

200400063A

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

サル等を用いたウイルスベクターの  
安全性・有効性の評価に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 17 (2005) 年 3 月

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

サル等を用いたウイルスベクターの  
安全性・有効性の評価に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 17 (2005) 年 3 月

サル等を用いたウイルスベクターの  
安全性・有効性の評価に関する研究班

区分	氏名	所 属	職名
班長	倉田 毅	国立感染症研究所	所長
班員	神田 忠仁	国立感染症研究所遺伝子解析室	室長
	俣野 哲朗	東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻微生物学講座	助教授
	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
	近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部 微生物学講座第1	教授
	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
	佐多 徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
	寺尾 恵治	国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター	センター長

## 目 次

### I. 総括研究報告書（平成 16 年度）

- サル等を用いたウイルスベクターの安全性・有効性の評価に関する研究…………… 1  
班長 倉田 毅（国立感染症研究所長）

### II. 分担研究報告

1. アデノ随伴ウイルスベクターの開発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. サル個体レベルにおけるセンダイウイルスベクターを用いた  
遺伝子発現・免疫誘導システムに関する研究…………… 17  
俣野 哲朗（東京大学大学院医学系研究科助教授）
3. 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…………… 24  
西山 幸廣（名古屋大学大学院医学研究科教授）
4. ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6, HHV-7 を利用したベクターの安全性評価…………… 29  
近藤 一博（東京慈恵会医科大学医学部教授）
5. 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…………… 32  
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）
6. 遺伝子治療用ベクターの安全性評価に関する研究…………… 34  
佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部長）
7. サルをモデルとするウイルスベクターの安全性・有効性評価に関する研究…………… 37  
寺尾 恵治（国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター長）

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 45

# 1. 総括研究報告書

## サル等を用いたウイルスベクターの安全性・有効性の 評価に関する研究

主任研究者 倉田 毅 (国立感染症研究所長)

**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。新たに分離した AAV10、11 型をもとにベクターを作製し、カニクイザル及びマウス静脈へ接種した。これらのベクターは従来の 2 型ベクターと抗原性が異なり、臓器親和性も一部が異なっていた。特に、11 型ベクターが肝臓に検出されないことは注目に値する。粒子そのものの毒性も認められず、特定の臓器を標的とする遺伝子治療用ベクターの素材となる。一方、ベクターは体内に長く留まるので、AAV2 型ベクターと同様、動態や消長に関してさらに検討が必要である。ヒト 19 番染色体に存在するインシュレーターを同定した。ベクターへの搭載が可能な 25 塩基長程度のインシュレーターなので、導入遺伝子の長期発現に役立つ可能性がある。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と特異的 CTL の誘導、SeV 特異的 CTL の誘導が起こった。抗原特異的 CTL の維持のために SeV ベクターを複数回経鼻接種しても、特に安全上の問題は生じなかった。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、頭頸部癌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。これまでの再発性乳癌を対象とした臨床試験の結果とあわせ、HF10 を癌に感染させる治療方法は患者の負担を避けながら QOL の維持や改善に有効であることを示している。ヒトヘルペスウイルス 6 型(HHV-6)ベクターは NK 細胞に、HHV-7 ベクターはマクロファージに効率的に遺伝子導入できることがわかった。これらの細胞への遺伝子導入は、これまで有効な方法が無く、HHV-6 及び -7 ベクターの発展が望まれる。

### 分担研究者

神田 忠仁	アデノ随伴ウイルスベクターの開発と安全性・有効性の評価に関する研究	近藤 一博	ヒトヘルペスウイルス 6、7 型ベクターの安全性・有効性に関する研究
俣野 哲朗	センダイウイルスベクターの安全性・有効性の評価に関する研究	北村 義浩	レンチウイルスベクターの安全性・有効性に関する研究
西山 幸廣	癌の治療を目的とする単純ヘルペスウイルスベクターの開発	佐多 徹太郎	ウイルスベクターの病理学的安全性評価に関する研究
		寺尾 恵治	サルをモデルとするウイルスベクターの安全性・有効性評価に関する研究

## A. 研究目的

ウイルスベクターを患者に直接注入する遺伝子治療では、ベクター粒子に対する免疫応答とベクターの体内動態、消長が安全性評価の基盤となる。即ち、キャプシド蛋白質と細胞表面の受容体分子との選択的な結合が、ウイルスベクターの標的臓器・組織を決め、キャプシド蛋白質が患者の免疫系との関わりにおいて最も重要な抗原となる。ベクターが持つウイルス由来の核酸は、導入遺伝子が細胞質に存在するか、核に運ばれるか、染色体に組み込まれるか、等を決め、また導入遺伝子の複製の有無も決める。これらの性質は各ウイルスベクター固有のもので、モデルベクターを使って解析できる。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは心筋や骨格筋に直接注入する治療戦略で臨床試験が計画されており、センダイウイルス(SeV)ベクターは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ワクチン抗原を接種する道具として注目されていることから、これら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、臨床試験の安全性・有効性の評価に役立てるのが研究の主要な目的である。また、NK細胞やマクロファージに選択的な遺伝子導入ができるヒトヘルペスウイルス6、7型ベクターや癌の治療を目的とする単純ヘルペスウイルスベクター、改良型レンチウイルス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ベクターとSeVベクターはそれぞれ神田と俣野が製造し、寺尾と協力してサル接種実験を行った。サル組織の病理学的な検討は佐多が担当した。単純ヘルペスウイルスベクターの臨床試験は西山が行い、ヒトヘルペスウイルス6、7型ベクターの開発は近藤、レンチウイルスベクターの開発は北村が担当した。

- 1) AAV2、10、及び11型モデルベクターを作り、混合して5頭のカニクイザルに全身投与した。ベクターが持つEGFP遺伝子にアミノ酸は換えず塩基のみを置換した変異を導入し、2型、10型、11型ベクターゲノムを識別できるよう工夫した。3頭を90日

目に解剖し、2頭は観察を続けた。臓器片から抽出したDNAに含まれるベクターDNAをPCRで増幅し、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) COS-1細胞表面の糖鎖をヘパリナーゼ及びコレラ菌シアリダーゼで分解したり、O結合型のグリコシル化を阻害して、AAV2、4、8、10、及び11型ベクターの感受性の変化を調べた。
- 3) ヒト19番染色体のAAVS1領域に見出したインシュレーター活性が、どの塩基配列に担われているか丹念に解析した。ゲルシフト法によって、HeLa細胞核抽出液中のインシュレーター結合蛋白質を検出した。(神田)
- 4) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症の治療にHIVベクターを使う場合を想定し、ベクターによるHIVの複製促進の可能性を調べた。プロトタイプHIVベクターであるHXNベクターをコードするプラスミド(pHXN)DNAとHIVの感染性クローン(pLAI)DNAを293細胞に同時に導入しHIVの産生量を調べた。(北村)
- 5) アカゲサルにDNAワクチンとGag抗原発現SeVベクター(SeV-Gag)併用によるプライム・ブーストワクチン接種実験を行い、ベクターの複数回接種によるCTLの維持と、安全性を検討した。これまでにDNAプライム・SeV-Gagブーストワクチンを接種し、SHIVをチャレンジしたアカゲサルを用いた実験では、サル2頭に初回のSeV-Gag経鼻接種後190週目にF遺伝子を欠損させた非複製型SeVベクター(F(-)SeV-Gag)を経鼻接種した。サル1頭には初回のSeV-Gag経鼻接種後153週目及び160週目の2回にわたりF(-)SeV-Gagを経鼻接種した。ナイーブ・カニクイサル2頭には、F(-)SeV-Gagの経鼻接種を行なった後、7週目に再度F(-)SeV-Gagを経鼻接種ないし筋肉内接種した。これらのサルの末梢血単核球とGag発現ワクシニアウイルス(Vv-Gag)感染あるいはSeV感染autologous B細胞の共培養によりインターフェロンが誘導されたCD8陽性Tリンパ

球数を FACS にて測定し、Gag 特異的あるいは SeV 特異的 CTL レベルを解析した。  
(俣野)

- 6) 再発性頭頸部癌患者 2 名を対象に、単純ヘルペスウイルス弱毒株 HF10 を接種する第 I 相/II 相臨床試験を行った。患者の皮膚、皮下の腫瘍内にウイルス液 0.5-1 ml (1 x 10<sup>4</sup> PFU から 1 x 10<sup>5</sup> PFU の HF10 を含有) を 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べた。(西山)
- 7) HF10 の膀胱がんに対する抗腫瘍作用を調べるため、Immunocompetent なマウスを担がん動物とした評価系を樹立した。また、腹水貯留型の腹膜播種モデルを作製した。様々な大きさの腫瘍塊を対象に、どのような濃度、容量、回数での接種が感染効率を高めるのかについて検討した。(西山)
- 8) HF10 をヘルパーウイルスとし、ヒト及びマウスの GM-CSF、IL-12、TNF- $\alpha$  などを CMV プロモーターの制御下に発現する HSV アンプリコンを作製した。(西山)
- 9) HHV-6 および HHV-7 ベクターが感染する細胞種と、遺伝子導入率を調べた。EGFP を発現する HHV-6 および HHV-7 ベクターを作製し、末梢血中リンパ球や各種細胞株に感染させた。phycoerythrin (PE) ラベルした抗細胞表面マーカーモノクローナル抗体で細胞表面を染色し、ウイルスベクターから発現する EGFP との 2 色解析を FACS で行った。
- 10) HHV-6 および HHV-7 の組織特異性に関係する遺伝子を知るために、臍帯血由来 T 細胞では増殖する遺伝子欠損株を作製し、他の細胞種におけるウイルス増殖を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所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) 2 型、10 型、11 型ベクターの混合溶液を経静脈接種して 90 日後のカニクイザルで、2、10 型ベクターは主に脾臓、肝臓、各リンパ節、扁桃などに検出された。11 型ベクターは脾臓、各リンパ節、扁桃などに認められたが、肝臓では検出されなかった。いずれのベクターが検出された臓器にも異常な病理所見は認められなかった。(神田、佐多)
- 2) AAV2 型の感染受容体はヘパラン硫酸分子であること、AAV4 型の感染にも細胞表面のシアル酸が重要であることが分かった。(神田)
- 3) AAVS1 内の 2 つの独立した新規インシュレーターが存在が明らかになり、インシュレーターのコア配列が示された。HeLa 細胞の核内には、これらのインシュレーターに特異的に結合する蛋白質が存在していた。(神田)
- 4) pHXN と pLAI が同時に存在すると HIV 産生量は低下した。pHXN に中央部多プリン領域の上流 (dZ) を挿入したベクター (pHXN-dZ) DNA と pLAI を co-transfect すると HIV の産生量はさらに低下した。dZ が HIV の RNA 量を低下させることが明らかになった。(北村)
- 5) 初回の SeV-Gag 経鼻接種後 190 週目に F(-)SeV-Gag を経鼻接種したサル 2 頭で、効率よい Gag 特異的 CTL レベルの上昇が認められた。その誘導効率は、初回接種 (チャレンジ前) と同程度であった。初回の SeV-Gag 経鼻接種後 153 週目及び 160 週目の 2 回にわたり F(-)SeV-Gag を経鼻接種したサルでは、1 回目及び 2 回目のベクター接種共に効率良く Gag 特異的 CTL が誘導された。F(-)SeV-Gag の経鼻接種を行なった後、7 週目に再度 F(-)SeV-Gag を経鼻接種ないし筋肉内接種したナイーブ・カニクイザルでは、初回の SeV-Gag ベクター経鼻接種により、効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が認められたが、2 度目の接種では経鼻接種によって Gag 特異的 CTL レベルの上昇が認められたものの、筋肉接種による

Gag 特異的 CTL の誘導効率は低かった。  
(俣野)

- 6) HF10 を接種したいずれの患者においても、痛み、局所発赤などは認められなかったが 1 名の患者では接種後 3-4 日目に軽度の発熱が認められた。また、HSV に対する抗体価の上昇は認められなかった。(西山)
- 7) マウス膀胱癌由来細胞 MBT-2 を用いて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。In vivo passage の癌組織を膀胱内に移植後、3 日目に HF10 ( $1 \times 10^5$  PFU) を 3 回投与した群で生存期間の有意な延長と生存率の上昇が認められた。(西山)
- 8) 抗腫瘍作用増強のためにアンプリコンを利用する場合には、HF10 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。CMV プロモーターの下流にマウス及びヒトの GM-CSF 遺伝子を組み込んだアンプリコンプラスミドを作製し、HF10 を用いて複製させた。この stock の感染価は  $1.2 \times 10^8$  pfu/ml で、アンプリコンは  $1.25 \times 10^6$  unit/ml であった。Vero 細胞に moi3 で感染させると、medium 中には 30-70 ng/ml の GM-CSF が検出された。(西山)
- 9) HHV-6 が効率よく遺伝子導入できる血液細胞は、CD4(+)T 細胞とナチュラルキラー(NK)細胞であった。NK 細胞に対する遺伝子導入効率は非常に高いことが分かった。HHV-7 は、CD4(+)T 細胞とマクロファージに遺伝子導入した。(近藤)
- 10) HHV-6 の U2 から U8 遺伝子を欠損させると臍帯血由来 CD4(+)T 細胞と CD4(+)T 細胞株 Molt-3 では増殖できるが、同じ CD4(+)T 細胞株である MT-4 細胞では感染細胞がアポトーシスを起こし、増殖できなかった。この増殖抑制は、U5, U7, U8 領域を exon とする U875 遺伝子の導入で緩和され、U875 遺伝子が感染細胞のアポトーシスの抑制機能を持つことが示唆された。(近藤)

#### D. 考察

- 1) 静脈に接種した AAV2、10、11 型ベクターは、カニクイザルやマウスの脾臓・リンパ系組織には共通に感染したが、一部の臓器への感染効率は異なり、臓器親和性の相違が示された。特に、11 型ベクターが肝臓に検出されないことは注目し得る。今後、臓器親和性の特異性を向上させれば、標的臓器を狙った治療が可能になる。いずれのベクターが検出された臓器にも異常な病理所見は認められず、どの血清型の AAV ベクターも粒子そのものの毒性は極めて低いことがわかった。カニクイザル体内の AAV2、10、11 型ベクターは接種 90 日経過しても、脾臓、リンパ系組織を中心に多量に体内に残っており、さらに長期の観察を続けて、その消長を明らかにする必要がある。(神田、佐多)
- 2) AAV8、10 型の感染受容体分子は細胞表面のシアル酸を含む分子らしい。11 型の感染受容体分子にはシアル酸は関わらない。血清型による臓器親和性の差は、少なくとも一部は細胞表面の感染受容体分子の違いに担われていると思われる。(神田)
- 3) AAVS1 領域の 2 つのインシュレーターをベクターへ応用できれば、導入遺伝子の長期間にわたる安定的な発現を可能にすることができる。
- 4) HIV ベクターが野生型 HIV と共存しても必ずしも HIV の増殖を促進しないことが示された(北村)
- 5) 比較的長期間を隔てれば、2 回目以降の SeV ベクター経鼻接種であっても、抗原特異的 CTL は、初回接種時と同様効率よく誘導されることが示された。間隔が比較的短期間(1-2 ヶ月)であっても、2 回目以降の SeV ベクター経鼻接種による抗原特異的 CTL 誘導効率は、ある程度保たれることが示された。したがって、複数回の SeV ベクター経鼻接種は、抗原特異的 CTL 誘導・維持に有効であると考えられる。さらに、これらの結果は、ある程度の SeV ベクターに対する宿主適応免疫存在下においても、SeV ベクター経鼻接種により抗原特

異的 CTL 誘導に至る可能性を示唆している。適切な接種間隔は、今後の検討課題である。(俣野)

- 6) HF10 による転移性乳癌及び頭頸部癌に対する腫瘍の治療は、これまでの臨床試験で重篤な副作用が無く、一定の効果が示されている。今後の発展を期待させる。(西山)
- 7) ヒトの表在性膀胱癌に対して HF10 がどのような効果を示すか、マウスモデルで評価した後に、臨床試験を計画している。
- 8) アンプリコンを用いた HF10 の抗腫瘍作用増強に関する実験的検討が可能になった。今後、腫瘍部局所における GM-CSF の発現量、接種回数などの検討が必要である。(西山)
- 9) HHV-6 ベクターが NK 細胞に、HHV-7 ベクターがマクロファージに効率良く遺伝子導入することがわかった。癌免疫や自己免疫における NK 細胞やマクロファージの機能を修飾するために、HHV-6 及び HHV-7 ベクターが役立つと期待できる。
- 10) HHV-6 では U875 遺伝子産物が、宿主細胞のアポトーシスを抑制することを明らかにした。各遺伝子の機能を順次明らかにすることで、ベクターの安全性、実用性を高めることが重要である。

## E. 結論

AAV10 型、11 型は 2 型と抗原性が異なり、臓器親和性も一部が異なっていた。粒子そのものの毒性も認められず、新たな遺伝子治療用ベクターの素材となる。経静脈投与されたベクターは、体内に長く留まるので、動態や消長に関してさらに検討が必要である。AAVSI のインシュレーターはベクターに搭載可能な大きさである。

SeV ベクターの複数回経鼻接種は抗原特異的 CTL 誘導・維持に有効であり、特に安全上の問題は見つかっていない。

再発性乳癌や頭頸部癌に対する HF10 の臨床試

験は、この治療方法が患者の負担を避けながら QOL の維持や改善に有効であることを示している。

HHV-6 や HHV-7 ベクターは、従来遺伝子導入が困難であった細胞 NK 細胞やマクロファージに効率的に遺伝子導入でき、今後の開発が期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

神田

1. Kondo, K., Ishii, Y., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Prophylactic capsid vaccine against multiple high-risk human papillomaviruses: the chimeric L1-capsid presenting the common neutralization L2-epitope. Vaccine, in press, 2005.
2. Ishii, Y., Ozaki, S., Tanaka, K., and Kanda, T.: Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. Virus Genes, in press, 2005
3. Matsumoto, K., Yasugi, T., Oki, A., Fujii, T., Nagata, C., Sekiya, S., Hoshiai, H., Taketani, Y., Kanda, T., Kawana, T., and Yoshikawa, H. : IgG Antibodies to HPV 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. Cancer Letter, 2005 in press
4. Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., and Kanda, T.: Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. Virology, 330:375-383, 2004.
5. 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, 23:5014-5022, 2004.

俣野

1. Lun WH, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Sata T, Nagai Y, Matano T. Loss of virus-specific CD4+ T cells with increases in

- viral loads in the chronic phase after vaccine-based partial control of primary simian immunodeficiency virus replication in macaques. *J Gen Virol* 85:1955-1963, 2004.
2. Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 199:1709-1718, 2004
  3. Kato M, Igarashi H, Takeda A, Horie S, Higashihara E, Matano T. Stimulation of virus-specific T cell responses by dendritic cell vaccination in the chronic phase of simian AIDS models. *Jpn J Infect Dis* 57:220-223, 2004
  4. Kato M, Igarashi H, Takeda A, Sasaki Y, Nakamura H, Kano M, Sata T, Iida A, Hasegawa M, Horie S, Higashihara E, Nagai Y, Matano T. Induction of Gag-specific T-cell responses by therapeutic immunization with a Gag-expressing Sendai virus vector in macaques chronically infected with simian-human immunodeficiency virus. *Vaccine*, in press.
  5. 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. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 130: 470-478 (2004).
  6. 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. *Journal of Surgical Oncology* 85: 42-47. (2004).
  7. Ihira, M., Yoshikawa, T., Enomoto, Y., Akimoto, S., Ohashi, M., Suga, S., Nishimura, N., Ozaki, T., Nishiyama, Y., Notomi, T., Ohta, Y. and Asano, Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, Loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 140-145. (2004).
  8. 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. *Journal of Virology* 78: 3984-3993 (2004).
  9. 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 polymerases  $\alpha$  and  $\eta$  alter DNA replication fidelity and translesion activity. *Molecular and Cellular Biology* 24: 2734-2746 (2004).

#### 西山

1. 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. *Journal of Virology* 78:104-115 (2004).
2. Nishiyama, Y. Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well. *Review in Medical Virology* 14: 33-46 (2004).
3. 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. *Journal of Clinical Virology* 29: 206-209 (2004).
4. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 936-937 (2004).
5. 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. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 130: 470-478 (2004).
6. 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. *Journal of Surgical Oncology* 85: 42-47. (2004).
7. Ihira, M., Yoshikawa, T., Enomoto, Y., Akimoto, S., Ohashi, M., Suga, S., Nishimura, N., Ozaki, T., Nishiyama, Y., Notomi, T., Ohta, Y. and Asano, Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, Loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 140-145. (2004).
8. 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. *Journal of Virology* 78: 3984-3993 (2004).
9. 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 polymerases  $\alpha$  and  $\eta$  alter DNA replication fidelity and translesion activity. *Molecular and Cellular Biology* 24: 2734-2746 (2004).
10. Yoshikawa, T., Ihira, M., Akimoto, S., Usui, C., Miyake, F., Suga, S., Enomoto, Y., Suzuki, R., Nishiyama, Y. and Asano, Y. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1348-1352 (2004).
11. Suda, N., Ito, Y., Imai, T., Kikumori, T., Kikuchi, A., Nishiyama, Y., Yoshida, S., and Suzuki, M. The  $\alpha$  4 residues of human DNA topoisomerases II  $\alpha$  function in enzymatic activity and anticancer drug sensitivity. *Nucleic Acids Research* 32: 1767-1773 (2004).
12. Mori, I., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara R., Takeuchi, T., Yokochi, T., and Nishiyama, Y. Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *Journal of Medical Virology* 73: 605-611 (2004).
13. 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. *Journal of Virology* 78: 4927-4930 (2004).
14. Nakao, A., Kimata, H., Imai, T., Kimumori, T., Teshigahara, O., Nagasaka, T., Goshima, F. and Nishiyama, Y. Intratumoral injection of herpes simplex HF10 in recurrent breast cancer. *Annals of Oncology* 15: 988-989 (2004).
  15. Tanaka, M., Kodaira, H., Nishiyama, Y., Sata, T., and Kawaguchi, Y. Construction of recombinant herpes simplex virus type 1 expressing green fluorescent protein without loss of any viral genes. *Microbes and Infection* 6: 485-493 (2004).
  16. Nozawa, N., Yamauchi, Y., Ohtsuka, K., Kawaguchi, Y., and Nishiyama, Y. Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly. *Experimental Cell Research* 299: 486-497 (2004).
  17. Sugiura, S., Yoshikawa, T., Nishiyama, Y., Morishita, Y., Sato, E., Beppu, R., Hattori, T. and Nakashima T. Detection of herpesvirus DNAs in perilymph obtained from patients with sensorineural hearing loss by real-time polymerase chain reaction. *The Laryngoscope* 114(12): 2235-2238 (2004).
  18. Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T. and Kimura, Y. Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host. *Reviews in Medical Virology* 14: 209-216 (2004).
  19. Okamoto, S., Yoshikawa, T., Ihira, M., Suzuki, K., Shimokata, K., Nishiyama, Y. and Asano, Y. Rapid detection of varicella-zoster virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Medical Virology* 74: 677-682 (2004).
  20. Ohashi, M., Yoshikawa, T., Asonuma, K., Iwasaki, T., Nishiyama, Y., Asano, Y., Kimoto, Y., Yagi, T., Urushihara, N., Tanaka N. and Baba, K. Human herpesvirus 6 fulminant hepatic failure treated by living donor liver transplantation. *Pediatrics International* 46: 730-732 (2004).
  21. Nishimura, N., Yoshikawa, T., Ozaki, T., Sun, H., Goshima, F., Nishiyama, Y., Asano, Y., Kurata, T and Iwasaki, T. In vitro and in vitro analysis of human herpes -6 U90 protein expression. *Journal of Medical Virology*, 75: 86-92 (2005).
  22. Yamamoto, K., Yoshikawa, T., Okamoto, S., Yamaki, K., Shimokata, K. and Nishiyama, Y. HHV-6 and 7 DNA loads in lung tissues collected from patients with interstitial pneumonia. *Journal of Medical Virology* , 75: 70-75 (2005).
  23. Nagai, H., Wada K., Morishita, T., Utsumi, M., Nishiyama, Y. and Kaneda, T. New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *Journal of Virological Methods* 124: 157-165 (2005).
  24. Koshizuka, T., Kawaguchi, Y. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIFIA. *Journal of General Virology* 86: 527-533 (2005).
  25. Enomoto, Y., Yoshikawa, T., Ihira, M., Akimoto, S., Miyake F., Usui, C., Suga, S., Suzuki, K., Kawana T., Nishiyama, Y. and Asano, Y. Rapid Diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 951-955 (2005).
  26. Kudoh, A., Fujita, M., Zhan, L., Shirata, N., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Nishiyama, Y. and Turumi, T. Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *Journal of Biological Chemistry* (2005), in press.
  27. Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T. and Kimura, Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of NeuroVirology* (2005), in press.
  28. Mori, I., Goshima, F., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura, Y. and Nishiyama, Y. The vomeronasal chemosensory system as a potent route of neuroinvasion by herpes simplex virus. *Virology* (2005), in press.
  29. Mori, I., Koshizuka, T., Goshima, F., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura, Y. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus US11 shows intercellular trafficking activity in the mouse brain. *Molecular Brain Research* (2005), in press.
  30. Nozawa, N., Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Kato, A., Kato, A., Kimura, H. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles. *Journal of Virology* (2005), in press.
- 近藤
1. K. Tanaka-Taya, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Okada S, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 (HHV-6) transmits from parent to child by integration form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *Journal of Medical*

- Virology 2004; 73 (3): 465-73.
2. Takemoto M, Mori Y, Ueda K, Kondo K, Yamanishi K. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *Journal of General Virology* 2004; 85 (4): 869-79.
  3. Shimada K, Kondo K, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein k and casein kinase 2. *Microbiology and Immunology* 2004; 48 (3): 205-10.

#### 北村

1. Zhu D, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A and Kitamura Y. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly-active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy*. in press, 2004.
2. Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J. Virol.* 78: 8437-8445, 2004

#### 2. 学会発表

##### 侯野

1. 侯野哲朗. AIDS ワクチン開発の現状. 第 45 回日本臨床ウイルス学会、大阪、6/12/2004.
2. Matano T, Kobayashi M, Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Iida A, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Yasunami M, Kimura A, Nagai Y. Vaccine-induced CTL-based control of SIV replication in a group of rhesus macaques that share an MHC haplotype. XV International AIDS Conference, Bangkok, Thailand. 7/15/2004.
3. 侯野哲朗、小林政博、五十嵐博子、武田明子. サル免疫不全ウイルス CTL エスケープ変異体の reversion. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/21/2004.
4. 川田真幹、侯野哲朗. CTL 誘導ワクチンによりサル免疫不全ウイルス複製制御が認められたサルの長期的解析. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、静岡、12/9/2004.
5. Matano T. CTL-based control of SIV replication.

第 18 回日本エイズ学会学術集会、静岡、12/9/2004.

##### 近藤

1. 船水 尚武、嶋田 和也、武本 眞清、鎌田 美乃里、山西 弘一、近藤 一博 ヒトヘルペスウイルス(HHV-) 6 の細胞特異性に関わる遺伝子の同定と機能解析 第 52 回日本ウイルス学会 (平成 16 年 11 月 21-23 日 横浜)
2. 近藤 一博、鎌田 美乃里、渡辺 美智子、船水 尚武、山西 弘一 ヒトヘルペスウイルス (HHV-) 6 および HHV-7 の細胞治療への応用 第 52 回日本ウイルス学会 (平成 16 年 11 月 21-23 日 横浜)
3. 嶋田和也、山西弘一、近藤一博 ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 前初期遺伝子 IE2 とスプライシング関連因子 SART3 の相互作用によるウイルス遺伝子の転写後調節 第 52 回日本ウイルス学会 (平成 16 年 11 月 21-23 日 横浜)
4. K. Kondo, K. Yamanishi, and M. Kamada Application of human herpesvirus (HHV-)6 and 7 for the gene therapy vectors. The 29th International Herpesvirus Workshop (平成 16 年 7 月 26-31 日) Reno Nevada USA

##### 寺尾

1. 飯島沙幸、石井孝司、李永仲、岩田奈織子、八木慎太郎、山口健次郎、榎昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、鈴木哲朗、佐多徹太郎、寺尾恵治、宮村達男、明里宏文：C 型肝炎のサル病態モデル開発. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、平成 16 年 11 月

#### 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)

## 11. 分担研究報告

## 1. アデノ随伴ウイルスベクターの開発と安全性の 評価に関する研究

分担研究者 神田 忠仁 (国立感染症研究所遺伝子解析室長)

**研究要旨** アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、患部への直接接種によって治療用遺伝子を標的臓器に導入し、長期にわたって発現させることが可能なベクターとして開発されている。従って、非標的臓器への遺伝子導入に関する情報が安全性の確保には重要である。これまで、ヒトから分離された AAV2 型がベクターの素材として使われてきたが、最近、血清型の異なる AAV がそれぞれ固有の臓器親和性を示すことが明らかになり、標的臓器に適した血清型の AAV ベクターを使う治療戦略が検討されている。我々はカニクイザルから新規に AAV10 型、11 型を分離したので、これらを利用したベクターを作り、臓器親和性を調べた。カニクイザルへ 2 型、10 型、11 型ベクターを経静脈接種し、90 日後の各ベクターの体内分布を調べると、2 型、10 型は脾臓、肝臓、リンパ組織、扁桃などに、11 型ベクターは脾臓、リンパ組織、扁桃などに検出された。11 型は肝臓に検出されなかった。ベクターを尾静脈から接種したマウスの 6 週めの体内動態も、カニクイザルとほぼ同様であった。いずれのベクターが検出された臓器にも異常な病理所見は認められず、2 型同様 10、11 型 AAV ベクター粒子そのものの毒性は極めて低いことがわかった。血清型による臓器親和性の違いは必ずしも厳格ではなく、またベクターは体内に長く留まることが確認された。安全性の確保には非標的臓器への遺伝子導入を防ぐことが重要であり、標的的特異性を高める工夫を加えることが役立つと思われる。また、AAV が選択的に組み込まれるヒト 19 番染色体上の AAVS1 領域に存在するインシュレーター機能を AAV ベクターへ応用するべく、詳細な解析を進めた。

### A. 研究目的

これまで海外の臨床試験で使われた AAV2 型ベクターと、カニクイザルより新たに分離した AAV10、11 型ベクターのサル及びマウスでの体内動態・消長を調べて、患者に直接接種された AAV ベクターによってどのような臓器に遺伝子導入されるかを予測する基盤情報を得る。血清型によって臓器親和性がどの程度異なるか実験的に検証し、AAV ベクターによる標的臓器特異的な遺伝子導入の可能性を探る。AAV ベクターには、治療用遺伝子の長期間にわたる安定的な発現が求められていることから、新たに同定したヒトインシュレーターの機能を解析し、ベクターへの応用をめざす。

### B. 研究方法

- 1) AAV2、4、8、10、11 型のキャプシド蛋白質を作り、マウスに免疫して抗血清を得た。これらの血清による各 AAV ベクターの感染中和活性を調べた。
- 2) AAV ベクターの感染受容体分子としての細胞表面糖鎖の役割を調べた。COS-1 細胞をヘパリナーゼないしコレラ菌シアリダーゼで処理した後に、AAV2 型、4 型、8 型、10 型、11 型ベクターを感染させ、ベクターに組み込んだ  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を調べた。また、O 結合型のグリコシレーションの特異的阻害剤を添加した培養液で増殖させた COS-1 細胞へのベクターの

感染を調べた。

- 3) EGFP 遺伝子を発現する AAV2、4、8、10、11 型ベクターをそれぞれ  $10^9$  ゲノムコピーずつマウス尾静脈から接種し、6 週間後に解剖した。各臓器に存在するベクター DNA を EGFP 特異的プライマーを用いた PCR によって増幅し、検出した。
- 4) EGFP 遺伝子の 129 ないし 162 番目の塩基に HindIII 認識部位を生じる変異を導入して EGFP129 ないし EGFP162 遺伝子を作った。これらの変異遺伝子から作られる蛋白質のアミノ酸配列は野生型と同一である。野生型 EGFP を持つ AAV2 型ベクター、EGFP162 を持つ 10 型ベクター、及び EGFP129 を持つ 11 型ベクターを作成した。同一個体内での体内動態を比較するため、これらのベクターをそれぞれ  $10^{10}$  ゲノムコピーずつ混ぜ、雄 3 頭と雌 2 頭のカニクイザルに大腿静脈から接種した。うち雄 2 頭、雌 1 頭は接種後 90 日目に解剖し、各臓器を回収した。各臓器に存在するベクター DNA を EGFP 特異的プライマーを用いた PCR によって増幅し、検出した。さらに PCR 産物を HindIII で消化し、生じる断片の大きさによってベクターの型を区別した。
- 5) これまでに AAVS1 内の約 300bpDNA 断片がインシュレーター活性を持つことを示してきた。この断片をさらに細分し、ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドの CMV エンハンサーとプロモーターの間に挿入した。このプラスミドを HeLa 細胞に導入し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量を測定して、エンハンサーブロッキング活性を調べた。エンハンサーブロッキング活性を示す最小 DNA 断片をプローブとして、HeLa 細胞の核蛋白質によるゲルシフト解析を行い、インシュレーター結合蛋白質を探索した。

(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（昭和 62 年 11 月 19 日）に沿って、審査委員会に実験計画を申請し、許可を得て行っている。

## C. 研究結果

- 1) AAV10 型、11 型にキャプシド蛋白質のアミノ酸配列が最も近い 8 型、4 型を含め、AAV2、4、8、10、11 型間に中和抗体の交差性は無かった。(図 1、2)
- 2) ヘパリナーゼによる COS-1 細胞表面のヘパラン硫酸分子の切断は、2 型ベクターの感染性を著しく低下させたが、4、8、10、11 型ベクターの感染には影響が無かった。コレラ菌シアリダーゼで切断した場合、4 型ベクターの感染は強く阻害され、8、10 型ベクターの感染は部分的に阻害された。2 型、11 型ベクターの感染には影響が無かった。O 結合型のグリコシレーションを阻害された COS-1 細胞への 4 型ベクターの感染は低下した。
- 3) ベクターをマウス尾静脈から接種後 6 週間に、2 型ベクターは肝臓、脾臓に認められた。4 型ベクターは肺、脾臓、腎臓に、8 型ベクターは心臓、肝臓、腎臓に検出された。10 型ベクターは肝臓、心臓、筋肉、肺、腎臓に検出された。11 型ベクターは筋肉、腎臓、脾臓、肺、心臓に検出された。(図 3)
- 4) 2 型、10 型、11 型ベクターの混合溶液を経静脈接種して 90 日後のカニクイザルで、2、10 型ベクターは主に脾臓、肝臓、各リンパ節、扁桃などに検出された。11 型ベクターは脾臓、各リンパ節、扁桃などに認められたが、肝臓では検出されなかった。3 頭のサルのうち 1 頭では 2 型、10 型ベクターは検出されるものの、11 型ベクターは検出されなかった。いずれのベクターが検出された臓器にも異常な病理所見は認められなかった。(図 4)
- 5) AAVS1 内の約 25bp の 2 つの断片にエンハンサーブロッキング活性が存在し、2 つの独立したインシュレーターの存在が示された。この DNA 断片の塩基配列は極めてよく似ていた。ゲルシフト解析によって、HeLa 細胞の核蛋白質中には、これらの領域に特異的に結合する蛋白質が存在することが示された。この蛋白質は、これまでインシュレーター結合蛋白質として知られている CTCF ではなかった。

## D. 考察

- 1) AAV ベクターを複数回接種する治療戦略では、先に接種したベクターに対する中和抗体の存在が 2 回目以降の接種に影響すると考えられる。AAV2、4、8、10、11 型の間には中和抗体の交差性が無いので、異なる血清型の AAV ベクターを順次使用できる。
- 2) AAV2、10、11 型は、カニクイザルやマウスの脾臓・リンパ系組織には共通に感染したが、一部の臓器への感染効率は異なっていた。特に、肝臓では 2、10 型ベクターが検出されたが、11 型ベクターは検出なかった。いずれのベクターが検出された臓器にも異常な病理所見は認められず、どの血清型の AAV ベクターも粒子そのものの毒性は極めて低いことがわかった。
- 3) 血清型による臓器親和性の差は、少なくとも一部は細胞表面の感染受容体分子の違いに担われていると思われる。8、10 型はシアリダーゼによって細胞表面のシアル酸を切断した細胞への感染性が低下することから、シアル酸の一種を感染受容体分子としているらしい。11 型は、ヘパリナーゼやシアリダーゼで消化された細胞へ非消化細胞と同様に感染したので、8、10 型とは異なる感染受容体分子を利用していると考えられる。
- 4) カニクイザルに経静脈接種された 2、10、11 型ベクターは接種 90 日経過しても、脾臓、リンパ系組織を中心に多量に体内に残っていた。さらに長期の観察を続けて、どの程度長く残るのかを明らかにする必要がある。
- 5) AAVS1 領域の 2 つのインシュレーター活性は 25bp 長の領域に担われているので、AAV ベクターに搭載可能である。この領域に結合する細胞蛋白質の同定を進め、ベクターへ応用できれば、導入遺伝子の長期間にわたる安定的な発現を可能にすることができる。

## E. 結論

AAV10 型、11 型は 2 型と抗原性が異なり、臓

器親和性も一部が異なっていた。粒子そのものの毒性も認められず、新たな遺伝子治療用ベクターの素材として利用できる。経静脈投与されたベクターは、動物体内に長く留まるので、動態や消長に関してさらに検討が必要である。AAVS1 のインシュレーターはベクターに搭載可能な大きさである。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kondo, K., Ishii, Y., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Prophylactic capsid vaccine against multiple high-risk human papillomaviruses: the chimeric L1-capsid presenting the common neutralization L2-epitope. *Vaccine*, in press, 2005.
2. Ishii, Y., Ozaki, S., Tanaka, K., and Kanda, T.: Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. *Virus Genes*, in press, 2005
3. Matsumoto, K., Yasugi, T., Oki, A., Fujii, T., Nagata, C., Sekiya, S., Hoshiai, H., Taketani, Y., Kanda, T., Kawana, T., and Yoshikawa, H.: IgG Antibodies to HPV 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Letter*, 2005 in press
4. Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., and Kanda, T.: Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology*, 330:375-383, 2004.
5. 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*, 23:5014-5022, 2004.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1. AAV10, 11型

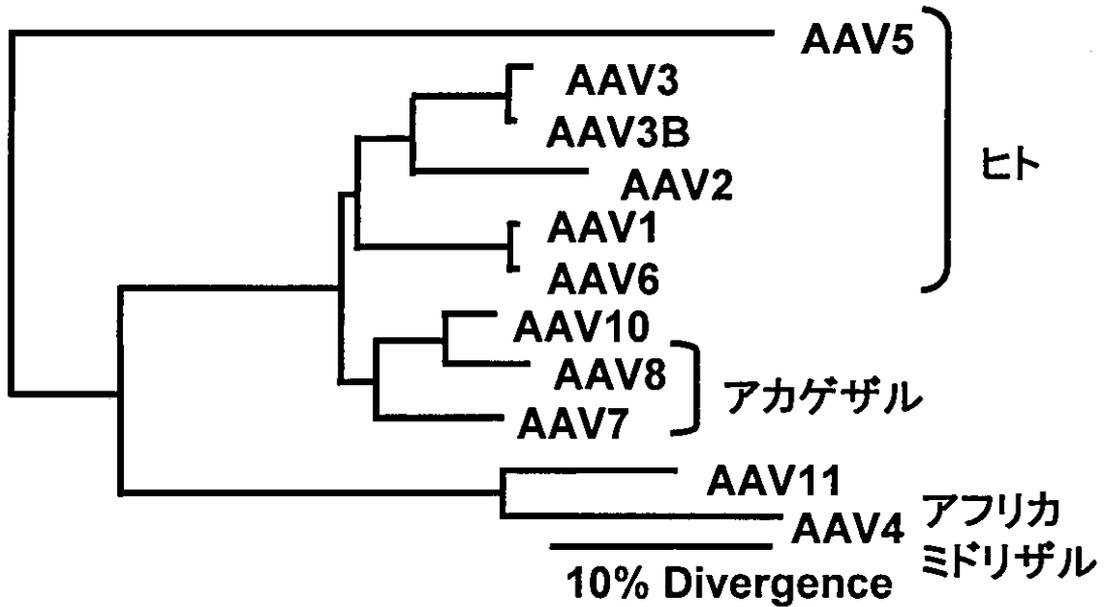


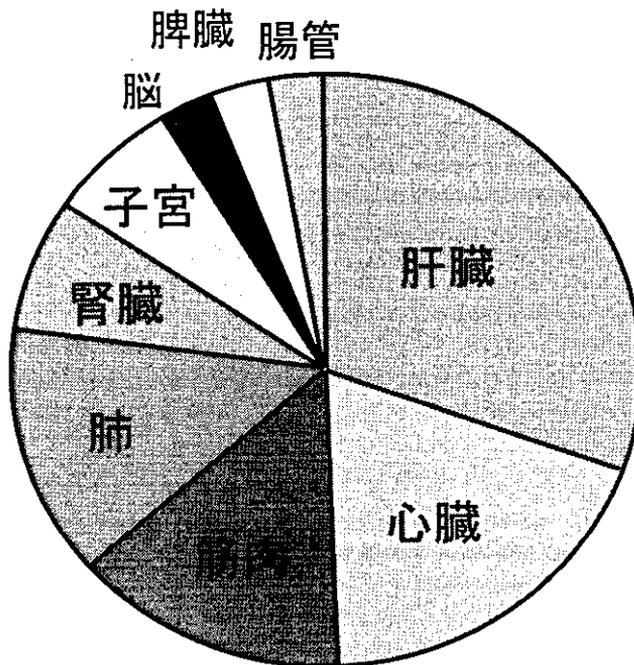
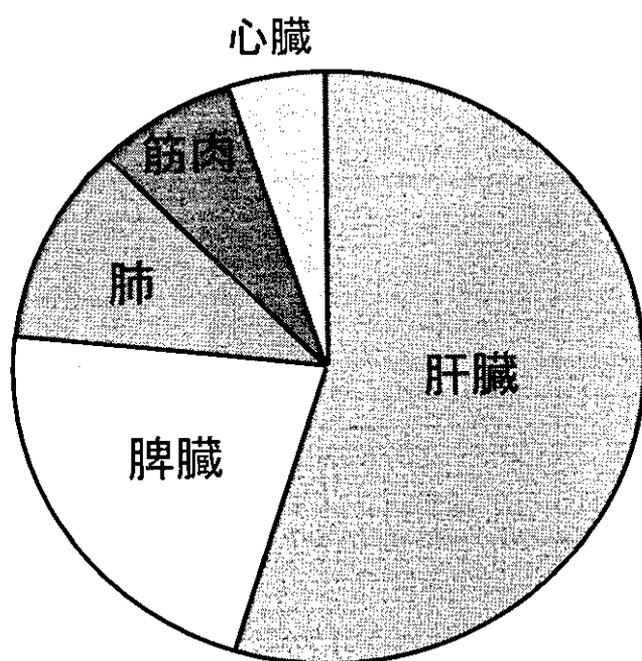
図2. 中和抗体の交差性

Antiserum	Vector				
	AAV2	AAV4	AAV8	AAV10	AAV11
AAV2	1: 160	< 1: 10	< 1: 10	< 1: 10	< 1: 10
AAV4	ND	1: 10240	ND	ND	1: 10
AAV10	< 1: 10	< 1: 10	1: 40	1: 2560	1: 10
AAV11	< 1: 10	1: 160	< 1: 10	< 1: 10	1: 2560

図3. ベクター接種6週間後のマウスでの体内分布

AAV2

AAV10



AAV11

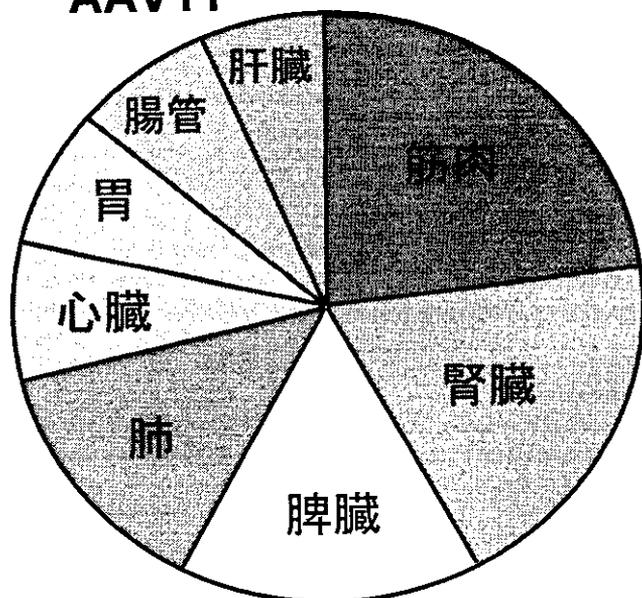


図3. AAV2型ベクターの体内動態(カニクイサル)

