

Fig. 1. *In utero* transplantation. Pregnant monkeys were anesthetized by intramuscular administration of ketamine hydrochloride (Ketalar). Cynomolgus ES cells genetically modified to express GFP (10^6 cells/fetus) were injected into the fetal abdominal cavity or liver through a 23-gauge needle using an ultrasound-guided technique around the end of the first trimester (**left**). The full term is 165 d. The weight of the fetus at the time of transplantation was estimated at 20 g, which is equivalent to that of an adult mouse (**right**).

frozen samples, embed samples ($5 \times 5 \times 3$ mm) in OCT compound containing 10% sucrose, freeze them in liquid nitrogen, and store them at -80°C .

3.3. In Situ Detection of Transplanted Cell Progeny

You may examine tissue sections for *in vivo* fate of transplanted cell progeny by *in situ* PCR, which amplifies marker (GFP) sequences (10,13). It is especially useful when it is difficult to identify cells by staining specific surface markers, when GFP fluorescence is hampered by the high autofluorescence of tissue samples, or when the transgene expression is shut down (“silenced”) *in vivo*.

3.3.1. Cell Wall Permeabilization

1. (Optional) If a tissue section is embedded in paraffin, then dewax it by dipping the slide in xylene three times, each for 10 min, and then in 100% ethanol three times, each for 10 min. Air-dry the slide.
2. Soak the slide in $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K/PBS and incubate it at 37°C for 10 min (*see Note 9*).

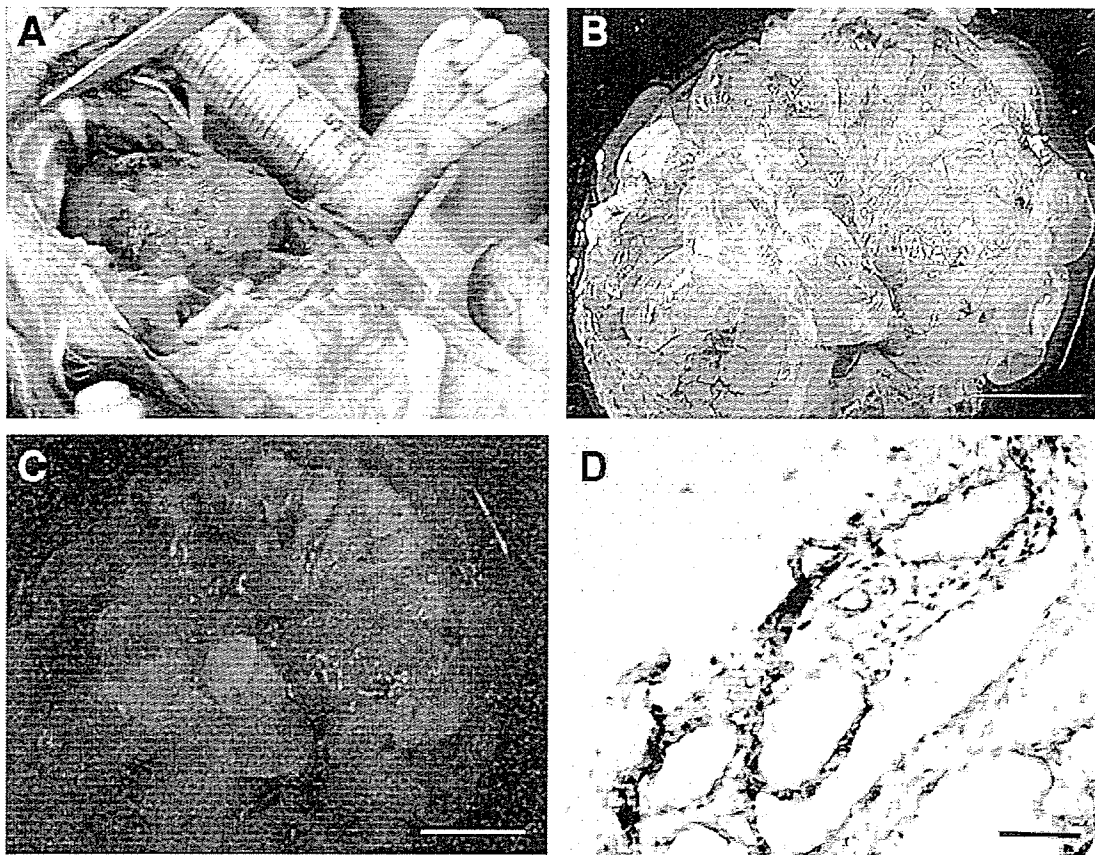


Fig. 2. Teratoma formation in a cynomolgus fetus after transplantation of allogeneic ES cells. (A) A tumor ($4 \times 3 \times 2.5$ cm) was detected in the thoracic cavity 3 mo after allogeneic transplantation of ES cells expressing GFP. The tumor was observed in (B) a bright field and (C) a dark field (C) under a fluorescence stereomicroscope. GFP was expressed in the tumor, clearly indicating that the tumor was derived from transplanted ES cells. (D) The GFP gene was also detected in the tumor cells by *in situ* PCR (stained black). Bar in B and C = 1 cm. Bar in D = 50 μ m.

3. Soak the slide in 0.1% Triton X-100/PBS for 5 min and wash it with PBS twice, each for 5 min.
4. Soak the slide in 95% ethanol for 10 min and then in 100% ethanol twice, each for 10 min, to remove proteins and air-dry it.

3.3.2. In Situ PCR

1. Attach a slide frame to the slide (from Subheading 3.3.1., step 4) and incubate it at 95°C for 5 min.
2. Apply a master mix of *in situ* PCR to the slide at room temperature (see Note 10 and Table 1).
3. Cover the slide with a film (see Note 11).
4. Place the slide upside down in a PTC100 Peltier thermal cycler and start a cycling program (i.e., 94°C for 1 min and 55°C for 2 min with 15 cycles; see Note 12).

3.3.3. Detection

1. Remove the slide frame gently after PCR (from Subheading 3.3.2., step 4) and soak the slide in two changes of PBS for 5 min each.
2. Dropwise add an horseradish peroxidase-labeled anti-Digoxigenin solution (diluted 1:100 with 2% BSA and 5% horse serum in PBS) onto the slide and incubate it at 37°C for 2 h.

Table 1
***In Situ* PCR Reaction Mixture**

Master mix	Volume per reaction	Final concentration
10X PCR buffer (Mg ²⁺ free)	2.5 μ L	1X
25 mM MgCl ₂	4.5 μ L	4.5 mM
dNTPs mixture (2.5 mM each)	3 μ L	420 μ M dATP
Digoxigenin (DIG) DNA labeling mix (Roche)	3 μ L	420 μ M dCTP 420 μ M dGTP 378 μ M dTTP 42 μ M DIG-dUTP
Forward primer (10 μ M)	2 μ L	0.8 μ M
Reverse primer (10 μ M)	2 μ L	0.8 μ M
Takara Taq polymerase (5 U/ μ L)	0.8 μ L	0.16 U/ μ L
Water	7.2 μ L	NA
Total volume of master mix	25 μ L	NA

NA, not applicable.

Primer set for the GFP sequence: 5'-CGT CCA GGA GCG CAC CAT CTT C-3' and 5'-GGT CTT TGC TCA GGG CGG ACT-3'.

3. Soak the slide in two changes of PBS for 5 min each.
4. Dropwise add a Vector SG solution onto the slide, stain it for 3–10 min, and gently wash it with water for 10 min.
5. Dropwise add a Kernechtrot solution and incubate the slide at room temperature for 1–2 min to stain nucleotides and gently wash it with water for 10 min.
6. Mount the slide with glycerol and observe it under a light microscope (*see Note 13 and Fig. 2D*).

4. Notes

1. Although we use NOD/SCID mice (lack of B and T lymphocytes but presence of natural killer cells), SCID mice are usually used in many other laboratories to form teratomas from ES cells. NOD/SCID mice are more highly immunodeficient than SCID mice; thus, NOD/SCID mice may be better in the setting of xenotransplantation.
2. Cynomolgus or rhesus monkeys are the most appropriate to work with because of ES cell availability and their size. In the monkey fetus, “the window of opportunity” for successful tolerance induction may be earlier and narrower than thought (*14*). To avoid immune responses, transplantation at earlier days (around 40–50 d) may be better.
3. It is not necessary to disperse ES cell clumps to single cells when transplanting ES cells into mice (or other animals). We transplanted about 1×10^6 ES cells (corresponding to two confluent 60-mm dishes) per site in mice. There is, however, considerable variation among reports: from 10–15 clumps (200 cells) per site (*2*) to 5×10^6 cells per site (*15*). ES cells are usually transplanted subcutaneously into the hind leg muscle, testis capsule, or abdominal cavity. In our experiments, a teratoma was formed in any site. It is recommended to choose injection sites you can observe easily from the outside and from which you can easily excise tumors.
4. For ultrasound-guided transplantation operations, endotracheal intubation is not necessary.
5. We prefer a small convex transducer rather than a big linear transducer because of the small size of the monkey fetus. Although a needle adapter is available, we prefer the freehand technique.

6. You may puncture transplacentally when the placenta is located anteriorly. Bleeding from the placenta usually stops spontaneously. However, we recommend every effort to avoid this approach by manipulation.
7. The survival rate with this *in utero* transplantation technique is currently 100%, excluding those fetuses that died from massive teratoma formation.
8. Uterine atony requiring oxytocin administration is quite rare in primates.
9. The treatment with proteinase K may need longer time depending on samples.
10. The amount of master mix per slide is 25 μ L for Takara cat. no. 9066 and 65 μ L for cat. no. 9067.
11. Slides are attached to the Takara slide seal kit. Be careful not to trap air under films.
12. The PCR conditions should be optimized for each *in situ* PCR.
13. The results should be observed within the same day. On the following day, the tissue would peel off, making examination difficult.

Acknowledgments

We thank Dr. Naohide Ageyama for help in monkey operations. We conducted all monkey operations in the Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation (Ibaraki, Japan).

References

1. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147.
2. Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**, 399–404.
3. Asano, T., Hanazono, Y., Ueda, Y., et al. (2002) Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. *Mol. Ther.* **6**, 162–168.
4. Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**, 868–872.
5. Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., and Verma, I. M. (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2140–2145.
6. Takada, T., Suzuki, Y., Kondo, Y., et al. (2002) Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein. *Cell Transplant.* **11**, 631–635.
7. Harrison, M. R., Slotnick, R. N., Crombleholme, T. M., Golbus, M. S., Tarantal, A. F., and Zanjani, E. D. (1989) *In-utero* transplantation of fetal liver haemopoietic stem cells in monkeys. *Lancet* **2**, 1425–1427.
8. Tarantal, A. F., Goldstein, O., Barley, F., and Cowan, M. J. (2000) Transplantation of human peripheral blood stem cells into fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Transplantation* **69**, 1818–1823.
9. Suemori, H., Tada, T., Torii, R., et al. (2001) Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev. Dyn.* **222**, 273–279.
10. Asano, T., Ageyama, N., Takeuchi, K., et al. (2003) Engraftment and tumor formation after allogeneic *in utero* transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation* **76**, 1061–1067.

11. Honjo, S. (1985) The Japanese Tsukuba Primate Center for Medical Science (TPC): an outline. *J. Med. Primatol.* **14**, 75–89.
12. Honjo, S., Cho, F., and Terao, K. (1984) Establishing the cynomolgus monkey as a laboratory animal. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **28**, 51–80.
13. Haase, A. T., Retzel, E. F., and Staskus, K. A. (1990) Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4971–4975.
14. Lindton, B., Markling, L., Ringden, O., Kjaeldgaard, A., Gustafson, O., and Westgren, M. (2000) Mixed lymphocyte culture of human fetal liver cells. *Fetal Diagn. Ther.* **15**, 71–78.
15. Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., et al. (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 971–974.

蛋白質核酸酵素

PNE
*PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME*

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

センダイウイルス工学の展開

永井美之・加藤 篤・井上 誠

センダイウイルスは50年あまり前にわが国で発見された。動物実験施設を汚染しマウスを全滅させるためしばしば問題となるが、医学的にさしたるインパクトはないため、ウイルス学の表舞台からは早晩退く運命にあると思われていた。しかしながら、センダイウイルスを利用した研究から生物学やウイルス学の基本的コンセプトが生まれ、このウイルスは今日でも表舞台に立ち続けている。近年では、センダイウイルスの遺伝子操作系(逆遺伝学)の確立をもとにウイルス学の積年の疑問の数々が解かれており、さらに、産官学の好連携により“細胞質 RNA ベクター”という世界に誇りうる国産技術の事業化も進んでいる。ここでは、基礎研究と応用研究の両面でのセンダイウイルスの遺伝子操作をセンダイウイルス工学と総称し、その誕生から事業化までを描く。

Key words センダイウイルス 逆遺伝学 アクセサリー遺伝子 遺伝子治療ベクター
ワクチンベクター 事業化

はじめに

センダイウイルスは、ネズミパラインフルエンザウイルス1型、あるいは、Hemagglutinating virus of Japan (HVJ)ともよばれる。1本のマイナス鎖RNAをゲノムにもつ直径200 nm前後の円形のエンベロープウイルスで、いわゆるモノネガウイルススーパーファミリーの一員である。モノネガウイルスには、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルスなど医学・獣医学上重要な古典的ウイルスから、ニパウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルスといった凶暴な新興ウイルスまでが含まれている。

これまでセンダイウイルスを用いて、ウイルスの細胞融合能の発見、エンベロープ糖蛋白質のプロセッシングによる膜融合能・感染能の活性化とそのウイルス病原性への意義の発見、モノネガウイルスゲノムの共通像の提示、そして、ここで紹介するウイルス工学の展開など、ウイルス生物学への重要な貢献がなされてきた。しかも、その多くは日本人の手によるものである。

I. センダイウイルスの構造と機能

センダイウイルスゲノムRNAは15,384塩基からなり、N(nucleocapsid;ヌクレオカプシド)蛋白質にびっしりと包装されたRNP(ribonucleoprotein, RNAとN蛋白質の複合体)がウイルス内部構造を形成する(図1)。RNPは長さ1.1 μ m、幅18 nm、ピッチ5 nm、1回転あたり13個のN蛋白質が付着した左巻きらせん状の構造物である。6塩基のRNAごとに1個のN蛋白質が付着するので、1本のRNPには2,564個(=15,384/6)のN蛋白質が存在している。RNPの先頭およびそのところどころには、ゲノムの転写と複製にあずかるRNAポリメラーゼであるL(large)蛋白質およびP(phospho)蛋白質が結合している(図1)。

最外側には2種の糖蛋白質がスパイク状に突き出していて、その根元は細胞膜成分と同じ脂質二重層に埋まっている(図1)。このようなウイルス特有の膜構造をエンベロープという。スパイク糖蛋白質のひとつはHN蛋白質

Yoshiyuki Nagai¹, Atsushi Kato², Makoto Inoue³, ¹理化学研究所 感染症研究ネットワーク支援センター/富山県衛生研究所,
²国立感染症研究所 ウイルス第三部, ³ディナベック(株) E-mail: yoshi-nagai@riken.jp
Establishment and progress of Sendai virus engineering

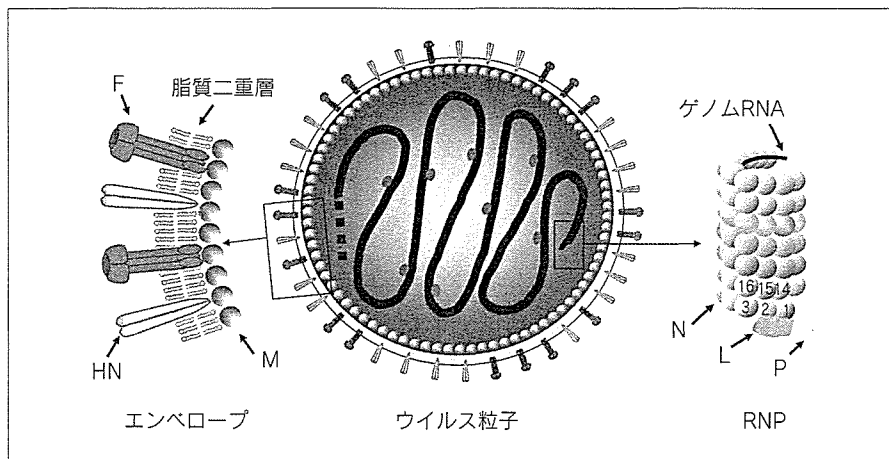


図1 センダイウイルスの構造

質とよばれ、赤血球凝集素(hemagglutinin; HA)活性とノイラミニダーゼ(neuraminidase; NA)活性をもち、宿主細胞表面の受容体である糖鎖末端のシアル酸を認識する。もうひとつはF蛋白質で、エンベロープと細胞膜を融合(fusion)させRNPを細胞内に導入する。F蛋白質は非活性型前駆体F₀として合成されたのち、宿主プロテアーゼによりF₁とF₂に分割され、融合能をもつ活性型へ変換される。

エンベロープとRNPとのあいだにはM(matrix; マトリックス)蛋白質が存在する(図1)。M蛋白質はスパイク糖蛋白質の根元に結合し、脂質二重層中に浮かんでいる状態の糖蛋白質を固定する錨の役目をすると同時に、RNPとも結合して内部構造と外部構造を架橋する。細胞膜上でのウイルス構成蛋白質のウイルス粒子への集合と粒子の出芽に必須である。

以上の6種の構成蛋白質をコードする遺伝子は3'-N-P-M-F-HN-L-5'の順に配置されている(図2)。P遺伝子からは、さらにV蛋白質とC蛋白質とよばれる2つのアクセサリ-蛋白質が生成され、その機能は目下の研究の焦点である(後述)。

II. センダイウイルス逆遺伝学の成立

1. ポストゲノムは逆遺伝学

1980年代の東京大学医科学研究所における、洪田博(故人)と塩田達雄(現大阪大学微生物病研究所)らによるセンダイウイルスの全ゲノム塩基配列の決定は、モノネガウイルスの感染と病原性をゲノムワイドに考察する契機となった¹⁾。ウイルスのある表現型を支配する遺伝

子型を決定する順(正方向)遺伝学(forward genetics)が定着し、また、個々のウイルス遺伝子をクローニングし発現させる研究も進展して、その機能を細胞レベルで評価できるようになったのである。

しかし、個々の遺伝子の情報を単純に加算しても、それらが有機的にからみあった集合体としての命あるウイルスとはなりえない。順遺伝学でみつかった遺伝子型をウイルスの表現型として再現(裏をとる)することもできない。ゲノムに任意の改変をほどこし、その結果を、ウイルスの細胞レベルの増殖のみならず、個体レベルでの病原性という文脈のなかで評価できる逆遺伝学(reverse genetics, リバースジェネティクス)の成立がポストゲノムとして待望されたゆえんである。そして、その技術基盤となるcDNAからのウイルス回収(再構成)の熾烈な先陣争いが始まった。

2. さきを争い、できればを競う

まず、モノネガウイルスcDNAからのウイルス再構成系の構築原理の理解のため、ウイルス自然生活環でのゲノムの転写と複製を概説する。

細胞質に入ったマイナス鎖RNAゲノムは裸にはならず、RNPの状態のまま各mRNAに転写される。マイナス鎖RNPの先頭に結合していたRNAポリメラーゼ、L蛋白質とP蛋白質が3'側50塩基ほどのリーダー配列を読んだのち、各遺伝子の先頭と末尾にある転写開始配列および転写終結/ポリA付加配列(図2)を認識して、ゲノムの5'末端にむかって順々にmRNAを生成する(一次転写)。その際、転写終結/ポリA付加配列とつぎの遺伝子の転写開始配列とのあいだにある3塩基の介在配列(図2)は転写されない。N蛋白質、P蛋白質、L蛋白

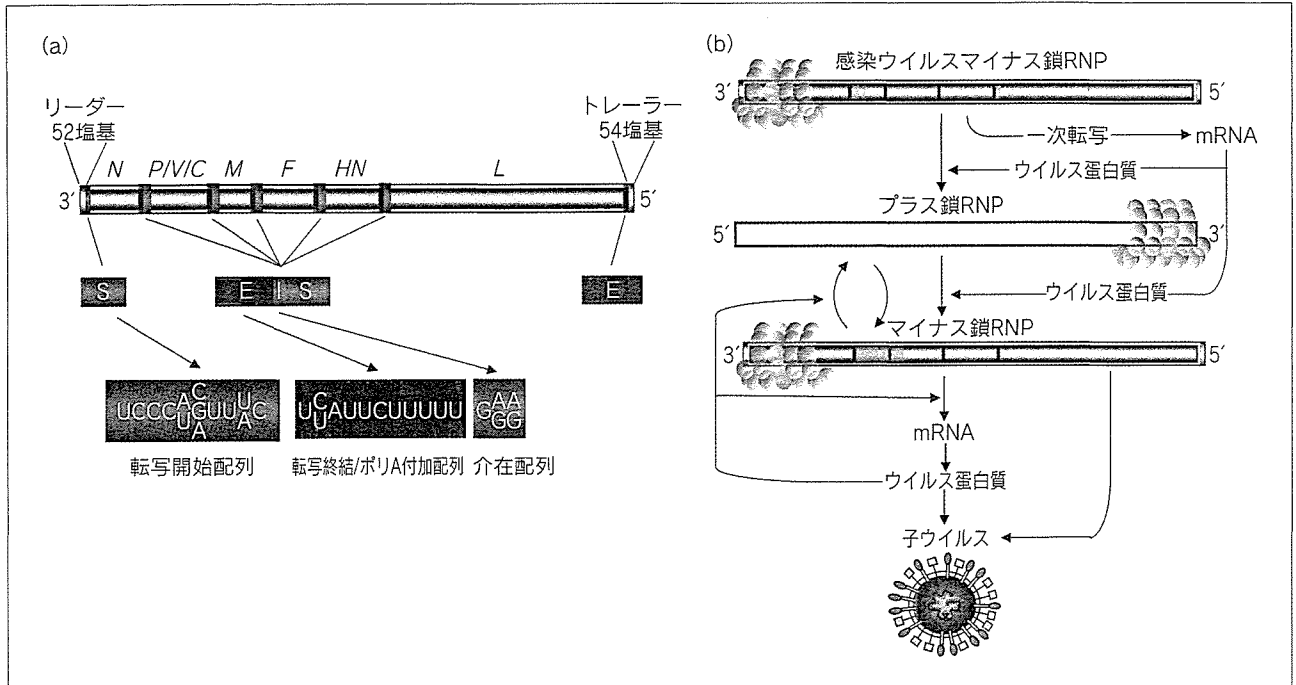


図2 センダイウイルスの転写と複製

(a) 転写. 各遺伝子の両端には、転写開始配列(S)と転写終結/ポリA付加配列(E)がある。遺伝子と遺伝子は3塩基からなる介在配列(I)でつながっている。

(b) 複製. 複製開始には、一次転写産物から生成されるウイルス蛋白質が必要である。マイナス鎖もプラス鎖も、裸のRNAではなくRNP状態で鋳型活性をもつ。

質の3つの細胞内での合成・蓄積が始まると、マイナス鎖RNPから全長のアンチゲノム(プラス鎖RNA)への複製が始まる。プラス鎖RNAゲノムはつくられつつもやかに新生N蛋白質に包装され、転写終結/ポリA付加配列、介在配列、転写開始配列を無視して伸張して、全長のプラス鎖RNPの完成に至る(図2)。このプラス鎖RNPが鋳型となって、やはりN蛋白質、P蛋白質、L蛋白質の供給下に、マイナス鎖RNPが複製される。マイナス鎖RNPの一部は子ウイルス粒子に入り、別の一部は振り出しに戻ってmRNAとプラス鎖RNPの鋳型となり、ウイルスゲノムとウイルス蛋白質の拡大再生産に貢献する(図2)。ゲノム両末端にあるリーダー配列とトレーラー配列が複製のシス配列である。とくに、マイナス鎖RNAゲノムとプラス鎖RNAゲノムの3'末端13塩基のうち12塩基は完全に一致し、この部分が複製開始(RNAポリメラーゼの結合)に重要であるとされている。

以上から、ゲノムRNAとN蛋白質、P蛋白質、L蛋白質の3つの蛋白質を細胞内でそれぞれの発現プラスミドから生成し、機能的なマイナス鎖RNPをうまく再構

成することがウイルス回収の前提となる。プラス鎖RNAゲノムを発現させ、プラス鎖RNPを再構成することで複製を1段階スキップするのもよい考えである。

ほとんどの研究グループが、組換えワクシニアウイルスにより発現されるT7ファージRNAポリメラーゼですべてのプラスミドを駆動し、生成した全長ゲノムRNAの一方の端はデルタ肝炎ウイルス由来リボザイムで自己切断的に切り出す、という戦略をとった(図3a)。約10年の試行錯誤の末、1994年にドイツのConzelmannらは、狂犬病ウイルスcDNAプラスミド(約12kb)からウイルスの生成に成功²⁾、そののち、筆者ら元東京大学医学研究所のグループを含め、世界の6研究室ではほぼ時を同じくしてほかのモノネガウイルス(麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルスなど)の生成に成功した^{3,4)}。

Conzelmannらを含むほかのグループでは、 10^7 個のトランスフェクション細胞からわずかに1個の感染性ウイルスが得られる程度であったが、筆者らのセンダイウイルスの系では、その100倍~1,000倍の 10^4 ~ 10^5 細胞から1個のウイルスという高効率でウイルスを生成できた。そして、プラス鎖であれマイナス鎖であれ、試験管

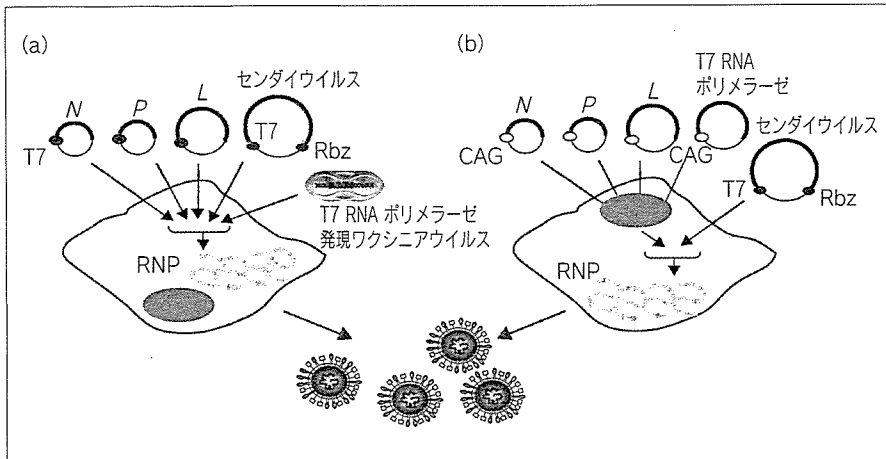


図3 cDNAからのセンダイウイルスの再構成

(a) T7 RNA ポリメラーゼ発現組換えワクシニアウイルスを用いる方法。

(b) ワクシニアウイルスを用いない方法。

T7: T7 プロモーター, Rbz: デルタ肝炎ウイルス由来リボザイム, CAG: CAG プロモーター

内で cDNA から合成した全長 15.3 kb もの裸の RNA をトランスフェクションしても、N 蛋白質、P 蛋白質、L 蛋白質が至適量だけ供給されればウイルスが回収できたのである³⁾。これも系の効率のよさを示すものであるが、それ以上にこのことは、新生 RNA 鎖の伸張とその新生 N 蛋白質による包装が共役する精妙な RNA 複製をイメージしてきたこの分野の研究者には驚きであった。

この効率のよさは、N 蛋白質、P 蛋白質、L 蛋白質の発現プラスミドの量比を至適化し、ワクシニアウイルス複製による細胞毒性を、薬剤により T7 RNA ポリメラーゼの発現を大きく損なうことなく減弱したこと、T7 プロモーター依存性転写産物の 5' 側にはプロモーター配列由来のグアニンがいくつか付加されるのが普通だが、転写効率に若干の犠牲をはらってでもそのようなグアニンの付加を避け、正確なウイルス配列から転写が始まるようプロモーターを改変したことによる³⁾。第三者からも、注意深いチューニングの結果、比類ない高効率のウイルス回収系が生まれたと賞讃された (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 誌 1996 年 93 巻 21 号)。一番乗りは逃したが、できれば一番だった。

そのうち、紫外線照射により二本鎖 DNA に特異的に安定結合するソラレン化合物の存在下、組換えワクシニアウイルスを紫外線照射することによって、T7 RNA ポリメラーゼ発現は保ちつつ、ワクシニアウイルス複製による細胞傷害性をさらに減弱した。その結果、センダイウイルスの回収効率はさらに 10~100 倍 ($10^2 \sim 10^3$ 細胞から 1 個) も上昇し、センダイウイルス工学は当初と比べ嘘のように簡単になった⁵⁾。

組換えワクシニアウイルスは基礎研究に限って使用するという条件で米国 NIH から分与されており、センダ

イウイルス工学の臨床応用(後述)に際しては問題が生ずる。そこで、T7 RNA ポリメラーゼを含め、センダイウイルスゲノム以外のプラスミドを CAG プロモーター下で細胞 RNA ポリメラーゼ II により駆動することによって、ワクシニアウイルスなしで効率を落とすことなくウイルスを回収する方法を確立した(図 3b)。

III. 逆遺伝学によるウイルス学の革新

1. アクセサリー遺伝子を初めて組上に

センダイウイルスは 6 つの基幹遺伝子産物(N 蛋白質、P 蛋白質、M 蛋白質、F 蛋白質、HN 蛋白質、L 蛋白質)のほか、V 蛋白質および C 蛋白質とよばれる蛋白質をコードする。V 蛋白質と C 蛋白質は、モノネガウイルスのうちセンダイウイルスと近縁のパラミクソウイルス科の多くがコードしているが、基幹遺伝子のようにすべてにゆきわたっているわけではない。これらをもたないウイルスもあり増殖が可能である。したがって、これらは非必須なアクセサリー蛋白質とみなされてきた。しかし、本当に“非必須”であるとするには、V 遺伝子や C 遺伝子をノックアウトしてもウイルスとして生きていられるという証明がある。加えて、そのようなノックアウトウイルスが回収できれば、その細胞レベルの増殖や個体レベルの病原性を親株と比較することにより、V 蛋白質や C 蛋白質の機能に肉薄できる。ここでまさに逆遺伝学の出番となった。

V 蛋白質も C 蛋白質も P 遺伝子の産物である。P 遺伝子の翻訳開始点を違え P 蛋白質とは異なる ORF (open reading frame) を利用してできるのが 4 種類の C

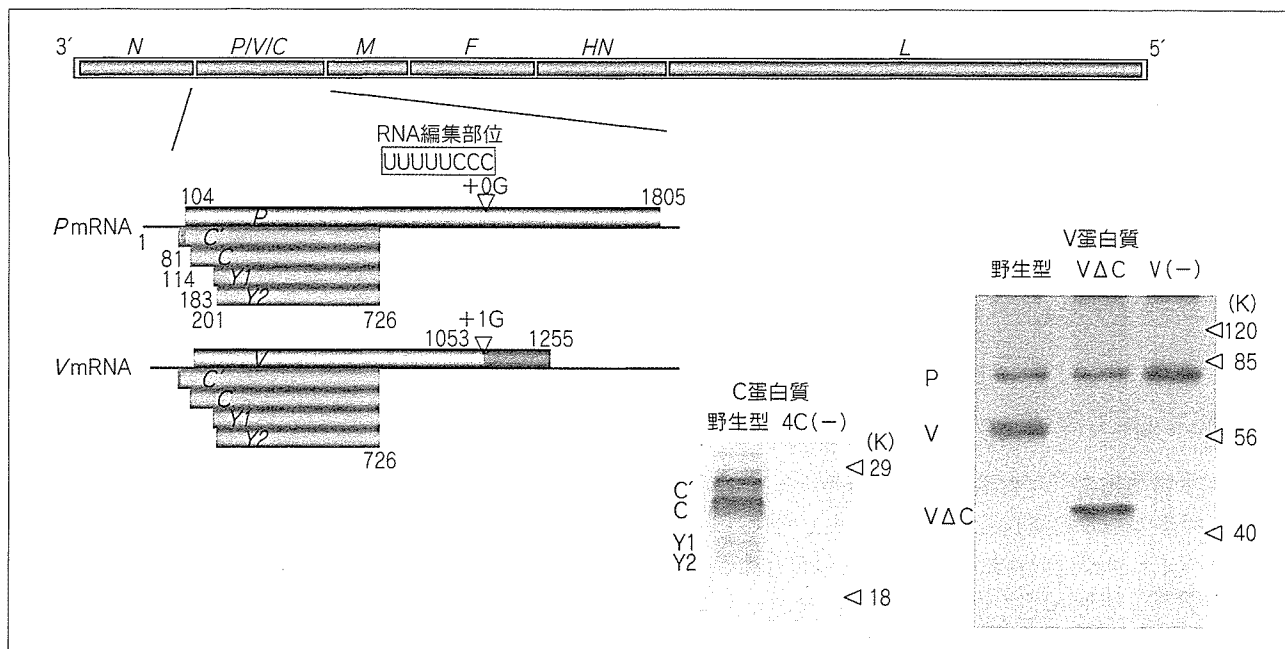


図4 センダイウイルス *P* 遺伝子からの C 蛋白質および V 蛋白質の発現とノックアウトウイルスの回収
 回収ウイルス感染細胞のウェスタンブロットングにより、4C(-)：4種のC蛋白質を欠失した4C(-)センダイウイルス、V(-)：V蛋白質を完全欠失したV(-)センダイウイルス、および、VΔC：V蛋白質特異的な領域のみを欠失したVΔCセンダイウイルス、を示す。

蛋白質，すなわち C'蛋白質，C蛋白質，Y1蛋白質，Y2蛋白質で(図4)，200アミノ酸残基前後の塩基性蛋白質であるという共通性はあるものの，パラミクソウイルス間での一次構造上の相同性は低い。

一方，翻訳開始点はP蛋白質と共通であるが，転写途中でRNA編集により鋳型に依存しないグアニンが1つ付加されたmRNAの生成によって，P蛋白質のORFが途中でシフトするのがV蛋白質である(図4)。P蛋白質と共通のN末端側約3/4はウイルス間での相同性がきわめて低いが，V蛋白質特異的なC末端側1/4には非常によく保存された15個のアミノ酸残基があり，なかでも7個のシステイン残基は完全に保存されジンクフィンガー様モチーフを形成し，事実，2個のZn²⁺が結合する。RNA編集されないP蛋白質のmRNAとRNA編集されるV蛋白質のmRNAは，およそ3：1の割合で生成される。

2. 病原性発現を専業とするV蛋白質

センダイウイルスcDNAプラスミドへ，P蛋白質のアミノ酸配列の変化を伴わないよう変異を導入し，2種類のV遺伝子ノックアウトウイルスの作出を試みた。P遺伝子内の8塩基のRNA編集シグナル(UUUUUUCCC)

(図4)の一部置換(UUCUUUCCC)による，RNA編集を起ささないV(-)センダイウイルスと，RNA編集シグナル直後から3番目のアルギニンコドン(AGA)を終止コドン(UGA)に変え，C末端側のV蛋白質特異的なORFを欠損するようにしたVΔCセンダイウイルスの作出である。

V(-)センダイウイルスとVΔCセンダイウイルスはともに容易に回収でき(図4)，培養細胞で親株と遜色なく増殖できたので，V蛋白質は“非必須蛋白質”であることが確定した^{6,7)}。センダイウイルスの利点のひとつは，マウスにおいてウイルス病原性と宿主応答が研究できるというすぐれたモデル性にある。V(-)センダイウイルスもVΔCセンダイウイルスも，マウス感染後1日目までは親株と同様に活発に肺内で増殖した。しかし，親株ではそののちに高いウイルス価が続き，10日前後で全数が肺炎で死亡したのに対し，V(-)センダイウイルス，VΔCセンダイウイルスはともにすみやかに肺から除去され，マウスは全数が生残した。結局，V蛋白質は病原性発現を専業とするアクセサリ蛋白質で，その機能はおもにV蛋白質特異的な領域が担うのである^{6,7)}。

V蛋白質特異的な領域のジンクフィンガー様モチーフをつくる7個のシステイン残基それぞれをアミノ酸置換

したウイルスも回収でき、その結果、Zn²⁺結合能と病原性(感染初期の宿主防御能の回避能力)とは見事に並行していた⁸⁾。問題は、V蛋白質が抵抗している宿主の初期防御機構の本態である。さまざまなノックアウトマウス・変異マウスを使って調べたところ、インターフェロンやナチュラルキラー細胞など既知のものではないことがわかってきた。V(-)センダイウイルスやVΔCセンダイウイルスを使って新たな防御機構が見つかるかもしれない。

3. C蛋白質の超多機能性

C遺伝子の開始コドンの破壊などにより、たいへん難航はしたが4つのC蛋白質すべてを欠失した4C(-)センダイウイルスが回収され(図4)、C蛋白質も非必須蛋白質であることが確定した⁹⁾。回収の困難さは、4C(-)センダイウイルスの感染価が親株の1/100~1/1000と著しく低下することにより、その成功は再構成系の効率のよさにあった。

4C(-)センダイウイルスの表現型は、C蛋白質が、①細胞内ウイルスmRNAとゲノムRNAの生産をほどよく抑えてウイルス生活環を円滑に進める、というこれまでの考えを支持し^{9,10)}、②ウイルス粒子には入らない非構造蛋白質であるにもかかわらず、構造蛋白質群のウイルス粒子への組織化と粒子の出芽に必須である、という新知見を導いた¹⁰⁾。

ウイルスの出芽は、ウイルス蛋白質が細胞膜に集合し、その膜部分が突出、その根元の膜がくびれる(pinch-off)という段階をふむ。レトロウイルスの研究から、膜のpinch-offに、宿主蛋白質複合体ESCRT(endosome-associated complexes required for transport)がはたらいっていることが明らかにされている。センダイウイルスでは、C蛋白質がESCRTを形成する蛋白質群のひとつAIP1/Alixと相互作用し、ESCRTをウイルス出芽の部位によび寄せる役割をしていることが示唆された¹¹⁾。

さらに、4C(-)センダイウイルスは親株に比べインターフェロン感受性が著しく亢進しているという事実を発端に¹²⁾、C蛋白質は、③I型インターフェロンのJAK/STATシグナル伝達経路を遮断することで宿主のウイルス排除に抵抗し、その機能はC蛋白質のC端側半分に担われている、ことが明らかになった^{13,14)}。現在、この遮断機構の詳細が調べられている^{15,16)}。

以上のC蛋白質の3つの機能は、みかけ上も異なる

が、それぞれ変異導入により区別可能な独立した機能であった。したがってC蛋白質は、約200アミノ酸残基と小さいが実に多芸であるといえる。

こうしてセンダイウイルス逆遺伝学は、いままでまったく手の出なかったアクセサリ遺伝子にせまり、それらを単なる“アクセサリ”(脇役)から“主役”の座へと押し上げた。とくにその個体レベルでの活躍はめざましく、センダイウイルスが宿主との攻防の過程で自らの存続のために獲得してきたものとみなされる。ほかのパラミクソウイルスにあっても同様な見方ができ、アクセサリ遺伝子の獲得とその産物の研究は逆遺伝学成立を契機に一気に活発化した¹⁷⁾。ウイルス学の文字どおり革新である。

4. “裏”をとれた仮説、とれなかった仮説

生物学、生化学、順遺伝学から導かれた古典的定説の“裏をとる”ことも始まった。

ゲノム3'末端に結合したRNAポリメラーゼは、5'末端にむかって、各遺伝子の先頭と末尾にあるよく保存された転写開始配列と転写終結/ポリA付加配列(図2)をスキャンしながら(転写の開始、終結、そして再開をくり返ししながら)、順々にmRNAを産生する。そのとき、再開にあたってはRNAポリメラーゼが鋳型から一定の割合で脱落するため、転写は5'末端にむかって直線的に減衰すると信じられてきた。しかし実際には、転写開始配列の微妙な違いによる下流遺伝子の転写効率の激減という劇的な二相性制御が主体であるとされ、直線的減衰説は後退しつつある¹⁸⁾。

P蛋白質のリン酸化はRNA合成制御の鍵をにぎる。M蛋白質のリン酸化・脱リン酸化はウイルス蛋白質群の粒子への組織化と粒子の出芽を制御する。これらも教科書的に信じられてきた。しかし、リン酸受容残基の改変によりリン酸化を受けないウイルスが難なく回収でき、そのマウスへの病原性も親株に匹敵していて、これらのリン酸化はウイルス増殖には関係しない単なる副反応とみなされるようになった^{19,20)}。

筆者のひとり(永井)は、センダイウイルスではないがニューカッスル病ウイルスについて、ウイルス毒性(全臓器侵襲型の強毒株と、一部限定臓器しか標的にしない弱毒株)の違いは、F蛋白質の非活性型前駆体から活性型への宿主プロテアーゼによる切断が、あらゆるタイプの細胞内で起こるか、ごく一部の組織でしか起こらない

かで決まり²¹⁾、この切断活性化の差は、強毒株 F 蛋白質の切断部位には塩基性アミノ酸残基がクラスターをなしているのに対して、弱毒株では 1 個の塩基性アミノ酸残基(アルギニン残基)しか存在しないことよるとした²²⁾。これは、いま問題の高病原性トリインフルエンザウイルス vs 低病原性トリインフルエンザウイルスにも適用される重要原理である²²⁾。1999 年に成立したニューカッスル病ウイルスの逆遺伝学はさっそくこの説の検証を試み、切断部位の改変のみで弱毒株→強毒株の転換が可能であるとした²³⁾。“裏がとられた”典型例である。こうして、教科書の改訂と強化が進んでいる^{4,17)}。

IV. 産官学連携によるセンダイウイルスのベクター化

1. 発端 — Send in sendai vector

ディナベック研究所は、1995 年に厚生省(当時)管轄の医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構(当時)および日本の主要製薬会社 7 社が出資し、遺伝子治療製剤の開発に特化した官民共同プロジェクトとして発足した。センダイウイルス逆遺伝学は東京大学医科学研究所において純粋に学術的要求から生まれたが、ディナベック研究所はこの系が新しい概念の遺伝子導入ベクターとして発展する可能性を予測し、産官学の連携のもとに基本特許を出願した。

実際、センダイウイルスゲノムに挿入(図 5)したルシフェラーゼ遺伝子、HIV-1(ヒト免疫不全ウイルス 1 型)の gp120 遺伝子などの外来遺伝子は驚くべき高レベルで発現され、かつ、その RNA ポリメラーゼには校正・修復機構がないにもかかわらず搭載遺伝子の安定性を確保できた^{24,25)}。さらに、コーカサス系人種に多く発症する致死性の高い嚢胞性繊維症(cystic fibrosis)の遺伝子治療をめざしていた英国 Imperial College School of Medicine の米満吉和(現九州大学大学院医学研究院)、Eric Alton らとの共同研究で、従来のアデノウイルスベクターや陽性荷電リポソームではきわめて困難であった呼吸器系上皮細胞への効率的な遺伝子導入をセンダイウイルスベクターで実現し²⁶⁾、“Send in sendai vector”、“生来の気道への嗜好性を利用した新しい役者の登場”と注目された(*Nature Genetics* 誌 2000 年 9 月号)。これらに勇気づけられてセンダイウイルスのベクター化が始まった。

2. センダイウイルスベクターの特質 — 遺伝毒性のない“細胞質型 RNA ベクター”

ウイルスゲノムの染色体への組込みがレトロウイルス遺伝子発現の前提である。アデノウイルスやアデノ随伴ウイルスのゲノムは核内にエピソードとして存在するが、染色体への組込みも一定頻度で起こる。したがって、これらをベースにしたベクターには多少なりとも宿主遺伝子への傷害、遺伝毒性の発現が予想される。フランスでの小児の重症複合免疫不全症治療でのレトロウイルスベクターによる白血病発症は、あらためてこの問題を浮きぼりにした。これに対して、全生活環が細胞質内で全うされ核との相互作用は一切ないセンダイウイルスベクターは、原理的には遺伝毒性がない“細胞質型 RNA ベクター”とみなしうる。

また、核への侵入が搭載遺伝子の発現の前提となるレトロウイルス(レンチウイルスを除く)のベクターは、原理的に分裂細胞にしか利用できず、中枢神経や筋肉など非分裂細胞は適用外である。センダイウイルスベクターは非分裂細胞へも感染し、宿主域も広く適用範囲もきわめて広い。モノネガウイルスでは相同組換えはありえない。RNA ポリメラーゼの鋳型乗換えによる組換えも起こらない。したがって、偶発的な組換えウイルスの出現のおそれはほとんどゼロに等しい。

3. 事業化への前提 — 非伝播型ベクターの構築

センダイウイルスは約 50 年前に新生児肺炎の原因ウイルスとしてわが国で分離されたが、その因果関係はいまだ確立されていない。そののちも、センダイウイルスが新生児肺炎も含めヒトの疾患と関連しているという報告はない。それゆえ、センダイウイルスのヒトへの病原性は、ないか微弱であると考えられる。実際、ヒトパラインフルエンザウイルス I 型(hPIV1)とセンダイウイルスのあいだには抗原性の交差があるので、hPIV1 に対する対策の生ワクチンとして野生型センダイウイルスをヒトへ投与する臨床試験が米国で行なわれたが、副作用は観察されなかった²⁷⁾。一方、ディナベック研究所は、げっ歯類およびサルを用いた単回および反復投与試験、体内分布などの前臨床安全性試験により、大量投与でのセンダイウイルスベクターの安全性を確認してきた。

とはいえ、センダイウイルス完全長ゲノムに所望の遺伝子を付加した形のベクターは、投与個体内で感染拡大

しさらに別の個体へと伝播しうるので、製剤としては使いがたい。多様な施設でのヒトへの適用を可能にするためには、ベクター駆動に必須の *N* 遺伝子、*P* 遺伝子、*L* 遺伝子以外の遺伝子を欠損させた非伝播型ベクターの構築が必要である。

たとえば、*F* 遺伝子を cDNA から欠失させ、*F* 蛋白質そのものを別のプラスミドからトランスに供給するパッケージング細胞(ヘルパー細胞)を作出して、それを用いて *F* 遺伝子欠損 cDNA からのベクターウイルス、 ΔF センダイウイルスベクターの回収と増幅を行なうことができる⁵⁾。生産した ΔF センダイウイルスベクター(図 5)は、トランスに供給された *F* 蛋白質をエンベロープにもち、完全長ベクターと同等の感染性(遺伝子導入能・遺伝子発現能)を有していて、試験管内では、初代肝細胞、

初代肺上皮細胞、初代平滑筋細胞、CD34 陽性血液幹細胞、大脳皮質初代神経細胞、後根神経節初代神経細胞、そして、胚生幹細胞(ES 細胞)など、各種細胞への効率的な感染と搭載遺伝子(GFP)の発現が確認できた⁵⁾。動物においても、脳室上皮細胞と錐体神経細胞⁵⁾(図 6)、気道上皮細胞、筋肉、血管内皮細胞、鼻粘膜上皮細胞、および、網膜下神経細胞などへの効率的な感染と遺伝子発現が確認でき、センダイウイルスの広い宿主域があらためて確認された。これらの細胞・組織で複製された子ベクターウイルスは、*F* 蛋白質を欠くため新しい細胞へは感染できなかった。

別の 1 遺伝子欠失、 ΔM ベクターと ΔHN ベクター、2 遺伝子欠失、 $\Delta F\Delta M$ ベクターと $\Delta F\Delta HN$ ベクター、さらに、3 遺伝子欠失、 $\Delta M\Delta F\Delta HN$ ベクターの作出にも成功

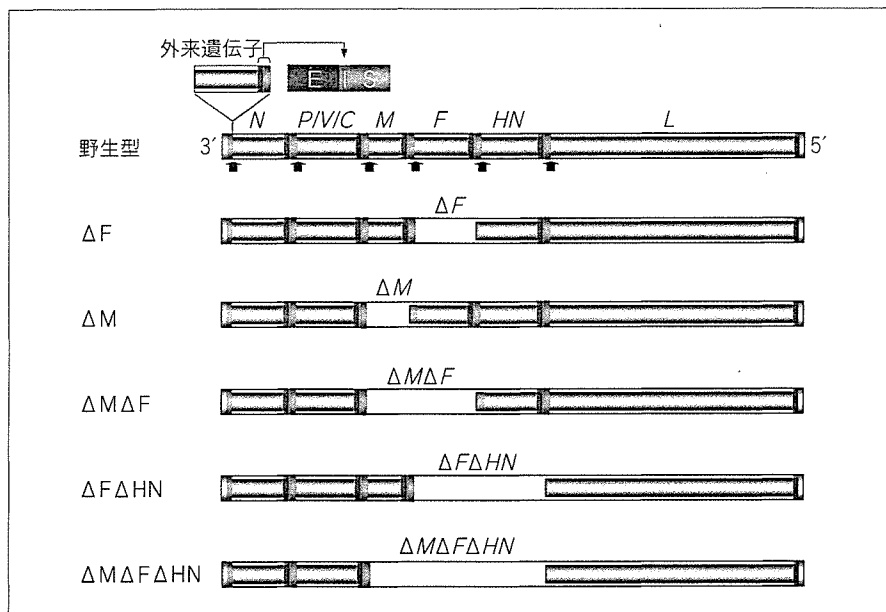


図 5 野生型および各種遺伝子欠失センダイウイルスベクター
挿入遺伝子は、たとえば、その末尾に合成した転写終結/ポリ A 付加配列(E)、
介入配列(I)、転写開始配列(S)を付加して、*N* 遺伝子の転写開始配列と ORF とのあいだの非翻訳領域に挿入する。挿入された遺伝子は、本来は *N* 遺伝子のための開始配列を使って発現する。基本的に同様の方法で、用途に応じいろいろな場所(矢印)に遺伝子を挿入できる。

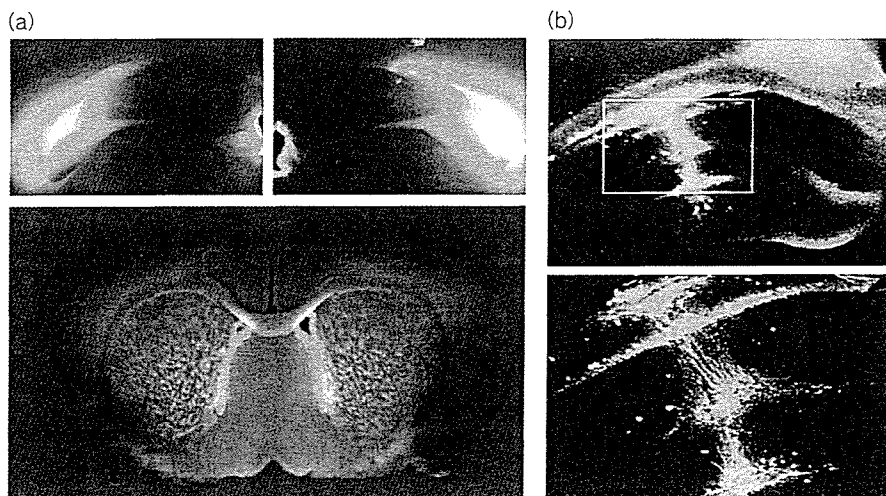


図 6 GFP の遺伝子を組み込んだ ΔF センダイウイルスベクターの発現
(a) スナネズミ脳室内投与による脳室上皮細胞への遺伝子導入。
(b) ラット脳内投与による錐体神経細胞への遺伝子導入。

した(図5)。3遺伝子欠失型ベクターではエンベロープ関連遺伝子すべてをゲノムから欠失しており、現在、細胞質型RNAベクターのデザインでは世界でもっとも進化したものになっている。

ウイルスベクターを生体に投与した場合は、染色体組込み型でウイルス蛋白質をコードしないベクターの場合を除き、遺伝子発現の持続は数日～数週間と短い。その理由のひとつはベクターに対する免疫反応が惹起されるためであり、免疫が成立すると再投与もむずかしい。センドライウイルスベクターでもこの問題は回避できない。特異的中和抗体、細胞傷害性T細胞が排除の主体をなしている。エンベロープ蛋白質がおもに抗体の標的となるが、F遺伝子、HN遺伝子、M遺伝子の3遺伝子欠失により、どの程度まで免疫応答の回避が可能であるかをみきわめたいと思う。

V. センドライウイルスベクターの事業化

1. 遺伝子治療

各種の遺伝子欠失・非伝播型センドライウイルスベクター構築技術は、新しいバイオベンチャー、ディナベック

(株)にライセンスされ、事業化へと踏み出した。ベクターの大量生産・精製および安全性と有効性を担保する品質管理技術が確立されるとともに、英国の受託施設でのGMP(good manufacturing practice)対応生産が可能になった。

遺伝子治療製剤としてももっとも開発が進んでいるのは、FGF-2(fibroblast growth factor 2; 塩基性線維芽細胞増殖因子)の遺伝子を搭載した ΔF ベクターによる、慢性動脈硬化症などを原因とする重症の虚血下肢(重症虚血肢)に対する血管新生である。九州大学大学院医学研究院での前臨床試験では、マウスおよびウサギの虚血肢モデルにおいて顕著な治療有効性が示され²⁸⁾、同附属病院での臨床研究が計画されている。日本で開発されたウイルスベクターによる初めての臨床研究となるが、厚生科学審議会科学技術部会末梢性血管疾患遺伝子治療臨床研究作業部会においておおむね了承する方向であるとの議事録(2005年2月14日付)が公開されている。

同じベクターの虚血性心疾患治療への応用も検討されている。ベクターを梗塞部位へ導入し血管新生を促進する方法であり、ブタの慢性虚血心モデルでの有効性が確認されている(未発表)。上述の嚢胞性繊維症治療への応用は、英国のCystic Fibrosis Gene Therapy Consortium

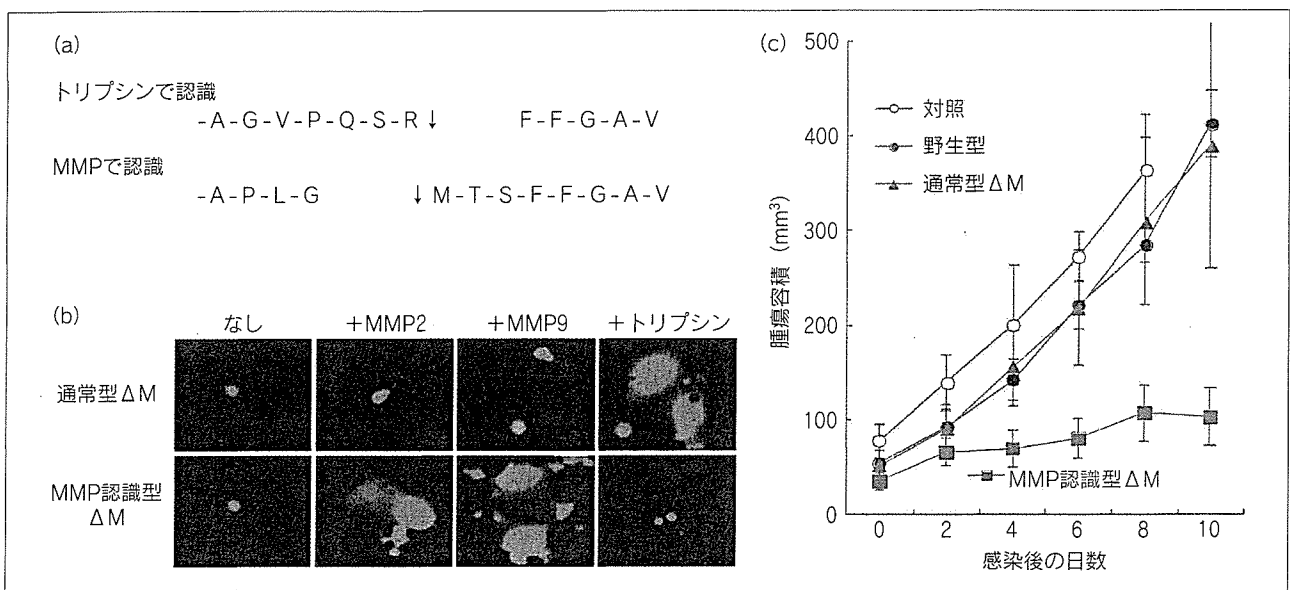


図7 MMP認識型 ΔM センドライウイルスの作製とその抗腫瘍効果

(a) F蛋白質切断部位の通常型(トリプシン認識型)からMMP認識型への改変。

(b) 回収されたMMP認識型 ΔM センドライウイルスと通常型 ΔM センドライウイルスの、培養細胞における細胞融合と感染拡大のプロテアーゼ依存性。

(c) MMP認識型 ΔM センドライウイルス、通常型 ΔM センドライウイルス、野生型センドライウイルスのHTT080移植マウスにおけるがん細胞増殖抑制活性。

との共同研究で検討されている。

2. がん治療への応用

千葉大学大学院医学研究院のグループは、食道がん、前立腺がん、脳腫瘍(グリオーマ)などの治療への応用をめざしている。ラットの神経膠肉腫脳腫瘍モデルで、インターロイキン2の遺伝子を搭載した ΔF ベクターの局所腫瘍内投与と、放射線照射した自己腫瘍細胞ワクチンを併用することで、全身性の免疫賦活化と局所性の免疫誘導によると思われる顕著な腫瘍縮退・消失効果を観察している²⁹⁾。センダイウイルスベクターは樹状細胞への効率的遺伝子導入を果たすのみならず、樹状細胞を強力に活性化し強い腫瘍抗原提示能を誘発する。このような樹状細胞療法により、複数のマウス腫瘍モデルでの顕著な治療効果が確認されている(未発表)。

M蛋白質はウイルス粒子の形成と出芽に中心的役割を担うので、 ΔM センダイウイルス感染細胞では粒子の形成・出芽・放出が完全に抑えられる。そのため、HN蛋白質とF蛋白質は細胞膜上に蓄積し、感染細胞は隣接した細胞ときわめて効率よく融合する³⁰⁾。同時に、感染細胞中で増殖したRNPは隣接細胞に伝達され、そこでまた増殖し細胞傷害性を発揮する。その結果、培養細胞では数十個ないしはそれ以上の細胞がすみやかに融合し、やがて溶解する。このような ΔM センダイウイルスの融合・溶解能力をがん細胞が密集して塊をなす固形がんの治療に応用した。

すでに述べたように、F蛋白質は宿主プロテアーゼによるプロセッシングにより融合能と感染能を発現する。切断は非活性型前駆体が細胞表面に出現したのち、あらかじめ細胞外へ分泌されていたトリプシン様宿主プロテアーゼにより行なわれる³¹⁾。上記の ΔM センダイウイルスの細胞融合はトリプシン存在下での観察である。一方、悪性の転移性がん細胞ではマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)の発現と分泌が亢進している。そこで、F蛋白質本来のトリプシン切断部位をMMP認識型に変換した ΔM センダイウイルスを作製・回収した(図7a)。このウイルスは、培養細胞レベルではもはやトリプシン添加では活性化できないが、MMP添加またはMMP高発現がん細胞では活性化でき、多核巨細胞が出現した(図7b)。そして、マウスに移植したヒト線維肉腫細胞HT1080の腫瘍塊に接種すると顕著な腫瘍増殖抑制活性を示した³²⁾(図7c)。

3. ワクチンベクター

エイズワクチンの開発研究では霊長類(マカクサル、カニクイサル)とサル免疫不全ウイルス(SIV)が唯一のモデルである。SIVの内部蛋白質Gagを発現するセンダイウイルスを経鼻接種したカニクイサルは、そののちのSIVの接種(攻撃)に耐えるなどの観察から³³⁾、Gagを感染防御抗原とし、細胞傷害性T細胞を誘導するワクチン戦略に焦点をおき、アカゲサルをDNAワクチンで初回免疫(プライム)し、Gag発現センダイウイルスで追加免疫(ブースト)する方法を採用した。

当初、攻撃ウイルスとしてSHIV89.6P(エンベロープといくつかのアクセサリ遺伝子をHIV-1のものに置き換えたキメラSIVで、Gagなど主要内部蛋白質はSIV由来)を使用した。その理由は、HIV-1感染やSIV感染における長い自然経過とはまったく異なり、接種後2週間ほどでサル末梢血のCD4陽性細胞が激減するので、実験結果が早く得られるからであった。センダイウイルスベクターのほか³⁴⁾、アデノウイルスベクターとワクシニアウイルスベクター(ともに米国)を用いたプロトコールは、どれも見事にこの攻撃ウイルスに対する防御を誘導した。しかし、自然界でHIV-1やSIVはコレセプターCCR5を使用して個体間感染するのに対してSHIV89.6PはCXCR4を使っている、また、上記のように超急性で超高病原性であるにもかかわらず、理由は不明だがサルの免疫系によりたいへん制御されやすい。つまり“狼の衣を着た羊”である。したがって、自然経過により近いSIV株を攻撃ウイルスとすべきであるとされた³⁵⁾。

そのような株のひとつ、SIVmac239に対してもGag発現 ΔF センダイウイルスベクターのプロトコールは有効であったが³⁶⁾、アデノウイルスベクターやワクシニアウイルスベクターのプロトコールは不成功に終わった(そののち、アデノウイルスベクターもある程度は有効であることが報告された)。そのため、センダイウイルスベクターはAIDSワクチン戦略において無視できない新たな道具として注目されるに至った(*International AIOS Vaccine Initiative Report* 誌2004年5~8月号)。

ほかにも、RSウイルスとよばれる小児や高齢者にしつこい肺炎を惹起するウイルスの感染防御にも有望であるなど³⁷⁾(米国St. Jude Children's Hospitalとの共同研究)、センダイウイルスベクターのワクチンベクターとしての利用価値は高いと思われる。

■ おわりに

発見から約50年、日本のセンダイウイルス研究はつねに世界のウイルス学をリードしてきたが、センダイウイルス工学の確立もそのひとつである。それは、純粋に学術上の必要により“学”(東京大学医科学研究所)から生まれ、“産・官”(ディナベック研究所)による目利きと事業化への意欲によって世界最先端の多目的“細胞質RNAベクター”に結実しつつある。“学”と“産・官”の出会い、1995年の中ごろ、技術確立直前に催された“産・官”の勉強会での“学”(永井)による“センダイウイルスの生物学”の講演であった。これはタイムリーではあったがまったくの偶然であった。

そのうちの両者の連携とは、“知の集積”、たとえば、センダイウイルスの生活環やその臓器向性のプロテアーゼ依存性原理と“遺伝子組換え技術”を生かして、“製剤化”にむかうことであった。実用化研究の成果がウイルス学へフィードバックされる場面も多かった。その意味で“学”と“産・官”が相互に刺激しあう楽しい連携であったと思える。

今日この時点まで、サルの使用を含む前臨床試験の結果は、効能と安全性の両面から、少なくともたずさわってきた者にとっては満足のゆくものであった。なすべきことは大方つくしたという感もある。しかし、前臨床試験の結果がいかによさそうでも、ヒトでは予想もしなかった副作用が起こるかもしれない。世界に前例のない技術であるがゆえに、その不安はなおさら大きい。リスクとベネフィットの厳密な評価を含む倫理問題を乗り越え、しかるべき疾患に適用すること、得られる結果をみなで共有し、成功であれ不成功であれ、その原因をつまびらかにすることが基本になろう。

ここで述べた研究は、坂口剛正、清谷克寛、吉田哲也(広島大学)、後藤 敏(福井医科大学)、米満吉和、居石克夫(九州大学)、Eric W. F. M. Alton(英国ロンドン大学)、俣野哲朗(東京大学)のほか、東京大学医科学研究所旧ウイルス感染研究部、ディナベック(株)(長谷川 譲社長)、国立感染症研究所のみなさまをはじめ、多くの方々との共同による。ここで述べた研究の一部は、文部科学省特定領域研究「感染と宿主応答」により支援された。

文 献

1) Shioda, T., Iwasaki, K., Shibuta, H. : *Nucleic Acid. Res.*, 14,

- 1545-1563(1986)
- 2) Schnell, M. J., Mebatsion, T., Conzelmann, K.-K. : *EMBO J.*, 13, 4195-4203(1994)
- 3) Kato, A. *et al.* : *Genes Cells*, 1, 569-579(1996)
- 4) Nagai, Y. : *Rev. Med. Virol.*, 9, 83-99(1999)
- 5) Li, H.-O. *et al.* : *J. Virol.*, 74, 6564-6569(2000)
- 6) Kato, A. *et al.* : *EMBO J.*, 16, 578-587(1997)
- 7) Kato, A. *et al.* : *J. Virol.*, 71, 7266-7272(1997)
- 8) Huang, C. *et al.* : *J. Virol.*, 74, 7834-7841(2000)
- 9) Kurotani, A. *et al.* : *Genes Cells*, 3, 111-124(1998)
- 10) Hasan, M. K. *et al.* : *J. Virol.*, 74, 5619-5628(2000)
- 11) Sakaguchi, T. *et al.* : *J. Virol.*, 79, 8933-8941(2005)
- 12) Gotoh, B. *et al.* : *FEBS Lett.*, 459, 205-210(1999)
- 13) Kato, A. *et al.* : *J. Virol.*, 75, 3802-3810(2001)
- 14) Kato, A. *et al.* : *J. Virol.*, 76, 7114-7124(2002)
- 15) Takeuchi, K. *et al.* : *Genes Cells*, 6, 545-557(2001)
- 16) Kato, A. *et al.* : *J. Virol.*, 78, 7443-7454(2004)
- 17) Nagai, Y., Kato, A. : *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 283, 197-248(2004)
- 18) Kato, A. *et al.* : *J. Virol.*, 73, 9273-9246(1999)
- 19) Hu, C. *et al.* : *Virology*, 263, 195-208(1999)
- 20) Sakaguchi, T. *et al.* : *Virology*, 235, 360-366(1997)
- 21) Nagai, Y., Klenk, H.-D., Rott, R. : *Virology*, 72, 494-508(1976)
- 22) Nagai, Y. : *Trends Microbiol.*, 1, 81-87(1993)
- 23) Peeters, B. P. H. *et al.* : *J. Virol.*, 73, 5001-5009(1999)
- 24) Hasan, M. K. *et al.* : *J. Gen. Virol.*, 78, 2813-2820(1997)
- 25) Yu, D. *et al.* : *Genes Cells*, 2, 457-466(1997)
- 26) Yonemitsu, Y. *et al.* : *Nature Biotechnol.*, 18, 970-973(2000)
- 27) Slobod, K. S. *et al.* : *Vaccine*, 22, 3182-3186(2004)
- 28) Masaki, I. *et al.* : *Circ. Res.*, 17, 966-973(2002)
- 29) Iwadata, Y. *et al.* : *Clin. Cancer Res.*, 11, 3821-3827(2005)
- 30) Inoue, M. *et al.* : *J. Virol.*, 77, 3238-3246(2003)
- 31) Gotoh, B. *et al.* : *EMBO J.*, 9, 4189-4195(1990)
- 32) Kinoh, H. *et al.* : *Gene Ther.*, 11, 1133-1145(2004)
- 33) Kano, M. *et al.* : *AIDS*, 14, 1281-1282(2000)
- 34) Matano, T. *et al.* : *J. Virol.*, 75, 11891-11896(2001)
- 35) Feinberg, M. B., Moore, J. P. : *Nature Med.*, 8, 207-210(2002)
- 36) Matano, T. *et al.* : *J. Exp. Med.*, 199, 1706-1718(2004)
- 37) Takimoto, T. *et al.* : *J. Virol.*, 78, 6043-6047(2004)

永井美之

略歴：1965年名古屋大学医学部卒業、医学博士、1984年名古屋大学医学部教授、1993年東京大学医科学研究所教授、1999年国立感染症研究所エイズ研究センターセンター長、2001年富山県衛生研究所所長を経て、2005年、文部科学省“新興・再興感染症研究拠点形成プログラム”推進のため設置された、理化学研究所感染症研究ネットワーク支援センターセンター長。

Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity

Mariko Yoshizaki¹
Takashi Hironaka¹
Hitoshi Iwasaki¹
Hiroshi Ban¹
Yumiko Tokusumi¹
Akihiro Iida¹
Yoshiyuki Nagai²
Mamoru Hasegawa¹
Makoto Inoue^{1*}

¹DNAVEC Corporation, 1-25-11
Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki
305-0856, Japan

²RIKEN, Center of Research Network
for Infectious Diseases, 1-7-1
Yuraku-cho, Chiyoda-ku, Tokyo
100-0006, Japan

*Correspondence to: Makoto Inoue,
DNAVEC Corporation, 1-25-11
Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki
305-0856, Japan.
E-mail: inoue@dnavec-corp.com

Abstract

Background Sendai virus (SeV) is a new class of cytoplasmic RNA vector that is free from genotoxicity that infects and multiplies in most mammalian cells, and directs high-level transgene expression. We improved the vector by deleting all of the envelope-related genes from the SeV genome and thus reducing its immunogenicity.

Methods The matrix (M), fusion (F) and hemagglutinin-neuraminidase (HN) genes-deleted SeV vector (SeV/ Δ M Δ F Δ HN) was recovered in a newly established packaging cell line. Then, the generated SeV/ Δ M Δ F Δ HN vector was characterised by comparing with single gene-deleted type SeV vectors.

Results This SeV/ Δ M Δ F Δ HN vector carrying the green fluorescent protein gene in place of the envelope-related genes could be propagated to a titer of more than 10^8 cell infectious units/ml. This vector showed an efficient transduction capability *in vitro* and *in vivo*, and the cytopathic effect and induction of neutralizing antibody *in vivo* were greatly reduced compared with those of single gene-deleted type SeV vectors. No activity of neutralizing antibody or anti-HN antibody was seen when SeV/ Δ M Δ F Δ HN was transduced *ex vivo*. Additional introduction of amino acid mutations that had been identified from SeV strains causing persistent infections was also effective for the reduction of cytopathic effects.

Conclusions The deletion of genes from the SeV genome and the additional mutation are very effective for reducing both the immunogenic and cytopathic reactions to the SeV vector. These modifications are expected to improve the safety and broaden the range of clinical applications of this new class of cytoplasmic RNA vector. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords Sendai virus; cytoplasmic RNA vector; gene deletion; reduced cytotoxicity; genotoxicity-free; gene therapy

Introduction

A new class of cytoplasmic RNA vectors is thought to provide advanced transgene expression systems that can overcome recent problems of genetic disturbance caused by presently available vectors. The Sendai virus (SeV) vector, based on SeV (belonging to the genus *Respirovirus* of the family *Paramyxoviridae*), infects and multiplies in most mammalian cells, and directs high-level transgene expression. Its replication is independent of nuclear



Received: 19 December 2005
Revised: 17 March 2006
Accepted: 10 April 2006

functions, and there is no DNA phase during its life cycle, so that the possible transformation of cells due to the integration of vector materials into the cellular genome is not a concern [1]. These properties make SeV vectors very promising for applications to gene therapy (cytoplasmic gene therapy) and vaccination via the expression of therapeutic genes and antigens [2,3]. In particular, a clinical trial protocol for therapeutic induction of angiogenesis, which is for the treatment of critical limb ischemia using an SeV vector carrying the fibroblast growth factor-2 gene [4,5], has been approved by the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) of Japan and will begin soon. In addition, cancer treatments including treatments for brain tumors [6] and many types of aggressive tumors [7], and a variety of vaccination protocols such as for the human immunodeficiency virus [8,9], using SeV vectors are planned.

The viral envelope comprises a lipid bilayer derived from the host plasma membrane and two inserted viral glycoproteins, fusion (F) and hemagglutinin-neuraminidase (HN) proteins. Beneath the envelope is a lining consisting of the matrix or membrane (M) protein. The F and HN proteins are primarily required during the entry of SeV into cells. The F protein is involved in virus penetration, hemolysis and cell fusion [10]. The HN protein mediates the viral attachment to cells by interacting with cell-surface sialic acid containing receptor(s). The HN protein is known to be one of the major targets of the host humoral immune responses against SeV infection, and to induce NK and cytotoxic T lymphocyte responses [11,12]. The M protein promotes vesiculation of the membrane and the release of particles into the extracellular medium without the aid of other viral proteins [13,14]. We previously succeeded in the recovery of high titers of F-gene-deleted (SeV/ Δ F) [15], M-gene-deleted (SeV/ Δ M) [16], HN-gene-deleted (SeV/ Δ HN), and both M- and F-genes-deleted (SeV/ Δ M Δ F) [17] SeV vectors in addition to other types of SeV vectors [18] by using packaging cell lines that express the respective proteins encoded by the deleted gene(s). All the vectors showed efficient infectivity and transgene expression in various types of cell lines and primary cells *in vitro*. Deletion of the F gene made the SeV vector non-transmissible, deletion of the M gene worked well to render the vector incapable of directing the formation of particles in infected cells, and deletion of the HN gene was expected to reduce the host immune response against the SeV vector. The single-gene-deleted SeV vectors were also rescued and propagated by another group [19], but multiple-genes-deleted SeV vectors have not been propagated at high titer. For the wide-range application of SeV vectors, such as for the treatment of chronic diseases, virus-gene-derived protein expression should be reduced as much as possible. High-level transgene expression from the SeV vector results from the high-level transcription associated with the genome replication that is directed by nucleoprotein (NP), phospho (P) and large (L) proteins [20]. To keep the high-level expression of SeV vectors, the NP, P and L genes should not be removed. Therefore, the most

advanced SeV vector, which reduces the viral genome as much as possible, is the M-, F- and HN-genes-deleted SeV vector (SeV/ Δ M Δ F Δ HN) at present. However, the recovery of SeV/ Δ M Δ F Δ HN has hitherto been very difficult because the efficient complementation of all three proteins (M, F and HN) needed to form the virion particle was essential for its propagation.

In this study, we succeeded in the establishment of a packaging cell line that expresses all three envelope proteins, M, F and HN, by using a Cre/*loxP* induction system. Using this cell line, we succeeded in producing the SeV vector deleted for the M, F and HN genes at a titer of more than 10^8 cell infectious units (CIU)/ml. SeV/ Δ M Δ F Δ HN possesses only the NP, P and L genes in its genome. This vector showed efficient transduction capability and reduced cytopathic effect. Importantly, the immune reaction against SeV was also reduced when SeV/ Δ M Δ F Δ HN was used *in vivo* and *ex vivo*.

Materials and methods

Cells and viruses

Monkey kidney cell lines, LLC-MK₂ and CV-1, were maintained in monolayer cultures in minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin in the presence of 5% CO₂. The molecular clone of SeV Z strain with attenuated virulence was used as the starting material for genome modifications in this study. The F, M or both M/F gene(s)-deleted SeV vectors were prepared by using LLC-MK₂ cells stably transformed with the F gene (LLC-MK₂/F7 [15], M gene (LLC-MK₂/F7/M62 [16]), or both M and F genes (LLC-MK₂/F7/M#33 [17]). The SeV/ Δ M Δ F Δ HN was prepared in a new packaging cell line (LLC-MK₂/F7/M#33/A/HN7; this report). An adenovirus vector, AxCANCre [21], expressing Cre recombinase, was used for the induction of respective protein(s) encoded by these deleted gene(s).

Plasmid construction

For the construction of genomic cDNA of M-, F- and HN-genes-deleted SeV carrying the green fluorescent protein (GFP) gene, LitmusSalINheIhfrag- Δ M Δ FGFP that was used to generate the cDNA of SeV/ Δ M Δ F-GFP (pSeV/ Δ M Δ F-GFP) containing the GFP and HN genes in the *Sal* I/*Nhe* I site in LITMUS38 (NEB) [17] was utilised. Inverse polymerase chain reaction (PCR) was conducted with primer pairs of 5'-GAGGTCGCGCGTTAATTAAGCTTTACCTCAAACAAGC-ACAGATCATGG-3' and 5'-GCATGTTTCCCAAGGGGAGAGTTAATTAACCAAGCACTCAAGGGAC-3' to introduce the *Pac* I site just behind the P gene. The PCR product was digested with *Pac* I and *Dpn* I and then self-ligated; thus both GFP and HN genes were deleted from LitmusSalINheIhfrag- Δ M Δ FGFP and generated

LitmusSalINheIhfrag- Δ M Δ F Δ HN-Pac I. To insert the GFP gene with end and start signals (EIS) between the P and L genes, PCR was conducted with primer pairs of 5'-CTGCGATCGCGCCCAAGCAGACACCACCT-3' and 5'-TACGCGATCGCTGATAATGGTCGTGATCAT-3' on pSeV18+/ Δ F-GFP [15] as a template. The amplified GFP fragment was digested with *Sgf* I and inserted into the *Pac* I site of LitmusSalINheIhfrag- Δ M Δ F Δ HN-PacI to generate LitmusSalINheIhfrag- Δ M Δ F Δ HN-GFP. The 5.9 kb *Sal* I- and *Nhe* I-digested fragment containing the GFP gene was substituted for the corresponding fragment of pSeV18+/ Δ M Δ F-GFP to generate pSeV/ Δ M Δ F Δ HN-GFP. To introduce the mutations of persistent infection into the P and L genes, site-directed mutagenesis was conducted using a QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with the primer pairs 5'-ctcaaacgcatcacgtctcTtTcctccaaagagaagc-3' (sense) and 5'-gcttctcttggaggAaAgagacgtgatgcgtttgag-3' (antisense) for L511F in the P gene, and 5'-gttctatcttctgacTC-tatagacctggacacgcttac-3' (sense) and 5'-gtaagcgtgtccaggtctataGAgtcaggaagatagaac-3' (antisense) for N1197S and 5'-ctacctattgagcccttagttgacGaAgataaagataggcta-3' (sense) and 5'-tagcctatctttatcTtCgtcaactaaggggtcaataggtag-3' (antisense) for K1795E in the L gene used on pSeV/ Δ M Δ F Δ HN-GFP as a template. Thus, full-length genomic cDNA of pSeV/PLmut Δ M Δ F Δ HN-GFP was generated and its structure was confirmed by sequencing. For the plasmid expressing the HN protein under the control of the *Cre/loxP* induction system [22] a PCR-generated 1.8 kb fragment containing the HN gene from SeV cDNA was inserted into the *Swa* I site of pCALNdLw [22] to generate pCALNdLw/HN, in which the HN gene was located after the drug-resistant gene sandwiched between *loxP* sequences. Hence, the expression of the HN protein in pCALNdLw/HN-introduced cells, LLC-MK2/F7/M#33/A/HN7, was induced after expressing Cre recombinase from AxCANCre.

Insertion of the SEAP gene

To quantify the expression of a foreign gene carried in the SeV genome, the gene for the secreted form of human placental alkaline phosphatase (SEAP) was inserted upstream of the open reading frame of the NP gene. The SEAP gene with the EIS element [17] was introduced into the *Not* I site located in the non-coding sequence between the start (S) signal and the translation initiation codon (ATG) of the NP gene of pSeV/PLmut Δ M Δ F Δ HN-GFP to generate pSeV¹⁸⁺SEAP/PLmut Δ M Δ F Δ HN-GFP.

Cloning and analysis of packaging cell lines

LLC-MK₂/F7/M#33 cells were transfected with pCALNdLw/HN using LipofectAMINE PLUS reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. Two weeks after transfection, viable clones of single cell origin

in 96-well plates were expanded in 12-well plates, and, when they reached a nearly confluent state, they were infected with AxCANCre at a multiplicity of infection (MOI) of 5 [21,22]. After culturing for 2 days at 32 °C, the cells were recovered and subjected to semiquantitative Western blotting with anti-HN antibody according to a method described previously [16].

M-, F- and HN-genes-deleted SeV vector recovery from cDNA

Preparation of cell lysate containing RNPs and primary virions of SeV/ Δ M Δ F Δ HN-GFP was carried out according to the method described previously [16] with minor modification. Briefly, approximately 1×10^7 LLC-MK₂ cells seeded in Ø10-cm dish were transfected with pSeV/ Δ M Δ F Δ HN-GFP and pCAG-plasmids each carrying the NP, P, M, F, HN or L gene (Ban *et al.*, personal communication). The cells were cultured in MEM containing trypsin (7.5 µg/ml). Twenty-four hours after transfection, the cells were overlaid with LLC-MK2/F7/M#33/HN7 cells after induction of M, F and HN proteins by AxCANCre infection at an MOI of 5 and cultured for another 48 h. The cells were harvested and lysed by repeating a freeze/thaw cycle three times in Opti-MEM (Invitrogen). The cell lysate was infected into new LLC-MK2/F7/M#33/HN7 cells after AxCANCre infection. After that, these cells were cultured at 32 °C in MEM containing trypsin for 10 to 20 days. When spread of GFP expression to neighbour cells was seen by fluorescence microscopy, it was considered that viral vectors were recovered in the culture supernatants. Those viral vectors were further amplified by several rounds of propagation. Titers were determined by the proportion of GFP-expressing cells (GFP-CIU) per milliliter [15]. The culture supernatant of the fourth passage was collected and stored at -80 °C, after adding bovine serum albumin (BSA) solution to a final concentration of 1% (w/v), until usage in all the experiments described below.

RT-PCR

Total viral RNA from SeV/ Δ M Δ F Δ HN-GFP was extracted from the supernatant containing viral particles using a QIAamp viral RNA minikit (Qiagen). Reverse-transcription (RT)-PCR was performed in a one-step process using the Superscript RT-PCR system (Invitrogen). RT-PCR amplification was performed with random hexamers and the primer pair 5'-AGAGAACAAGACTAAGGCTACC-3' (forward primer specific for the P gene) and 5'-TATTCAACCAAAGATCCT-GGAACCC-3' (reverse primer specific for the L gene) probed.

Detection of viral proteins by Western blotting

Analysis of viral proteins by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was