

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成19（2007）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	名誉所員
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
	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 18 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（国立感染症研究所名誉所員）

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…………… 5
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）
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…………… 9
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…………… 15
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…………… 19
近藤 一博（東京慈恵会医科大学医学部教授）
5. 遺伝子治療用ベクターの安全性評価に関する研究…………… 25
佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部長）
6. 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…………… 29
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…………… 33

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(国立感染症研究所名誉所員)

研究要旨 遺伝子治療の実用化には、ベクター性能の飛躍的な向上が求められる。遺伝子欠損症の治療に応用が期待されるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、高い感染力を持ちワクチン抗原等の一過性高発現に適したセンダイウイルス (SeV) ベクター、癌細胞で選択的に増殖する単純ヘルペスウイルス (HSV) 変異体とアンプリコンベクターの癌治療への応用に注目し、これらのベクターの基本性質をサル等の動物実験と、小規模臨床試験で調べた。血清型の異なる AAV ベクターが異なる臓器親和性を持つことが強く示唆されていることから、カンクイサルにどのような血清型の AAV がどのような臓器に自然感染しているかを調べた。AAV2 型ベクターは HeLa 細胞に効率よく遺伝子導入するが AAV10 型は遺伝子導入しない。AAV2 型と 10 型のキメラベクターを作って、この機構を解析した。AAV2 型ベクターにインシュレーターを搭載し、マウス筋肉に接種したところ、長期の高発現が見られた。SeV ベクターをアカゲサルに繰り返し投与した。抗 SeV 抗体存在下で、繰り返し効率よい導入遺伝子発現がみられ、異常な免疫応答も無かった。HSV の欠損免疫変異株 (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) の腫瘍部に HF10 を接種する臨床試験を行い、HF10 が明らかな有害事象を示すことなく抗腫瘍作用を示す成績を得た。担癌マウスモデルに対し GM-CSF を産生する HSV アンプリコンを HF10 と併用すると、抗腫瘍性が増強した。ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) 及び HHV-7 ベクターの作製と性質の解析を進めた。

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
俣野哲朗 東京大学医科学研究所教授
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
佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長
寺尾恵治 医薬基盤研究所霊長類医科学研
究センター長

A. 研究目的

ウイルスベクターは、遺伝子導入効率の高さや標的特異性を持ちうることから、今後も治療用遺伝子導入技術の中核となると予想される。1990 年代に遺伝子治療臨床研究が開始された頃には、レトロウイルス及びアデノウイルスベクターが用いられた。しかし、レトロウイルスベクターの組み込みによって白血病が発症したり、アデノウイルスベクターの高い免疫原性が患者の多臓器不全を誘発した例があり、またアデノウイルスベクターは当初の期待ほど遺伝子導入効率が高くない等、これらのベクター

の持つ短所が示されてきた。今後は、遺伝子の長期安定発現が必要な遺伝子欠損症の治療にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが有望とされ、ワクチン抗原等の一過性高発現にはセンダイウイルス (SeV) ベクターの高い感染性が期待されている。癌の治療には癌細胞で選択的に増殖する単純ヘルペスウイルス (HSV) 変異体とアンプリコンの応用が研究されている。本研究では、これらのウイルスベクターの基本的な性質を明らかにし、臨床応用における安全性、有効性評価の基盤情報を整備し、遺伝子治療の健全な発展を促す厚生行政に役立てることを目的とした。またベクター性能の向上も試みた。

B. 研究方法

1) カニクイザルに AAV10、11 型が自然感染していることが分かったので、AAV10、11 型キャプシド遺伝子に対応するプライマーを使ってこれらの AAVDNA を増幅し、ウイルスがどのような臓器に分布しているかを調べた。(神田、佐多、寺尾)

2) ヒトから分離された AAV2 型は HeLa 細胞によく感染するが、AAV10 型はほとんど感染しない。AAV2 型と 10 型のキメラキャプシドを持つベクターを作り、HeLa 細胞への感染を支える 2 型キャプシドの領域を調べた。(神田)

3) ヒト 19 番染色体の AAVS1 領域の 350 塩基長の領域はインシュレーター活性を持つことを見出したので、この配列を AAV ベクターに組み込み、導入遺伝子の発現に与える効果を調べた。(神田)

4) SeV ベクターはヒトに効率よく感染し、しかもベクターゲノムが複製するため導入遺伝子が高発現する。ワクチン抗原やサイトカインの一過性高発現への応用が期待されている。サル免疫不全症ウイルスの Gag 蛋白質を発現する複製型 SeV ベクターと F 欠損非複製型 SeV ベクターを作り、アカゲサルに経鼻接種して、Gag 蛋白質に対する免疫応答を調べた。繰り返し接種の安全性、有効性を検討した。(俣野、佐多、寺尾)

5) HSV の弱毒変異株 (HF10) をマウス腹腔播種モデルに投与すると、癌細胞で良く増殖し癌細胞を傷害すると共に、NK 細胞やマクロファージを活性化し、さらに細胞傷害性 T 細胞を誘導する。HF10 をヒトの転移性乳癌及び頭頸部腫瘍の治療に使う臨床試験を行った。(西山)

6) HF10 の抗腫瘍活性を増強するために、GM-CSF 遺伝子発現アンプリコンの併用をマウスモデルで検討した。(西山、倉田)

7) U2-U8 領域が KO された HHV-6 と HHV-7 の、臍帯血 T 細胞、成人の T 細胞、マクロファージおよび MT-4 細胞、SupT1 細胞における感染様式と、これらの細胞を様々な方法で刺激した時のウイルス増殖性の変化を検討することで、U2-U8 領域欠損の HHV-6 と HHV-7 の増殖に与える影響とそのメカニズムを検討した。

(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) カニクイザルに自然感染している AAV10、11 型ゲノムは回腸、脾臓、リンパ節、肝臓、骨髄、肺、腎臓等に検出された。ゲノム量は少なく、検出限度に近いレベルであった。自然感染した種々の血清型 AAV の体内分布が、各血清型 AAV の標的臓器を知る基盤となる。

2) AAV の感染では、ウイルス粒子が細胞表面の特定分子 (結合レセプター) に結合し、さらに別の細胞分子 (侵入レセプター) と複合体を形成して核内に運ばれる。AAV2 型のキャプシド蛋白質のアミノ酸 493-739 領域が結合レセプターと、アミノ酸 236-315

領域が侵入レセプターと結合することがわかった。臓器親和性は、各 AAV が利用する結合レセプター分子と侵入レセプター分子の組み合わせに依存していることが強く示唆されたので、これらのレセプター分子に結合するキャプシドの領域がわかれば、結合領域に変異を導入する等の方法で、標的臓器特異性を増したり、変更する改変が可能となろう。

3) AAVS1 インシュレーターを搭載した AAV2 型ベクターをマウス大腿筋に接種すると、非搭載ベクターからの導入遺伝子発現に比べ、接種 3 ヶ月後に 1000 倍程度高い発現が継続していた。

4) 複製型と非複製型 SeV ベクターの感染は共に鼻腔粘膜周辺に局限した。ベクター接種後 1 週目で末梢血に高レベルの Gag 特異的 CTL が検出された。時間と共にレベルは漸減したが、3 ヶ月の時点でも複製型ベクター接種群では 4 頭中 4 頭で、非複製型ベクター接種群では 7 頭中 4 頭で CTL が検出された。複製型ベクター接種後 153 ないし 190 週目に非複製型ベクターを追加接種した。153 週目に追加接種したサルにはさらに 160 週目に非複製型ベクターを再度追加接種した。全ての追加接種で有害な副作用は認められず、効率よい Gag 特異的 CTL レベルの上昇が認められた。

非複製型ベクターの接種量を変えて効果を調べ、 6×10^7 CIU(細胞感染単位)で Gag 特異的 CTL が効率良く誘導できることが分かった。この成績は、臨床試験での接種量を決める基盤となる。

5) 転移性乳癌 6 名の皮膚転移腫瘍(径 1-2cm)に HF10 (5×10^5 PFU) の 3 回接種で、80%以上の腫瘍細胞が死滅した。接種局所の肉眼的所見、自覚症状、血液所見などにとく変化は認められず、副作用はないと判定した。再発性頭頸部癌患者 2 名を対象に皮膚、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。HF10 を接種したいずれの患者においても、痛み、局所発赤や抗 HSV 抗体価の上昇は認められなかった。切除した腫瘍には広範な癌細胞の死滅と、CD4、CD8 陽性リンパ球の浸

潤が認められた。これらの成績は、HF10 の高い抗腫瘍作用と安全性を強く示唆している。現在、英国において GMP 製剤の製造が完了し、高力価の標品が得られた。GLP での前臨床試験を経た後、FDA の認可を得て、頭頸部癌患者を対象に本格的な臨床試験に入る予定である。

6) 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すると、HF10 単独より強い単球系細胞の浸潤を誘発し、有意に高い抗腫瘍作用を示した。

D. 考察

1) 自然感染では同一臓器に異なる血清型 AAV が検出されることから、標的臓器親和性はかならずしも厳格では無いらしい。臓器親和性は、各 AAV が利用する結合レセプター分子と侵入レセプター分子の組み合わせに依存していることが強く示唆されたので、これらのレセプター分子に結合するキャプシドの領域がわかれば、結合領域に変異を導入する等の方法で、標的臓器特異性を増したり、変更する改変が可能となろう。

2) AAV ベクターは、AAV と異なり、細胞染色体に組み込まれることは無く、遊離の核酸として核内に留まることが分かってきた。従って、筋肉細胞のような非分裂細胞に入ると、長く安定に留まると考えられている。インシュレーターは AAV ベクターからの遺伝子発現を長期間継続させる新たな技術に役立つ可能性が高い。

3) SeV ベクター追加接種は、抗 SeV 抗体存在下でも Gag 特異的 CTL 誘導・維持に有効であることが示され、SeV ベクターは、繰り返し投与が可能なうえ、接種部位に局限して一過性に導入遺伝子を高発現することがわかった。この性質は、細胞性免疫を誘導するワクチン抗原の発現系に適しており、広汎な臨床応用が期待できる。

4) アンプリコンプラスミドの併用によって HF10 感染細胞に免疫活性化因子を発現させる方法は、臨床応用が期待できる。

E. 結論

血清型の異なる AAV が異なる標的臓器親和性を持つ機構は、感染に利用する結合レセプターと侵入レセプターの組み合わせに依存している。侵入レセプターは、核移行、核内での脱殻等に関わる可能性が示唆された。この機構を詳細に調べれば、特定の臓器に遺伝子導入する AAV ベクターが開発できる。インシュレーターを搭載は、AAV ベクターによる導入遺伝子の発現期間を飛躍的に伸ばすと期待できる。

F 遺伝子欠損非増殖型 SeV ベクターは、増殖型と同様の高い導入遺伝子発現能を持つ。繰り返し投与によっても、抗 SeV 抗体によって導入遺伝子の発現が阻止されることもなく、過度な免疫応答を誘発することも無いので、一過性の高発現が必要なワクチン抗原の発現などに実用性がある。

HSV 欠損変異株による癌治療の安全性と有効性が示唆された。今後、腫瘍免疫増強因子を発現するアンプリコンとの併用で、実用的な癌治療法の一つに発展する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(原著論文のみ)

別紙

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請中

1. 「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
2. 「HF10 を使う癌のウイルス療法に関する特許」

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、導入遺伝子を長期にわたって安定に発現させ続けるベクターとして期待されている。当初は、ウイルスとしての AAV 同様にベクターゲノムが細胞染色体に組み込まれると考えられていたが、非構造蛋白質である Rep 蛋白質をもたないベクターは、感染細胞核内で二本鎖 DNA となった後、主に 2 量体を形成し、核内遊離核酸として存在することが分かってきた。従って、AAV ベクターは筋肉細胞や神経細胞のような非分裂細胞に導入すれば、ベクターゲノムが長期間維持される。AAV には複数の血清型があり、血清型によって臓器親和性が異なるので、筋肉細胞や神経細胞を標的とする AAV ベクターを開発することが求められている。AAV の標的細胞親和性を決める分子機構を解析するために、HeLa 細胞には AAV2 型がよく感染するが AAV10 型はほとんど感染しないことに注目し、AAV2 型と 10 型 capsid 蛋白質の組換え体を作り、HeLa 細胞への感染性を担う領域を解析した。HeLa 細胞への結合に関わる領域とその後の核移行、脱殻に関わる領域が明らかになった。また、血清型の異なる AAV が自然界でどのような臓器に感染しているのかを詳細に知るために、カンクイザルの各臓器から抽出した DNA 中の AAV ゲノムを、既知の血清型に共通の AAV コンセンサスプライマーを用いて PCR によって増幅、検出し、サル体内での分布を調べた。これまでに同定したヒトインシュレーター因子を AAV2 型ベクターに搭載し、遺伝子発現への影響を調べた。インシュレーター搭載ベクターをマウス大腿筋に接種すると、長期の高発現が観察された。

A. 研究目的

非分裂細胞でベクターゲノムが安定に長期間維持される AAV ベクターの性質を活かすためには、筋肉細胞や神経細胞に感染性の高いベクターを作る必要がある。血清型の異なる AAV が異なる臓器親和性を持つ分子機構を知ることが目的とした。また、インシュレーターを搭載することで、ベクターゲノムが不活化されず、導入遺伝子の長期発現が可能になるか調べた。

B. 研究方法

1) AAV2 型と 10 型の capsid 蛋白質を様々な位置で繋ぎ合わせたキメラ capsid 遺伝子を作製し、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するキメラ AAV ベクターを作製した。これらのベクターの HeLa 細胞への結合、侵入、導入遺伝子の発現を調べた。

2) 既知の AAV 群の capsid 遺伝子に共通する配列をプライマー (コンセンサスプライマー) として、14 頭のカンクイザルの各臓器から抽出した DNA 中の AAV ゲノムを PCR により増幅、検出した。また、カンクイザルに自然感染している AAV10 型、11

型のキャプシド遺伝子にそれぞれ特異的なプライマーを用いて、同様の検討を行い AAV10 型、11 型の体内分布を調べた。

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を持つ DNA 配列 (350 塩基長) を、ルシフェラーゼ発現 AAV2 型ベクターゲノムの 5' 端 ITR とプロモーターの間に挿入した。このベクターをマウス大腿筋に接種し、1、3 ヶ月後に筋肉を回収し、抽出液のルシフェラーゼ活性を調べた。

(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、許可を得て行った。

C. 研究結果

1) HeLa 細胞に AAV2 型ベクターがよく感染し AAV10 型ベクターは感染しない機構を調べた。2 型ベクターは HeLa 細胞表面へ結合するが、10 型ベクターは結合しなかった。10 型のキャプシド蛋白質 (739 アミノ酸) のうちアミノ酸(aa)493、375、315 から C 末端領域のアミノ酸を 2 型の相当領域に変えたキメラベクターは HeLa 細胞表面へ結合したが、導入遺伝子は発現しなかった。同様に、aa236 から C 末端まで 2 型に変えたキメラベクターでは、2 型ベクターとほぼ同レベルに HeLa 細胞で導入遺伝子を発現した。AAV2 型、及び AAV2 型の aa236-315 を 10 型に変えた変異キャプシド蛋白質にそれぞれ GFP を融合したウイルス粒子を複製し、HeLa 細胞への感染過程を調べた。両者とも、同様に細胞内に侵入し、核内に移行することがわかった。

2) コンセンサスプライマーを使った PCR でカニクイザルに感染している AAV ゲノムを検出すると、回腸(12/14)、脾臓(8/14)、リンパ節(7/14)、肝臓(5/13)、骨髄(4/14)等に AAV の感染が見られた。AAV10 型、11 型は脾臓(10 型 : 4/7、11 型 : 4/7)に多く検出され、さらにリンパ節(10 型 : 3/7、11 型 : 2/7)、回腸(10 型 : 2/7、11 型 : 2/7)、副腎(10 型 : 2/7、11 型 : 2/7)等にも検出された。7 頭中 6

頭のサルで、AAV10 型、11 型ゲノムがともに検出された。そのうち 4 頭のサルでは脾臓、リンパ節、回腸、副腎等の臓器で、AAV10 型、11 型ゲノムがともに検出された。

3) AAVS1 インシュレーターを搭載した AAV2 型ベクターをマウス大腿筋に接種すると、非搭載ベクターからの導入遺伝子発現に比べ、接種 3 ヶ月後に 1,000 倍程度高い発現が継続していた。

D. 考察

1) AAV2 型キャプシド蛋白質の aa493 から C 末端までの領域が HeLa 細胞表面への結合に、aa236-374 の領域が導入遺伝子の発現に重要であることがわかった。細胞内へ侵入した AAV ベクターは核内に移行後、脱殻によりベクターゲノムが放出され、1 本鎖 DNA であるゲノムから 2 本鎖 DNA が合成され、そこから転写が起こると考えられているが、詳細は不明である。10 型キャプシド蛋白質の aa236-374 領域を持つキメラキャプシドも核移行までは同様に進むが、遺伝子発現は起こらないので、核内へ移行後の反応が HeLa 細胞では進まない。2 型と 10 型キャプシド蛋白質の aa236-374 の領域の機能を比較すれば、AAV の感染、増殖調節の素過程を明らかにでき、AAV ベクターの臨床応用に直接役立つ情報となる。

2) 自然感染した野生型 AAV ゲノムはカニクイザルの回腸に高率に検出された。その他に、脾臓、リンパ節等のリンパ系組織に多く検出されることと合わせて考えると、AAV は経口感染し、腸管粘膜、特にパイエル板から侵入後、血球系細胞に感染し、全身へ広がると推測される。

1 つの臓器に 2 つの異なる血清型 AAV が感染していることがわかった。1 つの細胞に複数の異なる血清型 AAV が重感染することにより、組換え体が生じる可能性があり、AAV の多様性に繋がると思われる。

3) AAV ベクターは、AAV と異なり、細胞染色体に組み込まれることは無く、遊離の核酸として核内に留まることが分かってきた。従って、筋肉細胞のような非分裂細胞に入ると、長く安定に留まると考えられて

いる。インシュレーターは AAV ベクターからの遺伝子発現を長期間継続させる新たな技術に役立つ可能性が高い。

E. 結論

血清型の異なる AAV が異なる標的臓器親和性を持つ機構は、感染に利用する結合レセプターと侵入レセプターの組み合わせに依存している。侵入レセプターは、核移行、核内での脱殻等に関わる可能性が示唆された。この機構を詳細に調べれば、特定の臓器に遺伝子導入するベクターが開発できる。インシュレーターの搭載は、導入遺伝子の発現期間を飛躍的に伸ばすと期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表（英文原著論文のみ記載）
 - 1) Takizawa S, Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Yashgi T, Takeuchi T, Kanda T, Huijbregtse JM, Akiyama T, Taketani Y: Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Genes Cells* 11: 453-464, 2006.
 - 2) Mori S, Takeuchi T, Enomoto Y, Kondo K, Sato K, Ono F, Iwata N, Sata T, Kanda T: Biodistribution of Intravenously Administered AAV-2, 10, and 11 Vectors in a Low Dose to Cynomolgus Monkeys. *Jpn J Infect Dis* 59: 285-293, 2006.
 - 3) Mori S, Ozaki S, Yasugi T, Yoshikawa H, Taketani Y, Kanda T: Inhibitory cis-Element-Mediated Decay of Human Papillomavirus Type 16 L1-Transcript in Undifferentiated Cells. *Mol Cell Biochem* 288: 47-57, 2006.
 - 4) 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* 231: 309-313, 2006.

- 5) Kukimoto I, Takeuchi T, Kanda T: CCAAT-Enhancer Binding Protein _ Binds to and Activates the P670 Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *Virology* 346: 98-107, 2006.
- 6) Kondo K, Ishii Y, Ochi H, Matsumoto T, Yoshikawa H, Kanda T: Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 Pseudovirions with Antisera Induced by Immunizing Rabbits with Synthetic Peptides Representing Segments of the HPV16 Minor Capsid Protein L2 Surface Region. *Virology* 358: 266-272, 2007.
- 7) Sato K, Takeuchi T, Kukimoto I, Mori S, Yasugi T, Taketani Y, Kanda T: Human Papillomavirus Type 16 P670 Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. *Virus Genes*, 2007. (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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、平成 17 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。今年度は、サル免疫不全ウイルス Gag 発現非複製型 F 欠損 SeV (F[-]SeV-Gag) ベクターを用い、Gag 特異的 CTL 誘導に結びつくベクター接種量の検討を行った。これまでの DNA プライム・F[-]SeV-Gag ブーストワクチン接種実験では、ブースト時に 6×10^9 CIU のベクター経鼻接種を行っていたが、本研究では、その $1/100$ の 6×10^7 CIU の F(-)SeV-Gag ベクター経鼻接種にても Gag 特異的 CTL を誘導しうる結果が得られた。この結果は、SeV ベクターの実用化に向けてたいへん有用な情報であると考えられる。

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 ワクチンとサル免疫不全ウイルス (SIV) 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。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。さらに平成 17 年度には、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。今年度は、非複製型 F 欠損 SeV (F(-)SeV) ベクターワクチンについて、その実用化に向けて必要な情報の一つとして、F(-)SeV ベクター接種量の検討を行うこととした。

B. 研究方法

カニクイサル 5 頭を用いた DNA プライム・F(-)SeV-Gag ブーストワクチン接種実験において、ブースト時の F(-)SeV-Gag 接種量の影響を調べた。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 SIV Gag 発現 F(-)SeV (F(-)SeV-Gag) ベクター経鼻接種によるブーストとした。3 頭を用いた第 1 実験では、ブースト時に各々 1 頭ずつ、 6×10^9 CIU (cell infectious unit) (C00-014)、 6×10^8 CIU (C00-001)、 6×10^7 CIU (C97-117) の F(-)SeV-Gag ベクターを経鼻接種した。この第 1 実験の結果をもとに、第 2 実験では 2 頭を用い、ブースト時に各々 1 頭ずつ、 6×10^7 CIU (C97-066)、 6×10^6 CIU (C91-084) の F(-)SeV-Gag ベクターを経鼻接種した。

ブースト後 1 週目の末梢血単核球 (PBMC) を用い、Gag 510 アミノ酸をカバーするオーバーラッピングペプチド (約 15-mer x 117 本) 特異的に誘導されるインターフェロン γ を細胞内免疫染色にて検出することにより、Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球レベルおよび Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルを調べた。ブースト前、ブースト後 1 週目およびブースト後 2 週目の血漿を用い、ELISA にて SeV 特異的抗体価を調べた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国

立感染症研究所、医薬基盤研究所および東京大学医科学研究所の動物実験委員会の審査を受け、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済みである。

C. 研究結果

第 1 実験においては、ブースト時に 6×10^9 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C00-014、 6×10^8 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C00-001、 6×10^7 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C97-117 のいずれの 3 頭においても、ブースト後 1 週目に Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球および Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の誘導が認められた (図 1)。第 2 実験においては確認中である。

血漿中の抗体価の解析では、全 5 頭において、ブースト後 2 週目に SeV 特異的抗体の誘導が認められた。F(-)SeV-Gag ベクター接種量が低い C91-084 (6×10^6 CIU 接種) および C97-066 (6×10^7 CIU 接種) では、誘導抗体価がやや低い傾向がみられた (図 2)。

D. 考察

これまでの DNA プライム・F(-)SeV-Gag ブーストワクチン接種実験では、ブースト時に 6×10^9 CIU の F(-)SeV-Gag ベクター経鼻接種を行っていたが、本研究では、その 1/100 の 6×10^7 CIU の F(-)SeV-Gag ベクター経鼻接種にても Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球および Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球を誘導しうる結果が得られた。抗体価の解析結果から、従来の接種量の 1/10 にあたる 6×10^8 CIU の F(-)SeV-Gag ベクター経鼻接種では免疫誘導効率に変化はないものの、従来の接種量の 1/100 にあたる 6×10^7 CIU のベクター接種では、 6×10^8 CIU のベクター接種と比較して免疫誘導効率が低下する可能性が考えられた。この点に関しては今後の検討課題である。

E. 結論

DNA プライム・F(-)SeV-Gag ブーストエイズワクチン接種実験において、従来のブーストベクター接種量の 1/100 にあたる 6×10^7 CIU の F(-)SeV-Gag ベクター経鼻接種にても Gag 特異的 CTL を誘導しうる結果が得られた。この結果は、SeV ベクターの実用化に向けてたいへん有用な情報であると考えられる。

F. 健康危機情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, Matano T: Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J Gen Virol.* (in press)
- 2) Takahashi-Tanaka Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miysazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A: Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis.* (in press)
2. 学会発表
- 1) Matano T: Control of viral replication by vaccine-induced CTL in macaque AIDS models. The 13th East Asia Symposium on Biomedical Research: From Genes to Therapeutics, Seoul, Korea, 7/19/2006.
- 2) Moriya C, Takeda A, Matano T: A single amino acid change in CTL epitope flanking region can abort efficacy of vaccine-induced CTL responses against simian immunodeficiency virus infection. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 2006, Awaji, Japan.
- 3) Matano T: Long-term CTL-based control of simian immunodeficiency virus replication in vaccinated rhesus macaques. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 2006, Awaji, Japan.
- 4) 俣野哲朗: CTL 誘導エイズワクチンによ

る長期ウイルス複製制御の可能性。第 9 回白馬シンポジウム in 京都 (京都) 2006 年 10 月

- 5) 関紗由里、川田真幹、俣野哲朗: Gag 特異的 CTL からのエスケープ変異を蓄積した SIV の複製能。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 6) 湯浅光博、川田真幹、山本浩之、俣野哲朗: X4-tropic SHIV 複製制御サルにおける R5-tropic SIV 重複感染防御機序。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 7) 塚本徹雄、俣野哲朗: サルエイズモデルにて誘導される CTL の SIV 複製抑制能の in vitro 評価系の樹立。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 8) 守屋智草、五十嵐博子、井上 誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、永井美之、俣野哲朗: ワクチン誘導 CTL に対する異種株サル免疫不全ウイルスのエスケープ機序。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 9) 山本浩之、川田真幹、俣野哲朗: サル免疫不全ウイルス感染成立後の中和抗体のウイルス複製抑制効果。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 10) 川田真幹、山本浩之、塚本徹雄、関紗由里、五十嵐博子、俣野哲朗: 細胞傷害性 T リンパ球誘導型予防エイズワクチンによる長期のサル免疫不全ウイルス複製制御の可能性。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 11) 俣野哲朗: エイズウイルス感染に対する獲得免疫反応。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 12) 山本浩之、川田真幹、俣野哲朗: サル免疫不全ウイルス感染に対する細胞傷害性リンパ球と中和抗体の相乗的な複製抑制効果。第 20 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 13) Matano T: Multiple epitope-specific CTL responses in control of immunodeficiency virus replication. 20th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, Dec. 2006, Tokyo, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

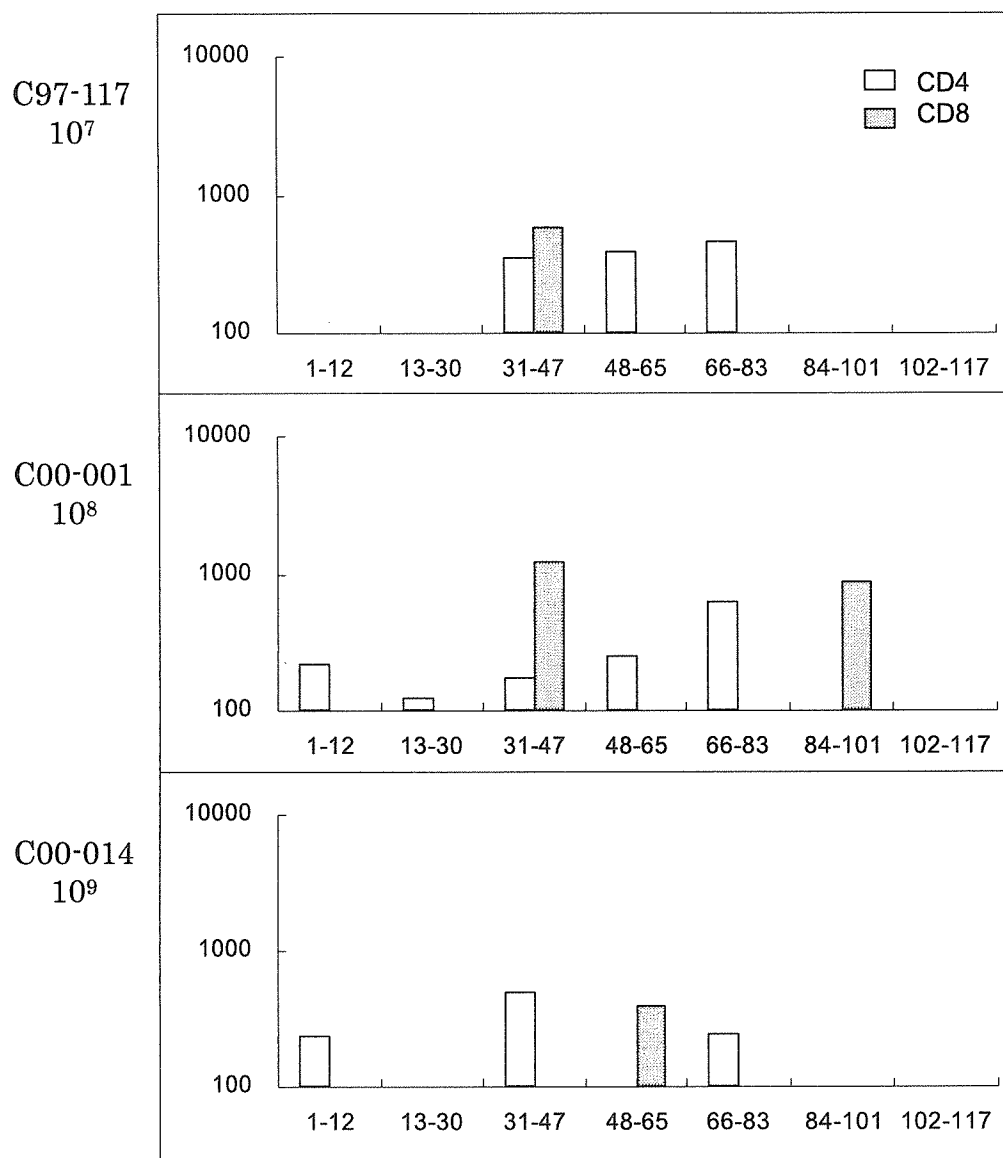


図 1. F(-)SeV-Gag ブースト後1週目の Gag 特異的 Tリンパ球レベル

上から順に、ブースト時に 6×10^7 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C97-117、 6×10^8 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C00-001、 6×10^9 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C00-014。縦軸は、 1×10^6 PBMC あたりの Gag 特異的 CD4 陽性 Tリンパ球数(白)および Gag 特異的 CD8 陽性 Tリンパ球数(黒)。横軸は抗原ペプチドの番号で、各番号は以下の Gag アミノ酸領域に相当する。1-12: Gag 1-65; 13-30: Gag 55-139; 31-47: Gag 129-213; 48-65: Gag 202-292; 66-83: Gag 282-364; 84-101: Gag 354-442; 102-117: Gag 432-510。

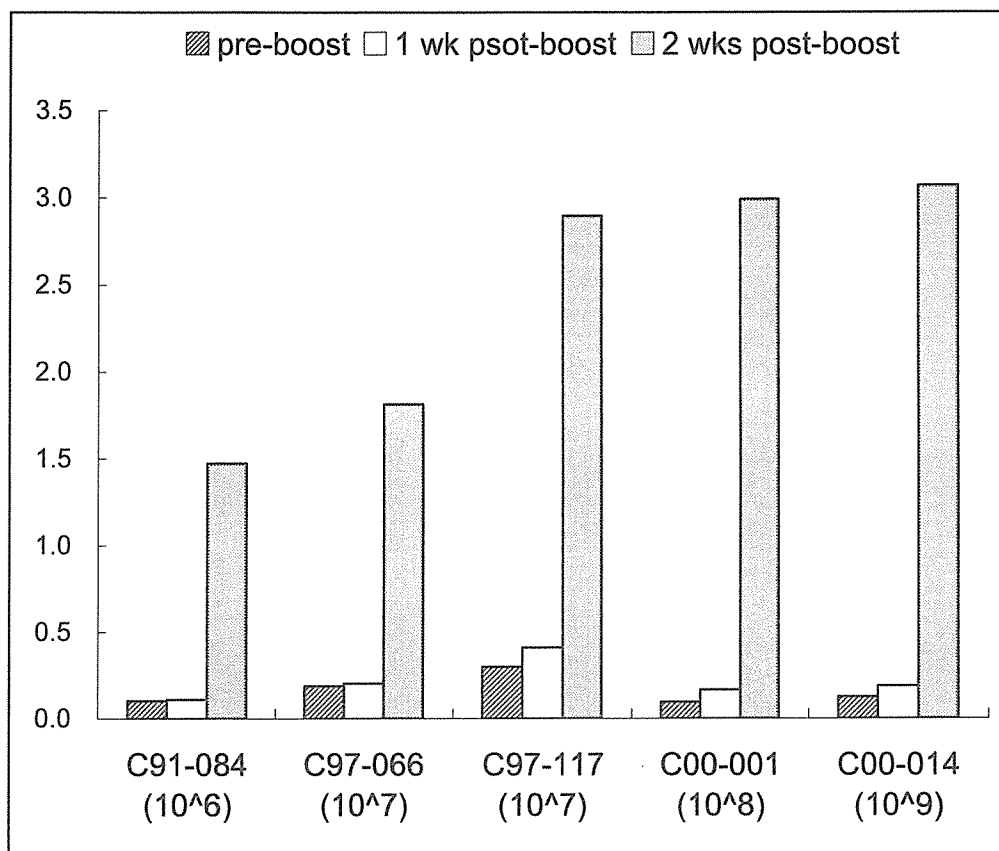


図2 F(-)SeV-Gag ブースト前後の SeV 特異的抗体価

ブースト時に 6×10^6 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C91-084、 6×10^7 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C97-066、 6×10^7 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C97-117、 6×10^8 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C00-001、 6×10^9 CIU の F(-)SeV-Gag ベクターを接種したサル C00-014 について、ブースト前、ブースト後1週目およびブースト後2週目の血漿中 SeV 特異的抗体価を ELISA の OD 値にて示す。

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 変異 HSV-1 HF10 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乳癌、頭頸部癌を対象にトランスレショナルリサーチを行ってきた。HF10 に関しては英国のウイルス製造企業において製剤化が既に終了し、GLP での安全性試験が行われている。本年度の研究では 1) マウスに静注した時の体内分布、2) 適応拡大のためにマウス悪性黒色腫に対する効果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。我々は、前者での利用、すなわつ弱毒化 HSV を用いた Oncolytic Virotherapy の可能性について主に模索してきた。その結果、HF10 と名付けた変異ウイルスに優れた抗腫瘍性があることを見出し、HF10 の生物学的、遺伝学的性状について検討するとともにヒトの再発性難治癌を対象にトランスレショナルリサーチを行ってきた。本研究では HF10 の特性を明らかにするためのさらなる検討を行った。

B. 研究方法

1) DBA/2 マウスの皮下に clone M3 (1×10^7 cells/mice) を接種し皮下腫瘍モデルを作製、腫瘍形成後に HF10 (10^7 pfu) を皮下結節内

に接種し、その後の腫瘍の大きさの変化及びマウスの生存について観察した。

2) ICR 6 週齢マウスの尾静脈に HF10 及び KH7 を 1×10^7 pfu 接種し、3、24、48、72、96 時間後に各組織・臓器を採取し、DNA を抽出して PCR にてウイルス DNA の検出を行った。

3) ICR 6 週令マウスの腹腔内に HF10、KH7 を連続的に投与し、毒力について比較した。ここで用いたウイルスは無血清培地に馴化した Vero 細胞にて増殖させたものを用いた。

C. 研究結果

1) clone M3 を用いたマウス悪性黒色腫皮膚モデルにおいて、HF10 接種群はコントロール群と比較して、皮下腫瘍の増大阻止効果が見られた。組織学的には腫瘍細胞のウイルス感染像とともに、接種部位に一致して多数の炎症細胞浸潤像が観察された。ウイルス抗原を用いた免疫組織化学染色では、ウイルス抗原は、腫瘍部のみに限局して存在していた。興味深い事に、背部両側に皮下腫瘍を作製し、片側のみに HF10 を接種した実験では、ウイルス接種をしていない側の腫瘍の増大も有意に抑制された。

2) マウス尾静脈に HF10 (1×10^7 pfu) を接

種した場合、3時間後では、脾臓を除き各臓器にウイルス DNA は検出できなかった。24 時間後に副腎及び膀胱で検出されたが、他の臓器には検出されなかった。副腎ではこの後も陽性が続き、48、72、96 時間でも検出された。一方、KH7 では 24 時間で副腎と脾臓に検出され、48 時間では頸髄、胸髄にも検出されるようになった。96 時間では小脳、三叉神経節にも検出された。

3) KH7 を 1×10^4 PFU、3 日間腹腔内投与したマウスは 6-7 日目から神経症状、麻痺が現れ、9 日目までに全匹死亡した。一方、HF10 投与群では、 1×10^6 PFU では体重減少、神経症状など明らかな有害事象は認められず、5 回/週、3 クール投与してもコントロールと変わらなかった。 10^7 PFU、 10^8 PFU 接種群で一時的な体重減少が認められたが、10 日目にはコントロール群に追いつき、計 15 回接種しても死亡例はなかった。

D. 考察

ウイルスによる腫瘍溶解療法では、癌細胞にウイルスが溶解感染することによる直接的な殺細胞効果のみならず、ウイルス感染による腫瘍特異的免疫の誘導効果も期待されている。今回の実験の結果、HF10 はマウス皮下に作製した悪性黒色腫細胞に感染し、増殖する事で長期間存在し続けることができる事、また HF10 接種により全身的な抗腫瘍免疫が誘導されている可能性が皮下接種モデル系においても示唆された。

以前から報告されており、我々も観察していたことだが、HSV が副腎組織に強い親和性をもっていることが改めて確認された。HF10 も高い感染価の接種では一過性に増殖するが、死亡に至らせる程ではなかった。ウイルス中和抗体価の存在下ではこのような体重減少は全く認められないので、臨床的には大きな問題にはならないと考えられる。

E. 結論

再発性乳癌や頭頸部癌に対するトランスレー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 vivo therapy の将来性を強く期待させるものであった。現在、英国にて GMP 製剤の製造が完了し、高力価(約 1×10^9 PFU/アンブレ)の標品が得られた。GLP での前臨床試験を経た後、来年度には FDA の認可を得て、頭頸部癌患者を対象に本格的な臨床試験に入る予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, 2006.
- 2) Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Tanaka M, Sata T, Nishiyama Y, 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.
- 3) Koshizuka T, Kawaguchi Y, Goshima F, Mori I, Nishiyama Y: Association of two membrane proteins encoded by herpes simplex virus type 2, UL11 and UL56. *Virus Genes* 32: 157-167, 2006.
- 4) Mori I, Goshima F, Watanabe D, Ito H, Koide N, Yoshida T, Liu B, Kimura Y, Yokochi T, Nishiyama Y: Herpes simplex virus US3 protein kinase regulates virus-induced apoptosis in olfactory and vomeronasal chemosensory neurons in vivo. *Microb infect* 8: 1806-1812, 2006.
- 5) Asai R, Kato A, Kato K, Kanamori-Koyama M, Sugimoto K, Sairenji T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y: Epstein-barr virus protein kinase BGLF4 is a virion tegument protein that dissociates from virions in a phosphorylation dependent process and phosphorylates the viral immediate-early protein BZLF1. *J Virol* 80: 5125-5134, 2006.
- 6) Shibata Y, Hoshino Y, Hara S, Yagasaki H,

- Kojima S, Nishiyama Y, Morishima T, Kimura H: Clonality analysis by sequence variation of the latent membrane protein 1 gene in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 78: 770-779, 2006.
- 7) Fujimoto Y, Mizuno T, Sugiura S, Goshima F, Kohno S, Nakashima T, Nishiyama Y: Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 126: 1115-1117, 2006.
- 8) Kimata H, Imai T, Kikumori T, Teshigawara O, Nagasaka T, Goshima F, Nishiyama Y, Nakao A: Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus HF10 against recurrent metastatic breast cancer. *Ann Surg Oncol* 13: 1078-1084, 2006.
- 9) Mori I, Nishiyama Y: Accessory genes define the relationship between the herpes simplex virus and its host. *Microb Infect* 8: 2556-2562, 2006.
- 10) Iwata S, Shibata Y, Kawada J, Hara S, Nishiyama Y, Morishima T, Ihira M, Yoshikawa T, Asano Y, Kimura H: Rapid detection of Epstein-Barr virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol* 37: 128-133, 2006.
- 11) Zhang L, Daikoku T, Ohtake K, Ohtsuka J, Nawa A, Kudoh A, Iwahori S, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T: Establishment of a novel foreign gene delivery system combining an HSV amplicon with an attenuated replication-competent virus, HSV-1 HF10. *J Virol Methods* 137: 177-83, 2006.
- 12) Luo C, Nawa A, Yamauchi Y, Kohno S, Ushijima Y, Goshima F, Nishiyama Y: Intercellular trafficking and cytotoxicity of recombinant HSV-1 thymidine kinase fused with HSV-2 US11 RXP repeat peptide. *Virus Genes*, Epub ahead of print, Aug22, 2006. (in press)
- 13) Ushijima Y, Luo C, Goshima F, Yamauchi Y, Kimura H, Nishiyama Y: Determination and analysis of the DNA sequence of highly attenuated herpes simplex virus type 1 mutant HF10, a potential oncolytic virus. *Microb Infect* 9: 142-149, 2007.
- 14) Tanino T, Nawa A, Kondo, E, Kikkawa F, Daikoku T, Tsurumi T, Luo C, Nishiyama Y, Takayanagi Y, Nishimori K, Miki Y, Iwaki M: Paclitaxel-2'-ethylcarbonate prodrug can overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to increase drug cytotoxicity. *Pharm Res.* (in press)
- 15) Mori I, Nishiyama Y: Replication-competent herpes simplex virus: a novel and promising modality for cancer therapy. *Curr Top Virol.* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし