

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 遺伝子治療において治療遺伝子を標的細胞に効率よく導入し安定的に維持させて当該遺伝子を発現させることが必要である。この目的に近年ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を基にしたベクターが用いられてくるようになった。しかし、効率の良い安全な HIV ベクターを確立するためには未だ解明すべき点が多い。HIV は感染後細胞内でウイルスゲノム RNA を相補 DNA に変換して組み換え前複合体を形成し、その後核内に移行し宿主染色体に入り込む。この DNA への変換以降のステップのメカニズムを明らかにし、これをベクター開発に応用することを目的とし研究を行った。HIV のウイルス中央多プリン配列 (cPPT) を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する場合があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるというよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量を低下させる働きのあることも明らかにした。

A. 研究目的

HIV は(+)一本鎖 RNA をゲノムとして有するレトロウイルスである。レセプターを介し標的細胞に進入した後、感染細胞の細胞質でゲノム RNA は逆転写酵素によって線状二本鎖 DNA に変換される。この DNA 分子は HIV の組み込み酵素(IN)を含む様々なタンパク質とともに巨大な核酸・タンパク質複合体(組み込み前複合体、preintegration complex; PIC)を形成する。しかし、この構造について、cDNA、IN が含まれること以外は、具体的なことはほとんど分かっていない。PIC に Vpr、MA、などウイルスタンパク質の他、さらに、宿主の HMG-I(Y)タンパク質などが共存しているという報告が散見されるもののその報告者とは異なる研究者による厳密な検証はなされていないので、真偽は不明である。さらに、メカニズムは不明であるが、この PIC は細胞質から細胞核に移行し、細胞核内で宿主ゲノム DNA に組み込み(狭義の組み込み反応)を起こしてプロウイルスとなる。分裂していない、静止期の細胞においてこ

の細胞膜を越して細胞核に進入できる点が HIV に特徴的で、マウスのレトロウイルスではこの一連の過程はレトロウイルスに特徴的な反応なので、この過程を特異的に促進し、細胞機能にはほとんど影響を与えないしておくことは理論上可能である。そのような制御が可能になれば、遺伝子治療に大いに役立つであろう。

本研究は、逆転写以降のステップのメカニズムを明らかにし、それをベクター開発に応用することを目的とする。

B & C. 研究方法および結果

まず HIV をベースにしたベクターを作製した。ベースとして採用したのは HXN ベクター(島田隆博士より供与を受けた)である。HIV-1 の構造から、5'の LTR、3'の LTR、gag の 5'末端領域以外の gag のほぼ全部、pol、env が欠失している。そこに、Tk プロモーターと neomycin 耐性遺伝子が組み込まれている。従ってこのベク

ターが組み込まれた細胞は G418 に耐性となる。従来 HIV ベクターに HIV のウイルス中央多プリン配列 (cPPT) を挿入すると遺伝子導入効率が高まるとされてきた。そこで、HXN の Tk プロモーターのすぐ上流に従来報告されていた 178 塩基の cPPT または、それを含みさらにそれよりも長い 282 塩基の cPPT を挿入したベクター-DNA を作製した。これをヘルパープラスミド (gag-pol 発現ベクター、VSV-G 発現ベクター) とともにヒト 293T 細胞にトランスフェクトして、ベクター粒子を産生させて、その量を p24 量と RNA 量で定量した。同じ量のベクター粒子を使用して HeLa 細胞に遺伝子導入を試みた。遺伝子導入効率、組み込み効率、核移行高効率を調べた。遺伝子導入効率は同じ p24 量 (1 ng 程度) のベクターを HeLa 細胞に感染させ、出現する G418 耐性細胞コロニー数で定量した。282 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターではそうでない HXN ベクターに比べて遺伝子導入効率が効率が 15%程度にまで低下した。挿入の向きに依存しなかった。178 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターではそうでない HXN ベクターに比べて遺伝子導入効率が逆に 200%程度にまで上昇した。これも挿入の向きに依存しなかった。HIV の cPPT を含む 178 塩基の領域を有する HIV ベクターではそうでない HIV ベクターに比べて遺伝子導入効率が高く、これは向きに依存すると一般には信じられてきた。そのメカニズムは cPPT を挿入することによって生ずると信じられている cDNA の当該領域部の DNA flap が cDNA の細胞核への移行効率を高めるためであろうと信じられている。そこで我々の系でベクターの cDNA の核移行の程度を調べた。核移行効率は、環状 2 本鎖 DNA の 2LTR 接合領域を PCR 法で増幅して半定量的に調べた。環状 DNA が核内でのみ合成されることを利用したのである。282 塩基長であれ 178 塩基長であれ cPPT 領域を有する HXN ベクターとそうでない HXN ベクターで核移行の程度は同じであった。次に組み込み効率はいわゆる Alu-PCR 法で組み込み接合領域を増幅して半定量的に調べた。遺伝子導入効率から予想されたように組み込み効率は 282 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターでのみ低下していた。

次に 282 塩基長と 178 塩基長の 2 つの cPPT の差である 104 塩基長の配列を有する HXN ベクターを作製しようと、その構造を有する DNA

を作製した。これを 293T 細胞にトランスフェクトしても、予想に反しベクターは産生されなかった。293T 細胞でベクター-RNA がは全く合成されなかったことが原因であることが分かった。この 104 塩基対の領域に RNA 量を低下させる働きはあることが明らかになった。

D. 考察

cPPT を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する場合があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるというよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量に関わる働きのあることも明らかにした。

E. 結論

HIV の組み込みに cis に関わる領域のあることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

4. 北村義浩、仲嶋一範 (編著)、必ず上手くいく 遺伝子導入と発現解析プロトコール、羊土社、2003年9月
5. 村松正実 (監修)、北村、井上、田中、禾 (編著)、新ラボマニュアル遺伝子工学、丸善、2003年9月

2. 学会発表

1. 佐久間龍太、北村義浩、HIV-1 cPPT/CTSの隣接配列のベクター産生に及ぼす影響、日本ウイルス学会、2003年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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 組換え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、マカクサル急性エイズモデルにおいて、SeV ベクター単独投与および DNA ワクチン併用プライム・ブースト法の優れた感染抑制・発症阻止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うこととした。昨年度は、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世代プライム・ブーストシステムを確立したが、今年度は、このシステムの抗原特異的 T リンパ球誘導能について、サル頭数を増やして詳細に検討した。従来の複製型 Gag 発現 SeV ベクターを用いた第1世代ワクチンシステム接種サル7頭と、非複製型 F 欠損 Gag 発現 SeV ベクターを用いた第2世代ワクチンシステム接種サル7頭との比較では、誘導された Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルおよび Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球レベルのピーク値 (ブースト後1週目) に、両者間の有意な差は認められず、第2世代ワクチンシステムも第1世代ワクチンシステムと同様に優れた抗原特異的 T リンパ球誘導能を有することが明らかとなった。さらに、第2世代ワクチン接種サル2頭の組織別解析では、ブースト後、鼻腔粘膜および扁桃優位の Gag 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細胞性免疫誘導能が強く示唆された。

A. 研究目的

組換え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1つであり、ワクチン抗原発現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、有効性の点で期待されるものである。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、安全性の点でもリスクが低いと考えられる。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、細胞性免疫が防御免疫として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発現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。DNA ワクチンと Gag 抗原発現 SeV ベクター (SeV-Gag) との併用による DNA/SeV-Gag プライム・ブーストワクチン接種実験では、SHIV89.6PD (サル・ヒト免疫不全ウイルス) 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。

本研究では、SeV ベクターを用いたワクチン抗原発現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 エイズワクチン経鼻接種後の免疫誘導を中心とした解析を行ってきた。当初解析を進めた第1世代ワクチンシステムでは、V 遺伝子を knock-out することにより弱毒化した複製型 SeV ベクターを用いたが、昨年度は、さらに安全性と実用性を高めたエイズワクチンとして、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世代ワクチンシステムを確立した。今年度は、この非複製型 F 欠損 Gag 発現 SeV ベクター (F[-]SeV-Gag) を用いた第2世代ワクチンシステムの抗原特異的 T リンパ球誘導能について、サル頭数を増やして詳細に検討した。

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 の抗原特異的 T リンパ球誘導能の比較) :

F(-)SeV-Gag 作成は DNAVEC に依頼し供給を受けた。14頭のアカゲサルを2群に分け、第1群(第1世代ワクチンシステム接種群)の7頭に対しては、SIV(サル免疫不全ウイルス)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週目に複製型 SeV-Gag を経鼻接種した(ブースト)。第2群(第2世代ワクチンシステム接種群)の7頭に対しては、CMV-SIVGP DNA を筋注した後、6週目に非複製型 F(-)SeV-Gag 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、ブースト後1週目の末梢血単核球(PBMC)中の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルおよび Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球レベルを測定した。さらに、東京医科歯科大学の木村・安波等の協力にて明らかとなったサル組織適合性抗原クラス I (MHC-I) の情報をもとに、ある一つのエピトープ特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルについても比較検討した。

実験2(組織別 Gag 特異的免疫誘導の解析) :

カニクイサル2頭を用い、CMV-SIVGP DNA 筋注後6週目に F(-)SeV-Gag 経鼻接種をおこなった。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

ワクチン接種をおこなったサル全頭において、病的臨床所見は認められなかった。

実験1(図1) :

第1群・第2群とも全頭において、ブースト後、1週目をピークとする高レベルの Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球および Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の誘導が認められた。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。第1群と第2群との比較では、ブースト後1週目の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルおよび Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球レベルについて、有意な差は認められなかった。

第1群のうちの3頭(R00-018、R02-003、R02-012)および第2群のうちの1頭(R01-007)は、一方のMHC-Iハプロタイプを共有していた。これら4頭すべてにおいて、ブースト後、そのハプロタイプ由来のMHC-I拘束性と考えられるあるエピトープに特異的なCD8陽性Tリンパ球が効率よく誘導されていた。

実験2(図2) :

F(-)SeV-Gag 経鼻接種後2週目において、腋窩リンパ節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 中のものと同レベルであった。一方、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 中のものと比較して高値を示した。

D. 考察

本研究により、F(-)SeV-Gag 経鼻接種ブーストは、複製型 SeV-Gag 経鼻接種ブーストと同様、高レベルの Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球および Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球誘導効果を有することが明らかとなった。したがって、この非複製型 F 欠損 SeV ベクターを用いた第 2 世代 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。

また、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霊長類動物の扁桃において、F(-)SeV-Gag ブースト後、効率良く 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。

E. 結論

非複製型 F 欠損 SeV ベクターを用い、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が、複製型 SeV ベクターを用いた第 1 世代ワクチンシステムと同様の高い抗原特異的 CD8 陽性 T リンパ球および CD4 陽性 T リンパ球誘導能を有することを明らかにした。さらに、抗原特異的 T リンパ球レベルの組織別解析を進展させ、このシステムが粘膜細胞性免疫誘導能を有する可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

1. 俣野哲朗. HIV ワクチンの展望. 第 26 回日本医学会総会、福岡、4/5/2003.
2. Matano, T. Cytotoxic T lymphocyte-based pressure against immunodeficiency virus infections in a macaque AIDS model. 第 76 回日本生化学会大会、横浜、10/16/2003.
3. 小林政博、五十嵐博子、武田明子、野本明男、俣野哲朗. SIV Gag における CTL エピトープの同定. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/28/2003.
4. 俣野哲朗、五十嵐博子、武田明子、小林政博、飯田章博、永井美之. Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンによる SIV 複製抑制効果. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/29/2003.
5. 俣野哲朗. 慢性エイズモデルにおける Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンの効果. 第 17 回日本エイズ学会学術集会、神戸、11/28/2003.
6. Matano, T., Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Sugiura, W., Mori, K., Kano, M., Iida, A., Hasegawa, M., Miyazawa, M., Yasunami, M., Kimura, A., O'Connor, D., Watkins, D., and Nagai, Y. Containment of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques by vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes. The 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, USA, 2/11/2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請中

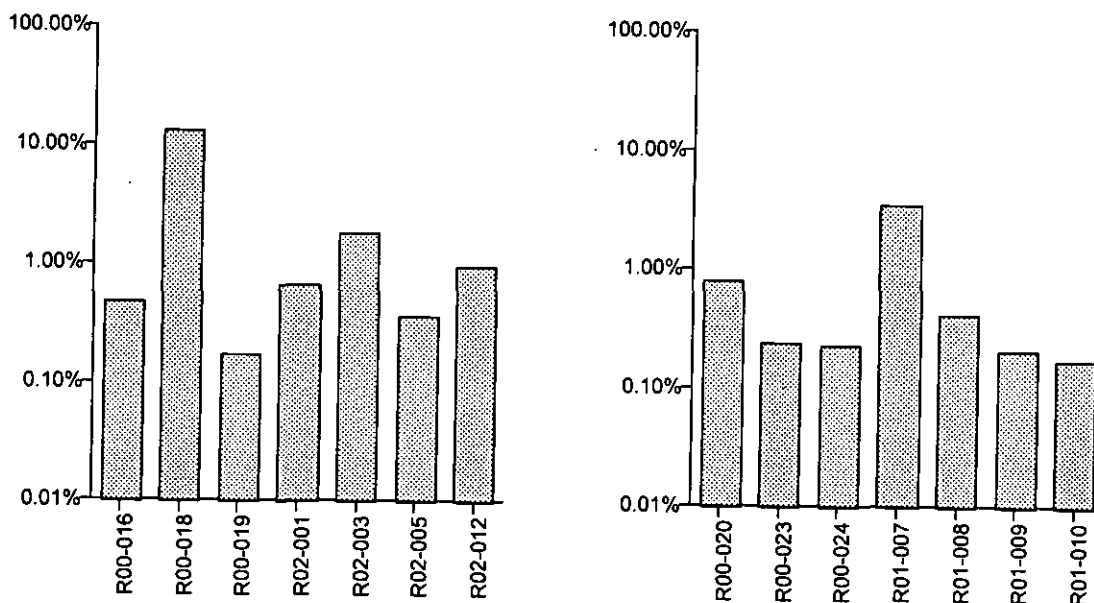


図1. ブースト後1週目の末梢血リンパ球中のGag特異的CD8陽性Tリンパ球レベル。左が第1群（第1世代ワクチンシステム接種群）の7頭、右が第2群（第2世代ワクチンシステム接種群）の7頭。

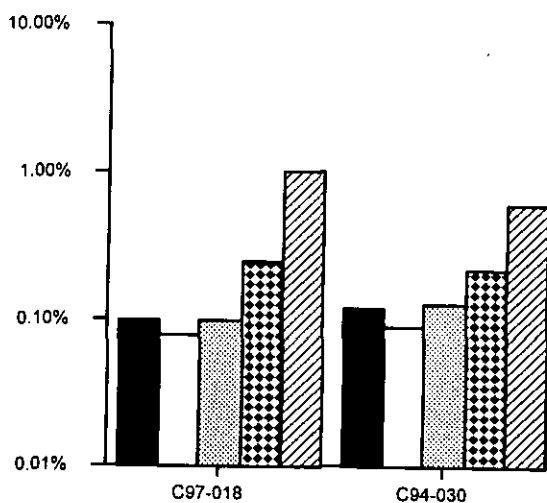
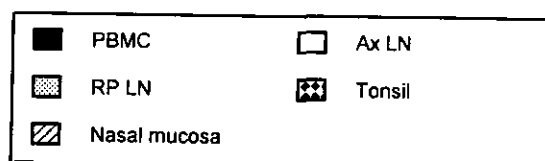


図2. F(-)SeV-Gagブースト後2週目の各組織由来リンパ球中のGag特異的CD8陽性Tリンパ球レベル。Nasal mucosa: 鼻腔粘膜、Tonsil: 扁桃、RP LN: 後咽頭リンパ節、Ax LN: 腋窩リンパ節。

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て、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の動物実験系の作製を行ってきた。HF10 と名付けた変異 HSV-1 に優れた抗腫瘍性があることが判明し、臨床試験に使用しうるウイルス製剤の作製を行い、名古屋大学医学部倫理委員会等の承認のもとに再発性乳癌を対象に臨床試験を施行した。その結果、HF10 の腫瘍内への注入は明らかな副作用を示すことなく、ほとんどの腫瘍細胞を死滅させることが明らかになった。

A. 研究目的

現在、単純ヘルペスウイルス (HSV) をベースとしたベクターは、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ベ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ベ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 ベクターは、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 を悪性腫瘍治療用ベクター (ウイルス) 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。また、既に実験モデルにおいて優れた抗腫瘍性と安全性が確認された HF10 に関する臨床試験実施のための準備を整え、できれば再発性乳癌に対する臨床試験を施行する。

B. 研究方法

- 1) 名古屋大学医学部附属動物実験センター P3 施設内において、ほぼ GMP に準じる形で HF10 製剤のワーキングロットを作製した。SPF 受精鶏卵から得られたニワトリ胎

児線維芽細胞にて3回ブラッククローニングを行ったものをマスターウイルスバンクとした。ワーキングロットとしては無血清下で増殖させた培養上清を用いた。エンドトキシン、多種ウイルスの混入、マイコプラズマの混入、蛋白質濃度等についても測定、検討した。

- 2) Immunocompetent なマウスを担がん動物とした評価系を樹立し、HF10 を含む弱毒化 HSV 数種の有効性と安全性についてさらなる検討を加えた。とくに膀胱がん評価系を確立し、HF10 のマウス膀胱腫瘍モデルにおける作用について検討した。
- 3) HSV は少なくとも 74 種類の遺伝子をコードするが 1/3 近くは機能がほとんどわかっていない。ヘルペスウイルスベクターの安全性、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) 再発性乳癌に対する HF10 接種の効果

名古屋大学医学部倫理委員会、IRB 委員会での承認及び厚生労働省担当者の確認のもとに、名古屋大学附属病院（責任研究者病態外科学講座教授 中尾昭公）において、再発性乳癌患者（6 名すべて HSV 抗体陽性の患者）を対象に第 I 相/II 相 臨床試験を施行した。患者の皮膚、皮下の腫瘍内（直径 1~2cm）にウイルス液 0.5ml（ 1×10^4 PFU から 5×10^5 PFU の HF10 を含有）を 1 回ないし 3 回（3 日連続）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査した。接種腫瘍は 2 週間後に切除し、病理学的な検索を行った。いずれの患者においても HF10 接種による明らかな副作用（発熱、痛み、局所発赤など）は認められなかった。血液においても明らかな異常所見への変化は認められなかった。また、HSV に対する抗体価の上昇も認められなかった。一方、 1×10^4 PFU の HF10 1 回接種の乳癌腫瘍塊においても 30%近い腫瘍細胞の著しい変性あるいは死滅が認められ、 1×10^5 あるいは 5×10^5 PFU を 3 日連続して接種した腫瘍では 80%~100%の腫瘍細胞が変性、死滅しているのが観察された。以上の結果は、HF10 がマウスを用いた実験モデル系での結果から予想される以上の優れた抗腫瘍作用を持つ可能性があることを示している。

2) アンプリコンを利用した抗腫瘍作用の増強

各種プロドラッグの活性化に関わるカルボキシエンテラーゼを発現するアンプリコン作製、酵素活性発現の確認、プロドラッグ活性化の確認については昨年度報告した。

抗腫瘍作用の増強のためにアンプリコンを利用する場合には、HF10 のような弱毒化抗腫瘍性 HSV をヘルパーとして用いれば、感染性ウイルスを除く必要は必ずしもない。このような考えに基づき、ヘルパーウイルス（HF10）に対するアンプリコン粒子の比率を増すための条件の検討を行い、10%以上の濃度でアンプリコンを含有する条件をほぼ確立した。また、アンプリコンに搭載する外来性遺伝子として各種

サイトカインを候補として考え、そのうちのいくつかを作製した（特許に関わるので具体的にはふせさせて戴きます）。

3) HF10 全塩基配列の決定

HF10 は Vero 細胞での増殖性が極めて良いにもかかわらず（臨床分離株の約 100 倍）、マウス末梢接種での病原性が極めて低い（5 万分の 1 以下）。また、多くの培養細胞において著しい細胞融合を誘導するなどの特性をもつ。ショットガン法によりライブラリーを作製し、全塩基配列の決定を試みた。現在、約 90%まで終了したが、我々が既に報告した UL56、UL55 の欠損に加えて今回の解析でいくつかの遺伝子産物に大きな変異があることが明らかになった。（特許に関わるので具体的にはふせさせて戴きます）。

4) マウス膀胱癌モデルに対する HF10 の効果

マウス膀胱癌由来細胞 MBT-2 を用いて、腹膜播種モデル、膀胱腫瘍モデルを作製し HF10 接種の効果について検討した。MBT-2 を 1×10^6 個腹膜内接種し、3、4、5 日目に HF10（ 1×10^7 PFU）を腹腔内投与して体重、及び生存率を 90 日間観察した。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 HF10 の効果は弱かったが、統計学的に有意な生存期間の延長が認められた。MNT-2 膀胱癌モデルの作製は、癌細胞の生着率が低く安定した結果が得られなかった。In vivo passage の癌組織を膀胱内に 10mg/マウス移植後、3 日目に HF10（ 1×10^5 PFU）を 3 回投与した群で生存期間の延長が認められた。

D. 考察

HF10 をヒトの転移性乳癌腫瘍に直接接種する時、明らかな副作用もなくマウス実験系での予想を上回る抗腫瘍作用を示すことが明らかになった。弱毒化 HSV の利用は、たとえウイルスの増殖が予想以上だとしても抗ヘルペス剤アシクロビアやガンシクロビアでコントロールすることが可能であり、アデノウイルスなどと比べ安全性が高い。平成 16 年度には頭頸部

腫瘍に対する HF10 の臨床試験も計画しているが、HSV を用いたウイルス療法は、化学療法剤、放射線などに加え、非外科的な癌治療法の選択肢の一つとなりうる可能性をもっていると考えられる。

E. 結論

再発性乳癌に対する HF10 の臨床試験は Oncolytic viral therapy の可能性を強く期待させるものであった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 1 δ . *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. *Micriobiol 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., Limsirichaiikul, S., Yoshoda, S., Iwai, S., Masutani, C., Hanaoka, F., Kool, E. T., Nishiyama, Y. and Suzuki, M. Palm residue mutant in DNA polymerases α and η alter DNA replication fidelity and translesion activity. *Mol Cell Biol*, in press.
 27. Mori, I., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara, 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし

6. カニクイザルの MHC クラス I 遺伝子の解析

分担研究者 山田 章雄 (国立感染症研究所獣医学部部長)

研究協力者 宇田 晶彦 (国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
協力研究員)

研究要旨 細胞性免疫および液性免疫を理解することは、病原体予防を目的とする新規ワクチンの有効性を評価するために必要不可欠である。カニクイザルは、薬効評価試験、体内動態試験、安全性試験を行うにあたり汎用されている。しかし、カニクイザルの MHC (*Mafa*) に関する報告は少数に過ぎず、細胞性免疫を司る CTL の測定さえ困難な状況にある。そこで昨年度の本研究では、カニクイザルの MHC クラス IA 遺伝子座(*Mafa-A*)について解析を行い、*Mafa-A*01* から *A*14* までのアレルを確立した。また、*Mafa-A* の一部のアレルについて、マルチプレックス PCR-SSP 法を用いた簡易的検出法も開発した。本年度は、*Mafa-A* アレルを全て網羅したマルチプレックス PCR-SSP 法の開発を試みた。*Mafa-A* 特異的なアンチセンスプライマーと各アレル特異的なセンスプライマーを 4 または 5 種類混合し、*Mafa-A*01* から *A*14* を挿入した各プラスミド DNA を鋳型とし PCR を行った。この試験の結果、*Mafa-A*01* から *A*14* までの各アレル特異的な PCR 産物は検出された。そこでカニクイザル PBMC 由来 cDNA を鋳型とし同法を適用したところ、1 個体あたり 2~3 種類の *Mafa-A* アレルが検出され、*A* 遺伝子座は重複して存在する可能性が示唆された。本年度は更に *B* 遺伝子座について、塩基配列解析を行いアレルの確立を試みた。この結果、10 頭のカニクイザルより 34 種類の塩基配列が得られたが、NJ 法に基づいて 18 種類のアレルに分類し、各々 *Mafa-B*01* ~ *B*18* と命名した。また、*Mafa-B* における塩基配列解析の結果、1 個体あたり 1~5 種類のアレルが検出され *B* 遺伝子座についても複数存在している可能性が示唆された。

A. 研究目的

わが国で実験動物モデルとして多用されているカニクイザルは、免疫の中樞を担う MHC の解析が全くされていなかった。この為にカニクイザルを用いた種々の実験では、細胞性免疫の動向を正確に把握する事ができなかった。そこで昨年度は、カニクイザルの MHC クラス I A 遺伝子座 (*Mafa-A*) について解析を行い、*Mafa-A*01* から *A*14* までのアレルを確定した。また、*Mafa-A* の一部のアレルについて、マルチプレックス PCR-SSP 法を用いた簡易的検出法も開発した。本年度は、*Mafa-A* アレルを全て網羅したマルチプレックス PCR-SSP 法の開発と、HLA-B のホモログである *Mafa-B* アレル

の確立を目的とし研究を行った。

B. 研究方法

カニクイザルから得たリンパ球を ConA 処理で活性化し、Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いて mRNA を精製した後、mRNA は High Fidelity RNA PCR Kit (Takara) を用いて cDNA へ変換した。

Multiplex PCR-SSP 法をもちいた解析は、各個体から得られた cDNA を鋳型として用いた。プライマーセット 1 は IA-01s (5' -GCAGCG GGATGGAGAGGAA-3'), IA-02s (5' -GCTGTG

GTTGTGCCTTCTGGAAAA-3'), IA-03s (5'-ACGCTGCAGCGCGCA-3'), IA-04s (5'-GCGGCGGATGTGGCGG AGAG-3'), IA-05s (5'-CTGCGACCTGG GGCCG-3')と IA-a (5'-CCTGGCACT GTCAGTCTT-3')を混合し、プライマーセット 2 は IA-06s (5'-GGGCCTGTGCGTGGAGTCCCTG-3'), IA-07s (IA07-s5'-CACACTGACCTGGCAGCGT-3'), IA-08s (5'-CTGCGACCTGGGGCCA-3'), IA-09s (5'-GCTGGCCTGGTTCTCC TTGGAA-3'), IA-10s (5'-GCAGCCCCG CTTCATCT-3')と IA-a を混合し、プライマーセット 3 は IA-11s (5'-ACACATGTGACCCATCACCT-3'), IA-12s (5'-GCCGGAGTATTGGGACCA-3'), IA-13s (5'-GGCCTGCAGGAGATGGAAA-3'), IA-14s (5'-CGGACCTGGGGGCTCAA-3')と IA-a を混合した。PCR は、GeneAmp® PCR System (ABI, Norwalk, CT)を用いて 95°C で 5 分間 DNA を変性後、95°C で 30 秒、72°C (プライマーセット 1 または 2) 又は 70 度 (プライマーセット 3) で 30 秒、72°C で 30 秒を 25 サイクル反応させ、最後に 72°C で 7 分間の伸張反応を行った。PCR 産物は 1.3% アガロースゲルにて電気泳動を行った。検出された全てのバンドは Freeze 'N Squeeze Spin Column (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて精製し、ABI model 310 DNA sequencer (ABI) でシーケンス解析を行った。

合成した cDNA を鋳型とし、primer (5'-CGCTCGAGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCGAG-3' 及び 5'-AAGCCGTGAGAGACACATCAGA-3'), 及び Pfu DNA polymerase (Promega, Madison, WI)を用いて PCR を行い MHC class I B 遺伝子座を増幅した。PCR の条件は 95°C で 5 分間 DNA を変性後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 40 サイクル反応させ、最後に 72°C で 7 分間の伸張反応を行った。得られた PCR 産物は、1%アガロースにて電気泳動を行った後切り出し、Freeze 'N Squeeze" DNA gel extraction spin columns (Bio-Rad)を用いて精製した。精製した PCR 産物は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて pCR-4-Blunt-TOPO ベクターへ挿入した。1 個体あたり 48 クローンずつ LB 培地にて培養し、NucleoSpin Multi-8 Plus Plasmid (Macherey-Nagel)にてプラスミドの精製を行った。得られたプラスミドのシーケンス解析を行うために T7 promoter primer (5'-TAATAC GACTCACTATAGGG-3'), SP6 promoter primer

(5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'), Ia698 primer (5'-TAGAAGCCCAGGGCCCAGGC-3'), または Is437 primer (5'-ATTACATCGCCC TGAACGAG-3')を、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 (ABI)を用いてサイクル PCR を行った。反応液は Wizard MagneSil Sequencing Reaction Clean-Up System (Promega)を用いて、フリーダイを除去し、Hi-Di Formamide (ABI)にてサンプルを溶出した。得られたサンプルは、ABI 310 DNA Sequencer (ABI)を用いて塩基配列を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験計画については国立感染症研究所動物実験委員会で審査承認を受けた。

C. 研究結果

Mafa-A アリルを検出するためのマルチプレックス PCR-SSP 法の確立

マルチプレックス PCR-SSP 法が、Mafa-A アリルの検出に有効であるか否かを検証する為に、Mafa-A*01 から A*14 までを各々挿入した pcDNA3.1(-)プラスミドを鋳型とし同法を行った。この結果、プライマーセット 1 を用いて解析した場合、Mafa-A*01 から A*05 までの特異的 PCR 産物は検出された。プライマーセット 2 を用いて解析を行うと、Mafa-A*06 から A*10 までの特異的 PCR 産物を検出することができた。同様にプライマーセット 3 を用いて解析を行った場合、Mafa-A*11 から A*14 までの各アリル特異的な PCR 産物を検出することが出来た。以上の結果からマルチプレックス PCR-SSP 法を用いれば、14 種類の Mafa-A アリルを簡便に検出できる可能性が示唆された。

プラスミドを鋳型としたマルチプレックス PCR-SSP 法の結果は良好であったので、カニクイザル由来の cDNA を鋳型にして Mafa-A アリルの検出を試みた。この解析には昨年度 Mafa-A アリルを確立する際に使用した 1 家系 3 世代 7 頭のカニクイザルの cDNA を用いた。この結果、全ての個体で昨年度報告したシーケンス解析によって得られた 4 種類のアリル (Mafa-A*03, A*07, A*11, A*14) は、検出可能である事が確認された。更に 3005 を除く 6 頭に関しては、シーケンス解析では検出できなかったアリルも検出された。マルチプレック

ス PCR-SSP 法にて新たに検出された *Mafa-A* アリルが特異的な PCR 産物であることを確認するために、アガロースゲルからバンドを抽出し塩基配列の解析を行った。マルチプレックス PCR-SSP によって 2 頭 (1102、2010) から新たに検出された *Mafa-A*07* は、既に確立していた *Mafa-A*07* と塩基配列が完全に一致していた。しかし、4 頭 (5117、5076、4045、1102) から検出された *Mafa-A*04* は、これまでに得ていたアリルとは符合しない新規のアリルであった。8225 より検出された *Mafa-A*08* のバンドは、クローニング後シーケンス解析を行った結果、既に確立していた *Mafa-A*08* と新規のアリルが得られた。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。更にマルチプレックス 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。

カニクイザルにおけるクラス I B 遺伝子座のアリルの確立

カニクイザルの B 遺伝子座の塩基配列を解析するために、1 個体あたり 48 クローンについてシーケンス解析を行った。得られた塩基配列について 2 クローン以上同一の塩基配列を有していた場合、1 つの塩基配列として認定した。認定した 34 種類の塩基配列をもとに NJ 法を用いて系統樹を作成し $d < 0.025$ まで同一アリルとした場合 10 種類に分類され、塩基配列から予想されるアミノ酸配列をもとに同じ条件で分類した場合 18 種類に分類された。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分類を適応し、*Mafa-B*01* から *B*18* と命名した。

本研究で確立した *Mafa-B*01* から *B*18* が、MHC クラス I B 遺伝子座由来の産物であることを確認する為に、既に確立されている *Mamu-A*、*Mamu-B*、*Mafa-A* のアミノ酸配列と比較検討を行った。*Mafa-B* のアミノ酸配列は 361 または 362 残基で、*Mamu-A* や *Mafa-A* と比較して 3 残基程度短く、細胞膜貫通領域から細胞内領域のアミノ酸配列は *Mamu-B* とのホモロジーが非常に高かった。*Mafa-B* の予想される糖鎖結

合部位は 86 番目のアミノ酸であった。 $\alpha 2$ 領域の 101 番目と 164 番目のシステインと、 $\alpha 3$ 領域の 203 と 259 番目のシステインは霊長類のクラス I 遺伝子全てで保存されていた。*Mafa-B* 遺伝子の多様性は $\alpha 1-2$ に集中しており、次いで $\alpha 3$ にも存在する。一方、膜貫通領域や細胞内領域には A、B、及び E 遺伝子座間で特有のアミノ酸配列が見られるが、同一遺伝子座内ではアミノ酸配列は比較的保存されていた。この結果より、本研究で確立した *Mafa-B* アリルは *Mamu-B* と高いホモロジーを有しており、カニクイザルの MHC クラス I B 遺伝子座由来の塩基配列であることが示唆された。

D. 考察

MHC 遺伝子のうち特定のアリルを検出する方法の開発は、HLA で最も進められており、HLA のアリルタイピングはヒト由来のアロ抗血清を用いた解析方法が中心である。しかし、サル類には血清学タイピングに用いる標準抗血清が存在しない為に上記の方法は適用できない。一方で分子生物学的手法の発展に伴い MHC 遺伝子のタイピングは、PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) 法、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法、PCR-SSP (sequence specific primer) 法、SBT (sequencing based typing) 法、SSCP (single strand length polymorphism) 法を用いた検査法が確立されている。本研究では、カニクイザルの *Mafa-A* アリルを検出する為に PCR-SSP 法を改良したマルチプレックス PCR-SSP 法を採用した。このマルチプレックス PCR-SSP 法に使用するプライマーセットは、*Mafa-A* 特異的なアンチセンスプライマーと 4 または 5 種類のアリル特異的プライマーを混合した。実際にマルチプレックス PCR-SSP 法を用いてアリルを検出可能であるか否か検証する為に、*Mafa-A*01* から *A*14* を各々 pcDAN3.1(-)へ挿入したプラスミドを鋳型として、マルチプレックス PCR-SSP 法を行った。この結果、各々のアリル特異的 PCR 産物を検出することに成功した。この結果を受けて、カニクイザル由来の cDNA について同様の検査を行った。この結果、各々個体特異的な *Mafa-A* アリルを検出することにも成功した。以上の事よりマルチプレックス PCR-SSP 法は、*Mafa-A* アリルを検出する有効な手段であることが判明した。

ヒトのHLAクラスIA遺伝子座は1対の対立遺伝子で構成されているので、1個体から2種類のHLA-Aアレルしか検出されない。しかし、旧世界ザルではMHCクラスI遺伝子座が重複しているとの報告があるので、MHCクラスIA遺伝子座のアレルは3つ以上検出される可能性がある。本年度開発したマルチプレックスPCR-SSP法を用いた解析では、1個体より2または3種類のMafa-Aアレルが検出された。この結果より、旧世界ザルに属するカニクイザルもMafa-Aが重複して存在する可能性が示唆された。

MHCクラスIB遺伝子座のアレルを確立するために、ランダムに選抜した10頭のカニクイザルを用い、シークエンス解析を行った。この結果、32種類のB遺伝子座由来と思われる塩基配列が得られた。しかし得られた塩基配列をどの様に分類しMafa-Bアレルを確立すべきかという問題が生じた。HLAでは、標準抗血清の反応性に基づいてアレルの分類を行っているが、この方法は当該遺伝子の全アミノ酸配列に基づくものではなく、一部のアミノ酸の違いに基づいているに過ぎない。更にヒト以外の霊長類では標準抗血清が無いので、標準抗血清によるアレル分類を行うことは不可能である。そこで、Mafa-Bと結合可能な抗原ペプチドモチーフによりMafa-Bアレルを分類する事が最良の手段であると考えたが、Mafa-Bに結合すると推測される8~12残基のペプチドを無数の組み合わせを有する配列より特定することは不可能であった。そこで本研究では、次善の策として塩基配列から予測されるアミノ酸配列を元にNJ法を用いて系統樹を作成し、ある程度までの変異率までを1つのアレルとして認定しようと試みた。試行錯誤の結果、塩基配列から予想されるアミノ酸配列を用いて、 $d < 0.025$ で分類を行えば各々特有性のある塩基配列が同一アレルとして分類された。この分類を用いて解析した結果、32種類の独立した配列は18種類に分類されMafa-B*01からB*18と命名した。

本研究で確立したMafa-BアレルがMHCクラスIB遺伝子座由来の産物であることを確認する為に、Mafa-Bアレルと既に確立されているMamu-A、Mamu-B、Mafa-Aアレルのアミノ酸配列と比較検討を行った。この結果Mafa-BアレルはMamu-Bと高いホモロジーを有していた。

更に種々の霊長類のクラスIA、B、及びC遺伝子座の $\alpha 1-3$ のアミノ酸配列についてNJ法を用いて系統樹を作成した。この結果、各霊長類由来のA、B、C遺伝子座は各々のクラスターを形成し、Mafa-B*01~A*18は他の霊長類のB遺伝子座と同じクラスターに属していた。以上の結果により、本研究で確立したMafa-Bの塩基配列は、MHCクラスIB遺伝子座由来の塩基配列であることが示唆された。

E. 結論

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座のアレルを明らかにした。

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, Yamada A : Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol.* 2003 Apr;32(2):105-10

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
Nakao A, Kimata, H, Imai T, Teshigawara O, Nagasaka, T, Goshima F, Nishiyama Y	Construction of recombinant herpes simplex virus type 1 expressing green fluorescent protein without loss of any viral genes.	Annals Oncol	in press		
Mori I, Yokochi T, Koide N, Sugiyama T, Yoshida T, Kimura Y, Naiki H, Matsubara R, Takeuchi T, Nishiyama Y	PCR search for HSV-1 genome in the brain section of patients with familial Alzheimer's disease.	J Clin Microbiol	in press		
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
Asano S, Yoshikawa T, Kimura H, Enomoto Y, Ohashi M, Terasaki H, Nishiyama Y	Monitoring herpesvirus DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR.	J Clin Virol	in press		
Mori I, Kimura Y, Naiki H, Matsubara R, Takeuchi T, Yokochi T, Nishiyama Y	Limited reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease.	J Med Virol	in press		
Teshigahara O, Goshima F, Takao K, Kohno, S, Kimata H, Nakao A, Nishiyama, Y	Oncolytic viral therapy for breast cancer with herpes simplex virus type 1 mutant HF10.	J Surg Oncol	85	42-47	2004
Nishimura H, Yajima T, Kagimoto Y, Ohata M, Watase T, Kishihara K, Goshima F, Nishiyama Y, 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		
Kanamori M, Watanabe S, Honma R, Kuroda M, Imai S, Yamamoto N, Nishiyama Y, Kawaguchi Y	Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein induces expression of thymus and activation-regulated chemokine in B cells.	J Virol	in press		
Kudoh A, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura T, Fujita M, Kiyono T, Nishiyama Y, 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

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Niimi A, Limsirichaikul S, Yoshoda S, Iwai S, Masutani C, Hanaoka F, Kool ET, Nishiyama Y, Suzuki M	Palm residue mutant in DNA polymerases α and η alter DNA replication fidelity and translesion activity.	Mol Cell Biol	in press		
Enomoto Y, Enomoto K, Kitamura T, Kanda T	The keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a represses the growth of cervical cancer cell Lines.	Oncogene	in press		2004
Sugiura S, Goshima F, Takakuwa H, Sata T, Nakashima T, Nishiyama Y	Treatment of solid sarcomas in immunocompetent mice with novel oncolytic herpes simplex viruses.	Otolaryngol Head Neck Surg	in press		
Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T, Kimura Y	Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host.	Rev Med Virol	in press		
Nishiyama, Y	Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well.	Rev Med Virol	14	33-46	2004
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	17	1392-1394	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
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	88	F483-486	2003
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	148	813-825	2003
Enomoto K, Enomoto Y, Ishii Y, Araie M., Kanda T	Genes up- or down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a.	BBRC	303	580-585	2003

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
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	489-495	2003
Nawa A, Nozawa N, Goshima F, Nagasaka T, Kikkawa F, Niwa Y, Nakanishi T, Kuzuya K, 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
Kimata H, Takakuwa H, Goshima F, Teshigahara O, Nakao A, Kurata T, Sata T, Nishiyama Y	Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex virus.	Hepato-Gastroenterology	50	961-966	2003
Mori I, Goshima F, Koshizuka T, Koide N, Sugiyama T, Yoshida T, Yokochi T, Nishiyama Y, 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
Kato K, Yokoyama A, Tohya Y, Akashi H, Nishiyama Y, 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
Ihira M, Yoshikawa T, Ohashi M, Enomoto Y, Akimoto S, Suga S, Hiroo S, Nishiyama Y, Asano Y	Variation of human herpesvirus 7 shedding in saliva.	J Infect Dis	188	1352-1354	2003
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	32	105-110	2003
Sugiura S, Yoshikawa T, Nishiyama Y, Morishita Y, Sato E, Hattori 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
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	70	267-272	2003
Yoshikawa T, Yoshida J, Hamaguchi M, Kubota T, Akimoto S, Ihira M, Nishiyama Y, 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

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
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	497-505	2003
Yoshikawa T, Goshima F, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Asano Y, Nishiyama Y	Human herpesvirus 6 infection of human epidermal cell line: pathogenesis of skin manifestations.	J Med Virol	71	62-68	2003
Kudoh 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
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	1589-1594	2003
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
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	77	3204-3216	2003
Ogata T, Kozuka T, Kanda T	Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA.	J Virol	77	9000-9007	2003
Takeda A, Igarashi H, Nakamura H, Kano M, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Nagai Y, 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
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	56	139-141	2003
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