

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ウイルスベクターの安全性及び
有効性を評価する実験系の開発
及び標準化に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 14 (2002) 年 3 月

ウイルスベクターの安全性及び有効性を評価する
実験系の開発及び標準化に関する研究班

区分	氏名	所 属	職名
班長	倉田 毅	国立感染症研究所	副所長
班員	俣野 哲朗	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
	北村 義浩	東京大学医科学研究所先端医療研究センター 感染症分野	助教授
	神田 忠仁	国立感染症研究所遺伝子解析室	室長
	西山 幸廣	名古屋大学医学部附属研究施設 ウイルス感染研究部門	教授
	佐多 徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
	山田 章雄	国立感染症研究所獣医科学部	部長

目 次

I. 総括研究報告書（平成13年度）

ウイルスベクターの安全性及び有効性を評価する実験系の開発 及び標準化に関する研究……………	1
班長 倉田 毅（国立感染症研究所副所長）	

II. 分担研究報告

1. アデノ随伴ウイルス及びアデノ随伴ウイルスベクターの 病原性と安全性の評価に関する研究……………	7
神田 忠仁（国立感染症研究所遺伝子解析室長）	
2. ウイルスベクターの病理学的安全性評価研究……………	10
佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部長）	
3. 遺伝子治療用レトロウイルスベクターの安全性評価に関する研究……………	14
北村 義浩（東京大学医科学研究所先端医療研究センター助教授）	
4. センダイウイルスベクターのサルにおける病原性と 安全性の評価に関する研究……………	16
俣野 哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官）	
5. ヘルペスウイルスベクターの安全性の評価技術の 開発に関する研究……………	20
西山 幸廣（名古屋大学医学部附属研究施設ウイルス感染研究部門教授）	
6. カニクイザルの免疫学的特性に関する研究……………	25
山田 章雄（国立感染症研究所獣医科学部長）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	29
--------------------------	----

I. 総括研究報告書

ウイルスベクターの安全性及び有効性を評価する 実験系の開発及び標準化に関する研究

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

研究要旨 遺伝子治療に使われるウイルスベクターの安全性・有効性を、どのような前臨床試験によって評価すべきかを明らかにすることが目標である。ウイルスベクターの臨床応用に伴うリスクは、1) 標的以外の組織、臓器への感染（非標的感染）、2) 製造過程での遺伝子組み換えで自律増殖能を獲得した混入ベクターの感染、3) 患者に潜伏・持続感染しているウイルスとベクター間の遺伝子組み換えによるベクターレスキュー等に基づいている。患者自身に対するリスクばかりでなく、社会復帰する患者から環境へのベクターの放出による二次感染や生殖細胞を介した子孫への遺伝子導入についても配慮が必要である。また、ベクターの性質は、素材となったウイルスの性質に依存することが多く、ベクター毎にリスクに関する基礎的情報を蓄積しなければならない。生殖細胞への遺伝子導入の有無等を正確に把握するには、長期に渡る観察が不可欠である。今年度は、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターを対象に、ベクターの急性毒性、体内動態等をサルや小動物を使って調べる研究を始めた。サルに経静脈投与されたアデノ随伴ウイルスベクターは、3ヶ月経過後も生殖器を含む多くの臓器に存在することがわかった。センダイウイルスベクターの経鼻接種によって病的臨床所見は認められず、効率よく粘膜免疫を誘導することが示された。弱毒化ヘルペスウイルスは、ヒト膝臓痛腹膜播種モデルにおいて、腫瘍細胞を選択的に殺す性質を持つことがわかり、ベクターとして応用できる可能性が示された。また、前臨床試験における有用性が期待されるサルの免疫系についての研究を進めた。これらは、各ベクターに必要な前臨床試験が何かを知り、また成績を正確に理解するための基礎となる情報である。

分担研究者

神田 忠仁 国立感染研遺伝子解析室長
佐多 徹太郎 国立感染研感染病理部長
北村 義浩 東大医科研先端医療研究センター感染症分野助教授
俣野 哲朗 国立感染研エイズ研究センター主任研究官
西山 幸廣 名古屋大大学院医学研究科教授
山田 章雄 国立感染研獣医科学部長

A. 研究目的

各ウイルスベクターのリスクと安全性確保に必要な前臨床試験を網羅し、標準的な試験方法とその成績を解析する基準を明確にすることが本研究の最終目的である。本年度は、リスク評価の基盤となるベクターの体内動態の解析を中心に研究を進めた。諸外国や我が国で既に臨床応用されているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターとレトロウイルスベクターについては、サルに標準的なベクター等を全身投与し、各臓器へのベクターの感染と残存期間の解析をめざした。臨床試験に向けた

準備が進められている国産のセンダイウイルス(SeV)ベクターは、サルに投与後の急性毒性、体内動態、導入遺伝子の発現についてできる限り多くの知見を集めた。癌の治療をめざす増殖性ヘルペスウイルス(HSV)ベクターについては、弱毒化 HSV がベクターとなる可能性、及び HSV の病原性に関わる遺伝子の同定と機能解析を行った。今後、前臨床試験に使われる標準的な動物となる可能性があるカニクイサルの、免疫学的な特性の解析を進めた。

B. 研究方法

- 1) β -gal 発現 AAV ベクターを作製し、カラムクロマトグラフィを組み合わせて濃縮・精製した。4 頭のカニクイサルの大腿静脈に、夫々 3×10^{10} ゲノムコピーのベクターを接種した。雌 1 頭を 2 日後に、雌雄各 1 頭を 90 日めに解剖し、各臓器を回収した。また雌 1 頭には 90 日目に同量のベクターを追加接種し、その 2 週間後に臓器を回収した。各臓器片から総 DNA を抽出し、 β -gal 特異的プライマーを用いた PCR によって臓器中の組み換えベクターを検出した。同時にホルマリン固定標本を作り、病理組織学的解析をおこなった。(神田、佐多)
- 2) レトロウイルスベクターは、製造過程で自律複製能を獲得した組み換え体(RCR、マウス白血病ウイルスと基本的に同一のものが生じる。RCR が病原性を持つとされ、その排除が課題となっている。そこで、マウス白血病ウイルス (10^{14} ゲノムコピー) を 3 頭の雄カニクイサル大腿静脈に接種し、1 週ないし 1 ヶ月後に各臓器を回収した。env 遺伝子を増幅する nested PCR で、プロウイルスの有無を調べた。(北村、佐多)
- 3) SeV ベクターは、ワクチン抗原産生系として臨床応用されることが期待されているので、マカクサルエイズモデルを使い、SeV ベクターによるワクチン抗原発現効果と安全性の解析を行った。サル免疫不全ウイルス (SIV) Gag 発現 SeV ベクター (SeV-Gag) と対照 SeV ベクター (SeV-control) 10^8 CIU を、各々マカクサル 3 及び 2 頭に経鼻接種し、接種

後 1 週および 3 週目の末梢血リンパ球中の SeV 特異的 T リンパ球レベルを測定した。また、マカクサル 3 頭に、SIV の Env・Nef 以外の抗原を発現する DNA (CMV-SIVGP) を接種後、さらに 6 週目に SeV-Gag 10^8 CIU を経鼻接種して、SeV-Gag 接種後 1 週および 2 週目の末梢血リンパ球中の Gag 特異的 T リンパ球レベルを測定した。1 頭からは SeV-Gag 接種後 1 週目に摘出した扁桃中の Gag 特異的 T リンパ球レベルを測定した。(俣野)

- 4) 免疫系が正常なマウスを使ってヒト膀胱癌の腹膜播種モデルを作り、弱毒化 HSV が抗腫瘍効果を持つか調べた。HSV の機能不明な遺伝子産物に対する特異抗体、動物細胞発現系、遺伝子欠損ウイルス等を作製し、各遺伝子産物のウイルス増殖、病原性発現における役割を調べた。(西山)
- 5) 177 頭のカニクイサルについて、CD3 に対する標準単クローン抗体 FN18 との反応性及び PCR で増幅した CD3 ϵ DNA 断片の restriction fragment length polymorphism(RFLP)解析を行った。FN18 との反応性とリンパ球サブセットは FACS によって調べた。(山田)

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所において行われる動物実験に関する基本方針(昭和 62 年 11 月 19 日)ないし名古屋大学医学部倫理規定に沿って、審査委員会に実験計画を申請し、許可を得て行っている。

C. 研究結果

- 1) AAV ベクターを経静脈接種したカニクイサルでは、接種 2 日後に脾臓に多量のベクター ($>10^5$ copy / 10^5 cells) が認められた。その他、肺、扁桃、腋窩腺、腸間膜リンパ節、腸骨リンパ節に $10^3 \sim 10^4$ copy / 10^5 cells の、卵巣、子宮、心臓、腸に $10 \sim 10^2$ / 10^5 cells のベクターが存在し、尿中にもベクターが検出された。90 日後でも、脾臓、リンパ組織を中心に、大脳、小脳、骨髄、腸、気管や

生殖器にもベクターが存在していた。90日後にベクターを追加接種したサルでは、剖検時に著明な変化は認められなかった。病理組織所見においても、AAV ベクターに起因すると思われる変化はなかった。ベクターの染色体への組み込み、導入遺伝子の発現、抗 AAV 抗体の有無について検討を進めている。(神田、佐多)

- 2) MLV を接種したサルの臓器から抽出した DNA を鋳型にし、env 遺伝子を増幅する nested PCR を行った。30 サイクル、2 回の増幅ではプロウイルス DNA は検出できなかった。60 サイクル、2 回の増幅では、骨髄、胸腺、精巣、そけいリンパ節、腸間膜リンパ節、大脳由来 DNA にプロウイルスが検出された。(北村、佐多)
- 3) SeV ベクターを経鼻接種したマカクサルにおいて、病的臨床所見は認められなかった。免疫応答は良好で、接種後 1 週目より、末梢血中にベクター自身に対する特異的 T リンパ球の誘導が認められ、やや CD4 T リンパ球の誘導が優位であった。3 週目には、さらに高レベルの特異的 T リンパ球が認められ、CD8 T リンパ球の誘導が優位であった。導入抗原である Gag に特異的な T リンパ球は、接種後 2 週目より末梢血中に検出された。一方、DNA ワクチンでプライムしたサルに SeV-Gag ベクターを経鼻接種した場合は、1 週目より高レベルの Gag 特異的 T リンパ球の誘導が認められた。扁桃より分離したリンパ球中には、高レベルの Gag 特異的 T リンパ球誘導が認められ、SeV ベクターワクチンシステムは、効率良い粘膜免疫誘導能を持つことが示唆された。(俣野)
- 4) HSV 1 型 HF 株由来の Clone10 に優れた抗腫瘍作用があることを見出した。すなわち、肉腫細胞 NfSa の腹膜内播種モデルにおいて Clone10 を腫瘍細胞接種後 7、8、9 日の 3 日間連続投与すると、対照群がすべて死亡するのに対し、90% のマウスが生残した。生残したマウスは、NfSa 細胞の再接種に対して抵抗性を示し、腫瘍免疫の成立が示唆された。Clone10 のゲノム構造を詳細に検討し、UL56 の N 末端を含む 3829 塩基対の欠損があること、倒置反復配列にお

ける大きな rearrangement があることがわかった。また、UL56 遺伝子産物は C-terminal anchored typeII membrane protein であり、ゴルジ体や early endosome に分布すること、lipid raft と会合していることが示された。小胞輸送に関与している可能性が高い。(西山)

- 5) カニクイザル CD3 分子の検出に使われる標準抗体 (FN18) と反応しない CD3 分子は、67 番のグルタミン酸がグリシンに置換していた。フィリピン産のカニクイザルの大部分は FN18 に反応しないことがわかった(山田)

D. 考察

- 1) サルへ AAV ベクターを経静脈接種すると、脳を含む全ての臓器にベクターが運ばれることがわかった。接種後 3 ヶ月経過後でも種々の臓器にベクターが存在するので、これらの臓器に感染していることが強く示唆された。病理組織学的には目立った変化は無いものの、今後ベクター核酸が陽性であった組織材料を用い、ベクターの染色体への組み込みの有無と導入遺伝子の発現を調べ、血管内皮細胞やリンパ球から臓器の実質部分への感染拡大の有無を明らかにする必要がある。特に生殖細胞への組み込みに留意しながらさらに長期の観察実験を行うことも必要である。(神田、佐多)
- 2) 60 サイクル、2 回の PCR で検出されうる程度の微量なプロウイルスが、少なくとも接種後 1 ヶ月では個体内から排除されないらしい。プロウイルスは、長期的には癌の原因となりうるので、慎重な追試験が必要である。(北村)
- 3) マカクサルへの SeV ベクターの複数回接種によって病的臨床所見は認められず、サルにおける SeV ベクターの安全性は確認されつつある。SeV ベクターの複製は、経鼻接種後 1 週間以内にピークに達することが知られているが、SeV 特異的 T リンパ球が接種後 1 週間以内に出現することから、ベクター複製の抑制に細胞性免疫が関わっているらしい。こ

の迅速かつ強力な免疫反応は、SeV ベクターの安全性を支持している。一方、Gag 特異的 T リンパ球誘導も認められたことから、SeV ベクターの複数回接種も有効性向上の選択肢となりうる。DNA プライム後のサルでは、顕著なブースター効果が認められた。また、霊長類動物の扁桃はマウスの nasal-associated lymphoid tissue に相当すると考えられているので、SeV-Gag 経鼻接種後、扁桃由来のリンパ球中に特異的 T リンパ球が認められたことは、SeV ベクター経鼻接種が粘膜免疫誘導能を持つことを示している。(俣野)

- 4) HSV の UL56 遺伝子欠損増殖型弱毒株は、マウスモデルにおいて優れた腫瘍抑制作用を持つ。腫瘍塊内部には HSV 抗原が認められたが、ウイルス感染による細胞死だけでは抗腫瘍活性を説明できない。免疫系の関与を中心に、今後の検討が必要である。(西山)

E 結論

健常なサルに投与された RCR や AAV ベクターは、1~3 ヶ月後も各種臓器に存在していた。この時点で病理組織学的な異常は認められなかったものの、今後ベクターの残存期間、存在する細胞種、存在様式、導入遺伝子の発現、病理所見等を長期に渡って追跡する必要がある。特に、遺伝子治療の対象となる患者は免疫能が低下していると予想されるので、免疫抑制下でのベクターの体内動態、病原性等に留意した検討が求められる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究報告書参照。

2. 学会発表

各分担研究報告書参照。

H. 知的所有権の取得状況

なし

II. 分担研究報告

1. アデノ随伴ウイルス及びアデノ随伴ウイルスベクターの 病原性と安全性の評価に関する研究

分担研究者 神田 忠仁 国立感染症研究所遺伝子解析室長

研究要旨 アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、先天性、後天性の遺伝子欠損症に対し、治療用遺伝子を患者細胞染色体に組み込み、長期にわたって安定に発現させ続ける遺伝子治療への応用が期待されている。しかし、AAV ベクターが組み込まれた細胞に AAV とヘルパーウイルスが感染するとベクターの増殖が起こることがわかり、ベクターの患者体内の別の部位への感染や、生殖細胞への感染による子孫への影響、患者から環境に放出されて二次感染を起こす可能性が示されて、AAV ベクターの安全性評価が求められている。そこで、安全性・有効性を評価する基礎となるベクターの詳細な体内動態と AAV 生活環の解明をめざしている。今年度は、精製した AAV ベクターを、 3×10^{10} ゲノムコピーずつ 4 頭のカニクイザルへ大腿静脈へ接種し、2 日目及び 90 日目に臓器を回収し、ベクターの存在を PCR で調べた。2 日目には、生殖器を含む全ての臓器にベクターが検出された。90 日目でも、脾臓を中心にリンパ組織、脳、生殖器等にベクターが検出され、AAV ベクターは体内に長く残ることが示された。また、90 日後に 1 頭には 2 度目の接種を行い、その 2 週間後に解剖した。特に顕著な免疫反応は観察されなかった。ベクターの存在する細胞種、染色体への組み込み、導入遺伝子の発現、抗 AAV 抗体の有無、及び病理所見について検討を進めている。

A. 研究目的

AAV ベクターのリスクを評価する基礎情報として、ベクターの体内動態を明らかにする。不明な点の多い AAV の生活環とその潜伏・持続感染の分子機構を明らかにする。

B. 研究方法

1) β -gal 発現 AAV ベクターの作製は、ベクタープラスミドとヘルパープラスミドをヒト 293 細胞にトランスフェクトする方法を用い、アデノウイルスの混入を避けた。ベクタープラスミドとヘルパープラスミドを導入した細胞を 3 日後に回収し、少量の MEM に浮遊させた後、3 回の凍結融解で抽出液を得た。DNA 分解酵素、RNA 分解酵素、及びデオキシコロール酸で処理した後、

PBS (pH7, 4)で平衡化したヘパリンアフィニティーカラムを通した。カラムを 0.1M NaCl PBS で洗った後、0.4M NaCl PBS で溶出した。溶出液には、少量の細胞成分が残るので、さらに陰イオン交換カラム (POROS50PI)を通し残りの細胞成分を吸着させて除いた。組み換えベクター粒子に含まれる β -gal 遺伝子のコピー数でベクターを定量した。

- 2) カニクイザルは、生殖年齢に達した雄 1 頭と雌 4 頭を用いた。雌 1 頭は対照としてベクターを含まない生理食塩水を接種し、他の 4 頭に 3×10^{10} ゲノムコピーの組み換え AAV ベクターを大腿静脈に接種した。雌 1 頭を接種後 2 日目に、雌雄各 1 頭を 90 日目に解剖し、各臓器を回収した。雌 1 頭には 90 日目に同量のベクターを追加接種し、その 2 週間後に臓器を回収した。
- 3) 各臓器片から総 DNA を抽出し、 β -gal 特

異的プライマーを用いた PCR によって臓器中の組み換えベクターを検出した。

- 4) AAV の Rep 蛋白質の標的となる細胞蛋白質は、大腸菌での two-hybrid 系を使った。
- 5) ヒト胎盤由来ゲノムライブラリーから、ヒト CDC45 遺伝子と UFD1L 遺伝子の転写調節領域をクローニングした。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所において行われる動物実験に関する基本方針(昭和 62 年 11 月 19 日)に沿って、審査委員会に実験計画を申請し、許可を得て行っている。

C. 研究結果

- 1) カラムクロマトグラフィを組み合わせた方法で、高純度、高濃度の AAV ベクターを作製することができた。ベクター溶液を銀染色で調べると、AAV のキャプシド蛋白質しか認められず、少なくとも純度は 95%以上と推定した。ベクターの濃度は 10^{10} ゲノムコピー/ml 程度で、 10^8 /ml 程度の感染価を示した。また、PCR を用いた AAV ベクターの検出方法を検討し、細胞 1000 個あたりに存在する 0.5-1 copy のベクターを確実に検出する条件を設定した。
- 2) AAV ベクターを経静脈接種したカニクイサルでは、接種 2 日後に脾臓に多量のベクター ($>10^5$ copy / 10^5 cells) が認められた。その他、肺、扁桃、腋窩腺、腸間膜リンパ節、腸骨リンパ節に $10^3 \sim 10^4$ copy / 10^5 cells の、卵巣、子宮、心臓、腸に $10 \sim 10^2$ / 10^5 cells のベクターが存在し、尿中にもベクターが検出された。90 日後でも、脾臓、リンパ組織を中心に、大脳、小脳、骨髄、腸、気管や生殖器にもベクターが存在していた。90 日後にベクターを追加接種したサルでは、剖検時に著名な変化は認められなかった。ベクターの染色体への組み込み、導入遺伝子の発現、抗 AAV 抗体の有無、及び病理所見について検討を進めている。
- 3) AAV は宿主細胞染色体にゲノムを組み込み潜伏持続感染する。この独特な生活環を可能にしている AAV の非構造蛋白質、Rep の機能解析を進め、Rep の標的となる細胞蛋白質の候補を得た。
- 4) ヒト CDC45 遺伝子と UFD1L 遺伝子に挟

まれた 800 塩基の領域は、両方向に転写活性を持つことがわかった。

D. 考察

- 1) AAV ベクターのサルへの経静脈接種では、脳を含む全ての臓器にベクターが運ばれることがわかった。接種後 3 ヶ月経過したサルで、依然として種々の臓器にベクターが存在するので、接種後、血流によって全身に運ばれるだけでなく、種々の臓器に感染することが強く示唆された。PCR でベクター核酸が陽性であった組織材料を用い、ベクターの染色体への組み込みの有無、導入遺伝子の発現を調べ、感染が、血管内皮細胞やリンパ球から臓器の実質部分へ拡大しているのか明らかにする必要がある。また、丹念に病理所見を調べて、病原性についての知見を集めなければならない。特に生殖細胞への組み込みに留意しながら、さらに長期の観察実験を行う必要がある。
- 2) AAV が潜伏・持続感染する機構を担う AAV の Rep 蛋白質は、AAV ゲノムの複製とキャプシドへのゲノムの取り込みに必要であり、感染後は AAV ゲノムのヒト 19 番染色体の特定領域 (AAVS1) への組み込みに不可欠である。一方、細胞の複数の遺伝子発現に影響を与えることも知られている。AAV の生活環を理解し、或いは AAV ベクターの AAVS1 への組み込みに利用したり、AAV ベクターが組み込まれた細胞からレスキューされるのを防ぐ方法を工夫するためにも、Rep 蛋白質の機能を詳しく知ることが必要である。Rep 蛋白質が細胞のどのような蛋白質を標的にするのかを知ることが重要と考え、解析を進めている。
- 3) CDC45/UFD1L 遺伝子のプロモーターは、短い領域から二つの遺伝子を同時に発現させる技術へ応用できる。特にベクター粒子内に組み込める DNA の大きさが 4.7kb しかない AAV ベクターには役立つと期待できる。

E. 結論

経静脈投与された AAV ベクターは、サル体内で 90 日以上、リンパ組織を中心に生殖器を含む様々な臓器に存在し続ける。ベクターが存在する細胞種、存在様式や導入遺伝子の発現を調

べるとともに、さらに長期間にわたるベクターの体内動態の観察が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kukimoto, I., and Kanda, T.: Displacement of YY1 by Differentiation Specific Transcription Factor hSkn-1a Activates P670 Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* 75: 9302-11, 2001.
2. Igaki, H., Nakagawa, K., Aoki, Y., Ohtomo, K., Kukimoto, I., and Kanda, T.: Characterization of the Bi-directional Transcriptional Control Region between the Human UFD1L and CDC45L Genes. *BBRC* 283, 569-576, 2001
3. Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Human Papillomavirus 16 Minor Capsid Protein L2 N-terminal Region Containing a Common Neutralization Epitope Binds to the Cell Surface and Enters the Cytoplasm. *J. Virol.* 75: 2331-1336, 2001.
4. Kawana, K., Kawana, Y., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Nasal Immunization of Mice with Peptide Having a Cross-Neutralization Epitope on Minor Capsid Protein L2 of Human Papillomavirus Type 16 Elicits Systemic and Mucosal Antibodies. *Vaccine* 19: 1496-1502, 2001.

2. 学会発表

1. 森 清一郎、竹内隆正、神田忠仁 : Rescue of a recombinant AAV vector from the vector-transduced HeLa cells. 第7回日本遺伝子治療学会。
2. 川名 敬、八杉利治、松本光司、武谷雄二、吉川裕之、神田忠仁 : ヒトパピローマウイルス 16 型 (HPV16) に対する血清中和抗体の有無と子宮頸部病変。第 60 回日本癌学会総会。

3. 榎本 裕、柗元 巖、神田忠仁 : ヒトパピローマウイルス 16 型 (HPV16) 後期プロモーターの転写調節機構。第 49 回日ウイルス学会総会。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

2. ウイルスベクターの病理学的安全性評価研究

分担研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長
研究協力者 佐藤 由子、秋山 ひと美（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨 遺伝子治療用ベクターの安全性評価法の確立を目的として rAAV ベクターをカニクイサル 4 頭に投与し、3 日後ないし 3 ヶ月後に剖検し、対照 1 頭とともに病理組織学的に検討した。いずれのサルにおいても有意な影響は観察されなかった。肝臓や腎臓組織に著変はみられず、投与後 3 日のサルでは免疫系組織（脾臓やリンパ節、パイエル板等）において T および B 細胞両者の反応がみられたが、3 ヶ月後では T 細胞領域の反応のみがみられた。一部のサルで肺の気管支周囲のリンパ系組織が目立ち、一頭には誤燕性肺炎がみられたが、ベクター投与との関連性は考えにくい。今後はより長期的観察を試み、安全性評価法の確立を目指したい。

A. 研究目的

遺伝子治療に用いるベクターの安全性および有効性を評価するシステムを作ることを目的とし、病理組織学、免疫組織化学、そして in situ hybridization 法を応用してサル組織病変の解析を行う。それぞれのベクターにより特性があるが、その有効性評価とともに組織や臓器に対する影響を病理学的に解析することで、安全性を評価する。一方で、安全性評価のための汎用性を目的とした実験系の開発を試みる。

これまで種々のウイルスベクターはその有効性についておもに検討されてきたが、安全性の検討についてはいまだ十分とはいえない。とくにウイルスベクターの組織内広がりやこれによる臓器組織に対する影響についてサルを用いた報告は少ない。

そこで本年度は rAAV ベクターを大量に調整し、5 頭のカニクイサルに静脈接種し、適当な時期に剖検し、rAAV の大量投与による影響を病理組織学的に検討することを目的とした。

B. 研究方法

4 才から 5 才のカニクイサル計 5 頭を使用し、陰性対照として雌 1 頭を用い、ほか雄 1 頭、雌 3 頭に recombinant β -gal-AAV, 2.5×10^{10} の

ウイルスを静注した。このベクターには AAV のうち両側端を残し、CMV プロモーターと β -galactosidase 遺伝子を挿入した組み換え体である。急性毒性をみるために 3 日後に、また中期的毒性として 3 ヶ月後に、さらにうち 1 頭については 2 ヶ月後に再度同じ rAAV, 5×10^{10} を同じルートで追加投与し 3 ヶ月目に、過剰の麻酔薬の投与にて安楽死させ、剖検を行った。剖検時に出来るだけ多くの臓器組織を採取し、PCR 用に凍結標本を、病理組織学的検査のためには 10%緩衝ホルマリンで固定した。固定標本は再切り出し後にパラフィンに包埋し、HE 標本および免疫組織化学を行った。検索臓器は、脳、脊髄、眼球、耳下腺、顎下腺、舌、扁桃、甲状腺、副甲状腺、胸腺、心臓、肺、縦隔、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、胃、小腸、大腸、卵巣ないし精巣、子宮、膀胱、リンパ節（鼠径部、腋窩、肺門、腸間膜）、骨髄、鼻粘膜、筋肉、皮膚で、各サル例について 32-46 個、計 188 個の標本作製した。免疫組織化学にはリンパ系マーカーとして CD3, CD20, CD68 を中心に行い、また β -gal アッセイも行った。経過中は、実験動物の一般観察とともに、体重や血圧測定、血算、血液生化学、尿検査を定期的に行った。

（倫理面への配慮）

実験に用いたサルは、動物実験委員会の承認を得ている。また、国立感染症研究所実験動

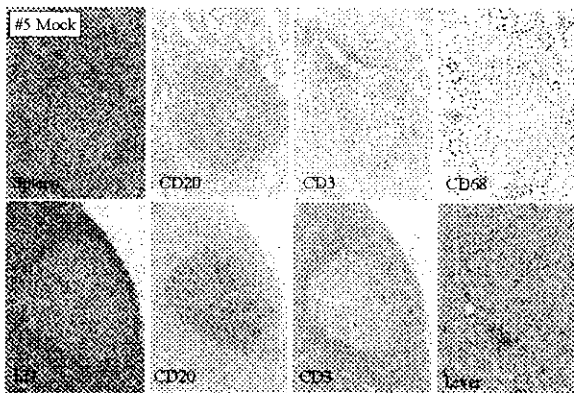
物取り扱いに基づいて実験を行った。剖検時には、苦痛のないように過剰のケタラール麻酔薬を投与し、全採血を行って安楽死させた後、剖検を行った。

C. 研究結果

1. 実験中の一般観察および血液検査では、いずれのカニクイサルも特記すべき所見はなかった。一般動物観察では特に著変はみられず、体重の経過では、一時的にごく軽度の体重減少がみられたが、剖検時まで順調に体重が増加した。血算、血液生化学、尿検査にても異常はみられなかった。

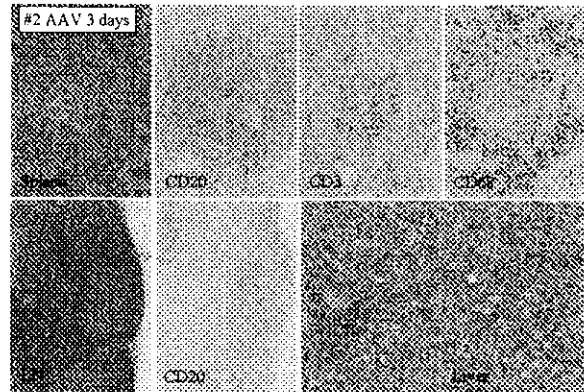
2. 5 頭の実験サルの病理組織所見は下記の通りであった。

a) No. 5 のサルは 4.8 才の雌で、体重は 3.2kg で、No. 2 の実験サルの対照例で rAAV を含まない溶液のみを静注し、3 日後に安楽死させた。病理組織学的には、脾臓には二次濾胞がみられ一部は軽度の硝子化がみられた。B 細胞および T 細胞領域ともに発達している。リンパ節や小腸パイエル板でも同様の所見であった。肝臓と腎臓の間質に小リンパ球の集簇果がみられる。膀胱には上皮細胞の空胞化とリンパ球浸潤があり、肺の気管支壁にリンパ濾胞をみる。鼻腔の扁平上皮粘膜の間質血管内に寄生虫がみられ、*Anatorichosoma cynomolgi* という線虫と考えられた。ときどき鼻出血の原因となるもので、カニクイサルにまれにみられるものである。線虫感染による免疫系の反応と考えられた。

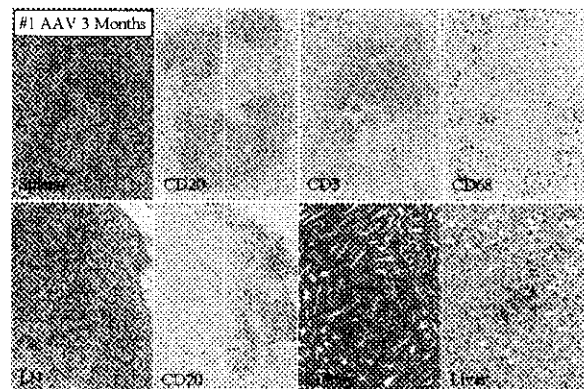


b) No. 2 のサルは 5.8 才の雌で、体重は 3kg。rAAV を 2.5×10^{10} 静注した。大量のベクターを投与したので、急性毒性が出現す

るかどうかを病理組織学的に検討した。しかしながら、肝臓や腎臓には著変は認められず、他臓器にも毒性を示す所見は認められなかった。甲状腺には嚢胞が、子宮頸部には扁平上皮下にリンパ球浸潤がみられるのみであった。リンパ節は B と T 領域の拡大があり、反応性病変と考えられた。脾臓の二次濾胞は No. 5 と同様であったが、マクロファージの浸潤がめだった。

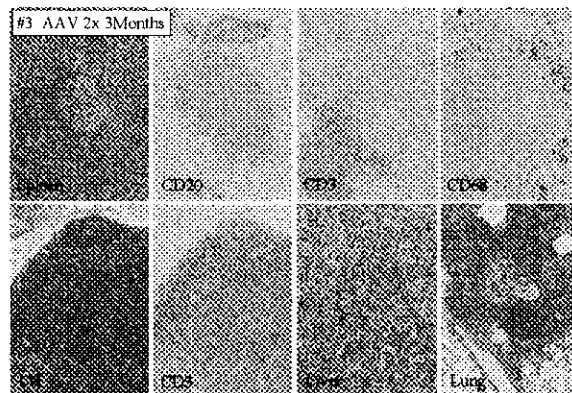
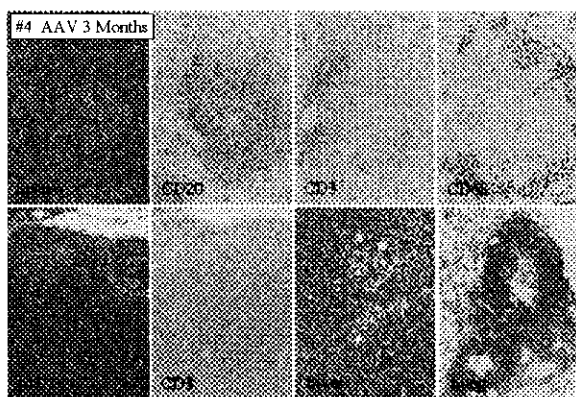


c) No. 1 のサルは 5.5 才の雄で、体重は 5.8kg。rAAV を同様に接種したのち、3 ヶ月後に安楽死させ、剖検した。体重は 6.5kg と増加していた。肝臓、腎臓、耳下腺の間質に小リンパ球浸潤巣がみられたが、他の所見は認められなかった。このリンパ球は主に T 細胞で一部 B 細胞が混在していた。リンパ節は T 細胞領域の拡大があり、濾胞は目立たない。脾臓は二次濾胞が形成されているが、特に著変はない。



d) No. 4 のサルは 5.1 才の雌で、体重は 3.3kg。rAAV を同様に接種後 3 ヶ月後に安楽死させた。上記 No. 1 のサルと同じ実験群に属する。肝臓には脂肪滴が小葉周辺部に認められた。リンパ節は T 細

胞領域の拡大が軽度に認められ、B 細胞領域は目立たない反応性変化と考えられた。脾臓についても同様で、ややマクロファージが多い印象を受けるほか、著変は認められない。肺の気管支周囲に形質細胞、興産球そして多核巨細胞がみられ、軽度の気管支炎をみる。



e) No. 3 のサルは 4.8 才の雌で、体重は 3kg。rAAV を接種した後、2 ヶ月後に再度 5×10^{10} を再投与した。3 ヶ月後の体重は 3.1 kg と軽度増加した。肝臓に巣状の凝固壊死巣がありリンパ球の浸潤を伴っていたが、一箇所のみ認められた。肺には誤燕性肺炎があり、誤燕した異物とそれに対する反応性病変が一部に認められた。子宮体部の粘膜内にリンパ球の軽度の浸潤がある。脾臓には軽度の二次濾胞の過形成があり、硝子様変化を伴っていた。リンパ節は T 細胞領域の拡大がおもで、小腸パイエル板も同様であった。他の臓器には著変はみられなかった。

f) 4 頭のサル全体として、急性ないし亜慢性毒性変化はみられなかった。脾臓やリンパ節の病理組織変化はいずれも反応性所見であり、No. 2 のサルでは B 細胞および T 細胞領域の両者の反応がみられたが、No. 1, 4, 3 ではおもに T 細胞領域の反応のみであった。肝臓や腎臓そして肺にみられたリンパ球浸潤はサルでは時々みられるものであり、また主に T 細胞であること、全体ではなく一部であることから、非特異変化と考えられた。ただし、No. 5 のサルの鼻腔粘膜に線虫の存在や、No. 3 の誤燕性肺炎は病的所見であるが、本実験による影響とは考えにくい。

g) β -gal アッセイないし免疫組織化学的検討では特異的シグナルを検出できなかった。

上記について表にまとめると下記の通りである。

Monkey	Inoculum	Spleen	LN	Liver	Others
#5 F	Mock (3d)	Usual	Follicular hyperplasia	Lymphocytes	Anatorichosoma cynomolgi Lymph follicle in bronchus
#2 F	rAAV (3d)	Follicular hyperplasia	B & T expansion macrophage	NP	Thyroid cyst, lymphoid hyperplasia in uterine cervix
#1 M	rAAV (3m)	Usual	T cell expansion	Lymphocytes	Lymphocytes in kidney
#4 F	rAAV (3m)	Usual	T cell expansion	Fatty droplets	Lymph follicle in bronchus
#3 F	rAAVx2 (3m)	Usual, hyalin	T cell expansion	Coagulation necrosis with lymphocytes infiltration	Focal aspiration pneumonia

D. 考察

今回 5 頭のサルを用いて、大量の rAAV ベクターを静注し、3 日後および 3 ヶ月後の影響を剖検後のサル臓器組織で病理組織学的に検討した。その結果、大きな影響は認められなかった。個々のサルにおいては、軽度のリンパ球浸潤が肝臓や腎臓等、そして脾臓やリンパ節そして小腸パイエル板等のリンパ装置に軽度の変化を認め、また肺の気管支壁にリンパ濾胞の形成をともなうリンパ球浸潤がめだった。前者については、ときどきみられる所見であり、今回の実験操作に伴った直接的な病変とは言い難い。後者については、いわゆる異物を投与した結果の反応性病変と考えられ、rAAV の直接的影響とは考えにくい。対照としたサルに線虫がみられたり、3 ヶ月後に剖検したサルに誤燕性肺炎がみられたが、特異的な病変とは考えにくい。

No. 2 と 4 のサルでは肝臓や脾臓でマクロファージの浸潤が目立ち、3 ヶ月後に剖検したサル No. 1, 3 では目立たなかったが、対照 (No. 5) と比較すると有意な所見とはいえなかった。

β ギャルアッセイや免疫組織化学で β -gal の検出を試みたが、検出することは出来なかったので、検出感度以下と考えられた。かなりのベクターウイルスは速やかに排除される可能性が考えられた。

今回生殖器系組織には著変は認められなかったが、今後、安全性について検討するにはより長期の観察が必要と思われた。

E. 結論

今回 5 頭のカニクイサルを用いて、大量の rAAV ベクターウイルスを静注し、3 日後および 3 ヶ月後の影響を剖検後のサル臓器組織で病理組織学的に検討した結果、大きな影響は認められなかった。今後はより長期の観察が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

とくになし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

とくになし。

3. 遺伝子治療用レトロウイルスベクターの安全性評価に関する研究

分担研究者 北村義浩 東京大学医科学研究所先端医療研究センター
感染症分野助教授

研究要旨 マウス白血病ウイルス（MLV）由来のレトロウイルスベクターの安全性は元になった MLV のヒトにおける病原性を元にして評価すべきである。そこで、オスのサルにアンフォトロピック MLV を大腿静脈経路で 10^{14} 葉投与して 1 週間後または 1 ヶ月後にとさつし、各臓器における MLV のプロウイルスの存在を高感度 PCR 法でエンベロープ配列を標的に調べた。骨髄・胸腺・精巣・そけいリンパ節、腸間膜リンパ節・大脳ではプロウイルスを確認できた。脊髄・肝臓・心臓・腎臓ではプロウイルスの存在を確認できなかった。平成 13 年度はこの PCR 法によるプロウイルス検出システムを確立できた。

A. 研究目的

現在使用されている遺伝子治療用ウイルスベクターのうち、宿主ゲノムに組み込まれて遺伝子発現するタイプのもののうち、主なものはマウス白血病ウイルス（MLV）由来のレトロウイルスベクターである。このベクターは自律複製しないような仕組みを備えているものの、製造の過程でしばしば自律複製可能レトロウイルス（RCR）が混入する。レトロウイルスベクターの安全性は元になった MLV と混入する可能性のある RCR のヒトにおける病原性をもとにして評価すべきである。したがって、霊長類で自律複製可能なレトロウイルスのサルにおける病原性を解析すれば、品質管理をする上でも遺伝子治療後の経過を観察する上でも役立つはずである。本研究課題は自律増殖可能なアンフォトロピック MLV をサルに投与し、その様々な組織でのプロウイルスの有無を調べることを目的とした。

B. 研究方法

3 頭のオスカニクイサル（サル番号 #1 - #3）に A-MLV（A1080A 株）を 10^{14} を生理食塩水にけん濁して大腿静脈から投与した。サル #3 には、摂氏 56 度で 1 時間非働化したウイルス

を投与した。サル #1 は 1 ヶ月後に、サル #2 と #3 は 1 週間後に屠殺して各臓器を採取した。それらから、ゲノム DNA を調製し、エンベロープタンク質を標的としてネステッド PCR を行った。

C. 研究結果

サル #1 においては骨髄・胸腺・精巣・そけいリンパ節、腸間膜リンパ節・大脳ではプロウイルスを確認できたが、脊髄・肝臓・心臓・腎臓ではプロウイルスの存在を確認できなかった。サル #2 においては骨髄・胸腺・精巣ではプロウイルスを確認できたが、そけいリンパ節・腸間膜リンパ節・大脳脊髄・肝臓・心臓・腎臓ではプロウイルスの存在を確認できなかった。

D. 考察

少なくとも感染後 1 ヶ月ではプロウイルス化した A-MLV は個体内から排除されないことが分かった。プロウイルスは、長期的にはガンの原因となりうるので A-MLV がヒトにおいて病原性が皆無であるとは考えられない。今後は、もう少し長期にわたるプロウイルスの排除について調べる予定である。

E. 結論

MLV は多彩な臓器に感染しプロウイルス化した。
少なくとも 1 ヶ月ではこれらプロウイルスは排除されなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

4. センダイウイルスベクターのサルにおける病原性と 安全性の評価に関する研究

分担研究者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター
主任研究官

研究要旨 ウイルスベクターは遺伝子治療用ベクターとして最も有望なもの
の 1 つであり、特にワクチンへの応用が期待されている。そのなかでも、センダイ
ウイルス（SeV）ベクターの遺伝子導入・発現効率の高さは、培養細胞およ
び小動物において既に証明されている。しかし、ヒトへの臨床応用を検討する
にあたっては、霊長類動物における解析が必須である。我々はこれまで、サル
レベルにおける組換え SeV ベクター経鼻接種後の抗原発現を解析し、マカクサル
エイズモデルにおいて、単独投与さらには DNA ワクチン併用プライム・ブ
ースト法による優れた感染防御効果を明らかにしてきた。本研究では、組換え
SeV ベクターを用いたワクチン抗原産生系の安全性と有効性の確立を目的とし
て、マカクサルレベルにて、組換え SeV ベクター経鼻接種後の免疫誘導を中心
とした解析を行なった。組換え SeV 接種後の SeV 特異的免疫の解析では、接
種後 1 週目より高レベルの SeV 特異的 T リンパ球の誘導が認められ、この SeV
特異的免疫反応が組換え SeV 複製の抑制に重要な役割を果たしていることが示
唆された。一方、抗原特異的免疫の解析では、単独接種と比較して、DNA プラ
イム・組換え SeV プースト後の特異的 T リンパ球の反応は、迅速かつ高レベル
であることが明らかとなった。さらに、末梢血リンパ球中だけでなく、扁桃由
来のリンパ球中にも、高レベルの特異的 T リンパ球の誘導が認められ、組換え
SeV ベクター経鼻ワクチンの粘膜免疫誘導能が示唆された。

A. 研究目的

ウイルスベクターは遺伝子治療用ベクターとして最も有望なもの
の 1 つであり、ワクチン抗原産生系への応用の可能性が注目されている。そ
のなかでも、近年開発されたセンダイウイルス（SeV）ベクターシステムは、培養細胞および
小動物レベルにおける高い遺伝子導入・発現効率が既に証明されており、有効性の点で充分期
待できる。また、マウスを自然宿主とする SeV は、ヒトにおける病原性が知られておらず、安全
性の点でも期待しうる。しかし、ヒトへの臨床応用を検討するにあたっては、霊長類動物に
おける解析が必須である。ウイルスベクターワクチンは、特に、細胞性免疫誘導が重要とされる慢性感染症に対して有用
と考えられている。そこで我々は、組換え SeV

ベクターをワクチン抗原産生系として応用することを目的として、代表的慢性感染症の 1 つで
あるエイズを対象疾患とし、マカクサルエイズモデルにおける組換え SeV ワクチンの効果を解
析してきた。抗原としては、サル免疫不全ウイルス（SIV）Gag を選択し、Gag 抗原発現組換
え SeV ベクター（SeV-Gag）を作成した。SeV-Gag 経鼻接種後の急性期の解析では、鼻
腔粘膜における良好な Gag 発現が認められたが、その発現は鼻腔粘膜および鼻腔近傍リンパ節に
限局化していた。一方、感染防御効果の解析では、SIV チャレンジ後の set-point plasma SIV
量は、対照群と比較して、SeV-Gag 経鼻接種群では顕著に低い値を示した。さらに、DNA ワ
クチンとの併用による DNA/SeV-Gag プライム・ブーストシステムでは、極めて優れた急性
エイズ発症防御効果が認められた。

HIV および SIV 感染においては、血液感染の他、性交渉による粘膜感染も主要な感染経路であり、この粘膜感染に対する防御においては、粘膜免疫が重要な役割を担っている。組換え SeV ワクチンは、その抗原発現に経鼻接種が最も有利と考えられており、その経鼻接種により鼻腔近傍に限局した抗原発現が認められることから、抗原特異的粘膜免疫誘導に有用と期待される。以上をふまえ、本研究では、組換え SeV ベクターを用いたワクチン抗原産生系の安全性と有効性の確立を目的として、マカクサルレベルにて、SeV-Gag ワクチン経鼻接種後の免疫誘導を中心とした解析を行なった。まず、主に安全性に関わる免疫として、SeV 特異的免疫反応を解析した。一方、主に有効性に関わる免疫として、SIV Gag 特異的免疫反応を解析し、さらに粘膜免疫誘導の可能性を検討した。

B. 研究方法

全ての動物実験は、倫理面も含めて国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、その承諾を得てから開始した。

実験 1 (SeV 特異的免疫の解析) :

コントロール SeV (SeV-control) 10^8 CIU を経鼻接種したマカクサル 2 頭、SeV-Gag 10^8 CIU を経鼻接種したマカクサル 3 頭の計 5 頭を用いた。SeV 感染 autologous B 細胞との共培養により誘導される interferon- γ (IFN- γ) 陽性 T リンパ球を flow-cytometry にて検出することにより、接種後 1 週間および 3 週目の末梢血リンパ球中の SeV 特異的 T リンパ球レベルを測定した。

実験 2 (Gag 特異的免疫の解析) :

マカクサル 2 頭に、SIV の Env・Nef 以外の抗原を発現する DNA (CMV-SIVGP) を接種後、6 週目に SeV-Gag 10^8 CIU を経鼻接種した。Gag 発現組換えワクシニアウイルス (Vv-Gag) 感染 autologous B 細胞との共培養により誘導される IFN- γ 陽性 T リンパ球を検出することにより、SeV-Gag 接種後 1 週間および 2 週目の末梢血リンパ球中の Gag 特異的 T リンパ球レベルを測定した。

実験 3 (扁桃における Gag 特異的免疫誘導の解析) :

マカクサル 1 頭に CMV-SIVGP DNA を接種後、6 週目に SeV-Gag 10^8 CIU を経鼻接種した。SeV-Gag 接種後 1 週目に摘出した扁桃よりリンパ球を分離し、Gag 特異的 T リンパ球レベルを測定した。

C. 研究結果

組換え SeV 接種をうけたマカクサルにおいて、病的臨床所見は認められなかった。

実験 1 (SeV 特異的免疫の解析) :

SeV-control あるいは SeV-Gag 経鼻接種後 1 週間より、末梢血リンパ球中にベクター抗原自身に対する (SeV) 特異的 T リンパ球の誘導が認められ、やや CD4 T リンパ球の誘導が優位であった (図 1)。3 週間には、さらに高レベルの特異的 T リンパ球が認められ、CD8 T リンパ球の誘導が優位であった。また、血漿中抗 SeV 抗体は、経鼻接種後 1 週目は検出限界レベル以下であったが、2 週間より検出された。一方、SeV-Gag 接種サルでは、経鼻接種後 2 週間より Gag 特異的 T リンパ球の誘導が認められたが、この Gag 特異的 T リンパ球レベルと SeV 特異的 T リンパ球レベルとの間の相関は認められなかった。

実験 2 (Gag 特異的免疫の解析) :

SeV-Gag 経鼻接種によるブースト後 1 週間より、極めて高レベルの Gag 特異的 T リンパ球誘導が認められた (図 2)。そのレベルは、2 週間には 1 週間よりは低下していた。

実験 3 (扁桃における Gag 特異的免疫誘導の解析) :

末梢血中リンパ球だけではなく、摘出した扁桃より分離したリンパ球中にも、高レベルの Gag 特異的 T リンパ球誘導が認められた (図 3)。