

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 18 (2006) 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 病原体ゲノム解析研究センター	センター長
	俣野 哲朗	東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター	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	医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター	センター長

目 次

I. 総括研究報告書（平成 17 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（国立感染症研究所病原体遺伝子解析研究センター長）
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……………14
俣野 哲朗（東京大学医科学研究所感染症国際研究センター教授）
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……………18
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……………22
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……………27
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……………29
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……………32
寺尾 恵治（医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター長）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………37

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。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターとセンダイウイルス (SeV) ベクターに注目し、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。AAV ベクターが標的臓器から血流へ漏出することを想定し、治療に使われる量の 1/100 程度の AAV2 型ベクターを 14 匹のサルに静脈接種し、体内動態と消長を調べた。ベクターは主にリンパ組織に 7 ヶ月以上に渡って存在し、導入遺伝子を発現することがわかった。カニクイザルから、新たに AAV10、11 型ゲノムを分離し、ベクターに応用した。10、11 型はマウス筋肉細胞に感染することがわかった。HIV ワクチン抗原発現系に SeV ベクターを応用することを念頭に、複製型 SeV および非複製型 SeV ベクターをサルに接種して、導入遺伝子発現の限局性と優れた細胞性免疫誘導能、複数回接種が可能なこと等を明らかにした。単純ヘルペスウイルス(HSV)弱毒変異株 HF10 は癌細胞で選択的に増殖することから、皮膚転移のある再発性乳癌患者 (6 例) 及び頭頸部癌患者 (3 例) に対して HF10 の臨床試験を行い、HF10 がヒトの癌に対して、明らかな有害事象を示すことなく優れた抗腫瘍作用を示すことを明らかにした。ヒト(h)及びマウス(m)の GM-CSF を産生する HSV アンプリコンを、HF10 をヘルパーウイルスとして作製した。マウスを用いた動物実験において、HF10 と mGM-CSF アンプリコンとの組み合わせは、HF10 単独投与に比べ抗腫瘍性を有意に上昇させることを明らかにした。ヒトヘルペスウイルス 6 型(HHV-6) 及び HHV-7 ベクターの安全性の確認および病原遺伝子の探索用の小動物モデルとして、NOD-SCID-hu マウスを用いた HHV-6 感染動物を作製した。このモデルで HHV-6 の長期的な潜伏感染と再活性化が確認された。ヒトで増殖しない弱毒ワクチニアウイルス DIs 株、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、小型 DNA ウイルスで良く研究されているヒトパピローマウイルス (HPV) をベクターに応用する可能性を探った。

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

我が国では遺伝子治療の臨床試験に際して、ベクターの安全性・有効性は製造者や臨床試験を行う医師が責任を負う原則となっている。しかし、ウイルスベクターの安全性を評価する一般的な方法は確立していない。米国でのアデノウイルスベクターの投与による死亡に加え、フランスでのレトロウイルスベクターによる白血病が示すように、ウイルスベクターの安全性確保は依然として重要な課題である。

患者に直接投与されるウイルスベクターの安全性は、用いたベクター固有の性質と導入遺伝子の性質に依存している。ベクター固有の性質は、キャプシドを介した標的細胞の選択、細胞への侵入効率、侵入後の発現部位への移動と、ウイルス由来核酸や調節蛋白質を介したベクターゲノムの複製や染色体への組み込みなどであり、モデルベクターで検討できる。本研究では、臨床試験を行う医師や企業とは独立に、ウイルス学及び感染病理学を専門とする国立研究所の研究者が中心となって、モデルベクターを作製しサル等に接種して、ベクターの特性を詳細に解析し、安全性・有効性に関する情報を得る。サルはヒトと同様、遺伝的に均一な集団ではなく、ベクターに対する反応も個体差があるので、複数のサルで実験を繰り返し、データを蓄積することが必要である。

研究の重点を臨床応用が計画されながら安全性に関する基礎的情報が不足している AAV ベクター、SeV ベクター、HSV ベクターに置く。また、新たな国産ベクターとしての発展が期待できる HHV-6、HHV-7、弱毒ワクチニアウイルス DIIs 株を利用したベクター、安全なレンチウイルスベクターとして期待されるネコ免疫不全ウイルス (FIV) ベクター、小型 DNA ウィルスで取り扱いが容易な HPV ベクターの開発と基礎的性質の解析を進める。各ベクターそのものの特性に関する情報は、どのような治療用遺伝子を使う戦略においても、遺伝子治療臨床研究の安全性や有効性を評価し、遺伝子治療の健全な発展を促す厚生行政の基盤となる。

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。HSV ベクターの臨床試験は西山が行い、HHV6、7 型ベクター、DIIs ベクター、FIV ベクター、HPV ベクターの開発はそれぞれ近藤、寺尾、北村、神田が担当した。

- 1) EGFP 遺伝子を持つ 2 型、10 型、11 型 AAV ベクターの混合液 (ベクター DNA を型別に識別可能) を 5 頭のカニクイザルに接種し、うち 2 頭を接種 7 ヶ月後に解剖し、各臓器のベクター DNA を検出した。また、それぞれの血清型に対する中和抗体の誘導を調べた。ヒト及びカニクイザルから採取した末梢血単核球に AAV2 型ベクターを感染させ、ベクターゲノムの発現を調べた。(神田、佐多、寺尾)
- 2) アカゲサルに env と nef 以外の SHIV 遺伝子発現ベクタープラスミド DNA を筋注した後、6 週目に Gag 発現 SeV ベクターの経鼻接種でブーストし、その後の Gag 特異的 CTL レベルの経時変化を追った。約 3 ヶ月経過した時点で、SIVmac239 (サル免疫不全ウイルス) あるいは SHIV89.6PD を静注にてチャレンジした。(俣野、佐多、寺尾)
- 3) 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。マウスの GM-CSF、IL-12、TNF- α などを CMV プロモーターの制御下に発現し、HF10 をヘルパーウイルスとして複製する HSV アンプリコンを作製した。(西山、倉田)
- 4) NOD-SCID-hu マウスにヒト臍帯血由来単核球を移入して、HHV-6、HHV-7 が感染する小動物実験系を作成した。また、HHV-6、HHV-7 の潜伏感染、流産感染ともに遺伝子発現が抑制され、増殖感染のみで遺伝子が発現するウイルスエンハンサー・プロモーターを探索、同定した。(近藤)
- 5) ワクチニアウイルスのプロモーター mH5 の下流に HCV および GBV-B 遺伝子の一部を挿入した DNA 断片を相同組換えで DIIs に導入し、DIIs ベクターを作製した。これらの組換え DIIs をマウスに接種し液性及び細胞性免疫応答について解析した。(寺尾)
- 6) FIV のプロウイルス DNA から gag, pol, env 遺伝子とアクセサリー遺伝子を除き、ブラ

ストサイジン耐性遺伝子カセットを挿入後、さらに、3'側 LTR のプロモーター活性を担う U3 領域を除いた。この DNA と、FIV の gag と pol 遺伝子を発現するプラスミドベクター、及び vesicular stomatitis virus のエンベロープタンパク質 (VSV-G) を発現する発現プラスミドをヒト培養細胞 (HEK293 株) にトランスフェクションして pseudotype 型ベクターを得た。(北村)

- 7) HPV キャプシドは、主キャプシド蛋白質 L1 と副キャプシド蛋白質 L2 から形成される正二十面体の粒子である。L1 及び L2 を発現するプラスミドを構築し、細胞で発現させて、キャプシド形成過程を解析した。また、キャプシドに発現プラスミドを取り込ませる方法を検討した。(神田)
- 8) 高感度 in situ 核酸検出法である in situ hybridization AT tailing (ISH-AT) 法の原理を抗原検出法に適用することをめざし、条件の最適化を試みた。(佐多)

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所及び各大学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。SeV ベクター、DIs ベクター、HHV ベクター等の増殖性組換えウイルスについては、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。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。臍帯血の採取に関しては、厚生労働省のガイドラインに準拠した同意書によってインフォームドコンセントを取った。

C. 研究結果

- 1) 2 型、10 型、11 型ベクター経静脈接 7 ヶ月後に解剖した 2 頭サルのうち 1 頭 (雌) では、いずれの血清型ベクターゲノムも脾臓を中心に主にリンパ系組織に検出されたが、他の 1 頭 (雄) では、いずれの血清型ベクターも検出されなかった。またベクターを接種した 5 頭のうち 3 頭では全ての血清型に対する中和抗体の誘導が見られたが、1 頭では 2 型、10 型に対する中和抗体の誘導はみられたものの 11 型に対する中和抗体の誘導は認められず、他の 1 頭ではいずれの血清型に対する中和抗体の誘導も認められなかった。ヒト及びカニクイザ

ルから採取した末梢血単核球への AAV2 型ベクターによる遺伝子導入は認められなかった。(神田、佐多、寺尾)

- 2) Gag 発現 Se ベクター接種によるブーストを受けた全てのサルで、1 週めに高レベルの Gag 特異的 CTL 誘導が認められた。レベルは漸減したが、3 ヶ月の時点でも、複製型 Gag 発現 Se ベクター接種群では 4 頭中 4 頭で、非複製型 Gag 発現 Se ベクター接種群では 7 頭中 4 頭で、CTL は検出可能であった。チャレンジ後 2 週めには、全頭で効率よい Gag 特異的 CTL の 2 次反応が認められた。(俣野、佐多、寺尾)
- 3) 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。切除した腫瘍の病理学的検索の結果、1) 広範な癌細胞の死滅が認められる、2) 頭頸部癌 (扁平上皮癌) では、乳癌 (腺癌) の場合と異なり、核の消失が特徴的所見として認められる、3) CD4, CD8 陽性のリンパ球の浸潤が HF10 接種腫瘍内に顕著に誘導されることがわかった。
CMV プロモーターの下流にマウス GM-CSF 遺伝子を組み込んだアンプリコンプラスミドを、HF10 と共に CT26 マウス大腸癌由来細胞/BALB/C マウスの固形腫瘍モデルに接種した。GM-CSF アンプリコンを含む HF10 投与は HF10 単独に比べ、強い単球系細胞の浸潤を誘発し、有意に強い抗腫瘍作用を示した。(西山、倉田)
- 4) HHV-6 を NOD-SCID-hu マウスに投与したところ、感染後 4 週間から 10 週間以上経過したマウスにおいても、HHV-6 DNA が検出された。脾臓では HHV-6 の初期遺伝子 U79/80 や後期遺伝子 U60/66 が検出されるのに対し、骨髄ではこれらウイルス増殖の指標となる遺伝子の発現は検出されず、脾臓において HHV-6 の持続的な増殖感染が、骨髄において HHV-6 の潜伏感染が成立している可能性が示唆された。骨髄及び脾臓での HHV-6 感染率は、ヒトでの感染率より高いことが推定され、HHV-6 の潜伏感染・再活性化と持続感染を非常に効率よく再現している可能性がある。
HHV-6 の U2~U8 領域を knock out (KO) した組み換えウイルス H6R28 を

NOD-SCID-hu マウスに感染させると 6 週間後でも wt ウイルス同様に高率でウイルス DNA 陽性細胞が骨髄と脾臓に存在し、初期遺伝子は発現していた。しかし、PHA 刺激したヒト臍帯血由来 T 細胞と混合培養を行なってもウイルス分離はできず、H6R28 の増殖は確認できなかった。U2~U8 領域の遺伝子を KO することによりウイルスの増殖感染は *in vivo* で defective となるが、潜伏感染そのものは障害を受けないらしい。

HHV-6、HHV-7 の U79/80、U41、p41、及び DNA ポリメラーゼ遺伝子のエンハンサー・プロモーターは、細胞内因子では活性化されず、HHV-6 の IE2 前初期遺伝子で強く活性化されることがわかった。(近藤)

- 5) 弱毒ワクチニアウイルス DIs 株に HCV もしくは GBV-B の core-E1-E2 領域、NS3 領域、NS5A 領域及び全長に相当する遺伝子領域を組み込んだ DIs ベクターを哺乳類細胞に感染させると導入遺伝子が発現し、液性免疫及び細胞性免疫を誘導した。(寺尾)
- 6) FIV ベクターを HeLa 細胞に感染させたところ、プラストサイジン耐性コロニー数を指標として 1000unit/mL 程度の力価を示した。(北村)
- 7) SV40T 抗原を発現する 293T 細胞に SV40 複製開始点を持つレポータープラスミドを導入して複製させ、同時に HPV L1 と L2 を発現させると、HPV キャプシドにレポータープラスミドが取り込まれ、ベクターができた。このベクターは、少なくとも 293T 細胞に感染した。(神田)
- 8) oligo(dA-dT) 標識した抗体を用いた Immuno-AT (間接法) により Vero 細胞のゴルジ体を検出した結果、現行法と比較して 16 倍の検出感度が得られた。(佐多)

D. 考察

- 1) 経静脈接種された低用量 AAV ベクターは、血清型の違いにかかわらず、脾臓、リンパ節を中心としたリンパ系組織に長期間留まるので、遺伝子治療臨床試験で、血流に漏れ出した少量の AAV ベクターがリンパ系組織に感染し、治療用遺伝子を発現する可能性がある。しかしサル及びヒトの末梢血

単核球への AAV2 ベクターによる遺伝子導入効率は極めて低かったので、リンパ系組織において、リンパ球等が AAV ベクターに感染しているとは考えにくく、生体内でリンパ系組織のどのような細胞種に AAV ベクターが感染するのかさら調べる必要がある。低用量接種された各血清型 AAV ベクターに対する中和抗体の誘導には個体差があった。ヒトでも血清型によって中和抗体の誘導効率に差があると考えられる。(神田、佐多、寺尾)

- 2) Gag 発現 SeV ベクター接種によるブースト後、Gag 特異的 CTL は効率よく誘導された。非複製型 SeV ベクター接種群に比べ、複製型 SeV ベクター接種群で CTL レベルが維持される傾向が示された。接種後約 3 ヶ月経過しても Gag 特異的 CTL メモリーは全頭で維持されており、チャレンジ後に効率よい Gag 特異的 CTL の 2 次反応が認められた。この Gag 特異的 CTL 2 次反応のレベルは、ベクター接種後 1 週めの Gag 特異的 CTL レベルにほぼ相関していた。(俣野、佐多、寺尾)
- 3) HF10 を用いた臨床試験の結果から、ヒト (HSV 抗体陽性) の腫瘍内において HF10 が比較的長期 (2 週間以上) にわたり増殖し、癌細胞を死滅させながら存続しうることが示された。また、マウスで使用する 1/100 のウイルス量で広範な腫瘍細胞の死滅を引き起こすことがわかった。HF10 は Immuno competent マウスを用いたモデル系では速やかにクリアランスを受けるので、有効性、そして安全性予測には、ヌードマウスモデル系、培養細胞レベルでの検討を含め総合的な判断が必要である。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。(西山、倉田)
- 4) ヒト臍帯血由来単核球をもちいて myeloid 系細胞の増殖・分化が維持できる NOD-SCID-hu マウスを利用して、HHV-6 の潜伏感染・再活性化と持続感染を同時に観察できる小動物感染モデルを作った。HHV-7 は HHV-6 と非常に近縁なウイルスで、マクロファージなどの myeloid 系細胞で潜伏感染・再活性化を生じると予測されるため、HHV-7 にもこの実験系が使えると

思われる。(近藤)

- 5) 弱毒化ワクチニアウイルス DIs 株は、親株のワクチニアウイルスと異なりヒト生体内で増殖しないため、安全なベクターとなる。今後、DIs ベクターを C 型肝炎予防・治療用ワクチン抗原発現系として応用する方法を検討する。(寺尾)
- 6) HIV ベクターと同等に FIV ベクターを作製できたが、実用化には力価をもっと上げる必要がある。(北村)
- 7) HPV キャプシドは、L1 及び L2 の 2 種の蛋白質から形成される正二十面体で、物理化学的に安定である。ベクターに応用するには好個の素材であり、今後の発展が期待できる。(神田)
- 8) Immuno-AT 法を用いて、遺伝子ベクター投与後の生体内での遺伝子発現等をより詳細に解析できることが期待される。(佐多)

E. 結論

臓器への直接投与で静脈への漏出を想定し、低用量で静脈接種された AAV2 型、10 型、11 型ベクターは、いずれもリンパ系組織に長期間留まるが、必ずしもリンパ球に感染するわけではないらしい。どのような細胞種に存在するのか、導入遺伝子の発現はあるのか等、さらに詳しい動態や消長に関する検討が必要である。(神田、佐多、寺尾)

SeV ベクターブーストにより誘導された抗原特異的 CTL メモリーは、少なくとも 3 ヶ月間以上は維持される。ブースト後 1 週目の抗原特異的 CTL レベルは、ウイルス暴露後の抗原特異的 CTL の 2 次反応レベルの指標となることが示唆された。(俣野、佐多、寺尾)

再発性乳癌や頭頸部癌に対するトランスレショナルリサーチは、HF10 の高い抗腫瘍作用と安全性を示唆し、Oncolytic viral therapy の将来性を強く期待する。(西山、倉田)

HHV-6 及び HHV-7 ベクターの感染を検討するための小動物感染実験モデルを、NOD-SCID-hu マウスを用いて作成した。このモデルでは、ヒトに比べて高率に HHV-6 の潜伏感染が観察された。(近藤)

HCV および GBV-B 遺伝子を組み込んだ DIs ベクターは、マウスに液性及び細胞性免疫を誘導した。(寺尾)

HPV を素材としたベクターは、キャプシドへのレポータープラスミドの組み込みで容易に作製できる。(神田)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

神田

1. 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*, 31(3), 321-328, 2005.
2. Kukimoto, I., Takeuchi, T., and Kanda, T.: CCAAT-Enhancer Binding Protein \square Binds to and Activates the P670 Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *Virology*, 346, 98-107, 2006.
3. Mori, S., Ozaki, S., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Kanda, T.: Inhibitory cis-Element-Mediated Decay of Human Papillomavirus Type 16 L1-Transcript in Undifferentiated Cells. *Mol. Cell. Biochem.* in press, 2006.
4. Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Yashgi, T., Yaketani, Y., and Kanda, T.: Human Papillomavirus Type 16 P670 Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. 投稿中
5. Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Iwata, N., Sata, T., and Kanda, T.: Biodistribution of Intravenously Administered AAV-2, 10, and 11 Vectors in a Low Dose to Cynomolgus Monkeys. 投稿中

俣野

1. 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* 23:3166-3173, 2005.
2. Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A,

- Yamamoto N, Szuki Y, Nagai Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 79:10386-10396, 2005.
3. Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Kato M, Matano T. Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J. Virol.* 79:11529-11532, 2005.
 4. Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Yamamoto H, Dohki S, Takiguchi M, Matano T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* 80:1949-1958, 2006.
- 西山
1. 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. *J. Med. Virol.* 75: 86-92, 2005.
 2. 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. *J. Med. Virol.* 75: 70-75, 2005.
 3. 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. *J. Virol. Methods* 124: 157-165, 2005.
 4. Koshizuka, T., Kawaguchi, Y. and Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIFIA. *J. Gen. Virol.* 86: 527-533, 2005.
 5. 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. *J. Clin. Microbiol.* 43: 951-955, 2005.
 6. 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. *J. Biol. Chem.* 280: 8156-8163, 2005.
 7. Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T. and Kimura, Y.: Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J. Neurovirol.* 11: 129-137, 2005.
 8. 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* 334: 51-58, 2005.
 9. 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. *Mol. Brain Res.* 136: 158-163, 2005.
 10. 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. *J. Virol.* 79: 6947-6956, 2005.
 11. Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Kodaira, H., Nishiyama, Y. and Kawaguchi, Y.: Identification of proteins phosphorylated directly by the US3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 79: 9325-9331, 2005.
 12. Shaku, F., Matsuda, G., Furuya, R., Kamagata, C., Igarashi, M., Tanaka, M., Kanamori, M., Nishiyama, Y., Yamamoto, N. and Kawaguchi, Y.: Development of a monoclonal antibody against Epstein-Barr virus nuclear anti gen leader protein (EBNA-LP) that can detect EBNA-LP expressed in P3HR1 cells. *Microbiol. Immunol.* 49: 477-483, 2005.
 13. Matsuzaki, A., Yamauchi, Y., Kato, A., Goshima, F., Kawaguchi, Y., Yoshikawa, T. and Nishiyama, Y. The US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 is required for the stability of the UL46-encoded tegument protein and its association with virus particles. *J. Gen. Virol.* 86: 1979-1985, 2005.
 14. Mori, I., Liu, B., Goshima, F., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura Y. and Nishiyama, Y.: HF10, an attenuated herpes simplex virus (HSV) type 1 clone, lacks neuroinvasiveness and protects mice against lethal challenge with HSV types 1 and 2. *Microb. Infec.* 7: 1492-1500, 2005.
 15. Mori I, Nishiyama Y.: Herpes simplex virus and varicella-zoster virus: why do these human alphaherpesviruses behave so differently from one another? *Rev. Med. Virol.* 15: 393-406, 2005.
 16. Kohno, S., Luo, C., Goshima, F., Nishiyama, Y., Sata, T. and Ono, Y.: Herpes simplex virus

type 1 mutant HF10 oncolytic viruthery for bladder cancer. *Urology* 66: 1116-1121, 2005.

17. Tanaka, M., Nishiyama, Y., Sata, T. and Kawaguchi, Y.: The role of protein kinase activity expressed by the UL13 gene of herpes simplex virus 1: the activity is not essential for optimal expression of ICP0 and UL41. *Virology* 341: 301-312, 2005.
18. Mori, I., Goshima, F., Mizuno, T., Imai, Y., Kohsaka, S., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Kimura, Y., Yokochi, T. and Nishiyama, Y.: Axonal injury in experimental herpes simplex encephalitis. *Brain Res.* 1057: 186-190, 2005.
19. Miyake, F., Yoshikawa, T., Sun, H., Kakimi, A., Ohashi, M., Akimoto, S., Nishiyama, Y., Asano, Y. Latent infection of human herpesvirus 7 in CD4(+)T lymphocytes. *J. Med. Virol.* 78: 112-116, 2005.
20. Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Tanaka, M., Sata, T., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y.: Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates the viral US3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J. Virol.* 80: 1476-1486, 2006.

近藤

1. Takemoto, M., Koike, M., Mori, Y., Yonemoto, S., Sasamoto, Y., Kondo, K., Uchiyama, Y., Yamanishi, K.: Human herpesvirus 6 open reading frame U14 protein and cellular p53 interact with each other and are contained in the virion. *J. Virol.* 79(20): 13037-13046, 2005.
2. Urashima, M., Sakuma, M., Terumoto, S., Fuyama, Y., Eto, Y., Kondo, K., Tanaka, T.: Gene expression profiles of peripheral blood and cord blood mononuclear cells altered by thymic stromal lymphopoietin. *Pediat. Res.* 57(4): 563-569, 2005.

北村

1. Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, Sugiura W: A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 16:363-373, 2005.
2. Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H. Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J Antibiot.* 58:65-68, 2005.

寺尾

1. Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K and Terao K. Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp Anim.* 54: 421-428, 2005.
2. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics.* 57: 189-197, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請中

「HHV-6 または HHV-7 由来の組み換えウイルスベクター、その製造方法、それを用いた宿主細胞の形質転換方法、それにより形質転換された宿主細胞およびそれを用いた遺伝子治療方法」

国際特許出願 PCT/JP2004/012487、国内出願 2003 年第 307335 号

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

分担研究者 神田 忠仁 (国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター長)

研究要旨 アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、治療用遺伝子を長期にわたって安定に発現させ続ける治療戦略に使われる。臨床試験では、大量 ($\sim 10^3$ ゲノムコピー) の AAV ベクターを直接患者の臓器へ接種することから、接種部位から血流に漏れ出した少量の AAV ベクターの体内動態、消長が安全性評価の基盤となる。また、AAV には多数の血清型の存在が明らかになり、しかも血清型によって臓器親和性が異なることがわかって、標的臓器によってベクターの素材となる血清型を使い分ける試みがなされている。昨年度、 10^{10} ゲノムコピーずつの AAV2 型、10 型、11 型ベクターを 5 頭のカニクイザルへ経静脈接種し、うち 3 頭について 3 ヶ月後の体内分布を調べた。今年度は残りの 2 頭について 7 ヶ月後の体内分布を調べた。その結果、3 ヶ月後と同様、いずれの血清型においても脾臓、リンパ節などにベクターゲノムが検出され、血清型の違いに関わらず、経静脈接種された比較的少量の AAV ベクターはリンパ系組織を中心に体内に長く残ることがわかった。ベクターゲノムがリンパ系組織に多く検出されたことから、ヒト及びカニクイザルの末梢血単核球への AAV ベクターの感染の有無を調べたが、効率よい感染は認められなかった。また、血清型による臓器親和性の相違を支える分子機構を解析するために、EGFP で標識した各血清型 AAV 粒子を作製し、ベクター粒子の追跡を可能にした。また、小型 DNA ウイルスを素材にした新たなベクターとしてヒトパピローマウイルス (HPV) に注目し、キャプシド形成や遺伝子発現調節機構の解析を行った。

A. 研究目的

AAV ベクターの安全性及び有効性を評価する基礎情報として、ベクターの体内動態を明らかにする。AAV2 型に加えて、カニクイザルより新たに分離した 10 型、11 型を使用したベクターのサル体内での分布、消長を調べる。ベクター接種後の各血清型に対する中和抗体の誘導を調べる。また、血清型によって異なる臓器親和性を支える分子機構を調べる。

構造が単純で研究が進んでいる HPV を素材とするベクター構築の可能性を探る。

B. 研究方法

1) EGFP 遺伝子を持つ 2 型、10 型 (EGFP 遺伝子の 162 番目の塩基に HindIII 認識部位を

生じる変異を導入)、11 型 (EGFP 遺伝子の 129 番目の塩基に HindIII 認識部位を生じる変異を導入) AAV ベクターの混合液 (それぞれ 10^{10} ゲノムコピー) を接種したカニクイザル 5 頭のうち 2 頭 (雄 1 頭、雌 1 頭) を接種 7 ヶ月後に解剖し、各臓器を回収した。各臓器片から総 DNA を抽出後、EGFP 特異的プライマーを用いて変異導入部位を含む領域を PCR によって増幅し、ベクター DNA を検出した。PCR 産物を HindIII で消化後、電気泳動を行い、生じる断片の大きさによって血清型を区別した。

2) 2 型、10 型、11 型ベクターの混合液を接種したカニクイザルにおけるそれぞれの血清型に対する中和抗体の誘導を調べた。接種 1 週間前、接種 1 週間後から 2 週間ごとに 11 週目までの血清を段階的に希釈したもの

とベータガラクトシダーゼ遺伝子を発現するそれぞれの血清型ベクターをインキュベートし、COS-1 細胞へ感染させた。2 日後に X-gal 染色し、感染細胞数を調べた。

- 3) ヒト及びカニクイザルから採取した末梢血単核球 (10^5 個) に EGFP/チューブリン融合遺伝子をもつ AAV2 型ベクター (10^9 ゲノムコピー) を感染させ、その後、EGFP/チューブリン融合蛋白質の発現を蛍光顕微鏡下で調べた。
- 4) AAV2 型、10 型、11 型の各 VP2 キャプシド遺伝子と EGFP 遺伝子を融合した発現プラスミドを作製した。このプラスミドと各血清型の VP2 遺伝子開始コドンに変異を挿入した AAV ゲノム DNA を 293 細胞にトランスフェクションし、EGFP で標識された各血清型 AAV 粒子を作製した。
- 5) HPV キャプシドは、主キャプシド蛋白質 L1 のジスルフィド結合によって正二十面体の骨格構造を形成するとされている。システイン残基に変異を導入した L1 及び副キャプシド蛋白質 L2 を発現するプラスミドを構築し、細胞で発現させて、キャプシド形成過程を解析した。また、キャプシドに発現プラスミドを取り込ませる方法を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所において行われる動物実験に関する基本方針に沿って、審査委員会に実験計画を申請し、許可を得て行っている。

C. 研究結果

- 1) 2 型、10 型、11 型 AAV ベクターの混合溶液を経静脈接種して 7 ヶ月後のカニクイザル 2 頭のうち 1 頭 (雌) では、いずれの血清型ベクターゲノムも脾臓、各リンパ節など主にリンパ系組織に認められた ($10^3 \sim 10^5$ ゲノムコピー/0.5 microgram)。1 頭 (雄) では、いずれの血清型ベクターも検出されなかった ($<10^2$ ゲノムコピー/0.5 microgram)。
- 2) 2 型、10 型、11 型 AAV ベクターの混合溶液を経静脈接種したカニクイザル 5 頭のうち 3 頭では全ての血清型に対する中和抗体の誘導が見られた。1 頭では 2 型、10 型に対する中和抗体の誘導はみられたものの 11

型に対する中和抗体の誘導は認められなかった。残りの 1 頭ではいずれの血清型に対する中和抗体の誘導も認められなかった。

- 3) ヒト及びカニクイザルから採取した末梢血単核球 (10^5 個) への AAV2 型ベクターによる遺伝子導入は認められなかった。
- 4) EGFP 融合 VP2 蛋白質を持つ AAV2 型 (AAV2-GFP)、10 型 (AAV10-GFP)、11 型 (AAV11-GFP) 粒子を得た。HeLa 細胞に感染させた AAV2-GFP 粒子は蛍光顕微鏡で観察できた。
- 5) HPV キャプシド形成過程で、L2 が L1 を集合させることが示唆された。SV40T 抗原発現細胞 (293T 細胞) で SV40 複製開始点をもつレポータープラスミドを複製させ、同時に L1、L2 を発現させると、細胞核内に形成されたキャプシドがレポータープラスミドを取り込んで、感染性のベクターとなった。

D. 考察

- 1) 経静脈接種された AAV ベクターは、血清型の違いにかかわらず、脾臓、リンパ節を中心としたリンパ系組織に長期間留まることがわかった。遺伝子治療臨床試験で、血流に漏れ出た少量の AAV ベクターがリンパ系組織に感染し、治療用遺伝子を発現する可能性が考えられる。また、1 頭のサルではベクターゲノムが検出されなかったことは、AAV ベクターの体内動態・消長に個体差があることを示唆している。
- 2) サル及びヒトの末梢血単核球への AAV2 ベクターによる遺伝子導入効率は極めて低かった。リンパ系組織において、リンパ球が AAV ベクターに感染しているとは考えにくく、生体内でリンパ系組織のどのような細胞種に AAV ベクターが感染するのかさら調べる必要がある。
- 3) 接種された各血清型 AAV ベクターに対する中和抗体の誘導には個体差があった。投与量が少なかったことが個体差を明瞭に示す原因であったと思われる。ヒトでも血清型によって中和抗体の誘導効率に差があると考えられ、ベクターとして使用する血清型を決める際に考慮する必要があるかもしれない。
- 4) 各血清型 AAV 粒子を EGFP で標識すること

により追跡可能とした。血清型ごとの細胞への吸着、細胞内輸送等の過程を調べるための道具として有用である。

- 5) HPV キャプシドは、L1 及び L2 の 2 種の蛋白質から形成されており、ウイルスの中では最も単純な構造で、物理化学的に安定である。ベクターに応用するには好個の素材である。

E. 結論

静脈から接種された AAV2 型、10 型、11 型 AAV ベクターは、必ずしもリンパ球に感染せずに、リンパ系組織に長期間留まる。感染する細胞種と導入遺伝子の発現の有無を検討する必要がある。

HPV を素材としたベクターは容易に作製でき、今後の発展が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*, 31(3):321-328, 2005.
2. Kukimoto, I., Takeuchi, T., and Kanda, T.: CCAAT-Enhancer Binding Protein β Binds to and Activates the P670 Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *Virology*, 346:98-107, 2006.
3. Mori, S., Ozaki, S., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Kanda, T.: Inhibitory cis-Element-Mediated Decay of Human Papillomavirus Type 16 L1-Transcript in Undifferentiated Cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 2006. (in press)
4. Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Yasugi, T., Yaketani, Y., and Kanda, T.: Human Papillomavirus Type 16 P670 Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. 投稿中

5. Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Iwata, N., Sata, T., and Kanda, T.: Biodistribution of Intravenously Administered AAV-2, 10, and 11 Vectors in a Low Dose to Cynomolgus Monkeys. 投稿中

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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 (東京大学医科学研究所教授)

研究要旨 遺伝子治療用ベクターの1つであるセンダイウイルス (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臨床応用に向け、その長期的な安全性と有効性の確立および実用化につながる検討を、マカクサルレベルにて行うこととした。平成 16 年度は、抗原特異的 CTL の誘導・維持を目的とした SeV ベクターの複数回接種の有効性を示した。今年度は、長期的な有効性についての指標の一つとして、複製型および非複製型 SeV ベクター接種後の抗原特異的 CTL レベルの維持について比較検討を行った。DNA プライム後 Gag 発現 SeV ベクターブーストを行ってからの Gag 特異的 CTL レベルは、ブースト後 1 週目をピークとして漸減したが、解析を行った 11 頭中 8 頭では約 3 ヶ月経過した時点でも検出可能なレベルに維持されていた。非複製型 SeV ベクター接種群と比較して、複製型 SeV ベクター接種群の方で CTL レベルが維持される傾向が示唆されたが、ブースト後約 3 ヶ月の時点でエイズウイルスチャレンジを行うと、いずれのサルにおいても、チャレンジ後に効率よい Gag 特異的 CTL の 2 次反応が認められ、そのレベルはブースト後 1 週目のレベルと関連していた。したがって、SeV ベクターブースト後約 3 ヶ月経過した時点においても、抗原特異的 CTL メモリーは維持され、ウイルス感染に対して、ブースト後のピークレベルに相關した CTL の 2 次反応が誘導されると考えられた。

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および実用化につながる検討を行うことを目的として、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うこととした。特に長期的有効性を考える際には、CTL メモリーの維持が重要な課題となる。そこで、平成 16 年度には、抗原特異的 CTL の誘導・維持を目的とした SeV ベクターの複数回接種の有効性を明らかにした。今年度は、複製型および非複製型 SeV ベクター接種後の抗原特異的 CTL レベルの維持について比較検討を行った。

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。これまでにワクチン接種後のエイズウイルスチャレンジ実験を行ったアカゲサル 3 群計 11 頭について、Gag 特異的 CTL レベルの比較検討を行った。

ワクチンプロトコールは、env と nef 以外の SHIV 遺伝子発現ベクタープラスミド DNA の筋注によるプライム後 6 週目に SeV-Gag ベクター経鼻接種によるブーストとした。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。ブースト後約 3 ヶ月経過した時点で、SIVmac239 (サル免疫不全ウイルス) あるいは SHIV89.6PD を静注にてチャレンジした。

ブースト後 1 週目、ブースト後 2 週目、ブースト後約 3 ヶ月、チャレンジ後 2 週目の末梢血単核球を用い、Gag 特異的 CTL レベルを調べた。Gag 特異的 CTL レベルは、Gag 発現ワクシニアウイルス (Vv-Gag) 感染 autologous B 細胞と末梢血単核球 (PBMC) との共培養によりインターフェロン γ 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。

サルについて、第 1 群 (4 頭) では、ブーストに複製型 F(+)-SeV-Gag ベクターを用い、チャレンジには SIVmac239 を用いた。第 2 群 (4 頭) では、ブーストに非複製型 F(-)-SeV-Gag ベク

ターを用い、チャレンジには SIVmac239 を用いた。第 3 群 (3 頭) では、ブーストに非複製型 F(-)-SeV-Gag ベクターを用い、チャレンジには SHIV89.6PD を用いた。

C. 研究結果

いずれのサルにおいても、ブースト後 1 週目に高レベルの Gag 特異的 CTL 誘導が認められた (図 1)。そのレベルは、ブースト後 2 週目、ブースト後約 3 ヶ月と経過するにしたがって漸減したが、ブースト後約 3 ヶ月の時点でも、複製型 F(+)-SeV-Gag ベクター接種群では 4 頭中 4 頭で、非複製型 F(-)-SeV-Gag ベクター接種群では 7 頭中 4 頭で、Gag 特異的 CTL が検出可能なレベルに維持されていた (図 1)。

チャレンジ後 2 週目においては、ブースト後約 3 ヶ月で Gag 特異的 CTL レベルが検出下限以下となったサルも含め全頭で、効率よい Gag 特異的 CTL の 2 次反応が認められた。チャレンジ後 2 週目の Gag 特異的 CTL レベルは、ブースト後 1 週目の Gag 特異的 CTL レベルに近い値であった (図 1)。

D. 考察

SeV-Gag ブースト後、Gag 特異的 CTL は効率よく誘導され、1 週目の時点で高レベルの Gag 特異的 CTL が検出された。それ以降、Gag 特異的 CTL レベルは漸減したが、11 頭中 8 頭では、約 3 ヶ月の時点でも検出可能なレベルに維持されていた。非複製型 SeV ベクター接種群と比較して、複製型 SeV ベクター接種群の方で CTL レベルが維持される傾向が示唆されたが、それよりも重要なことは、ブースト後約 3 ヶ月で Gag 特異的 CTL レベルが検出下限以下となったサルも含め全頭で、チャレンジ後に効率よい Gag 特異的 CTL の 2 次反応が認められたことである。したがって、SeV-Gag ブースト後約 3 ヶ月経過した時点においても、Gag 特異的 CTL メモリーは全頭で維持されていたということである。

さらに注目すべきことは、この Gag 特異的 CTL の 2 次反応のレベルが、ブースト後 1 週目の Gag 特異的 CTL レベルにほぼ関連していたことである。したがって、SeV ベクターブースト後 1 週目の抗原特異的 CTL レベルは、ウイル

ス感染後の抗原特異的 CTL の 2 次反応レベルの指標となることが示唆された。

E. 結論

SeV ベクターブーストにより誘導された抗原特異的 CTL メモリーは、少なくとも 3 ヶ月間以上は維持されることが示された。さらに、ブースト後 1 週目の抗原特異的 CTL レベルは、ウイルス暴露後の抗原特異的 CTL の 2 次反応レベルの指標となることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 23:3166-3173, 2005.
2. Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Szuki Y, Nagai Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 79:10386-10396, 2005.
3. Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Kato M, Matano T. Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J. Virol.* 79:11529-11532, 2005.
4. Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Yamamoto H, Dohki S, Takiguchi M, Matano T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* 80:1949-1958, 2006.

2. 学会発表

1. Kawada M, Tsukamoto T, Igarashi H, Takeda A, Matano T. Reappearance of plasma viremia with accumulation of CTL escape mutations after vaccine-based control of SIVmac239 replication. Keystone Symposium (X8): HIV Vaccines (Current Challenges and Future Prospects), #320, Banff, Alberta, Canada, 4/12/2005.
2. Kawada M, Kobayashi M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A, Matano T. Long-term analysis of rhesus macaques that showed prophylactic vaccine-based control of SIVmac239 replication. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoA03, Kobe, Japan, 7/4/2005.
3. Matano T. Contribution of vaccine-induced cellular immune responses to viral suppression: analysis in macaque AIDS models. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoS18-02, Kobe, Japan, 7/4/2005.
4. Matano T, Kawada M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A. Long-Term Control of Simian-Human Immunodeficiency Virus 89.6P Replication in A Preclinical Trial of CTL-Based AIDS Vaccines. The International Congress of Virology, V-460, San Francisco, CA, USA, 7/26/2005.
5. 山本浩之、五十嵐博子、武田明子、川田真幹、俣野哲朗. CTL 誘導型予防エイズワクチンによる SIV/SHIV 複製制御における de novo 中和抗体の寄与の比較. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、1B20、横浜、11/20/2005.
6. 川田真幹、俣野哲朗. ワクチンによる SIV 複製の初期制御後、CTL エスケープ変異の蓄積により複製能低下にもかかわらず再出現したウイルス血症. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、#235、熊本、12/2/2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

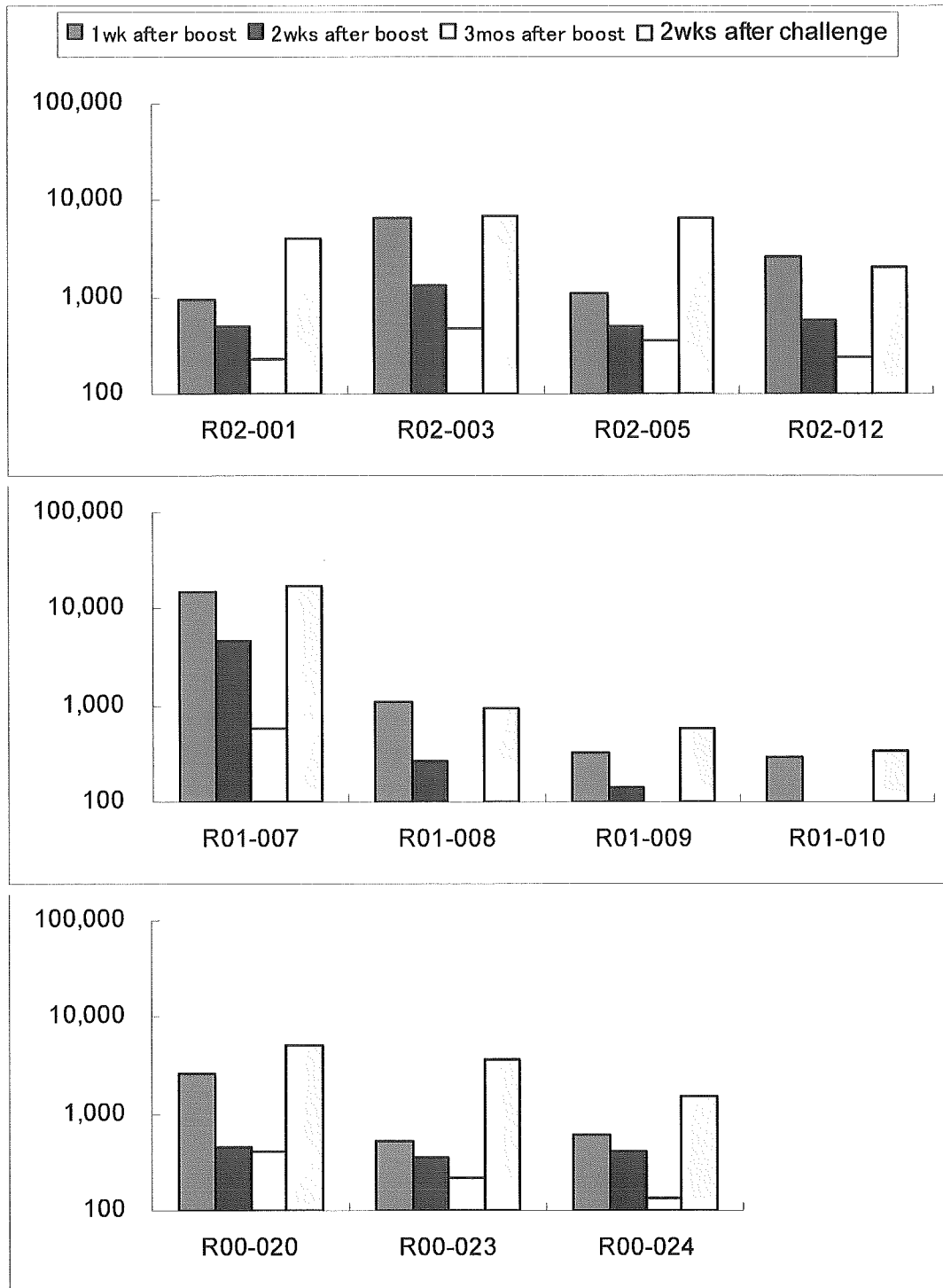


図 1 SeV-Gag ブースト後の Gag 特異的 CTL レベルの変化

上から順に、第 1 群：複製型 SeV-Gag ブースト・SIVmac239 チャレンジ群、第 2 群：非複製型 F(-)SeV-Gag ブースト・SIVmac239 チャレンジ群、第 3 群：非複製型 F(-)SeV-Gag ブースト・SHIV89.6PD チャレンジ群。縦軸は、Gag 特異的 CTL 頻度 (/100 万 PBMC)。各サルにつき、ブースト後 1 週目、2 週目、約 3 ヶ月、チャレンジ後 2 週目の Gag 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 がん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。また変異 HSV-1HF10 が優れた抗腫瘍性をもつことを見つけ、名古屋大学医学部倫理委員会等の承認のもとに再発性乳癌、頭頸部癌を対象にトランスレーショナルリサーチを行った。さらに、HF10 の抗腫瘍作用の増強を目的として、種々のアンプリコンの作製と利用、GCV との併用療法等について検討した。

A. 研究目的

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、有効性、安全性の上でも検討すべき課題は多い。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 に関してはヒトの再発性難治癌を対象にトランスレーショナルリサーチを行う。

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。

- 2) マウスの GM-CSF、IL-12、TNF- α 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。
- 3) HF10 の全塩基配列の決定を行い、すでに配列の知られている HSV-1 の標準株 17 と比較した。

(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 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に、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 (1×10^4 PFU から 1×10^5 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。どの患者においても HF10 接種による痛み、局所発赤などは認められなかったが、接種後 3~4