

図1. マウス尾整脈へのウイルス接種後(1 × 10⁷PFU)のウイルス DNA の分布

臓器(ICR)	KH7 1X10 ⁷ PFU i.v.					HF10 1X10 ⁷ PFU i.v.				
	3hr	24hr	48hr	72hr	96hr	3hr	24hr	48hr	72hr	96hr
大脳	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
小脳	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
三叉神経	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
眼+視神経	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
副腎	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
腎臓	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
膀胱	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
肺	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
肝臓	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
頸、胸脊椎	ND	-	+	+	+	ND	-	-	-	-
腰椎	ND	-	-	-	+	ND	-	-	-	-
脾臓	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
膵臓	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

図2. マウス腹腔内ヘルペスウイルス接種による体重変化と生存率

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:清水 昭宏、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)

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る。ウイルス蛋白の発現が低く一生涯保持される潜伏感染状態を利用することにより、安全で長期的な遺伝子発現を得る事も可能である。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。今年度は、HHV-6 ベクターを利用した細胞治療の方法を検討するために、HHV-6 ベクターによる T 細胞での干渉 RNA の導入と発現を確認した。また、HHV-6 および HHV-7 を基礎としたウイルスベクターの U2-U8 領域の遺伝子を knock out することにより、これらのウイルスベクターを非増殖性にできることを示し、そのメカニズムの一端を明らかにした。また、HHV-6 ベクターの安全性をさらに向上させるために、HHV-6 ベクターに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を組み込み、本来 HHV-6 に対する抗ウイルス作用の弱いアシクロビルやガンシクロビルのウイルス増殖抑制効果が著しく向上することを確認した。

A. 研究目的

本研究は、我々が世界に先駆けて開発した 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、その安全性の確認と有効な治療法の開発をおこなう事を目的とする。

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。昨年度までの研究により、HHV-6、HHV-7 は、CD4 陽性 T 細胞、ナチュラル・キラー細胞、マクローファージなどの他種類の免疫担当細胞に非常に高率に遺伝子導入可能である事が判明した。

また、HHV-6 および HHV-7 の潜伏感染、持続感染、増殖感染などの様々な感染様式を支持する細胞の種類や分化段階を詳細に検討するための、感染モデル動物を Scid-hu マウスを用いて作成することが出来た。

今年度は、HHV-6、HHV-7 ベクターを利用した細胞治療の可能性を検討するために、HHV-6 ベクターによる T 細胞での干渉 RNA の導入と発現を検討した。また、HHV-6 および HHV-7 を基礎としたウイルスベクターの U2-U8 領域の遺伝子を knock out することによるウイルスの増殖能の欠損のメカニズムを検討した。また、HHV-6 ベクターの安全性をさらに向上させるために、HHV-6 ベクターに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を組み込んだウイルスを作成し、本来 HHV-6 に対する抗ウイルス作用の弱いアシクロビルやガンシクロビ

ルのウイルス増殖抑制効果を検討した。また、昨年までに作成した Scid-hu マウスシステムを用いて、HHV-6 の潜伏感染・再活性化様式の *in vivo* での解析も行った。

B. 研究方法

1) HHV-6 ベクターによる T 細胞への干渉 RNA の導入と発現:

HHV-6 は病原性が低く、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と同じく CD4(+) T 細胞やマクロファージに感染するため、AIDS 治療を目的とした遺伝子治療用ベクターとしての応用が期待されている。また、shRNA などの干渉 RNA は HIV の侵入、増殖を抑制するツールとして利用されている。今年度の研究では、昨年までの開発した、U2-U8 領域を knock out することにより非増殖性とした HHV-6 ベクターに shRNA 発現ユニットを組み込み、T 細胞への遺伝子導入と shRNA 発現を確認した。

U2-U8 を knock out した HHV-6 は、通常の T 細胞においては吸着、侵入はするものの非増殖性であり、phytohemagglutinin (PHA) 刺激後の臍帯血 T 細胞でのみ増殖を認める。このため組み換えウイルスは、同意を得て採取した臍帯血由来の T 細胞を利用して、相同組み換えによって作成した。shRNA 発現ユニットは、Polymerase β (U6)プロモーター下に Firefly luciferase を標的とするものを作成し、HHV-6 の U2-U8 領域に導入した。組み換えウイルスの選択は Puromycin 耐性遺伝子と green fluorescent protein の発現を指標に行った。shRNA 発現の確認は、T 細胞株に firefly luciferase をアデノウイルスベクターを利用して導入した後、shRNA HHV-6 を感染させ、luciferase 蛋白の発現を発光によって測定することによって行なった。

2) HHV-6、HHV-7 の細胞指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析:

HHV-6 と HHV-7 は、CD4 陽性 T 細胞やマクロファージに効率よく感染し、免疫抑制患者におけるウイルス血症もほとんど疾患を生じないなど、遺伝子治療用ウイルスベクターとしての良い素質をもつ。我々は、

HHV-6 と HHV-7 の U2-U8 遺伝子領域を、EGFP と puromycin 耐性遺伝子で相同組換によって置き換えることで knocked out(KO)した組換ウイルスを、phytohemagglutinin (PHA)刺激した臍帯血 T 細胞を用いて作成した。このウイルスは成人の T 細胞や白血病由来 T 細胞株 MT-4 細胞、SupT1 細胞において増殖できないことが判明し、非増殖性ウイルスベクターとしての性質をもつことが判った。

今回は、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。

具体的には、成人および臍帯血由来の T 細胞を、インターロイキン 2(IL-2)、PHA、抗 CD3 抗体を用いて刺激し、U2-U8 を KO した HHV-6(H6R28)、HHV-7(H7R28)の増殖の有無を検討した。また、マクロファージや MT-4 細胞、SupT1 細胞における H6R28、H7R28 の感染様式も検討した。

3) 単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子による HHV-6 ベクターの制御:

HHV-6 は、病原性が低い上、U2-U8 遺伝子領域を knocked out(KO)することにより、PHA 刺激された臍帯血 T 細胞などの限られた細胞でしか増殖しない非増殖型 HHV-6 ベクターを作成できる。この KO ウイルスは、成人の血液細胞では増殖できないため、極めて安全性が高いと考えられる。しかし、HHV-6 は TK 遺伝子をもたず有効な抗ウイルス剤がないため、万一の事故に対する備えが充分ではない。本研究では、HHV-6 ベクターの安全性をさらに向上させる目的で、HSV-1 の TK 遺伝子を組み込んだ HHV-6 に対するガンシクロビル(GCV)およびアシクロビル(ACV)の効果を検討した。

HSV-1 TK 遺伝子の効果を検討するためには以下の 2 通りの方法を用いた。まず、HSV-1 TK 遺伝子を、レトロウイルスベクター pQCXIP を用いて MT-4 細胞に恒常的に発現させ、HHV-6 HST 株(野生株)を感染させ

た。次に、HSV-1 TK 遺伝子を EGFP との融合蛋白として発現し puromycin 耐性遺伝子を選択マーカーとして、相同組換によって U2-U8 領域 KO HHV-6 に導入し、PHA 刺激したヒト臍帯血 T 細胞のみで増殖可能な HSV-1 TK 遺伝子をもつ HHV-6 (HHV-6 +TK)を作成した。これを臍帯血 T 細胞に感染させ、薬剤によるウイルス増殖の影響を検討した。

4) SCID-hu マウスモデルを用いた HHV-6 潜伏感染・再活性化の解析:

NOD/SCID-hu マウス尾静脈より HHV-6 感染 T 細胞を移注し、4~6 週間後に末梢血、骨髓、脾臓を採取した。フローサイトメトリーでヒト CD45⁺細胞を、double-nested PCR 法で HHV-6 ゲノム DNA を、RT-PCR 法で HHV-6 mRNA 発現を検討した。HHV-6 ゲノム コピー数と環状 HHV-6 ゲノムコピー数は、real-time PCR 法で測定した。

また、ウイルスベクター作成に際して knock out する遺伝子の潜伏感染・再活性化への影響をより詳細に検討するために、潜伏感染状態におけるウイルス遺伝子の形状の変化に関する検討も行なった。HHV-6 を含むヘルペスウイルスの遺伝子 DNA は一般に、潜伏感染時には環状構造をしているが、増殖してウイルス粒子中にパッケージングされると直鎖構造をとることが知られている。そこで、ウイルスの末端部分と直鎖部分に対するプライマーと TaqMan プローブを作成し、Real-time PCR 法によって SCID-hu マウスモデルにおける HHV-6 DNA が環状構造か直鎖構造であるかの検討を行なった。

(倫理面への配慮)

なお、これらの研究に関する臍帯血細胞の採取は、東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認得て倫理指針に従って行った。遺伝子組換え実験は同・遺伝子組み換え委員会の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行なった。動物実験に関しては、同・動物実験委員会の承認を得て、実験機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従って行った。

C. 研究結果

1) HHV-6 ベクターによる T 細胞への干渉 RNA の導入と発現:

Luciferase 遺伝子に対する shRNA 発現ユニットを組み込んだ HHV-6 ベクターを初代培養 T 細胞および T 細胞株(MT-4, Molt-3)に感染したところ、ほぼ 100%の細胞で蛍光マーカー遺伝子 EGFP の発現が観察された。これは、ほぼ 100%の細胞に shRNA 発現ユニットが導入できたことを示す結果であった。

アデノウイルスベクターによって luciferase を発現させた T 細胞株(MT-4, Molt-3)における luciferase 蛋白発現の阻害作用を発光によって検討したところ、MT-4 細胞において最大 95%、Molt-3 細胞において最大 98%の発現抑制が観察された。今回用いた U2-U8 KO HHV-6 ベクターは、通常の T 細胞や MT-4 細胞においてはウイルス増殖が欠損しているが、Molt-3 細胞では high MOI の感染においてウイルス増殖がみられる。このため、今回の結果は、polymerase β U6 プロモーターによって発現誘導される shRNA が HHV-6 ベクターに組み込まれた状態で、HHV-6 の非増殖状態、増殖状態の何れでも良好な発現ができることを示す結果であった。このことは、今後 HHV-6 ベクターが様々な場面で使用可能であることを示唆するものであった。

2) HHV-6、HHV-7 の細胞指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析:

H6R28、H7R28 とともに、成人 T 細胞での増殖は見られなかった。また、H6R28、H7R28 とともに、PHA 刺激した臍帯血由来 T 細胞では増殖したが、H7R28 はウイルス感染後に IL-2 と抗 CD3 抗体で刺激し続けることにより、ウイルス増殖が著しく抑制された。これに対し、H6R28 ではむしろ促進される傾向にあった。H6R28 と H7R28 は、HHV-6 や HHV-7 野生株が良く増殖するマクロファージや T 細胞株(MT-4 細胞、SupT1 細胞)において、前初期遺伝子発現は見られるもののウイルス増殖は見られなかった。

IL-2 と抗 CD3 抗体による刺激で、臍帯血由来 T 細胞における H6R28 と H7R28 の増殖に差がある理由を検討するために、この細胞におけるサイトカイン類の mRNA の発現を Real-time PCR 法にて検討した。この結

果、IL-2 と抗 CD3 抗体による刺激によって INF- γ の産生が有為に上昇することが判明した。別の研究により、HHV-7 は HHV-6 よりも INF- γ に感受性が高いことが判っており、このために H7R28 の増殖が著しく抑制されるものと考えられた。

この結果は、U2-U8 遺伝子領域が INF- γ などの産生によるウイルス増殖の抑制効果を緩和する働きを持つ可能性が示唆された。また、U2-U8 領域を KO した HHV-6 や HHV-7 が、通常の T 細胞やマクロファージで増殖できなくなる現象は、U2-U8 KO ウイルスの遺伝子治療用ベクターとしての有用性を示すものと考えられた。

3) 単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子による HHV-6 ベクターの制御:

HSV-1 TK を恒常的に発現する MT-4 細胞に HHV-6 を感染させた場合、GCV の IC50 は 0.8 μ M、ACV の IC50 は 11 μ M であった。組換えウイルス HHV-6+TK の臍帯血 T 細胞における感染細胞数の増加も 1 μ M GCV または 10 μ M ACV の存在下で 50%以上阻止された。HHV-6 野生株の IC50 は、GCV で 12 μ M、ACV で 60 μ M であった。

この結果から、HHV-6 は HSV-1 TK の存在下では GCV がサイトメガロウイルス(IC50: 5 μ M)の約 5 分の 1 の濃度で、ACV が水痘帯状疱疹ウイルス(IC50: 15 μ M)と同等の濃度で、それぞれ有効であることが判った。このことは、HHV-6 ベクターの安全性をさらに向上させる上で重要な知見であると考えられる。

4) SCID-hu マウスモデルを用いた HHV-6 潜伏感染・再活性化の解析:

感染 SCID-hu マウスの骨髄および脾臓から HHV-6 DNA が検出できた。また、感染後長時間(6 週以上)経過したマウスの脾臓において、HHV-6 初期遺伝子、後期遺伝子 mRNA 発現を確認できたのに対し、骨髄ではこれらのウイルス増殖に関する mRNA は検出されなかった。これは、骨髄中より分化の進んだ myeloid 系細胞がある脾臓において、HHV-6 は再活性化過程にあると考えられた。このことから、このモデルに感染した HHV-6 は再活性化可能な完全な潜伏感染を成立させていることが示された。

HHV-6 は潜伏状態において感染細胞核内に環状のエピゾームとして存在し、また複製に際してローリングサークル型複製をおこなう。HHV-6 が潜伏感染状態にあることを確認するために、HHV-6 末端部分にプライマーを設定し、real-time PCR 法にて環状 HHV-6 ゲノム DNA コピー数を測定した。その結果、一部の感染モデルマウス骨髄と脾臓細胞中に環状の HHV-6 を検出できた。高コピー数の HHV-6 ゲノムが検出されるマウスでは、環状 HHV-6 ゲノムは検出されず、逆に環状 HHV-6 ゲノムが検出されるマウスでは HHV-6 ゲノムは検出されない傾向にあった。このことは、この感染モデルの HHV-6 がウイルス DNA の形状からみても完全な潜伏感染状態にあることを示すとともに、ウイルス DNA の形状の変化によってより鋭敏に潜伏感染から再活性化への変化を検出できる可能性が示唆された。

D. 考察

今回の研究により、HHV-6 ベクターが HHV-6 の主たる感染細胞である T 細胞に高率に干渉 RNA の発現ユニットを導入でき、充分量の shRNA を発現できることが判った。HHV-6、HHV-7 ベクターは、CD4 陽性 T 細胞、ナチュラル・キラー細胞、マクロファージなどの他種類の免疫担当細胞に非常に高率に感染および遺伝子導入することが可能な安全性の高いベクターであるため、干渉 RNA をこれらの細胞の導入することにより、様々な疾患の細胞治療に威力を発揮することが期待される。例としては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する干渉 RNA を T 細胞やマクロファージに導入することによる AIDS 治療や、T 細胞や NK 細胞の機能を修飾することによる癌治療などである。また、HHV-6、HHV-7 ベクターを作成する際に knock out (KO)する U2-U8 領域の機能を検討し、この領域の機能の一つとして INF- γ による抗ウイルス作用の抑制効果を見出すことができた。U2-U8 領域には、サイトメガロウイルスの US22 ファミリー遺伝子に属する遺伝子が少なくとも 4 個含まれる。US22 ファミリー遺伝子は、HHV-6 や サイトメガロウイルスなどの β -ヘルペスウ

ウイルス亜科に特徴的な遺伝子で、ウイルスの細胞指向性に関係すると考えられている。今回見出した、IFN- γ の抑制作用も、US22ファミリー遺伝子の細胞指向性の修飾に関連する性質であると考えられる。また、U2-U8 KO ウイルスは、HHV-6、HHV-7ともに通常の T 細胞やマクロファージで増殖できないことが確認され、遺伝子治療用ベクターとして望ましい性質をもつことが明らかになった。もともと、HHV-6 や HHV-7 は免疫抑制患者でウイルス血症を生じても重篤な疾患を起こさないことが知られているが、今回の発見により、さらに安全性が確認できたものと考えている。

さらに、万一の対策として、HHV-6 の抗ウイルス薬に対する感受性を上昇することに成功した。HHV-6 や HHV-7 は元来病原性の低いウイルスであるため、抗ウイルス薬の開発が遅れており、効果的な薬剤が存在しない。臨床現場では同じ β -ヘルペスウイルス亜科の属するサイトメガロウイルスに対する抗ウイルス薬であるガンシクロビルが用いられるが、高濃度の投与が必要である。今回、HHV-6 に単純ヘルペスウイルス 1 型のチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を導入することにより、ガンシクロビルの有効濃度を低下させるのみならず、さらに安全な薬剤であるアシクロビルにも感受性を持たせることができた。このことは、何らかの理由で HHV-6 ベクターが増殖能を回復した際の備えとして重要であると思われる。

HHV-6 感染の小動物モデルである、NOD-SCID-hu マウス感染モデルにおいて、HHV-6 が再活性化能のある環状 DNA として長期間存在できることが判明した。このことより、HHV-6 の潜伏感染に影響を与えるウイルス遺伝子を、KO ウイルスの作成と NOD-SCID-hu マウス感染モデルでの感染実験で明らかにできる目処が立った。HHV-6 ベクターの、潜伏感染するという性質は、長期的な機能遺伝子の導入という点では有利な性質であるが、寿命の短い細胞への遺伝子導入の場合は、安全性向上のために削除したい性質でもある。このため、今回 HHV-6 の潜伏感染成立に必要な遺伝子の検索の目処が立ったことは、今後のベクター開発にとって有益な手段を与えるものと考えられる。

E. 結論

今回、通常の方法では遺伝子導入が難しい T 細胞への干渉 RNA の導入と発現を、HHV-6 ベクターを用いて効率よく行なうことができた。このことは、HHV-6 ベクターが実践的な治療用ベクターとして使用可能であることを示すものと考えられる。また、ウイルス遺伝子の knock out や HSV TK 遺伝子の導入によって HHV-6 ベクターの安全性をさらに向上させることができた。今後、今回開発した HHV-6 感染の小動物モデルを用いて HHV-6 の病原性に関する遺伝子を同定し、knock out することができれば、さらに安全で実用的なベクター開発ができるものと考えている。

F. 健康危険情報:

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
 - 1) 清水昭宏、近藤一博：ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 ベクターを用いた short hairpin RNA(shRNA)の T 細胞への導入。第 54 回日本ウイルス学会(名古屋) 2006 年 11 月
 - 2) 清水昭宏、近藤一博：ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7)の細胞指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析。第 54 回日本ウイルス学会(名古屋) 2006 年 11 月
 - 3) 船水尚武、清水昭宏、近藤一博：単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子によるヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6)遺伝子治療ベクターの制御。第 54 回日本ウイルス学会(名古屋) 2006 年 11 月
 - 4) 鎌田 美乃里、近藤 一博：HHV-6 感染 SCID-hu マウスにおける HHV-6 感染様式の解析。第 54 回日本ウイルス学会(名古屋) 2006 年 11 月
 - 5) 嶋田和也、武本眞清、山西弘一、近藤一

- 博：ヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6) 初期遺伝子制御機構の解析 – 初期遺伝子プロモーター間の比較検討。第 54 回日本ウイルス学会(名古屋) 2006 年 11 月
- 6) 近藤一博、鎌田美乃里、小林伸行：ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 と HHV-7 の再活性化の誘導因子としての疲労。第 54 回日本ウイルス学会(名古屋) 2006 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請中

- 1) Recombinant virus vector originating in HHV-6 or HHV-7, method of producing the same, method of transforming host cell using the same, host cell transformed thereby and gene therapy method using the same.
Inventor: Kazuhiro Kondo (総員1名) US patent application 10/570,589, European patent application 04772443.0
- 2) 「ヘルペスウイルスTK遺伝子によるHHV-6、HHV-7ベクターの制御」
発明者：近藤一博 (総員1名)
特願2006-298208

5. 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 中島 典子(感染研感染病理部)

花木 賢一(東京大学疾患生命工学センター)

研究要旨 遺伝子治療用ベクターの安全性を評価するためには、遺伝子治療用ベクター投与後、搭載遺伝子が目的の細胞に正しく導入・発現されているのかを確認すると同時に、ベクターウイルスが病原性を発現していないかを確認しなくてはならない。*in situ* で搭載遺伝子あるいは転写物を検出するための高感度で特異性に優れた *in situ* hybridization AT tailing-CSA 法、遺伝子産物および細胞マーカーを検出するための免疫染色法 (Immuno-AT 法) などについて再検討し、ベクターの安全性を病理学的に解析する方法について比較した。

A. 研究目的

遺伝子治療に用いるベクターの安全性、副作用、有効性を病理学的に評価するシステムを確立することが目的である。病理学的手法として、1) 顕微鏡下での病理学的所見。2) *in situ* hybridization 法を用いたベクター核酸、導入遺伝子の検索。3) 免疫組織化学によるベクター抗原の検索ならびに導入遺伝子産物発現細胞の同定。4) microdissection-PCR 法によるベクター核酸、導入遺伝子の発現の検出などがある。今年度は3年間の総括としてこれらの方法の特徴をまとめ、昨年度報告した高感度の免疫組織化学 immuno-AT 法の抗体作製法についてはさらに詳細に再検討したので報告する。

B. 研究方法

1) *in situ* 核酸検出法

Oligo(dA-dT)標識合成オリゴプローブを用いた新しい *in situ* 核酸検出法である *in situ* hybridization AT-tailing-CSA 法を用いたベクター核酸、導入遺伝子の検索。

2) immuno-AT 法の検討

immuno-AT 法に関しては昨年度から引き続き改良を加えて開発中である。Oligo(dA-dT)標識抗体作成法についてさらに条

件を検討した。Oligo(dA-dT)標識抗体の調整は還元抗体(ウサギ)と 15 塩基の合成 oligo(dA-dT)をマレイミド化したもののカップリングにより行った(図1)。この Oligo(dA-dT)標識抗体(IgG-AT と Fab'-AT)の物性について PAGE 解析と動的散乱光(DLS)により評価した。また2倍希釈列の精製 HBs 抗原を 96 ウェルプレートに固相化し、1次抗体添加、2次抗体添加後 2.5 U/0.1ml Klenow fragment、exo-(KF-)、100 μm dATP と dTTP、1.25 μM DIG-dUTP からなる酵素反応液を加えて 37°C、2 時間静置、POD 標識抗 DIG 抗体反応後に TMB で発色させて A450 を測定した。2次抗体として IgG-AT と Fab'-AT のどちらがより高い検出感度を示すか検討した。

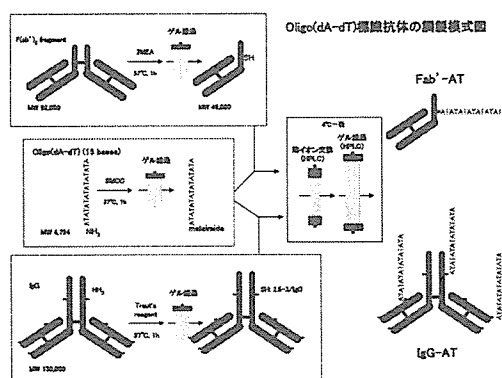


図1

C. 研究結果

1) *in situ* hybridization AT-tailing-CSA 法

この方法は従来の RNA probe を用いた *in situ* hybridization 法と比較して高感度で特異性が高い。また検出したい核酸の塩基配列がわかればプローブを合成できるので、必要時に迅速に対応できる。しかしながら 1 細胞 1 コピーを検出するまでの感度にはいまのところ至らない。現在までの検出例はすべてウイルス mRNA であり、DNA を検出した例はまだない。よってベクター核酸、導入遺伝子の検索においても検出限界がある。染色体内に目的遺伝子を挿入するレトロウイルスベクターを使用した場合など導入遺伝子の転写産物が多量に存在する場合は検出可能と考えられる。AAV ベクターの場合 episomal に存在し、かつコピー数が少ないので解析するのが困難であることが予想される。EGFP-AAV ベクター接種ザルの脾臓から分離したリンパ球の染色体標本からのベクター DNA の検出を FISH-AT-CSA 法で試みたが、検出できなかった (平成 16 年度報告)。染色体標本への適用は DNA 処理法など条件検討中である。

2) ベクター抗原ならびに導入遺伝子産物の検索ならびに発現細胞同定の方法

免疫組織化学の従来法として、LSAB 法、Envision 法などがある。目的の抗原を検出すると同時に細胞マーカー抗原を蛍光色素で二重染色すれば、どのような細胞に抗原が発現し、組織中でどのように分布しているか解析することが可能である。目的の細胞で導入遺伝子産物が発現しているかどうかを確認するためには必須の方法である。また、開発中の新しい免疫組織化学である immuno-AT 法であるが、2 種類の Oligo (dA-dT) 標識抗マウス IgG 抗体である IgG-AT と Fab'-AT において SH 基の数を比較した。SH/Fab' は SH 基が 1 個なので理論上 1.0 となるが、これに対して、SH/IgG は平均 2.5-3.0 であった。Oligo (dA-dT) 標識抗体の PAGE 解析では、いずれも Oligo (dA-dT) が H 鎖に標識されていることが確認された。DLS 解析では通常 IgG は 9.6nm であるのに対し、IgG-AT は直径が 11.2nm、Fab'-AT では 7.8nm であった (図 2)。ELISA

では従来法による抗原検出限界が 1.25ng/ml に対し、IgG-AT を使用した immuno-AT 法では 39pg/ml、Fab'-AT を使用した immuno-AT 法では 78pg/ml であった。よって従来法に比べて 16 倍以上高感度であった (図 3)。

動的光散乱 (Dynamic Light Scattering) 法による oligo(dA-dT) 標識抗体の粒径測定

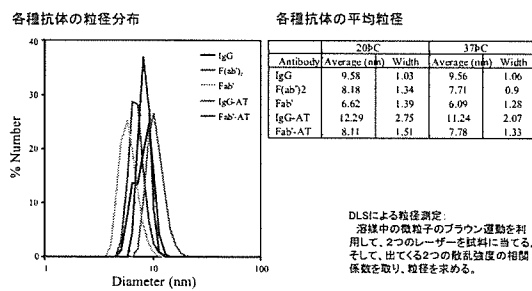


図2

ELISA (間接法) による検出感度比較

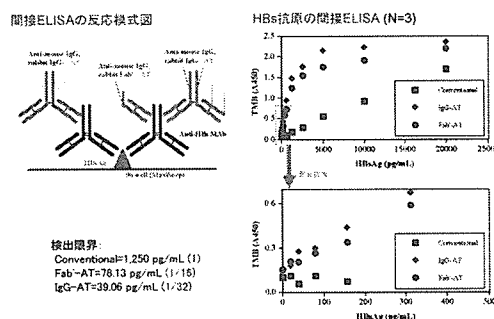


図3

D. 考察

ベクターや導入遺伝子産物が生体内でどのように分布し、蛋白(抗原)を発現しているかを病理学的に検索するためには、あらゆる条件の標本に適用できる高感度な *in situ* 核酸・抗原検出法の開発が必要である。また何をいつ検出するかによって選択する解析法も異なる (表 1)。

平成 16 年度の AAV ベクター接種ザルにおけるベクター遺伝子の病理学的検索はいずれも解析不可であった。組織片からの核酸抽出後の PCR では検出できているが、組織局在性については解析できなかった。microdissection-PCR 法を導入すれば局在がしぼれるが、限界がある。

遺伝子治療においては治療用遺伝子が目的以外の細胞に導入されたり、DNA の誤った場所に導入された場合、また治療用遺伝子が過剰に働く場合などの副作用、ベクターのウイルスが病原性や免疫反応を引き起こす場合を常に念頭において対処しなくてはならない。迅速かつ正確な対応のために病理学的検索が有用であるよう今後も新しい方法を開発していきたいと考えている。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。

In situ 核酸検出法 ISH-AT-CSA法が従来法ではRISH(RNA probeによるISH)が高感度

RNA 主にmRNAを検出する。転写物が多いときは検出可能。ベクター投与後からの経過時間によって異なる。
DNA DNAの場合、2本鎖を1本鎖にする処置の再検討が必要。
現在のところ1コピー/1細胞(ACH-2細胞中のintegrated HIV)は検出不可。

免疫組織化学 LSAB法、Envision法、Immuno-AT法、CSA(TSA)法(シグナル増幅法)

導入遺伝子産物がどこで発現しているかを確認できる。
今後、感度と特異性(signal/noise比)の改良が期待できる。

#両方法とも細胞マーカーとの二重蛍光染色像をconfocal microscopeで観察することにより発現細胞を同定できる。

レーザーマイクロディセクション(LMD)?PCR法

遺伝子導入による副作用として癌化等が引き起こされた場合、詳細な解析が必要となる癌化(異常)部位をLMDで回収し、PCR、塩基配列解析などが可能である。

表1

E. 結論

AAVベクターを接種したカニクイサルではベクター接種後6週間の段階で病理学的に問題となる所見は認められなかった。ウイルスベクターの安全性・有効性の評価に有用な病理学的検索方法を開発・改良中である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
 - 1) 花木寛一、中島典子、大岡静衣、野本明男、佐多徹太郎: Oligo (dA-dT)標識抗体の調整と診断法への応用。第54回日本ウイルス学会(名古屋)2006年11月

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

分担研究者 寺尾 恵治 (医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター長)

研究協力者 明里宏文、飯島沙幸、岩崎優紀(医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)
石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男(国立感染症研 ウイルス2部)

研究要旨 組換えDIsによる有効なHCVワクチン開発の可能性を探るため、HCVに最も近縁なGBV-Bの構造蛋白を発現する組換えDIsをベースとするリコンビナントワクチンを開発すると共に、タマリン/GBV-B感染・肝炎発症モデルをワクチン評価系として確立した。これらを基に、DNAプライム-リコンビナントDIs プーストによるワクチンプロトコルを設定した。現在、GBV-B攻撃接種による有効性評価を行うためタマリンへのワクチン接種実験が進行中である。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因ウイルスである。現在の HCV 感染者は我が国に約 200 万人、世界中には 1.7 億人 (HIV 感染者の 4 倍) にのぼり、毎年 3 万人もの国民が HCV 感染に起因する肝細胞癌で死亡している。現在最善の治療法である PEG-IFN/リバビリン併用療法の有効率は 50%程度であり HCV 感染者の半数はなお肝臓癌発症のリスクを避けられない現状を鑑み、C 型肝炎の治療法開発およびワクチン・創薬研究は厚生行政上急務である。この問題を克服するべく、本研究では HCV の感染・発症予防ワクチンを構築すると共に、これを動物レベルにおいて有効性及び安全性の評価を行うことを目的とした。

このようなワクチン開発において、前臨床試験としての動物モデルは不可欠である。しかしワクチン接種による獲得免疫が、果たして HCV の感染・発症予防効果を持ちうるのかについて、評価可能なモデル動物はチンパンジーのみである。動物倫理の問題等より、現在では国内におけるチンパンジーの実験動物としての使用は不可能な状況

にあることから、評価システムとして何らかの代替法の開発が求められる。

これまで我々は評価システムの構築を目指し、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 C 型肝炎様ウイルスである 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。

他方、我々は HCV の感染・発症予防ワクチン候補として弱毒ワクチニアウイルス DIs 株をウイルスベクターとしたリコンビナントワクチンを開発しつつある。DIs は既に多数の研究結果よりその安全性が確認されており、ウイルスベクターとして有望である。そこで、その有効性を前述の代替モデルにて評価する目的で、GBV-B 遺伝子を DIs に組み込んだ GBVB-DIs ワクチンを構築した。これをマウスに接種したところ、顕著な液性および細胞性免疫の誘導が確認された。

これらを踏まえ今年度は、GBVB-DIs ワクチンをタマリン/GBV-B 感染病態モデルにて評価する上で重要な、① HCV 感染を想定した GBV-B 接種方法の確立、② ワクチ

ンによる細胞性免疫応答評価系の確立、を行った。

結果としてこれらのワクチン評価系が確立出来たことから、本ワクチンをベースとしたプライム-ブースト法による接種プロトコルを設定し、霊長類における接種実験を開始した。

B. 研究方法

GBVB-DIs リコンビナントワクチン：ワクチニアウイルスのプロモーターmH5の下流に GBV-B 遺伝子の一部が挿入されたトランスファーベクターを作成し、homologous recombination の手法を用いて DIs に導入した。

プライム用 GBV-B 遺伝子発現ベクター：EF-1a promoter の下流に GBV-B core および E1/E2 遺伝子を挿入したコンストラクトを構築した。

サル類：GBV-B が効率よく感染するアカタマリン 12 頭を用いた。使用した個体は、予備的検査により血液学的・生化学的に正常であることを確認した。

ウイルス：GBV-B ゲノム RNA を接種したタマリンから得た infectious GBV-B を含む保存血漿 (#3 tamarin GBV-B plasma; 約 10^9 genome equivalent; GE)。

なおすべての動物実験は、倫理面を含めて医薬基盤研究所の動物実験委員会にて審査・承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) HCV 感染を想定した GBV-B 接種方法の確立

これまでタマリンへの GBV-B 感染は、肝臓への直接接種法(i.h.)によるものであった。この方法はウイルス感染における信頼性から一般に良く用いられているが、サル個体への侵襲性および接種ウイルスにおける定量性に欠ける面で問題があった。そこで、今回経静脈(i.v.)による接種法について比較検討を行なった。

まず予備的実験にて接種用ウイルスストックであるタマリン由来 GBV-B 感染性血

漿 100 μ l を i.v.にてタマリンに接種したところ、予想に反し感染が成立しなかった。しかし i.h.では同一の保存ウイルスサンプルであっても問題なく感染が成立していたことから、ウイルスそのものではなく血漿内に i.v.感染を阻害する要因があるものと考え、PBS で 100 倍希釈 (約 10^7 GE) として接種を行なった。その結果、再現性良く (3 頭中 3 頭) ウイルス感染が成立し、かつ肝炎マーカー上昇を伴う亜急性肝炎を呈することが確認された。血中ウイルス量は、i.h.接種の場合感染 2~3 週でピークとなり、これと平行して肝炎マーカー上昇が認められる。一方、i.v.接種の場合、血中ウイルス量のピークを過ぎた感染 5~7 週以降に肝炎マーカー上昇が認められた点で興味深い。

以上の結果より、再現性、侵襲性およびウイルス接種量の観点からワクチン評価系として優れた i.v.によるウイルス攻撃接種法が確立できた。

2) ワクチンによる細胞性免疫応答評価系の確立

ワクチン接種後の獲得免疫に関する評価として、抗体応答及び CTL 応答について定量的解析は不可欠である。これまでに我々は抗 GBV-B コア抗体および抗 GBV-B NS3 抗体用の ELISA システムを構築してきた。一方 CTL 応答を評価するための簡便な指標としては IFN γ 産生細胞を検出する ELISPOT 法が挙げられる。そこで、タマリン IFN γ を検出するため、種々のヒト IFN γ 用 ELISPOT システムについて検証した。その結果、U-CyTec 社製のものがタマリン IFN γ を検出可能であることが判明した。これにより、ワクチン接種後の獲得免疫が評価可能となった。

3) タマリン/GBV-B 感染モデルを用いたリコンビナント DIs の有効性評価実験

本実験では、SIV をモデルとしたエイズワクチン研究において有効性が確認されているプライム-ブースト法による接種プロトコルを設定した。すなわち、コントロールもしくは GBV-B core および E1/E2 遺伝子を挿入した発現プラスミド (1mg/body) を筋注にて 4 週間隔で 2 回、さらに 4 週間後リコンビナント DIs の接種 (10^6 pfu/body) にて皮下注にて 1 回接種するというものである。

現在プライム用のプラスミドを接種したところであり、今後抗体誘導および細胞性免疫誘導について評価を行なった後、上記 i.v.接種による GBV-B 攻撃接種実験を行なう予定である。

D. 考察

本研究では、ウイルスベクターを用いた HCV のワクチン開発を念頭に置いている。しかし HCV に感受性のある動物がヒトとチンパンジーしかないといった宿主域の問題から、代替モデル動物を用いた前臨床試験による有効性評価が必要となる。そこで我々は、リコンビナント DIs ワクチン開発と平行して、評価システムの構築を目指して 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 C 型肝炎様ウイルスである 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。さらに、ウイルス RNA や獲得免疫の定量的測定系を始めとして、ウイルス感染・肝炎発症の再現性が高くサルへの侵襲性の低い接種方法を確立することが出来た。

平行して開発を進めたリコンビナント DIs ワクチンについては、昨年度の研究ですでにマウスにおける免疫原性も確認されている。現在、DNA prime-組換え DIs boost 法に基づくワクチンプロトコルに従ってタマリンへの接種実験が進行中であり、本結果より組換え DIs をブーストワクチンとして用いた C 型肝炎予防・治療用ワクチンとしての有効性、臨床応用への可能性について評価していきたい。

E. 結論

組換え DIs による有効な HCV ワクチン開発の可能性を探るため、GBV-B 蛋白を発現する組換え DIs をベースとするワクチン開発、およびその評価システムとしてのサロゲート霊長類モデル開発に成功した。現在これらを用いた評価実験が進行中である。

F. 健康危機情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, Terao K: Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration. *J Neurosci Res* 84: 782-789, 2006.
- 2) Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y: In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 329: 459-467, 2006.
- 3) Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting. *Stem Cells* 24: 1450-1457, 2006.
- 4) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microb Infect.* (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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	巻号	ページ	出版年
Takizawa S, Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Yashgi T, Takeuchi T, Kanda T, Huibregtse JM, Akiyama T, Taketani Y	Human scribble, a novel timor 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
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 Inf Dis	59	285-293	2006
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
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
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
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
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

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koshizuka T, Kawaguchi Y, Goshima F, Mori I, Nishiyama Y	Association of two membrane proteins encoded by herpes simplex virus type2, UL11 and UL56.	Virus Genes	32	157-167	2006
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
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
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
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
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
Mori I, Nishiyama Y	Accessory genes define the relationship between the herpes simplex virus and its host.	Microb Infect	8	2556-2562	2006

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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	177-183	2006
Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, Terao K	Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration.	J Neurosci Res	84	782-789	2006
Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y	In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells.	Methods Mol Biol	329	459-467	2006
Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y	Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting.	Stem Cells	24	1450-1457	2006
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. [Epub Aug 22]	Virus Genes		in press	2006
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

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	88	652-659	2007
Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A	Reference strand-mediated conformation analysis based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci.	Electrophoresis	28	918-924	2007
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
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 circumvent P-glycoprotein-mediated cellular efflux to increase drug cytotoxicity. [Epub Jan 24]	Pharm Res		in press	2007
Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H	GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. [Epub Jan 27]	Microb Infect		in press	2007
Sato K, Takeuchi T, Kukimoto I, Mori S, Yasugi T, Takatani Y, Kanda T	Human Papillomavirus Type 16 P670 Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein.	Virus Genes		in press	
Mori I, Nishiyama Y	Replication-competent herpes simplex virus: a novel and promising modality for cancer therapy.	Curr Top Virol		in press	