

療域に達するレベルの血中濃度が得られたか、残る1頭では発現が検出できなかった。その理由としては、発現が認められなかった個体のみで投与前の1型キャプントに対する抗体価が陽性(1000倍希釈まで)であったことの影響が考えられる。この個体では結局ヒト型第IX因子の発現も、これに対する抗体産生も認められなかった。尚、5型由来のヘクターではヒト型第IX因子の発現は殆ど認められなかったか、対応する抗体は産生されており、1型又は2型の場合とは異なる傾向を示していた。5型の場合には抗原提示から抗体産生に至る過程が効率よく行われるような機序が働いているのかもしれない。1型を用いた結果は治療域に達していることから、実際の臨床研究において米国で使用された2型由来のヘクターを1型に取り替えることで新たに臨床研究を行うことが有望視される。この場合、前臨床試験としては長期的な効果及び安全性の検証が課題となる。また、1型に対して高い抗体価を有する場合にどのような治療を行っていくかについても検討が必要である。

第VIII因子の発現に際してはSCIDでは問題はなかったか、第VIII因子ノックアウトマウスを用いた場合には免疫寛容を誘導しているにもかかわらず高い抗体価が認められた。第VIII因子を重鎖と軽鎖に分けて導入することはAAVを用いる際には魅力的なアプローチであるか、お互いに会合していない重鎖又は軽鎖単独の分子を大量に産生する結果になるものと予想されることから、これらのいずれかもしくは両方が強力な免疫原性を示している可能性がある。その意味ではより免疫への影響が少ないと考えられる肝臓を標的組織として選ぶことや、免疫抑制薬の併用などが今後の課題と考えられる。

血友病Bに対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、骨格筋を標的として2型AAVを用いた方法では発現効率が不十分であり、実用レベルに到達しなかったものと考えられる。肝臓を標的とする投与方法についても十分な効果は認められていない。また、より患者数の多い血

友病Aの場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかりそうである。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまた初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に霊長類モデルなどにおいて治療遺伝子を搭載したAAVヘクターを用いて検証を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果が得られるものと期待される。

#### E 結論

AAVを用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響すると思われる因子を解析し、肝臓及び骨格筋の各々において*in vivo*における最適な条件を見出した。また、これらの条件を用いることで霊長類モデルにおいても治療域に達する効果を認めた。今後更に免疫学的な検討が必要であるが、以上の技術的な進歩が血友病の治療に真に役立つ遺伝子治療法の開発に通じることか期待される。

#### F 健康危険情報

該当なし

#### G 研究発表(原著論文)

- 1) Shimpō M, Ikeda U, Maeda Y, Takahashi M, Miyashita H, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Takizawa T, Shibuya M, Ozawa K, and Shimada K AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model *Cardiovasc Res* 53, 993-1001 (2002)
- 2) Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis *J Neurosci* 22, 6920-8 (2002)
- 3) Okada T, Shimazaki K, Nomoto T,

Mizukami H, Monahan J, Ozawa K, and Kawai N AAV mediated gene transfer for gene therapy of ischemia-induced neuronal death Methods Enzymol 346, 378-393 (2002)

4) Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Lijun W, Lu Y, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A,

Muramatsu S, Nakano I, Ozawa K Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain Methods 28, 237-47 (2002)

H 知的所有権の出願・登録状況  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

イヌモデルを用いた生体部分肝臓移植と  
第3世代レンチウイルスを用いた遺伝子治療の基礎研究

分担研究者 吉岡 章 奈良県立医科大学

研究要旨, 血友病A患者の cure を目指して、イヌモデルを用いた生体部分肝臓移植と第3世代レンチウイルスを用いた遺伝子治療の基礎研究を行った。現時点で肝移植は血友病Aの cure という観点から最も確実な方法と考えられる。そこで、昨年度血友病A イヌモデルを用いて血友病の治療を目的に、同胞大から自己肝温存生体部分肝移植（APOLT）を行い、移植肝由来の第Ⅷ因子の産生を確認した。移植肝は肉眼的にも顕微鏡的にもほぼ正常組織であった。これに引き続いて成熟肝細胞移植の検討を開始した。また、クラゲ GFP/イヌ第Ⅷ因子遺伝子を担った第3世代レンチウイルスを作成し、マウスを使って遺伝子導入実験を行った。正常マウス実験系では肝臓を標的に種々の導入方法を試みたが、門脈ルートで肝臓に GFP 陽性細胞を同定し得た。第Ⅷ因子ノックアウトマウスを用いた実験系では、門脈ルートで血中第Ⅷ因子活性が最高値 34%、抗原量 3.6%と、第Ⅷ因子遺伝子産物として同定することができた。

A. 研究目的

血友病Aは、X染色体に存在する血液凝固第Ⅷ因子遺伝子の異常に起因する先天性凝固障害性の出血性疾患である。現在の治療法は、ヒト血漿由来あるいはリコンビナントの第Ⅷ因子濃縮製剤を出血時あるいは予防的に、不定期あるいは定期的に静脈内投与し、止血を計る、という補充療法を主体とする血友病の care である。今後さらに進めた血友病の cure をめざすという観点から、イヌモデルを用いた生体部分肝移植、これに続く成熟肝細胞移植と、マウスおよびイヌモデルを用いた第3世代レンチウイルスによる遺伝子治療についての可能性を検討する。

近年、ES細胞、骨髄幹細胞や肝幹細胞を用いた幹細胞への分化の研究が盛んに行われているか、成熟肝細胞移植についてはあまり検討されていない。そこで、成熟肝細胞を移植し、臓器新生、肝新生の可能性を検討する。

また、ウイルスヘクターを用いた遺伝子治療については、2002年は種々の問題が明確になった。しかし、治療法のない疾患などに対しては遺伝子治療の risk より merit の方が大きいと考えられる場合もあり、またウイルスヘクターの改良が進み、これらの問題は克服されるであろうことを期待する。昨年度に引き続き第3世代レンチウイルスを用いて、第Ⅷ因子ノックアウトマウス（KOマウス）の肝臓をターゲットにした遺伝子導入について基礎研究を進める。

B. 研究方法

1) イヌ生体部分肝移植と肝細胞移植  
(奈良医大消化器外科肝移植グループと共同研究)

昨年、血友病A大に対して同胞大から自己肝温存生体部分肝移植を行ったか、その剖検後の移植肝の病理学的検討を追加する。

肝細胞移植については、マウスの肝臓から初代肝細胞を培養 増殖させ同系統のマウスに肝細胞移植する。具体的には、C57BL/6通常マウスから、肝細胞をコラゲナーゼ法で分離し、初代肝細胞として培養増殖させ、KOマウスの種々の部位に移植し、KOマウスの経過を観察するものである。

## 2) 遺伝子治療

第3世代レンチウイルスヘクターにCMVプロモーター制御下にGFP(クラゲ由来の蛍光蛋白)または肝細胞特異的プロモーター制御下にBトメインを欠失させたイヌ第Ⅷ因子遺伝子をそれぞれ組み込んだ組換えウイルス(rCS-CGまたはrCS-SCP)を作成した。昨年は、これらの組換えウイルスを各種培養細胞に感染させ、rCS-CGを感染させた培養細胞中にウイルス量依存的にGFPの発現を、rCS-SCPを感染させた培養細胞上清中に組織特異的にイヌ第Ⅷ因子の活性と抗原の発現を確認した。また、肝臓を標的にした遺伝子導入のため、通常のマウス(C57BL/6)にrCS-CGを10E8TUずつ尾静脈 腹腔内 肝被膜下から投与し、2週間後肝臓の凍結切片を作成し蛍光顕微鏡で観察したか、GFPの発現は肝臓被膜下から投与したときのみかろうして確認できたか、尾静脈 腹腔内投与では確認できなかった。なお、通常のマウスにrCS-SCPを同様に3種類のルートから導入したか、いずれもイヌ第Ⅷ因子の抗原を確認することはできなかった。このことをふまえて、本年は自治医大小林先生から門脈内投与法を御教授いただき、自治医大坂田先生からKOマウスを分与していただき、肝臓を標的にした実験を行った。昨年と同様、GFPの観察は蛍光顕微鏡で、イヌ第Ⅷ因子活性はヒト第Ⅷ因子欠乏血漿を用いた凝固1段法で、イヌ第Ⅷ因子抗原はAsserachrom VIII Ag kit (Diagnostica Stago)を用いたELISA法で、それぞれ定量することによりその発現を評価した。

## C 研究結果・考察 結論・今後の展望

### 1) イヌ生体部分肝移植および肝細胞移植 (奈良医大消化器外科肝移植グループと共同研究)

昨年、血友病A大に対し同胞大から自己肝温存生体部分肝移植を行い、46日間の生存期間を得た。移植肝からの第Ⅷ因子産生は移植24時間後から認められ、補充療法は不要となった。第Ⅷ因子の最高値は60%、最低値は3%、死亡前は32%であり、第Ⅷ因子に対するインヒビターは検出されなかった。観察期間中、明らかな出血症状も認めなかった。死因は明らかではないが、死亡半月前からいらい瘦か著明であり、Tacrolimusによる副作用が疑われた。剖検では左肺に炎症所見を認めたものの、移植肝自体は肉眼的にも顕微鏡的にもほぼ正常組織であった。肝移植後、ALTは一過性に上昇したが、その後徐々に低下し、正常化した。総ビリルビン値とASTは経過中、ほぼ正常範囲を推移した。以上から、血友病の自己肝温存生体部分肝移植(APOLT)は手術手技および止血管理の面からも技術的には充分可能であることが明らかとなった。今後、recipient大に負担を負わさない免疫抑制療法の改善などさらに検討が必要と思われた。

次にマウスモデルでの肝細胞移植を検討した。マウスの肝臓からの初代肝細胞を培養増殖させ、同系統のマウスに肝細胞移植を行うものである。しかし、マウス初代肝細胞培養の技術的困難さともとの肝臓への導入効率の問題があり今年度はほとんど進展していない。そこで、成熟肝細胞を肝臓以外の部位に移植することによって、肝臓という臓器新生を計るという方向で検討を開始した。臓器新生を行う肝臓以外の部位として、腎臓被膜下や腹腔内があげられるが、移植肝細胞に通常適さないと考えられている皮下に成熟肝細胞を移植し、生着させることを目標とする。生着すれば、血友病治療においては、自己肝細

胞採取 遺伝子改変 皮下への移植という流れて治療が可能と考えられ、万一移植肝細胞にトラブルが起こっても容易に切除できる。

## 2) 第3世代レンチウイルスを用いた遺伝子治療

自治医大小林英司先生に門脈内投与法を御教授いただき、10E8TUのrCS-CGを2尾の通常マウスの門脈内に投与し、2週間後の肝臓凍結切片において、1視野数個のGFP陽性細胞を確認できた。次に、10E8TUのrCS-SCPを自治医大坂田洋一先生から分与して頂いた第Ⅷ因子ノックアウトマウス(KOマウス)6尾に門脈内ルートで投与し、8週まで毎週眼窩静脈叢から採血し、第Ⅷ因子活性(凝固1段法)と抗原(ELISA法)を測定した。第Ⅷ因子活性については、第2週目で最高34%の活性を示し、8週目までおおよそ5-10%程度の活性を維持した。第Ⅷ因子抗原については、2週目で最高36%、おおよそ1%のレベルを8週間維持した。第Ⅷ因子活性と抗原の不均衡の原因として、一つは採血時の組織液の流入という純粋にテクニカル問題と、イヌ第Ⅷ因子分子がヒト第Ⅷ因子分子に比べて一分子当たりの活性が高い可能性が示唆された。ベセスダ法でインヒビターの存在を検討したが、いずれのKOマウスにおいてもインヒビターの存在はなかった。また、レンチウイルスの導入に細胞周期の関与が示唆されているため、部分肝切除を一部行ったが、現時点での評価は困難であった。

第3世代レンチウイルスを用いて、イヌ第Ⅷ因子遺伝子を門脈ルートでKOマウスの肝臓に導入し、血流中にイヌ第Ⅷ因子活性抗原を確認した。さらに導入効率を上げるため、肝部分切除の評価 ウイルス骨格に種々のシスエレメントを搭載した組換えウイルスを作成中である。また、次期3年間にKOマウスから数匹の血友病犬に同様の遺伝子治療を行う予定である。

## D 結語

- 1 イヌ生体部分肝臓移植(APOLT)を行い、移植肝由来の第Ⅷ因子産生を確認した。移植肝自体は肉眼的にも顕微鏡的にもほぼ正常組織であった。引き続き、成熟肝細胞移植の検討を開始した。
- 2 第3世代レンチウイルスを用いて、イヌ第Ⅷ因子遺伝子を門脈ルートで第Ⅷ因子KOマウスの肝臓に導入し、血流中にイヌ第Ⅷ因子活性抗原を確認した。

## E 研究発表

- 1) 新井盛夫、福武勝幸、吉岡 章、瀧 正志、嶋 緑倫、血友病補充療法の方方向性血栓止血誌 13(1) 97-122、2002
- 2) 嶋 緑倫 血友病のインヒビター 生物試料分析 25(2) 217-226、2002
- 3) C Hough, S Kamisue, C Cameron, C Notley, S Tinlin, A Giles and D Lilliecrap Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A Similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia Thromb Haemost 87 659-65, 2002
- 4) M Shima, T Matsumoto, K Fukuda, Y Kubota, I Tanaka, K Nishiya, A Giles and A Yoshioka The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A patients with very low levels of factor VIII activity (FVIII C) Thromb Haemost 87 436-41, 2002
- 5) K Nogami, M Shima, K Nishiya, Y Sakurai, I Tanaka, J C Giddings, E L Saenko and A Yoshioka Human

factor VIII inhibitor alloantibodies with a C2 epitope inhibit factor Xa-catalyzed factor VIII activation A new anti-factor VIII inhibitory mechanism Thromb Haemost 87 459-65, 2002

- 6) J Ori, I Tanaka, Y, Kubota, T Matsumoto, S Kamisue, M Shibata, M Shima, D Lillcrap and A Yoshioka  
The assessment of carrier status of canine hemophilia A in a hemophilic colony 血栓止血誌 13(3) 252-258、2002
- 7) 吉岡 章 血友病治療-21世紀の展望-日本小児科学会雑誌 106(5) 631-638、2002

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

治療に適した SIV ベクターのデザインと遺伝子導入効率および発現効率の向上

分担研究者 長谷川 護 株式会社ディナベック研究所

研究要旨 これまで開発してきたサル免疫不全ウイルス（SIV）をベースにしたレンチウイルスベクターの骨格配列に細胞への導入効率を高める SIV ゲノムに含まれるセントラルポリプリントラクト（cPPT）配列、および導入遺伝子の発現効率を高めるウッドチャック肝炎ウイルス由来の転写後調節因子（WPPE）配列を挿入した。これによって緑色蛍光蛋白質（GFP）遺伝子をマーカーに用い、293T 細胞に遺伝子導入実験を行った結果、cPPT 配列の搭載により遺伝子導入効率が、WPPE 配列の搭載により遺伝子発現効率か上昇したことが明らかになった。さらに両者を同時搭載することにより従来の SIV ベクターに比べて機能力価で約 10 倍ベクターの生産性を上昇させることに成功した。さらに SIV ベクターより vif、vpr、tat といった配列を取り除き、rev 遺伝子を別のプラスミドに搭載し生産をする、いわゆる第 3 世代化にも成功した。その後、詳細な生産条件の検討によって従来と変わらない力価の生産性が得られた。

A 研究目的

レンチウイルスベクターの特徴は細胞周期によらず細胞に遺伝子導入する点である。また、挿入可能な遺伝子のサイズも比較的大きいため、血友病 A の遺伝子治療の最適なベクターの候補となっている。しかし、血友病 A の治療効果をもたらすためには、標的細胞に遺伝子を導入し、血中内に十分量の第Ⅷ因子を放出させる必要がある。そのためには効率のよい遺伝子導入と遺伝子発現が重要になる。そこでこれまでに報告のある 2 つの因子を導入することで SIV ベクターの性能の向上を図った。一つはレトロウイルスゲノ

ムに含まれる cPPT と呼ばれる配列で、この配列によって逆転写され、作製された DNA の構造がコンパクトになり、核内に進入しやすくなると考えられている。従ってこの配列を含むベクターは、染色体内に取り込まれる確率が上昇する、即ち遺伝子導入効率の改善が期待される。また、肝炎ウイルスに含まれる転写後調整因子（PR E）配列は RNA の安定性を促進するといわれ、特にウッドチャック肝炎ウイルスの配列（WPPE）はその機能が高い。この配列を遺伝子導入ベクターに組み込むことで導入遺伝子の発現効率の上昇が期待される。

昨年度までの検討で、血友病Aの遺伝子治療用にヒト第Ⅷ因子の遺伝子（Bドメイン欠失型）を搭載したSIVベクターを複製し *in vitro* で細胞に感染させたところ、培養上清中への凝血活性を持つ因子の放出が確認された。しかし、実際の臨床応用において遺伝子治療の効果は、体内での遺伝子導入効率と、発現効率に左右される。本年度の研究は、前述のエレメントを既存のベクターに組み込むことでベクター性能を向上させ、臨床効果を高める工夫である。

また一方でヒト免疫不全ウイルス（HIV）ベクターで先行している第3世代ベクターの生産系をSIVベクターに移行し、ベクターの安全性を高めた。

## B 研究方法

これまで開発してきたSIVベクターの基となるSIVagmTYO-1株ゲノムよりcPPT配列(130bp)を遺伝子導入プラスミド上の内部プロモーターの上流部分に挿入した。また、一方WPRE配列(600bp)は同じく遺伝子導入プラスミド上の導入遺伝子と3'側LTRとの間に挿入した。また、cPPT、WPRE両者を挿入したプラスミドも作製した。従来のものでこれらの遺伝子導入用プラスミドをこれまでの生産方法に準じて、GFPを搭載したSIVベクターを作製した。ベクターの粒子力価は生産時の培養上清よりベクターRNAを調整し、ドットプロット法により測定した。また、遺伝子導入効率、発現効率は293T細胞にベクター上清を感染させ2日後に細胞の蛍光観察およびフローサイトメーターによる解析を行い蛍光の陽性率および蛍光

強度の強さを測定した。

また、ベクターの機能力価も従来の方法である上清を希釈して293T細胞に感染させ、陽性細胞の数をカウントする方法によって測定した。

このcPPT、WPRE両者を搭載したGFPベクターを用いて、マウス神経細胞、カニクイザル骨髄CD34陽性細胞に感染させ導入効率を調べた。

このcPPT、WPRE両者を搭載した遺伝子導入プラスミドを遺伝子を挿入しやすいように改変し、LacZ遺伝子、ヒト第Ⅷ因子遺伝子を搭載した新規プラスミドも調製し、新型ベクターを生産した。

これまでのSIVベクターは、LTRに挟まれた導入遺伝子を含む遺伝子導入プラスミド、ウイルスの構成に必要なgag、polそれにrevを発現させるパッケージングプラスミド、ベクターのエンベロープとなるVSV-Gを発現させるVSV-Gプラスミドの3者を同時に293T細胞に取り込ませ、細胞内でベクター粒子を再構成させている。パッケージングプラスミドより不要と思われるtat、vpr、vif遺伝子を取り除き、さらにrevは別の発現ベクターに分離して搭載し、四者のプラスミドの導入により作製した。

## C 研究結果

従来型SIVベクター（cPPT、WPRE非搭載）、cPPT搭載SIVベクター、WPRE搭載SIVベクター、cPPT-WPRE搭載ベクターによって、293T細胞にGFPを発現させた結果、期待通り、cPPT搭載により導入効率が上昇し、WPRE搭載により発現効率が上昇した。また両者の搭載によ



り、相乗効果が得られ、導入効率と発現効率が飛躍的に上昇した。GFP 搭載 SIV ベクターの場合、機能力価は粒子力価の約 100 分の一と大きく乖離していたが、cPPT と WPRE を両方搭載したベクターではその乖離が 10 分の一まで減少した。新型ベクターの生産性は従来型と粒子力価では差がなかったことから、単純に導入される粒子の生産性が 10 倍上昇したと考えられる。また、新型ベクターによって神経細胞、造血細胞への導入効率の上昇も確認された。

また、搭載遺伝子の交換も容易な形のプラスミドも作製に成功し、LacZ 遺伝子のみならず治療遺伝子であるヒト第Ⅷ因子（B 領域欠失型）遺伝子の搭載にも成功し、粒子力価を調べたところ、他のベクターと同等の生産性を示した。

パッケージングプラスミドを改良し、SIV ベクターの第三世代化を試みた結果、293T 細胞を用いた遺伝子発現確認ではこれまでと同等の発現効率を示した。一方、生産性では生産時に使用するプラスミドが 1 種類増えたためと思われる、若干の生産性がみられた。しかし、プラスミド比を調製することにより、粒子力価で  $10^8$  という第二世代とほとんど変わらない効率での生産レベルを得ることに成功した。

#### D 考察

これまで、レンチウイルスベクターによる標的細胞への高率での遺伝子導入が期待されてきたが、実際臨床においては、*vivo* 環境での遺伝子導入効率の低下にともなう治療遺伝子産物である凝血因子の血中濃度不足が問題となる。本研究によ

り、導入効率と発現効率の上昇は臨床にむけた大きな改善となり、今後の治療への期待が膨らんだ。

しかし、制御不可能な搭載染色体への遺伝子の取り込み、免疫等による治療因子の不活性か物質の出現、搭載遺伝子の不活化による治療効果の減退等、克服すべき課題はまだある。

他方で安全性の観点から、複製可能な粒子の混入を防ぐことが課題であった。Rev 遺伝子の分離、*vif*、*tat*、*vpr* といった遺伝子の除去によって、相同性を低下させ、組換えによる複製可能粒子の混入の可能性を抑えることができたと考えられる。現在のところ、高感度で汎用性のある手段がないため複製可能粒子の混入を検出を行っていないが、検出方法の確立と共に SIV ベクター生産において複製可能粒子の混入が検出感度以下である証明を行う必要がある。

#### E 結論

cPPT、WPRE を搭載することで、SIV ベクターの導入および発現効率は飛躍的に増大した。結果として生産時の機能力価はほぼ 10 倍上昇した。また、第三世代化にも成功し、原理的には複製可能粒子の混入は無に等しいと思われる。またこれによっても生産上は大きな力価の減少もなく実用性のある系であると思われる。

#### F 健康危険情報

SIV ベクターの基本骨格となっている SIVagm TYO-1 株は自然宿主であるアフリカミドリザルに対しても病原性はなくヒトに対しても病原性が知られていない。また、HIV ウイルスゲノムとの配列の相

同性は30-60%と低く、HIV ベクターと異なりベクター投与細胞に HIV ウイルスが感染しても、ベクター-ウイルス間での組換えにより搭載遺伝子を持つ感染性粒子の出現頻度は低いと考えられる。また本年度の研究で、第三世代化することにより、組換えによる複製可能粒子の混入の確率はさらに減少したと考えられる。

## G 研究発表

### 1 論文発表

Kobayashi M Hasegawa M 他  
Pseudotyped Lentivirus Vectors Derived from Simian Immunodeficiency Virus SIVagm with Envelope Glycoproteins from Paramyxovirus J Virol  
2003 77 2607-2614

## H 知的財産権の出願 登録状況

### 1 特許取得

出願日 2000 6 1

特許の名称 ヘマグルチニン活性を有する  
シュードタイプレトロウィルスベクター

出願番号 特願 2000-169090

海外出願各国移行済み

## 厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

### 分担研究報告書

#### AAV1 ヘクターを用いた WPRE の血友病遺伝子発現効果に関する研究

分担研究者 新井 盛夫 東京医科大学

#### 研究要旨

ヒト FIX 遺伝子(hFIX)cDNA を組みこんだ 1 型リコンビナントアデノ随伴ウイルス AAV(rAAV)ヘクターにおける第 IX 因子発現効率の向上を目的とした。WPRE および DNA サイズの異なる hFIX イントロン 1 を組み込んだ各種 minigene cassette を有するプラスミドヘクターを作成しトランスフェクションした。第 IX 因子の発現は、イントロン 1 の有無により約 3 倍、WPRE 挿入の有無により約 2 倍の効率が得られた。また、イントロン 1 のサイズが大きいもの(1.4kb)は小さいもの(0.3kb)に比べ、約 2 倍の第 IX 因子発現量を認めた。RAG1 マウスを用いた動物実験においては、十分な第 IX 因子の発現（正常レベルの約 10%）を認めたがピークは一過性であった。

#### A 研究目的

AAV は、ヒトへの病原性が知られておらず、幅広い宿主域を有し、非分裂細胞にも導入可能なことから、理想的なヘクターとしてさまざまな遺伝性疾患に応用されてきている。AAV には 1-8 型のセロタイプが知られており、中でもイヌにおける筋肉経路での研究では 1 型 AAV (AAV1) のヘクター導入効率が高いことが知られている。Katherine A High 教授（米国ペンシルベニア大学、フィラデルフィア小児病院）は、多年にわたり、FIX のタンパクおよび遺伝子レベルの研究と各種ウイルスヘクターを用いた血友病 B に対する遺伝子治療の可能性について研究を行ってきた。1999 年 4 月には世界に先駆けて hFIX cDNA を組みこんだリコンビナント AAV (rAAV) ヘクターの筋肉内注射による血友病 B 患者に対する臨床試験を開始した。現在、血友病 A では 3 件、B でも 2 件のヒトへの臨床試験がすでに開始されているが、まだ満足のいく結果は得られていない。一方、1999 年、Donello らは WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory

element)が哺乳動物細胞における in vitro トランスフェクションにてタンパク発現を高めることを報告した。その後もマウスおよびイヌにおいて 2 型 rAAV ヘクターにリポーター遺伝子とともに WPRE を挿入し遺伝子発現効果を検討した研究においても、挿入しないものに比べより高い発現効果が報告されている。本研究では、セロタイプ、AAV1 を用いて hFVIII および hFIX 遺伝子 cDNA または minigene に WPRE を組み込むことで、遺伝子発現効率を高めることを検討した。

#### B 研究方法

##### 1) WPRE を挿入した hFVIIIcDNA ベクターの開発

hFVIIIcDNA はそのサイズが 7kb を越え、B トメインを除いても約 4.4kb である。一方、AAV ヘクターの packaging size は最大 4.7kb である。そこで、hFVIII を軽鎖と重鎖に分けてそれぞれのベクターを作製し細胞に共感染させることにより分泌過程で 2 量体を形成させる。CMV I/E エンハンサープロモーターを上流に、さらにそれぞれの

3'UTR 内に WPRE を挿入したベクターを作製する。

## 2) WPRE を挿入した hFIXcDNA ベクターの開発

CMV I/E エンハンサープロモーターおよびサイズの異なる Intron とともに 3'UTR 内に WPRE を挿入したベクターを作製する。

## 3) In vitro での WPRE の発現効果

AAV をヘースとしたプラスミドに WPRE とともに hFVIII および hFIXcDNA を挿入しクローニングした後、プラスミドベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションしてタンパク発現実験を行う。得られたタンパクは純化し、因子活性と抗原量の測定および各種プロテアーゼとの反応をイムノブロット法にて確認する。

## 4) リコンビナント AAV (rAAV)ベクターによる遺伝子治療への応用

In vitro にて発現効果の確認できたプラスミドは、アデノウイルスプラスミドおよびヘルパープラスミドとともに HEK293 細胞にトランスダクション後、当該 rAAV1 ベクターを作成し、In vitro および In vivo (血友病マウス、Rag1 マウス) にて hFVIII、hFIX タンパク発現量とその持続経過を評価する。高純度かつ高濃度のベクター作製には塩化セシウムの濃度密度勾配を原理とした超遠心により行い、精製したベクターの力価は P32 標識した hFIXcDNA フラグメントをプローブとしササンハイブリダイゼーションを行い定量する。rAAV1 ベクター作製にあたっては海外研究協力者である Dr High より供与を受けた AAV1 を使用する。

## C 研究結果および考察

1) hFVIII ベクター、リコンビナント BDDhFVIIIISQ の sequence を鋳型として、第 VIII 因子の重鎖および軽鎖をそれぞれ作

成した。また、今後これら Splnt ベクターのそれぞれに WPRE sequence を挿入し、プラスミドでのトランスフェクションによる評価を行った後、rAAV1 ベクターによる in vitro、in vivo での評価を行っていく予定である。

2) hFIX ベクター: DNA sequence サイズの異なる intron1 を組み込んだ各種 minigene cassette を有する plasmid vector を作成し in vitro でトランスフェクションした結果、intron の有無により約 3 倍、WPRE 挿入の有無により約 2 倍の発現が得られた。また 0.3kb および 1.4kb のサイズの異なる intron を挿入した plasmid vector においても、後者において約 2 倍の hFIX タンパク発現が得られた。さらに同時に検討した WPRE 挿入による 3'UTR の影響 (1.4kb のうち 1.1kb を delete された) については、delete の有無にかかわらず hFIX タンパクの発現量に差違はなかった。RAG1 マウスを用いた動物実験においては十分な hFIX タンパクの発現 (正常レベルの約 10%) を認めたが、ピークは一過性であった。他の同様の実験系においてはピークに引き続き、数ヶ月単位で FIX タンパク発現を継続維持できているため、今後再評価する必要がある。

## D 結論

WPRE はその sequence サイズも 0.6kb と比較的扱いやすく、タンパク発現を enhance する tool として有用であり、遺伝子治療用ウイルスベクターのみならず Naked DNA(plasmid)やその他の応用も充分可能であると考えられる。

## E 論文発表

1 永泉圭子、稲葉浩、伊藤武善、山中晃、鈴木隆史、西田恭治、萩原剛、天野景裕、香川和彦、新井盛夫、福武勝幸 先

- 天性第 VII 因子欠乏症 3 家系のミスセンス変異 血栓止血誌 2001,12 133-143
- 2 新井盛夫 凝固因子インヒビター測定 *medicina* 2001,29 961-966
  - 3 新井盛夫 *Annual Review 血液* 2002 中外医学社 2002, 215-228
  - 4 萩原剛、守谷研二、西田恭治、佐藤晋、小柳泰久、海老原善郎、新井盛夫、福武勝幸 血友病 A 症例に自然発症した非外傷性小腸壁内血種の 1 例 内外文献のレビューを加えて・血栓止血誌 2002,13 55-61
  - 5 新井盛夫、小野織江、嶋緑倫、白幡聰、高松純樹、三間屋純一 インヒビターを保有する血友病患者におけるノホセブンの使用経験 第 3 報 頭蓋内出血 抜歯 在宅療法 血栓止血誌 2002,13 89-96
  - 6 稲葉 浩、永泉圭子、新井盛夫、福武勝幸 Non-Isotopic RNase Cleavage Assay を用いた血友病 A の遺伝子異常の解析 血栓止血誌 2002,13 26-34
  - 7 山中 晃、天野景裕、永泉圭子、稲葉 浩、新井盛夫、福武勝幸 血友病 A 患者に認められた 2 種のミスセンス変異 (R2159C, R2209Q) は変異第 VIII 因子の分泌が阻害されている 血栓止血誌 2002,13 175-182
  - 8 Goto S, Tamura N, Handa S, Arai M, Kodama K, Takayama H Involvement of Glycoprotein VI in Platelet Thrombus Formation on Collagen and von Willebrand factor Surfaces Under Flow Conditions *Circulation* 2002,106 266-272
  - 9 高橋芳右、新井盛夫、小林隆夫、新谷憲治、内海英貴 座談会 後天性血友病・臨床像と治療の実際・前編 *Pharmamedica* 2002,20 175-186
  - 10 新井盛夫 DIC 診断の実際 医某の門 2002,42 50-56
  - 11 新井盛夫 APTT の延長 PT の延長から考えられる血液疾患 血液フロンティア 2002,12 59-67
  - 12 Horita K, Matsunami H, Shimizu Y, Shimizu A, Kurimoto M, Suzuki K, Tsukadaira T, Arai M Treatment of a patient with hemophilia A and hepatitis C virus-related cirrhosis by living-related liver transplantation from an obligate carrier donor *Transplantation* 2002,73 1909-1912
  - 13 高橋芳右、新井盛夫、小林隆夫、新谷憲治、内海英貴 座談会 後天性血友病・臨床像と治療の実際 後編 *Pharmamedica* 2002 20 153-167
- 14 知的所有権の出願・取得状況  
当該事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

血友病治療のための新しい遺伝子導入法の開発

分担研究者 小林 英司 自治医科大学

研究要旨

〔目的〕 血友病に対し新しい治療法を開発するため、動物での *In vivo* 技術開発を中心に分担研究をこれまでに引き続き行った。最終年度（平成14年度）は独自にウイルスヘクターを用いない新しい肝特異的な遺伝子導入法の開発を行った。

〔方法〕①新生仔 KO マウスにヒト第Ⅷ因子を顕微鏡下で鎖骨上静脈に圧入し neonatal tolerance の誘導実験を行った。②AAV ヘクターの selotype による発現をマウス及びラットを用いて肝及び腎特異的ベクター圧入法を検討した。③ウイルスベクターを用いず筋肉及び肝特異的に遺伝子を導入する方法をラット及びブタモデルで検討した。

〔結果〕①新生仔期にできるだけ早期にヒト第Ⅷ因子を投与することでインヒビタ形成の阻止が可能となった。②AAV ベクター selotype の検討では、肝は selotype 5 が、腎は selotype 2 が他と比較して優位に有効であった。③大量の溶液とともに naked DNA を筋肉又は肝に圧入するとそれぞれの臓器に目的遺伝子の高発現が得られた。ブタを用いたプレクリニクでもカテーテル法により安全に本手技が行えることが判明した。

〔考察〕AAV ヘクターや naked DNA を用い肝選択的に血友病遺伝子を圧入することが可能であり極めて臨床応用の可能性が高いと考えられた。

A 研究目的

本研究班では血友病の動物モデルとして第Ⅷ因子 KO マウス及び、血友病大モデルが用いられている。小林の分担研究ではこれらの動物モデルを用いた治療実験を遂行する為の技術的問題を解決することを中心に検討した。まず、1) ヒト第Ⅷ因子補充療法を繰り返し行う際、体内での第Ⅷ因子に対する抗体産生が問題となる。まず新生仔 KO マウスに対する安全な第Ⅷ因子圧入法開発を目的とした。次に、2) 第Ⅷ因子欠損を AAV ヘクターを用いた遺伝子治療で克服する際、ヘクターの投与ルートの検討が必要である。種々の selotype で、成熟マウスやラットでの肝、及び腎をターゲットとした臓器特異的ベクター圧入法を検討した。

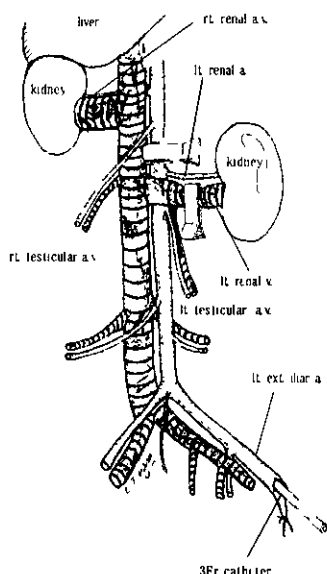
さらに最終年（平成14年度）では、これまでの検討の結果を受け、肝での血友病遺伝子発現が治療に極めて有効であることが判明したので、以下の方法でさらに有効な方法を開発検討した。大量の溶液とともに Naked DNA を注入すると筋肉や肝臓に遺伝子発現が得られることに注目して、カテーテルを用いてそれぞれの臓器に安全に遺伝子導入を行う方法をラット及びブタを用いて検討した。

B.研究方法

1) KO マウスの新生仔（生後2日以内）を吸入麻酔で導入後、実体顕微鏡下（×15）鎖骨下静脈へ 30G の注射針にて約 0.1cc のヒト第Ⅷ因子を投与した。

2) AAV ベクターを用いて、肝及び腎

特異的遺伝子発現実験をマウス、及びラットを用いて行った。肝へのアプローチとして、麻酔（ネンプタール 50mg/kg 腹腔内投与）下、回盲部静脈より注入し、門脈を介して肝への導入を行った。腎へは、同様の麻酔下、セルジンガー変法を用いて左腎臓特異的に AAV ヘクターを注入した（図 1）。



マウス及びラットにおける左腎選択的ヘクター注入法(図 1)

AAV ベクターは、本班分担研究者小澤らのグループにより供給され、ヘクタータイプとして 1 から 5 までの型が検討された。

3) ラットを用いて筋肉内及び肝臓へ以下の方法で、ウィルスヘクターを用いない遺伝子導入法を検討した。

3)–1 大腿静脈にカテーテルを導入後、種々の用量の生理食塩水中に一定濃度のマーカー遺伝子 (Naked Lac Z gene) を混ぜ急速注入した。

3)–2 体重あたりの溶液量を 75, 62, 50, 25% とし、それらの溶液に上記同様一定量のマーカー遺伝子混入の上、陰茎静脈から急速注入した。

3)–3 大腿静脈をカットダウンし、同

部よりカテーテルを肝内 IVC まで進めた上で、その上下をく血し、カテーテルを通して肝内に逆行的にマーカー遺伝子を注入した。

3)–4 さらにブタを用いて外頸静脈より穿刺法にてカテーテルを挿入し、肝静脈を介して肝区域内に選択的に造影剤ならびに色素を注入し、溶液注入の安全性ならびに注入範囲の検討を行った。

### C 結果

1) は、坂田報告参照、及び 2) は、小澤報告参照。3) について以下の結果が得られた。

3)–1 大腿動静脈へのカテーテルを用いた注入。大腿の血管に急速に大用量の溶液とともに Naked DNA を注入すると筋肉に遺伝子発現が得られた（図 2）。その注入ルートとして動脈より静脈が有効で注入ボリュームが大の方が有効であった。

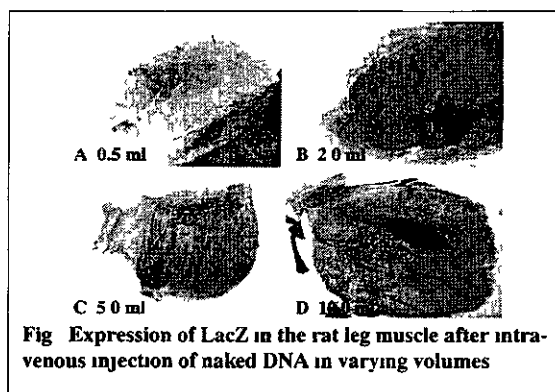
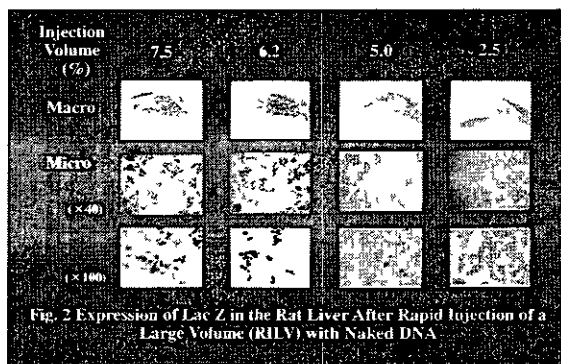


Fig Expression of LacZ in the rat leg muscle after intravenous injection of naked DNA in varying volumes

大腿動脈または静脈より Naked DNA を注入する方法により得られたマーカー遺伝子の発現（図 2）

3)–2 大用量の溶液の全身注入法、本法では、体重あたり 75% では多くのラットが心不全をおこし死亡するが 62% 以下で比較的安全に液注入が行えた。また肝で

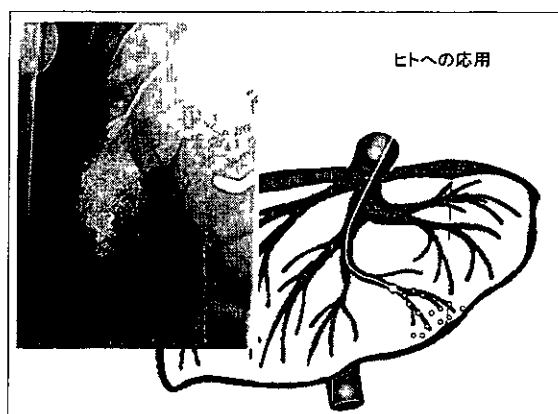
の遺伝子発現と安全性から、6.2%用量が条件として適正であった(図3)。



全身への大用量急速注入で得られる肝での遺伝子発現(図3)

3)-3 カテーテルを用いて肝静脈から逆行性に同法を行ったが大循環系への影響もなく極めて安全に肝への遺伝子導入ができた。

3)-4 ブタを用いた検討でカテーテルを用いて亜区域に選択的に遺伝子注入ができた(図4)。



ブタにおけるカテーテルを用いた亜区域造影とヒトへの臨床応用を示すスキーマ(図4)

#### D 考察

成熟個体では、外来からタンパク等投与

された場合にそれに対する抗体産生が生じるが、新生仔期にその目的抗原に暴露されることにより免疫寛容が生じる現象(neonatal tolerance)がある。血友病はその遺伝形式も明らかなどころから、出生前診断が可能である。したかつて、前述の neonatal tolerance をインヒビター産生防止法として使用できる可能性がある。本研究モデルとして KO マウスが考えられたが、新生仔期の静脈内投与は体サイズ及び注射針による易出血性の問題が生じていた。そこで分担研究では、この新生仔 KO マウスに安全にヒト第Ⅷ因子を注入する技術開発を第一目標とした。吸入麻酔の種類の見直しと、顕鏡下手術により新生仔 KO マウスにおける neonatal tolerance の誘導実験が可能となった。

AAV ベクター遺伝子治療による第Ⅷ因子長期産生の検討、本法の有効性を示すために種々の serotype の AAV ベクターが門脈を介して肝へ注入された。肝へのヘクター注入ルートとしては、小開腹による回盲部静脈より注入する方法をとった。全身投与に比し、少ない量のヘクターで高用量の目的タンパク産生が可能と考えられた。また、付随して腎への選択的遺伝子導入法の検討、さらに AAV の serotype の検討など極めて短期間に種々の問題を検討してきたが、小動物を用いて組織的に検討するメリットがあった。

大用量の溶液とともに Naked DNA を注入する方法は、筋肉または肝臓への利用が可能であった。特に肝では亜区域での発現が可能となり臨床応用に極めて展望がある。



## E 結論

ラット及ヒブタモデルにおいて、ウィルスベクターを用いない新しい遺伝子導入法(肝亜区域注入法)を開発した。

## F 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Ajiki, T, Murakami, T, Kariya, Y, Hoshino, Y, and Kobayashi, E et al Introduction of CTLA4-Ig using non-viral gene transfer method, gene gun, for rat composite tissue allograft Transplantation 74(4) 651, 2002
- 2 Ajiki, T, Takahashi, M, Inoue, S, Sakuma, Y, Oyama, S, Kaneko, T, Hakamata, Y, Murakami, T, Kume, A, Kariya, Y, Hoshino, Y, and Kobayashi, E Generation of donor hemato-lymphoid cells after rat limb composite grafting Transplantation (in press)
- 3 Ajiki, T, Murakami, T, Kobayashi, Y, Hakamata, Y, Wang, J, Inoue, S, Nakagawa, H, Kariya, Y, Hoshino, Y, and Kobayashi, E Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacain Efficient combination therapy with IL-12 and IL-18 cDNA on the rat with carcinoma Cancer Gene Ther (in press)
- 4 Endo, M, Enosawa, S, Suzuki, S, Amemiya, H, Kobayashi, E, Miyashita, T, Aoki, T, and Koyanagi, Y Porcine liver transplantation as an estimation system for bridge-use of bioartificial liver Transplant Proc 34 2714-2717, 2002
- 5 Enosawa, S, Lu, H, Zhang, H, Q, Kobayashi, E Comparison of postoperative antibody responses against allogeneic MHC antigens and levels of donor-type soluble class I antigen in the recipient serum after liver, heart, small bowel, pancreas/spleen, kidney and skin transplantation in the rat Transplantation 74(4) 280-281, 2002
- 6 Inoue, S, Hakamata, Y, Iwamoto, S, Tahara, K, Murakami, T, Takahashi, M, and Kobayashi, E et al Rejection of intestinal grafts overexpressed with human histo-blood group A/B antigens Transplantation 74(4) 609, 2002
- 7 Iwamoto, S, Kumada, M, Kanasaki, T, Okuda, H, Kajii, E, Inagaki, T, Saikawa, D, Takeuchi, K, Ohgawara, S, Takahashi, R, Ueda, S, Inoue, S, Tahara, K, Hakamata, Y and Kobayashi, E Rat encodes paralogous gene equivalent of human

- histo-blood group ABO gene association with antigen expression by overexpression of Human ABO transferase J Biol Chem Nov 29,277(48) 46463-46469, 2002
- 8 Kita, J , Kobayashi, E , Hishinuma, A , Kaneda, Y Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method Transplant Immunol (in press)
  - 9 Nakao, A , Mitsuoka, N , Tahara, K , Tanaka, N , Kobayashi, E Experimental models of rat small intestinal transplantation cuff method and suture method Transplant Proc (in press)
  - 10 Nakao, A , Tahara, K , Inoue, S , Tanaka, N and Kobayashi, E Experimental models of small intestinal transplantation in rats orthotopic versus heterotopic model Acta Medica Okayama 56(2) 69-74, 2002
  - 11 Nakao, A , Tahara, K , Inoue, S , Mizuta, K , Takeichi, T , Uchida, H , Tanaka, N and Kobayashi, E Combined cuff and suture technique for orthotopic whole intestinal transplantation in rats Microsurgery 22 85-90, 2002
  - 12 Ohya, T , Usui, K , Teramoto, K , Arii, S , Iwai, T , Tahara, K , Hashizume, K , and Kobayashi, E "Virtual Histology" A novel Modality for Monitoring Graft Rejection Post-Small Bowel Transplantation Transplant Proc 34 993, 2002
  - 13 Ogata, Y , Takahashi, M , Takeuchi, K , Ueno, S , Mano, H , Ogawara, S , Kobayashi, E , Ikeda, U and Shimada, K Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes A possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy J Cardiovasc Pharmacol 40 907-915, 2002
  - 14 Ogata, Y , Takahashi, M , Ueno, S , Takeuchi, K , Okada, T , Mano, H , Ookawara, S , Ozawa, K , Berk, B C Ikeda, U , Shimada, K , Kobayashi, E c-Src/Bcl-1<sub>L</sub> Pathway Involvement in Anti-Apoptotic Effect of Endothelin-1 in H9c2 Cardiomyocytes (in press)
  - 15 Okazaki, H , Hirata, D , Kamimura, T , Sato, H , Iwamoto, M , Yoshio, T , Masuyama, J , Fujimura, A , Kobayashi, E , Kano, S and Minota, S Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice Therapeutic Potential in Systemic Lupus Erythematosus J Rheumatol 29(4) 707-716, 2002

- 16 Sakuma, Y , Nagai, H , Sugimoto, K , Fujimura, A , Murakami, T , Uchida, H , Hakamata, Y , Takahashi, M and Kobayashi, E Comparison of efficacy and toxicity between sandimmune and neoral in the cyclosporine-resistant rat allo-pancreas transplantation Res Commun Pharmacol Toxicol (in press)
- 17 Sakuma, Y , Xiu, D R , Uchida, H, Hakamata, Y , Takahashi, M , Murakami, T , Nagai, H and Kobayashi, E Short-course methotrexate and long-term acceptance of fully allogeneic rat cardiac grafts A possible mechanism of tolerance Transpl Immunol 10(1) 49-54, 2002
- 18 Sato, Y Hakamata, Y , Inoue, S , Tahara, K , Sakuma, Y , Ajiki, T , Wang, J , Takahashi, M , Murakami, T , and Kobayashi, E Transgenic rats a novel tool for transplantation research Transplantation 74(4) 291, 2002
- 19 Takahashi, M , Nishihira, J , Katsuki, T , Kobayashi, E , Ikeda, U , Shimada, K Elevation of plasma levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with acute myocardial infarction Am J Cardiol 89(2) 248-9, 2002
- 20 Takahashi, M Ogata, Y , Okazaki, H , Takeuchi, K Kobayashi, E , Ikeda, U , Shimada, K Fluvastatin enhances apoptosis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells J Cardiovasc Pharmacol 39(2) 310-7, 2002
- 21 Takahashi, M , Takahashi, S , Shimpo, M , Naito, A , Ogata, Y , Kobayashi, E , Ikeda, U , Shimada, K  $\beta$ -very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells Atherosclerosis 162(2) 307-313, 2002

## 2 学会発表

国内	57	件
海外	15	件

## G. 特許獲得なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策 研究事業）

分担研究報告書

霊長類における血友病の遺伝子治療全臨床試験の可能性に関する研究

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

遺伝病の遺伝子治療に汎用されているマウス白血病ウイルス（MLV）由来のレトロウイルスヘ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クMLVに感染したカニクイサル細胞を大腿静脈経由で $10^8$ 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法でエンヘローブ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 血友病の *in vivo* あるいは *ex vivo* 遺伝子治療を目的とするレトロウイルスヘクターの開発にあたり、霊長類における前臨床試験が必要である。そこで、本研究では霊長類でのレトロウイルスヘクターの前臨床試験の実施可能性（feasibility and tolerance）について調べることを目的とする。

#### B 研究方法

まず amphotropic なマウスレトロウイルスに感染したカニ喰いサル由来 B 細胞株を作製した。次に、これを cyclosporin を前々日から投与したカニ喰いサルに  $10^8$  細胞/個体で経静脈的に投

与した。投与後さらに2日間 cyclosporinA を投与した。1ヶ月後にと殺して、各組織にプロウイルスが存在するかどうかを PCR 法を用いて調べた。

（倫理面での配慮）

動物愛護の精神と、関連学会の指針、および、国立感染症研究所霊長類センターの規則等に則って行なった。

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。のこりのサル#5には、非感染細胞を投与した。三頭と