

**分担研究報告書**  
**チンパンジーを用いた遺伝子治療の有効性・**  
**安全性評価方法の開発に関する研究**

分担研究者 早坂 郁夫\*

協力研究者 富永 壽和\* 吉本 信彦\* 田上 哲也\*  
              武士俣 清彦\* 鵜殿 俊史\* 友栗 徹士\*  
              森 裕介\* 春山 清\* 熊澤 俊彦\*  
              浅野 幸康\*  
              中市 統三\*\* 佐藤 圭創\*\*\* 松井 政則\*\*\*\*

\* (株)三和化学研究所熊本霊長類パーク

\*\* 山口大学農学部付属家畜病院

\*\*\* 熊本大学医学部第一内科

\*\*\*\* 埼玉医科大学微生物学教室

**研究要旨**

チンパンジーを用いた遺伝子治療法評価システムの確立を目的として、次の4実験を実施した。

- (1) 呼吸器系疾患に対する遺伝子治療法評価方法の開発を目指して、チンパンジー気管支の解剖学的所見を得る目的で、ヘリカルCTを用いて気管支の大まかな形態を把握した後、内視鏡を用いて気管支の主要な分岐構造を明らかにした。さらに鏡視下、バイオプシーにて気管支粘膜を採取する手技を確立した。
- (2) 中枢神経疾患、慢性関節リウマチに対する遺伝子治療法評価方法の開発を目指して、チンパンジーへの後頭下穿刺および膝関節腔穿刺方法を検討するために、ヘリカルCTを用いて頭頸部と膝関節部の骨の構造を明らかにした。
- (3) 造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法評価方法の開発を目指して、チンパンジーの造血幹細胞を得るための手段として骨髄採取方法を確立した。
- (4) DNA ワクチンなど免疫反応を介した遺伝子治療法評価の際に必要な、供試個体の遺伝的背景を把握する目的で、チンパンジー6頭についてMHCクラスI遺伝子型を決定した。

**A. 研究目的**

遺伝子治療研究をチンパンジーを用いて進展させるための基礎として、チンパンジーの解剖学的検討は必須である。1) 遺伝子治療用ベクターの *in vitro* 評価に用いる臓器・組織のバイオプシー技術の確立のため、さらに生体における *in vivo* の遺伝子治療評価に向けて、2) 遺伝子

治療用ベクターの投与技術開発、3) *in vivo* におけるベクター遺伝子発現確認技術の開発、4) 生体内の情報を得るための体腔液採取技術の確立などを効率良く進めていくためには、チンパンジーの剖検所見を踏まえた上で、生きたチンパンジーから可能な限り非侵襲的な手法を用いて臓器の形態情報を捕捉することが必要である。

昨年度、内視鏡を用いて上部消化管および大腸の形態の観察と胃および直腸粘膜のバイオプシー方法を確立したのに続いて、本年度は内視鏡およびヘリカルCTを用いて、気管支の形態の解明と気管支粘膜のバイオプシー方法の確立を試みた。また中枢神経系においては、昨年度MRIによる頭部の撮像を行い3次元解析により脳の表面および内部構造を明らかにし、本年度はヘリカルCTを用いて後頭下穿刺の可能性を検討した。さらに本年度は膝関節腔穿刺方法の検討をヘリカルCTを用いて行った。

造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法をチンパンジーを用いて評価するために、チンパンジーの造血幹細胞採取手技を確立させることが急務である。我々は一昨年MRIを用いた検討を行い、脂肪化の認められない赤色髄を安全かつ確実に骨髓穿刺法にて採取できる部位に腸骨を選定した。本年度は実際に腸骨から骨髓を採取し、骨髓細胞中の造血幹細胞の存否を確認した。

DNA ワクチンなど免疫反応を介した遺伝子治療の有効性や安全性評価を行う際、免疫反応に直接関係する遺伝的な因子としてのMHC抗原遺伝子型を把握しておくことは大変重要である。Inchauspeら<sup>1)</sup>はHCVに対するDNAワクチンを構築し系統の異なる3種のマウスに投与したところ、投与後の免疫反応に大きな差があったことを示し、MHCによる抗原提示の様式の違いによるものと推察している。免疫系においてMHCタンパクはウイルス等の感染細胞排除の役割を担う細胞傷害性Tリンパ球(CTL)へ抗原ペプチドを提示するMHCクラスI分子と免疫系全体の活性化をつかさどるヘルパーT細胞へ抗原提示するMHCクラスII分子が知られている。我々は当研究所に保有するチンパンジーについてMHCクラスI(Patr-A, -B, -C)遺伝子型の決定を開始し、本年度は6頭について明らかにした。

## B. 研究方法

### 1. チンパンジー気管支のヘリカルCTおよび内

### 視鏡を用いた形態観察と気管支粘膜のバイオプシー

#### (1) ヘリカルCTによる胸部の撮影

Ch44 テツ♂(63.8kg、23才)に対して、ケタミン5mg/kg i.m.とメドトミジン50μg/kg i.m.の併用による麻酔下、胸部のCTスキャンをスリッピングCTスキャナ(PRATICO、日立メディコ)を用いて、管電圧:120kV、管電流:150mA Collimation:3mm、table index:5mm/sec、scan time:1secの条件で施行した。

#### (2) 気管支の内視鏡観察とバイオプシー

Ch46 タロウ♂(52.4kg、22才)を用いた。実施日の朝、ふかしいも300g、バナナ2本を与えた後、実施までの9時間は食事を与えなかった。麻酔はケタミン5mg/kg i.m.およびメドトミジン50μg/kg i.m.の併用により行った。この時、気道分泌を抑制するため硫酸アトロピン0.25mg/body i.m.も併せて行った。なおpositive reinforcement trainingによる自発的な投与の受け入れにより、挾体装置を使用することなく導入麻酔を行った。体位は仰臥位とし、気管チューブ(内径:9.5mm)を口腔より咽頭部を経て、気管に挿入した。外側にリドカイン(キシロカインゼリー)を適量塗布した気管支用ビデオスコープ(オリンパス:BF-P240、最大外径:約6mm)を口腔より気管チューブ内を経由して気管に挿入した。気管を経て気管支の内部を観察後、内視鏡用バイオプシー鉗子を用いて、鏡視下、気管支分岐部のspurにおける粘膜のバイオプシーを行った。バイオプシー部位の出血は、エピネフリンを含む2%リドカイン液を適量散布することによって止血した。

#### (3) 気管支粘膜の組織学的検討

バイオプシーにより採取した粘膜片を0.1Mリン酸緩衝3%グルタルアルデヒド液で3時間前固定、続いて1%オスミウム酸で2時間後固定し、常法に従いエポキシ樹脂に包埋後、超薄切

片を作製し、酢酸ウラニルおよび鉛染色を施した後、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

## 2. ヘリカルCTを用いたチンパンジーに対する後頭下穿刺と膝関節腔穿刺方法の検討

ヘリカルCT撮影は実験方法1. (1)に記載した、Ch44 テツ♂の胸部撮影時に、併せて実施した。スキャン条件は管電圧:120kV、管電流:200mA(頭部) or 150mA(頸部・膝関節部)、collimation:2mm(頭頸部) or 3mm(膝関節部)、table index: 2mm(頭頸部) or 5mm/sec(膝関節部)、scan time:1secであった。

スキャンデータはvolume rendering (VR)法により再構成し骨を3次元画像で表示した。頭頸部の画像からは後頭下穿刺の可能性を評価し、また膝関節部の画像においては過去の膝関節腔造影結果を踏まえて穿刺位置の検討を行った。

## 3. チンパンジー骨髄の採取と評価

Ch7 ラッキー♂ (49.5kg、25才)を用いた。前日の夕方より実施まで食事を与えなかった。Positive reinforcement trainingにより、ケタミン 5mg/kg i.m. とメデトミジン 50 μg/kg i.m. の併用による無拘束の麻酔導入を行い、腸骨部位の背部外表を広範に剃毛後、気道確保のため気管チューブを挿管し、チューブを塞がないように側臥位に近い伏臥位に保定した。呼吸数、動脈血酸素飽和度、心拍数、血圧、心電図のモニターを開始し、少量の血液の採取と抗生物質のアンプシリン・クロキサシリンナトリウム 500mg/body i.m. 投与を行った。

チンパンジーの腸骨の後縁部を触って確認後、外表をイソジンおよびイソプロパノールにて消毒した。術野以外は滅菌オリーブで覆い、以後手術は無菌的に行った。骨髄穿刺針を左右に交互に回転させながら加圧し、腸骨上後腸骨棘と下後腸骨棘の間に穿刺した。骨質を通過し髄腔内に達したところで刺入を止め、内針を抜去した。少量のヘパリンを含む30mlの注射筒を骨

髄穿刺針に接続して、一気に強く吸引し、骨髄液の吸引量が約5mlに達したところで骨髄穿刺針を抜去した。さらに穿刺部位を変え、両側の腸骨からの総採取量が50mlに達するまで同様に穿刺を繰り返した。採取終了後、骨髄穿刺部をガーゼで圧迫止血後、イソジンで消毒した。また止血のためカルバゾクロムスルホン酸ナトリウム 10mg/body i.m. 投与を行い、さらに少量の血液を採取した。術前、術後の血液については血液学的検査、血液生化学的検査を行い、塗抹標本作製後血液細胞形態も観察した。

十分な覚醒が得られた後、消炎鎮痛剤ナプロキセン 200mg p.o. 投与を行った。さらに翌日から術後3日目までナプロキセン 200mg p.o. 投与とアンプシリン・クロキサシリンナトリウム 500mg p.o. 投与を1日2回行った。術後2週間は貧血症状の発現に注意して、症状観察を続けた。

採取した骨髄については、磁気ビーズ法によるCD34陽性細胞の回収を経て、コロニーアッセイにより造血幹細胞の存否が確認された。これらの分析は分担研究者の寺尾恵治先生と柴田宏昭先生(国立感染症研究所)により実施された。

## 4. チンパンジーMHCクラスI (Patr-A, -B, -C) 遺伝子型の決定

4頭の野生由来チンパンジー (Ch8 ブラック♂、Ch12 ヒトミ♀、Ch44 テツ♂ および Ch82 ススム♂) と2頭の F1 世代チンパンジー (Ch201 ケン♂: ヒトミとブラックの子および Ch205 ケンジ♂: ヒトミとテツの子) のヘパリン血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法により末梢血単核球(PBMC)を分離し、PBMC 約  $5 \times 10^6$  個を出発材料とした。RNA 分離用試薬を用いて全 RNA を抽出した後、Dynabeads Oligo(dT)kit (Dyna) を用い mRNA を分離した。次に、分離した mRNA の一部を Oligo-(dT)<sub>12-18</sub> プライマーと M-MLV 由来逆転写酵素(Promega)を用いて cDNA を合成した。

さらにcDNAの一部をPCRに供しPatrクラスI cDNAsを増幅した。PCRに用いたプライマーはHLAクラスI (A,B,C) 遺伝子の5'UTRおよび3'UTR領域に設定されたものに若干の変更を加えた1ペアのプライマー (sense: 5UTN, anti-sense: 3UTCN) である (Fig.1)。Taq DNAポリメラーゼはAmpli-Taq Gold™ DNA polymerase (Perkin-Elmer) またはTakara LA Taq™ (宝酒造)を用いた。PCRはPreheating [95°C,9min]; 35cycles[95°C,1min; 55°C,1min; 72°C,2min]; last extention [72°C,10min]の増幅プログラムにて行った。PCRにて増幅されたPCR産物はOriginal TA cloning® kit (Invitrogen)を用いてpCR®2.1プラスミドベクターにクローニングしたのち*E.coli* INV α F'にて増やし、QIAwell® plasmid purification system (QIAGEN)を用いて純化抽出した。

PatrクラスI遺伝子をクローニングしたプラスミドは、5種類のsequencing primer (Fig.1)を用いてABI-373A (PE Applied Biosystems) またはALF-II (Amersham Pharmacia Biotech) DNAシーケンサーにより塩基配列の読み取りを行った。また、Taq DNAポリメラーゼの読み取りエラーに対処するため、同一alleleについて5クローン以上全塩基配列を読み取ったものを集めたうえで、最終的なコンセンサス配列を決定した。F1世代のチンパンジーについてはα1およびα2ドメインを含む一部の塩基配列のみ決定した。

## C. 研究結果

### 1. チンパンジー気管支のヘリカルCTおよび内視鏡を用いた形態観察と気管支粘膜のバイオプシー

ヘリカルCTによる胸部横断面の代表例をFig.2に示した。肺野、縦隔内ともヒトと類似の構造が確認された。ただし、気管チューブが右側の気管支に入っていたため、右肺が少し過

膨張の状態であった。横断面を連続的に追うと、気管、気管支のさまざまな形態を推定することができ、これはヒトとほぼ同様であった。

気管支内視鏡はこのようなヘリカルCTの結果および剖検所見を踏まえて実施した。気管支を観察した順序は、次の通りであった。まず気管分岐部から右主幹に入った後、右上幹入口を確認しながら中間幹を進み、中葉支・下葉支分岐部で中葉支に入りB<sup>4</sup>、B<sup>5</sup>入口部を観察、さらに中間幹に戻って下葉支に入り、下葉支からB<sup>7</sup>、B<sup>8</sup>、B<sup>9</sup>、B<sup>10</sup>入口部を観察した。次いで下葉支からB<sup>6</sup>へと進み、B<sup>6</sup>から分岐する区域気管支入口部を観察した後、下葉支を経て中間幹に戻った後、右上幹に入りB<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>、B<sup>3</sup>入口部を観察した。次に右主幹に戻って、気管分岐部から左主幹に入り、左上幹・左底幹分岐部周辺を観察した。さらに、左上幹へ入って上大区支・下大区支分岐部を確認後、下大区支からはB<sup>4</sup>、B<sup>5</sup>入口部を、また上大区支からはB<sup>1+2</sup>、B<sup>3</sup>と推測される区域気管支の入口部を観察した。最後に、左上幹・左底幹分岐部から左底幹に入りB<sup>8</sup>、B<sup>9</sup>、B<sup>10</sup>入口部を観察した。これら気管支の分岐様式はヒトとほぼ同様であった。以上の所見から気管支の模式図をFig.3の如く示すことができた。また主要な分岐部の撮影写真をFig.4-1,2に示した。尚、気管支分岐の命名法は1970年日本肺癌学会総会で報告された気管支鏡所見分類委員会の案に従った。

気管支粘膜のバイオプシーは中葉支・下葉支分岐部のspurとB<sup>8</sup>・B<sup>9</sup>+B<sup>10</sup>分岐部のspurの2ヶ所において行った。B<sup>8</sup>・B<sup>9</sup>+B<sup>10</sup>分岐部のspurにおける粘膜上皮細胞の電顕像をFig.5に示した。線毛細胞および粘液細胞の超微形態が明らかになったが、これらはヒトや他の動物と同様であった。

麻酔の状態は良好で、内視鏡操作に起因した咳発作は僅かであった。喀痰の付着や過剰な粘液分泌も認められず、観察を円滑に進めることができた。またバイオプシーの際も出血は僅か

で、エピネフリンを含むリドカイン液を採取部位に散布することによって容易に止血できた。また、実施後、麻酔から覚醒の後に軽度の咳を認めたが、直ぐに消失した。このほか術後に特記すべき異常な症状は診られなかった。

## 2. ヘリカルCTを用いたチンパンジーに対する後頭下穿刺と膝関節腔穿刺方法の検討

頭頸部、膝関節部とも骨の撮像には問題なかった。しかしながら頭頸部における小脳、延髄、脊髄および脳脊髄液の流路に関する情報は乏しかった。頭頸部の後頭骨から頸椎に至る骨の3次元再構成をFig. 6に示した。上方に後頭骨があり、頭蓋底には大後頭孔が見えた。下方へは頭蓋を受ける第1頸椎の環椎、第2頸椎の軸椎と続き、第3、第4頸椎と続いた。後頭骨と環椎の間には針が通過できる隙間が認められた。また別の角度から見ると環椎には椎体がなく、環椎の椎体にあたるどころには、軸椎の歯突起が伸びていた。これらの特徴はヒトと同様であった。

右側膝関節部の骨の3次元再構成をFig. 7に示した。膝関節を構成する骨は大腿骨下端の内側顆と外側顆、脛骨上端の内側顆と外側顆、および膝蓋骨の後面であり、それぞれの形状および相互の位置関係はヒトとほぼ同様であった。過去の膝関節腔造影結果(Fig. 8)に照らして、膝蓋骨、大腿骨間の外側である、膝関節腔穿刺の刺入位置を3次的に確認した。

## 3. チンパンジーの骨髄の採取と評価

約50mlの骨髄の採取に約30分を要した。骨髄の採取は循環器系、呼吸器系に明らかな影響を及ぼさなかった。また、骨髄採取後の血液検査に異常を認めず、以後の経過観察で貧血症状などの異常も現れなかった。

採取した骨髄の性状をTable 1に示した。ヒトやカニクイザルの骨髄に比し、明らかな違いは認められなかった。

Table 1 骨髄の性状

項目	
白血球数 ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	136
赤血球数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	606
ヘモグロビン (g/dL)	17.4
ヘマトクリット (%)	51.4
平均赤血球容積 (fL)	84.8
平均赤血球血色素量 (pg)	28.7
平均赤血球血色素濃度 (g/dL)	33.9
血小板数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	7.1

得られた骨髄細胞について、カニクイザルで交差反応を示すDyna1社の抗ヒトCD34抗体を用いて磁気ビーズ法により回収したCD34陽性細胞に、高いコロニー形成能が認められた。これにより腸骨から採取した骨髄に造血幹細胞が含まれていることが判った。また、Dyna1社以外の抗ヒトCD34抗体も交差反応を示した。

## 4. チンパンジー-MHCクラスI (Patr-A, -B, -C) 遺伝子型の決定

今回、野生由来チンパンジー4頭のPatrクラスIタンパクコード領域の遺伝子全長について、それぞれの塩基配列を決定することができた。4頭から20個のalleleを決定したが、4頭のすべてのPatrクラスI遺伝子から予想されるアミノ酸配列をHLAクラスI (A,B,C)のコンセンサス配列と比較した結果をFig. 9に示した。Patr-A,B,Cのそれぞれのアミノ酸配列はHLA-A,B,Cの特徴と極めてよく一致していた。すなわち、アミノ酸長ではA:365、B:362/363、およびC:366個からそれぞれ構成されていた。また、A,B,Cの各locusにlocus特異的配列が存在していた。そして、最も重要な特徴はいわゆる抗原認識部位にアミノ酸置換が集中していた点で、 $\alpha 1$ ドメイン後半で特に顕著であった。なお、今回決定したalleleのうち、6 allelesはこれまで報告されていない新規配列であった。各個体間で共通するalleleもいくつか認められ、Patr-A07は4頭のうち3頭が、Patr-A01は2

頭が有していた。

F1世代のチンパンジーのPatrクラスI遺伝子型については、母親および父親から1ハプロタイプずつ受け継ぐことから既に決定した親の遺伝子と、子の遺伝子の一部の配列を比較することによる判定を試みた。ヒトミを共通の母親にもつ異父兄弟のケンとケンジについて行った判定結果を Fig.10 に示した。例としてケンのPatr-B について両親との配列比較結果を示したが、父親と母親の塩基配列の違いが多い $\alpha 1$  や $\alpha 2$  ドメインの領域で配列比較することにより全長の塩基配列を決定せずとも判定が可能であった。さらに、このような親と子の関係に基づいた解析によって、それぞれのハプロタイプ推定が行えた。

#### D. 考察

本年度行った4実験は、チンパンジーを用いた遺伝子治療方法評価系の開発を目指した基盤技術研究である。それぞれについて、以下の様に考察した。

##### 1. チンパンジー気管支のヘリカルCTおよび内視鏡を用いた形態観察および気管支粘膜のバイオプシー

肺葉の数がヒヒヤサルでは右4葉、左2葉であるのに対しチンパンジーとヒトは右3葉、左2葉で共通である。気管支のおおまかな形状もチンパンジーはヒトに似ていることが知られている。このような剖検所見、さらに今回得られた、胸部CT撮影結果および内視鏡による観察結果をもとに気管支の構造を同定できた。これによりチンパンジーの気管支の形状、分岐構造はヒトに非常に良く似ていることが判った。

気管支では分岐が目印となるため、in vivo における遺伝子治療用ベクターの局所投与や導入遺伝子の発現の検討が、チンパンジーに対し、ヒト用の内視鏡を用いて効果的に進めることができるものと期待される。例えば、代表的な中

枢型肺がんで、病巣が気管支壁内に限局している扁平上皮がんなどの遺伝子治療法の評価や、遺伝性疾患の嚢胞性線維症など経気道的な遺伝子導入法が考えられている疾患の遺伝子治療法の評価にはこの方法は非常に有用である。また今回は実施しなかったが、気管支肺胞洗浄(BAL)の手法を用いれば肺胞からも多くの情報を取得することができるため、末梢型の肺がんやその他の呼吸器疾患も含めて遺伝子治療法の有効性・安全性評価にも広く応用できると考える。

##### 2. ヘリカルCTを用いたチンパンジーに対する後頭下穿刺と膝関節腔穿刺方法の検討

脳や脊髄のくも膜下腔に穿刺することによって得られた脳脊髄液から脳内の情報を得ることができる。これは中枢神経系を標的とした遺伝子治療を評価するための有力な手段である。脳脊髄液を採取する方法としては、1)後頭骨と環椎の間から小脳延髄槽に穿刺する後頭下穿刺、2)腰椎の棘突起間から脊柱管に穿刺する腰椎穿刺などがある。ヒトでは2)の腰椎穿刺が一般的であるが、チンパンジーについては脊柱管内の脊髄の位置が未だ明らかでなく、方法として確立していない。そこで、後頭下穿刺について、その可能性を調べた。剖検による報告では後頭骨と環椎の関係が明確ではないが、今回のCTによる観察で後頭骨、頸椎間に穿刺針を通すことが十分可能な隙間が認められた。ただし今回の撮像条件では小脳延髄槽および延髄の形状を評価できなかったため、穿刺針が硬膜を抜けてから延髄までの間隙は不明である。また、外表の至適穿刺位置から小脳延髄槽の間は7~8cmに及ぶ厚い筋肉に遮られているため穿刺操作は容易ではない。従って安全性確保の観点から現時点での後頭下穿刺の実施は難しく、今後さらにCTやMRIで小脳延髄槽の同定を明確にすることによって可能性を判断すべきと考える。

我々は、過去、X線を用いた膝関節腔造影による検討で、膝関節腔の、膝蓋骨から膝蓋骨の

上方にかけての拡がりの方が、膝蓋骨の下方への拡がりより大きいことを明らかにし、膝関節腔への至的穿刺位置を膝蓋骨・大腿骨間の外側と定めた<sup>2)</sup>。今回は骨を3D表示することによってチンパンジーの膝関節の解剖学的理解を深め、滑液採取や膝関節腔内投与の際に行う膝関節腔穿刺位置を3次元的に確認した。慢性関節リウマチ(RA)などの自己免疫疾患は難治性疾患として知られている。RAは関節の滑膜細胞の異常増殖が特徴であり、これをコントロールすることで治療に繋がると考えられているが、有効な方法がないため滑膜細胞を標的とした遺伝子治療への期待が集まっている。遺伝子治療用ベクターをin vivoで評価するためには関節腔内への投与が効果的であり、既に小動物に対し、関節腔内へベクター投与後、滑膜細胞へレポーター遺伝子が発現したとの報告がみられる<sup>3)</sup>。チンパンジーは今回示したように関節の形態がヒトと同様であり、関節内の情報を得るための滑液の採取も可能である。従ってRAに対する評価系にチンパンジーは有用と考えられるが、遺伝子治療の安全性・有効性評価のうち有効性の評価に関しては滑膜細胞への遺伝子発現の確認方法などさらに検討を必要とする。

### 3. チンパンジー骨髄の採取と評価

現在のところ造血幹細胞を標的とした遺伝子治療では患者に遺伝子を導入した造血幹細胞を注入する前に、造血幹細胞移植の場合と同様の前処置、すなわち、化学療法剤の大量投与や放射線照射により患者の造血系(骨髄)を廃絶することが不可避と考えられている。ところが、将来的には、患者への負担を減らすために前処置軽減化の方向で治療方法の改良を企図して行くべきである。チンパンジーは造血系や免疫系がヒトに最も近いと考えられているため、チンパンジーを用いた評価系からは貴重な情報が得られるはずである。またチンパンジーは実験動物倫理の観点から化学療法剤の大量投与や放射線

照射は認められない。これは、前処置を伴わない遺伝子治療の将来像と附合し、前処置を極力抑えた遺伝子治療方法の評価系としてチンパンジーは極めて有用であると考ええる。今回、チンパンジーの骨髄を腸骨から採取したところ、骨髄細胞からDynal社の抗ヒトCD34抗体を用いてCD34陽性細胞が回収され、さらにコロニーアッセイによりCD34陽性細胞のコロニー形成能が確認された。また、カニクイザルがDynal社の抗体しか反応しないのに対し、チンパンジーでは他の抗ヒトCD34抗体も交差反応を示すということからチンパンジーとヒトとの近縁性も示唆された。これによりチンパンジー造血幹細胞の採取方法が確立できたことで、チンパンジーを用いた造血幹細胞を標的とする遺伝子治療評価系開発の基礎とすることができた。

### 4. チンパンジーMHCクラスI (Patr-A, -B, -C) 遺伝子型の決定

PatrクラスI遺伝子のクローニングに我々が用いた方法は、基本的にはEnnisら<sup>4)</sup>の方法に準じているが、Patr用に改良され1ペアのプライマーでPatr-A,B,およびC遺伝子の全てを増幅できる点で、より迅速なPatrクラスI遺伝子の決定が可能になった<sup>5,6)</sup>。

DNAワクチンはウイルス等の抗原ペプチドをコードする塩基配列を組込んだプラスミドを直接筋肉や皮膚へ注入することで抗原特異的な液性免疫および細胞性免疫を長期にわたり誘導すると言われている。しかしながら、細胞性免疫の活性化においてはMHC分子との親和性に乏しい抗原ペプチドではT細胞の抗原認識に問題が生じる可能性が考えられるため、ワクチンデザインにはMHCとのinteractionも考慮する必要がある。チンパンジーは言うまでもなく遺伝的に最もヒトに近縁で、MHC遺伝子においても酷似している。最近、HCV、HBV、そしてHIVに感染したそれぞれのチンパンジーから誘導したCTLの認識エピトープが、それぞ

れのウイルスに対する既知の HLA クラス I の CTL エピトープと共通した配列を有していることを示す報告が相次いで出されている。今回、個体ごとの Patr クラス I 遺伝子型の把握が可能になったことから、特に上記のようなヒト以外ではチンパンジーにしか感染しないウイルス疾患を標的とした DNA ワクチンの有効性検討において、今後は MHC 遺伝子型も考慮に入れた供試個体の選定が行える。また、得られた Patr クラス I 遺伝子を細胞に transfect して *in vitro* での詳細な CTL の機能解析などにも応用できることから、さらにより多くのチンパンジーの Patr クラス I 遺伝子解析を推進する意味は大きいと考えられる。

## E. 結論

呼吸器系疾患の遺伝子治療評価系の確立に向けて、ヘリカル CT および内視鏡を用いてチンパンジーの気管支構造を明らかにし、粘膜を採取する手技を開発した。

中枢神経疾患や慢性関節リウマチの遺伝子治療法評価系の確立に向けて、ヘリカル CT を用いてチンパンジーの頭頸部と膝関節の骨の構造を明らかにした。

造血幹細胞を標的とした遺伝子治療評価系の確立に向けて、チンパンジーの造血幹細胞を得る手段として骨髄穿刺方法を開発した。

DNA ワクチンなど免疫反応を介した遺伝子治療評価系の確立に向けて、供試個体の遺伝的背景を把握するために、チンパンジー6頭の MHC クラス I 遺伝子型を決定した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Machida, S., Matsui, M., Tanoue, T., Hayasaka, I., Akatsuka, T. Molecular cloning and expression of chimpanzee MHC class I alleles: PCR cloning of Patr-A, -B, -C cDNAs by using one pair of primers.

*Eur. J. Immunogenet.* (in press)

### 2. 学会発表

- 1) 富永壽和, 吉本信彦, 武士俣清彦, 鶴殿俊史, 古屋孝文, 早坂郁夫. チンパンジーにおける上部消化管および大腸の内視鏡を用いた観察. 第15回日本霊長類学会(宮崎)1999年6月
- 2) 武士俣清彦, 鶴殿俊史, 富永壽和, 吉本信彦, 早坂郁夫. チンパンジーにおける麻酔法の検討(メデトミジン-ケタミンによる麻酔法). 第15回日本霊長類学会(宮崎)1999年6月
- 3) 富永壽和, 中市統三, 吉本信彦, 武士俣清彦, 鶴殿俊史, 早坂郁夫. チンパンジー脳の Magnetic Resonance Imaging. 第47回日本実験動物学会(徳島)2000年5月予定

### [謝辞]

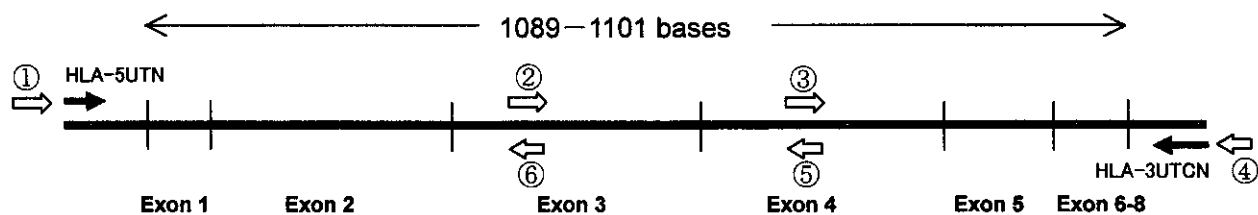
ヘリカル CT 撮影方法についてご指導いただいた長崎市十善会病院、磨田勝範先生に深謝いたします。

### 文献

- 1) Inchauspe, G., Vitvitski, L., Major, M.E., Jung, G., Spengler, U., Maisonnas, M., Treppe, C. 1997. Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: Comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol.* 16:185-195.
- 2) 友栗徹士, 早坂郁夫, 水田博志. チンパンジーにおける膝関節腔造影の経験. 第16回九州実験動物研究会 1998年
- 3) Roessler, B. J., Allen, E. D., Wilson, J. M. et al. 1993. Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 92:1085-1092
- 4) Ennis, P. D., Zemmour, J., Salter, R. D.,



- Parham, P. 1990. Rapid cloning of HLA-A, -B cDNA by using polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2833-2837.
- 5) Matsui, M., Machida, S., Feinstone, S.M., Akatsuka, T. 1999. Molecular analysis of five new chimpanzees MHC class I alleles: Implications for differences between evolutionary mechanisms of HLA-A, -B, and -C loci. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**:46-52
- 6) Machida, S., Matsui, M., Tanoue, T., Hayasaka, I., Akatsuka, T. Molecular cloning and expression of chimpanzee MHC class I alleles: PCR cloning of Patr-A, -B, -C cDNAs by using one pair of primers. *Eur. J. Immunogenet.* (in press)



PCR primers

→ HLA-5UTN : 5' - GGACTCAGAATCTCCCCAGAC -3'  
 ← HLA-3UTCN : 5' - GAGGGAACACAGGTCAGTGTG -3'

Sequencing primers

⇒ ① M13-FW : 5' - CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC -3'  
 ⇒ ② Patr-3S : 5' - CGGCAAGGATTACATCGCCCTG -3'  
 ⇒ ③ Patr-4S : 5' - GCGGAGATCACACTGACCTGGC -3'  
 ⇐ ④ M13-RV : 5' - GAGCGGATAACAATTTACACAGG -3'  
 ⇐ ⑤ Patr-4N : 5' - GCCAGGTCAGTGTGATCTCCGC -3'  
 ⇐ ⑥ Patr-3N : 5' - CAGGGCGATGTAATCCTTGCCG -3'

Fig.1 Patr クラス I cDNA クローニングに用いた PCR プライマー  
 および塩基配列解析に用いたシーケンシングプライマー  
 の遺伝子上の位置とその配列

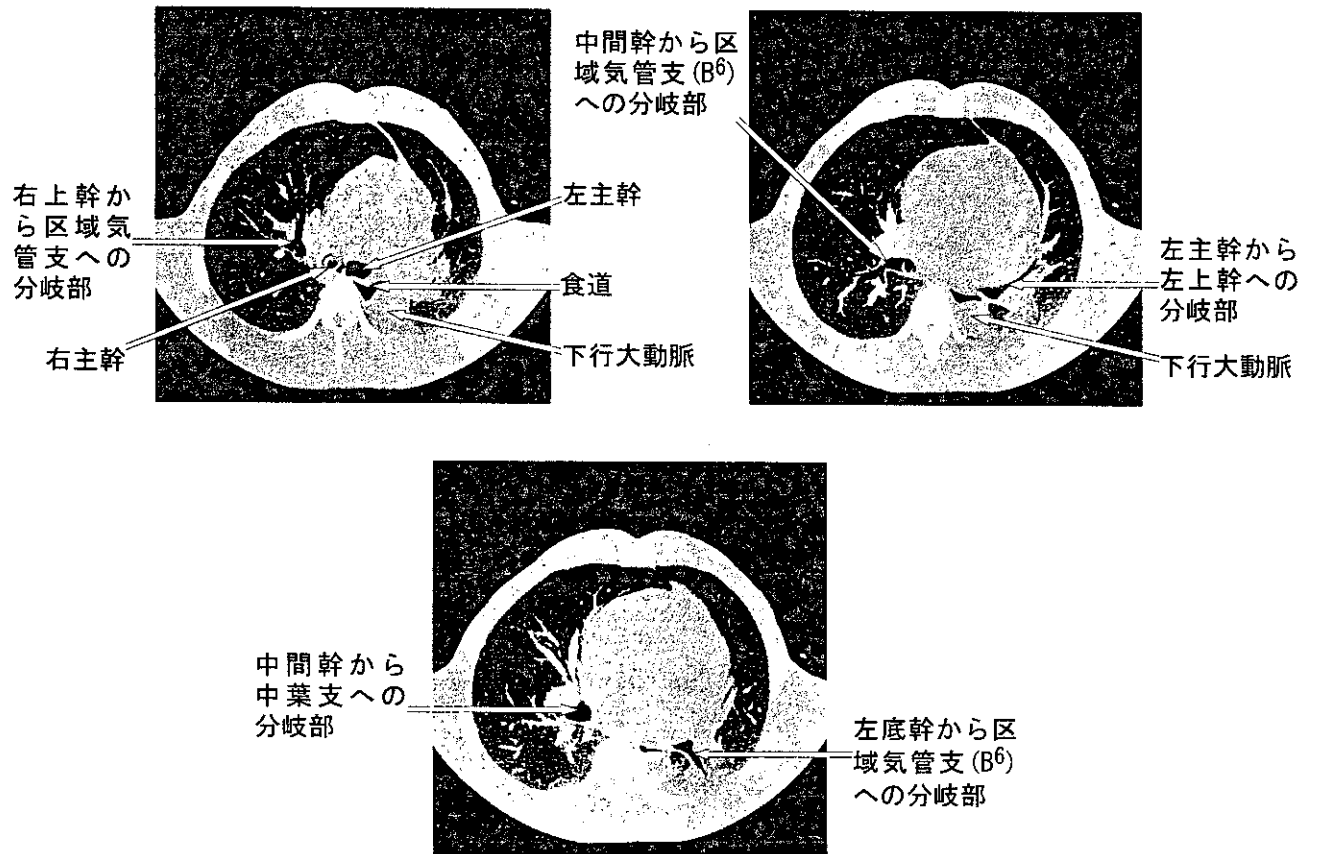


Fig. 2 ヘリカルCTスキャンによるチンパンジー胸部の断面図

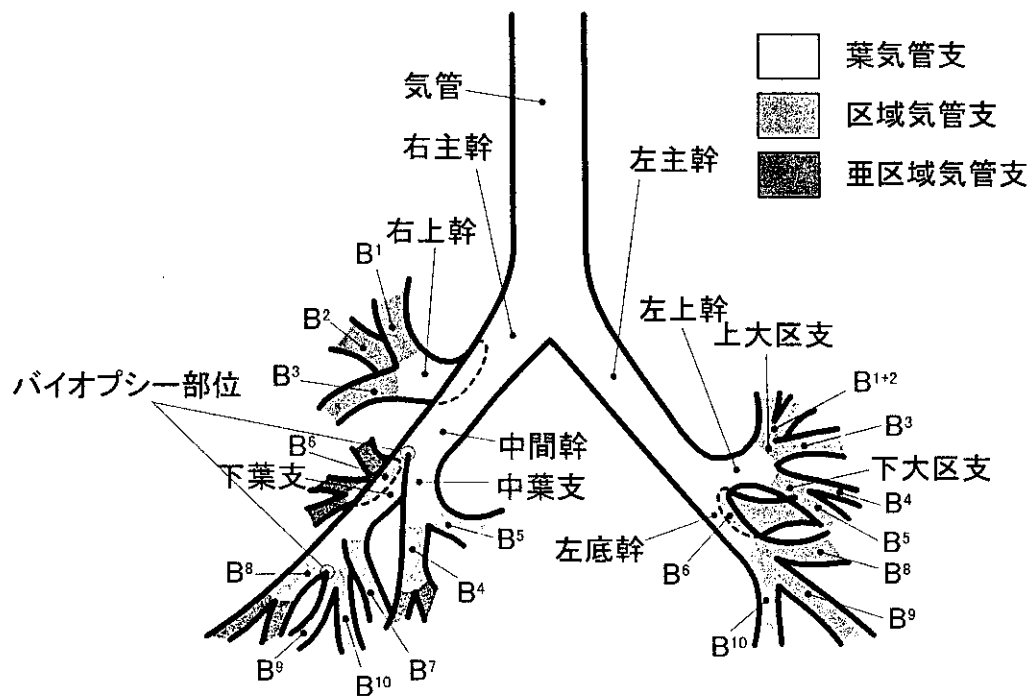


Fig. 3 チンパンジー気管支の模式図

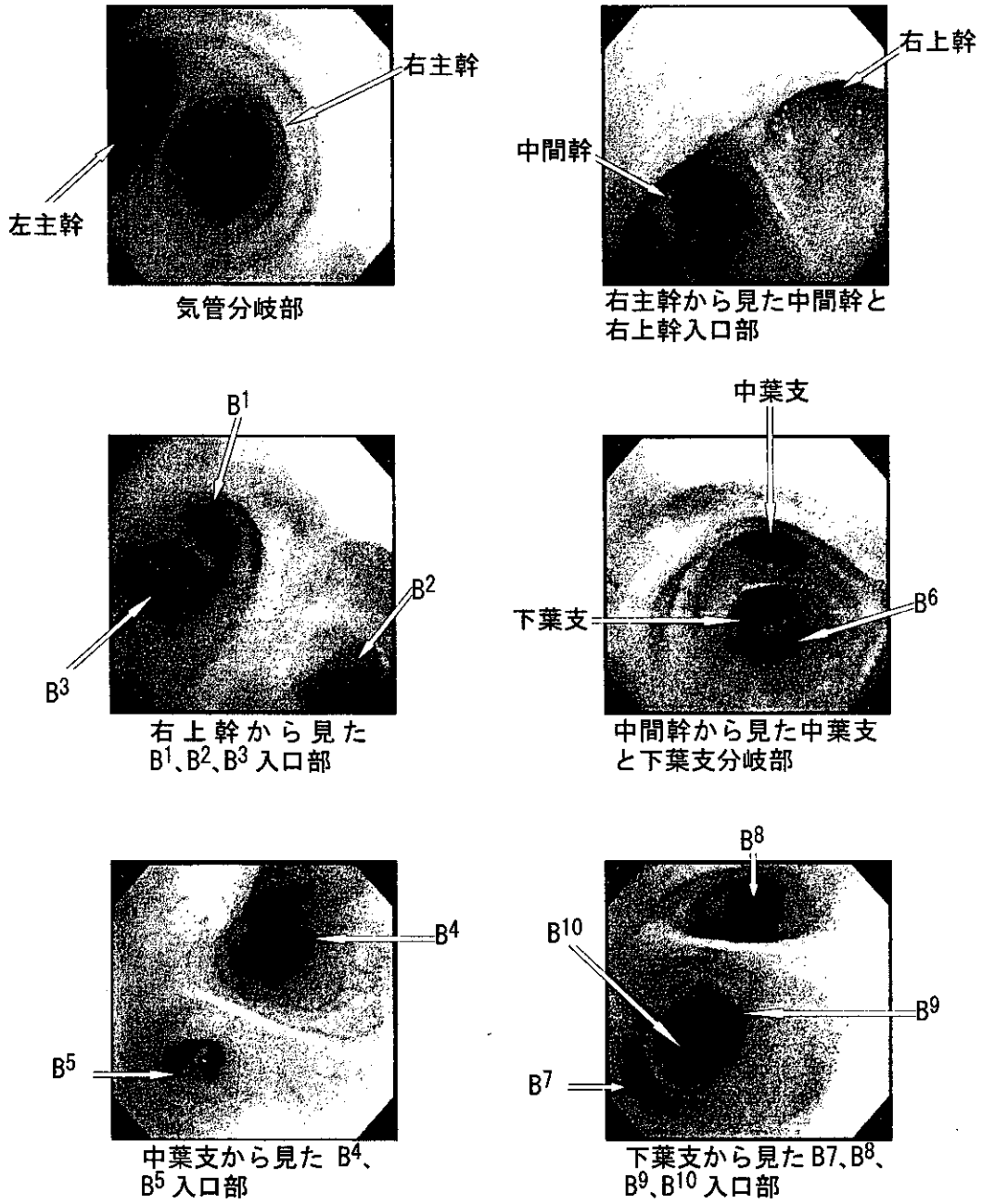


Fig. 4-1 気管支内視鏡で見た右側の主要な気管支分岐部

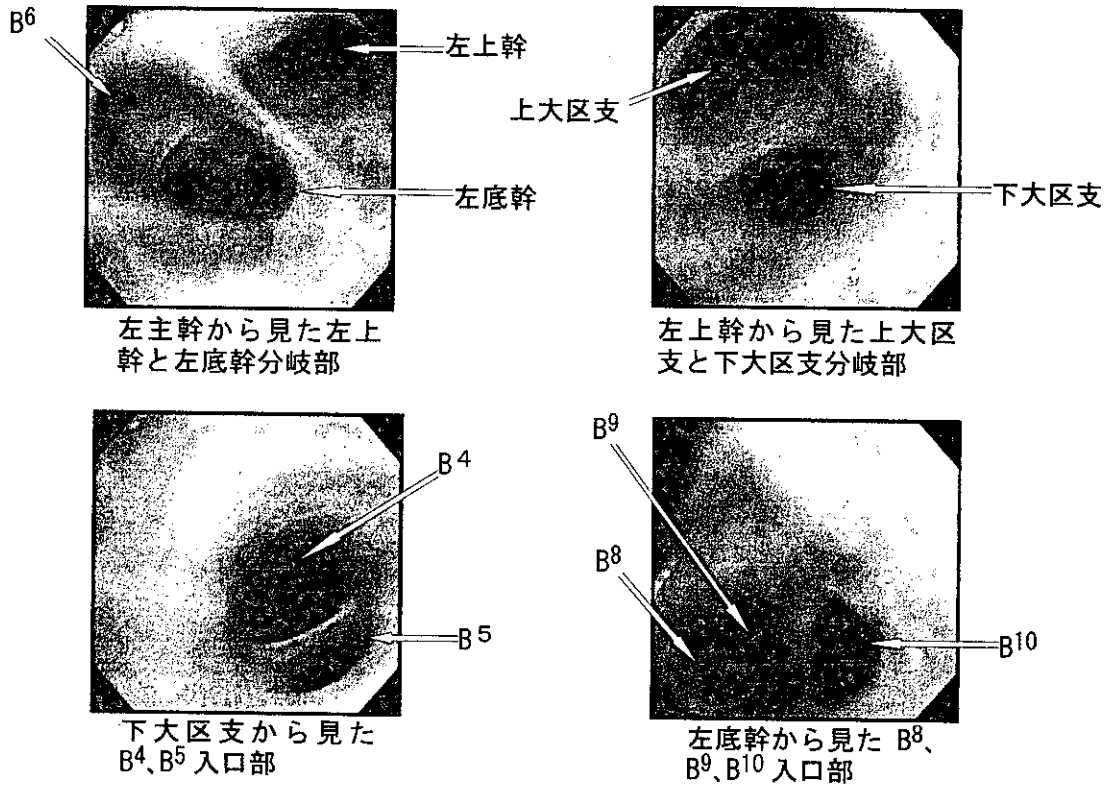


Fig. 4-2 気管支内視鏡で見た左側の主要な気管支分岐部

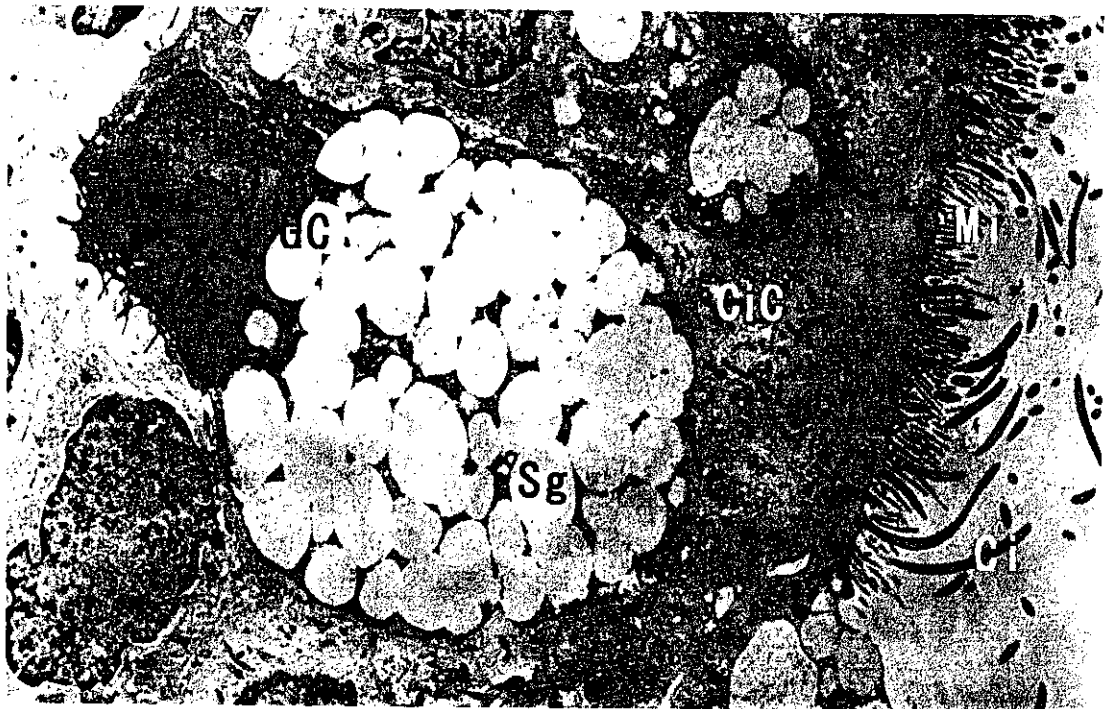


Fig. 5 チンパンジー気管支粘膜上皮細胞の電顕像

GC: 杯細胞, Sg: 分泌顆粒, CiC: 線毛細胞, Ci: 線毛, Mi: 微絨毛

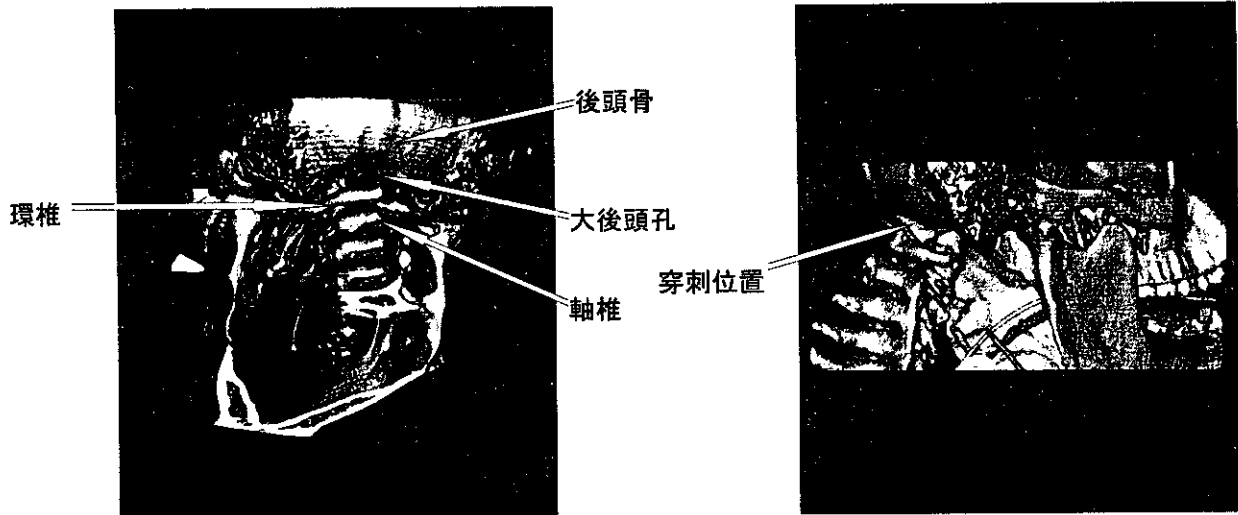


Fig. 6 ヘリカル CT スキャンにより 3 次元再構成したチンパンジーの頭頸部

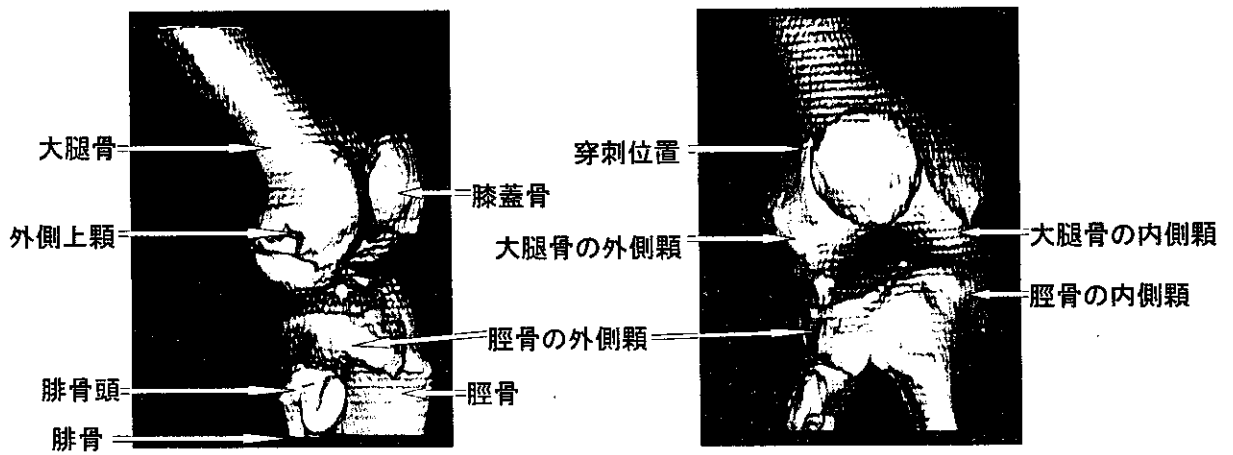


Fig. 7 ヘリカル CT スキャンにより 3 次元再構成したチンパンジーの右側膝関節部



Fig. 8 右側膝関節腔を造影した X 線写真 (↔ : 関節腔)

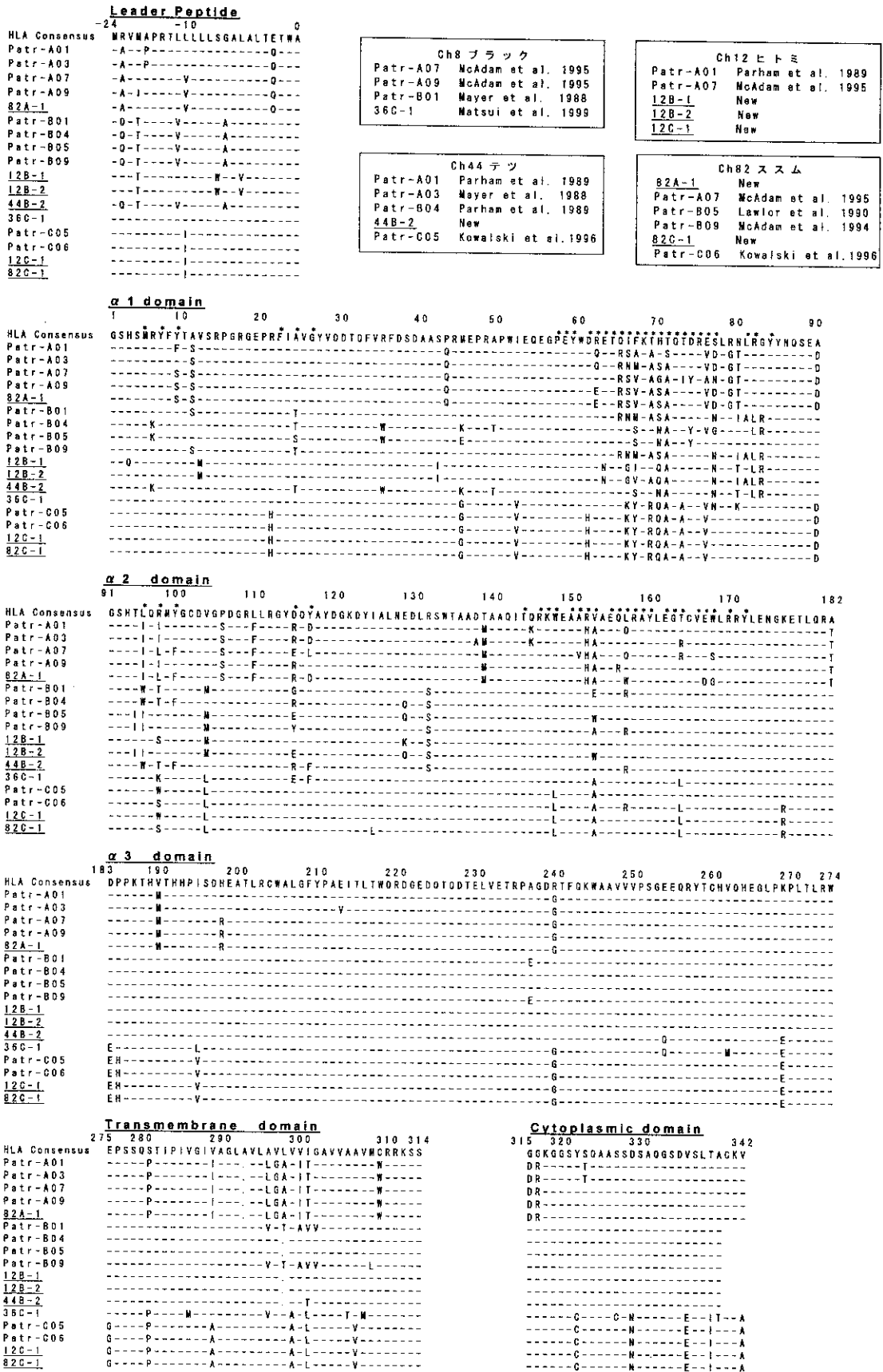
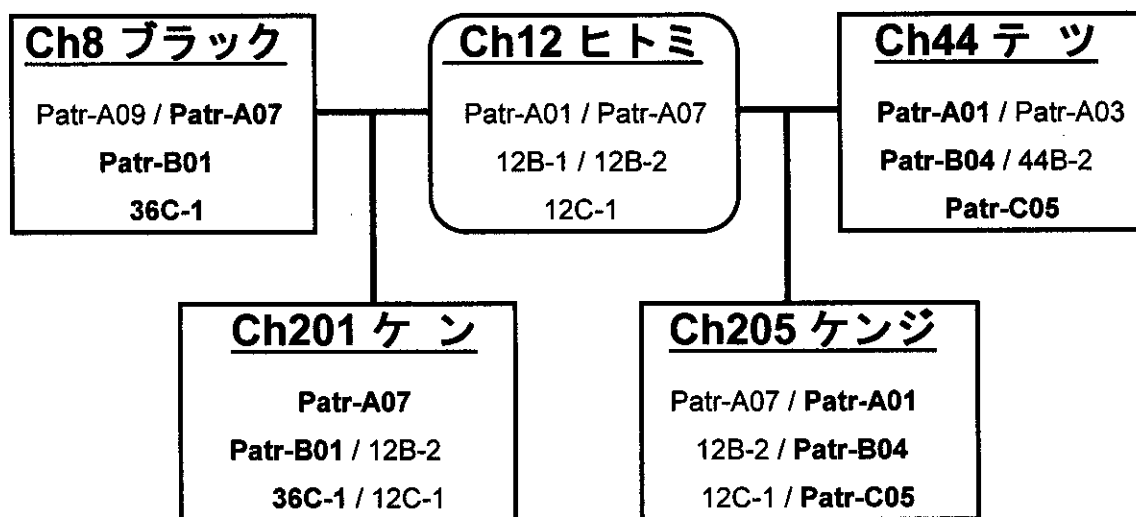


Fig.9 Patrクラス I アミノ酸配列と HLA クラス I コンセンサス配列との比較  
 図中アミノ酸 No. は α 1 domain の N 末端を基点とし、HLA クラス I コンセンサス配列と一致するものは「-」で示す。アミノ酸 No. 下の「\*」は抗原認識部位を示す。  
 アンダーラインのついた allele は新規配列。



	343		372	
8B-1 (Patr-B01)	GGGTCTCACACCTGGCAGACGATGTATGGC			} Ch201 ケンの Patr-B → Patr-B01 → 12B-2
201B-1	-----			
201B-2	--T-----T-ATC---G----C--			
12B-2 (New)	--T-----T-ATC---G----C--			
12B-1 (New)	-----TCTC---T-----			

Fig.10 F1 世代チンパンジーの Patr クラス I ハプロタイプ判定



## 分担研究報告書

### 霊長類の各種臓器細胞の培養/ex vivo 系を用いた 遺伝子ベクターの安全性に関する研究

分担研究者 加藤賢三 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨：霊長類を用いた遺伝子治療の評価システムの確立の一環として ex vivo 系の立ち上げを行っている。カニクイザルの各種臓器の凍結保存、初代細胞培養技術を確立中である。数多くのベクターの安全性の評価を可能にするため、以下の臓器・組織の細胞培養を行った。(1) 肝臓、(2) 腎臓、(3) 肺臓、(4) 筋肉、(5) 心臓、(6) 胃、(7) 皮膚、(8) 小腸、(9) 膵臓、(10) 膀胱、(11) 尾、(12) 骨髄、(13) 胸腺、(14) 脾臓。これらの中で最も増殖性が優れているのは、肺臓であり次が腎臓であった。現状において、ベクターの安全性の ex vivo 系テストの準備を整えた。

A. 研究目的 ex vivo 系を用いた遺伝子ベクターの安全性に関する研究用として、霊長類の各種臓器細胞の培養を行い、細胞の形態、ウイルス感受性、染色体、細胞表面マーカーの解析を行い、再現性の良い初代培養系を確立して、供給できる体制をつくる。

#### B. 研究方法

[カニクイザル胎児各種臓器細胞凍結保存および培養]

帝王切開で得たカニクイザル胎児の各種臓器(小腸、大腸、肺、腎、肝、膵、筋肉など)を無菌的に、ハサミで細かく刻み、それを細胞保存液とともに直接組織凍結を試みた。一方、それらの組織をトリプシン液で処理した後にFCS 10%—RPMI 1640あるいは10%FBS—MEM培地を用いて初代培養を行った。(1) 妊娠後80日のものから肝臓、腎臓、肺臓、小腸を培養した。(2) 妊娠後90日のものから小腸と腎臓を細胞培養用に組織凍結を行った。(3) 妊娠後150日のものから、以下の臓器組織(肝臓、腎臓、肺臓、膀胱、胃、十二指腸、脳)を採取し、組織凍結とともに初代培養を行った。

[染色体標本の作製]

対数増殖期の細胞の培地中に蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤であるカリクリンA(最終濃度50 nM)を添加し、30分作用させ未成熟染色体凝縮(Premature Chromosome Condensation; PCC)を誘発させた後、75 mM KClにて低張処理を37度20分を行い、カルノー固定液(メタノール:酢酸, 3:1)で固定を行いスライドガラス上に展開して5%ギムザ液で染色し顕鏡した。対照として細胞をコルセミド処理(0.1 ug/ml, 3時間)し、低張処理・固定を行い分裂中期染色体を得た。

#### C. 研究結果

[カニクイザル胎児(妊娠後80日齢)の各種臓器・組織の保存と初代細胞培養]

以下の臓器・組織の細胞培養を行った。(1) 肝臓、(2) 腎臓、(3) 肺臓、(4) 筋肉、(5) 心臓、

(6) 胃、(7) 皮膚、(8) 小腸、(9) 膵臓、(10) 膀胱、(11) 尾、(12) 骨髄、(13) 胸腺、(14) 脾臓。

肺臓、腎臓、小腸の培養は3代まで継代し、各代で凍結保存を行った。この中で特に、肺臓の細胞 Monkey Fetal Lung (MFL) Cell について長期継代を行い、細胞の保存と性格づけを行った。トリプシン処理にて細胞を分離して、37℃、炭酸ガスフラン器で静置培養した。培養液は10% FBS-MEMを使用。5-6日毎の継代(1:4)を10ヶ月間行い、継代数は現在、44代である。

#### 【MFL細胞の保存】

MFL細胞は各継代時(2代、3代、15代、40代)で、4~10本のアンプルの保存した。

#### 【MFL細胞の染色体】

この細胞株の2倍体性の検索のため染色体を検索したところ、継代20代までは2倍体(42本)を維持していたが、それ以降染色体数はほぼ4倍体(~80本)になっている事が分かった。

#### 【細胞表面マーカー解析】

CD44は広範囲に発現が認められている細胞接着分子の一つである。単一遺伝子から多数のアイソフォームを産生することにより多様性を獲得している事が知られている。その機能としては、未だ不明な部分も多いが初期造血、リンパ球のホーミング、白血球の活性化、癌の転移等、多様な生物学的現象に関与することが示唆されている興味深い多機能接着因子である。細胞の継代数の増加とCD44細胞表面抗原の発現量との関係を調べるために、樹立した2系統のカニクイザル胎児肺の細胞株の各継代の細胞を準備した。さらに、新たな腎臓由来細胞株CMK/K(p5)、アフリカミドリザル腎細胞株BSC-40と、不死化ヒト胎児腎臓細胞293を用い、以下の細胞表面マーカー、CD11a、CD14、CD18、CD44、CD49d、CD62L、CD83、CD103、インテグリンβ7、に対する抗体により、FACS SCANによる解析を行った。これらの抗体は、カニクイザルのリンパ球に反応することは既に確認されたものである。培養細胞をトリプシン処理してはがし、細胞濃度を $10^7$ に調製した。細胞の浮遊にはSTB(3% FBS+0.1%NaN<sub>3</sub>/PBS)を用い、細胞浮遊液100μl+単クローン抗体5μlを加えて4℃で15分反応させ、再びSTBで洗浄したのち、FACS解析を行った。

陽性反応はCD44抗体でのみ認められた。得られたCD44の結果から、細胞表面マーカーの蛍光量の指標の一つであるメダイアン値はCMK/Kでは、1037、BSC-40では、229、293細胞では60であった。同じ、腎臓由来細胞株を比較した場合、CD44は初代培養により多く抗原が保持され、癌化により減少する可能性が示唆された。ちなみに、CMK/Kは初代培養細胞の形態、染色体の二倍体性をよく保持していることが確認されている。さらに、二つの2系統のカニクイザル胎児肺の細胞株(MFLとCML)の各継代の細胞を準備して、同様にCD44の解析を行ったところ、2系統において、細胞の継代に伴い、CD44の抗原量が減少する傾向が再現性をもって認められた(図1)。さらに、CD44抗原量は新たに樹立したCMLが多いことも示された。これは、染色体解析における、2倍性の保持の割合がCMLの方が有意に高いことと矛盾しないことが分かった。

## MFL株の染色体解析

MFL株 染色体 (42/N=30)					
継代数	染色体数	2N%	4N%	EX%	Ring%
p16	48.9	83	17	0	0
p28	55.2	53	47	0	0
p41	58.7	40	60	0.4	0.07

### D. 考察

カニクイザルの各種臓器の凍結保存、初代細胞培養技術を確立中である。数多くのベクターの安全性の評価を可能にするため、多くの臓器・組織の細胞培養を行った。これらの中で最も増殖性が優れているのは、肺臓であり、次が腎臓であることがわかった。しかし、20代以降に染色体数の変化が認められている。安全性試験のための細胞は、染色体レベルが2nであることが望ましいので、この目的には5代から15代の細胞が適しているものと思われる。現状において、ベクターの安全性のex vivo系テストの準備が整ったといえる段階であり、ベクターの発現効率や安全性に関する評価法の開発の準備が整った。

### E. 結論

1. カニクイザルの各種臓器の凍結保存と安定な初代細胞培養技術を確立した。
2. 肺と腎臓の細胞・組織から新たな初代細胞株を樹立した。
3. ex vivo細胞の特徴化のために、細胞の形態、ウイルス感受性、染色体に加え、細胞表面マーカー解析を加えた。
4. 今回、新たに樹立された肺と腎臓のex vivo細胞は5代から15代のレベルでカニクイザルの遺伝子治療用のベクターの安全性の検査に適しているものと考えられる。
5. これらの細胞は、今後筑波霊長類センターに保管されて、必要があれば供給できる体制が整えられた。

F. 研究発表           なし

Change in expression of CD44 on fetal cynomolgus monkey lung cells during cellular aging

