

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 16 (2004) 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	名古屋大学大学院医学研究科 分子総合医学専攻ウイルス学	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 15 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	11
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	15
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	18
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	21
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	27
西山 幸廣（名古屋大学大学院医学研究科教授）	
6. カニクイザルの MHC クラス I 遺伝子の解析	29
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	35
---------------------	----

# 1. 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** ウイルスベクターを患者に直接投与する遺伝子治療の安全性評価では、ベクター粒子の毒性と血流に侵入したベクターの体内動態や消長、非標的臓器への遺伝子導入の有無などの情報が安全性評価の基盤となる。本研究では、アデノ随伴ウイルス (AAV) 2 型ベクターとセンダイウイルス (SeV) ベクターに注目し、それぞれモデルベクターをサルに接種して、ベクターの基本特性を詳細に解析した。大量の AAV2 型ベクターをサルに大腿静脈から投与すると、リンパ組織や肝臓を中心に様々な臓器に感染した。ベクター粒子の急性毒性は認められなかった。接種後 150 日経過しても、ベクターは各種臓器に存在し、導入遺伝子が発現していることが確認された。治療に使われる遺伝子から作られる蛋白質の性質によっては、有害な副作用の原因となる可能性があり、ベクターが感染している細胞種と存在様式の詳細な解析が必要である。サルに SeV ベクターを経鼻接種すると、鼻腔粘膜周辺にのみ限局して感染し、導入遺伝子の高発現が観察された。ベクターそのものは、誘導された SeV 特異的細胞性免疫反応で速やかに排除された。増殖能を除いて安全性を増した SeV も導入遺伝子を高発現することがわかり、SeV ベクターの臨床応用には非増殖型ベクターが優れていると思われた。また、腫瘍細胞に選択毒性を持つ単純ヘルペスウイルスの弱毒変異株 (HF10) を、再発性乳癌患者の皮膚転移腫瘍 (6 名すべて HSV 抗体陽性の患者) に注入する癌治療の第 I 相/II 相臨床試験を行った。副作用は無く、一定の殺腫瘍細胞効果が認められた。転移性乳癌に対する第 II 相臨床試験を行うとともに、頭頸部腫瘍に対する臨床試験を計画している。

### 分担研究者

神田 忠仁	国立感染症研究所遺伝子解析室・室長
佐多 徹太郎	国立感染症研究所感染病理部・部長
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
俣野 哲朗	国立感染症研究所エイズ研究センター・研究員
西山 幸廣	名古屋大大学院医学研究科・教授
山田 章雄	国立感染症研究所獣医科学部・部長

### A. 研究目的

患者の心筋、骨格筋、肝臓等にウイルスベクターを直接注入する遺伝子治療では、ベクター粒子の毒性と血流に侵入したベクターによる非標的臓器への遺伝子導入の有無が安全性評価の基盤となる。ウイルスベクターの体内動態や消長はキャプシド蛋白質とベクターゲノムに含まれるウイルス由来核酸の性質に依存している。即ち、キャプシド蛋白質は細胞表面の受容体分子との選択的な結合を介して標的細胞に侵入し、発現部位へ導入遺伝子を運搬する。また、患者の免疫系との関わりの主体となる。ウイルス由来核酸は細胞染色体への組み込み等に関わる。従って、導入遺伝子の性質とは別に、各ウイルスベクターには固有の性質があり、

この性質はモデルベクターを用いて解析できる。我が国で臨床試験が準備されているアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターとセンダイウイルス (SeV) ベクターを中心に、非病原性のモデルベクターを作り、サルに接種してベクター粒子の急性毒性、ベクターの体内動態、導入遺伝子の発現等を詳細に調べ、これらのベクターを使った臨床試験の安全性・有効性の評価に役立つのが研究の主要な目的である。ベクターの改良に役立つ材料や情報が得られれば、新たなベクターの開発も行う。

## B. 研究方法

研究全般の総括は倉田が行った。AAV ベクター、SeV ベクター、HIV ベクターは、それぞれ神田、俣野、北村が担当し、サル感染実験では山田と佐多が協力した。サル組織の病理学的な検討は佐多が担当した。HSV に関する研究は西山が担当し、佐多が協力した。

- 1) 大量の AAV2 型モデルベクターを 4 頭のカニクイザルに全身投与し、150 日目に解剖した。臓器片から抽出した DNA にふくまれるベクター DNA を PCR で調べた。ホルマリン固定標本作製し、病理学的な検討を加えた (神田、佐多)。
- 2) AAV9、10 型のモデルベクターを作り、培養細胞への感染性と、マウスへ経静脈投与後の体内動態を調べた。AAV2、9、10 型のキャプシド蛋白質に対する抗体による各ベクター感染阻害を調べて、中和抗体の交差性を検討した。(神田)。
- 3) ヒト 19 番染色体の AAVS1 領域に、エンハンサー遮断活性と導入遺伝子の不活化を阻止する機能があるか調べた (神田)。
- 4) HIV の中央多プリン配列 (cPPT) と、それに隣接する配列 (dZ 部) を挿入した HIV ベクターを作製し、HeLa 細胞に感染させて遺伝子導入、組み込み、核移行の効率を調べた (北村)。
- 5) アカゲザルに、SIV の Env・Nef 以外の抗原を発現する DNA を筋注した後、6 週目に SIV の Gag 遺伝子を発現する増殖型 SeV

ベクター (SeV-Gag) と非増殖型 SeV ベクター (F[-]SeV-Gag) を経鼻接種した。経鼻接種前後 (1 週間) 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、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)。

- 6) 再発性乳癌患者 (6 名すべて HSV 抗体陽性の患者) を対象に、HF10 を投与する癌治療の第 I 相/II 相臨床試験を行った。HF10 製剤の臨床試験用ワーキングロットは、GMP に準ずる方法で作製した。患者の皮膚、皮下の腫瘍にウイルス液を 1 回ないし 3 回接種し、接種直後から 3 週間にわたり局所、全身、血液所見等について調べた。2 週間後に接種腫瘍を切除し、病理学的な検討を加えた (西山)。
- 7) ショットガン法によりライブラリーを作製し、HF10 の塩基配列を調べた。
- 8) マウス膀胱癌由来細胞 MBT-2 を用いて、Immunocompetent なマウスを担癌動物とした腹膜播種モデル、膀胱腫瘍モデルを作製し、HF10 を腹腔内投与して、体重及び生存率を 90 日間観察した (西山)。
- 9) カニクイザルリンパ球から抽出・精製した mRNA の cDNA を合成した。これを鋳型とし、Multiplex PCR-SSP によって増幅された DNA の塩基配列を調べた (山田)。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験基本方針に沿って、審査委員会に実験計画を申請し、許可を得て行った。HF10 を使った臨床試験は名古屋大学医学部倫理委員会の許可を得て行った。

## C. 研究結果

- 1) AAV2 型ベクターを静脈接種後 150 日のカニクイザルには、リンパ節、脾臓、肝臓を中心に、扁桃、膵臓、腸管、腎臓、胆嚢、副腎、心臓、肺などにベクターが存在した。接種 90 日後と 150 日後のベクター量は大

大きく変わらないことが示された。ベクターが検出された臓器に異常な病理所見は無かった（神田、佐多）。

- 2) マウスに経静脈接種した AAV9 型、10 型キャプシドを持つベクターは、2 型ベクターと異なる臓器親和性を示した。接種 6 週間後に AAV2 型ベクターは主に肝臓、脾臓で検出されたが、AAV9 型ベクターは肝臓、心臓、筋肉、肺、腎臓で、10 型ベクターは筋肉、腎臓、脾臓、肺、心臓で検出された。AAV2、9、10 型のキャプシド蛋白質に対する抗血清は、感染中和活性において交差性を示さなかった（神田）。
- 3) AAVS1 領域の DNase I hypersensitive site を含む 330bp の Sma I 断片に、エンハンサー遮断機能、及び染色体に組み込まれた外来遺伝子の不活化を阻止する機能があり、典型的なインシュレーターが存在することがわかった（神田）。
- 4) HIV のウイルス中央多プリン配列（178bp cPPT/CTS 領域）を挿入すると遺伝子導入効率が高まること、またその隣接する配列（dZ 部）を挿入するとベクター粒子を産生できないことを明らかにした（北村）。
- 5) 複製型 SeV-Gag と非複製型 F[-]SeV-Gag の抗原特異的 T リンパ球誘導能に差は無かった。ベクターを接種したサル全てにおいて、病的臨床所見は認められなかった。また、F[-]SeV-Gag 経鼻接種後 2 週目に採取した腋窩リンパ節由来リンパ球中の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルは、PBMC 中のものと同程度だったが、鼻腔粘膜および扁桃由来のリンパ球中の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルは、PBMC 中のものより高レベルであった（俣野）。
- 6) HF10 を接種した再発性乳癌の患者において、明らかな副作用（発熱、痛み、局所発赤、血液所見の異常など）も、HSV に対する抗体価の上昇も認められなかった。一方、低用量接種の腫瘍塊において 30%近い腫瘍細胞が、高用量接種では 80%~100%の腫瘍細胞が変性、死滅した（西山）。
- 7) HF10 塩基配列を調べ、UL56、UL55 の欠

損と複数の遺伝の変異を明らかにした（西山）。

- 8) マウス膀胱癌細胞の腹膜播種モデル、膀胱腫瘍モデルへの HF10 腹腔内投与では、肉腫由来の NfSa 細胞や大腸癌由来の Colon23 細胞を用いた場合と比べ効果は低いものの、統計学的に有意な生存期間の延長が認められた。
- 9) マルチプレックス PCR-SSP 法を用いた検出法は、シーケンス解析法で得た全てのアリルを検出可能であり、シーケンス解析法では得られない新規のアリルについても検出可能であった。また、マルチプレックス PCR-SSP 法を用いた解析の結果、7 頭中 2 頭から 2 種類のアリルが、7 頭中 5 頭から 3 種類のアリルが検出され、カニクイザルの MHC class I A 遺伝子座が重複している可能性が示唆された（山田）。

#### D. 研究結果

- 1) サルへの感染実験では、いったん臓器に感染した AAV ベクターは安定で、接種後 150 日たってもリンパ系組織を中心に種々の臓器に存在していた。患者に直接投与された AAV ベクターが血流に入ると、非標的臓器に感染し、長期間にわたって導入遺伝子を発現する可能性があるため、ベクターの存在様式や導入遺伝子の発現をさらに詳しく調べておく必要がある。モデルベクターの大量投与にもかかわらず、臨床所見および感染組織の病理所見に異常は認められず、AAV ベクター粒子そのものの毒性は低いことが確認された（神田、佐多）。
- 2) カニクイザルから分離された AAV9 型、10 型の中和抗体とヒトから分離され、現在遺伝子治療用ベクターとして利用されている AAV2 型の中和抗体には交差性が無い。多くのヒトが AAV2 型に感染しており、抗体も持っていることが知られており、AAV2 型ベクターの臨床応用では、ベクターに対する感染中和抗体が速やかに患者に誘導され、複数回接種の障害となっている。AAV9 型、10 型を使ったベクターは、この問題を回避できると思われる。また、

筋肉細胞は分裂や死滅しない安定な細胞として、長期にわたる治療用遺伝子を発現させる臓器に適しているが、AAV2型ベクターは筋肉への遺伝子導入効率が低いことが明らかにされている。筋肉に対する感染性が高い AAV9 型、10 型ベクターは新しい遺伝子治療用ベクターになると期待できる (神田)。

- 3) 新たに発見した AAVS1 領域内のインシュレーターを治療用遺伝子の発現カセットの両端に付加することで、導入遺伝子を長期間、安定に発現させることができる可能性がある (神田)。
- 4) HIV ベクターに挿入された cPPT は核移行後のなんらかの過程に関わり、HIV ベクターの遺伝子導入効率をあげるらしい。また、cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量に関わる機能がある。これらの発見は、HIV ベクターの開発に役立つ (北村)。
- 5) 非複製型 F 欠損 SeV-Gag ベクターの経鼻接種は、複製型 SeV-Gag と同様の Gag 特異的免疫誘導が可能であることが示された。非複製型を用いた 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なりうる。また、霊長類動物の扁桃はマウスの nasal-associated lymphoid tissue (NALT) の一部に相当すると考えられている。サルを DNA/F(-)SeV プライム・ブーストシステムで免疫すると扁桃において、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の誘導が認められたことは、このワクチンシステムの粘膜細胞免疫誘導能を示唆している (俣野)。
- 6) HF10 をヒトの転移性乳癌腫瘍に直接接種する臨床試験では、明らかな副作用は無く、一定の殺腫瘍作用が認められた。弱毒化 HSV の接種は、ウイルス増殖を薬剤で抑制することが可能なので安全性は高い。この治療方法は、化学療法、放射線療法とならぶ非外科的な癌治療法の一つとなる可能性がある。
- 7) カニクイザルのクラス IMHC の A 座のタイピングを簡易に行う手法として SSP-PCR を確立した。また新たに B 座のアリルを明

らかにした (山田)。

## E. 結論

AAV2 型ベクターをカニクイサルに大腿静脈から大量に全身投与すると、ベクターはリンパ組織を中心に様々な臓器に感染し、接種後 150 経っても存在し続けていた。90 日目と 150 日目における各臓器のベクター量が殆ど変わらず、ベクターはさらに長期にわたって存在すると推定されるので、ベクターの存在様式の詳細な解析が必要である。カニクイサル由来の AAV9、10 型は 2 型と抗原性、臓器親和性が異なり、新たな遺伝子導入ベクターとして利用できる。安全性が向上した非増殖型 F(-)SeV ベクターは、増殖型 SeV 同様の導入遺伝子発現能を持つことが強く示唆され、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 (HF10) を転移性乳癌腫瘍に直接接種すると腫瘍細胞を殺す効果が示された。副作用はなく、化学療法、放射線療法とならぶ非外科的な癌治療法の一つに発展する可能性がある。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

神田

1. Enomoto, Y., Enomoto, K., Kitamura, T., and Kanda, T.: The keratinocyte-specific POU transcription factor hSkN-1a represses the growth of cervical cancer cell Lines. *Oncogene*, in press, 2004.
2. Ogata, T., Kozuka, T., and Kanda, T.: Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 77:9000-9007, 2003.
3. Enomoto, K., Enomoto, Y., Ishii, Y., Araie, M., and Kanda, T.: Genes up- or down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkN-1a. *BBRC*, 303:580-585, 2003.

佐多



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. Takakuwa H, Goshima F, Nozawa N, Yoshikawa T, Kimata H, Nakao A, Nawa A, Kurata, T, Sata T, Nishiyama Y.: Oncolytic viral therapy using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant for disseminated peritoneal tumor in immunocompetent mice. *Arch Virol* 2003, 148: 813-25.
3. Kimata H, Takakuwa H, Goshima F, Teshigawara O, Nakao A, Kurata T, Sata T, Nishiyama Y.: Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex viruses. *Hepato-Gastroenterology* 2003, 50: 961-6..
4. Nakajima N, Asahi-Ozaki Y, Nagata N, Sato Y, Dizon F, Paladin FJ, Olveda RM, Odagiri T, Tashio M, Sata T.: SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. *Jpn J Infect Dis.* 2003, 56: 139-41.

#### 北村

1. Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, Iwamoto A. "Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy." *J Med Virol.* 70 (4) :497-505. (2003)
2. Sakuma R, Kobayashi N, Ae K, Kitamura Y. "Inhibitory and enhancing effects of insertion of central polypurine tract sequence on gene expression with vectors derived from human immunodeficiency virus type 1." *Biochem Biophys Res Commun.* 302 (3) :489-95. (2003)
3. Yamada T, Kaji N, Odawara T, Chiba J, Iwamoto A, Kitamura Y. "Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human leukocyte antigen." *J Virol.* 77 (2) :1589-94. (2003)

#### 俣野

1. 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, AIDS 17:1392-1394, 2003.

2. Takeda, A., Nakamura, H., and Matano, T. Evaluation of simian immunodeficiency virus-specific immune responses induced by a defective proviral DNA vaccine in macaques. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56:172-173, 2003.
3. Takeda, A., Igarashi, H., Nakamura, H., Kano, M., Iida, A., Hirata, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Matano, T. Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA-prime followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector, in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 77:9710-9715, 2003.

#### 西山

1. Sugiura, S., Yoshikawa, T., Nishiyama, Y., Morishita, Y., Sato, E., Hattori, T. and 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) .
2. Kudoh, 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)
3. Kawaguchi, Y., Kato, K., Tanaka, M., Kanamori, M., Nishiyama, Y. and Yamanashi, Y. Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and a cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1δ. *J Virol* 77: 2359-2368 (2003)
4. 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* 77: 3204-3216 (2003) .
5. 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* 148: 813-825 (2003) .
6. Kimata, H., Takakuwa, H., Goshima, F., Teshigahara, O., Nakao, A., Kurata, T., Sata, T. and Nishiyama, Y. Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new

- replication-competent herpes simplex virus. *Hepato-Gastroenterology* 50: 961-966 (2003) .
7. Yoshikawa, T., Akimoto, S., Nishimura, N., Ozaki, T., Ihira, M., Ohashi, M., Morooka, M., Suga, S., Asano, Y., Takemoto, M. and Nishiyama, Y. Evaluation of active human herpesvirus 6 infection by reverse transcription-PCR. *J Med Virol* 70: 267-272 (2003) .
  8. Yoshikawa, T., Yoshida, J., Hamaguchi, M., Kubota, T., Akimoto, S., Ihira, M., Nishiyama, Y. and Asano, Y. Human herpesvirus 7-associated meningitis and optic neuritis in a patient after allogeneic stem cell transplantation. *J Med Virol* 70: 440-443. (2003) .
  9. Yoshikawa, T., Goshima, F., Akimoto, S., Ozaki, T., Iwasaki, T., Kurata, T., Asano Y., and Nishiyama, Y. Human herpesvirus 6 infection of human epidermal cell line: pathogenesis of skin manifestations. *J Med Virol* 71: 62-68 (2003) .
  10. Mori, I., Goshima, F., Koshizuka, T., Koide, N., Sugiyama, T., Yoshida, T., Yokochi, T., Nishiyama, Y. and Kimura, Y. Differential activation of JNK/SAPK and p38 MAPK signal transduction pathways in the mouse brain upon infection with neurovirulent influenza A virus. *J Gen Virol* 84: 2401-2408 (2003) .
  11. Nawa, A., Nozawa, N., Goshima, F., Nagasaka, T., Kikkawa, F., Niwa, Y., Nakanishi, T., Kuzuya, K. and Nishiyama, Y. Oncolytic viral therapy for human ovarian cancer using a novel replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant in a mouse model. *Gynecol Oncol* 91: 81-88 (2003) .
  12. Kato, K., Yokoyama, A., Tohya, Y., Akashi, H., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y. Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein-Barr virus nuclear leader protein at serine 35 that regulates its coactivator function. *J Gen Virol* 84: 3381-3392 (2003) .
  13. Yamauchi, Y., Daikoku, T., Goshima, F., and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus UL14 protein blocks apoptosis. *Micribiol Immunol* 47: 685-689 (2003) .
  14. 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* 88: F483-486. (2003) .
  15. Ihira, M., Yoshikawa, T., Ohashi, M., Enomoto, Y., Akimoto, S., Suga, S., Hiroo, S., Nishiyama, Y. and Asano, Y. Variation of human herpesvirus 7 shedding in saliva. *J Infect Dis* 188: 1352-1354. (2003) .
  16. Mori, I., Goshima, F., Koshizuka, T., Koide, N., Sugiyama, T., Yoshida, T., Tokochi, T., Kimura, Y. and Nishiyama, Y. The US3 protein kinase of herpes simplex virus attenuates the activation of the JNK signal transduction pathway in infected piriform cortex neurons in C57BL/6 mice. *Neurosci Letters* 351: 201-205 (2003) .
  17. Mori, I., Goshima, F., Koshizuka, T., Imai, Y., Kohsaka, S., Sugiyama, T., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura, Y. and Nishiyama, Y. Iba 1-expressing microglia-like cells respond to herpes simplex virus infection in the mouse trigeminal ganglion. *Mol Brain Res* 120: 52-56 (2003) .
  18. Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, T., Fujita, M., Kiyono, T., Nishiyama, Y. and Tsurumi, T. Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein Barr virus immediate early and early genes, preventing viral lytic replication. *J Virol* 78:104-115 (2004) .
  19. Nishiyama, Y. Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well. *Rev Medical Virol* 14: 33-46 (2004) .
  20. Teshigahara, O., Goshima, F., Takao, K., Kohno, S., Kimata, H., Nakao, A., and Nishiyama, Y. Oncolytic viral therapy for breast cancer with herpes simplex virus type 1 mutant HF10. *J Surg Oncol* 85: 42-47. (2004) .
  21. Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, Akimoto S, Ohashi M, Suga S, Nishimura N, Ozaki T, Nishiyama Y, Notomi T, Ohta Y, Asano Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, Loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 42: 140-145. (2004) .
  22. Asano, S., Yoshikawa, T., Kimura, H., Enomoto, Y., Ohashi, M., Terasaki, H. and Nishiyama, Y. Monitoring herpesvirus DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. *J Clin Virol*, in press.
  23. Mori, I., Yokochi, T., Koide, N., Sugiyama, T., Yoshida, T., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara, R., Takeuchi, T., and Nishiyama, Y. PCR search for HSV-1 genome in the brain section of patients with familial Alzheimer's disease. *J Clin Microbiol*, in press.
  24. Sugiura, S., Goshima, F., Takakuwa, H., Sata, T., Nakashima, T., and Nishiyama, Y. Treatment of solid sarcomas in immunocompetent mice with novel oncolytic herpes simplex viruses. *Otolaryngol Head Neck Surg*, in press.

25. Kanamori, M., Watanabe, S., Honma, R., Kuroda, M., Imai, S., Yamamoto, N., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y. Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein induces expression of thymus and activation-regulated chemokine in B cells. *J Virol*, in press.
26. Niimi, A., Limsirichaikul, S., Yoshoda, S., Iwai, S., Masutani, C., Hanaoka, F., Kool, E. T., Nishiyama, Y. and Suzuki, M. Palm residue mutant in DNA polymerase  $\alpha$  and  $\eta$  alter DNA replication fidelity and translesion activity. *Mol Cell Biol*, in press.
27. Mori, I., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara R., Takeuchi, T., Yokochi, T., and Nishiyama, Y. Limited reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *J Med Virol*, in press.
28. Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T. and Kimura, Y. Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host. *Rev Med Virol*, in press.
29. Nishimura, H., Yajima, T., Kagimoto, Y., Ohata, M., Watase, T., Kishihara, K., Goshima, F., Nishiyama, Y. and Yoshikai, Y. Intraepithelial  $\gamma\delta$  T may bridge a gap between innate and acquired immunity to herpes simplex virus type 2. *J Virol*, in press.
30. Nakao, A., Kimata, H., Imai, T., Teshigawara, O., Nagasaka, T., Goshima, F. and Nishiyama, Y. . Construction of recombinant herpes simplex virus type 1 expressing green fluorescent protein without loss of any viral genes. *Annals Oncol*, in press.

#### 山田

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.* 32 (2) :105-110, 2003

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

HF10 を使う癌のウイルス療法に関する特許（申請準備中）。



## 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室長)

**研究要旨** アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、治療用遺伝子を長期にわたって安定に発現させるベクターとして開発されている。先天性、後天性の遺伝子欠損症患者に直接投与する治療戦略が取られることから、ベクターの体内動態、消長に関する情報が、AAV ベクターを使った遺伝子治療の安全性・有効性を評価する基盤となる。AAV2 型ベクターをカニクイザルの大腿静脈へ接種し、150 日目に臓器を回収して、ベクターの存在を調べた。脾臓を中心にリンパ組織、扁桃、肝臓などにベクターが検出され、その量は接種 90 日後に比べて殆ど減少していなかった。いったん臓器に感染した AAV ベクターは体内に長く留まることがわかった。また、ベクターが検出された臓器に異常な病理所見が見られなかったため、ベクター粒子そのものの毒性は極めて低いこともわかった。AAV ベクターの安全性は導入遺伝子によって発現する蛋白質の機能と発現臓器、発現期間に依存すると考えられ、今後、ベクターの存在する細胞種と存在様式、導入遺伝子の発現継続などの解析が必要である。また、昨年度カニクイザルから新たに分離した AAV9、10 型は、抗原性が 2 型と異なっており、筋肉に感染性が高いことがわかったため、遺伝子導入ベクターとして開発を進めた。ヒト 19 番染色体の AAVS1 領域には野生型 AAV のゲノムが選択的に組み込まれる。この領域内に新たなインシュレーターを見いだした。レポーター遺伝子の発現カセットの両端に、このインシュレーターをつないで細胞に導入すると、遺伝子発現が長期間維持されることがわかり、AAV ベクターへの応用を探った。

### A. 研究目的

AAV ベクターを使った遺伝子治療の安全性、有効性を評価する基盤とするため、カニクイザルに全身投与した AAV ベクターの体内動態・消長を明らかにする。新たに分離した AAV9、10 型を利用した遺伝子導入ベクターを開発する。AAV ベクターによって導入された遺伝子の長期発現を可能にする技術を開発する。

### B. 研究方法

1) EGFP-tubulin 発現 AAV2 型ベクターを、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約  $10^{11}$  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 150

日目に解剖し、臓器を回収した。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 ベクターを検出した。ベクターが検出された臓器を中心に病理学的な検討を加えた (佐多分担研究者との共同研究)。

2) AAV2、9、10 型のキャプシド蛋白質 (VP2) を組換えバキュロウイルスで発現させ、精製した。これをマウスに免疫し、抗血清を作成した。両端に AAV2 型の ITR を持つ  $\beta$ -gal 発現カセットを AAV2、9、10 型キャプシドに組み込んだベクターを作成し、カラムクロマトグラフィによる精製条件を検討した。これらのベクターを種々の培養細胞へ感染させ、遺伝子導入効率を比較した。さらにマウスの尾静脈より約  $10^9$  ゲノムコ

ピーずつ接種し、6週間後に臓器を回収した。PCRによってベクターの体内分布を調べた。

- 3) CMV エンハンサーとプロモーターの間に AAVS1 の断片を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドを作った。これを HeLa 細胞に導入し、発現するルシフェラーゼ活性を測定して挿入 DNA 断片によるエンハンサー遮断の有無を検討した。エンハンサー遮断活性を示した DNA 断片を両端に付加したルシフェラーゼ発現カセットを 293 細胞に導入し、ルシフェラーゼ発現細胞クローンを複数分離した。各クローンのルシフェラーゼ活性の推移を 15 週間測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所において行われる動物実験に関する基本方針に沿って、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) AAV2 型ベクターを静脈接種して 150 日経過後のカニクイザルで、種々の臓器にベクターが存在した。細胞 10 万個あたりのベクター量は、リンパ節、脾臓、肝臓で  $10^3$  ゲノムコピー以上、扁桃、膵臓、腸管、腎臓、胆嚢、副腎、心臓、肺では、 $10^2 \sim 10^3$  ゲノムコピー程度であった。接種 90 日後と 150 日後のベクター量を比べると、脾臓では 1/10 程度に減少していたが、リンパ節、肝臓では大きな変化はなかった。体内の大まかなベクター量を計算すると、 $10^{11}$  ゲノムコピー接種されたベクターが 90 日後に  $3.6 \times 10^8$  ゲノムコピー、150 日後に  $1.2 \times 10^8$  ゲノムコピー程度になっていた。これまで、ベクターが検出された臓器に異常な病理所見は無かった。
- 2) AAV9 型、10 型キャプシドを持つベクターを作成し、精製した。ヘパリン硫酸が感染受容体とされる AAV2 型は、ヘパリンカラムへの結合・遊離で精製できるのに対し、AAV9、10 型ベクターはヘパリンカラムに結合せず、弱陰イオン交換カラム(POROS 50)に結合した。AAV9 型は NaCl 250mM

で溶出し、AAV10 型は 800mM で溶出した。

AAV9、10 型ベクターはヒト及びミドリザル由来の細胞株に感染し、遺伝子導入した。感染効率は細胞株によって大きく異なり、293 細胞には 9、10 型が同程度に感染したが、HeLa 細胞には 9 型が感染するのに対し 10 型は殆ど感染しなかった。マウス尾静脈から AAV2、9、10 型を接種すると、6 週間後に AAV2 型ベクターは主に肝臓、脾臓に検出されたが、AAV9 型ベクターは肝臓、心臓、筋肉、肺、腎臓で、10 型ベクターは筋肉、腎臓、脾臓、肺、心臓で検出された。

AAV2、9、10 型の抗 VP2 抗血清は、ベクター感染を阻害する活性において交差性は無かった。

- 3) AAVS1 領域の DNase I hypersensitive site を含む 330bp の Sma I 断片を、ルシフェラーゼ発現カセットのエンハンサーとプロモーターの間に挿入すると、発現するルシフェラーゼ活性が大きく低下した。方向依存性があり、この断片は典型的なエンハンサー遮断機能を持つことがわかった。さらに、Sma I 断片で挟まれた発現カセットを細胞染色体に組み込ませると、ルシフェラーゼ発現が少なくとも 15 週間以上安定に継続した。 $\lambda$  DNA 断片を付加した場合は、15 週間に次第に発現が低下した。これらの成績は、Sma I 断片には、染色体に組み込まれた外来遺伝子の転写が組み込み部位に依存する現象 (position effect) を阻止する機能があることを示している。

## D. 考察

- 1) カニクイザルに全身投与された AAV2 型ベクターは、接種後 150 日たってもリンパ系組織と肝臓を中心に種々の臓器に存在することがわかった。AAV2 型ベクターを利用した遺伝子治療において、ベクターが血流に入ると、非標的臓器に感染し、長期間にわたって導入遺伝子を発現する可能性がある。接種 90 日後と 150 日後のベクター量があまり変わらないことから、いったん臓器に感染した AAV2 型ベクターは

安定に存在し続けるらしい。どのような細胞種に、どのような形で存在するのか、導入遺伝子の発現はあるのかなどを、特に生殖細胞へのベクターの組み込みに留意しながら、長期の観察実験を行う必要がある。

ベクターが検出された臓器に異常な病理所見が見られなかったことは、ベクター粒子そのものの毒性は極めて低いことを示している。従って、AAV2型ベクターの安全性は導入遺伝子によって発現する蛋白質の機能と発現臓器、発現期間に依存すると考えられる。

- 2) 現在ベクターとして利用されている AAV2 型と AAV9 型、10 型間に中和抗体の交差性はなかった。AAV2 型ベクターの臨床応用では、繰り返し接種の際、宿主の免疫反応による感染効率の低下が懸念されている。AAV9、10 型はこの問題を克服するための新たなベクターとして役立つと期待できる。

マウスへの接種実験で、AAV2、9、10 型ベクターの臓器親和性が異なることが示された。AAV2 型の感染受容体分子であるヘパリンに AAV9、10 型が結合しなかったことから、AAV9、10 型は別の受容体分子を利用して細胞に感染すると考えられる。AAV9、10 型ベクターは、AAV2 型とは違う臓器を標的として遺伝子導入できるベクターとなる可能性がある。

- 3) AAVS1 領域の Sma I 断片の enhancer 遮断機能と position effect を阻止する機能は、この DNA 断片内に典型的なインシュレーターが存在することを示している。AAV は、AAVS1 領域が insulator で保護され、常に転写可能な活性型クロマチン状態に保たれていることを利用して、潜伏・持続感染しているらしい。このインシュレーターを発現カセットの両端に付加することで、導入遺伝子の長期間にわたる発現が可能になると期待できる。

## E. 結論

カニクイサルに静脈投与された AAV2 型ベク

ターは、接種 150 日後もリンパ組織を中心に様々な臓器に存在し続けていた。ベクターが存在する細胞種や存在様式と、さらに長期間にわたるベクターの体内動態、消長の解析が必要である。カニクイサル由来の AAV9、10 型は 2 型と抗原性、臓器親和性が異なるので、新たな遺伝子導入ベクターとして利用することができる。AAVS1 内のインシュレーターは、導入遺伝子の長期発現を狙うベクターに利用できる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Enomoto, Y., Enomoto, K., Kitamura, T., and Kanda, T: The keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a represses the growth of cervical cancer cell Lines. *Oncogene*, in press, 2004.
2. Ogata, T., Kozuka, T., and Kanda, T. : Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 77:9000-9007, 2003.
3. Enomoto, K., Enomoto, Y., Ishii, Y., Araie, M., and Kanda, T.: Genes up- or down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a. *BBRC*, 303:580-585, 2003.

### 2. 学会発表

1. Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Ono, F., Sata, T., and Kanda, T.: Systemic administration of recombinant AAV-2 vectors in cynomolgus monkeys. 第 9 回日本遺伝子治療学会 (2003 年 7 月、東京)
2. 神田忠仁、森清一郎、竹内隆正、佐多徹太郎: アデノ随伴ウイルスの体内動態。第 51 回日本ウイルス学会総会 (2003 年 10 月、京都)
3. 緒方敏彦、神田忠仁: アデノ随伴ウイルス組み込み領域内の insulator。日本分子生物学会 (2003 年 12 月、神戸)



H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 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)

研究協力者 岩田 奈織子、中島 典子、佐藤 由子(国立感染症研究所感染病理部)

**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システムを作ることを目的とし、AAV ベクターを接種したカニクイサル4頭を病理学的に検討した。その結果、肉眼的にも、また組織学的にも格別の所見は認められなかった。また、現在利用できる種々の病理組織学的解析方法を用いても、AAV ベクターが局在する細胞や組織を同定することはできなかった。より長期間の観察およびより鋭敏な検出方法のさらなる開発が必要である。

### A. 研究目的

遺伝子治療に用いるベクターの安全性および有効性を評価するシステムを作ることを目的とし、病理組織学的に形態変化を観察し、免疫組織化学でベクター抗原の検索、そして in situ hybridization 系を用いたサル組織病変の解析を行う。また組織切片の一部をレーザーマイクロダイセクション(LMD)法で切り取り PCR 法でゲノムを検索する。それぞれのベクターにより特性があるが、その有効性評価とともに組織や臓器に対する影響を病理学的に解析することで、安全性を評価するシステムの開発が目的である。

### B. 研究方法

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。実験の詳細については神田分担研究者の報告書を参照。剖検は型のごとく行い、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。LMD 法は、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、6-7 $\mu$ m 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%トルイジンブルーで核染色を行った。マイクロダイセクションは 40 倍の対物レンズを使用し、組織を切り取り、エッペンドルフチューブの蓋にレーザーパルスで飛ばした。切り取った組織切片から 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、10 $\mu$ l の精製水の DNA を溶解した。

(倫理面への配慮)

カニクイサル動物実験は当研究所の実験動物実験委員会の承認のもとで行なわれた。

### C. 研究結果

GFP-AAV ベクターを接種後、6 ヶ月および 1 年後に安楽死させたが、途中経過ではとくに問題になる臨床症状はみられなかった。4 頭(雌 2 頭<#10, #11>、雄 2 頭<#12, #13>)のカニクイサルを過剰のケタラールで麻酔したのち、心臓から全採血して安楽死させた。各主要臓器には肉眼的に著変を認めなかった。各組織を採材ののち、10%緩衝ホルマリン固定した。各サル組織から 31 ないし 37 個の組織片を切り出し、型のごとく組織標本作製した。全身的な影響を見るために、大脳、小脳、延髄の中樞神経組

織、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、消化管、膵臓、唾液腺、舌、耳下腺、甲状腺、胸腺、眼球、生殖器（子宮、卵巣、精巣）、膀胱、筋肉、骨髄、リンパ節、扁桃の各組織切片を観察した。4頭のサル各組織には腫瘍性病変は観察されず、ごく一部の組織にリンパ球浸潤が認められたが、ほかの大部分の組織に格別の所見は認められなかった。リンパ節の組織像ではT細胞領域の変化が目立つもののほか、二次濾胞が観察されるB,T混合型の反応性変化が認められたが、軽度の反応性変化であった。脾臓では4頭ともT細胞領域優位で、二次濾胞はほとんどみられない状態であったが、#10のサルでは一部の白脾髄に二次濾胞の発達と融合が認められた。

一部のサル組織でGFPを直接観察することを試みたが、対照と比較して有意な所見は認められなかった。また同様に単核球浸潤の目立つ部分をLMD法で切り出したが、PCR法でも有意な所見は得られなかった。

#### D. 考察

現在まで急性期および3ないし6ヶ月、そして1年後では、AAVベクターによると考えられる直接的なサル組織への影響はみられていない。未固定組織から抽出した核酸を用いたPCR法では脾臓にもっとも強く、そして多くの組織からAAVベクターが検出されたが、少なくともこの期間では組織に与える影響はないと考えられる。

AAVベクターの組織内局在を解析することが本研究の目的の一つでもあるが、ベクター自体は組織内で増殖する訳ではなく、いずれかの細胞の染色体内に組み込まれる。ベクターに組み込まれたGFPをマーカーとして組織切片上で検出することを試みたが、有意な所見は得られなかった。抗原としてもあるいはゲノムとしても量的に少ない場合、また一般にリンパ球系細胞では、検出感度を上げる方法の改善を行っても現在の技術では検出困難である場合が多い。つまりPCR法で陽性となってもコピー数が一桁ないし二桁の少ない方では組織内局在を解析するのは一般的に難しい。したがって、現在の方法で検出できるレベルまでGFPあるいはベクターのシグナルを何らかの方法で増幅す

ることが必要と考えられる。そこで形態学的変化のある部分を切り取り、周囲の組織を対照として、PCR法により検出することで、大まかな分布を知ることが可能と思われた。しかし、ホルマリン固定組織からのPCR法では一般的に検出感度が低下してしまうので、未固定組織を用いることが一つの可能性として考えられた。また今後とも検出感度を上げる方法を追求していきたい。

ベクターの安全性を確認するためには、今後はより長期の観察が必要となろう。また現在までは生殖器細胞における変化は認められていないが、他の方法での検討も必要であろう。

#### E. 結論

AAVベクターを接種したカニクイサルでは病理学的にとくに問題となる所見は認められなかった。

#### 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. Takakuwa H, Goshima F, Nozawa N, Yoshikawa T, Kimata H, Nakao A, Nawa A, Kurata T, Sata T, Nishiyama Y.: Oncolytic viral therapy using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant for disseminated peritoneal tumor in immunocompetent mice. *Arch Virol* 2003, 148: 813-25.
3. Kimata H, Takakuwa H, Goshima F, Teshigawara O, Nakao A, Kurata T, Sata T, Nishiyama Y.: Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex viruses. *Hepato-Gastroenterology* 2003, 50: 961-6.

4. Nakajima N, Asahi-Ozaki Y, Nagata N, Sato Y, Dizon F, Paladin FJ, Olveda RM, Odagiri T, Tashio M, Sata T.: SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. Jpn J Infect Dis. 2003, 56: 139-41.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし