

19990368

厚生科学研究費

# ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

霊長類を用いた遺伝子治療法の  
評価システム開発研究

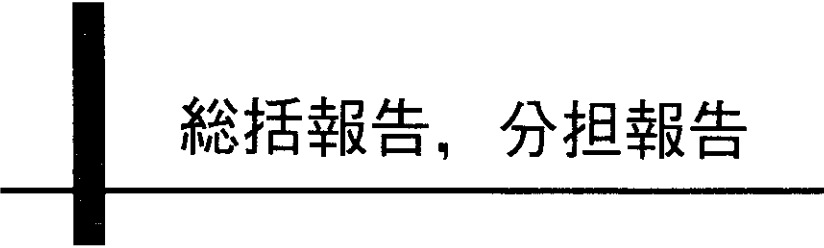
平成11年度 研究成果報告書

平成12年3月

班長 吉川 泰弘

東京大学大学院農学生命科学研究科





## 總括報告，分擔報告

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

総括研究報告書

## 霊長類を用いた遺伝子治療法の評価システム開発研究

吉川泰弘（東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授）

### 研究要旨

本研究班では宿主反応を指標にして類人猿を含む霊長類を用い ex vivo, 器官培養、in vivo での遺伝子治療法の安全性、有効性、安定性およびウイルスベクターのデリバリーに関する評価システムを確立することを目的としている。

新規開発ウイルスベクターの ex vivo での有効性を評価するための初代培養細胞系の開発と凍結保存に関しては実験がほぼ終了した。これらの細胞と非凍結末梢血細胞を含めセンダイウイルスベクターを中心に有効性と安全性の検討を始めた。カニクイザルを用いた骨髄幹細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムの評価系の開発については急速な進展を見せた。骨髄移植と骨髄幹細胞への遺伝子導入のハードとソフトのためのマニュアルが出来たので、今後の実験を通して SOP を確立することが必要である。チンパンジーではバイオプシー技術の展開（消化器系と呼吸器系）と骨髄細胞採取、関節と脳脊髄へのアプローチ法が開始された。今後 in vivo での遺伝子治療評価系の技術開発が必要となろう。霊長類疾患モデル家系の遺伝資源確保のため、胚や配偶子の保存方法、体外受精の基盤技術開発を進めた。その結果、胚移植による新生児の作成に成功し、霊長類生物資源の保持、再生が可能になった。また霊長類の胚、配偶子を用いる研究の基盤技術開発として、他種動物の生殖生物研究も進めた。

○吉川泰弘（東大院農学生命教授）  
寺尾恵治（感染研霊長類セ、室長）  
早坂郁夫（三和科学、霊長類  
パーク所長）  
山海直（感染研霊長類セ、  
主任研究官）  
加藤賢三（感染研、協力研究員）

河村清次（東大院農学生命助教授）  
黒田洋一郎（神経研参事研究員）  
中山裕之（東大院農学生命助教授）  
岡田詔子（東邦大医学部助教授）  
佐藤英明（東北大農学部教授）  
橋本光一郎（明治乳業主任研究員）

#### A. 研究目的

新規高度医療技術として、先天性遺伝子疾患、癌あるいはエイズ等の慢性感染症、生活習慣病や老人病に対し、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の適用が期待され、検討され始めている。今後わが国独自に開発されてくるウイルスベクターがヒトへの導入を考えたデザインであること、また導入される遺伝子がヒト由来の遺伝子であることから、ウイルスベクターによる生体内への遺伝子のデリバリー、安定性、安全性および有効性についてはヒトに最も近縁な類人猿を含む霊長類をもちいた評価系を確立することが急務である。遺伝子治療法の先進国である米国においては、しばしば非臨床試験をとばしてヒトでの臨床応用がなされてきた。そのため遺伝子治療法の有効性に関する疑義が提示されたことがあり、また高用量のウイルスベクター使用による死亡例のような問題が生じている。従って、遺伝子治

療の非臨床価試験は、出来る限り類人猿を含む霊長類を用いて行うべきであると思われる。また本研究班の用いる実験動物が齧歯類でなく類人猿を含む霊長類であることは研究の進展に時間を要すること、施設・設備に大きな費用がかかること、独自の技術開発が必要であることなどの欠点を持つ。しかし、そこで得られる成果は何よりも新医療技術としての遺伝子治療法が、社会一般に受け入れられるためのコンセンサスづくりに極めて有用である。

本研究班は、これに答えるべく *ex vivo* 評価のためのツールの開発（初代培養と凍結保存条件）と評価のマニュアル化、*in vivo* での遺伝子デリバリー（骨髄幹細胞への遺伝子導入、内視鏡での標的器官へのアプローチ）系の開発、遺伝子疾患モデルサルの生物資源(bio-resource)の保持と再生に取り組んでいる。

## B.C. 研究方法と研究結果

海外で開発され評価された既存のウイルスベクターあるいはリポソームのような新しい遺伝子ベクターを用いた遺伝子治療が、既にいくつかの大学病院でヒトに対し開始されつつある。他方、わが国で独自に開発されたウイルスベクターも近い将来ヒトへの応用が考えられている。本研究班は生体内でのウイルスベクターの安全性、安定性、有効性、デリバリーについて類人猿を含む霊長類を用いて、主に宿主の側から評価するための効率的なシステムの確立を目的としている。そのため、霊長類由来初代培養細胞を用いた ex vivo 評価、カニクイザル、チンパンジーを対象とした in vivo 評価システム、遺伝子のデリバリー、及び疾患モデルの開発等について研究を進めた。

1) 初代細胞を用いた評価法：カニクイザルクイザルの胎児（80日前後）を用いて、各種臓器由来組織を凍結保存し、初代培養細胞法の確立を試みた。培養を試みた臓器は肝、腎、肺、筋肉、心、胃、皮膚、小腸、膵、膀胱、骨髄、胸腺、脾、脳の14種類である。継代培養でほぼ線維芽細胞の混入なしに評価可能な組織は腎、肺、心、脳であった。このう

ち肺と腎は長期継代が可能であったが、20代以上では染色体数が異常となり、ex vivo 評価には5～15代の細胞が適していると思われた。これら4種の細胞ではいずれもセンダイウイルスベクターでの遺伝子発現は非常に高率であった。また初代神経系細胞培養ではシナプス形成を持つ神経回路が形成されるので、神経機能をマーカーとした ex vivo の安全性評価も可能と思われる。非凍結細胞としては末梢血細胞を標的として遺伝子導入の評価を進めている。

2) カニクイザル骨髄幹細胞への遺伝子デリバリー評価：骨髄自家移植システムを開発した。骨髄穿刺法と末梢動員法とで総回収細胞数、CD34陽性細胞数、プロジェニター数を比較し、移植細胞回収の至適条件を検討した。その結果、G-CSFとSCF併用投与またはG-CSF単独投与によるプライミングで効率よくCD34陽性細胞が回収されることが明らかになった。またカニクイザルで実施した骨髄移植後の経過を比較した結果、移植したCD34陽性細胞数が多いほどX線照射後の回復が早く、最低 $2 \times 10^6$ /KgのCD34陽性細胞の移植が必要であった。これらの結果をふまえてG-CSF投与スケジュー

ール、プラズマアフェレーシス法、CD34 陽性細胞の回収、遺伝子導入と放射線照射個体への移入、移植後の ICU における集中管理、輸血、抗生剤投与、検査間隔等について基本的なマニュアルを作成することが出来た。骨髄幹細胞への遺伝子導入効率と安定性評価法については検討を進めている。

3) In vivo 評価法の確立 : in vivo 評価をするための第1段階として、センダイウイルスベクターを用いて、幼若カニクイザルでの水平感染の有無を検索した。その結果付加型センダイウイルスベクターを鼻腔接種した個体では有意な抗体上昇が認められたが、同居非接種個体では抗体は検出されず、霊長類では感染性ウイルスの出現による水平感染の可能性はきわめて低いと思われた。またチンパンジーの場合は動物実験倫理からバイオプシーによる評価が主体になると思われる。そこで内視鏡を用い消化器系の他に呼吸器系（気管支粘膜上皮細胞）の採取、骨髄幹細胞を得るための骨髄穿刺法を確立した。また関節腔へのアプローチ、脳脊髄液採取のための基礎情報としてヘリ

カルCTによる検索を行い、当該部位の骨構造を明らかにした。

4) 疾患モデル動物の検索と生物資源の再生 : 自然発症モデルとしては老齡カニクイザルの老人斑を対象として、ヒトを含む各種動物の老人斑のフラクタル解析を行い、カニクイザル老人斑の特性を調べた。実験モデルとしては MPTP 投与によるパーキンソン病モデルの作出を試みた。0.5mg/Kg の MPTP を毎週静脈内投与した結果、投与開始 100 日目頃から反応の鈍さなどの症状が現れ、120 日過ぎからは四肢の麻痺が認められた。この症状は MPTP の投与を中止した後も持続した。一方、行動解析装置により発症したサルの手の動きを解析した結果、行動量（差分解析）と行動の周波数解析により症状の評価が可能であることが明らかになった。家系性網膜黄斑変性症や白内障等の動物モデル家系の遺伝資源確保のため、胚や配偶子の凍結保存、保存精子を用いた体外受精、初期胚培養、胚移植による新生児の作成に成功し、霊長類生物資源の保持、再生が技術的に可能になった。

#### D.E. 考察と結論

本研究班では類人猿を含む霊長類に対する遺伝子のデリバリー、細胞障害性、毒性、免疫応答、病理、副作用などの解析結果に基づき、ウイルスベクター等を用いた遺伝子治療法の評価をするための汎用性のあるマニュアルを作成することを目的としている。霊長類を用いて遺伝子治療法の有効性、安定性、安全性評価を行う場合、以下の3点について評価法を確立する必要がある。

- 1) 新規開発ウイルスベクターの有効性、安全性、安定性の評価 (ex vivo、器官培養及び in vivo)、
- 2) 骨髄幹細胞を含む標的組織、標的細胞への有効なドラッグデリバリーシステムの評価、
- 3) 霊長類疾患モデルを用いた遺伝子治療の有効性評価法の確立である。

本研究では、センダイウイルスをはじめウイルスベクターの ex vivo での有効性を評価するための初代培養細胞系の開発と凍結保存に関してはほぼ実験を終了し、センダイウイルスベクターを中心に有効性の検討を始めた。今後は初代細胞を継代することによる遺伝子発現に及ぼす影響を定性的及び定量的に測定し、再現性をもって利用できる限界を明らかにする必要がある。

カニクイザルを用いた骨髄幹細胞を

標的としたドラッグデリバリーシステムの評価系の開発については急速な進展を見せた。骨髄移植と骨髄幹細胞への遺伝子導入のハードとソフトのためのマニュアルが出来たので、今後の実験を通して SOP を確立することが必要である。またチンパンジーへの応用、汎用性幹細胞であるサル類及び類人猿の ES 細胞の作成を試みる必要があるかもしれない。

チンパンジーではバイオプシー技術の展開 (消化器系と呼吸器系)、バイオプシー技術を用いた器官培養系、in vivo での遺伝子治療評価系の技術開発が必要となろう。関節液、脳脊髄液を介した遺伝子治療法は将来、ヒトの慢性疾患の治療法として利用される可能性が強い。カニクイザルでデータ蓄積し、チンパンジーに応用する必要がある。

霊長類疾患モデル家系の遺伝資源確保のための研究として、カニクイザルの胚や配偶子の保存方法、体外受精、初期胚培養法を確立し、胚移植による新生児の作成に成功した。霊長類生物資源の保持、再生が可能になったことは、この分野で長い間研究が進められてきた技術の集大成で有り、当研究班のみならず、わが国にとって非常に大きな研究業績である。



## F. 研究発表

- 1) 輸入動物によるエマージングウイルスへの対策、吉川泰弘、SUT BULLETIN 2, 7-15, 2000.
- 2) サルの神経培養細胞 根岸隆之、河村晴次、吉川泰弘、黒田洋一郎、Brain Medical, 11, 58-65, 1999.
- 3) Bウイルス病 吉川泰弘 感染症とその治療 54, 170-180, 1999.
- 4) 動物由来感染症と検疫、吉川泰弘 臨床と微生物、26、279-286、1999
- 5) ペット動物をめぐる主な感染症とつきあい方 吉川泰弘 地域保健 3, 4-26, 1999.
- 6) 学校飼育動物と人獣共通感染症 吉川泰弘 MVM., 10、59-63、1999
- 7) サル由来のウイルス感染症 吉川泰弘 化学療法の領域 15、27-33、1999
- 8) 霊長類の輸入検疫等に関するOIE(国際獣疫事務局)の改正案について 吉川泰弘、川越真喜男、オペリスク 2、2-18、1999
- 9) Bウイルス感染症 吉川泰弘 pp 265-270、In エマージングディーズ 竹田美文、五十嵐章、小島荘明編 近代出版 1999
- 9) エボラ出血熱 吉川泰弘 pp 108-109、In 獣医感染症カラーアトラス、見上たけし、丸山務編、文永堂出版 1999
- 11) Opportunistic pneumocystis carinii infection in red-bellied tamarins (*Saguinus labiatus*). Kobayashi, R, Sakakibara, I., Furuta, T., Kikuchi, T., Yoshikawa, Y. Exp. Anim., 48, 55-57, 1999
- 12) Effect of SIVmac infection on peripheral blood CD4CD8 T lymphocytes in cynomolgus macaques. Akari, F., Nam, KH., Mori, K., Otani, I., Shibata, I., Adachi, A., Terao, K., Yoshikawa, Y. Clin. Immunol., 91, 321-329, 1999
- 13) Cyno-EBV induces rabbit malignant lymphomas and their tumor cell lines frequently show specific chromosomal abnormalities. Hayashi, K., Yanai, H., Koirala, T-H., Ohara, N., Teramoto, N., Oka, T., Yoshino, T., Takahashi, K., Miyamoto, K., Fujimoto, K., Yoshikawa, Y., Akagi, T. Lab. Invest. 79, 823-835, 1999.
- 14) An African green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and coexists with SIVagm. Murayama, Y., Mukai, R., Murayama, M., Yoshikawa, Y., Clin. Exp. Immunol. 117, 504-512, 1999
- 15) Accumulation of Mac387 macrophages in paracortical areas of lymph nodes in rhesus monkeys acutely infected with SIV. Otani, I., Mori, K., Sata, T., Terao, K., Doi, K., Akari, F., Yoshikawa, Y., Micro. Infect. 1, 977-985, 1999.

# マカク属サルを用いた遺伝子治療法の評価システムの開発に関する研究

分担研究者 寺尾恵治（国立感染症研究所・筑波霊長類センター）

## 研究要旨

カニクイザルを用いた遺伝子治療法の評価システムの開発を目的として、新規開発ベクターとしてセンダイウイルスベクター（SeV）の有効性と安全性評価、遺伝子デリバリーシステムとしての骨髄移植の安全性と有効性評価、遺伝子治療プロトコルの有効性評価に用いるパーキンソンモデルの作出を試み以下の結果を得た。

1) カニクイザルの末梢リンパ球サブセットへの SeV ベクターの遺伝子導入効率を GFP/SeV を用いて調査した。マクロファージ/単球とナチュラルキラー細胞には moi 依存性の高い感染率と遺伝子発現率が認められたが、リンパ球への導入効率はきわめて低かった。特に CD8+T 細胞では CD28+/CD8+細胞への導入効率は CD28-/CD8+細胞に比べて著しく低いことから、末梢リンパ球の分化段階により SeV の感染性が異なることが明らかになった（DNAvec 研究所との共同研究）。

2) SeV ベクターの安全性評価として、幼若カニクイザルでの水平感染の有無を調査した。その結果、 $2 \times 10^8$  の付加型 SeV を鼻腔接種した個体では有意な抗体上昇が認められたが、接触同居させた非接種個体では抗体は検出されなかった。このことから SeV は霊長類では感染ウイルスの出現による水平感染の可能性はきわめて低いと判断される（感染研・エイズセンターとの共同研究）。

3) 遺伝子デリバリーシステムの評価としての骨髄自家移植システムを開発した。骨髄穿刺法と末梢動員法とで総回収細胞数、CD34+細胞数、プロジェニター数を比較し、移植細胞回収の至適条件を検討した。その結果、G-CSF と SCF 併用投与または G-CSF 単独投与によるプライミングで効率よく CD34+細胞が回収されることが判った。一方、計 7 頭のカニクイザルで実施した骨髄移植後の経過を比較した結果、移植した CD34+細胞数が多いほど X 線照射後の回復が早く、最低  $2 \times 10^6$ /Kg の CD34+細胞の移植が必要と判断した（自治医科大学および DNAvec 研究所との共同研究）。

4) 特定の疾患を標的として前臨床の段階にある遺伝子治療法の有効性を評価するために、MPTP 投与によるパーキンソン病モデルの作出を試みた。0.5mg/Kg の MPTP を毎週静脈内投与した結果、投与開始 100 日目頃から反応の鈍さなどの症状が現れ、120 日過ぎからは四肢の麻痺が認められた。この症状は MPTP の投与を中止した後も持続した。一方、行動解析装置により発症したサルの手の動きを解析した結果、行動量（差分解析）と行動の周波数解析により症状の評価が可能であることを明らかにした（自治医科大学との共同研究）。

**キーワード** : カニクイザル、ウイルスベクター、骨髄幹細胞、パーキンソン病、行動解析

安定性、安全性および有効性については、前臨床試験としてヒトに最も近縁な霊長類を用いて評価する必要がある。さらに、遺伝子治療医薬品として開発の進んだ製剤については、霊長類を用いて遺伝子デリバリーシステムと治療プロ

## A. 研究目的

現在開発中の遺伝子治療医薬品の生体内での

トコルの有効性と安全性を評価する必要がある。

本研究では、マカク属サルを用いて 1) 新規開発ベクターの標的細胞での発現効率および安定性を評価するとともに、2) 生体内での安定性、安全性、有効性を評価する。ついで開発の進んだベクターについては 3) 遺伝子デリバリーシステムを含む有効な遺伝子導入法を確立し、4) 特定の疾患を標的とした遺伝子治療法の有効性を評価することを目的としている。

今年度は新規開発ベクター評価の対象として SeV ベクターについて、*in vitro* での末梢リンパ球への遺伝子導入効率の調査および *in vivo* での安全性評価のひとつとして水平感染の有無を調査した。さらに、骨髄幹細胞を標的とする遺伝子デリバリーシステムの安全性、有効性を評価する実験系を確立するとともに、特定疾患を治療対象とした遺伝子治療プロトコルの有効性評価を目的として、MPTP 投与による慢性パーキンソンモデルの作出と症状改善の評価指標の開発を行った。

## B. 材料と方法

### 1) SeV ベクターの *in vitro* での有効性評価：

成体雌カニクイザルの末梢血から分離したリンパ球に GFP 遺伝子を組み込んだ付加型センダイベクターを moi 5、10、50 で感染させた。感染後 24 時間目にリンパ球を回収し、PE 標識抗ヒト CD14 および CD20 モノクローナル抗体を用いた単染色または Cy5 標識 CD8 抗体と PE 標識抗ヒト CD4、CD16、CD28 モノクローナル抗体とをそれぞれ併用した二重染色を行った。染色後ホルマリン固定したリンパ球を FACSCalibur で解析し、それぞれの表面抗原陽性細胞での GFP (FITC) 発現細胞の比率を計測した。

### 2) SeV ベクターの *in vivo* での安全性評価：

8 ヶ月齢の幼若カニクイザル (雌雄各 2 頭)

を幅 45cm、高さ 60cm、奥行き 60cm の金属製ケージに雌雄 1 頭ずつ同居させた。一週間後に、同居している 2 頭のサルの 1 頭 (雄 1、雌 1) に、 $2 \times 10^8$  CFU/50ul の HIV gp120 を組み込んだ野生型 SeV を鼻腔内接種した。接種後 2、7、10、14、21、35 日目に 4 頭のサルから 1ml の末梢血を採血し、分離した血清を -80C で保存した。

血中の抗 SeV 抗体の測定は、SeV virion をコートしたプレートを用いた ELISA 法でおこなった。1000 倍に希釈した血清をプレートに分注し、抗原結合 IgG 抗体を HPO-標識抗サル IgG 抗体で検出した。なお、陽性と陰性のカットオフポイントを決定するため、陽性標準血清を 100 倍から 2 倍段階希釈して、ELISA 反応をおこなった。

### 3) 骨髄幹細胞を標的とした遺伝子デリバリーシステムの有効性、安全性の評価：

3~5 歳齢の育成カニクイザル計 14 頭を用いて 2 種類の骨髄採取法 (骨髄穿刺法、末梢動員法) での細胞回収効率を比較した。両法とも G-CSF および SCF によるプライミングでの投与量もあわせて調査し、カニクイザルを用いた骨髄採取法の標準化を試みた。プライミングは G-CSF 単独または SCF との併用で、3 種の異なった量のサイトカインを 5 日間連続で投与した。2 頭のサルでは 1 日の投与量を午前と午後の 2 回に分けて投与した。プライミング後、骨髄穿刺法またはアフレーシス法で細胞を回収し、総回収細胞数、CD34+細胞数、コロニーアッセイによる CFU 数を比較した。

カニクイザルの骨髄移植における移植細胞数と X 線照射による骨髄抑制からの回復時期との関係を調査した。7 頭のカニクイザルの寛骨から直接穿刺法で 50ml の骨髄を採取した。骨髄から CD 34+細胞をマグネットビーズで単離したのち、マウスレトロウイルスベクターを導入した。1000Rx2 回の致死量の X 線を照射したサルに、異なった細胞数の CD34+細胞を移植し、移

植後の白血球数および血小板数の変化を調査した。

#### 4) 遺伝子治療法の評価を目的としたカニクイザルのパーキンソンモデルの開発:

神経毒である MPTP の静脈内投与によるパーキンソンモデルの作出を試みた。2 歳半の雌カニクイザルに 0.5mg/Kg の MPTP を週一回で連続して静脈内投与した。投与後毎日 5 分間行動観察を行い、異常行動の出現を以下のスコアで定量化した。スコア 0.5: 体重減少、食欲不振、あくび、反応の鈍さ、スコア 1: 無関心、体重減少、手を使う行動の鈍さ、スコア 2: 無動、対光反射消失、失調症状、手の震え、眼瞼下垂、麻痺、四肢の運動麻痺、スコア 3: 傾眠傾向、四肢麻痺、スコア 4: 昏睡、スコア 5: 死亡。

遺伝子治療の有効性評価に用いる症状の改善を判定する客観的な指標を確立する目的で、自動行動解析装置を用いて手の運動を解析した。ケージ全面に干しぶどうを置き、これをサルが手を伸ばしてつかみ取る行動をビデオテープで記録し、つかみ取り行動の行動量を差分解析するとともに、動きの周波数を分析した。

### C. 結果及び考察

1) SeV ベクターのカニクイザル末梢リンパ球への遺伝子導入効率: 図 1 に主要リンパ球サブセットにおける SeV ベクターによる GFP 遺伝子の導入効率を示す。解析対象としたサブセットは、CD4+/T 細胞、CD4+/CD8+/T 細胞、CD28-/CD8+/T 細胞、CD28+/CD8+/T 細胞、CD20+/B 細胞、CD8+/CD16+/NK 細胞、CD8-/CD16+/NK 細胞、CD14+/マクロファージの 8 種類である。図に示すように、CD8-/CD16+/NK 細胞と CD14+/マクロファージでは moi に依存した高率の SeV の感染と GFP 遺伝子発現が認められた。一方、CD8+/CD16+/NK 細胞での導入効率は CD8-/NK

細胞に比べて低かった。これらのサブセットに比べると、CD4+/T 細胞と CD20+/B 細胞での導入効率はきわめて低かった。CD8+/T 細胞亜集団での比較では、CD28+/CD8 細胞に対する導入効率がきわめて低いのにに対し、CD28-/CD8 細胞での導入効率は T リンパ球中最も高かった。

カニクイザルの末梢リンパ球の表現型と機能に関してはこれまでに、1) CD4、CD8 のいずれの T 細胞においても、CD28 陽性の亜集団が Naive T 細胞、CD28 陰性の亜集団が Memory T 細胞としての機能を持つこと、2) CD16+/NK 細胞では、CD56 および DR 抗原の発現からみて、CD8-/CD16+/NK 細胞がより分化した NK 細胞と見なされること、を明らかにしている。今回の結果から、SeV ベクターの感染効率または遺伝子発現効率が末梢リンパ球の分化段階により影響を受けること、自然抵抗性に関わる免疫細胞 (NK およびマクロファージ) と記憶免疫に関わる T および B リンパ球とで感染効率に差があることが判明した。今回の結果は、SeV のカニクイザル末梢リンパ球に対する遺伝子発現効率を比較した結果であり、感染効率が直接評価できるものではないが、今後は遺伝子導入効率の異なるリンパ球サブセットを用いて、SeV の感染性、細胞内動態、遺伝子発現性など、遺伝子発現の差に関わる因子を解析し、SeV の特性の一端を明らかにする必要がある。

2) カニクイザルでの SeV ベクターの水平感染性の評価: 新規に開発されたウイルスベクターの安全性評価の一つとして、ベクター接種個体での感染性ウイルスの増殖と非感染個体への水平感染の有無を確認する必要がある。今年度はカニクイザルを用いた水平感染否定試験のプロトコルの確立を目的として、感染感受性が高いと考えられる離乳直後の幼若カニクイザルを接触同居させる方法を試みた。同居個体での水平感染を確認する最も感度の高い検出系として、

血中のウイルス抗体出現の有無を調査した。図 2 に二組の同居ザル（#001 と #002、#003 と #005）の一方の仔ザル（#001 および #005）の鼻腔内に  $2 \times 10^8$  CFU の SeV を接種した後の血中 ELISA 抗体価の変化を示す。図に示すように、接種個体では接種後 10 日前後から血中抗体が出現し、3 週目をピークに抗体価は上昇した。一方、接触同居させた非接種個体では接種後 1.5 ヶ月の観察期間中に抗体は全く検出されなかった。接種後 21 日以降にわずかな OD 値の上昇が認められるが、同時に測定した陽性標準血清でのカットオフポイントが OD0.3 であり、非感染ザルでの OD 値の上昇は有意なものといえない。霊長類への SeV 感染に関する情報は少ないが、今回の結果からみて、SeV は霊長類に感染するが、宿主内での感染性ウイルスの増殖と水平感染の危険性はきわめて低いと判断される。

#### 2) カニクイザルの骨髄移植技術の確立：

骨髄幹細胞を標的とした遺伝子デリバリーシステムの有効性を評価するために、カニクイザルの骨髄自家移植法の標準化を試みた。まず始めに遺伝子導入のキャリアーとなる骨髄細胞の採取法について骨髄穿刺法と末梢動員法の 2 種類の方法を確立した。表 1 に異なったプライミング法での細胞回収率を比較した結果を示す。骨髄穿刺法では G-CSF および SCF でプライミングした場合にはサイトカインの投与量に比例して回収細胞数が増加した。これらの結果を基にして、経済的理由も考慮しつつ、最終的に G-CSF および SCF のそれぞれ 50ug/Kg/日量を午前と午後の 2 回に分けて投与するプライミング法が最適と判断した。一日 2 回投与を考案した理由は、G-CSF と SCF の血中半減期が比較的短いことから、サイトカインの作用を持続するために一日二回投与が有効と判断したためである。

末梢動員法においても、サイトカイン投与量と細胞回収率には相関関係が認められたが、今

後 G-CSF および SCF のそれぞれ 50ug/Kg/日量を午前と午後の 2 回に分けて投与するプライミング法の有効性を例数を増やして検討する予定である。

カニクイザルを用いて X 線照射後にウイルスベクターを導入した CD34+細胞を自家移植する遺伝子デリバリーの評価プロトコルは昨年度に確立した。今年度は異なった標識遺伝子でマーキングした骨髄移植を実施し、プロトコルの有効性を評価すると共に、骨髄抑制からの回復経過を比較した。表 2 に 7 頭のカニクイザルで骨髄移植を行った結果を移植細胞数と回復経過で示す。幸いなことに、これまでのところ骨髄移植実験では死亡例がないが、表 2 に示すように回復過程は実験ごとに異なっている。最も回復が早かったのは、採取した全骨髄を移植した BMT-1 であるが、CD34+細胞を移植した 6 例では、体重あたりの移植細胞数が多いほど回復が早い傾向があった（例えば BMT-4）。その意味でも、サイトカインによるプライミングが有効であると判断される。

これら 7 頭の移植実験では、骨髄抑制からの回復の指標として、最低白血球数および最低血小板数と白血球数と血小板数がそれぞれ 1000、50000/ul に回復した移植後の日数をとりあげた。表に示すように、これらの指標が回復過程の評価に有効であると判断されることから、今後は骨髄幹細胞を標的とするベクターの有効性評価の指標として移植後の遺伝子発現効率とあわせて、回復過程の評価を行うことが可能となった。

4) カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの開発：特定の疾患を標的とした遺伝子治療プロトコルの有効性評価を目的として、MPTP 投与によるパーキンソンモデルの作出と症状の客観的評価法の開発を試みた。図 3 は低濃度の MPTP を長期投与することにより、慢性的なパーキンソン症状を引き起こすことに成功した例

である。このサルでは、毎週 1 回の MPTP 静脈内投与により、投与開始 100 日頃から、無関心、体重減少などの症状が現れ始めた。120 日以降には手の震えや失調症などより重篤な症状が持続し始めると共に、時として四肢麻痺や傾眠傾向などの症状もみられるようになった。さらに、170 日目で MPTP の投与を中断した後でもこれらの症状は 2 ヶ月近く持続し、慢性的なパーキンソン症状を示す病態モデルが確立できたと判断した。この個体に対して、ドーパミン合成酵素を組み込んだ AAV ベクターの脳内投与による遺伝子治療を試みた結果は共同研究者から報告される。

パーキンソン病を標的とした遺伝子治療プロトコルの有効性評価では、症状の改善を客観的に評価する指標の確立が必須となる。前述した MPTP 投与モデルサルについて、自動行動解析装置を用いて手の動きを解析し、症状の評価が可能か否かを検討した。サルケージ前面にセットした板に干しぶどうを置き、サルが手を伸ばして干しぶどうをつかむ動作をビデオテープに記録した。この一連の行動について時間あたりの運動量を差分解析により、また動作の連続性を周波数解析で求めた。図 4 に発症前 (Normal) と発症後 (MPTP) の手の動きを解析した結果を示す。発症前 (Normal) では、時間あたりの運動量は連続した一峰性のグラフとなり、周波数解析でも 1Hz 付近に大きな山が観察されることから、手を伸ばして干しぶどうをつかんで手を戻す、という行動は連続した一つの行動であると判断できる。一方、発症後 (MPTP) では時間あたりの運動量が二峰性を示し、1Hz の周波数のピークが消失して 2Hz 付近にピークが現れている。実際の観察でも発症したサルでは干しぶどうに向かって手を伸ばす行動と干しぶどうをつかんで戻すという行動の間に休止期が入ることが観察されている。発症により干しぶどうと

いう小さな標的を掴みにくくなっているためと判断される。行動解析結果はこのような手の運動傷害を数値化することが可能であることを示しており、今後遺伝子治療の有効性評価に有用なシステムと判断できる。

## D. 結論

カニクイザルを用いた遺伝子治療法の評価系の開発を行い以下の結果を得た。

1) SeV ベクターの末梢血リンパ球への遺伝子導入効率は、サブセットにより異なることから、リンパ球の分化段階の違いにより、SeV の感染率、細胞内動態、遺伝子発現率が異なることを明らかにした。

2) 感染感受性の高い幼若カニクイザルを用いた接触同居実験で SeV が水平感染しないことから、霊長類での水平感染の危険性はきわめて低いと判断した。

3) カニクイザルの骨髄細胞採取法の標準プロトコルを確立した。骨髄移植では骨髄抑制からの回復を評価する指標を選抜し、骨髄幹細胞を標的とした遺伝子デリバリーシステムの安全性評価を目的とした標準プロトコルを確立した。

4) 神経毒 MPTP の低濃度長期連続投与により、慢性的な症状を示すパーキンソンモデルの作出に成功した。発症したサルの手の運動を解析し、症状の改善を評価する指標を確立した。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) MURAYAMA, Y., TERAOKA, K. and INOUE-  
MURAYAMA, M. (2000) Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. HUMAN IMMUNOLOGY, -in press-
- 2) YOSHINO, N., AMI, Y., TERAOKA, K., TASHIRO, F. and HONDA, M. (2000) Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines

and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys using anti-human crossreactive antibodies. EXPERIMENTAL ANIMALS, -in press-

- 3) NAKAJIMA, T., NAKAMARU, K., IDO, E., TERAOKA, K., HAYAMI, M. and HASEGAWA, M. (2000) Development of novel nonpathogenic simian immunodeficiency virus vector carrying dual gene expression system. -Submitting-
- 4) AGEYAMA, N., SHIBATA, H., NARITA, H., HANARI, K., KHONO, A., ONO, F., YOSHIKAWA, Y. and TERAOKA, K. (2000) Specific gravity of whole blood and total blood volume in nonhuman primates. -submitting-

## 2. 学会発表

- 1) 肥田宗友、鈴木 穰、寺尾恵治、菅野純夫 マカク脳の部位特異的 cDNA ライブラリーの作製と解析、第 21 回日本分子生物学会、1998 年 12 月、横浜
- 2) 揚山直英、柴田宏昭、成田勇人、羽成光二、鴻野あや子、小野文子、寺尾恵治 実験用サル類の循環全血量及び血液比重、第 46 回日本実験動物学会、1999 年 5 月、市川
- 3) 肥田宗友、鈴木 穰、日尾有宏、寺尾恵治、平井百樹、菅野純夫、ヒトとの 5'UTR (untranslated region) の比較を中心としたカニクイザルの脳部位特異的 cDNA ライブラリーの解析、第 15 回日本霊長類学会、1999 年 6 月、宮崎
- 4) 吉野直人、網 康至、寺尾恵治、田代文夫、本多三男、非ヒト霊長類モデルの免疫病態解析のための抗ヒト抗体交叉反応性、第 9 回日本サイトメトリー学会、1999 年 8 月、札幌
- 5) 川崎勝義、池口邦彦、村松慎一、静間奈美、山海 直、寺尾恵治、小山高正、吉川泰弘、パーキンソン病の重症度判定における動画差分処理の応用、第 29 回日本神経薬理学会、1999 年 9 月、広島
- 6) 揚山直英、柴田宏昭、成田勇人、羽成光二、小野文子、花園 豊、小澤敬也、吉川泰弘、寺尾恵治、カニクイザルを用いた造血幹細胞の自家移植システムの確立、第 128 回日本獣医学会、1999 年 10 月、熊本
- 7) Nakajima, T., Nakamaru, K., Ido, E., Terao, K., Hayami, M. and Hasegawa, M. Nonpathogenic SVIAGM-based SIN vectors which carry a novel dual gene expression system. European Congress of Gene Therapy, 1999.11.25-28, Munich, Germany.
- 8) Hanazono, Y., Ageyama, N., Shibata, H., Nagashima, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Kato, I., Kume, A., Ozawa, K. and Terao, K. In vivo discrepancy of carrying the GFP gene between progenitors and circulating cells after cynomolgus monkey stem cell transduction and transplantation. Annual Congress of American Society of Hematology, 1999.12.7., New Orleans, USA
- 9) 寺尾恵治、マカク属サルを用いた遺伝子治療法の評価—その戦略と現状—、研究会「サルモデル系での遺伝子治療研究」1999 年 11 月、犬山
- 10) 寺尾恵治、遺伝子治療研究での霊長類モデルの必要性とその戦略、第 6 回遺伝子治療研究会ワークショップ、1999 年 11 月、東京

図1：カニクイザル末梢リンパ球サブセットへのGFP/SeVベクター導入効率

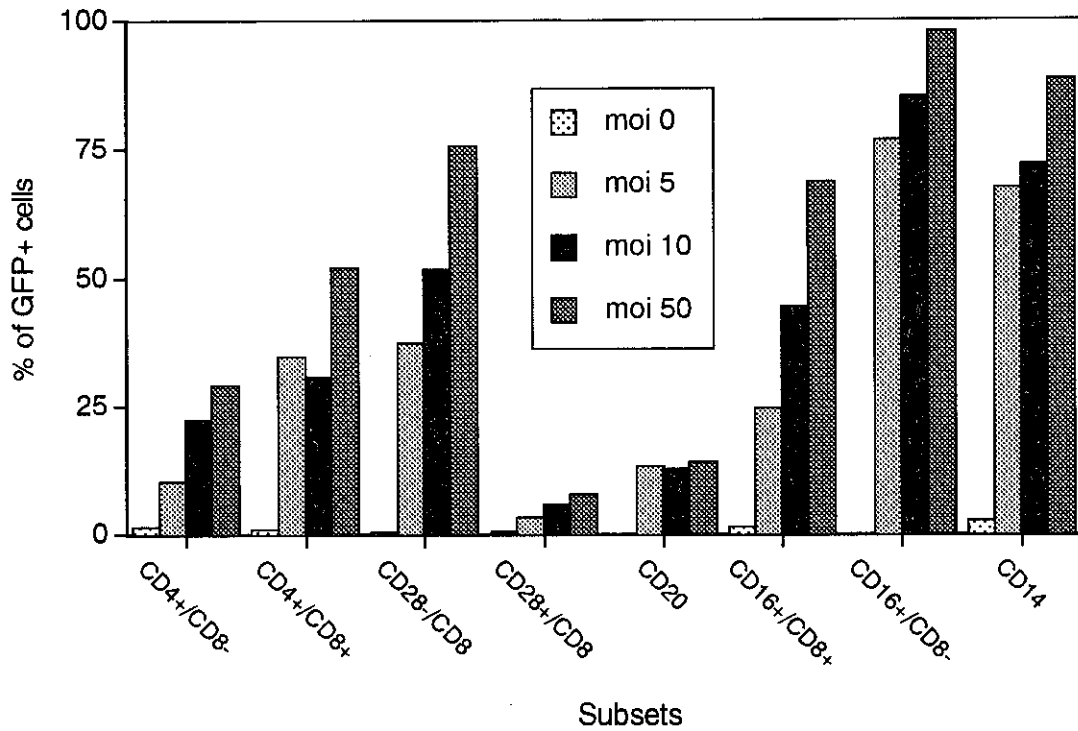


図2：SeVベクターの若齢カニクイザルでの水平感染試験  
(血中ELISA抗体価の推移)

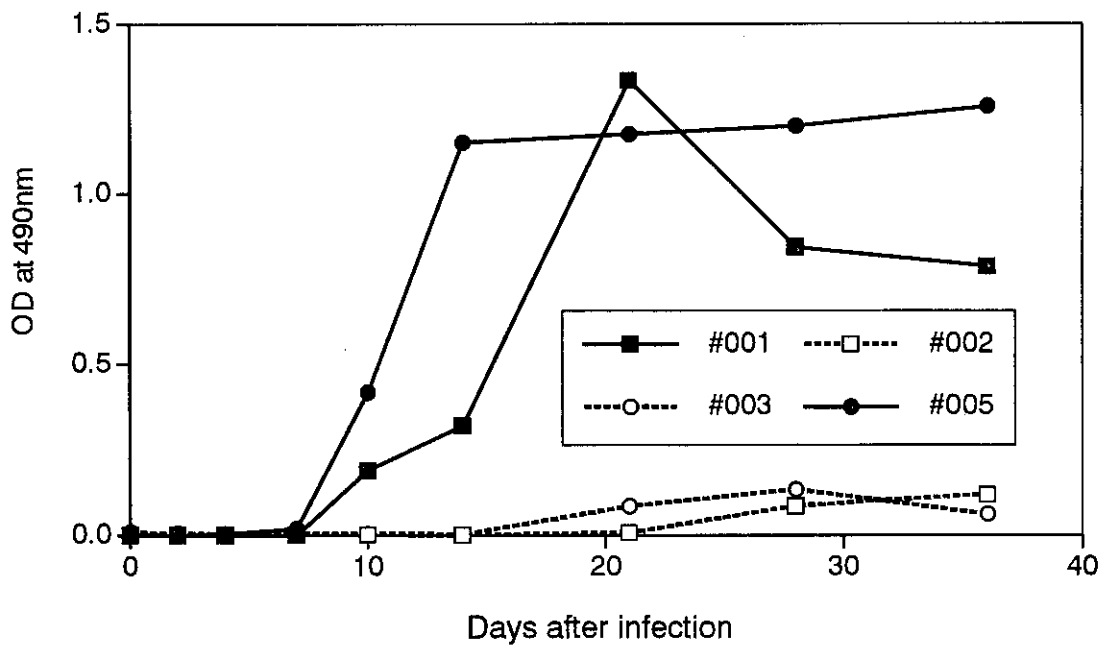




表1：骨髓穿刺法と末梢動員法での回収細胞数、CD34+細胞数、プロジェクト数一数の比較

Priming条件	供試動物数	総回収細胞数 (in billions)	CD34+ cells (in millions)	CFU			
				回収細胞 (in millions)	CD34+細胞 (in millions)	回収率(%)	濃縮率(倍)
-	2	0.68 ± 0.02	6.5 ± 3.2	0.67 ± 0.39	0.40 ± 0.30	51 ± 14	61 ± 16
G-CSF (10 ug/kg) SCF (50 ug/kg)	2	0.64 ± 0.09	12.0 ± 5.0	2.38 ± 0.34	1.12 ± 0.07	48 ± 3	30 ± 11
G-CSF (50 ug/kg) SCF (50 ug/kg)	3	1.40 ± 0.28	15.2 ± 4.2	4.42 ± 1.59	2.05 ± 0.89	46 ± 9	47 ± 23
G-CSF (100 ug/kg) SCF (200 ug/kg)	1	2.69	37.5	9.95	6	60	43.2

末梢動員法

Priming条件	供試動物数	総回収細胞数 (in billions)	CD34+ cells (in millions)	CFU			
				回収細胞 (in millions)	CD34+細胞 (in millions)	回収率(%)	濃縮率(倍)
-	1	0.60	ND	ND	ND	ND	ND
G-CSF (10 ug/kg) SCF (50 ug/kg)	1	3.40	6.3	5.61	0.68	12	64
G-CSF (50 ug/kg) SCF (50 ug/kg)	1	5.45	20.2	14.17	4.75	34	90
G-CSF (100 ug/kg)	2	5.77 ± 2.61	11.4 ± 5.0	2.31 ± 1.05	0.62 ± 0.37	40 ± 10	125 ± 25
G-CSF (100 ug/kg) SCF (200 ug/kg)	1	3.90	ND	ND	ND	ND	ND

表2：カニクイザルを用いた自家骨髄移植後の回復経過

実験番号	プライミング条件	採取骨髄数 ( $\times 10^9$ )	総骨髄細胞数 ( $\times 10^9$ )	移植CD34+細胞数 ( $\times 10^6$ )	CD34+細胞数/kg ( $\times 10^6$ )	最低白血球数 (/ul)	白血球数回復日数 ( $> 1000$ /ul)	最低血小板数 (/ul)	血小板数回復日数 ( $50,000$ /ul)
BMT1	-	1.1	NA	NA	NA	1,300	NA	83,000	NA
BMT2	-	1.0	0.70	3.30	1.38	400	Day 13	23,000	Day 15
BMT3	-	0.83	0.66	9.72	4.23	500	Day 10	67,000	NA
BMT4	G-CSF (100 ug/kg) SCF (200 ug/kg)	2.99	2.69	37.5	16.30	700	Day 12	26,000	Day 17
BMT5	G-CSF (10 ug/kg) SCF (50 ug/kg)	1.2	0.72	17.0	8.10	300	Day 14	40,000	Day 14
BMT8	G-CSF (50 ug/kg) SCF (50 ug/kg)	2.16	1.63	16.7	7.26	700	Day 10	145,000	NA
BMT9	G-CSF (50 ug/kg) SCF (50 ug/kg)	2.19	1.47	10.4	4.16	700	Day 14		

図3 : MPTP投与によるパーキンソンモデルの作出

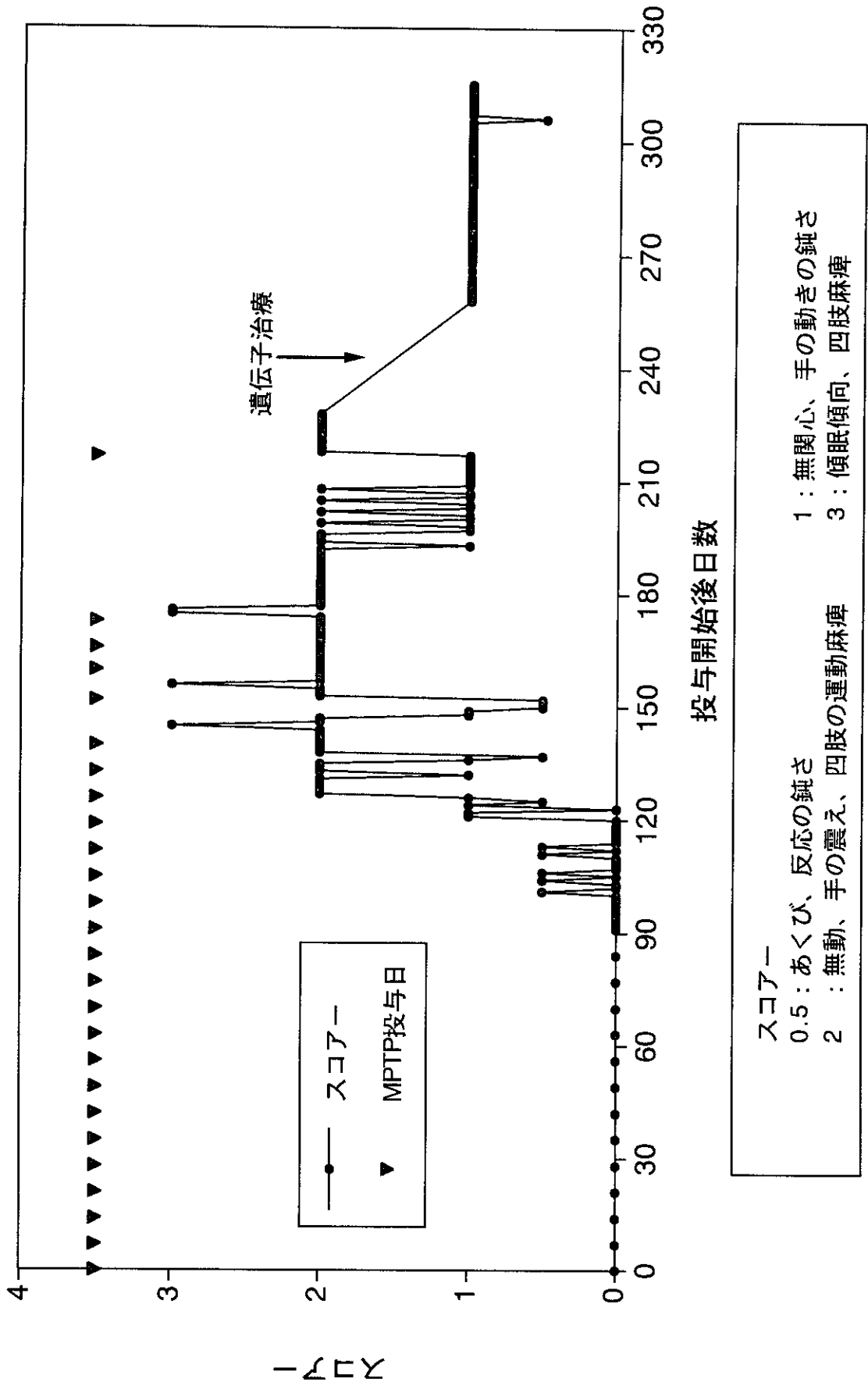
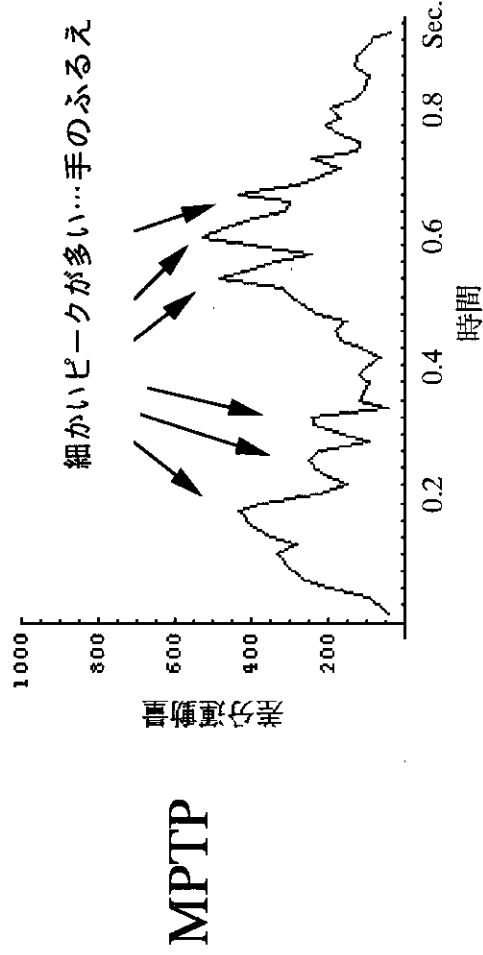


図4：パーキンソンモデルザルでの手の動きの差分および周波数解析

時間-差分量



周波数解析

