

## 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

分担研究者 俣野 哲朗 (東京大学大学院医学系研究科助教授)

**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、ワクチンへの応用という点においても非常に期待されている。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。我々はこれまで、SeV ベクターのエイズワクチンへの応用の可能性についての検討を重ね、その優れた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能を明らかにしてきた。本研究では、この SeV ベクターを用いたワクチン抗原発現系の長期的な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行なうこととした。今年度は、抗原特異的 CTL の維持を目的とした SeV ベクター複数回接種の可能性の検討を開始した。Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクター経鼻接種後のサル・ヒト免疫不全ウイルス (SHIV89.6PD) チャレンジ実験にて SHIV 複製制御が認められたサル2頭において、チャレンジ後 176 週目 (初回 SeV-Gag 接種後 190 週目) に治療ワクチンとして SeV-Gag 経鼻接種を行なったところ、初回接種時と比較して劣ることなく、非常に効率よく Gag 特異的 CTL が誘導された。短期間 (7 週間) を隔てた 2 回の経鼻接種実験 (サル2頭) でも、その効率は初回接種時と比較して若干劣っていると考えられるものの、2 回目の SeV-Gag 経鼻接種による Gag 特異的 CTL 誘導が認められた。2 回目の SeV-Gag 接種を筋肉内注射とした実験 (サル1頭) では、SeV-Gag 筋肉内接種によっても Gag 特異的 CTL が誘導されることが示されたが、その誘導効率は経鼻接種時と比較して低いと考えられた。本研究により、CTL 誘導・維持を目的とした SeV ベクターの複数回接種は有効であることが示唆された。

### 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

原発現系の長期的な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 ベクター接種後に誘導される Gag 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) についての解析を行なうこととした。特に長期的有効性を考える際には、CTL の維持が重要な課題となるが、この CTL の維持を達成する手段として、ベクターの複数回接種が有力な方法の一つである。そこで今年度は、抗原特異的 CTL の維持を目的とした SeV ベクター複数回接種の可能性の検討を開始した。

## B. 研究方法

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所および東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。また、用いた組換え SeV ベクター等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認（大臣確認）済みである。

SeV-Gag ベクターとしては、F(+)-SeV-Gag ベクター（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）あるいは F(-)-SeV-Gag ベクター（F 遺伝子を欠損させた非複製型 SeV ベクター）を用いた。Gag 特異的 CTL レベルあるいは SeV 特異的 CTL レベルは、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 細胞と末梢血単核球との共培養によりインターフェロン $\gamma$  が誘導された CD8 陽性 T リンパ球を、FACS にて検出することにより測定した。

実験 1（長期間を隔てた SeV-Gag の 2 回接種）：  
DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種後の SHIV89.6PD チャレンジ実験にて、SHIV 複製制御が認められ、3 年以上経過したアカゲサル 2 頭（R99-011、R99-012）を用いた。これら 2 頭では、セットポイント期以降、血漿中ウイルス RNA 量は検出限界以下であった。これら 2 頭に対し、チャレンジ後 176 週目（初回の F[+]SeV-Gag ベクター経鼻接種後 190 週目）に F(-)-SeV-Gag ベクター経鼻接種を行ない、Gag 特異的 CTL レベルあるいは SeV 特異的 CTL レベルの変化を調べた。

実験 2（短期間を隔てた SeV-Gag の 2 回接種）：

DNA ワクチン接種後の SHIV89.6PD チャレンジ実験にて、SHIV 複製制御が認められ、2 年以上経過したアカゲサル 1 頭（R00-022）を用いた。このサルでは、セットポイント期以降、血漿中ウイルス RNA 量は検出限界以下であった。このサルに対し、チャレンジ後 139 週目および 146 週目の 2 回、F(-)-SeV-Gag ベクター経鼻接種を行ない、Gag 特異的 CTL レベルあるいは SeV 特異的 CTL レベルの変化を調べた。

実験 3（短期間を隔てた SeV-Gag の 2 回接種／経鼻接種と筋肉内接種との比較）：

ナイーブ・カニクイサル 2 頭を用いた。まず、F(-)-SeV-Gag ベクターの経鼻接種を行なった後、7 週目に再度 F(-)-SeV-Gag ベクター接種を行ない、Gag 特異的 CTL レベルあるいは SeV 特異的 CTL レベルの変化を調べた。なお、2 回目の接種の際、一方のサル C98-024 には、F(-)-SeV-Gag ベクターの経鼻接種を行ない、もう一方のサル C98-029 には、F(-)-SeV-Gag ベクターの筋肉内接種を行なった。

## 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）：

2 頭ともにおいて、2 回目（チャレンジ後 176 週目）の SeV-Gag ベクター経鼻接種により、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）と比較して劣るものではなかった。2 回目の SeV-Gag ベクター経鼻接種後、SeV 特異的 CTL レベルも大きく上昇しており、SeV-Gag ベクターが効率よく発現したと考えられた。

実験 2（図 2）：

初回（チャレンジ後 139 週目）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。さらに、2 回目（チャレンジ後 146 週目）の SeV-Gag ベクター経鼻接種によっても、その CTL 誘導効率は初回接種時と比較して若干劣

っている可能性はあるものの、Gag 特異的 CTL レベルの上昇が認められた。SeV 特異的 CTL レベルの解析結果からも、初回だけでなく 2 回目の SeV-Gag ベクター経鼻接種時にも、SeV-Gag ベクターが効率よく発現したと考えられた。

#### 実験 3 (図 3) :

両者とも、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。サル C98-024 では、2 回目の SeV-Gag ベクター経鼻接種によっても、その CTL 誘導効率は初回接種時と比較して若干劣っているものの、Gag 特異的 CTL レベルの上昇が認められた。一方、サル C98-029 では、2 回目の SeV-Gag ベクター筋肉内接種により、Gag 特異的 CTL レベルの上昇が認められたものの、その CTL 誘導効率は SeV-Gag ベクター経鼻接種時と比較して低いと考えられた。SeV 特異的 CTL レベルの解析結果も、上記の結果を反映していた。

#### D. 考察

本研究から、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唆された。また、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、ある程度保たれる可能性が示された。したがって、抗原特異的 CTL 誘導・維持を目的とした複数回 SeV ベクター経鼻接種は、有効な方法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おり、臨床応用の際、有利であると考えられる。

一方、筋肉内接種による Gag 特異的 CTL 誘導の可能性も示されたが、経鼻から筋肉内への接種経路の変更が宿主免疫反応の影響の緩和に結びつくかどうかの判定にはいたらず、少なくとも 2 回目以降であっても、経鼻接種を続ける方が有利であることが示唆された。今後、さらに実験を積み重ねて、上記の結果を検証してい

く予定である。

#### E. 結論

本研究により、抗原特異的 CTL 誘導・維持を目的とした SeV ベクターの複数回経鼻接種は有効であることが示唆された。接種間隔については、今後の検討課題である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Lun WH, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Sata T, Nagai Y, Matano T. Loss of virus-specific CD4<sup>+</sup> 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.

## 2. 学会発表

1. 俣野哲朗. 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. 俣野哲朗、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、俣野哲朗. 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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

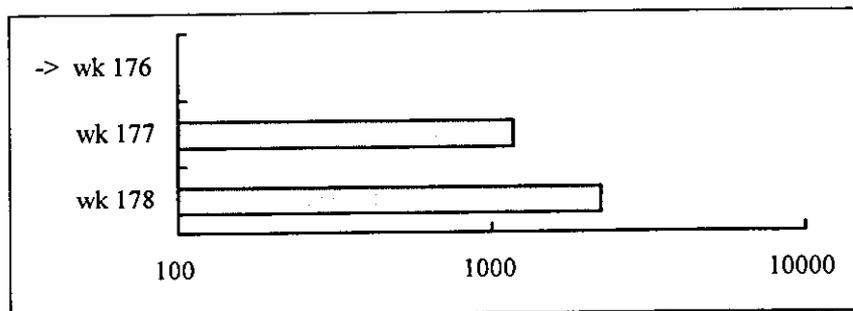
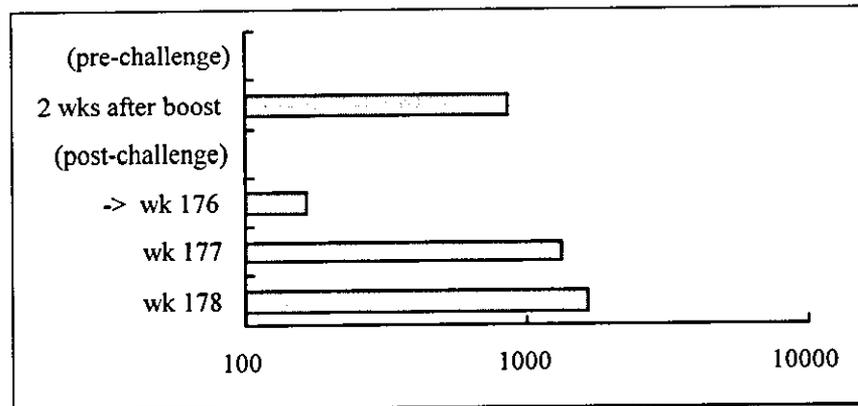
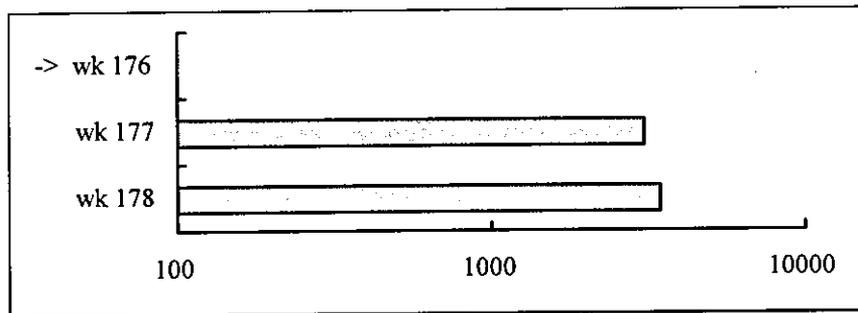
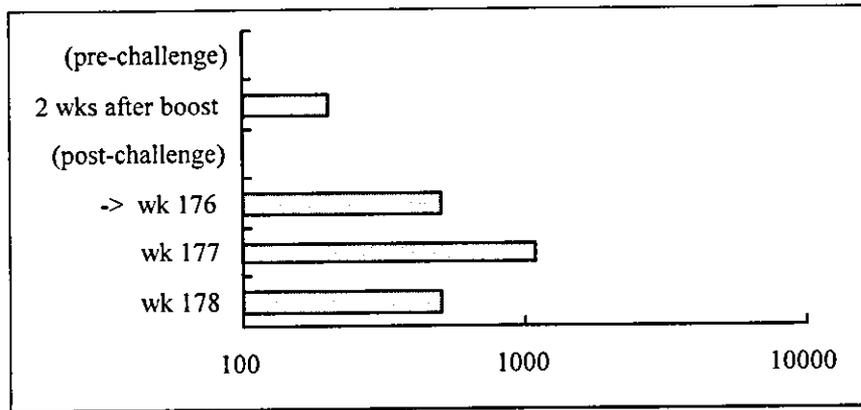


図1 (実験1) 長期間を隔てた複数回 SeV-Gag 接種による CTL レベルの変化。  
 上から順に、サル R99-011 の Gag 特異的 CTL レベル、サル R99-011 の SeV 特異的 CTL レベル、サル R99-012 の Gag 特異的 CTL レベル、サル R99-012 の SeV 特異的 CTL レベルを示す。

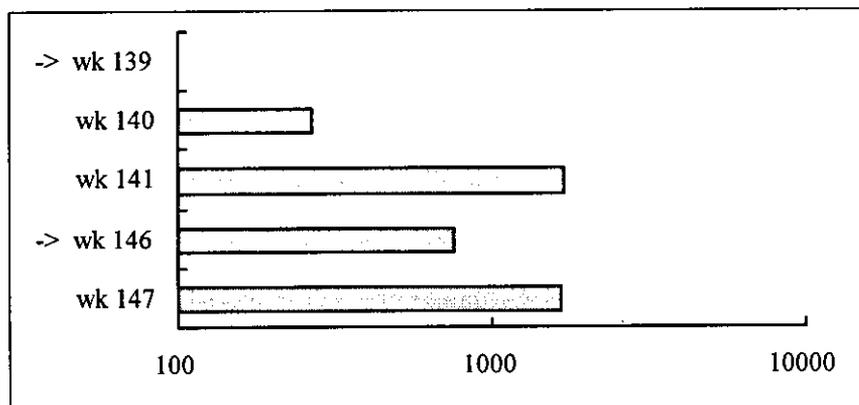


図2 (実験2) 短期間を隔てた複数回 SeV-Gag 接種による CTL レベルの変化。  
上から順に、サル R00-022 の Gag 特異的 CTL レベル、サル R00-022 の SeV 特異的 CTL レベルを示す。

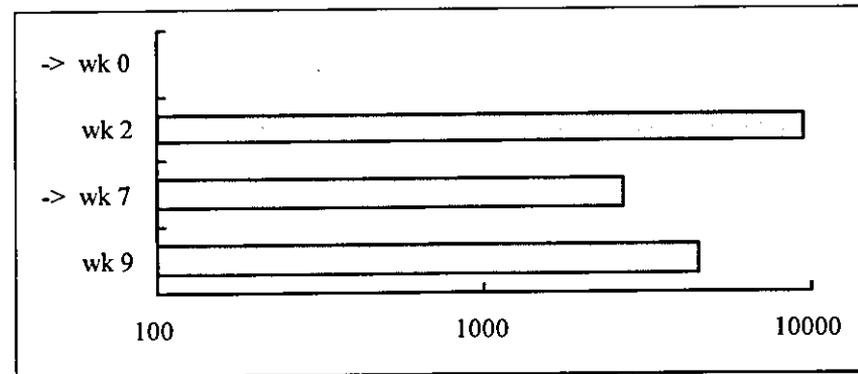
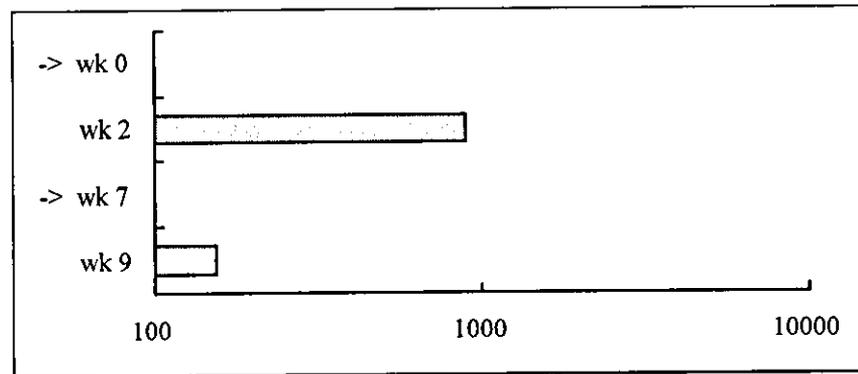
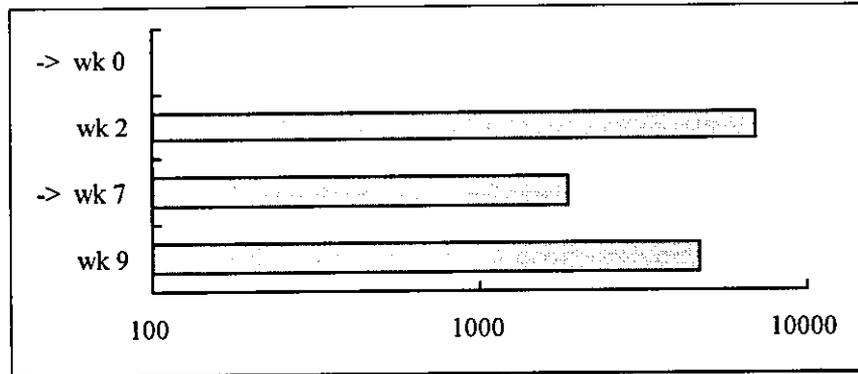
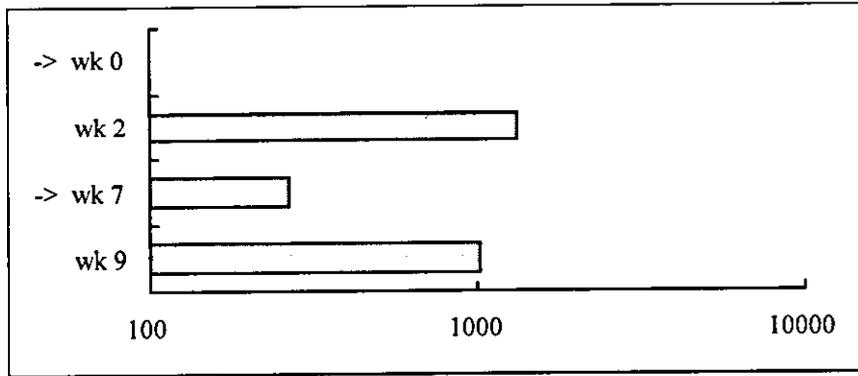


図3 (実験3) 短期間を隔てた複数回 SeV-Gag 接種による CTL レベルの変化。  
 上から順に、サル C98-024 の Gag 特異的 CTL レベル、サル C98-024 の SeV 特異的 CTL レベル、サル C98-029 の Gag 特異的 CTL レベル、サル C98-029 の SeV 特異的 CTL レベルを示す。

### 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

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。また HF10 と名付けた変異 HSV-1 に優れた抗腫瘍性を見つけ、名古屋大学医学部倫理委員会等の承認のもとに再発生乳癌を対象に臨床試験を行ってきた。本年度は新たに頭頸部癌を対象に臨床試験を施行した。さらに、HF10 の抗腫瘍作用を増強させるために様々なサイトカインを発現するアンプリコンの作製を行い、その効果について検討した。

#### 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、アンプリコンの作製を試みる。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 に関してはヒトの頭頸部癌を対象に臨床試験(Phase I/II)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 のマスターウイルスバンク、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、多種のヒト病原ウイルスの混入、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。また、毒力については ICR マウスへの腹腔内接種、静脈内接種などで野生株との比較検討を行った。

- 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。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の検討を行った。
- 3) 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 HF10 をヘルパーウイルスとして用いて作製した。
- 4) 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) 再発性頭頸部癌に対する HF10 接種の効果

名古屋大学医学部倫理委員会、IRB 委員会での承認のもと、名古屋大学附属病院(責任研究者 頭頸部・感覚器外科学 中島務教授、藤本保志講師)において、再発性頭頸部癌患者(現在のところ2名)を対象に第 I 相/II 相臨床試験を施行した。患者の皮膚、皮下の腫瘍内にウイルス液 0.5-1ml ( $1 \times 10^4$  PFU から  $1 \times 10^5$  PFU の HF10 を含有)を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3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。

### 2) アンプリコンを利用した抗腫瘍作用の増強

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。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、ヘルパーウイルスとして HF10 を用いてアンプリコン化した。この stock の感染価は  $1.2 \times 10^8$  pfu/ml に対し、アンプリコンは  $1.25 \times 10^6$  unit/ml であった。この stock を Vero 細胞に moi3 で感染させた時、medium 中には 30-70 ng/ml の GM-CSF が検出された。

### 3) 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。

### 4) HF10 と GCV の combination therapy についての基礎研究

我々は以前、hrR3 と hrR3 由来の変異株を用いた動物実験において、これらのウイルス接種と GCV の投与をうまく組み合わせれば、ウイルスの抗腫瘍作用が増強することを報告してきた。一方、HSV TK を発現する腫瘍細胞においては、GCV の投与による直接的細胞傷害作用に加えて、周辺の TK 非発現細胞を傷害する bystander 作用が知られている。しかし、増殖型ウイルスと GCV の組み合わせによる増強作用は他のグループからは報告されていない。そこで、増殖型ウイルス HF10 と GCV 処理がどのような変化を細胞に与えるのかを培養細胞系(Hep2)において検討した。Hep2 細胞に moi3.03, 0.03 で HF10 を感染させ、GCV 処理後、48時間であポトーシスの誘導について検討した。その結果、0.3, 0.03moi での感染において明らかな核の断片化が感染細胞周囲の非感染細胞に認められた。また、DNA ladder が観察された。しかし moi3 での感染では GCV 存在下でもアポトーシスの誘導は抑制された。すなわち、増殖型ウイルスの感染細胞においても GCV 処理による bystander 作用が現れることが示唆された。

### 5) TK-RXP のアポトーシス誘導作用

HSV TK 発現細胞は抗ウイルス剤 GCV によって選択的に殺される。また、TK が発現する周辺の細胞にも gap junction を介して GCV-TP が移動し傷害をうける (bystander effect)。

ウイルスベクターを利用した遺伝子治療を癌に利用しようと様々な工夫が試みられてきたが、必ずしもうまくいっていない。我々は以前 HSV のコードする US11 遺伝子産物を単独発現させると intercellular

trafficking 活性を示すこと、それは US11 の RXP 繰返し配列に依存していることを報告してきた。そこで、TK-RXP 融合蛋白質系発現系を作製し、TK/GCV の有効性を高めることを考えた。様々なコンストラクトを作製し、その活性について検討した。その結果、TK-RXP は intercellular trafficking を示すことが確認された。その過程で、TK-RXP そのものが (GCV の存在なくして) 強いアポトーシス誘導活性をもつことが明らかになった。プロモーターを工夫すれば suicide gene therapy に使用しうるかもしれない。

#### D. 考察

- 1) 現在のところ、GM-CSF 発現アンプリコンと HF10 の combination therapy が HF10 単独と比べ抗腫瘍作用が有意に上昇するとの結果は得られていない。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。
- 2) ヒトの表在性膀胱癌では、BCG を利用した局所療法がよく用いられているが、BCG 療法に抵抗性となる場合も多い。動物実験の結果やヒト膀胱癌細胞に対する HF10 の作用などを考慮すると、ヒトの表在性膀胱癌に対しても HF10 を用いたウイルス療法 (Oncolytic Virotherapy) が有効性を示すかもしれない。

#### E. 結論

再発性乳癌や頭頸部癌に対する 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。アンプリコンを用いた HF10 の抗腫瘍作用増強に関する検討についてもようやく実験系確立の見通しが立ってきた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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., Kikumori, 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 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

分担研究者 近藤 一博 (東京慈恵会医科大学微生物学講座第1 教授)

研究協力者 鎌田 美乃里、嶋田 和也、船水 尚武  
(東京慈恵会医科大学微生物学講座第1)  
山西 弘一 (大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座)

**研究要旨** ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6 と HHV-7 を利用した遺伝子治療用ベクターは、病原性が低く、リンパ球系の細胞に比較的大きな遺伝子を導入でき、ウイルス蛋白の発現の低い潜伏感染状態を利用することによりアレルギー反応などを防ぐことができる可能性がある。また、HHV-6、HHV-7 を利用したベクターは、世界に先駆けて開発したものなので、本邦の知的財産確保にも寄与できると考えられる。本年度は、i) HHV-6、HHV-7 ベクターによって効率良く遺伝子導入可能な細胞種を検討し、HHV-6 が T 細胞とナチュラルキラー細胞への遺伝子導入に、HHV-7 が T 細胞とマクロファージへの遺伝子導入にそれぞれ有効であることを明らかにした。ii) また、HHV-6 感染の臓器特異性を担う遺伝子として新規遺伝子 U875 を同定し、この遺伝子がアポトーシス刺激に感受性の高い細胞での感性特異性に関係することを示唆した。

### A. 研究目的

本研究は、HHV-6、HHV-7 を利用した遺伝子治療用ベクターにおいて、病原遺伝子の同定と除去、潜伏感染の利用と安全性の評価、組織特異性の強化を行なうことによって、できる限り安全なベクターの作成し、その安全性を確認することを目的とする。HHV-6、HHV-7 は、もともと病原性が低いウイルスである上に、潜伏感染状態での遺伝子発現も利用できるため、ベクターも安全性が高い事が期待される。また、病原性の発現に関する遺伝子を同定しこれを取り除くことで、安全性をさらに向上できる。さらに、これらのウイルスはリンパ球向性が高く、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染細胞や、癌免疫の担当細胞への遺伝子導入と治療法の開発が期待されるので、これらの治療に関する有用性を高めることも研究目的とする。

### B. 研究方法

- i) HHV-6、HHV-7 ベクターが遺伝子導入可能な細胞種の検討:

ウイルスベクターの有効性および安全性の評価には、ウイルスベクターの組織特異性の検討が重要となる。これを確認するために、多くの細胞種においてウイルスが侵入しただけで発現できる、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の前初期遺伝子(IE)プロモーター下で enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現する遺伝子発現ユニットを組み込んだ HHV-6 および HHV-7 を作成した。これを、末梢血中リンパ球や各種細胞株に感染させた後、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 にて行なうことにより、HHV-6 および HHV-7 ベクターが侵入可能

な細胞種の同定と、遺伝子導入率の検討を行なった。

ii) 感染の臓器特異性を担う遺伝子の同定と機能解析:

ウイルスベクターの安全性を確保するためには、ウイルスベクターの治療の標的となる細胞のみで遺伝子発現や増殖を行なうことが望ましい。このようなベクターを開発・評価するために、ウイルスの組織特異性に関係する遺伝子の同定と機能解析をおこなった。方法としては、ウイルス遺伝子で増殖に必須ではない可能性のある遺伝子を knock out した組み換えウイルスを、HHV-6 と HHV-7 が最も増殖し易い臍帯血由来 T 細胞を用いて作成し、臍帯血由来 T 細胞での増殖には影響せず、他の細胞種におけるウイルス増殖に影響を与える遺伝子を同定した。また、その遺伝子がウイルス増殖に影響を与える機序も解析した。

### C. 研究結果

i) HHV-6、HHV-7 ベクターが遺伝子導入可能な細胞種の検討:

HHV-6 は、ほとんどすべての細胞種の表面で発現する CD46 分子を感染時の受容体とするため、他種類の細胞に侵入できることが予測された。しかし、実際に上記システムを用いて組織特異性を検討した結果、HHV-6 が効率よく遺伝子発現できる血液細胞は、CD4(+)T 細胞とナチュラルキラー(NK)細胞であることが判明した。特に、NK 細胞に対する遺伝子導入効率は非常に高く、HHV-6 がマクロファージに遺伝子導入するにふさわしいウイルスベクターとなる可能性が示唆された。マクロファージでの EGFP 発現効率が低い理由を検討した結果、HHV-6 に組み込まれた HCMV の IE プロモーターが、マクロファージ内において、HCMV の潜伏感染時と同様に遺伝子発現形式をとり、下流の EGFP の発現が抑制されていることが判明した。

HHV-7 は、CD4 分子を感染受容体とする。侵入可能な血液細胞は予想通り CD4(+)T 細胞とマクロファージであった。また、マ

クロファージに関する遺伝子導入効率は、HHV-6 に比してはるかに高く、HHV-7 がマクロファージに遺伝子導入するにふさわしいウイルスベクターとして発展できることが示唆された。

ii) 感染の臓器特異性を担う遺伝子の同定と機能解析:

HHV-6 の遺伝子 knock out ウイルスの内、ウイルス遺伝子 U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8 を knock out したものは、臍帯血由来 CD4(+)T 細胞と CD4(+)T 細胞株 Molt-3 では良好な増殖を示したが、同じ CD4(+)T 細胞株である MT-4 細胞では増殖できないことが判明した。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ることから、U875 遺伝子がこの細胞特異性に関与していることが判明した。また、この増殖抑制は、感染細胞の apoptosis によって生じることが判り、U875 遺伝子が apoptosis を生じ易い細胞での遺伝子発現やウイルス増殖に重要な働きをすることが判明した。

### D. 考察

今回の検討によって、HHV-6 ベクターが NK 細胞に対して、HHV-7 ベクターがマクロファージに対して、それぞれ非常に有効な遺伝子導入法となることが示唆された。NK 細胞やマクロファージは、最近の innate immunity 研究の発展により、癌免疫や自己免疫に対する作用機序が明らかにされつつある。このため、これらの細胞に遺伝子導入を行い細胞機能を修飾することにより、癌や自己免疫疾患の治療が可能になると考えられる。これまで、NK 細胞やマクロファージに遺伝子導入を効率的におこなう方法がなかったため、HHV-6 と HHV-7 を利用したウイルスベクターはこれらの治療法に関する breakthrough となると考えられる。

また、両者とも CD4(+)T 細胞に対する遺伝子導入法としても非常に有用であることが示された。このことは、当初の目論見通り、抗 human immunodeficiency virus (HIV) 遺伝子の導入による、AIDS 治療のためのベクターとしての有用性も確認された。

一般にヘルペスウイルスの組織特異性は、その

侵入課程よりもむしろ侵入後の遺伝子発現によって規定されることが多い。HHV-6 では、侵入の際の受容体が ubiquitous な分子である CD46 であるため、遺伝子導入する細胞種を限定するためには、ウイルス増殖を規定している遺伝子の同定と解析が必要となる。今回我々は、HHV-6 感染によって誘導される apoptosis を阻害してウイルス増殖を促進するウイルス遺伝子 U875 を同定した。このような遺伝子を複数同定し knock out することにより、ウイルスベクターの感染の特異性を細かくコントロールし、ベクターの安全性を更に向上できるものと考えられる。

## E. 結論

HHV-6 や HHV-7 を基礎としたウイルスベクターは、CD4(+)T 細胞の他、NK 細胞やマクロファージなどの、従来遺伝子導入が困難であった細胞に対しても効率的に遺伝子導入が可能であった。また、感染の特異性を制御する遺伝子の同定に成功し、ウイルスベクターの安全性向上に対する新たな方法論を得ることができた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

## 2. 学会発表

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請中

## 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

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** ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症に対する遺伝子治療に HIV ベクターを用いる場合、すでに感染している HIV とベクターが相互作用して HIV の複製を促進するのではないかと危惧がある。そこでこの状態を模倣するために、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 をヒト胎児腎細胞 293 に co-transfect して HIV ウイルスの産生量を調べた。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の dZ と呼ぶ領域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。中央部多プリン領域の上流の dZ が HIV の RNA 量を低下させることに関わる領域であることが明らかになった。HIV ベクターが野生型 HIV と共存しても必ずしも HIV の増殖を促進するわけではないことが明らかになった。

### A. 研究目的

HIV は(+) 鎖 RNA をゲノムとして有するレトロウイルスであり、ヒト CD4 陽性細胞に感染する。感染細胞内の細胞質でゲノム RNA は逆転写酵素 (RT) によって線状 2 本鎖 DNA に変換される。この DNA 分子は細胞質から細胞核に移行し、細胞核内で宿主ゲノム DNA に組み込みを起こしてプロウイルスとなる。これまで、われわれは中央部多プリン配列の上流の約 100 塩基の領域 (dZ 領域) が細胞核内での組み込みに関わっていることを明らかにしてきた。プロウイルスから RNA が合成され、細胞質に移動してタンパク質合成が起こる。その後、粒子形成が起こる。HIV が感染している細胞に HIV ベクターが同時に存在する場合に、果たして HIV の複製が促進されるのか抑制されるのかは明らかでない。本研究は、この点を明らかにし、かつ、上述の dZ 領域が後期増殖過程にも関わっているかどうかを明らかにする事を目的とする。

### B. 研究方法

まず HIV をベースにしたベクター HXN に dZ 断片を挿入し HXN-dZ ベクター DNA (pHXN-dZ) を作製した。これをヘルパープラスミド DNA とともにヒト培養細胞 293T にトランスフェクトした。ベクター粒子量を p24 量と RNA 量で定量した。HIV の感染性クローン DNA (pLAI) と HXN または pHXN-dZ をヒト胎児腎細胞由来 293 細胞に co-transfect して HIV 産生量を調べた。

(倫理面への配慮)  
該当しない。

### C. 研究結果

抗ウイルス遺伝子治療で dZ を利用するために、dZ を有する HIV ベクター (HXN-dZ) の作製を試みた。HXN ベクターに dZ を挿入した場合でも培養上清中にベクター粒子は形成された。しかし、予想外にこれらのベクター粒子にベク

ターRNA は含まれていなかった。ベクター産生細胞の細胞質と核におけるベクターRNA 量を RT-PCR 法にて調べたところ、HXN-dZ の RNA はベクター産生細胞の核内からは検出できたが、細胞質からは検出されなかった。このことから、HXN ベクターに dZ を挿入することで、ベクターRNA が核外に移動できなくなったことが示唆された。

更に、pHXN の DNA と pLAI の DNA を 293 細胞に co-transfect して培養上清中に放出される粒子量を測定したところ、等モル比で co-transfect した場合に、pLAI DNA を単独で transfect した場合に比べて培養上清中に放出される粒子量が 50%程度に減少していた。粒子量 (p24 量)が少ないということは、pLAI の全長の RNA が細胞質に少ないことを示唆している。Tat タンパク質を競合的に取り合ったためではないかと推測している

pHXN-dZ DNA と pLAI DNA を細胞に co-transfection して培養上清中に放出される粒子量を測定したところ、pHXN と pLAI DNA を co-transfection した場合に比べて、培養上清中に放出される粒子量が等モル比の時と比較するとさらに 30%程度に減少していた。すなわち、pLAI 単独のときの粒子量に比べて 10 - 15% にまで産生量が減少していた。pLAI の全長の RNA が細胞核内でトラップされて核外に移動できていないのではないかと推測している。

#### D. 考察

こ HIV-dZ と HIVLAI が共存した場合にウイルス産生が抑制された機序として、核内にとどまる HXN-dZ の RNA と HIV-1LAI の RNA が dimer などの多量体を形成することで、核外への移動を妨げているのではないかと考えられた。HIV 感染症に HIV ベクターを使用したとしても必ずしも HIV の複製を促進するわけではないことが明らかになった。

#### E. 結論

HIV の増殖後期過程に関わる領域のあることを明らかにした。これを利用して HIV の増殖を制御できる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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* 9: 929-935, 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 6. 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、佐藤 由子、樋口 好美(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、昨年と同様に AAV ベクターを接種したカニクイサル 3 頭および陰性コントロールとして未接種サル 1 頭を病理学的に検討した。その結果、4 頭のサルは肉眼的にも、また組織学的にも所見は認められなかった。PCR 法で EGFP 遺伝子が検出された組織を抗 EGFP 抗体で免疫染色したところ、どの臓器にも抗原は検出されなかった。現在、AAV ベクター検出系を確立するため、AAV/EGFP-integrated Hela cell を用いて、高感度免疫組織化学法による EGFP 抗原の検出と EGFP オリゴプローブを用いた FISH 法による AAV 遺伝子の検出を試みている。この方法を確立し、AAV ベクターが局在する細胞あるいは組織の同定に応用する予定である。

### 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 Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いたサル組織病変およびベクターの局在について解析を行う。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、4%PFA 固定組織および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。EGFP 観察のため、凍結組織から切片を作製した。また染色体標本作製のため、脾臓から脾細胞を分離し、PHA および IL-2

添加培地で 48 時間培養後、標本作製した。脾臓、肝臓、リンパ節、骨髄、生殖腺等の凍結組織切片を作製し、EGFP 抗原について LSAB 法による免疫組織化学染色を行った。さらにより高感度に EGFP を検出するため、EGFP 発現 293T 細胞を使用して通常の免疫染色法と高感度法での EGFP 抗原に対する染色性の比較を行った。FISH 法では AAV ベクターに挿入されている EGFP 遺伝子に対してオリゴプローブを 4 種類作製した。そして EGFP/AAV integrated Hela cell の染色体標本を用いて AAV ベクター検出のための染色条件の検討を行った。

(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

EGFP-AAV ベクターを接種後、3 ヶ月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<#1, #2>、雄 2 頭<#4, #5>)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、4%パラホルムアルデヒドあるいは10%緩衝ホルマリンで固定した。各サル組織から組織片を切り出し、型のごとく組織標本を作製した。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、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頭のサルの各組織には腫瘍性病変は観察されなかった。#4のサルの腎臓、唾液腺、耳下腺の間質にリンパ球浸潤あるいは集簇巣が認められたが、ほか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。

PCR法でEGFPの遺伝子が検出された肝臓、脾臓、リンパ節の組織切片でEGFPを蛍光顕微鏡により直接観察してみたが、対照と比較して有意な所見は認められなかった。また同じ組織で抗EGFP抗体の免疫染色を行ったが、EGFP抗原は検出できなかった。脾臓から分離したリンパ球で作製した染色体標本で、EGFPの遺伝子配列に対するオリゴプローブを用いてFISH法を行ったが、検出はできなかった。

#### D. 考察

ベクター接種後3ヶ月のサルにはAAVベクターによると考えられる直接的な組織への影響はみられなかった。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、そして肝臓、リンパ節からAAVベクターが検出されたが、この期間では組織に与える影響はないと考えられた。

AAVベクターの組織内局在解析が本研究の目的の一つでもある。接種したベクターは染色体に組み込まれるのに必要なrep遺伝子が欠損している。そのため、細胞内ではいずれかの細胞にエピゾーマルの状態で存在し、染色体内に挿入されることはまれである。またベクターはそこで増殖することはない。ベクターに組み込まれたEGFPをマーカーとして組織切片上で直

接蛍光顕微鏡で蛍光発現を、また免疫組織化学法で抗原の検出を試みたが、どちらの解析法でも有意な所見は得られなかった。ベクター接種後3ヶ月後にはEGFPの遺伝子は発現していないかあるいはこれらの解析法での検出限界以下の発現である可能性が示唆された。ベクターの遺伝子レベルでの局在をFISHで検出しようと試みたが、オリゴプローブを用いた方法では検出できなかった。AAVベクターは染色体内でのコピー数が少なく、またエピゾーマルに存在するため、短いオリゴプローブでは可視化できないと考えられる。今回FISH法で検出できなかったのはコピー数が少ないからなのか、それともプローブが原因なのか明確に出来なかったため、今後、AAV野生株が遺伝子に挿入されているHela細胞を用いて、これまでに報告されているAAVで行われているFISH法と我々の系とを比較して、ベクターの検出が可能かどうか確認を行いたい。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、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。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EGFP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。ホルマリン固定組織からのPCR法では一般的に未固定組織に比べて、検出感度が低下してしまうが、今回、4%パラホルムアルデヒド固定後、短時間で包埋した組織から抽出した核酸でもEGFPの遺伝子を検出することが出来た。そこで形態学的変化が認められた場合、その部分を切り取り、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、ベクターの組織指向性を知ることが可能と思われた。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. 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.* 2004, 130: 470-478.
2. Lun WH, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Sata T, Nagai Y, Matano T.: Loss of virus-specific CD4<sup>+</sup> 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* 2004, 85, 1955–1963.
3. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H.: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol.* 85:2981-2989, 2004.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし