

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

分担研究者 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)

研究協力者 明里 宏文、飯島 沙幸、木村 展之、長濱 美香、李 永仲
(国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター)
石井 孝司、吉崎 佐矢香、町田 早苗、鈴木 哲朗、宮村 達男
(国立感染症研究所ウイルス2部)
八木 慎太郎、山口 健次郎、榎 昇(先端生命科学研究所)
佐多 徹太郎、岩田 奈織子(国立感染症研究所感染病理部)

研究要旨 HCVは、ヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しない。このことが治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験を行なう上での大きな障害となっている。本研究ではウイルスベクターによる HCV ワクチン等の安全性・有効性を評価することを目的として、C型肝炎のサロゲート病態動物モデルの開発を試みた。その結果、HCVに最も近縁なサル肝炎ウイルスである GBV-B を新世界ザルの一種であるタマリンに感染することにより、ウイルス増殖に伴う急性C型肝炎様症状を発症させることに成功した。霊長類を用いた本モデルはC型肝炎治療を目的としたウイルスベクターの安全性・有効性評価に有用であると考えられた。

A. 研究目的

現在、本邦におけるC型肝炎ウイルス(HCV)キャリアは約200万人とされ、その多くが肝硬変・肝細胞癌へと移行し年死亡者は3万人を数えることから、保健医療上その克服は急務である。また世界的にはHCVキャリアは数億人とも言われ、特にアジア・アフリカ諸国での感染拡大が懸念されている状況から、有効なワクチン開発は不可欠である。一方HCVは、ヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しない。チンパンジーは絶滅の危機にある類人猿であり、現在では実験動物としての使用はきわめて困難な状況にある。このことが治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験を行なう上での大きな障害となっている。

本研究では医科学研究の目的で利用可能な霊長類を用いたC型肝炎のサロゲート病態モデルの開発を行い、これを用いてウイルスベクター

によるHCVワクチン等の安全性・有効性を評価することを最終的な目的とする。本モデルにより実験レベルでの使用が非常に困難なチンパンジーを用いずに前臨床試験を行なえることから、有効なHCVワクチンや新規治療法等の開発に大きく貢献出来るものと期待される。

B. 研究方法

新世界ザルであるタマリンおよびマーモセットは当センターP2感染実験施設にて飼育管理した。感染性分子クローンpGBBはDr. Bukh (NIAID, NIH, USA)より分与を受けた。接種後1-2週ごとにケタミン麻酔下で採血し、得られた血液は血清生化学検査、血中ウイルス量及び抗体価測定を行った。血中ウイルス量測定はリアルタイムPCR法を用いた。pGBBよりサブクローニングしたCore発現ベクターを導入

した大腸菌からリコンビナント Core 蛋白を得た。これを用いて ELISA 系により抗体価測定を行った。また同時に上記リコンビナント Core 蛋白よりポリクローナル抗体を作成し、組織病理解析に供した。なおすべての動物実験は、倫理面を含めて国立感染症研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

C. 研究結果

今年度は GBV-B/サル実験感染系が C 型肝炎のサロゲート病態動物モデルとなりうるのかについて検討した。

(実験 1) 感染性分子クローン pGBB から *in vitro* transcription により得られたウイルス RNA を 2 頭のタマリン肝臓に接種したところ、接種後 2-8 週にわたり plasma ウイルス RNA 値および GPT 値の上昇を主徴とする急性 C 型肝炎様症状を発症した。また plasma ウイルス RNA 値および GPT 値の低下と相反して anti-Core 抗体価の上昇が認められた。

(実験 2) 実験 1 のタマリン 1 頭 (#5) 由来血清 (2×10^4 viral RNA copies/animals) を別のタマリン 2 頭の肝臓に接種したところ、viremia を伴う急性 C 型肝炎様症状を呈した。そこで、より高いウイルス RNA 値を示した個体 (#15) について安楽殺を行い、plasma を保存すると共に病理学的解析を行ったところ、肝臓において肝細胞変性、類洞拡張および Core 抗原陽性細胞が認められた。また一部の細胞では TUNNEL 陽性のアポトーシス像も観察された。以上より、GBV-B/タマリン感染により急性 C 型肝炎様症状を発症させることが確認された。

(実験 3) 最近、新世界ザルであるマーモセットはタマリンと同様に GBV-B に感受性であることが報告されている (Bright et al.: J Virol 78, 2062, 2004)。マーモセットは実験用霊長類として汎用されておりタマリンと比較して入手し易いことから、モデル動物として望ましいと考えられる。そこで Bright らのデータを追試する目的で実験 2 と同様に GBV-B 感染タマリン (#15) plasma を用いてマーモセット 1 頭に実験感染を開始したところである。

D. 考察

本研究ではウイルスベクターによる HCV ワクチンや新規治療法等の安全性・有効性を評価することを目的として、霊長類を用いた C 型肝炎のサロゲート病態モデルの確立を試みた。GBV-B は HCV と同じヘパチウイルス属に分類され、最も HCV に近縁なウイルスである。また本実験より、新世界ザルの一種であるタマリンに GBV-B 分子クローン由来 RNA を接種することによりウイルス感染が成立し急性 C 型肝炎様症状を呈することが確認された。本研究では分子クローンを出発材料としていることから、今後のリコンビナントワクチンや遺伝子治療研究において既知のウイルス遺伝子情報を利用可能であることから、動物モデルとしての有用性が高いものと考えられる。今後接種用ウイルスとして使用される予定の #15 plasma について、ウイルスゲノムの変異を検討するためシーケンスを進めているところである。

今後はより再現性と簡便性の面で有利な経静脈内感染ルートによる接種実験を行うとともに、慢性感染モデル作成を試み、C 型肝炎により近いサロゲートモデルを確立していきたい。

E. 結論

本研究ではウイルスベクターによる HCV ワクチン等の安全性・有効性を評価することを目的として、C 型肝炎のサロゲート病態動物モデルの開発を試みた。その結果、HCV に最も近縁なサル肝炎ウイルスである GBV-B を新世界ザルの一種であるタマリンに感染することにより、急性 C 型肝炎様症状を発症させることに成功した。霊長類を用いた本モデルはウイルスベクターの安全性・有効性評価に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

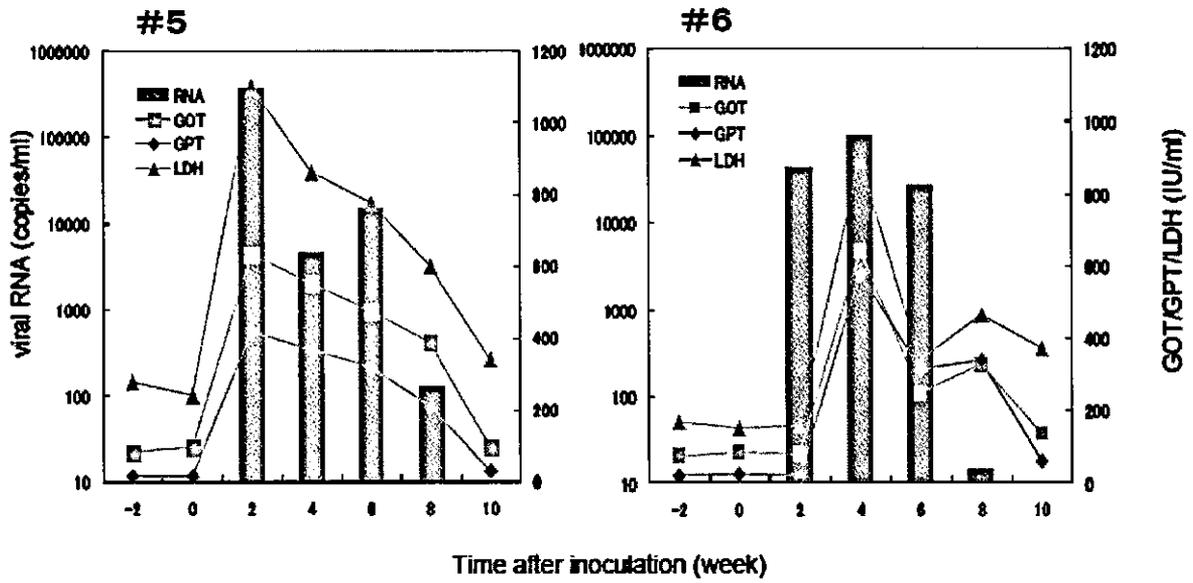
1. 飯島沙幸、石井孝司、李永仲、岩田奈織子、八木慎太郎、山口健次郎、榎昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、鈴木哲朗、佐多徹太郎、寺尾恵治、宮村達男、明里宏文：C型肝炎のサル病態モデル開発. 第52回日本ウイルス学会学術集会、平成16年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

GBV-B / Tamarin感染実験1:結果

viral RNA量と血清生化学値



viral RNA量と抗体価

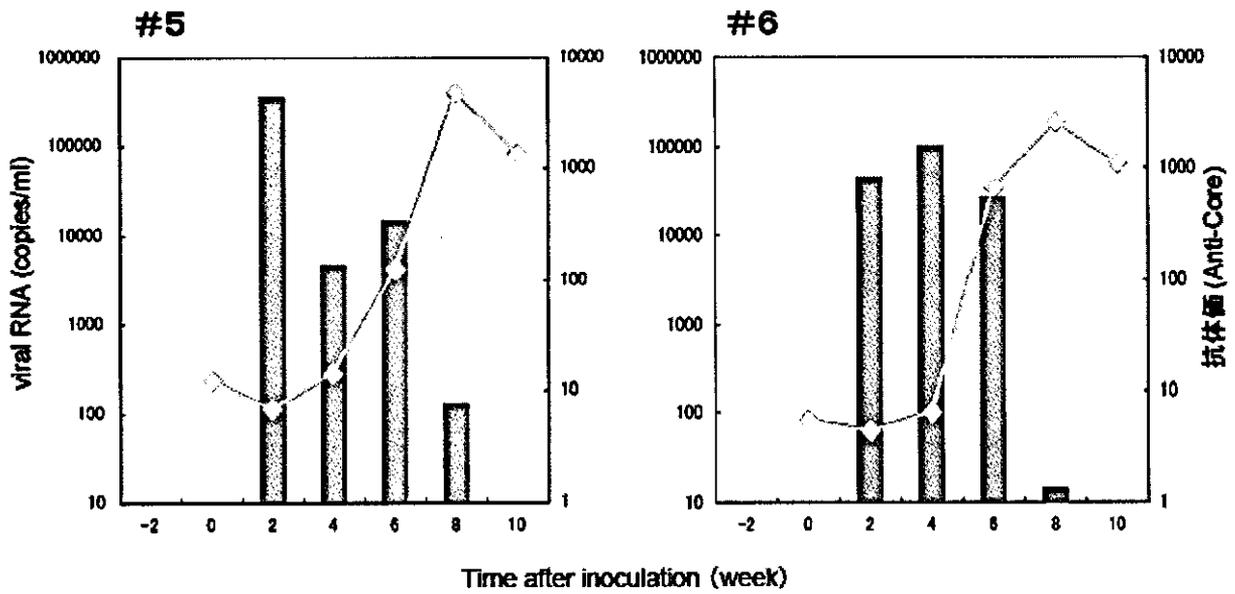


図1. GBV-B/タマリン感染実験(1)結果

GBV-B /Tamarin感染実験(2)

Viral RNA量と血清生化学値

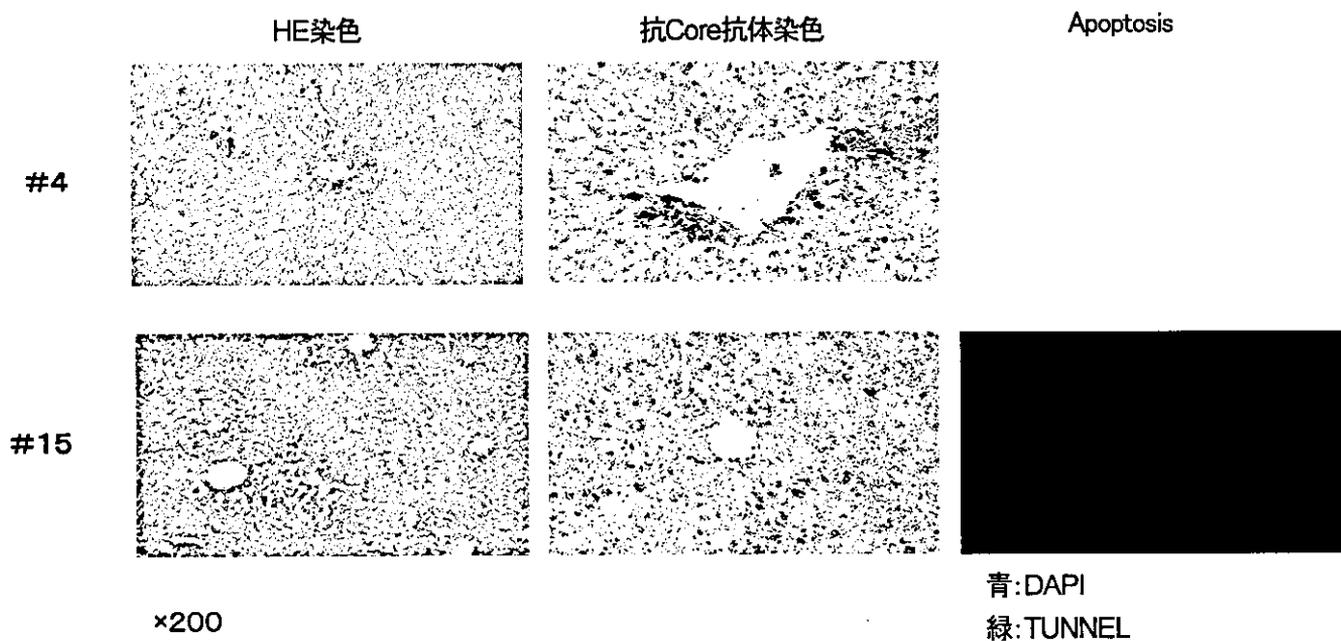
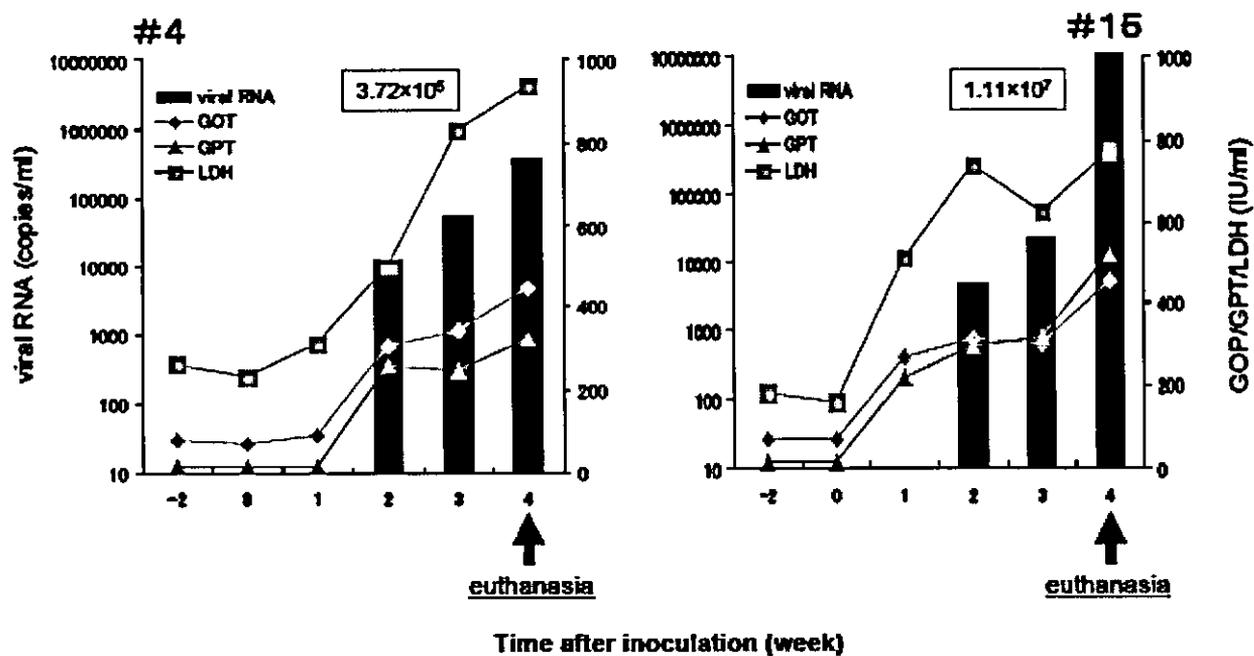


図2. GBV-B/タマリン感染実験(2) 結果

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
Matsumoto K, Yasugi T, Oki A, Fujii T, Nagata C, Sekiya S, Hoshiai H, Taketani Y, Kanda T, Kawana T, Yoshikawa H	IgG Antibodies to HPV 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia.	Cancer Lett	in press		2005
Kudoh A, Fujita M, Zhan L, Shirata N, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura H, Nishiyama Y, Turumi T	Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment.	J Biol Chem	in press		2005
Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T, Kimura Y	Olfactory transmission of neurotropic viruses.	J Neuro Virol	in press		2005
Nozawa N, Kawaguchi Y, Tanaka M, Kato A, Kato A, Kimura H, Nishiyama Y	Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles.	J Virol	in press		2005
Mori I, Koshizuka T, Goshima F, Ito H, Koide N, Yoshida T, Yokochi T, Kimura Y, Nishiyama Y	Herpes simplex virus US11 shows intercellular trafficking activity in the mouse brain.	Mol Brain Res	in press		2005
Kondo K, Ishii Y, Yoshikawa H, 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
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		2005
Mori I, Goshima F, Ito H, Koide N, Yoshida T, Yokochi T, Kimura Y, Nishiyama Y	The vomeronasal chemosensory system as a potent route of neuroinvasion by herpes simplex virus.	Virology	in press		2005
Ishii Y, Ozaki S, Tanaka K, Kanda T	Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding.	Virus Genes	in press		2005

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, Suga S, Suzuki K, Kawana T, Nishiyama Y, Asano Y	Rapid Diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method.	J Clin Microbiol	43	951-955	2005
Koshizuka T, Kawaguchi Y, Nishiyama Y	Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIFIA.	J Gen Virol	86	527-533	2005
Yamamoto K, Yoshikawa T, Okamoto S, Yamaki K, Shimokata K, Nishiyama Y	HHV-6 and 7 DNA loads in lung tissues collected from patients with interstitial pneumonia.	J Med Virol	75	70-75	2005
Nishimura N, Yoshikawa T, Ozaki T, Sun H, Goshima F, Nishiyama Y, Asano Y, Kurata T, Iwasaki T	In vitro and in vitro analysis of human herpes -6 U90 protein expression.	J Med Virol	75	86-92	2005
Nagai H, Wada K, Morishita T, Utsumi M, Nishiyama Y, Kaneda T	New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application.	J Virol Methods	124	157-165	2005
Nakao A, Kimata H, Imai T, Kimumori T, Teshigawara O, Nagasaka T, Goshima F, Nishiyama Y	Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent breast cancer.	Annals Oncol	15	988-989	2004
Zhu D, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A, 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.	Antivir Ther	9	929-935	2004
Nozawa N, Yamauchi Y, Ohtsuka K, Kawaguchi Y, Nishiyama Y	Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly.	Exp Cell Res	299	486-497	2004
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

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
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	42	936-937	2004
Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Usui C, Miyake F, Suga S, Enomoto Y, Suzuki R, Nishiyama Y, Asano Y	Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification.	J Clin Microbiol	42	1348-1352	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	29	206-209	2004
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 DJ, 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
Takemoto M, Mori Y, Ueda K, Kondo K, Yamanishi K	Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis.	J Gen Virol	85	869-879	2004
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
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
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.	J Med Virol	73	465-473	2004
Mori I, Kimura Y, Naiki H, Matsubara R, Takeuchi T, Yokochi T, Nishiyama Y	Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease.	J Med Virol	73	605-611	2004

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Okamoto S, Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Shimokata K, Nishiyama Y, Asano Y	Rapid detection of varicella-zoster virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method.	J Med Virol	74	677-682	2004
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
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
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	78	3984-3993	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	78	4927-4930	2004
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
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
Sugiura S, Yoshikawa T, Nishiyama Y, Morishita Y, Sato E, Beppu R, Hattori T, Nakashima T	Detection of herpesvirus DNAs in perilymph obtained from patients with sensorineural hearing loss by real-time polymerase chain reaction.	Laryngo scope	114	2235-2238	2004
Tanaka M, Kodaira H, Nishiyama Y, Sata T, Kawaguchi Y	Construction of recombinant herpes simplex virus type 1 expressing green fluorescent protein without loss of any viral genes.	Microbes Infect	6	485-493	2004

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Shimada K, Kondo K, Yamanishi K	Human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein k and casein kinase 2.	Microbiol Immunol	48	205-210	2004
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	24	2734-2746	2004
Suda N, Ito Y, Imai T, Kikumori T, Kikuchi A, Nishiyama Y, Yoshida S, Suzuki M	The α 4 residues of human DNA topoisomerases II α function in enzymatic activity and anticancer drug sensitivity.	Nucleic Acids Res	32	1767-1773	2004
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	23	5014-5022	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	130	470-478	2004
Ohashi M, Yoshikawa T, Asonuma K, Iwasaki T, Nishiyama Y, Asano Y, Kimoto Y, Yagi T, Urushihara N, Tanaka N, Baba K	Human herpesvirus 6 fulminant hepatic failure treated by living donor liver transplantation.	Pediatrics Int	46	730-732	2004
Nishiyama, Y	Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well.	Rev Med Virol	14	33-46	2004
Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T, Kimura Y	Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host.	Rev Med Virol	14	209-216	2004
Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T	Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein.	Virology	330	375-383	2004