

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

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉田 毅

平成15(2003)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14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 遺伝子治療用ベクターの安全性評価に関する研究 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 16
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 18
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 22
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 カニクイザルにおける MHC class I の解析 26
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

1. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（ヒトケノム・再生医療等研究事業）
平成14年度総括研究報告書

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か目標である。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。昨年度に引き続き、レトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの体内動態をカニクイサルを使って調べた。AAVベクターが血流に入ると、リンパ系を中心に種々の臓器に感染し、少なくとも3ヶ月以上導入遺伝子を発現し続けることがわかった。安全性を考慮して改良された非増殖性センダイウイルスベクターによるワクチン抗原発現の安全性・有効性を、アカゲサル感染実験で検討した。非増殖性センダイウイルスベクターの経鼻接種によって異常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か示された。増殖性弱毒化ヘルペスウイルスは、ヒト大腸癌腹膜播種モデルにおいて強い抗腫瘍性を示し、臨床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。各ベクターに必要な前臨床試験が何かを明らかにし、前臨床試験の成績を正確に理解するための基礎となる情報が蓄積しつつある。

分担研究者

神田 忠仁 国立感染症研 遺伝子解析室 室長
佐多 徹太郎 国立感染症研 感染病理部 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 国立感染症研・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 国立感染症研・獣医科学部 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か本研究の最終目的である。レトロウイルスベクターとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターでは、リスク評価の基盤となるベクターの体内動態の解析を進めた。臨床試験が計画されている国産のセンダイウイルス(SeV)ベクターでは、非増殖性の改良型ベクターの急性毒性、体内動態、導入遺伝子の発

現と免疫誘導能について調べた。増殖性弱毒化ヘルペスウイルスを悪性腫瘍治療用ベクターとして臨床応用するために、有効性・安全性の評価に最も適した実験系か何かを明らかにするとともに、対象となる悪性腫瘍に応じた増殖性弱毒化ウイルスの作製を目指した。今後、前臨床試験に使われる標準的な動物となりうるカニクイサルの MHC class I を詳細に解析し、型の判別方法を検討した。

B 研究方法

- 1) EGFP-tubulin 発現 AAV ベクターを作り、4 頭のカニクイサルの大腿静脈に 3×10^{11} ゲノムコピーずつ接種した。90 日目に解剖し、各臓器から抽出した DNA 中のヘクターを、PCR によって半定量的に検出した。また、tubulin 蛋白質を抽出・濃縮しウエスタンブロット法で EGFP-tubulin 融合蛋白質を検出した。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) AAV1~5 型ゲノムとの塩基配列の相同性を利用して、カニクイサルに潜伏・持続感染している AAV ゲノムを単離し、AAV9、10 型とした。(神田)
- 3) 自律複製能を獲得したレトロウイルスベクターの組み換え体 (RCR) と基本的に同じであるマウス白血病ウイルス (A-MLV) をカニクイサルに接種して、1 ヶ月後の各種臓器でのプロウイルスの存在と病理所見を調べた。昨年度は高度に精製・濃縮したウイルス (10^{14} ゲノムコピー) を接種したが、今年度は、A-MLV 感染カニクイサル細胞 (10^8 個) を接種した。接種の前後 2 日間は、サルにサイクロスポリン A を投与して免疫抑制状態にした。(北村、佐多)
- 4) SIV の Gag 遺伝子を発現するセンダイウイルスベクターを使って、増殖能を持つベクター (SeV-Gag) と持たない改良型ベクター (F[-]SeV-Gag) による Gag 特異的 T リンパ球誘導能を比較した。アカゲサル 3 頭に、SIV の Env Nef 以外の抗原を発現する DNA (CMV-SIVGP) を筋注した後、6 週目に F(-)SeV-Gag 6×10^{10} CIU を経鼻接種した (ブースト)。Gag 発現ワクチン感染 autologous B 細胞との共培

養により誘導される IFN- γ 陽性 T リンパ球を測定して、ブースト直前とブースト後 1 週目の末梢血リンパ球中の Gag 特異的 T リンパ球量を比較した。また、アカゲサル 1 頭に CMV-SIVGP を筋注した後、6 週目に F(-)SeV-Gag 6×10^{10} CIU を経鼻接種した。経鼻接種後 2 週目に採取した鼻腔粘膜、扁桃、後咽頭リンパ節、腋窩リンパ節、血液中の、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球を定量した。(俣野)

- 5) Immunocompetent なマウスを担がん動物とし、UL56 欠損 HSV 1 型 (HF 10) を含む弱毒化 HSV 数種の有効性と安全性について検討を加えた。また、HSV の機能不明な遺伝子群の各遺伝子産物に対する特異抗体、真核細胞発現系、及び遺伝子欠損ウイルスを作製し、各遺伝子産物のウイルス増殖、病原性発現における役割について検討した。(西山)
- 6) 1 家系 8 頭のカニクイザルと、無作為に選択した 32 頭のカニクイザルの抹消血から mRNA を抽出し、A locus 特異的なプライマーを使った RT-PCR で、MHC class I A locus を増幅した。DNA の塩基配列を基に、MHC class I A locus の Allele を特異的に検出するための PCR-SSP 用プライマーを設定した。(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) EGFP-tubulin 融合蛋白質を発現する AAV ベクターを経静脈接種して 90 日経過後のカニクイザルでは、脾臓、各リンパ節、扁桃、肝臓には細胞 10^6 個あたり 10^4 copy 以上のベクターが、筋肉、気管、心臓、肺、胆嚢、骨髄などには細胞 10^5 個あたり $10^3 \sim 10^4$ copy のヘクターが検出された。扁桃、脾臓では、50~250mg の組織あたり 1~5ng の EGFP-tubulin 融合蛋白質の発現が確認された。

これらの臓器 組織で、AAV ベクターに起因すると思われる病理組織所見はなかった。(神田、佐多)

- 2) カニクイザルの肝臓、脾臓、回腸、副腎、リンパ節などに、2 種の新たな AAV 関連ゲノムを検出し、AAV9 型、10 型とした。これらのウイルスのキャプシド蛋白質のアミノ酸配列と、ヒト由来の AAV2 型キャプシド蛋白質のアミノ酸配列との相同性はそれぞれ 84%と 62%だった。また、AAV9 型、10 型のキャプシドを持つヘクターを作製した。(神田)
- 3) A-MLV 産生細胞を接種したサル臓器から抽出した DNA を鋳型にし、env ないし pol 遺伝子を増幅する nested PCR によって、肺、脾臓、肝臓、大脳等でプロウイルス DNA を検出した。病理組織学的には病変と判定できるものはなかった。(北村、佐多)
- 4) ワクチン接種をうけたアカゲサル全頭において、病的臨床所見は認められなかった。非増殖性の F(-)SeV-Gag 経鼻接種ブーストを行なったサル臓器の Gag 特異的 T リンパ球は、ブーストによって高いレベルに上昇した。増殖性 SeV-Gag の接種によって誘導された Gag 特異的 T リンパ球レベルと有意な差は認められず、F(-)SeV-Gag が高い細胞性免疫誘導能を持つことがわかった。F(-)SeV-Gag 経鼻接種後 2 週目の採取組織より分離したリンパ球中には、鼻腔粘膜より分離したリンパ球を筆頭に、高レベルの Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球が認められた。(俣野)
- 5) マウスの大腸癌由来細胞 Colon26 細胞を接種した腹膜播種モデルで、HF10 及び Hh101 (HF10 と hrR3 の recombinant で UL56、UL39 遺伝子を欠損し、感染細胞に細胞融合を誘導する) の抗腫瘍効果を検討した。6 週令 BALB/C の腹腔内に 5×10^6 個の Colon26 細胞を接種後、7、8、9 日目に 1×10^7 PFU のウイルスを腹腔内接種した。HF10、Hh101 を 3 日間連続投与したものは 100%生残したか 非接種群では約 25%だった。そこで、新たに HL12 (HSV-1 型と HSV-2 型の recombinant で、UL56、US3 を欠損し細胞融合を起こす) と、HN1038

(HSV-1 型の弱毒化ウイルスで UL56、US9、US10、US11、US12 を欠損) を作製し、抗腫瘍性を検討している。(西山)

- 6) UL56 蛋白質はキネシンファミリーに属する KIF1A と結合することがわかった。UL51 蛋白質は、Golgi-58K、GM130 などと共局在することがわかった。キャプシドがゴルジ膜由来の小胞へ出芽してゆくこと、UL51 蛋白質はテグメント蛋白質として粒子内に取り込まれることなどから、UL51 蛋白質は HSV の envelope 獲得過程に重要であると推定された。(西山)
- 7) カニクイザルの MHC class I A locus について、1 家系 8 頭で 4 種類の Allele が、ランダムに選択した 32 頭で 10 種類の Allele が検出された。(山田)

D 考察

- 1) AAV ベクターが血流中に入ると、接種後 90 日たってもリンパ系組織を中心に種々の臓器にベクターが残り、少なくとも一部の臓器では導入遺伝子が発現していることがわかった。即ち、AAV ベクターは患者の様々な臓器に感染し、治療用遺伝子を発現し続けることを示しており、治療用遺伝子の性質によっては非標的臓器での発現が重大な副作用をもたらす可能性がある。今後、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。(神田、佐多)
- 2) カニクイザルには、サル固有の AAV が潜伏 持続感染していた。ヒトには AAV2、5 型等が潜伏 持続感染しており、ヒトに AAV ベクターを投与すると、AAV とヘクターの組み換え体の出現等が危惧されるが、カニクイザルはこれらを調べる優れた動物モデルであることがわかった。(神田)
- 3) フロウイルス化した A-MLV は、少なくとも接種後 1 ヶ月では体内から排除されないことがわかった。フロウイルスは長期的には癌の原因となりうるので、長期の観察が必要である。(北村、佐多)
- 4) 安全性が高いと期待できる非増殖性の F 欠損 SeV ヘクターは、ワクチン抗原発

現系として増殖性 SeV ベクターに劣らない性能を示した。F(-)SeV-Gag 経鼻接種後、扁桃由来のリンパ球中に Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の誘導が認められたことは、効率よく粘膜免疫が誘導されたことを示唆している。F 欠損 SeV ベクターを用いたエイズワクチンは、臨床試験を行う準備がほぼ完了したと考えられる。(俣野)

- 5) 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示した。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ず、免疫系の関与が推定される。マウスモデルで抗腫瘍性、安全性についてはほぼ確立できた HF10 を臨床試験に使用するため、ヒトに対する安全性がどのような試験で確保できるか、早急に明らかにしたい。(西山)
- 6) カニクイザルの MHC class I A locus の解析は、煩雑なシーケンス解析よりも、簡便なマルチプレックス PCR-SSP を用いる方が有用であることがわかった。また、B locus についても同様に解析し、A locus と合わせたハプロタイプを明らかにする必要がある。(山田)

E 結論

健常なサルに投与された RCR や AAV ベクターは、1~3 ヶ月後にわたり各種臓器に存在していた。AAV ベクターの場合は、少なくとも一部の臓器で導入遺伝子の発現がみられ、ベクターが血流中に入ると、標的臓器以外にも感染し、治療用遺伝子を発現し続けてしまうことを示している。導入遺伝子によっては重大な副作用をもたらす可能性があり、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。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も必要である。非増殖型 SeV ベクターは、安全性が向上し、しかも高い免疫誘導能を持つので、HIV 感染予防ワクチン抗原発現系として実用化が期待できる。増殖性弱毒化 HSV 欠損ウイルスは、マウスモデルで調べる限り強い

抗腫瘍活性を示した。末期癌患者に対する臨床応用を念頭に、安全性を確保するための前臨床試験を進める必要がある。

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 ベクターの生体内での動態については不明な点が多く、また 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も明らかになった。従って、ベクターの生殖細胞への感染による子孫への影響や患者から環境に放出されて二次感染を起こす可能性を含め、AAV ベクターの安全性についての基礎的情報の蓄積が求められている。本研究では、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。これまでに、AAV ベクターをカニクイザルの大腿静脈へ接種し、90 日目の体内残存ベクターを調べて、AAV ベクターは脾臓を中心にリンパ組織、脳 生殖器等に長く残ることを明らかにした。今年度は残存ベクターからの遺伝子発現の有無を検討した。EGFP-tubulin 融合蛋白質を発現する AAV ベクターを 3×10^{11} ゲノムコピーずつ 4 頭のカニクイザルに接種し、90 日後に各臓器から tubulin を抽出し、EGFP-tubulin 融合蛋白質の存在を調べた。リンパ節、扁桃、脾臓で導入遺伝子の明瞭な発現が認められた。AAV ベクターにより、これらの臓器に遺伝子が導入され、長期間にわたって発現することが確認された。現在、ベクターの存在する細胞種、染色体への組み込み等を詳しく調べている。また、カニクイザルより新たな AAV 関連ウイルスを分離し、ヒトの AAV との比較や標的臓器特異性等の解析を始めた。

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。即ち、静脈より導入されたベクターか、どの臓器 細胞に、どの程度の量で、どのくらい長く残存するかを明らかにする。ヒト同様にサルにおいても AAV 関連ウイルスの潜伏 持続感染があるか調べ、AAV ベクターの安全性 有効性を調べる動物モデルとしてのサルの性質を明確にする。

B 研究方法

1) EGFP-tubulin 発現 AAV ベクターを、生殖年齢に達した雄 2 頭と雌 2 頭のカニクイザ

ルにそれぞれ 3×10^{11} ゲノムコピーずつ大腿静脈に接種した。4 頭すべて接種後 90 日目に解剖し、各臓器を回収した。各臓器片から総 DNA を抽出し、EGFP 特異的プライマーを用いた PCR によって臓器中の AAV ベクターを半定量的に検出した。また、各臓器片から tubulin 蛋白質を抽出、濃縮し、抗 EGFP 抗体と抗 tubulin 抗体を用いたウエスタンブロット法によって、EGFP-tubulin 融合蛋白質を検出した。

2) 既知の AAV1~5 型のゲノムで良く保存されている塩基配列に注目し、この配列を持つプライマーとカニクイザル各臓器の DNA を使って PCR を行い、これまで知られていなかったサル型 AAV ゲノムを増幅した。得られ

た DNA は、クローニングした。さらに、サル型 AAV のキャプシド遺伝子に対する特異的プライマーを用い、PCR によってカニクイザル体内でのサル AAV の分布を調べた。サル型 AAV のキャプシドを用いたウイルスベクターを作成し、マウスの尾静脈より接種して、標的臓器特異性を調べた。

(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) EGFP-tubulin 融合蛋白質を発現する AAV ベクターを経静脈接種して 90 日経過後のカニクイザルで、種々の臓器にベクターが認められた。特に脾臓、各リンパ節、扁桃、肝臓には細胞 10^5 個あたり 10^4 copy 以上のベクターが存在し、筋肉、気管、心臓、肺、胆嚢、骨髄などには細胞 10^3 個あたり $10^3 \sim 10^4$ copy のベクターが検出された。
- 2) EGFP-tubulin 融合蛋白質を濃縮、精製する方法を確立した。ウエスタンブロット法で、約 1ng の融合蛋白質が検出できた。培養細胞を用いた実験では、およそ 10^4 個の細胞中に融合蛋白質が発現している細胞が 1 個あれば検出可能であった。
- 3) EGFP-tubulin 融合蛋白質発現 AAV ベクターを接種して 90 日後のサルの各リンパ節、扁桃、脾臓でそれぞれ 50~250mg の組織あたり 1~5ng の融合蛋白質が発現していた。
- 4) カニクイザルより新しい AAV 関連ウイルスゲノムをクローニングし、AAV9 型、10 型と名付けた。AAV9 型、10 型の DNA はカニクイザルの肝臓、脾臓、回腸、副腎、リンパ節などに認められた。ヒト由来の AAV2 型キャプシド蛋白質のアミノ酸配列との相性はそれぞれ 84%と 62%だった。
- 5) AAV9 型、10 型の標的臓器特異性を調べるため、それぞれのキャプシドを用いた AAV

ベクターを作成した。マウスの尾静脈からベクターを接種し、マウス体内での動態を調べている。

D 考察

- 1) AAV ベクターのサルへの経静脈接種では、接種後 90 日たってもリンパ系組織を中心に種々の臓器にベクターが残り、リンパ節、扁桃、脾臓では導入遺伝子が発現していることがわかった。これは、AAV ベクターが血流中に入ると標的臓器以外にも感染し、治療用遺伝子を発現してしまう可能性を示している。現在、ベクターが感染している細胞種の特定、ベクター DNA の染色体への組み込みを詳細に調べている。今後、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 はヒトに潜伏・持続感染している。従って、ヒトに AAV ベクターを投与すると、野生型 AAV との組み換え体の出現やベクターレスキューの可能性があり、これらを調べる動物モデルが必要とされていた。カニクイザルに AAV9、10 型が潜伏・持続感染していることがわかり、今後 AAV9、10 型を使ったベクターとカニクイザルの組み合わせで、AAV ベクターの安全性を詳細に検討できるようになる。
- 3) AAV9 型、10 型は、ヒトにも感染する可能性がある。もし、これまでベクターとして利用されてきた AAV2 型、5 型とは異なる臓器親和性があれば、新たな治療用ベクターに利用できるかもしれない。検討を急いでいる。

E 結論

経静脈投与された AAV ベクターは、カニクイザル体内で 90 日以上、リンパ組織を中心に様々な臓器に存在し、少なくともその一部では導入遺伝子を発現し続けていた。カニクイザルの AAV を分離し AAV9、10 型とした。これらを利用したベクターとカニクイザルの組み合わせは AAV ベクターの安全性・有効性を評価するための理想的な動物モデルとなる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Enomoto, K, Enomoto, Y, Ishii, Y, Araie, M, and Kanda, T Genes up- and down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a BBRC, in press 2003
- 2 Ishii, Y, Tanaka, K, and Kanda, T Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein L1 the Cysteines Affecting the Intermolecular Bonding and Structure of L1-Capsids Virology, in press 2003
- 3 Matsumoto, K, Yoshikawa, H, Yasugi, T, Nakagawa, S, Kawana, K, Takeoka, A, Yaegashi, N, Iwasaka, T, Kanazawa, K, Taketani, Y, and Kanda, T IgG Antibodies to Human Papillomavirus 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids a Case-Control Study of Cervical Intraepithelial Neoplasia in Japan J Medical Virology, in press, 2003
- 4 Kawana, K, Yasugi, T, Kanda, T, Kawana, Y, Hirai, Y, Yoshikawa, H, Taketani, Y Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus (HPV) as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia BBRC, 296 102-105, 2002
- 5 Mori, S, Murakami, M, Takeuchi, T, Kozuka, T, and Kanda, T Rescue of AAV by antibody-induced Fas-mediated apoptosis from viral DNA integrated in HeLa chromosome Virology, 301 90-98, 2002

2 学会発表

- 1 Kanda, T Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Human Papillomavirus 16 (HPV16) L1 Expression in HeLa 感染と免疫フォーラム
- 2 Kawana, K, Yasugi, T, Kawana, Y, Yoshikawa, H, Kanda, T, Taketani, Y Safety and Immunogenicity of a Peptide Containing the Cross-Neutralization Epitope on HPV 16 L2 in Nasal Immunization of Adult Volunteers 第20回国際パピローマウイルス会議
- 3 石井克幸, 神田忠仁 ヒトパピローマウイルス 16 型キャプシド主構成タンパク質 L1 の変異解析。日本ウイルス学会
- 4 緒方敏彦, 神田忠仁 アデノ随伴ウイルス組み込み領域(AAVS1)のエンハンサー遮断活性。分子生物学会

H 知的所有権の取得状況

なし

2. 遺伝子治療用ベクターの安全性評価に関する研究

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)

共同研究者 中島 典子、岩田 奈織子、佐藤 由子(同感染病理部)

研究要旨 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病理組織学的方法として、レーザーマイクロダイセクション法について SIV 実験サル組織を用いて検討した。その結果、組織構築と関連した組織間でのウイルスの動態の差異を明らかにすることができた。RNA の検討に課題を残しているが、今後有用な病理学的解析方法となると考えられた。また、MLV および AAV ベクターを接種したサルの病理組織学的解析では、一部に脾腫大や組織の変化を認めたが、ベクター接種と直接関連した組織変化ではないと考えられた。

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と目的とし、病理組織学的、免疫組織化学的、そして *in situ hybridization* 系を用いた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か、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、安全性を評価することか目的である。

レーザーマイクロダイセクション(LMD)法は組織切片から特定の部位を単離回収することができる簡便な方法である。この手法はおもに癌病変の解析に用いられており、感染症の病理学的解析に使用している報告は少ない。本年度はこの LMD 法を遺伝子治療に用いるベクターの安全性や有効性に関わる病理組織学的解析に応用する目的で検討を行った。また MLV や AAV ベクターを接種したサルの病理組織学的検討を行った。

B 研究方法

1) LMD 法

LMD 法は核酸への影響が少ない 337nm 波

長の UV レーザーにより顕微鏡下で標的組織を切り取る手法である。切り取った組織の核酸を抽出後、分子生物学的手法を用いて目的組織を解析できる。今回 LMD 法を応用するにあたり、HIV ないし SIV(SHIV) 感染サル組織のリンパ節および脳病変を対象に選んだ。というのは、HIV 感染リンパ節では、ARC 期のリンパ節は PGL とよばれるリンパ節腫脹がみられる。組織学的には胚中心の腫大があり、HIV gag 抗原が濾胞樹状細胞の表面に沿って検出されるが、一方、HIV の mRNA を昨年報告した HybrAT-Tailing 法で検索するといわゆる T 細胞領域に検出できるが、リンパ節の胚中心には検出できなかった。胚中心における濾胞樹状細胞(FDC)の役割については多数の研究が報告されているが、未だに一致した見解が得られていない。つまり、この細胞でウイルスが増殖しているのか、単にウイルス抗原をトラップしているだけなのかは不明である。HIV 動物モデルである SIV や SHIV 実験感染サルでは、HIV 感染患者と同様の病理学的変化が観察されているが、標本の状態はヒト症例に比べて格段によく、抗原やゲノムの保存がいいことか知られている。

今回、LMD 法を用いて HIV 動物モデルで

あるSIV感染サルのリンパ節からFDCの存在する胚中心とその周囲組織を切り取り、リンパ節におけるSIV-DNAの局在を調べた。また、従来、in situ hybridization (ISH)の結果によりウイルスRNAが検出されなかったSHIV感染サルの脳固有細胞からSIV-DNAが検出されるかをLMD法により検索した。

リンパ節はSIVsmE543-3接種後、1年経過したカニクイザルのPFA固定パラフィン包埋組織を用い、SIVgag抗原であるp27陽性細胞を含む胚中心とその周囲組織とに分けて、それぞれLMD法で切り取った。切り取った組織はDNA抽出後、nested-PCR法を用いて、SIV-DNA(productのサイズ122bp)を検出した。脳はSHIV896接種後8ヶ月経過したアカケザルのホルマリン固定パラフィン包埋組織を用い、マクロファージ集簇巣とそれ以外の脳組織(神経細胞および神経膠細胞を含む部分)とに分けてLMD法で切り取った。そしてリンパ節と同様に核酸を抽出し、nested-PCR法でSHIV-DNA(productのサイズ79bp)を検出した。

LMD法の詳細は以下の通りである。組織切片を載せるスライドガラスにメンブレンフィルムを張り200℃、2時間の乾熱滅菌を行い完全に貼り付けた。その後、6-7μmの組織切片を載せ、十分に乾燥させた。切片は脱パラ後滅菌精製水に浸漬し、0.05%トルイシンブルーで核染色を行った。レーザーマイクロタイセクションは40倍の対物レンズを使用し、切り取りエッペントルフチューブの蓋にレーザーパルスで飛ばした。切り取る組織切片に含まれる細胞数かおよそ1000個程度集まった時点で、Qiagen DNA抽出キットを用いてDNAを抽出した。エタノール沈殿を行った後、10μlの精製水のDNAを溶解した。

PCR法はSIVnef領域を標的とするnested PCR法を作製した。最初は122bp、二回目は内部に設定したプライマーにより79bpを増幅するものである。それぞれ35サイクルで行った。抽出DNAの質の検定にはβ-globin PCR (110 bp)を行い確認した。

2) 遺伝子治療用ヘクターを接種したカニクイサルの病理組織学的検討

実験の詳細については、神田および北村分担研究者の報告書を参照。剖検は型のこく行い、凍結組織、PCR用組織、ホルマリン固定組織をほぼ全臓器から採取した。ホルマリン固定組織から通常の病理組織標本を作製した。リンパ節等ではpan B(L26, Dako)およびpan T(CD3, Dako)細胞抗原をLSAB法による免疫組織化学染色を行い同定した。

C 研究結果

1) LMD法

a) SIV感染サルリンパ節のSIV-DNA局在免疫染色およびin situ hybridization (HybrAT-Tailng-CSA)法を用いたISHでは、SIVgag p27抗原およびSIV-RNAが、リンパ節の胚中心に優位に陽性となった。また、これらの抗原が検出された細胞は連続切片においてCD35陽性細胞(FDC)とほぼ一致していた。一方、LMD-PCR法の結果からSIV-DNAはむしろp27陰性の胚中心周囲組織から優位に検出された(図1)。

b) SHIV感染サルの脳のSHIV-DNA局在免疫染色およびISHではマクロファージに一致してSIV-RNAが認められ、神経細胞や神経膠細胞からは検出されなかった。LMD-PCR法によりSHIV-DNAを検索したところ、マクロファージ以外の神経細胞や神経膠細胞からも検出された(図2)。

2) MLVおよびAAV由来の遺伝子治療用ヘクターを接種したカニクイサルの病理組織学的検討

a) MLVヘクターを接種したサル3頭

1996年6月から9月に出生した雌のカニクイサルを実験に用いた。病理組織学的には病変と判定できるものはない。また骨髄にも著変はない。しかし#1219609141サルでは脾臓が腫大し、白脾髄の不規則な拡大とT細胞領域の反応性変化が認められた(図3)。ほか、腎臓、肝臓の門脈域、膀胱粘膜下層、リンパ節や小腸パイエル板、子宮筋

層や頸部、顎下腺、肺にリンパ装置やリンパ節の反応性変化が認められた。#1219606077 では胸膜にリンパ球集簇がみられた。もう一頭のサル(#1319607041)にはリンパ節の反応性変化のみであった。

b) AAV ヘクターを接種したサル 4 頭

1997年5月から6月に出生したカニクイサルで、雌1頭、雄3頭である。いずれも組織病変と判定しうるものはなく、minorな組織変化のみである。うち1頭(#1229705041)は脾臓腫大があり、白脾髄の不規則な拡大が認められた。このサルではほか、肝臓、腎臓、食道、消化管に軽度のリンパ球集簇がみられ、耳下腺や顎下腺にもリンパ濾胞がみられた。リンパ節は不規則な反応性変化を示していた。

#1229706052 では肝臓や肺、膀胱に小リンパ球集簇があり、#1319705021 では子宮頸部の扁平上皮に角化やリンパ球浸潤、#1319705028 ではリンパ節の軽度の反応性病変のみみられた。精巣や卵巣の生殖器に病変はない。

D 考察

1) LMD 法

胚中心部分では p27 抗原や SIVnef-RNA が陽性にも関わらず、SIV-DNA は nested PCR 法で検出されなかった。したがって、ウイルス粒子は FDC 表面にトラップされているだけで FDC 内で増殖していない可能性が示唆された。しかし ISH 法で検出された SIV-RNA が genomic RNA であるのか mRNA であるのかを検討していないため、その点を明らかにする必要がある。ISH で検出した SIV-RNA が mRNA であった場合、SIV-DNA が検出されなかったことは SIV-DNA が mRNA と比較して極めて少ないコピー数であったと考えられる。また、LMD-PCR 法では nef の部分の検出しか行っていないため、SIV-DNA が検出できなかったのはプライマーの感度が原因である可能性もある。そのため今後、他の部分にプライマーを設計し、PCR 法で確認を目的として再度検討を行う予定である。p27 陰性の胚中心周囲から SIV-DNA が優位に検出

してきたことについて、これは傍濾胞領域に存在する CD3 陽性細胞あるいは Mac387 陽性細胞中の proviral DNA を検出していると考えられる。このことを考慮すると、胚中心には mRNA はほとんどなく、proviral DNA も存在しない可能性が高い。一方、HIV および SIV 脳症の研究では、ウイルス発現細胞について多くの報告がされている。

今回の結果は、従来報告されているように SIV が神経細胞や神経膠細胞にも感染していることを示唆した。しかし、今回回収した神経細胞および神経膠細胞を含む部分には血管内皮細胞が少なからずも混在しているため、今後血管内皮細胞を混入しないよう神経細胞のみを切り取るか、血管内皮細胞のマーカー遺伝子の増幅を同時に行うなどの検討が必要であろう。また、今後、これらの標本数を増やし、DNA のみでなく RNA および mRNA の検出や定量 PCR を行い SIV の動態について検討していき、病態の解明の有効な方法としたい。

2) MLV および AAV 由来の遺伝子治療用ヘクターを接種したカニクイサルの病理

MLV や AAV ヘクターを接種したサルでは、明らかな組織病変といえるものは認められなかった。しかし、MLV を接種した #1219609141 と AAV を接種した #1229705041 のサルでは、脾腫大と白脾髄領域の不規則な拡大が認められた。これらの変化はときときみられるもののため、サル固有のものであり、ヘクター接種との直接的感染性はないと考えた。

(倫理面への配慮)

サル実験感染は感染研動物実験委員会の許可を受けて行った。

E 結論

LMD 法を用いて SIV 感染リンパ節および SHIV 感染サルの脳から核酸を抽出し、nested-PCR 法により proviral DNA の局在を明らかにし、今後の病理学的解析に重要な方法となる。MLV や AAV 接種による直接関連する病変は明らかではなかった。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Nakajima N, Ionescu P, Sato Y, Hashimoto M, Kuroita T, Takahashi H, Yoshikura H, Sata T In situ hybridization AT-tailing with catalyzed signal amplification for sensitive and specific in situ detection of HIV-1 mRNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues *Am J Pathol* 2003, 162 381-389
- 2 Kobayashi T, Ueda M, Nishino T, Moritani S, Hanada Y, Mito K, Kushima R, Sata T Cytology of high-grade squamous intraepithelial lesion in Japanese-Brazilian women with HIV infection with polymerase chain reaction-assisted human papilloma virus detection *Diagn Cytopathol* 2002, 26 268-271
- 3 Ashida M, Ueda M, Kunisada M, Ichihashi M, Terao M, Sata T, Matsukura T Protean manifestations of human papillomavirus type 60 infection on the extremities *Br J Dermatol* 2002, 146 885-90
- 4 Ando Y, Terao K, Narita M, Oguchi Y, Sata T, Iwasaki T Quantitative analyses of cytomegalovirus genome in aqueous humor of patients with cytomegalovirus retinitis *Jpn J Ophthalmol* 2002, 46 254-260
- 5 Mitsuishi T, Kawashima M, Matsukura T, Sata T Human papillomavirus type 58 DNA in Bowen's disease of the elbow *Br J Dermatol* 2001, 144 393-395
- 6 Katano H, Sato Y, Itoh H, Sata T Expression of human herpesvirus 8 (HHV-8) encoded immediate early protein open reading frame 50, in HHV-8-associated diseases *J Hum Virol* 2001, 4 96-102
- 7 Suda T, Katano H, Delsol G, Kakiuchi C, Nakamura T, Shiota M, Sata T, Higashihara M, Mori S HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated multicentric Castleman's Disease *Pathol Int* 2001, 51 671-679
- 8 Kino N, Sata T, Sato Y, Sugase M, Matsukura T Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a novel human papillomavirus (type 82) associated

with a vaginal intraepithelial neoplasia *Clin Diag Lab Immunol* 2000, 7 91-95

- 9 Yoda K, Sata T, Kurata T, Aramaki H Oropharyngotonsillitis associated with non-primary Epstein-Barr virus infection *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000, 126 185-193
- 10 Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease *Virology* 2000, 269 335-344
- 11 Kashiwase M, Sata T, Yamauchi Y, Minoda H, Usui N, Iwasaki T, Kurata T, Usui M Progressive outer retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 1 in a patient with acquired immunodeficiency syndrome *Ophthalmology* 2000, 107 790-794
- 12 Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, Nakaya T, Watanabe M, Tomonaga K, Iwahashi K, Ameno K, Momiyama N, Taniyama H, Sata T, Kurata T, de La Torre JC, Ikuta K Isolation of borna disease virus from human brain tissue *J Virol* 2000, 74 4601-11
- 13 Tanaka M, Endo K, Suzuki T, Kakita A, Takahashi H, Sata T Parkinsonism in HIV encephalopathy *Mov Disord* 2000, 15 1032-1033
- 14 Ishiji T, Kawase M, Honda M, Numura M, Yoshimura E, Sata T, Matsukura T Distinctive distribution of human papillomavirus type 16 and type 20 in the tonsillar and the skin carcinomas of in a patient with epidermodysplasia verruciformis *Br J Dermatol* 2000, 143, 1005-1010

2 学会発表

- 1 中島典子、佐多徹太郎、佐藤由子 ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた新しい in situ ウイルス核酸検出法。第91回日本病理学会総会、3月、横浜。

H 知的財産権の出願 登録状況

特になし

図 1

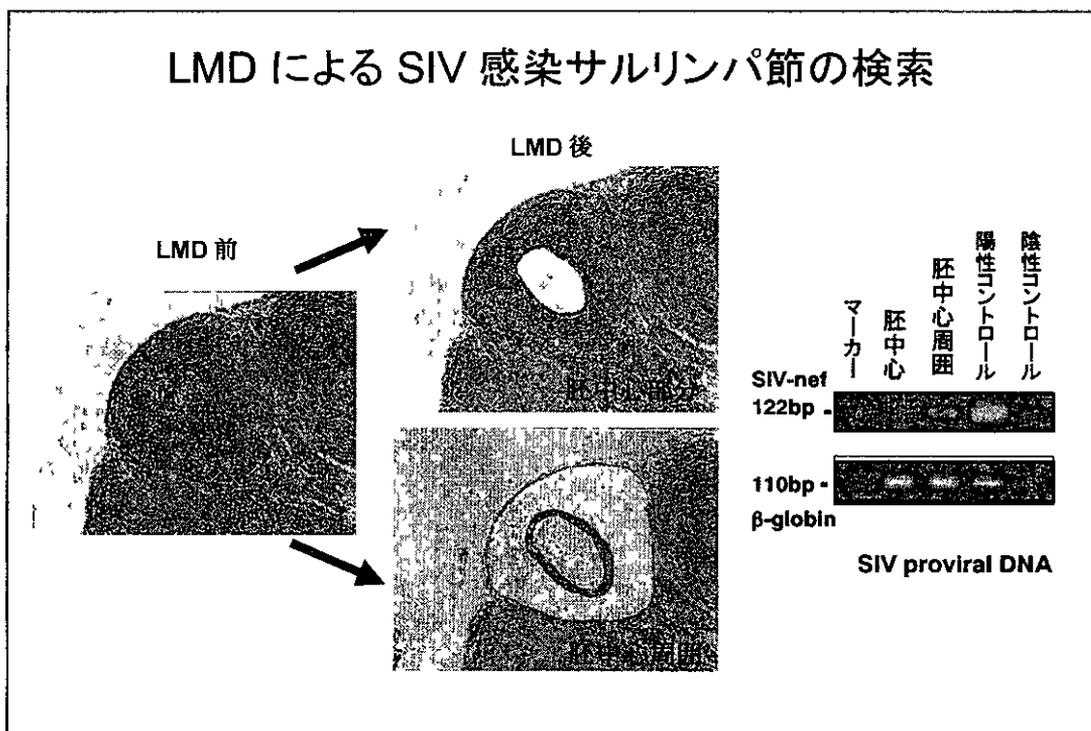
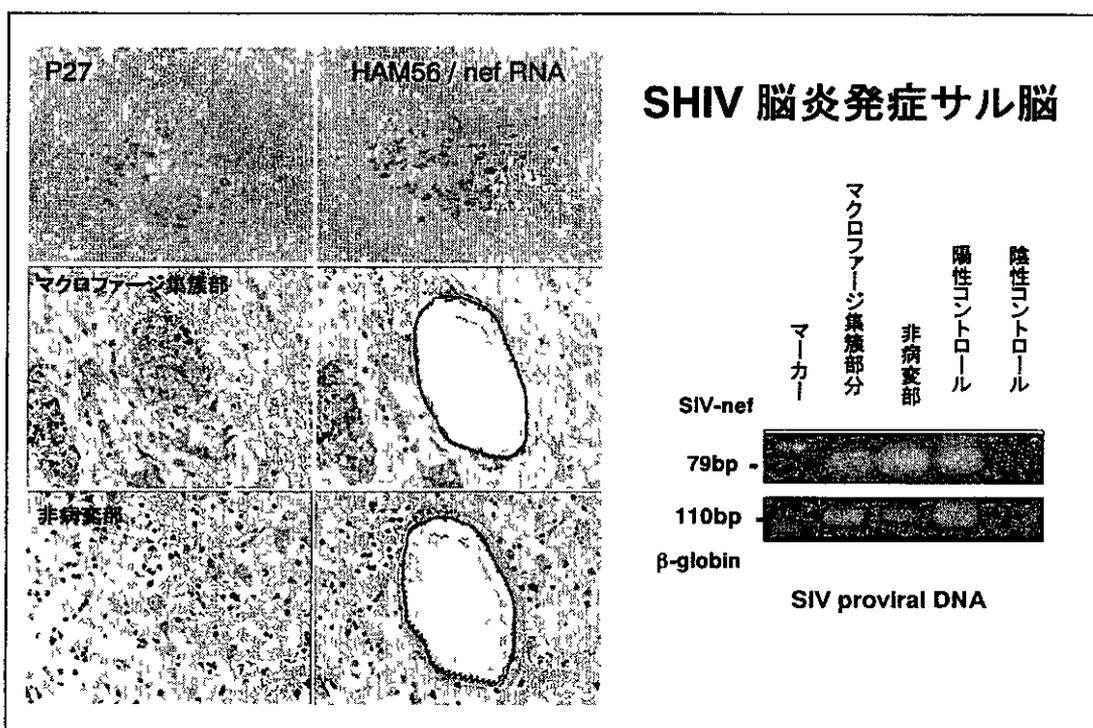
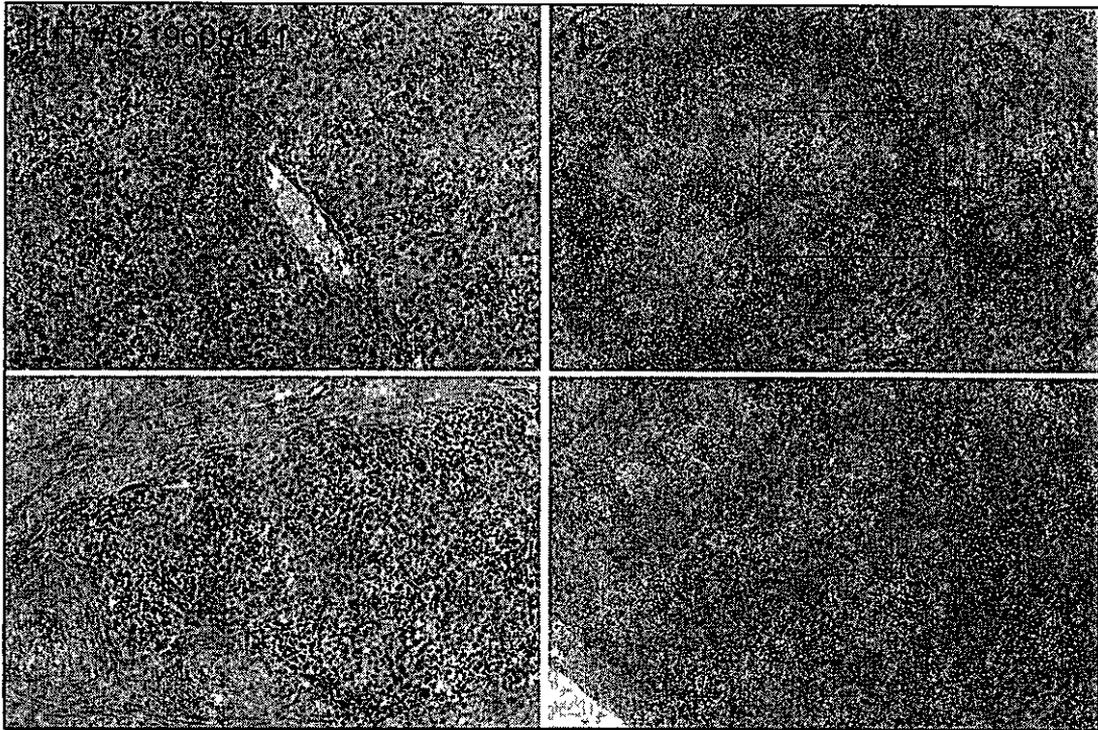


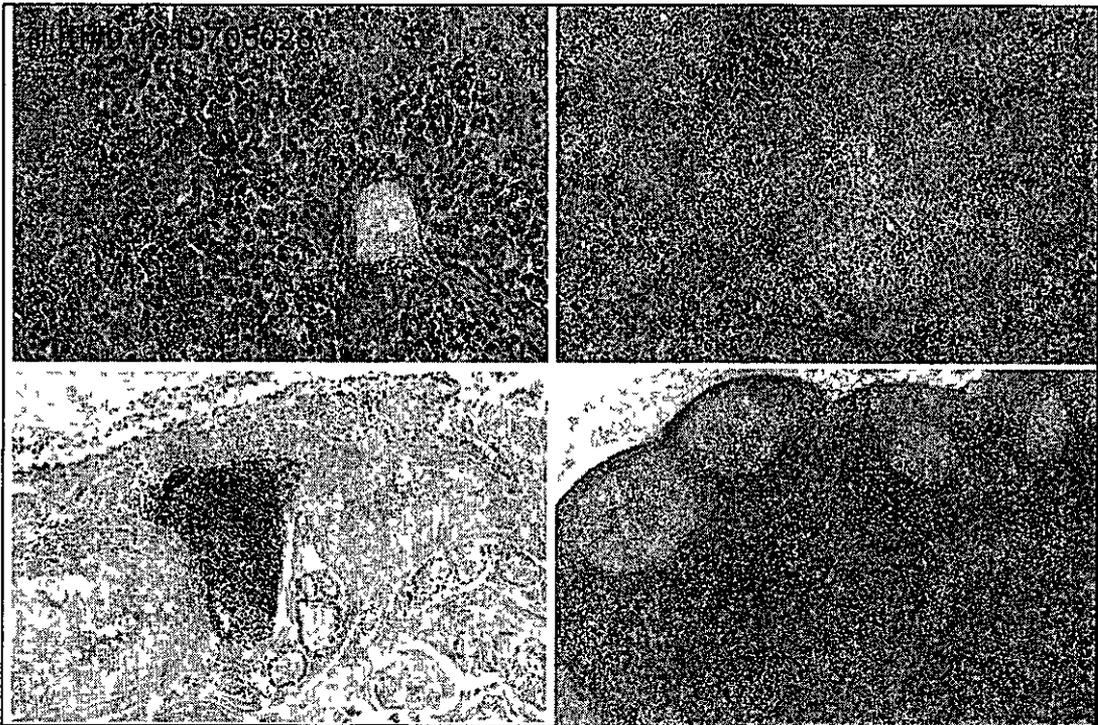
図 2



☒ 3



☒ 4



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基になった 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、サイクロスポリン A を投与して免疫抑制状態にしたメスのカニクイサル二頭にアンフォトロピック MLV に感染したカニクイサル細胞を大腿静脈経路で 10^8 投与した。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とポリメラーゼ配列を標的に調べた。一頭では肺、脾臓、肝臓、末梢血細胞でプロウイルスを確認できた。もう一頭では脾臓、大脳でプロウイルスの存在を確認できた。アンフォトロピック MLV はカニクイサルにおいては急性の毒性は強くないと考えられる。しかし、これら存在が確認されたプロウイルスが長期的な毒性を引き起こす可能性はある。

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頭のメスカニクイサルにあらかじめ2日間サイクロスポリン A を投与し、免疫抑制状態にした。うち二頭 (サル番号 #4 と #6) に A-MLV (A1080A 株) 感染細胞 (AzaB) 10^8 を生理食塩水にけん濁して大腿静脈から投与した。のこのサル #5 には、非感染細胞を投与した。三頭とも1ヶ月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、エンベロープ遺伝子、ポリメラーゼ遺伝子を標的としてネステッド PCR を行ってプロウイルスの有無を確認した。

C 研究結果

サル #4 においては肺、脾臓、肝臓、末梢血細胞でプロウイルスを確認できた。卵巣を含む他の臓器ではプロウイルスの存在を確認できな

かった。サル#6においては脾臓、大脳ではプロウイルスを確認できたか、やはり卵巣を含む他の臓器ではプロウイルスの存在を確認できなかった。いずれのサルにおいても目立った異常症状は見られなかった。

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ため 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 はカニクイサルにおいていくつかの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

特になし

G 研究発表

特になし

H 知的財産権の出願 登録状況

特になし