

20020428

厚生科学研究費

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

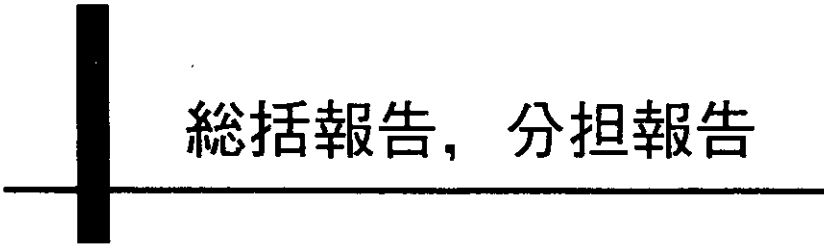
宿主応答を指標とした類人猿などを用いた
遺伝子治療法の評価系の確立

平成 14 年度 研究成果報告書

平成 15 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



総括報告，分担報告

厚生労働科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

総括研究報告書

宿主応答を指標とした類人猿などを用いた遺伝子治療法の評価系の確立

主任研究者 吉川泰弘

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究要旨

カニクイザル9頭を用い、欠損型センダイウイルスベクターを用いた筋肉内局所投与方法に関する安全性試験を実施した。ヒト治療研究のための常用量及び10倍量の投与において、特に有害な反応はみられず、安全性試験に適合することが明らかになった。MPTPによるパーキンソン病モデルサルを用いて、遺伝子治療効果を運動機能だけでなく、認知機能を基準とする評価法により、その有効性を検討した。サル類の発生工学基盤研究では新しくES様細胞株を複数作成した。カニクイザル細胞を用いて核移植実験の技術開発を進めた。これらは再生医療モデル研究を進めるにあたり、重要なツールになると考えられる。

チンパンジーではバイオプシーと器官培養法を駆使したex vivoでの評価系を確立し、経時的にウイルスベクターの遺伝子発現効率及びウイルスレセプターの発現の経時的変化を検索した。チンパンジーでは動物福祉上、実験は非侵襲的なものに限られるため、内視鏡を用いたバイオプシー技術の確立は重要な課題である。チンパンジーES細胞開発研究では、安定した過排卵誘起、体外受精及び初期胚培養の技術を確立した。ヒトへの外挿を考える上で強力なツールである。センダイウイルスベクターの新しい機能を検索するため、スナネズミを用いて脳梗塞モデルを作成し、負荷型・F欠損型・FM欠損型の有効性と安全性を評価した。FM欠損型は炎症を起さず、海馬錐体神経細胞のアポトーシスを抑制した。今後霊長類を用いてさらに有効性と安全性を確かめる必要がある。

伴侶動物を対象とした遺伝子治療研究を進めた。臨床例を増やすことによりヒトへの応用のブレークスルーが得られることが期待される。今後は遺伝子治療及び再生医療の有効性、安全性に関して動物モデルを用いて基盤研究を進めて行く予定である。

分担研究者：所属氏名

寺尾恵治 国立感染症研究所筑波霊長類
センター長

早坂郁夫 三和化学研究所熊本霊長類パーク所長

山海 直 国立感染症研究所筑波霊長類センター
主任研究官

中山 裕之 東京大学大学院農学生命科学研究科
助教授

久和 茂 東京大学大学院農学生命科学研究科
助教授

辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科
教授

A. 研究目的

フランスやアメリカのような先端医療技術の先進国では、しばしば霊長類を用いた非臨床試験なしにヒトで臨床応用がなされるケースがある。このため遺伝子治療の有効性に関する疑義や、あるいは高用量使用による死亡例あるいは白血病の誘発の可能性のような問題が生じている。

本研究は非臨床試験のためのサル類及び類人猿を用いた *ex vivo*, *in vivo* の遺伝子治療法の安全性、有効性、安定性等に関する評価システムを確立すること、サル類の ES 細胞を用いた再生医療の安全性、有効性評価のための実験手技の開発、伴侶動物モデルを用いた遺伝子治療法の有効性評価の検討など、総合的に先端医療技術の有効性を、安全性を評価することを目的としている。

非臨床試験による安全性、有効性評価はヒトに近縁な霊長類が最も適している。しかし動物福祉や生命倫理から齧歯類に比べ制約が多い。従って、動物福祉に配慮した実験系の開発が必要である。特に類人猿では非侵襲的手法を用いた評価系の開発がキーポイントとなる。他方、伴侶動物は寿命の延長からヒトと同様に老人病や癌の発生が高くなり、従来の物理・化学療法以外に遺伝子治療のような先端医療の試みが開始されつつある。

本研究班は *ex vivo* 評価のためのツール開発、評価マニュアルの作成、*in vivo* での遺伝子デリバリー系開発と評価基準の作成を試みてきた。またサル類 ES 細胞の作成、バイオハザード観点からの評価や伴侶動物を用いた遺伝子治療の有効性評価を進めている。

これらの成果は、わが国で開発されるウイルスベクターのヒトの臨床研究適用に対する安全性等の非臨床試験に有用なだけでなく、治療法の有効性評価や安全性評価の材料提供に役立つ。本研究班で対象とするモデルが齧歯類だけでなくヒトに外挿可能な伴侶動物や霊長類であるため、その成果は遺伝子治療・再生医療法が社会に受け入れられるコンセンサ

スを得るために極めて有用である。

B. C, 方法と結果

①昨年、欠損型センダイウイルスベクターの安全性評価の基礎研究として、カニクイザル6頭を用い、マーカー遺伝子を組み込んだ欠損型センダイウイルスベクターを接種し、その宿主反応を検索した。その結果、大脳髄膜、延髄、眼、鼻粘膜、腎臓でウイルスの増殖によると思われる炎症病変が観察された。しかし、病変はいずれも軽度であった。

本年度は治療用遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクターに対する宿主応答に加えて、ベクターに組み込まれているヒト由来遺伝子産物に対する宿主応答の評価と新規の遺伝子治療技術の開発を目的として以下の研究をおこなった。

A) 骨髄幹細胞を標的とした遺伝子治療で、致死量 X 線の全身照射を必要としない患者の負担の少ない骨髄採取・移植技術として期待されている骨髄還流置換法をカニクイザルに適用するためのプロトコルを作成した。

B) 骨髄幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療で、導入遺伝子の分子スイッチとしてヒトリコンビナントエリスロポエチン (rEPO) を用いるプロトコルの評価を行った。ヒト rEPO をカニクイザルに連続投与すると、短期間に抗ヒト rEPO に対する抗体が産生され、血中の rEPO が短期間で消失することが判った。これは、カニクイザルを用いてヒト由来タンパク発現遺伝子治療の評価を行う限界でもある。この欠点を克服する目的で、免疫抑制剤 (Cyclosporine A; CyA) によるヒト由来タンパクに対する抗体産生抑制を試み、抗体産生を抑制する投与方法を確立した。

C) 治療遺伝子 (ヒト Fibroblast Growth Factor-2; FGF-2) を組み込んだ F タンパク欠損センダイウイルスベクター (dFSeV/FGF) の大量接種にもなう宿主応答を評価した。(dFSeV) を 5×10^8 および 5×10^9 /Kg を筋肉内に接種したカニクイザルそれ

ぞれ3頭について、ウイルスベクターに対する宿主応答の指標として、主要リンパ球サブセットレベル、血中抗体価、血中炎症性サイトカイン濃度の経時的変化を調査するとともに、治療遺伝子 FGF-2 の発現効率およびヒト rFGF に対するサル細胞性免疫応答を指標として dFSeV/FGF の有効性評価を行った。CD4+/T細胞レベルが接種後5日目に一過性に増加したが、CD3+/T細胞、CD20+/B細胞およびCD8+/T細胞レベルには無処置対照群と比較して有意な差は認められなかった。一方、血中抗体価は 5×10^9 /Kg接種群で接種後5日目には血中抗体が検出され9日目には抗体価はプラトーに達した。炎症性サイトカインはほとんど検出されなかった。

今回の安全性試験は治療遺伝子を搭載した最終段階にあるベクターの評価であったが、大量接種で比較的早期に強力な免疫応答が生じる割には炎症反応が低いという調査結果は、dFSeVを用いた遺伝子治療の対象疾患を考慮する上で重要な知見と考えられる。接種個体全てで内在性 FGF レベル以上の FGF が接種2日目に検出されたことから、dFSeV/FGF は早期発現が期待される疾患に有効な治療用ベクターであると評価できる。

②カニクイザルで樹立された胚性幹細胞（以下 ES 細胞）株のうち、研究用に供給され汎用性の高い CMK-6 株について、バイオセーフティの観点から、4種のヘルペスウイルスの潜伏感染およびサルタイプ D レトロウイルス (SRV/D) の持続感染の有無を調査し、以下の結果を得た。a) 4種のヘルペスウイルス（サル B ウイルス；SHBV、サルサイトメガロウイルス；SCMV、ヒトサイトメガロウイルス；HCMV、ヒト単純ヘルペスウイルス；HSV）については、PCR-Microplate Hybridization 法でウイルスゲノムの検出を試みた。その結果、4種全てのヘルペスウイルスの潜伏感染は生じていなかった。b) RT-PCR により SRV/D env 遺伝子の増幅を試みた結果、いずれの PCR cycle 数においても複製可能な SRV/D env 遺伝子は

増幅されなかった。

これらの結果から、サル樹立 ES 細胞株 CMK-6 にはヒトに危険なヘルペスウイルスの潜伏感染および複製可能なサルタイプ D レトロウイルスの持続感染はないことが示された。

一方、遺伝子治療のレシピエントとなるコロニーのカニクイザルについても SRD の汚染状況の把握と SPF 化は安全性の観点から必須の問題である。遺伝子治療研究に用いる SPF サルの作出を目的として、B ウイルス及びサルバリセラウイルス抗体陰性の霊長類センターのカニクイザルコロニーから、免疫不全を引き起こす SRD 陰性群作出を試みたが、完全に D 型レトロウイルスフリーのコロニーの作成には至っていない。SRD の感染の特徴として、抗体産生を伴わない無症候キャリアになることがあるため、感度の高いゲノム検出法を確立する必要がある。霊長類センターで飼育されているカニクイザルから SRV/D を分離し、この塩基配列をもとに gag 領域の PCR 用のプライマーを設計した。本プライマーを用いることにより血液中の SRV/D ゲノム DNA を高感度に検出することが可能となった。

③臨床研究のための非臨床安全性試験として、カニクイザルにおいて SeV/FGF2 を筋肉内投与した際の急性変化について検討した。SeV/FGF2 をカニクイザルの上腕及び大腿部筋肉内に、常用量として 5×10^8 im/ml/kg 及び 10 倍量の 5×10^9 im/ml/kg を分割投与し、その後 14 日間観察を行った。観察期間を通じて、死亡例は認められず、一般状態観察においても著しい異常は認められなかった。体重、体温、血圧、脈拍、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査で著しい変化はみられなかった。症状の発現は投与濃度には依存していなかった。また剖検の結果、SeV/FGF2 接種に起因すると考えられる重篤な急性毒性を発現しなかったことから、SeV/FGF2 の筋肉内投与における毒性は低いものと判断した。

④サル類の疾患モデル動物の開発、疾患モデル動物の胚・配偶子の保存法の開発、さらに再生医療評価システムの開発を目的として発生工学的基盤技術の開発研究を進めた。本年度は a) フィーダー細胞の品質評価を行い、卵管上皮細胞が適していること、7種類のサイトカインを産生していること、b) パーコールを用いた遠心集卵法が有効であること、c) 円形精子細胞を用いた体外受精の結果から、卵の活性化能にはカニクイザルの個体差があること、d) ウサギのES様細胞、また除核した卵細胞にマウスおよびウサギの体細胞の核を移植して得られた胚からES様細胞を樹立することが出来た。今回の成績は今後のサル類ES細胞の研究に有用であると思われる。

⑤チンパンジーを用いた遺伝子治療用ベクターの評価技術開発の一環として、*in vitro*による評価方法を進めている。昨年度は、内視鏡を用いたバイオプシー材料を器官培養したチンパンジー気管支上皮にアデノウイルスベクターが発現するか否かを検討し、その有効性を確かめた。本年度は発現を経時的に追った所、培養後3日目では発現はみられず、培養後10日～2週間後のもので発現が効率よくみられることから、Ad5-CMV-LacZベクターによる遺伝子導入発現のメカニズムを検討するために、免疫組織細胞化学染色法を用いて、培養細胞がCoxsackie-Adenovirus Receptor (CAR) を有しているか否かを調べた。培養0、3、10、20日目のいずれにおいても、抗CAR抗体に対し陽性を示し、器官培養したチンパンジー気管支上皮細胞はCARを有することが判明した。このことからレセプターは定常的に発現しており、遺伝子導入と導入遺伝子の発現には他の因子が関連している可能性が示唆された。

チンパンジーのES細胞利用による遺伝子治療の評価法開発を目指し、GnRHa・hMG・hCGを併用した卵巣刺激(short protocol)を行い、1頭から複数の卵を経膈的に採取した。採取卵はICSIにより受精させたのち、培養した。チンパンジー5頭の雌から

総数27個の卵を採取し、そのうち22個が受精した。受精卵のうち、18個は8細胞期まで分割し、4個は胚盤胞まで発生した。しかし、本研究ではES細胞まで進まなかったため、今後ES細胞樹立の検討を行う予定である。

⑥伴侶動物等を用いたモデル研究では、a) 本年度は、昨年度作製したイヌ *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクター (AxCA-cp53) および本年度作製した *antisense-mdm2* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-m2a) について、イヌの各種腫瘍細胞株に対する増殖抑制効果の検討した。その結果、AxCA-cp53, Ad-m2a とともに骨肉腫および乳腺腫瘍由来の細胞株に対して明らかな増殖抑制効果を示すことが示された。さらにAxCA-cp53とAd-m2aを同時感染させることによって、より効果的な細胞増殖抑制を誘導することが確認され、今後 *p53* および *antisense mdm2* の同時導入による遺伝子治療の可能性が示された。b) またスナネズミを用いた脳梗塞モデルによる、海馬神経細胞の遺伝子治療によるアポトーシス阻止実験ではセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いて遺伝子治療について検討した。スナネズミ両側総頸動脈を5分間結紮することにより、海馬CA1領域の錐体細胞は選択的に細胞死 (アポトーシス) に至る。野生型SeVに治療用遺伝子を搭載した付加型SeVベクター、F遺伝子欠失センダイウイルスに治療用遺伝子を搭載したF遺伝子欠失型SeVベクター、あるいはMF両遺伝子を欠失したセンダイウイルスに治療用遺伝子を搭載したMF両遺伝子欠失型SeVベクターに、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) などの遺伝子を搭載し、脳虚血モデルスナネズミの脳室内に投与した。脳虚血前にGDNF遺伝子搭載付加型SeVベクターを投与することにより、錐体細胞の細胞死は抑制された。また、ウイルス粒子が放出されない、GDNF遺伝子搭載MF両遺伝子欠失型SeVベクターを虚血4時間後に投与した場合においても高い神経細胞保護効果が認められ、今後の臨床応用の可能性が示唆さ

れた。

D. 考察

本研究班は学術的意義と同時に動物を用いた遺伝子治療評価系の開発を最大の目的としている。新しい評価系として期待されるチンパンジーの ES 細胞株樹立、およびサル ES 細胞株の安全性をバイオセーフティの観点から検討したのは学術的意味がある。伴侶動物はヒトでは不可能な早期患者についての遺伝子治療の有効性評価が可能であり、早期治療の効果をヒトでの治験患者の選択とプロトコルの確立に寄与することが出来る。国際的・社会的意義：遺伝子治療技術を臨床応用するために必須のステップである a) 新規に開発されたベクターの安全性、有効性評価、b) 遺伝子治療プロトコルの安全性、有効性評価を可能とする標準プロトコルを確立したことにより、新規の遺伝子治療法の臨床応用に貢献した社会的意義は大きい。伴侶動物を対象とした臨床遺伝子治療を実施した。ヒトと動物の絆を保証するための伴侶動物の健康と福祉に貢献した社会的意義は大きい。また本研究で樹立したプロトコルを用いて、他の遺伝子治療ベクターおよび治療プロトコルの有効性、安全性の評価を中立的立場でおこなうこと、確立されたプロトコルに関しては情報公開し、広く利用を図る必要がある。今後は遺伝子治療の標的とされている、脳虚血、心臓虚血、慢性関節炎などの有効なモデルの開発と、遺伝子治療の有効性評価を霊長類を用いて進めること、開発途上にある新規評価系（チンパンジー器官培養系、ES 細胞、多様性に富むサル ES 細胞株）を作成し、再生医療用の類人猿を含む ES 細胞有用性の評価を進める必要がある。

E. 結論

チンパンジーではバイオプシー材料を用いた遺伝子治療の評価系を確立した。他のウイルスベクターや個体差を考慮した研究を進める必要がある。再生医療の新規評価系としてチンパンジーの ES 細胞の作

成を世界に先駆けて行う。カニクイザルでは骨髄細胞、脳内へのベクター接種の基本プロトコルの作成及び安全性試験のプロトコルを確立した。またサル類を用いたモデル系の開発、遺伝子治療の有効性評価を進めた。再生医療の評価のため新規 ES 細胞の作成を進めた。伴侶動物ではヒトで実施できないステージの患者を用いた臨床試験が可能であり、有効性評価を進めている。遺伝子治療の有効な患者の選択及び伴侶動物の健康と福祉に貢献し、社会的意義が高い。

F. 研究発表等

1. Inenaga, T., Nishida, E., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Renal function tests on diabetes-induced and non-induced APA hamsters. *Exp. Anim.* 51, 437-445, 2002

2. Kamiya, K., Kikkawa, Y., Ishii, T., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y. Changes in mRNA expression in mouse postnatal cochlea by differential display methods. *Exp. anim.* 51, 431-435, 2002

3. Ikegami, T., Miranda, EG., Caraor, A.B., Manalo, D., Miranda, Nj., Niikura, M., Saijo, M., Une, Y., Nomura, Y., Kurane, I., Ksiazek, TG., Yoshikawa, Y., MOrikaya, S. Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the philippine outbreak in 1996. *Exp. Anim.* 51, 467-455, 2002

4. Horiuchi, K., Takatori, a., Inenaga, T., Ohta, E., Yamanouchi, J., Kawamura, S., Ishii, T., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y. The effect of probucol on atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic-hyperlipidemic APA hamster in different stages of atherosclerosis. *Exp. Anim.* 51, 457-464, 2002

5. Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, EG., Calaor, AB., Hernandez, M., Malano, DL., Kurane, I., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. *Microbiol. Immunol.* 46, 633-638, 2002
6. Negishi, T., Ishii, Y., Kawamura, S., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y. Cryopreservation and primary culture of cerebral neurons from cynomolgus monkeys. *Neurosci. letters*, 289, 21-24, 2002
7. Negishi, T., Ishii, Y., Kawamura, S., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y. Cryopreservation of brain tissue from primary culture. *Exp. Anim.* 51, 383-390, 2002
8. Lee, WW., Nam, KH., Terao, K., Yoshikawa, Y. Age-related telomere length dynamics in peripheral blood mononuclear cells of healthy cynomolgus monkeys measured by flow FISH. *Immunol.* 105, 458-465, 2002
9. Furuta, T., Kikuchi, T., Miyadera, H., Yoshikawa, Y. Pneumocystis carinii infection in red-bellied tamarins and cynomolgus monkeys, and the characterization of the mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene of P. carinii. *J. Euk. Microbiol.* 51, 107-108, 2002
10. Miranda, ME., Yoshikawa, Y., Manalo, DL., Calaor, AB., Miranda, NL., Cho, F., Ikegami, T., Ksiazek, TG., Chronological and spatial analysis of the 1996 Ebola REston virus outbreak in a monkey breeding facility in the Philippines. *Exp. Anim.* 51, 173-179, 2002
11. Yamanouchi, J., Takatori, A., Nishida, E., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Expression of lipoprotein receptors in the aortic walls of diabetic APA hamsters. *Exp. Anim.* 51, 33-41, 2002
12. Takatori, A., Nishida, E., Inenaga, T., Horiuchi, K., Kawamura, S., Itagaki, S., Yoshikawa, Y. Functional and histochemical analysis on pancreatic islets of APA hamsters with SZ-induced hyperglycemia and hyperlipidemia. *Exp. Anim.* 51, 9-17, 2002
13. Hatta, Y., Kanai, T., Matsumoto, Y., Kyuwa, S., Hayasaka, I., Yoshikawa, Y. Analysis of cDNA coding MHC class IIbeta chain of the chimpanzee (Pan troglodytes). *Exp. Anim.* 51, 133-142, 2002
14. Tsutsui, S., Itagaki, S., Kawamura, S., Harada, K., Karaki, H., doi, K., Yoshikawa, Y. D-galactosamine induced hepatocyte apoptosis is inhibited in vivo and in cell culture by a calcium calmodulin antagonist. *Exp. anim.* 52, 43-52, 2003
15. Kwon, J., Kikuchi, T., Setsuie, R., Ishii, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y. Characterization of the testis in congenitally ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-1 defective (gad) mice. *Exp. anim.* 52, 1-9, 2003
- 吉川泰弘 霊長類を用いた老人病モデルの研究 平成13年度厚生科学研究 14-32, 2002
- 吉川泰弘 動物実験と福祉 アニテックス15, 18-22, 2003
- 吉川泰弘 生命科学と実験動物 学術の動向 31-34 2002, 9

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

本研究では、マカク属サルを用いて、宿主応答を指標とした新規ベクターおよび遺伝子治療プロトコルの安全性と有効性を評価するシステムの開発を目的としている。今年度は、開発の最終段階にある治療用遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクターに対する宿主応答に加えて、ベクターに組み込まれているヒト由来遺伝子産物に対する宿主応答の評価と新規の遺伝子治療技術の開発を目的として以下の研究をおこなった。

1) 骨髄幹細胞を標的とした遺伝子治療で、X線の全身照射などの骨髄廃絶処置を必要としない低負荷の骨髄採取・移植技術として期待されている骨髄還流置換法（Bone Marrow Replacement; BMR）をカニクイザルに应用するためのプロトコルを作成を作成した。

2) 骨髄幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療で、導入遺伝子の分子スイッチとしてヒトリコンビナントエリスロポエチン（rEPO）を用いるプロトコルの評価をおこなった。ヒト rEPO をカニクイザルに連続投与すると、短期間に抗ヒト rEPO に対する抗体が産生され、血中の rEPO が短期間で消失することが判った。これは、カニクイザルを用いてヒト由来タンパク発現遺伝子治療の評価を行う限界でもある。この欠点を克服する目的で、免疫抑制剤（Cyclosporine A; CyA）によるヒト由来タンパクに対する抗体産生抑制を試み、抗体産生を抑制する投与方法を確立した。

3) 治療遺伝子（ヒト Fibroblast Growth Factor-2 ; FGF-2）を組み込んだ F タンパク欠損センダイウイルスベクター（dFSeV/FGF）の大量接種にともなう宿主応答を評価した。5x10⁸ および 5x10⁹/Kg の dFSeV/FGF を筋肉内に接種したカニクイザルそれぞれ 3 頭について、ウイルスベクターに対する宿主応答の指標として、①主要リンパ球サブセットレベル、②血中抗体価、③血中炎症性サイトカイン濃度の継時的変化を調査するとともに、治療遺伝子 FGF-2 の④発現効率および⑤ヒト rFGF に対するサルの細胞性免疫応答を指標として dFSeV/FGF の有効性評価を行った。

キーワード：カニクイザル、ウイルスベクター、骨髄還流置換法、免疫抑制、免疫応答

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トコルの有効性と安全性を評価する必要がある。

A. 研究目的

開発途上の遺伝子治療医薬品の生体内での安定性、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

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生体内での安定性、安全性、有効性を評価し、開発の進んだベクターについては 2) 遺伝子デリバリーシステムを含む有効な遺伝子導入法の確立と、3) 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を評価するために、評価システムの開発をおこなうことを目的としている。今年度は以下の3種類の研究をおこなった。

1) 骨髄幹細胞を標的とした遺伝子治療では、遺伝子導入細胞の移植に先立って、X線照射などの骨髄廃絶処置が必要である。最近、患者の負担の少ない骨髄自家移植技術として骨髄還流置換法 (Bone Marrow Replacement; BMR) が報告された。そこで、BMRを用いた骨髄自家移植技術の有効性を評価するために、カニクイザルのBMRプロトコルを作成した。

2) 開発中の治療プロトコルに用いられるベクターにはヒト由来の治療遺伝子が組み込まれており、遺伝子産物の発現と発現持続時間がその有効性を左右する。一方、治療に用いられるヒト遺伝子産物はマカク属サルにとっては異種タンパクであり、遺伝子産物に対する抗体産生が問題となる。カニクイザルを用いた遺伝子治療プロトコルの評価のために、異種タンパクに対する抗体産生を抑制する方法を検討した。

3) 治療遺伝子 FGF-2 を組み込んだセンダイウイルスベクターの安全性、有効性評価を目的として、筋肉内接種後の宿主の免疫応答、炎症反応、治療遺伝子発現およびヒト FGF-2 に対する免疫応答について検討した。これにモデルとして、治療遺伝子搭載ベクターの安全性、安全性、有効性評価の基本プロトコルを確立することを目的とした。

B. 材料と方法

1) カニクイザルを対象とした骨髄還流置換法 (BMR) プロトコルの開発:

別添資料に、カニクイザルを対象とした BMR プロトコルの詳細を示す。

2) ヒトリコンビナントエリスロポエチン (hr-EPO) に対する抗体産生と免疫抑制剤によ

る抗体産生抑制:

hr-EPO を分子スイッチとする骨髄幹細胞を標的とした遺伝子治療プロトコルの有効性を評価した。3~5 歳齢の雄カニクイザルに、EPO 受容体/G-CSF キメラ遺伝子をレトロベクターで導入した造血幹・前駆細胞を移植し、ヒト r-EPO を皮下に連続投与した。ヒト r-EPO の血中濃度および抗ヒト-EPO 抗体は継時的に採血した血漿を用いて ELISA 法で測定した。ヒト r-EPO に対する抗体産生抑制を目的として、免疫抑制剤 (Cyclosporine A; CyA) 処理の方法を検討した。すなわち、筋肉内投与する CyA 濃度、投与期間、投与間隔を組み合わせ、CyA 投与期間中に肝機能傷害などの副作用なしにヒト由来遺伝子産物に対する抗体産生を抑制する CyA 投与条件を検討した。

3) ヒト FGF-2 遺伝子組込 F タンパク欠損センダイウイルスベクター (dFSeV/FGF) の安全性、有効性評価:

5 歳齢の雄カニクイザル 9 頭を 3 群に分け、治療ベクターとして最終段階に到達している dFSeV/FGF を 5×10^8 /Kg (3 頭)、 5×10^9 /Kg (3 頭) 大腿筋肉内の十数カ所に接種した。対照として燐酸緩衝液 (PBS) を同様に接種した 3 頭をおいた。接種前 7 日、直前 (0)、接種後 6 時間、1、2、5、9、14 日目に採血した。また接種後 2 日目に接種部位をバイオプシーし、2mm 角の材料を採取した。主要リンパ球サブセットレベルはフローサイトメトリーにより、CD3 (pan T 細胞)、CD20 (pan B 細胞)、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、CD16 陽性 NK 細胞、CD28-/CD4 細胞および CD28-/CD8 細胞レベルを測定した。血漿中の抗 SeV 抗体価、炎症性サイトカイン (IL6、IFN γ 、TNF α) および筋肉内の FGF 量はいずれも ELISA により測定した。FGF に対する細胞性免疫能は、リンパ球と 2mg/ml の hr-FGF-2 を混合培養し、幼若化の程度を TdR の取り込み

により測定した。

C. 結果及び考察

1) カニクイザルを対象とした骨髄還流置換法 (BMR) プロトコルの開発:

骨髄幹細胞を標的とした遺伝子治療において、患者の負担の少ない新規の骨髄採取および細胞移植法として報告されている「骨髄還流置換法 (BMR)」をカニクイザルに応用する技術を確立し、マニュアル化した資料を添付した。別添結果に示すように、骨髄細胞を陽圧で採取した場合には、骨髄中の血管内に骨髄が逆流し血栓形成の危険性が高い。このマニュアルでは骨髄内を血液の流入が生じない程度の陰圧に保ちつつ骨髄を採取することで、骨髄構成細胞を良好に採取することが可能であった。さらに、骨髄還流した部分に遺伝子導入細胞を移植することで、X線照射などの骨髄抑制処置無しに移植細胞の定着スペースを確保することが可能になり、本法を用いることで、骨髄自家移植患者の負担を大幅に軽減することが可能となる。

2) ヒトリコンビナントエリスロポエチン (hr-EPO) に対する抗体産生と免疫抑制剤による抗体産生抑制:

図 1-1 に 3000U/Kg のヒト r-EPO を背部皮下に週三日の割で 5 週間連続投与したサルでの血中 EPO 濃度と抗 EPO 抗体価の変化を示す。このケースでは、EPO の投与を継続しているにも関わらず、投与開始 2 週目から ELISA で測定した血中の EPO 濃度の低下が見られた。これは同時期以降に上昇する血中抗 EPO 抗体によって有効 EPO 濃度の低下が生じたためと判断した。カニクイザルを用いてヒト由来治療遺伝子発現を評価する限界である。そこで、免疫抑制剤 (CyA) を用いてヒトタンパクに対する抗体産生を抑制することを考え、ヒトで副作用が無くかつ有効な免疫抑制効果を示

す血中濃度、200~400ng/ml を保つための、CyA の投与条件を検討した。その結果、図 1-2 に示すように、5mg/Kg の CyA を 3 週間連日で筋肉内投与した後、6mg/Kg の CyA を 3 週間隔日で投与するサイクルを繰り返す投与方法が最適と判断した。CyA をこの方法で投与した 2 頭のカニクイザルについて免疫抑制効果を調べた結果を図 1-2 に示す。図に示すように、今回採用した方法で CyA を投与しながらヒト r-EPO を繰り返し投与した場合には、血中抗体は全く検出されず、ヒト r-EPO の血中有効濃度も十分に保たれることが判明した。さらに、CyA 投与期間中にモニターした血液・生化学検査結果においても肝機能障害などの CyA の副作用を示す結果が得られなかったことから、本法が安全かつ有効な免疫抑制効果を方法であると判断した。

3) 治療遺伝子 FGF-2 を組み込んだ F 欠損センドライウイルスベクター (dFSeV/FGF) の安全性、有効性評価:

図 2、図 3 に 5×10^8 /Kg および 5×10^9 /Kg の dFSeV/FGF を筋肉内接種したカニクイザルにおける接種後の主要リンパ球サブセットレベルの変化を示す。図 2 の結果では CD4+/T 細胞レベルが接種後 5 日目に一過性に増加したが、CD3+/T 細胞、CD20+/B 細胞および CD8+/T 細胞レベルには無処置対照群と比較して有意な差は認められなかった。図 3 の結果では、dFSeV/FGF 接種群で接種ウイルス量に関わらず CD16 陽性の NK 細胞レベルが接種後 9 日目以降に急増した。活性化マーカーとして調査した CD28 陰性 T 細胞 (活性化 T 細胞) レベルはほとんど変化しなかった。一方、血中抗体価は 5×10^9 /Kg 接種群で接種後 5 日目には血中抗体が検出され 9 日目には抗体価はプラトーに達した。

図 4 に炎症反応の指標として調査した血中の炎症性サイトカイン IL6、INF γ 、TNF α の変化を

示す。図 3 の血中抗体価の推移から判断される免疫応答の強さに比較して、炎症性サイトカインはほとんど検出されず、IL6 がそれぞれの接種群で 1 頭ずつ、INF γ と TNF α が 5×10^9 /Kg 接種群で 1 頭に検出されたのみであった。今回の安全性試験は治療遺伝子を搭載した最終段階にあるベクターの評価であったが、大量接種で比較的早期に強力な免疫応答が生じる割には炎症反応が低いという調査結果は、dFSeV を用いた遺伝子治療の対象疾患を考慮する上で重要な知見と考えられる。

SeV は短時間で高レベルの遺伝子発現が期待されているベクターであることから、接種部位（大腿筋）における遺伝子発現を接種 2 日目に調査した（図 5）。図に示すように、ベクター接種個体では全ての個体で無処理対象の筋肉内レベル（内在性 FGF-2 レベル）に比べて有意に高い FGF-2 が接種 2 日目に検出された。検出された FGF レベルには 44.4 から 1612.9pg/mg タンパク量まで著しいばらつきがあったが、これはバイオプシー部位と接種部位とが微妙にずれたことに起因していると推測している。接種個体全てで内在性 FGF レベル以上の FGF が接種 2 日目に検出されたことから、dFSeV/FGF は早期発現が期待される疾患に有効な治療用ベクターであると評価できる。なお、hr-FGF の早期発現にも関わらず、FGF で幼若化反応を誘発する末梢感作リンパ球は 2 週間の観察期間では全く検出されなかった（結果略）。

D. 結論

1) 骨髄幹細胞を標的とした遺伝子治療において、負荷の少ない骨髄採取、移植法とされる骨髄還流置換法をカニクイザルに応用するためのプロトコルをマニュアル化した。本法により末梢血の混入のない骨髄構成細胞の採取と、X 線照射などの侵襲的な骨髄廃絶処理を必要としな

い低負荷の骨髄移植法が期待される。

2) カニクイザルでヒト由来治療用遺伝子発現を評価するために、免疫抑制剤の投与による抗体産生抑制法を検討した。CyA の投与量投与方法を検討し、ヒトリコンビナントエリスロポエチンに対する抗体産生を抑制する至適投与条件を確立した。

3) ベクター開発の最終段階にある治療用遺伝子 FGF-2 を組み込んだ F 欠損センダイウイルスベクターの安全性、有効性評価を評価した。本ベクターは抗体産生などの免疫応答は惹起するが、炎症性サイトカインレベルからみた炎症反応惹起性は比較的低いことから、比較的安全性の高いベクターと判断される。また接種部位では短時間で高レベルの遺伝子発現が認められることから、治療対象疾患によれば有効なベクターであると判断できる。

D. 研究発表

1. 論文発表

Osada,N., Hida,M., Kusuda,J., Tanuma,R., Hirata,M., Hirai,M., Terao,K., Suzuki,Y., Sugano,S. Hashimoto,K. Prediction of unidentified human genes on the basis of sequence similarity to novel cDNAs from cynomolgus monkey brain. *Genome Biology*, 2002;3(1): Research 0006.1-0006.5

Muramatsu,S., Fujimoto,K., Ikeguchi, K., Shizuma,N., Kawasaki,K., Ono,F., Shen,Y., Wang,L., Mizukami,H., Kume,A., Matsumura,M., Nagatsu,I., Urano,F., Ichinose,H., Nagatsu,T., Terao,K., Nakano,I., Ozawa,K. Behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associate viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Human Gene Therapy*, 2002, 13: 345-354.

Kano,M., Matano,T., Kato,A., Nakamura,H., Takeda,A., Suzuki,Y., Ami,T., Terao,K., Nagai,Y. Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. *J Gen Virol.*, 2002, 83: 1377-1386.

Hanazono, Y., Nagashima, T., Asano, T., Shibata, H., Ageyama, N., Ueda, Y., Dunbar CE, Kume, A., Terao, K., Hasegawa, M. Ozawa, K. In vitro selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Therapy*, 2002, 9:1055-1064.

Hanazono, Y., Terao, K., Shibata, H., Nagashima, T., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Kato, I., Kume, A., Hasegawa, M. Ozawa, K. Introduction of the GFP gene into hematopoietic stem cells in primate results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells. *JOURNAL J Gene Med*, 2002, 4: 470-477.

Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ohto, K., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Donahue, R.E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Yoshikawa, Y., Terao, K. Safe and efficient methods for cynomolgus monkey autologous hematopoietic stem cell transplantation for biomedical research. *Comp Med*, 2002, 52: 445-451.

Ozawa, K., Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shen, Y., Wang, L., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ichinose, H., Nagatsu, T., Terao, K., Nakano, I. 2002, Gene therapy for Parkinson's disease using AAV vector. pp. 459-462 in Y. Mizuno, A. Fisher, I. Hanin [eds], *Mapping The Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, Kluwer, Academic/Plenum Publishers, London.

Inoue-Murayama, M., Adachi, S., Mishima, N., Mitani, H., Takenaka, O., Terao, K., Hayasaka, I., Murayama, U. Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression. *Neurosci Letter*, 2002, 34(3):206-210.

Osada, N., Hida, M., Kusuda, J., Tanuma, R., Hirai, M., Terao, K., Sugano, S., Hashimoto, K. Cynomolgus monkey testicular cDNA library for discovery of novel human cDNAs in the human genome sequence. *BMC GENOMICS*. 2002, 3:36-46.

Ageyama, N., Kimikawa, M., Eguchi, K., Ono, F., Shibata, H., Yoshikawa, Y., Terao, K. Development of

efficient leukapheresis procedure in rhesus monkeys (*Macaca mulata*). -Clinical application to a human infants- *J Clin Apheresis*, 2003, in press.

2. 学会発表

Nagashima, T., Ueda, Y., Hanazono, Y., Kume, A., Shibata, H., Ageyama, N., Komatsu, N., Terao, K., Ozawa, K., Hasegawa, M. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells with a novel selective amplifier gene consisting of the erythropoietin receptor and MPL genes., *The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy*, June 5-9, 2002, Boston

Yonemitsu, Y., Terao, K., Ono, F., Kuwahara, T., Iida, A., Hara, H., Iwasaki, H., Hasegawa, M., Sueishi, K., Preclinical safety study for intramuscular administration of F-defective, non-transmissible recombinant sendai virus vector using non-human primate: Toward a clinical study for 'integrated' therapeutic angiogenesis to treat subjects with critical limb ischemia. *The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy*, June 5-9, 2002, Boston

小澤敬也、村松慎一、王立軍、池口邦彦、藤本健一、岡田尚巳、水上浩明、寺尾恵治、中野今治、AAV ベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療、シンポジウム「中枢神経系再生のストラテジー」第45回日本神経化学学会大会、7月17日～19日、2002、札幌

Nagashima, T., Ueda, Y., Hanazono, Y., Shibata, H., Ageyama, N., Komatsu, N., Terao, K., Ozawa, K. Hasegawa, M. Second generation selective amplifier genes for efficient in vivo expansion of gene modified hematopoietic cells. *The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy*, July 18 - 20, 2002, Tokyo.

Takatoku, M. Hanazono, Y. Nagashima, T., Shibata, H., Ageyama, N., Ueda, Y., Kume, A., Dunbar, C.E. Terao, K. Hasegawa, M. Ozawa, K. Clonal Insertation analysis of gene-modified hematopoietic cells after hematopoietic

reconstitution with retrovirally-transduced CD34+ cells in nonhuman primates. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.

Yonemitsu, Y. Terao, K. Ono, F. Kawahara, T. Iida, A., Hara, H., Iwasaki, H., Hasegawa, M. Sueishi, K. A preclinical safety study for intramuscular administration of F-defective, non-transmissible recombinant Sendai virus vector using non-human primates. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.

柴田宏昭、棚林 清、揚山直英、吉川泰弘、

寺尾恵治、カニクイザル骨髄中の造血幹・前駆細胞の同定、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21

成田勇人、小野文子、鴻野あや子、羽成光二、揚山直英、大藤圭子、村松慎一、池口邦彦、藤本健一、中野今治、寺尾恵治、カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの作出、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京

揚山直英、花園 豊、小野文子、柴田宏昭、長島建之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也、吉川泰弘、寺尾恵治、カニクイザル造血幹細胞の自家移植法の確立、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京

図1-1：ヒトリコンピナントEPOに対する抗体産生とEPO有効濃度の低下

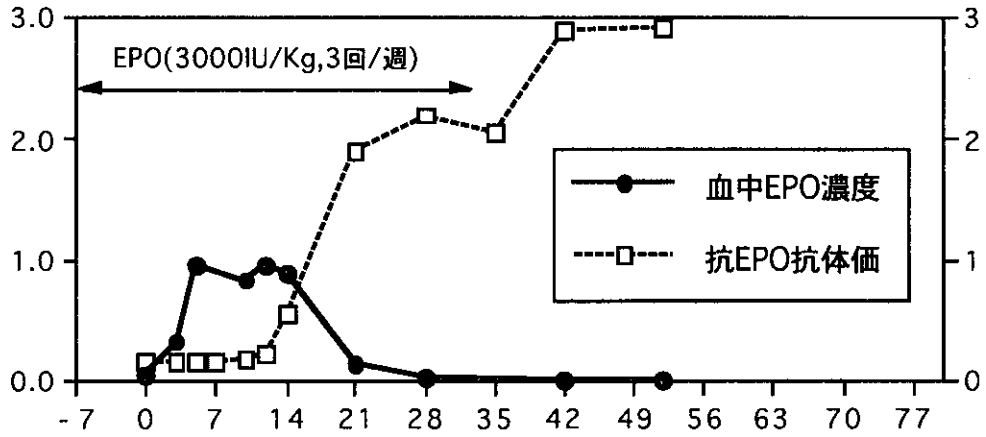
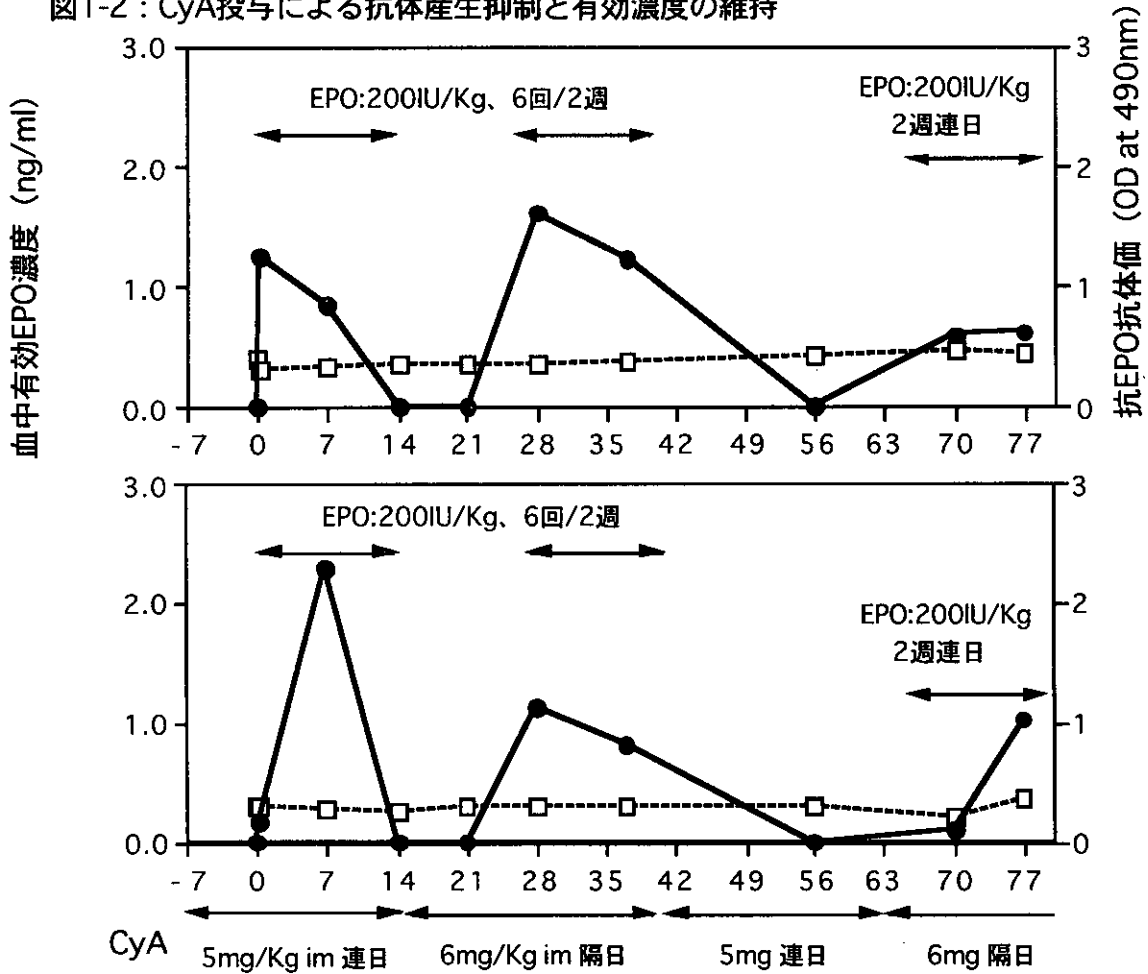


図1-2：CyA投与による抗体産生抑制と有効濃度の維持



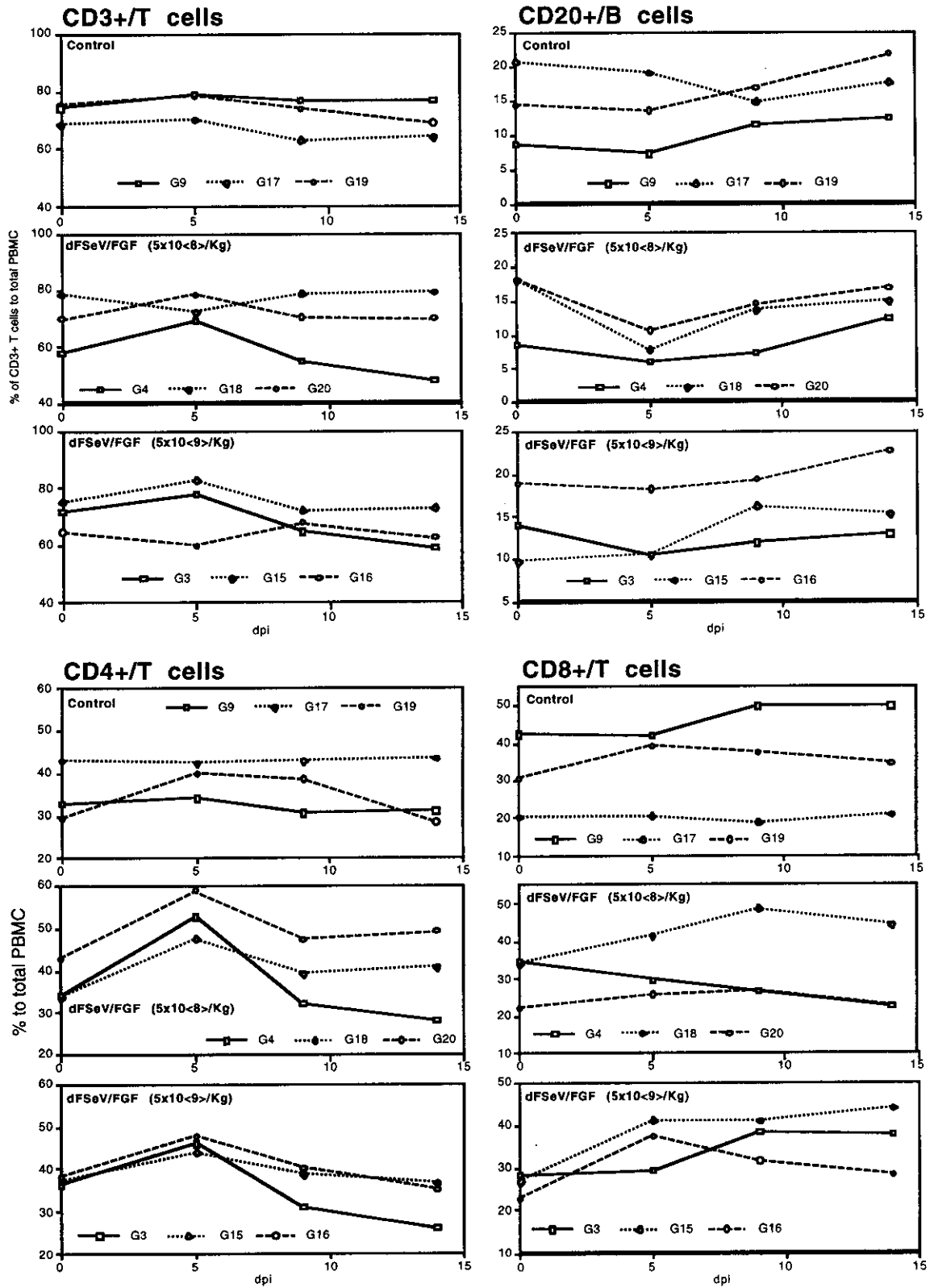


図 2 : dFSeV/FGF 接種後の末梢主要リンパ球サブセットレベルの変化 (1)

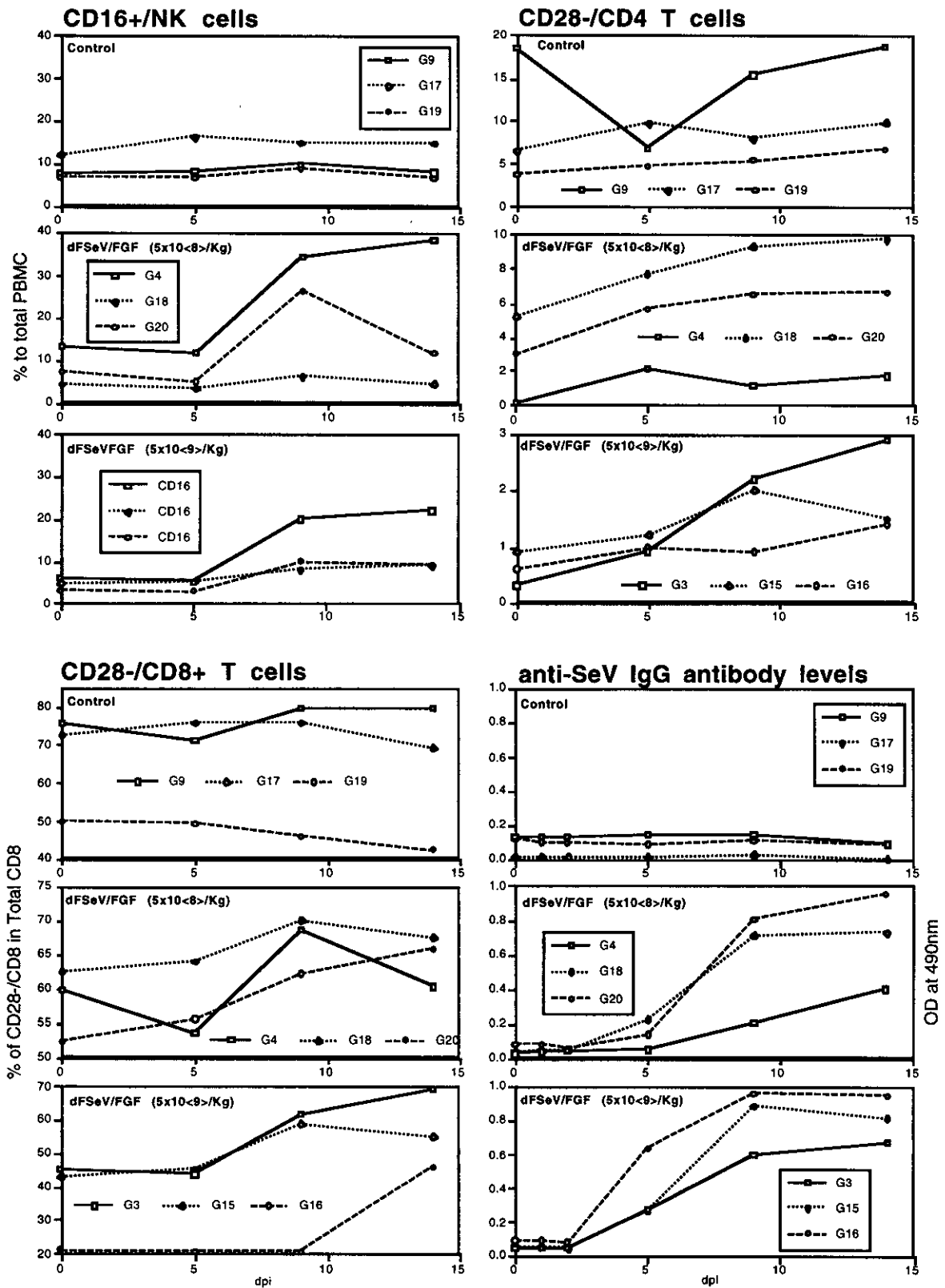


図3 : dFSeV/FGF 接種後の末梢主要リンパ球サブセットレベルの変化 (2) および血中抗体価の変化

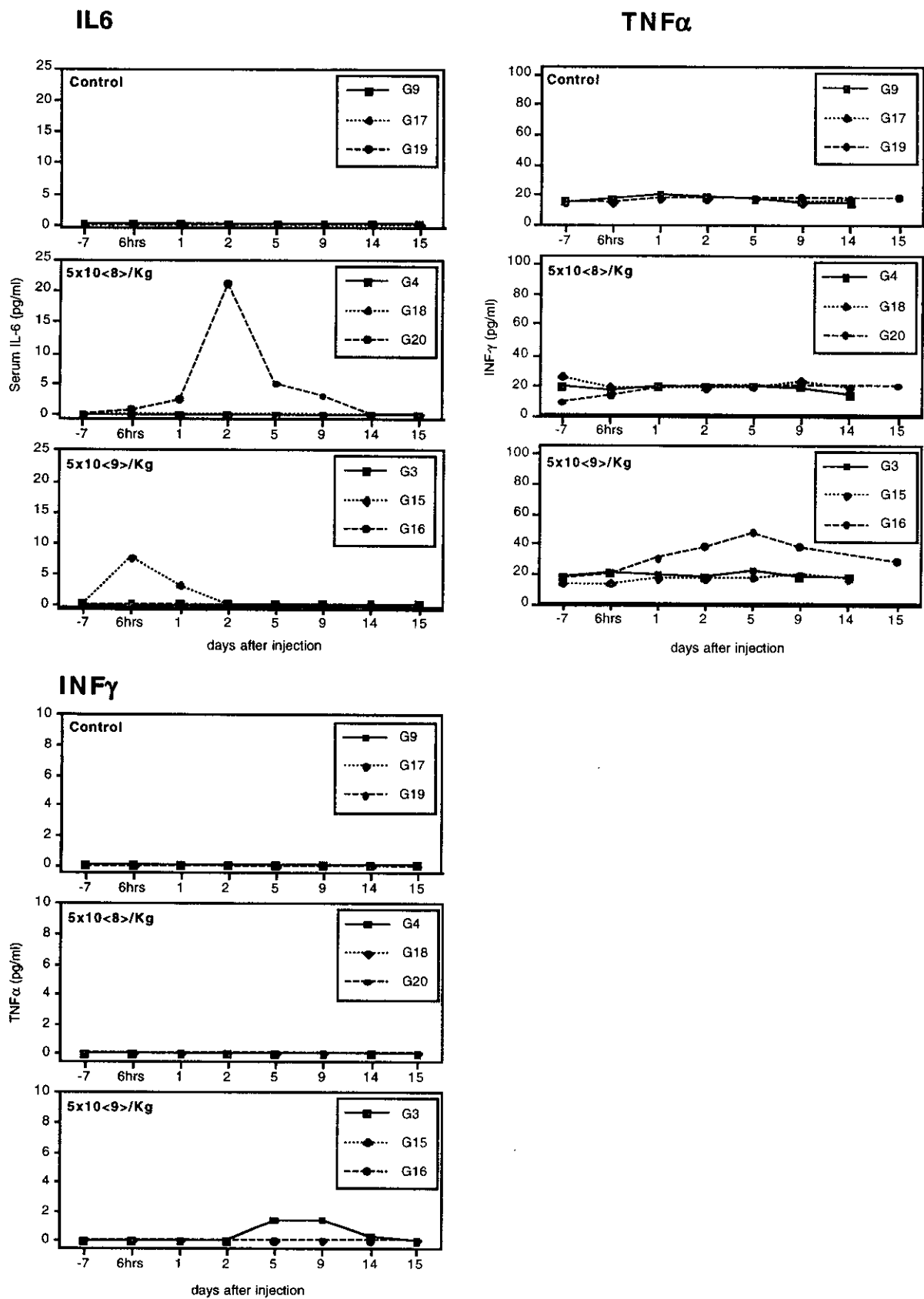


図 4 : 3 種の炎症性サイトカイン、IL6, INF γ , TNF α 、の変化

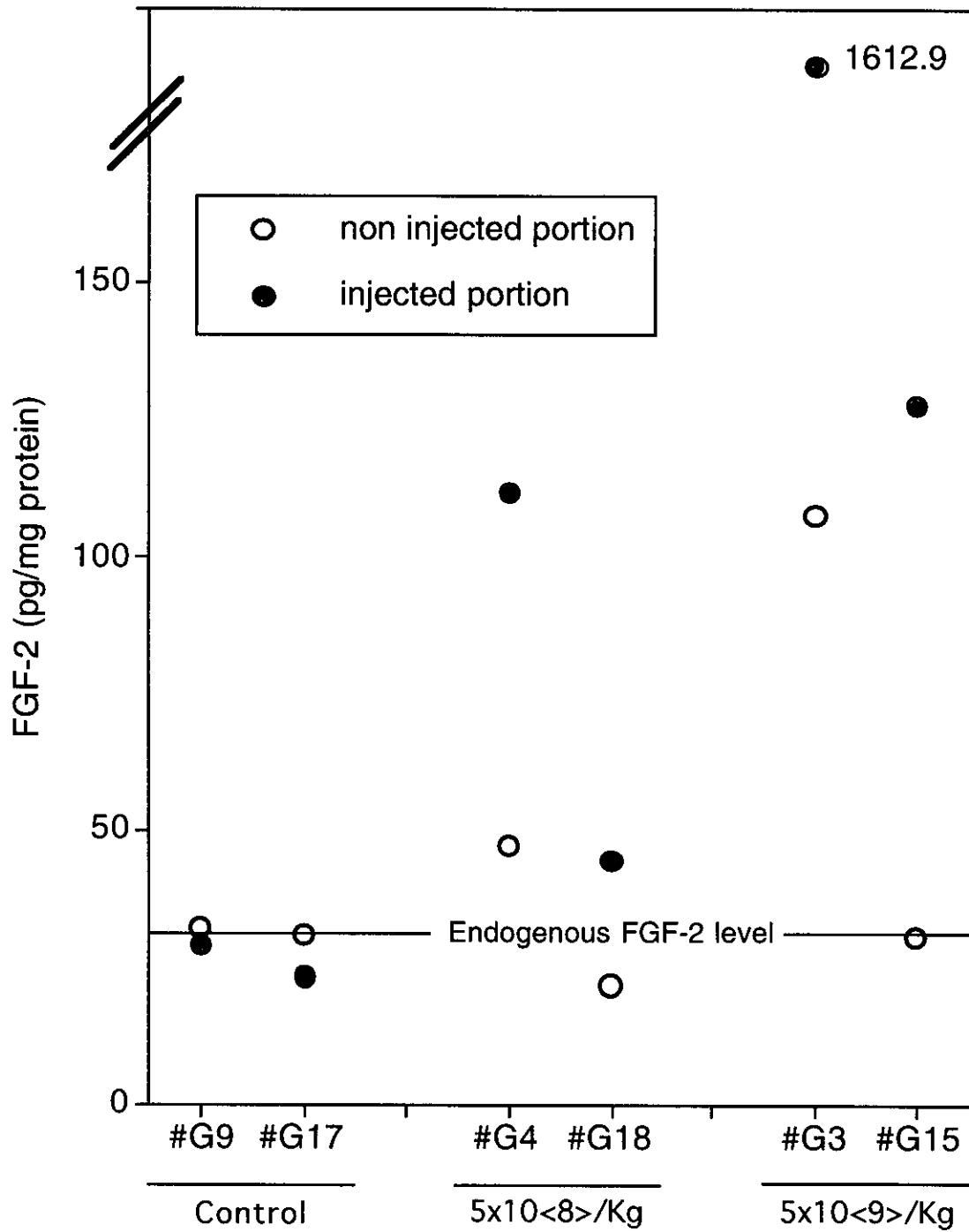


図 5 : dFSeV/FGF 接種部位での遺伝子発現

カニクイザルで樹立された胚性幹細胞（ES 細胞）におけるウイルス持続感染否定試験

吉川 泰弘（東京大学・農学生命科学研究科）

寺尾 恵治（国立感染症研究所・筑波霊長類センター）

協力研究者

本藤 良（日本獣医畜産大学・公衆衛生学教室）

研究要旨

カニクイザルで樹立された胚性幹細胞（以下 ES 細胞）株のうち、研究用に供給され汎用性の高い CMK-6 株について、バイオセーフティの観点から、4 種のヘルペスウイルスの潜伏感染およびサルタイプ D レトロウイルス（SRV/D）の持続感染の有無を調査し、以下の結果を得た。

- 1) 4 種のヘルペスウイルス（サル B ウイルス；SHBV、サルサイトメガロウイルス；SCMV、ヒトサイトメガロウイルス；HCMV、ヒト単純ヘルペスウイルス；HSV）については、PCR-Microplate Hybridization 法でウイルスゲノムの検出を試みた。その結果、4 種全てのヘルペスウイルスの潜伏感染は生じていないと判断した。
- 2) RT-PCR により SRV/D env 遺伝子の増幅を試みた結果、いずれの PCR cycle 数においても複製可能な SRV/D env 遺伝子は増幅されなかった。

これらの結果から、サル樹立 ES 細胞株 CMK-6 にはヒトに危険なヘルペスウイルスの潜伏感染および複製可能なサルタイプ D レトロウイルスの持続感染はないと判断した

キーワード：サル ES 細胞株、Zoonosis、ヘルペスウイルス、サルレトロウイルス

A. 研究目的

胚性幹細胞（ES 細胞）は自己複製能と三胚葉のいずれの組織にも分化する能力があることから、ES 細胞を用いた細胞治療や再生医療などの新しい医療技術の開発が始まろうとしている。ヒト ES 細胞を用いた治療技術の開発には、サル ES 細胞を用いた分化制御技術の開発や治療戦略設定が必須となる。昨年カニクイザル由来の ES 細胞株が数種類樹立され、使用を希望する研究者に供給する体制が整備されつつある。一方、研究用に供給される ES 細胞株の取扱について

は、バイオセーフティの観点から特に制限が加えられておらず、ES 細胞を介した Zoonosis のリスクは否定できない。様々な実験室で使用される状況を考慮すれば、樹立されたサル ES 細胞株の微生物学的清浄度の確認は、バイオハザード防止の観点から重要な課題となる。そこで本研究では樹立されたサル ES 細胞株のうち、汎用性が高い CMK-6 株について、4 種のヘルペスウイルスおよびサルタイプ D レトロウイルスの潜伏、持続感染の有無を調査した。

B. 材料と方法

1) Microplate hybridization による 4 種のヘルペスウイルス（SHBV、SCMV、HCMV、HSV）ゲ