

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、センダイウイルス（SeV）ベクターは、培養細胞において高い遺伝子導入 発現効率を示すことから、有力なワクチンベクター候補である。このベクターの臨床応用を検討するにあたっては、霊長類動物を用いた前臨床試験が重要である。我々はこれまで、サルレベルにおける 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、SeV ベクターを用いたエイズワクチンシステム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おける解析をおこなっている。昨年度までに、複製型 SeV ベクターの安全性および細胞性免疫誘導能を示してきたが、今年度は、さらに安全性と実用性を高めたエイズワクチンとして、非複製型 F 欠損 SeV ベクターを用いた（第2世代）ワクチンシステムを確立した。サルモデルにおける解析の結果、DNA/SeV フライム ブーストシステムにおいて、非複製型 F 欠損 Gag 発現 SeV ベクターを用いたブーストにより、効率よく Gag 特異的 T リンパ球が誘導されることが示された。その誘導効率については、従来の複製型 SeV ベクターを用いた場合と比較して有意な差は認められなかった。組織別解析では、非複製型 F 欠損 Gag 発現 SeV ベクター経鼻接種後、鼻腔粘膜優位の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球誘導が確認された。さらに、扁桃由来のリンパ球中にも、高レベルの特異的 CD8 陽性 T リンパ球誘導が認められ、このシステム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、前臨床試験として、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、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一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 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 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 遺伝子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 SeV-Gag 経鼻接種群では対照群と比較して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 フライム ブーストシステムでは、SHIV 感染サルモデルにおける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。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、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、マカクサルモデルにて、SeV-Gag エイス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ている。昨年度まで用いてきた SeV ベクターは、V 遺伝子を knock-out することにより弱毒化した複製型 SeV ベクターであったが、今年度はさらに F 遺伝子を欠損させた非複製型 SeV ベクターを用いた（第 2 世代）エイスワクチンシステムを確立した。この非複製型 F 欠損 Gag 発現 SeV ベクター (F[-]SeV-Gag) を用いて、サルモデルにおける解析をおこない、主にその細胞性免疫誘導能について検討した。

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うけ、その承諾を得てから開始した。

実験 1（複製型 SeV-Gag と非複製型 F[-]SeV-Gag の Gag 特異的 T リンパ球誘導能の比較）

F(-)SeV-Gag 作成は Dनावec に依頼し供給をうけた。マカクサル 3 頭に対し、SIV の Env Nef 以外の抗原を発現する DNA (CMV-SIVGP) を筋注した後（プライム）、6 週目に F(-)SeV-Gag 6×10^{10} CIU を経鼻接種した（ブースト）。対照群として、マカクサル 3 頭に対し、CMV-SIVGP DNA を筋注した後 6 週目に SeV-Gag 1×10^8 CIU を経鼻接種した。Gag 発現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、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 リンパ球レベルを測定した。

実験 2（組織別 Gag 特異的免疫誘導の解析）

マカクサル 1 頭に CMV-SIVGP DNA 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、血液よりリンパ球を分離し、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルを測定した。

C 研究結果

ワクチン接種をうけたマカクサル全頭において、病的臨床所見は認められなかった。

実験 1（図 1）

F(-)SeV-Gag 経鼻接種ブーストを行なったサル 3 頭について、ブースト直前の Gag 特異的 T リンパ球は検出レベル以下であったが、ブースト後 1 週目には、高レベルの Gag 特異的 T リンパ球が認められた。そのレベルには個体差があり、Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の誘導が優位なものもあれば、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の誘導が優位なものもあった。SeV-Gag 経鼻接種ブーストを行なった 3 頭との比較では、個体差はあるものの、誘導された Gag 特異的 T リンパ球レベルに有意な差は認められず、SeV-Gag 同様、F(-)SeV-Gag の高い細胞性免疫誘導能が明らかとなった。

実験 2（図 2）

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も、末梢血中リンパ球と同レベルあるいはさらに高レベルの Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球が認められた。鼻腔粘膜より分離したリンパ球中の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルは特に高かった。扁桃においても、効率よい Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球誘導が認められた。

D 考察

マウスを自然宿主とする SeV は、ヒトを含む霊長類動物では病原性は無いと考えられている。我々はこれまで、V 遺伝子を knock-out することにより弱毒化した SeV ヘクターについて、霊長類動物における安全性を示してきた。今年度は、さらに安全性を高めた非複製型 F 欠損 SeV ヘクターワクチンシステムを確立したわけである。本研究の結果は、F(-)SeV-Gag 経鼻接種ブーストにより、高レベルの Gag 特異的 T リンパ球が誘導されることを確認しており、このシステムの有効性を示している。したがって、この非複製型 F 欠損 SeV ヘクターを用いた DNA/F(-)SeV プライム ブーストシステムは、実用的なエイズワクチンとして、臨床試験の検討価値があると考えられる。

これまでのマウスの実験から、nasal-associated lymphoid tissue (NALT)における免疫反応レベルが、粘膜免疫の重要な指標の一つとされている。霊長類動物の粘膜免疫機構については、マウスと相違点があることは知られているが、霊長類動物の扁桃は、マウスの NALT の一部に相当すると考えられている。本研究において、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、この非複製型 F 欠損 SeV ベクター経鼻ワクチンが粘膜免疫誘導能を有することを示唆している。

E 結論

非複製型 F 欠損 SeV ヘクターを用い、安全性実用性を高めた (第 2 世代) DNA/F(-)SeV プライム ブースト エイズワクチンシステムを確立した。サルモデルにて、このシステムの高い抗原特異的 T リンパ球誘導能を明らかにした。さらに、抗原特異的 T リンパ球レベルの組織別解析を開始した。特に扁桃由来のリンパ球中にも高レベルの特異的 T リンパ球誘導が認められたことから、この F(-)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。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Kano, M, Matano, T, Kato, A, Nakamura, H, Takeda, A, Suzuki, Y, Ami, Y, Terao, K, and Nagai, Y Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques J Gen Virol 83 1377-1386, 2002
- 2 Kano, M, Matano, T, Kato, A, Shioda, T, and Nagai, Y Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector Jpn J Infect Dis 55 59-60, 2002
- 3 Matano, T Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials challenges against the chronic disease Current Topics in Virology, in press
- 4 Matano, T, Kano, M, Takeda, A, Nakamura, H, Nomura, N, Furuta, Y, Shioda, T, and Nagai, Y No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model AIDS, in press

2 学会発表

- 1 Matano, T, Kano, M, Lun, W H, Nakamura, H, Takeda, A, Ami, Y, Nomura, N, Furuta, Y, Shioda, T, and Nagai, Y Comparison of protective efficacies between Gag- and Tat-booster in a DNA-prime/ Sendai viral vector-boost vaccine system against AIDS The XIVth International AIDS conference, Barcelona, Spain, 7/9/2002
- 2 Matano, T, Lun, W H, Kano M, Takeda, A, Nakamura, H, Mori, K, Sata, T and Nagai, Y Loss of viremia control without losing specific CD8+

T cells in vaccinated macaques after showing CTL-based partial protection against SIV infection The XIIIth International Congress of Virology, Paris, France, 7/29/2002

- 3 Lun, W H, Kano, M, Takeda, A, Nakamura, H, Mori, K, Sata, T, Nagai, Y, and Matano, T Loss of AIDS vaccine-based viremia-control without loss of virus-specific CD8+ T cells in macaque preclinical trials 第50回日本ウイルス学会、札幌、10/16/2002
- 4 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤篤、須崎百合子 網康至、永井美之 俣野哲朗 組換えセンダイウイルスヘクターワクチンのマカクサルエイズモデルによる安全性および有効性の検討 第50回日本ウイルス学会、札幌、10/16/2002
- 5 倫文輝、狩野宗英、中村浩美、武田明子、俣野哲朗 サルエイズモデルにおける細胞性免疫破綻機構の解析 第16回日本エイズ学会、名古屋、11/30/2002

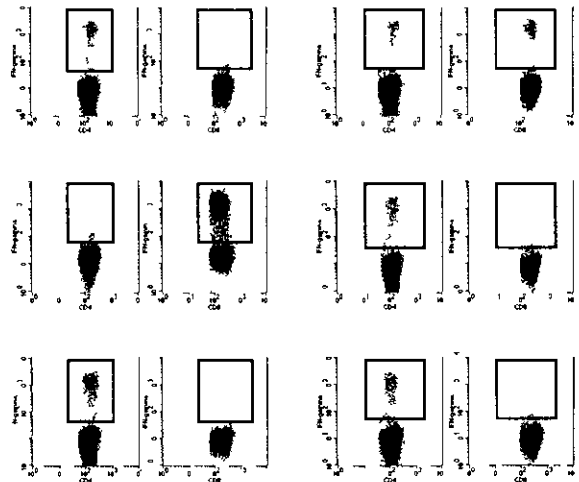


図1 ブースト後1週目の末梢血リンパ球中のGag特異的Tリンパ球誘導。Vv-Gag感染autologous B細胞との共培養によるGag特異的刺激後のIFN- γ 陽性Tリンパ球を示すFACS解析プロット図。左2列が対照群(SeV-Gagブースト)の3頭、右2列がF(-)SeV-Gagブースト群3頭。縦軸はIFN- γ 、横軸は左パネルがCD4、右パネルがCD8。

H. 知的所有権の取得状況

特許申請中

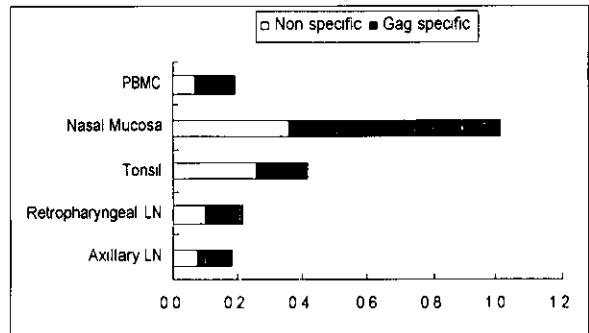


図2 F(-)SeV-Gagブースト後2週目の各組織由来リンパ球中のGag特異的CD8陽性Tリンパ球レベル(%). open box Vv感染autologous B細胞との共培養刺激, open box + closed box Vv-Gag感染autologous B細胞との共培養刺激後のIFN- γ 陽性CD8陽性Tリンパ球レベル。

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

分担研究者 西山 幸廣 (名古屋大学大学院医学研究科教授)

研究要旨 悪性腫瘍の治療を目的とした増殖型、弱毒化単純ヘルペスウイルス(HSV)の有効性、安全性を評価するために、Immunocompetent マウスを担がん動物 としての評価系を作製した。その結果、UL56 遺伝子を欠く弱毒化 HSV (HSV-1 HF10) が優れた抗腫瘍作用を有することか明らかとなり、臨床試験に向けての基礎データの収集及びウイルス製剤の生産を行った。また、遺伝子治療、及び癌治療の目的に沿った最良の HSV ベクターを開発するための基礎的情報の蓄積のためにウイルス遺伝子産物の機能について解析し、UL51、UL56 遺伝子産物などの役割について新たな知見を得た。

A 研究目的

現在、単純ヘルペスウイルス (HSV) をベースとしたヘクターは、二つの方向での利用が考えられている。一つは、HSV の細胞傷害性、およびチミジンキナーゼ (TK) を利用した悪性腫瘍治療用ヘクターとしての方向、他の一つは特定の細胞群への遺伝子導入用ヘクターとしての方向である。しかし、現在用いられている HSV ヘクターは、標的細胞の選択、細胞傷害性の制御などに成功しているとはいえ、臨床応用には有効性、安全性の上でも問題点が多い。本研究では HSV を悪性腫瘍治療用ヘクターとして開発し臨床応用するために、有効性及び安全性評価のための実験系を確立するとともに、対象となる悪性腫瘍に応じた replication-competent な弱毒化ウイルスの作製を試みる。さらに臨床試験実施のための準備を行う。

B 研究方法

- 1) Immunocompetent なマウスを担がん動物としての評価系を樹立し、UL56 欠損 HSV1 型 (HF10) を含む弱毒化 HSV 数種の有効性及び安全性についてさらなる検討を加えた。
- 2) HSV は少なくとも 74 種類の遺伝子をコードするか 1/3 近くは機能がほとんどわかっていない。

ていない。ヘルペスウイルスヘクターの安全性、有効性を高めるためにはこれらの遺伝子産物の機能についても明らかにすることが重要である。そのために各遺伝子産物に対する特異抗体、真核発現系の作製、及び遺伝子欠損ウイルスの作製を行い、それらを用いて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する。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の基準を満たしている。

C 研究結果

- 1 腹膜播種モデル、固形腫瘍モデルにおける弱毒化 HSV の抗腫瘍効果
 - 1 Immunocompetent マウスを担がん動物としての評価系の作製
昨年度、C3H 由来の肉腫細胞 NfSa を用いて腹膜播種モデル、頸部腫瘍モデルを作製し、接種細胞数と生存率、生存日数について検討した。本年度はマウスの大腸癌由来細胞 Colon26 細胞を用いて腹膜播種モデルにて HF10 及び Hh101 の抗腫瘍効果について検討を行った。

Hh101は HF10 と hrR3 の recombinant で UL56、UL39 遺伝子欠損しかつ感染細胞に細胞融合を誘導するクローンである。6週令 BALB/C (雌) 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 HF10、Hh101 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、コントロール群では約25%であった。一方、NfSaを用いて同様の実験を行ったか、HF10接種群では100%、Hh101では28.6%、コントロール群では0%の生存率であった。

2 新たな増殖型、弱毒化 HSV の作製

Hh101に加えて、HL12、HN1038を作製した。HLは、HSV-1型とHSV-2型の recombinant で、UL56、US3を欠損し細胞融合を起こすもの、HN1038はHSV-1型の弱毒化ウイルスで UL56、US9、US10、US11、US12を欠損するものである。各々異なる特性をもち、異なる抗腫瘍性を示すものと予想される。(現在、検討中)

3 アンプリコンを利用した抗腫瘍性 HSV の作製

HSV の replication-origin、packaging signal を有するプラスミドを構築し、CMV プロモーターの下流にウサギカルボキシエステラーゼ遺伝子を挿入した。ウサギカルボキシエステラーゼはトポイソメラーゼ I 阻害剤の前駆体 CPT-11 の活性化作用が強く、腫瘍部周辺での発現は副作用の低減と抗腫瘍作用の増強が期待される。HF10をヘルパーウイルスとして用い、上記アンプリコンを HSV 粒子内に取り込ませることかできた。また、感染によってカルボキシエステラーゼの発現を活性として確認できた。

II HSV 遺伝子機能の解析

- 1 Yeast two hybrid による解析から UL56 がキネシンファミリーに属する KIF1A と相互作用していることか示唆され、それは GST-pull down assay によっても

確認された。また、強毒 HSV-2 186 株を親株として UL56 欠損ウイルスを作製した。現在、培養細胞での増殖性、マウスに対する病原性について検討中である。

- 2 以前、UL51 遺伝子産物は、約 30K のリン酸化蛋白質で感染後期に産生されることを示した。

単独発現細胞を樹立し解析したところ、UL51 は膜分画と可溶性分画の両方に分布すること、また、コルシ装置のマーカ蛋白質、Golgi-58K、GM130 などと共局在することが明らかになった。さらに、種々の mutant 蛋白質を作製しその局在性について検討した。その結果、N 末の 15 個のアミノ酸部分にゴルジ装置への局在性を決定するシグナルがあり、それは 9 番目のシステイン残基の palmytoylation によって制御されていることが示唆された。カプントはゴルシ膜由来の小胞へ出芽してゆくこと、UL51 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考えて、HSV の envelope 獲得過程に重要であると推定される。

- 3 昨年、HSV の US11 産物か Intercellular trafficking 活性を有することを報告したか、今回、UL14 産物の C 末トメインを含む mutant 蛋白質が高温環境下 (42-43°C) で Intercellular trafficking 活性を示すことを見出した。詳細なメカニズムはまた不明たか、隣接細胞への拡散は gap junction を介して行われていることか種々の観察から示唆された。

D 考察

HF10 の抗腫瘍性、安全性についてマウスモデル系で検討し、その特性を明らかにした。臨床試験に使用するためのマスターウイルスバンク、臨床ロットの製造をほぼ GMP 規格に準じる形で行った。抗腫瘍療法に用いる弱毒化 HSV の安全性をとどのような形で検討しておくのが望ましいのか、ガイドラインの作成か急がれる。

E 結論

HF10に加えて、より安全性を増した Hh101, HL12, HN1038 の3種の増殖型、弱毒化 HSV を新たに作製し、抗腫瘍作用について検討した。その結果、悪性腫瘍の種類、部位によって弱毒化 HSV を使い分けるのかよい成績を得るために必要であることが示唆された。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Yoshikawa, T, Ihira, M, Asano, Y, Tomitaka, A, Suzuki, K, Matsunaga, K., Kato, Y, Hiramitsu, S, Tanaka, N, Kimura, H, and Nishiyama, Y Fatal adult case of severe lymphocytopenia associated with reactivation of human herpesvirus 6 J Med Virol 66 82-85 (2002)
- 2 Inagaki-Ohara, K, Kawabe, T, Hasegawa, N, Hashimoto, N, and Nishiyama, Y Critical involvement of CD40 in protection against herpes simplex virus infection in a murine model of genital herpes Arch Virol 147 187-194 (2002)
- 3 Yoshikawa, T, Asano, Y, Ihira, M, Suzuki, K, Ohashi, M, Suga, S, Kuto, K, Horibe, K, Kojima, S, Kato, K., Matsuyama, T, and Nishiyama, Y Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients clinical features and risk factors J Infect Dis 185 847-853 (2002)
- 4 Yoshikawa, T, Asano, Y, Akimoto, S, Ozaki, T, Iwasaki, T, Kurata, T, Goshima, F, and Nishiyama, Y Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis J Med Virol 66 497-505 (2002)
- 5 Nishiyama, Y, and Murata, T Antiapoptotic protein kinase of herpes simplex virus Trend Microbiol 10 105-107 (2002)
- 6 Ohashi, M, Yoshikawa, T, Ihira, M, Suzuki, K, Enomoto, Y, Suga, S, Tada, S, Sakui, H, Iida, K, Saito, Y, Nishiyama, Y, and Asano, Y Reactivation of human herpesvirus 6 and 7 in pregnant woman J Med Virol 67 354-358(2002)
- 7 Ihira, M, Yoshikawa, T, Ishiji, J, Ohashi, M, Enomoto, Y, Suga, S, Iida, K, Saito, Y, Nishiyama, Y, Asano, Y Serological analysis of human herpesvirus 6 and 7 in patients with coronary artery disease J Med Virol 67 543-537(2002)
- 8 Nozawa, N, Daikoku, T, Goshima, F, Yamauchi, Y, Takakuwa, H, Yoshikawa, T, and Nishiyama, Y Identification and characterization of the UL7 gene product of herpes simplex virus type 2 Virus Genes 24 257-266(2002)
- 9 Kimura, H, Ito, Y, Futamura, M, Ando, Y, Yabuta, Y, Hoshino, Y, Nishiyama, Y, and Morishima, T Quantitation of viral load in neonatal herpes simplex virus infection and comparison between type 1 and type 2 J Med Virol 67 349-353(2002)
- 10 Murata, T, Goshima, F, Yamauchi, Y, Koshizuka, T, Takakuwa, H, and Nishiyama, Y Herpes simplex virus type 2 US3 blocks apoptosis induced by osmotic shock Microb Infect 4 707-712(2002)
- 11 Koshizuka, T, Goshima, F, Takakuwa, H, Nozawa, N, Daikoku, T, Koiwai, O, and Nishiyama, Y Identification and characterization of the UL56 gene product of herpes simplex virus type 2 J Virol 76 6718-6728(2002)
- 12 Yamuchi, Y, Wada, K, Goshima, F, Daikoku, T, Ohtsuka, K, and Nishiyama, Y Herpes simplex virus type 2 UL14 gene product has heat shock protein (HSP)-like functions J Cell Sci 115 2517-2527(2002)
- 13 Murata, T, Goshima, F, Takakuwa, H, and Nishiyama, Y Excretion of herpes simplex virus type 2 glycoprotein D into culture medium J Gen Virol 83 2109-2116(2002)
- 14 Mori, I, Goshima, F, Imai, Y, Kohsaka, S, Sugiyama, T, Yoshida, T, Yokochi, T, Nishiyama, Y, and Kimura, Y Olfactory receptor neurons exhibit blockage of the dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by inducing self-apoptosis upon infection J Gen Virol 83 2109-2116(2002)
- 15 Ihira, M, Yoshikawa, T, Suzuki, K., Ohashi, M, Suga, S, Horibe, K, Tanaka, N, Kimura, H, Kojima, S, Kato, K, Matsuyama, T, Nishiyama, Y, and Asano, Y Monitoring of active HHV-6 infection in bone marrow transplant recipients by real time PCR and plasma PCR Microbiol

- Immunol 46 701-705(2002)
- 16 Murata, T, Goshima, F, Nishizawa, Y, Daikoku, T, Takakuwa, T, Ohtsuka, K, and Nishiyama, Y Phosphorylation of cytokeratin 17 by herpes simplex virus type 2 US3 protein kinase Microbiol Immunol 46 707-719(2002)
 - 17 Yamauchi, Y, Goshima, F, Yoshikawa, T, Nozawa, N, Koshizuka, T, and Nishiyama, Y Intercellular trafficking of herpes simplex virus type 2 UL14 deletion mutant proteins Biochem Biophys Res Comm 298 357-363 (2002)
 - 18 Umemura, M, Nishimura, H, Yajima, T, Wajjwalku, W, Matsuguchi, T, Takahashi, M, Nishiyama, Y, Makino, M, Nagai, Y, and Yoshikai, Y Overexpression of interleukin 15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome FASEB J 16 1755-1763 (2002)
 - 19 Mori, I, Liu, B, Hossain Md J, Takakuwa, H, Daikoku, T, Nishiyama, Y, Naiki, H, Matsumoto, K, Yokochi, T, and Kimura, Y Successful protection by amantadine hydrochloride against lethal encephalitis caused by a highly neurovirulent recombinant influenza A virus in mice Virology 303 287-296 (2002)
 - 20 Tanaka, N, Kimura, H, Hoshino, Y, Nishikawa, K, Kojima, S, Nishiyama, Y and Morishima, T Expression of tegument protein pp65 of human cytomegalovirus (CMV) and its application to the analysis of viral-specific cellular immunity in CMV-infected individuals Arch Virol 147 2405-2417 (2002)
 - 21 Sugiura, S, Yoshikawa, T, Nishiyama, Y, Morishita, Y, Sato, E, Hattori, T, and Nakashima, Detection of human cytomegalovirus DNA in perilymph of patients with sensorineural hearing loss using real-time PCR J Med Virol 69 72-75 (2003)
 - 22 Kudo, A, Fujita, M, Kiyono, T, Kuzushima, K, Sugaya, Y, Izuta, S, Nishiyama, Y, and Tsurumi, T Reactivation of lytic replication from Epstein-Barr virus latently infected B-cells occurs with high S-phase CDK activity while inhibiting cellular DNA replication J Virol 77 851-861 (2003)
 - 23 Kawaguchi, Y, Kato, K, Tanaka, M, Kanamori, M, Nishiyama, Y, and Yamanashi, Y Conserves protein kinases encoded by herpesviruses and a cellular protein kinase cde2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1 a J Virol 77 2359-2368 (2003)
 - 24 Kimura, H, Ito, Y, Futamura, M, Ando, Y, Hara, S, Sobajima, H, Nishiyama, Y, and Morishima, T Relapse of neonatal herpes simplex virus infection Arch Dis Child, in press
 - 25 Takakuwa, T, Goshima, F, Nozawa, N, Yoshikawa, T, Kimura, H, Nakao, A, Nawa, A, Kurata, T, Sata, T, and Nishiyama, Y Oncolytic viral therapy for peritoneally disseminated tumor using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant in immunocompetent mice ArchVirol, in press
 - 26 Nozawa, N, Daikoku, T, Koshizuka, T, Yamauchi, Y, Yoshikawa, T, and Nishiyama, Y Subcellular localization of UL51 protein of herpes simplex virus type 1 and role of palmitoylation in Golgi targeting J Virol, in press
 - 27 Kimata, H, Takakuwa, H, Goshima, F, Teshigahara, O, Nakao, A, Kuratam T, Sata, Tetsutaro and Nishiyama, Y Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex virus Hepato-Gastroenterogy, in press
 - 28 Yoshikawa, T, Akimoto, S, Nishimura, N, Ozaki, T, Ihira, M, Ohashi, M, Morooka, M, Suga, S, Asano, Takemoto, M, and Nishiyama, Y Evaluation of active human herpesvirus 6 infection by reverse transcription-PCR J Med Virol, in press

H 知的財産権の出願 登録状況

特になし

6 カニクイザルにおける MHC class I の解析

分担研究者 山田章雄 (国立感染症研究所獣医科学部長)

共同研究者 宇田晶彦 (国立感染症研究所協力研究員)

研究要旨 カニクイザルの MHC 解析を昨年度に引き続き行った。その結果 Mafa-A01 ~Mafa-A14 の存在を明らかにしてきた。各 Allele を簡易的に検出するために Allele 特異的なプライマーを設計し、各個体より得た cDNA を鋳型とし数種類のプライマーを混合したマルチプレックス PCR-SSP を確立した。

A 研究目的

MHC class I 複合体は遺伝的多型性を有する Heavy chain と単一の $\beta 2$ -microglobulin (β_2M) と抗原ペプチドで構成されている。この複合体が細胞性免疫を担う CD8 陽性 T 細胞 に抗原を提示し、CD8 陽性 T 細胞の活性化を促す。MHC class I が提示する抗原断片は、通常 8-10 残基のポリペプチドで、各々の Allele により特異的なアンカーモチーフが決まっている。カニクイザルやアカゲザルを含む霊長類の MHC の遺伝子解析も、近年の目覚ましい分子生物学における進歩により、進められている。AIDS モデルとして多用されているアカゲザルでは、既に MHC class I A, B, E, I, G, AG の存在があきらかにされ、特に A locus と SIV 感染効率の関係が多数報告されている。カニクイザルは、移植実験、SIV 感染実験、HTLV-1 感染実験の動物モデル、ワクチン検定、サイトカインの役割の探究手段として用いられている。しかしカニクイザルの MHC 研究は少数の報告か有るに過ぎない。

そこで、本研究ではカニクイザルにおける MHC class I を詳細に解析し、特定の MHC class I のタイプを簡易的に判定する系を確立する事にある。

B 研究方法

動物 当センターで飼育されていた 1 家系 8 頭のカニクイザルと、ランダムに選抜した

32 頭のカニクイザルについて調査を行った。

DNA と cDNA カニクイザルの PBMC から mRNA を抽出した。この mRNA を cDNA に変換した後、A locus 特異的なプライマーで RT-PCR を行ない、MHC class I A locus を増幅した。得られた産物を pcDNA3 1(-)ヘクターに導入し、クローン化した。

Primer アカゲザルの MHC class I A の遺伝子配列を参考にし、保存されている領域に基づいてプライマーを作成した。又クローニングを行い易くする為に各々のプライマーに予め HindIII と EcoRI のクローニングサイトを設定した。

Mafa-A-s
5'-GAC AGC TTA GAA TCT CCC CAG
ACG CCG AGG ATG-3'

Mafa-A-a
5'-GCG AAT TCC CTC ACA AGG CAG
CTG TCT CA-3'

シークエンスには、T7 プロモータープライマーと BGH-R プライマーを用いた。

得られたカニクイザルのシークエンス情報を基に、MHC class I A locus の Allele を特異的に検出するための PCR-SSP プライマーを設定した。

A02-s
5'-CGTGC GGTTTCGACAGCC-3'

A03-s
5'-AACACACGGATCATGAAGGCG-3'

A04-s
5'-TCCGCGGGTATGACCAGC-3'

A07-s
5'-GGCTCCCACTCCATGAGGTATTTT-3'

A11-s
5'-CCTGCGGAGATCACACTGACA-3'

A14-s
5'-CGGACCTGGGGGCTCAA-3'

IA-a
5'-CCCTGGGCACTGTCCTGCTT-3'

IA-a Primer は、カニクイザルのA locus の塩基配列と、Watkins らにより報告されているアカゲザルの A 及び B locus の塩基配列より、A locus を特異的配列を Primer の下流に含むように設定した。

Primer Set-1 は、IA-aプライマーと A04-s A08-s A11-s プライマーを混合し、Primer Set-2 は、IA-aプライマーと A07-s A03-s A14-sプライマーを混合した。

PCR-SSP 各個体より得た cDNA を鋳型とし、ExTaq ポリメラーゼと Primer Set-1 および Primer Set-2 を用いて各 Allele 特異的 PCR 産物を検出した。反応条件は、94℃30 秒、70℃又は 72℃30 秒、72℃30 秒を 1 サイクルとし、30 サイクルの PCR を行なった。

C 研究結果

MHC class I A locus に付いて 1 家系 8 頭を調査した結果、9234 [Mafa-A11]、8225[Mafa-A07, Mafa-A14]、5117[Mafa-A11, Mafa-A14]、4045[Mafa-A11, Mafa-A14]、5076[Mafa-A11, Mafa-A14]、2010[Mafa-A03]、3005[Mafa-A03, Mafa-A14]、1102[Mafa-A11] から 4 種類の Allele が検出された。また、各個体から検出された同一 Allele の変異率は 0.6%未満だった。

- 1 ランダムに選抜した 32 頭のカニクイザルを同様に A locus について調査した結果新たに 10 種類の Allele が検出された。
- 2 Primer Set-1 を用いて PCR-SSP を行った結果、4 頭 (5117, 4045, 5076, 1102) のカニクイザルから A11 が検出された。
- 3 Primer Set-2 を用いて PCR-SSP を行った結果 2 頭(3005, 2010)から Mafa-A03 か、1 頭 (1102) から Mafa-A07 が、5 頭 (8225, 5117, 5076, 4045, 3005) から Mafa-A14 が検出された。

D 考察

ヒトの動物モデルとして移植等の研究にカニクイザルは用いられているか、MHC に関する研究は殆ど行なわれていない。そこで本研究では、カニクイザルの MHC class I 遺伝子の塩基配列を決定し、PCR-SSP により Allele タイピングを行なうことを目的とした。

1 家系 8 頭のカニクイザルとランダムに選抜した 32 頭のカニクイザルの PBMC より得た cDNA から A locus を特異的に増幅した後 Plasmid に挿入し、大腸菌を用いてクローン化した。各個体から検出した Allele を 5% 内の差異を同一 Allele とした場合、塩基レベルでは 9 種類に区分され、アミノ酸レベルでは 14 種類に分類された。そこで、生物活性のモチーフをより反映すると思われるアミノ酸レベルの Allele 分類を用い、各々の Allele の内最も平均的な個体の Allele をコンセンサス配列とし、Mafa-A01 ~ Mafa-A14 を命名した。

Allele を簡易的に検出するために Allele 特異的なプライマーを設計し、各個体より得た cDNA を鋳型とし数種類のプライマーを混合したマルチプレックス PCR-SSP を確立した。シーケンス解析に用いた 1 家系 8 頭の内、7 頭に関してマルチプレックス PCR-SSP 解析を行った結果、6 頭 (8225, 5117, 4045, 5076, 2010, 1102, 3005) は、シーケンス解析と完全に一致した。1 頭 (1102) はマルチプレックス PCR-SSP 解析より新たに Mafa-A07 が検出された。この差異は、シーケンス解析に用いた A locus 特異的なプライマーか、1102 の Mafa-A07 を増幅できなか

った事に由来すると考えられる。

以上の結果より、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証明された。

今後の課題として、より多くのカニクイザルのMHC class I A locus を解析し、Alleleの塩基配列の精度を高める必要がある。その結果、マルチプレックスPCR-SSPの精度の向上に寄与すると考えられる。また、B locus に付いても今後詳細に解析し、A locus と合わせたハプロタイプとして解析する必要がある。

E 結論

カニクイザルクラス IMHC の A 座の Allele を簡易的に検出する方法として、数種類の Allele 特異的なプライマーを用いたマルチプレックス PCR-SSP を確立した。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Uda, A, Tanabayashi, K, Mukai, R, Terao, K, and Yamada, A Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) J Med Primatol (in press)

H 知的財産権の出願 登録状況

特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Matano T, Kano M, Takeda A, Nakamura H, Nomura N, Furuta Y, Shioda T, Nagai Y	No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model	AIDS		in press	
Kimura H, Ito Y, Futamura M, Ando Y, Hara S, Sobajima H, Nishiyama Y, Morishima T	Relapse of neonatal herpes simplex virus infection	Arch Dis Child		in press	
Takakuwa T, Goshima F, Nozawa N, Yoshikawa T, Kimura H, Nakao A, Nawa A, Kurata T, Sata T, Nishiyama Y	Oncolytic viral therapy for peritoneally disseminated tumor using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant in immunocompetent mice	Arch Virol		in press	
Matano T	Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials challenges against the chronic disease	Current Topics in Virology		in press	
Kimata H, Takakuwa H, Goshima F, Teshigahara O, Nakao A, Kuratam T, Sata T, Nishiyama Y	Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex virus	Hepato-Gastro-enterogy		in press	
Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A	Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>)	J Med Primatol		in press	
Yoshikawa T, Akimoto S, Nishimura N, Ozaki T, Ihira M, Ohashi M, Morooka M, Suga S, Asano Y, Takemoto M, Nishiyama Y	Evaluation of active human herpesvirus 6 infection by reverse transcription-PCR	J Med Virol		in press	

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Nozawa N, Daikoku T, Koshizuka T, Yamauchi Y, Yoshikawa T, Nishiyama Y	Subcellular localization of UL51 protein of herpes simplex virus type 1 and role of palmitoylation in Golgi targeting	J Virol		in press	
Enomoto K, Enomoto Y, Ishii Y, Araie M, Kanda T	Genes up- and down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a	BBRC		in press	2003
Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Nakagawa S, Kawana K, Takeoka A, Yaegashi N, Iwasaka T, Kanazawa K, Taketani Y, 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 Med Virol		in press	2003
Ishii Y, Tanaka K, 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
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	162	381-389	2003
Sugiura S, Yoshikawa T, Nishiyama Y, Morishita Y, Sato E, Hatton T, Nakashima T	Detection of human cytomegalovirus DNA in perilymph of patients with sensorineural hearing loss using real-time PCR	J Med Virol	69	72-75	2003
Kudo A, Fujita M, Kiyono T, Kuzushima K, Sugaya Y, Izuta S, Nishiyama Y, Tsurumi T	Reactivation of lytic replication from Epstein-Barr virus latently infected B-cells occurs with high S-phase CDK activity while inhibiting cellular DNA replication	J Virol	77	851-861	2003

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Kawaguchi Y, Kato K, Tanaka M, Kanamori M, Nishiyama Y, Yamanashi Y	Conserves protein kinases encoded by herpesviruses and a cellular protein kinase cde2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1 δ	J Virol	77	2359-2368	2003
Inagaki-Ohara K, Kawabe T, Hasegawa N, Hashimoto N, Nishiyama Y	Critical involvement of CD40 in protection against herpes simplex virus infection in a murine model of genital herpes	Arch Virol	147	187-194	2002
Tanaka N, Kimura H, Hoshino Y, Nishikawa K, Kojima S, Nishiyama Y, Morishima T	Expression of tegument protein pp65 of human cytomegalovirus (CMV) and its application to the analysis of viral-specific cellular immunity in CMV-infected individuals	Arch Virol	147	2405-2417	2002
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
Yamauchi Y, Goshima F, Yoshikawa T, Nozawa N, Koshizuka T, Nishiyama Y	Intercellular trafficking of herpes simplex virus type 2 UL14 deletion mutant proteins	BBRC	298	357-363	2002
Ashida M, Ueda M, Kunisada M, Ichihashi M, Terai M, Sata T, Matsukura T	Protean manifestations of human papillomavirus type 60 infection on the extremities	Br J Dermatol	146	885-890	2002
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	26	268-271	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Umemura M, Nishimura H, Yajima T, Wajjwalku W, Matsuguchi T, Takahashi M, Nishiyama Y, Makino M, Nagai Y, Yoshikai Y	Overexpression of interleukin 15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome	FASEB J	16	1755-1763	2002
Yamuchi Y, Wada K, Goshima F, Daikoku T, Ohtsuka K, Nishiyama Y	Herpes simplex virus type 2 UL14 gene product has heat shock protein (HSP)-like functions	J Cell Sci	115	2517-2527	2002
Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzaki Y, Ami Y, Terao K, Nagai Y	Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques	J Gen Virol	83	1377-1386	2002
Mori I, Goshima F, Imai Y, Kohsaka S, Sugiyama T, Yoshida T, Yokochi T, Nishiyama Y, Kimura Y	Olfactory receptor neurons exhibit blockage of the dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by inducing self-apoptosis upon infection	J Gen Virol	83	2109-2116	2002
Murata T, Goshima F, Takakuwa H, Nishiyama Y	Excretion of herpes simplex virus type 2 glycoprotein D into culture medium	J Gen Virol	83	2791-2795	2002
Kano M, Matano T, Kato A, Shioda T, Nagai Y	Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector Jpn	J Infect Dis	55	59-60	2002
Yoshikawa T, Asano Y, Ihira M, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Kuto K, Horibe K, Kojima S, Kato K, Matsuyama T, Nishiyama Y	Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients clinical features and risk factors	J Infect Dis	185	847-853	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Yoshikawa T, Ihira M, Asano Y, Tomitaka A, Suzuki K, Matsunaga K, Kato Y, Hiramitsu S, Tanaka N, Kimura H, Nishiyama Y	Fatal adult case of severe lymphocytopenia associated with reactivation of human herpesvirus 6	J Med Virol	66	82-85	2002
Yoshikawa T, Asano Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y	Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis	J Med Virol	66	497-505	2002
Kimura H, Ito Y, Futamura M, Ando Y, Yabuta Y, Hoshino Y, Nishiyama Y, Morishima T	Quantitation of viral load in neonatal herpes simplex virus infection and comparison between type 1 and type 2	J Med Virol	67	349-353	2002
Ohashi M, Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Enomoto Y, Suga S, Tada S, Sakui H, Iida K, Saito Y, Nishiyama Y, Asano Y	Reactivation of human herpesvirus 6 and 7 in pregnant woman	J Med Virol	67	354-358	2002
Ihira M, Yoshikawa T, Ishiji J, Ohashi M, Enomoto Y, Suga S, Iida K, Saito Y, Nishiyama Y, Asano Y	Serological analysis of human herpesvirus 6 and 7 in patients with coronary artery disease	J Med Virol	67	543-537	2002
Koshizuka T, Goshima F, Takakuwa H, Nozawa N, Daikoku T, Koiwai O, Nishiyama Y	Identification and characterization of the UL56 gene product of herpes simplex virus type 2	J Virol	76	6718-6728	2002
Ando Y, Terao K, Naita M, Oguchi Y, Sata T, Iwasaki T	Quantitative analyses of cytomegalovirus genome in aqueous humor of patients with cytomegalovirus retinitis	Jpn J Ophthalmol	46	254-260	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Murata T, Goshima F, Yamauchi Y, Koshizuka T, Takakuwa H, Nishiyama Y	Herpes simplex virus type 2 US3 blocks apoptosis induced by osmotic shock	Microb Infect	4	707-712	2002
Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Honbe K, Tanaka N, Kimura H, Kojima S, Kato K, Matsuyama T, Nishiyama Y, Asano Y	Monitoring of active HHV-6 infection in bone marrow transplant recipients by real time PCR and plasma PCR	Microbiol Immunol	46	701-705	2002
Murata T, Goshima F, Nishizawa Y, Daikoku T, Takakuwa T, Ohtsuka K, Nishiyama Y	Phosphorylation of cytokeratin 17 by herpes simplex virus type 2 US3 protein kinase	Microbiol Immunol	46	707-719	2002
Nishiyama Y, Murata T	Antiapoptotic protein kinase of herpes simplex virus	Trend Microbiol	10	105-107	2002
Mori S, Murakami M, Takeuchi T, Kozuka T, Kanda T	Rescue of AAV by antibody-induced Fas-mediated apoptosis from viral DNA integrated in HeLa chromosome	Virology	301	90-98	2002