

rejection of transplanted cells must be circumvented for a sustained engraftment. The cells would otherwise be cleared by immune responses.

We have previously reported highly efficient gene transfer into cynomolgus ES cells using a lentivirus vector derived from the simian immunodeficiency virus (3). Lentiviral transgene expression in ES cells is stable, with minimal levels of transcriptional silencing (4,5). In addition, cynomolgus ES cell sublines stably expressing green fluorescent protein (GFP) were established after electroporation of a GFP-expressing plasmid (6). By using such cynomolgus ES cells genetically modified to express GFP, it is now possible to distinguish transplanted allogeneic ES cell progeny from surrounding host cells as GFP will serve as a good genetic tag.

The early gestational fetus is a good recipient with which to circumvent immune rejection because the immune system is premature (7,8). Furthermore, in the animal fetus, "space" would be relatively available for engraftment as compared to the adult because of the rapid expansion of fetal tissue compartments. Thus, transplanted cells could engraft without conditioning of recipients, such as by irradiation or immunosuppressive treatment.

In this chapter, we show a method to transplant nonhuman primate (cynomolgus macaque) ES cells (9) into xenogeneic immunodeficient mice to form teratoma. In addition, we show methods to transplant nonhuman primate (cynomolgus macaque) ES cells stably expressing GFP (3,6) into the allogeneic fetus *in utero* and to examine the *in vivo* fate of transplanted cells using GFP as a genetic tag. At 3 mo after the allogeneic *in utero* transplantation, a fluorescent tumor, obviously derived from transplanted ES cells, was found in the thoracic or abdominal cavity. Notably, transplanted cell progeny were also detected (approx 1%) in multiple fetal tissues. The cells were solitary and indistinguishable from surrounding host cells as assessed by *in situ* polymerase chain reaction (PCR). Thus, transplanted cynomolgus ES cells can engraft in allogeneic fetuses. However, the cells will form a tumor if they "leak" into an improper space, such as the thoracic and abdominal cavities (10).

## 2. Materials

### 2.1. Cells

1. Cynomolgus ES cells stably expressing GFP (see Chapters 20 and 21, this volume).
2. Mouse embryonic fibroblasts from CD-1 (also referred to as ICR) (Charles River, Wilmington, MA) or BALB/c mice (Charles River).

### 2.2. Teratoma Formation in Immunodeficient Mice

1. 6- to 8-wk-old non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) (see Note 1).
2. Hanks' balanced salt solution (HBSS; Invitrogen, Carlsbad, CA; cat. no.14025-092).
3. Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 1:1 mixture (DMEM/F12) (Invitrogen, cat. no. 11330-032).
4. ES cell-qualified fetal bovine serum (Invitrogen, cat. no. 10439-024).
5. 10,000 IU/mL penicillin-10,000 µg/mL streptomycin (100X; Invitrogen, cat. no. 15070-063).
6. 200 mM L-glutamine (100X; Invitrogen, cat. no. 25030-081).
7. 2-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO; cat. no. M3148).

8. Culture medium for primate ES cells: DMEM/F12 containing 15% ES cell-qualified fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin, and 0.1 mM 2-mercaptoethanol.
9. 0.25% trypsin in HBSS (2.5% trypsin 10X liquid; Invitrogen, cat. no. 15090-046).
10. 1% bovine serum albumin (BSA fraction V; Sigma, cat. no. A4503) in HBSS.

### 2.3. Teratoma Formation in Allogeneic Fetuses

1. Anesthetic and surgical facilities for primates (including ultrasound and inhalation anesthesia equipment) (11).
2. A time-dated pregnant cynomolgus monkey of 50- to 70-d gestation (see Note 2) (12).
3. Ketamine hydrochloride (Ketalar® 50; Sankyo, Tokyo, Japan).
4. Isoflurane (Forane®; Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan).
5. A percutaneous transhepatic cholangiography (PTC) needle (22-gage, Sonoguide PTC needle type B; Hakko Medical, Nagano, Japan; cat. no. 22412210).
6. A 1-mL syringe (Terumo, Tokyo, Japan; cat. no. SS-01T) filled with graft cells ( $10^5$ – $10^7$  cells in 200–500 µL).
7. A 1-mL syringe (Terumo, cat. no. SS-01T) filled with normal saline (for flushing).

### 2.4. Sample Preparation

1. 4% paraformaldehyde (Wako, Osaka, Japan; cat. no. 169-18432) and 8% sucrose (Wako, cat. no. 192-00012) in phosphate-buffered saline (PBS; Invitrogen, cat. no. 10010-023).
2. OCT compound (Tissue Tek series; Sakura, Zoeterwoude, Netherlands; cat. no. 4583) containing 10% sucrose.

### 2.5. In Situ PCR

1. A PTC100 Peltier thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA).
2. 20 µg/mL proteinase K (Sigma, cat. no. 39450-01-6) in PBS.
3. 0.1% Triton X-100 (Sigma, cat. no. T8787) in PBS.
4. A slide frame for *in situ* PCR (slide seal; Takara, Shiga, Japan; cat. no. 9066 [25 µL] or cat. no. 9067 [65 µL]).
5. 50 µL Digoxigenin dNTP labeling mix (Roche, Basel, Switzerland; cat. no. 1277065).
6. Rabbit anti-Digoxigenin polyclonal antibody, horseradish peroxidase labeled (Dako, Glostrup, Denmark; cat. no. P5104) diluted (1:100) in 2% BSA and 5% horse serum (Invitrogen, cat. no. 16050-130) in PBS.
7. A Vector SG substrate kit (Vector, Burlingame, CA; cat. no. SK-4700).
8. Kernechtrot solution (0.1% Kernechtrot in aluminum sulfate; Muto, Tokyo, Japan; cat. no. 4087).

## 3. Methods

### 3.1. Teratoma Formation in Immunodeficient Mice

1. Wash ES cells with HBSS twice and add 0.25% trypsin to the dish at 37°C for 3 min. Neutralize trypsin with ES culture medium and make a suspension of ES cell clumps.
2. Transfer the cell suspension into a 50-mL conical tube, centrifuge it at 140g for 4 min, and resuspend the pellet with 20 mL 1% BSA/HBSS.
3. Centrifuge the cell suspension again at 140g for 4 min and resuspend the pellet with an appropriate volume of 1% BSA/HBSS ( $10^6$  cells in 150–200 µL per injection site).
4. Aspirate the ES cell suspension into a 1-mL syringe with a 23-gage needle and inject the suspension into NOD/SCID mice subcutaneously (see Note 3).



5. Resulting tumors will be palpable at 8–13 wk after the injection. Expose, observe, and excise tumors.
6. Fix tumor samples (5 × 5 × 3 mm) at 4°C for 4 h in 4% paraformaldehyde and 8% sucrose in PBS and embed the samples in paraffin for histological examination. To prepare fresh frozen samples, embed samples (5 × 5 × 3 mm) in OCT compound containing 10% sucrose, freeze them in liquid nitrogen, and store them at –80°C.

### 3.2. Teratoma Formation in Allogeneic Fetuses

#### 3.2.1. Anesthesia

1. Prepare a pregnant monkey around the end of first trimester (50–70 d; full term 165 d) (*see Note 2*).
2. Give the monkey 10 mg/kg ketamine hydrochloride intramuscularly. Secure the monkey on a table and monitor maternal heart rate by electrocardiography (*see Note 4*).
3. Induce and maintain anesthesia by inhalation of isoflurane (1.5–2%) mixed with 100% oxygen via a mask.

#### 3.2.2. In Utero Transplantation

1. Shave whole abdomen and sterilize the surface with iodine solution (from **Subheading 3.2.1., step 3**).
2. Determine fetal position by transabdominal ultrasound with a 7.5-MHz convex probe (*see Note 5*).
3. Let an assistant secure the other side of the uterus while an operator holds the transducer parallel to the intended course of the needle.
4. Select an optimal entry site into the uterine cavity, avoiding the placental tissue.
5. Insert a 23-gage PTC needle through the maternal skin and uterine wall into the amniotic cavity and then into the desired site (e.g., peritoneal cavity, brain, or liver) under continuous ultrasound guidance (*see Note 6 and Fig. 1*). A small push of an injector can visualize a tip of the needle on echocardiography.
6. Let an assistant gently inject the cells (200–500  $\mu$ L) and flush the needle with 100  $\mu$ L normal saline. The operator should focus on keeping the tip of the needle in an appropriate position.
7. Confirm adequate heart beats after the procedure (*see Note 7*).

#### 3.2.3. Caesarian Section

1. Prepare the pregnant monkey after transplantation as described in **Subheading 3.2.1. In utero** transplantation is usually done around the end of the first trimester (50–60 d) (*see Subheading 3.2.2.*). The full term is 165 d; therefore, the *in utero* incubation time of transplanted ES cells is about 3 mo.
2. Expose the gravid uterus through a midline incision and deliver the fetus through a low transverse hysterotomy (*see Note 8*).
3. Clamp and divide the cord. Remove the placenta and cord. Close the uterus and abdomen with absorbable sutures.
4. Insert a small catheter (24-gage intravenous catheter) into the umbilical vein and irrigate the newborn with normal saline to completely wash out fetal blood for mercy killing. Open the chest and abdomen, observe the whole body, and excise tumors (*see Fig. 2A–C*). Collect tissues.
5. Fix tissue samples (5 × 5 × 3 mm) at 4°C for 4 h in 4% paraformaldehyde and 8% sucrose in PBS and embed the samples in paraffin for histological examination. To prepare fresh

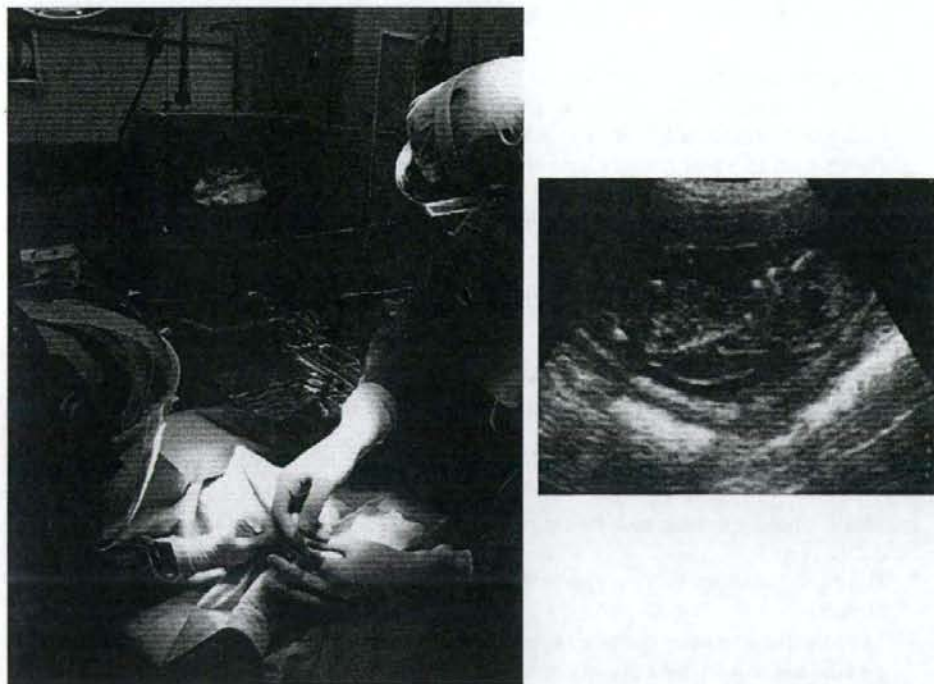


Fig. 1. *In utero* transplantation. Pregnant monkeys were anesthetized by intramuscular administration of ketamine hydrochloride (Ketalar). Cynomolgus ES cells genetically modified to express GFP ( $10^6$  cells/fetus) were injected into the fetal abdominal cavity or liver through a 23-gauge needle using 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  $-80^\circ\text{C}$ .

### 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  $20 \mu\text{g/mL}$  proteinase K/PBS and incubate it at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min (see Note 9).



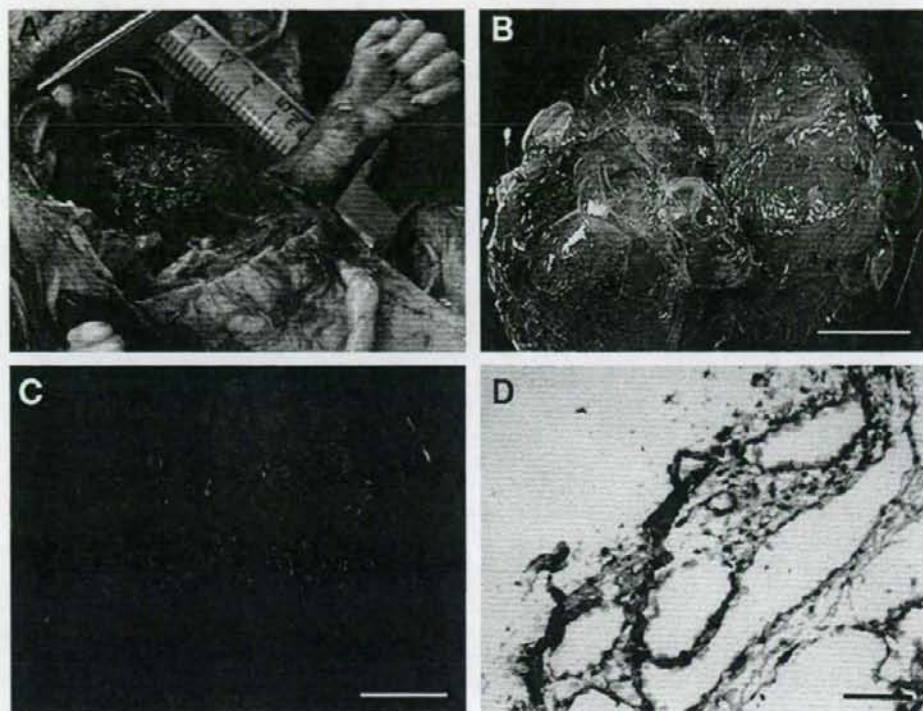


Fig. 2. Teratoma formation in a cynomolgus fetus after transplantation of allogeneic ES cells. (A) A tumor ( $4 \times 3 \times 2.5$  cm) was detected in the thoracic cavity 3 mo after allogeneic transplantation of ES cells expressing GFP. The tumor was observed in (B) a bright field and (C) a dark field (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  $\mu$ 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 <sup>2+</sup> free)	2.5 $\mu$ L	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4.5 $\mu$ L	4.5 mM
dNTPs mixture (2.5 mM each)	3 $\mu$ L	420 $\mu$ M dATP
Digoxigenin (DIG) DNA labeling mix (Roche)	3 $\mu$ L	420 $\mu$ M dCTP 420 $\mu$ M dGTP 378 $\mu$ M dTTP 42 $\mu$ M DIG-dUTP
Forward primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	0.8 $\mu$ M
Reverse primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	0.8 $\mu$ M
Takara Taq polymerase (5 U/ $\mu$ L)	0.8 $\mu$ L	0.16 U/ $\mu$ L
Water	7.2 $\mu$ L	NA
Total volume of master mix	25 $\mu$ 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  $1 \times 10^6$  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  $5 \times 10^6$  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  $\mu$ L for Takara cat. no. 9066 and 65  $\mu$ 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.



# 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、産官学的好連携により“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。

## 1. 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 μm、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の先端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 Nagai<sup>1</sup>, Atsushi Kato<sup>1</sup>, Makoto Inoue<sup>2</sup>, <sup>1</sup>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,

<sup>2</sup>国立感染症研究所 ウイルス第三部, <sup>3</sup>ディナベック(株) E-mail: yoshi-nagai@riken.jp

Establishment and progress of Sendai virus engineering

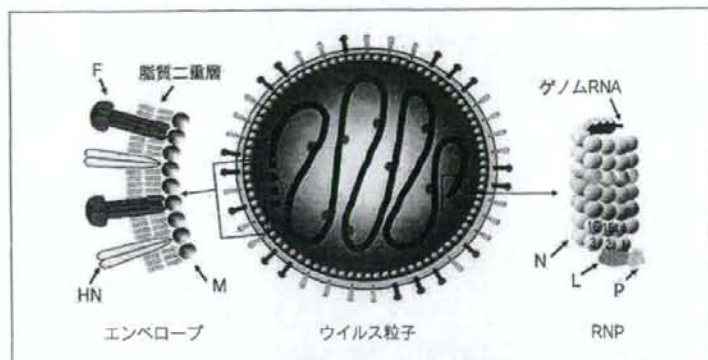


図1 センダイウイルスの構造

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F<sub>0</sub>として合成されたのち、宿主プロテアーゼによりF<sub>1</sub>とF<sub>2</sub>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種の構造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、渋谷博(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<sup>1)</sup>。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、できばえを競う

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蛋白質



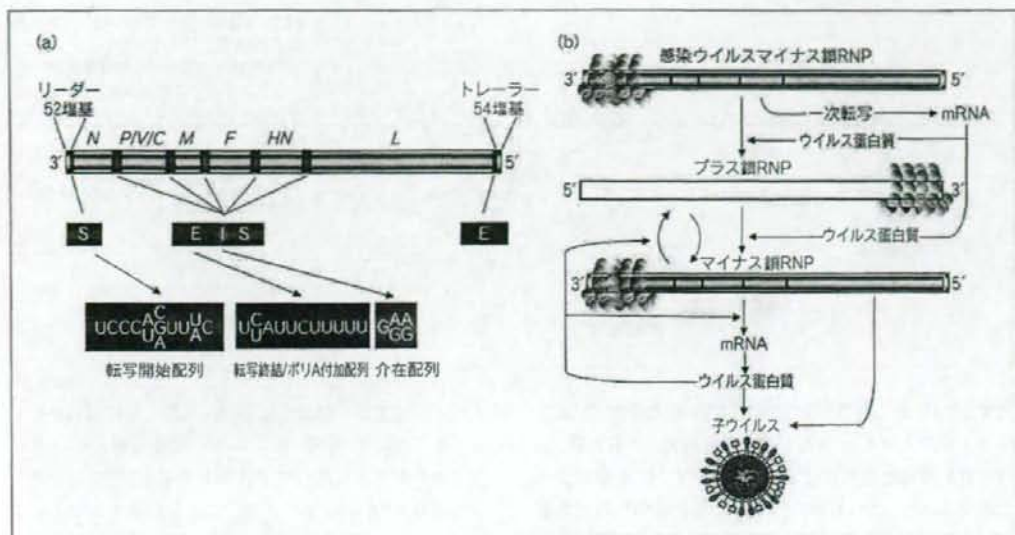


図2 センダイウイルスの転写と複製

(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すみやかに新生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が鋳型となり、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ゲノムを発見させ、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見される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の一方の端はア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<sup>2)</sup>、そのうち、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<sup>3,4)</sup>。

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

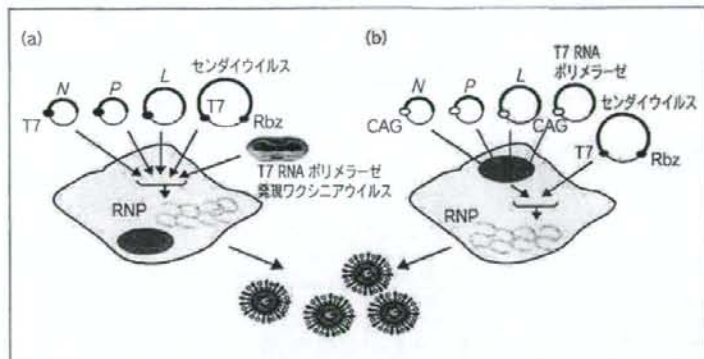


図3 cDNAからのセンダイウイルスの再構成

(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 蛋白質が至適な量だけ供給されればウイルスが回収できたのである<sup>3)</sup>。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<sup>3)</sup>、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壁のように簡単になった<sup>5)</sup>。

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 3 b)。

### 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畑上に

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



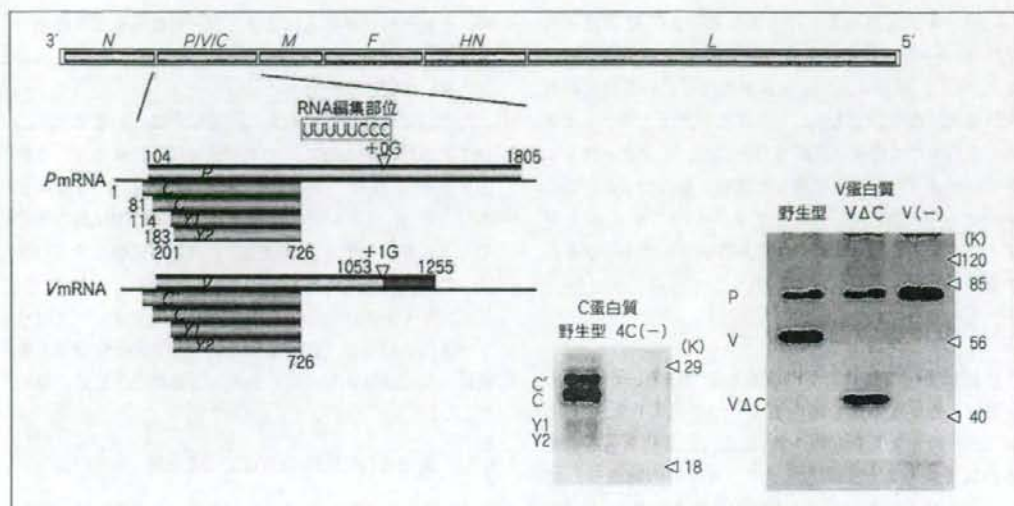


図4 センダイウイルス *P* 遺伝子からの C 蛋白質および V 蛋白質の発現とノックアウトウイルスの回収  
 回収ウイルス感染細胞のウェスタンブロットングにより、4C(-)：4種の C 蛋白質を欠失した 4C(-) センダイウイルス、V(-)：V 蛋白質を完全欠失した V(-) センダイウイルス、および、VΔC：V 蛋白質特異的な領域のみを欠失した VΔC センダイウイルスを示す。

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  $Zn^{2+}$  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(UUUUCCCC)

(図 4)の一部置換(UUCUUUCC)による，RNA 編集を起こさない 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<sup>6,7)</sup>。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ふ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，マウスは全数が生存した。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<sup>6,7)</sup>。

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、 $Zn^{2+}$ 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<sup>9)</sup>。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み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<sup>9)</sup>。回収の難しさは、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あり、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<sup>9,10)</sup>、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<sup>10)</sup>。

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)がはたし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<sup>11)</sup>。

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<sup>12)</sup>、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側半分には担われている、ことが明らかになった<sup>13,14)</sup>。現在、この遮断機構の詳細が調べられている<sup>15,16)</sup>。

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<sup>17)</sup>。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<sup>18)</sup>。

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<sup>19,20)</sup>。

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<sup>21)</sup>、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による<sup>22)</sup>、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<sup>23)</sup>。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、切断部位の変更のみで弱毒株→強毒株の転換が可能であるとした<sup>24)</sup>。“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<sup>4,17)</sup>。

## 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<sup>24,25)</sup>。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<sup>26)</sup>、“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み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ムとして存在するが、染色体への組み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<sup>27)</sup>。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、製剤としては使いたくない。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、 $\Delta F$  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<sup>5)</sup>。生産した  $\Delta F$  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<sup>5)</sup>。動物においても、脳室上皮細胞と錐体神経細胞<sup>5)</sup>(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、 $\Delta M$  ベクターと  $\Delta HN$  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

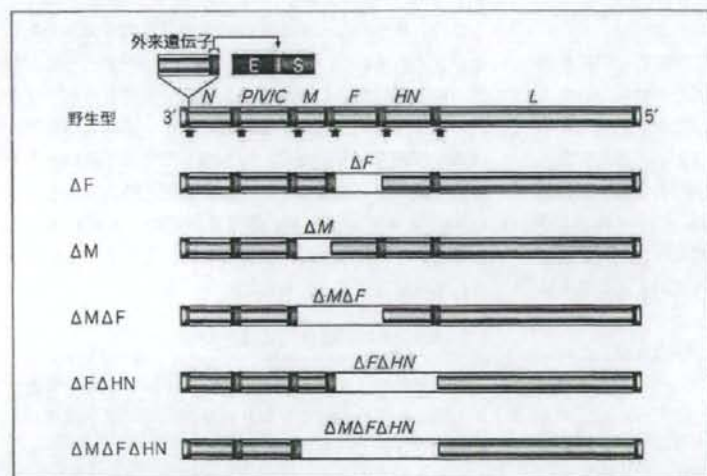


図 5 野生型および各種遺伝子欠失センダイウイルスベクター

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。

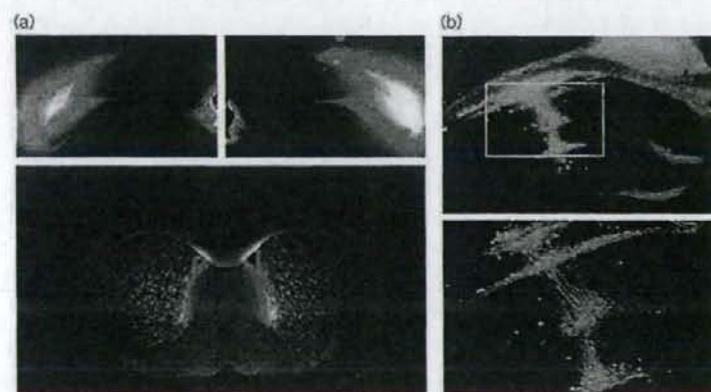


図 6 GFP の遺伝子を組み込んだ  $\Delta F$  センダイウイルスベクターの発現

(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。センダ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. センダ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・非伝播型センダ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<sup>28)</sup>、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)。上述の囊胞性繊維症治療への応用は、英国のCystic Fibrosis Gene Therapy Consortium

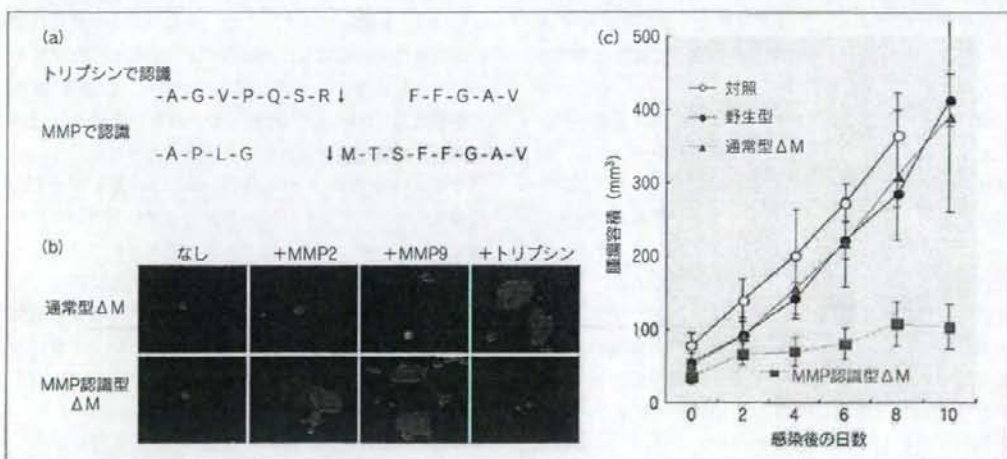


図7 MMP認識型ΔMセンダイウイルスの作製とその抗腫瘍効果

(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センダイウイルスと通常型ΔMセンダイウイルスの、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センダイウイルス、通常型ΔMセンダイウイルス、野生型センダイウイルスの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腫瘍モデルで、インターロイキン2の遺伝子を搭載した $\Delta F$ 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<sup>29)</sup>。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、 $\Delta M$ 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<sup>30)</sup>。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 $\Delta M$ 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<sup>31)</sup>。上記の $\Delta M$ 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 $\Delta M$ 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<sup>32)</sup>(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、その後のSIVの接種(攻撃)に耐えるなどの観察から<sup>33)</sup>、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<sup>34)</sup>、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に対してSHIV89.6PはCXCR4を使っていて、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<sup>35)</sup>。

そのような株のひとつ、SIVmac239に対してもGag発現 $\Delta F$ センダイウイルスベクターのプロトコルは有効であったが<sup>36)</sup>、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ルは不成功に終わった(そのうち、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<sup>37)</sup>(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。

そのの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が多かった。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しつづいたという感もある。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が共有し、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らう。

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)、米岡吉和、居石克夫(九州大学)、Eric W. F. M. Alton(英国ロンドン大学)、梶野哲朗(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 謙社長)、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) Iwadate, 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 Yoshizaki<sup>1</sup>  
Takashi Hironaka<sup>1</sup>  
Hitoshi Iwasaki<sup>1</sup>  
Hiroshi Ban<sup>1</sup>  
Yumiko Tokusumi<sup>1</sup>  
Akihiro Iida<sup>1</sup>  
Yoshiyuki Nagai<sup>2</sup>  
Mamoru Hasegawa<sup>1</sup>  
Makoto Inoue<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>DNAVEC Corporation, 1-25-11  
Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki  
305-0856, Japan

<sup>2</sup>RIKEN, 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/ $\Delta$ M $\Delta$ F $\Delta$ HN) was recovered in a newly established packaging cell line. Then, the generated SeV/ $\Delta$ M $\Delta$ F $\Delta$ HN vector was characterised by comparing with single gene-deleted type SeV vectors.

**Results** This SeV/ $\Delta$ M $\Delta$ F $\Delta$ 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/ $\Delta$ M $\Delta$ F $\Delta$ 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