

## 15. 遺伝子解析室

室長 神田 忠仁

### 概要

遺伝子解析室の業務は、遺伝子治療に用いるウイルスベクターの研究とウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索、解析である。遺伝子治療への応用を念頭にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの研究を進めた。また、臨床試験に使われるウイルスベクターの性能と安全性に関する情報を収集、解析した。子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス (HPV) が表皮基底層細胞に持続感染する分子機構の解明と HPV 感染を予防するワクチンの開発をめざす研究、多剤耐性を獲得したヒト免疫不全症ウイルス 1 型 (HIV-1) の逆転写酵素変異体の解析も継続した。今年度は、異種移植に伴うドナー動物由来感染症の可能性に関する情報の収集を行い、厚生労働省によるガイドライン策定に寄与した。

遺伝子治療は、先天性遺伝病に対して根治療法になりうる。これまでに欧米及び我が国で行われた臨床試験では、重症複合免疫不全症に対して良好な治療効果が見られている。前臨床試験では、血友病や糖尿病の治療にも効果が示されている。先天性遺伝病の治療では、治療用遺伝子を長期間に渡って安定に発現させる技術が求められる。AAV ベクターは、患者への直接投与で細胞染色体に導入遺伝子を組み込むことができることから、長期発現に適したベクターとして開発が進められている。我々は AAV モデルベクターを作製し、カニクイサルに接種して体内動態、消長を調べている。また、新たに分離した AAV10、11 型を利用して感染標的臓器の異なる AAV ベクターの作製を進めている。一方、米国でのアデノウイルスベクターによる患者の死亡やフランスでのレトロウイルスベクターによる白血病の発症が示すように、いわば人工のウイルスであるベクターの臨床応用では、ベクターの安全性確保が重要である。我が国での遺伝子治療臨床試験のリスク管理に役立てるため、内外のウイルスベクターの安全性、有効性に関する情報収集に努めた。

HPV 感染は子宮頸癌を中心に世界の女性の癌の 11% の原因とされている。HPV は、性行為等で生じた粘膜の微小なキズから侵入し、表皮基底層細胞 (幹細胞) の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が基底層に留まる限り、HPV の増殖は起こらないが、感染細胞が最終分化を始めると HPV ゲノムの複製と HPV 蛋白質の大規模な発現が起こり、子孫ウイルスが形成されて周

辺に放出される。このような HPV 潜伏・持続感染の成立と維持を支える角化細胞の分化の機構を解析し、HPV を排除する方法を検討している。また、動物パピローマウイルスでは、感染成立をワクチンで予防できることが示されている。80 以上の HPV 遺伝子型のうち 16、18 型等の 12 種類の遺伝子型 (高リスク群) が子宮頸癌の原因となることから、高リスク群 HPV の感染防御免疫を誘導できる実用的なワクチン抗原の開発を進めている。

HIV のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対する耐性株は、逆転写酵素に変異を持つことがわかったので、変異が逆転写酵素の構造と機能をどのように修飾するのかを詳細に解析し、薬剤耐性の分子機構を知るための研究を継続した。

重度の火傷の治療には、マウスの繊維芽由来の細胞をフィーダー細胞として患者の皮膚を培養し、患部に移植する医療が行われている。この培養皮膚はマウス由来細胞と直接接触することから、フィーダー細胞の種類と品質管理が重要となる。我が国で使われているフィーダー細胞を調べた。また、WHO 主催の移植医療に関する会議に出席し、異種移植の規制に関する各国の状況を調べた。

### 研究業績

#### 1. 遺伝子治療に用いるウイルスベクターに関する研究

1. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの開発及び安全性評価のための基礎的研究

(1) AAV2 型ベクターの体内動態の解析

カニクイサルでの AAV2 型ベクターの体内動態を解析した。今年度は、接種から長期間経過後のベクターの体内残留・分布の解析に重点を置いた。1 頭あたり約  $10^{11}$  ゲノムコピーの EGFP-tubulin 融合タンパク質発現 AAV2 型ベクターを計 4 頭のサルに静脈より接種した。150 日後に解剖し、各臓器に存在する EGFP 遺伝子を PCR によって増幅、検出した。ベクターゲノムは種々の臓器に認められた。特に各リンパ節、脾臓、肝臓 ( $>10^3$  copy/ $10^5$  cells) に多く、扁桃、膵臓、腸管、腎臓、胆嚢、副腎、心臓、肺 ( $10^2$  ~  $10^3$  copy/ $10^5$  cells) などに検出された。これまでに明らかにした接種 90 日後のベクター量に比べ、脾臓で 1/10 程度、リンパ節、肝臓では同程度のベクターが残存していることがわかった。この成績は、AAV ベクターが種々の臓器に、さらに長期間にわたり存在し続けることを示しており、どのような細胞種に、どのような状態で存在して

いるのか、導入遺伝子の発現はあるのか、等を明らかにすることが今後の課題である。(森清一郎、竹内隆正、佐多徹太郎[感染病理]、神田忠仁)。

## (2) カニクイサル由来新規 AAV キャプシドを使用したベクターの解析

カニクイサルより新たに分離した AAV10 型、11 型のキャプシドを使った beta-gal 発現ベクターを作成し、それらの性質を調べた。AAV10 型、11 型ベクターはヒト、サル、マウス由来の培養細胞に遺伝子導入が可能であった。特に、マウス筋芽細胞では、2 型ベクターが分化した細胞に比べ未分化な細胞への遺伝子導入効率が非常に高いのに対し、10 型、11 型ベクターは未分化な細胞より分化した細胞への遺伝子導入効率が高かった。マウス骨格筋へ直接ベクターを接種した場合、10 日後の beta-galactosidase 発現は AAV10 型が最も高く、次いで 11 型、2 型であった。マウス尾静脈からベクター接種後 6 週間目の体内分布を調べたところ、AAV2 型ベクターが主に肝臓、脾臓で検出されたのに対し、AAV10 型ベクターは肝臓、心臓、筋肉、肺、腎臓などで、11 型ベクターは筋肉、腎臓、脾臓、肺、心臓などで検出された。それぞれの型のキャプシド蛋白質に対する抗血清を用いて、中和抗体の交差性を調べた結果、AAV2 型、10 型、11 型の間に中和抗体の交差性は認められなかった。AAV10 型、11 型が現在ベクターとして使用されている 2 型とは臓器親和性、抗原性が異なることから、新たな遺伝子治療用ベクターとして有用であると考えられる。(森清一郎、神田忠仁)

## 2. 新たなウイルスベクターの開発に関する研究

### (1) ウイルスベクターを用いた RNAi 誘導系の作製

U6 snRNA プロモーターを用いた short hairpin RNA (shRNA) 発現カセットをもつ AAV ベクター及びレンチウイルスベクターを作製し、培養細胞レベルでの各々のベクターの遺伝子導入様式の特徴及び遺伝子ノックダウン効率について検討した。AAV ベクターは分裂細胞への遺伝子導入は効率よく行えたものの、発現レベルは急速に低下した。これはエピソームとして存在するベクターゲノムが細胞分裂の際に失われるためと考えられた。また非分裂細胞への遺伝子導入は 3 週間程度ではほとんど認められず、非常に緩徐に進行するものと考えられた。一方レンチウイルスベクターは分裂細胞・非分裂細胞いずれへの遺伝子導入も効率よく行うことができ、遺伝子発現は継続していた。またノックダウン効率はいずれのベクターでも全般に高くはなかったが、ウイルスベクターを用いると導入遺伝子コピー数がより厳密に規定されることから、ウイルスベクターを用いた高効率なノックダウンには shRNA 発現カセット自体の最適化が必要であると考えられた。(竹内隆正、神田忠仁)。

### (2) AAV 組み込み標的部 (AAVS1) に存在するインスレーターの解析。

導入遺伝子の長期発現を可能にするため、ウイルスベクターにインシュレーターを組み込む技術の開発を進め

た。我々が見出した AAVS1 領域内のインシュレーターの解析を続け、DNaseI 高感受性部位を含む SmaI 断片内の 2 ケ所 (1~90bp 及び 206bp~353bp) が、独立にインシュレーター活性を持つことがわかった。また  $\beta$  グロビンのインシュレーターとは異なり、AAVS1 インシュレーターは、細胞株によって異なる活性を持つことが分かった。この領域に結合する細胞蛋白質の探索を目指している。また、レトロウイルスベクターにこのインシュレーターを組み込む作業を行っている。(緒方敏彦、神田忠仁)。

## 3. 小型 DNA ウイルスベクターの作製技術の開発に関する研究

機能分子を細胞内に運び込む担体として、小型 DNA ウイルスのキャプシドを利用できる。HPV キャプシドは、72 個のキャプソメア (L1 の 5 量体) と 12 分子の L2 から成る。キャプソメア間のジスルフィド結合によって正二十面体構造が作られており、L2 の存在によってキャプシドの安定性が増すが、L2 がどのように存在しているのかは知られていない。昆虫細胞で L2 と野生型 L1、ないし L2 とキャプソメアのみ形成できる変異型 L1 を発現させると、野生型 L1 では直径 55nm のキャプシドが、変異体 L1 では直径 40-50nm の粒子が形成された。即ち、L2 にはジスルフィド結合に非依存的にキャプソメアの会合を仲立ちする機能があることがわかった。(石井克幸、神田忠仁)

## 11. HPV に関する研究

### 1. HPV の増殖制御機構の研究

#### (1) HPV の後期プロモーター活性化機構に関する研究

角化細胞の分化に伴って発現が誘導される転写因子 C/EBP $\beta$  が、16 型 HPV の後期プロモーター P670 の活性に及ぼす効果を検討した。C/EBP $\beta$  発現プラスミドを P670 のリポータープラスミドと共に HeLa 細胞に導入すると、10 倍程度の P670 活性化が起こった。組み換え C/EBP $\beta$  蛋白質を用いたゲルシフト法によって、P670 配列中の C/EBP $\beta$  結合部位を三カ所同定した。その内の二カ所に C/EBP $\beta$  が結合出来ない塩基置換を導入すると C/EBP $\beta$  による P670 の活性化が減弱した。C/EBP $\beta$  は細胞内で P670 に直接結合し、その活性化を引き起こすことが示唆された。(終元巖、神田忠仁)

#### (2) HPV16L1 蛋白質の発現抑制機構の解析

HPV16L1 遺伝子は通常の培養細胞で発現しない。最終分化の過程にある角化細胞でのみ発現する。この発現抑制と抑制解除の機構は、HPV の潜伏・持続感染に重要な役割を担っているらしい。これまでの解析で、全長約 1500bp の L1 遺伝子の 5' 端から 500 塩基までの領域が、核内での mRNA の安定性を著しく損なうことがわかった。この領域を別の遺伝子の 5' 領域につなぐと、やはり mRNA が検出できなくなり、核内での mRNA 分解を促進する機能が示された。この領域が mRNA の 5' 端から 1000 塩基長以内に存在すると mRNA の分解がみられるが、5' 端からの距離がそれ以上長くなると効果を失った。mRNA の 5' 端に結合する細胞因子が、この領域を介す mRNA 分解活性に関わっている

と推定している。(尾崎さおり、神田忠仁)

## 2. HPV ワクチン開発に関する研究

HPV16 型 L2 のアミノ酸 108-120 領域に、複数の高リスク型 HPV を中和できる抗体のエピトープ (L2-エピトープ) が存在する。L1 蛋白質のループ部分に 3 つの L2 エピトープを組み込んだキメラ L1 蛋白質を作った。野生型 L1 蛋白質で形成される粒子に比べやや大きいものの、安定で野生型粒子と同様に精製できた。粒子あたり 1080 個の L2-エピトープが存在することから、L2-エピトープに対する抗体を誘導するための優れたワクチン抗原となることが期待される。(近藤一成、神田忠仁)

## III. HIV に関する研究

### 1. HIV 逆転写酵素の研究

(1) HIV-1 亜株プロテアーゼの薬剤感受性予測  
計算科学的手法を HIV-1 亜株プロテアーゼの薬剤感受性予測に適用した。統合計算化学システム MOE (カナダ CCG 社) を使い、ガーナ流行株 (HIV-1 CRF02AG) と欧米流行株 (HIV-1 subtype B) プロテアーゼのホモダイマーモデルを作製し、薬剤の結合親和性 (結合エネルギー、結合時の阻害剤の構造と配置) を評価した。AG プロテアーゼは B に比べ NFV 親和性が低下し、感受性低下が示唆された。一方 APV 親和性には亜株間で有意差は認められなかった。この予測は、ウイルスを用いた感受性試験の結果と一致した。(横山勝、佐藤裕徳、木ノ本正信[感染病理]、徳永研三[感染病理])

### (2) HIV-1 逆転写酵素の結晶化条件検討

HIV-1 逆転写酵素の結晶化条件を検討した。大腸菌で発現した his-tag 付き酵素を、親和性クロマトグラフィー、ゲルろ過、およびハイドロキシアパタイトカラムを用いて高度精製し (クマシ染色純度 95%, 比活性  $>10^5$  unit / mg protein)、動的光散乱装置を用いて酵素の分散状態を検討した後、種々の結晶化条件 (沈澱剤、緩衝液、塩、蛋白質の濃度、温度) を検討した。その結果、単分散状態の活性型ヘテロダイマー-酵素精製標品を得た。これを用い、結晶化に適する非晶質 (amorphous) と非沈澱 (clear) の境界条件を絞り込んだ。(横山勝、守宏美、中村浩美、佐藤裕徳)

### (3) HIV-1 中和逃避機構の研究

以前の結果 (*J. Virol.* 73: 3551-59, 1999., 74: 1069-78, 2000) をもとに、HIV-1 の未知の V3 抗体逃避機構の存在について検討した。CRF01\_AE 感染者血漿 15 種について、1) CRF01\_AE R5 株および X4 株の V3 を代表する 9 種の V3 ペプチド配列に対する結合抗体の有無、2) それらの V3 を有する HIV-1 V3 組み換え体 25 クローンに対する中和能を調べた。X4V3 結合抗体は約 1/3 の血漿に認められ、結合抗体が存在すると当該 V3 をもつ X4 ウイルスを中和した。一方、R5V3 結合抗体は全ての血漿中に検出されたが、R5 ウイルス中和能は無い、または低かった。R5 株 V3 は、抗体産生のよいエピトープとなるが、産生された抗体

に抵抗性である。R5 ウイルスには、エピトープ変異以外の V3 抗体逃避機構 (エピトープマスキング) があると考えられる。(長縄聡[横浜市立大学医]、富田康浩、北村勝彦[横浜市立大学医]、佐藤裕徳)

## IV. 培養皮膚の作製に使われるフィーダー細胞に関する研究

ヒト上皮系細胞を移植のために体外培養する際にフィーダー細胞として用いられる 3T3 (Swiss albino) 細胞、及び、名称上混同のおそれがある NIH3T3 細胞及び Balb3T3 細胞を、ATCC、厚生労働省細胞バンク、理研バイオリソースセンターなどから入手し、DNA フィンガープリンティングにより異同を調べた。「3T3」細胞をマウスの系統毎に区別することが可能であった。市販の「3T3」細胞間での名称の混同は見られなかった。しかしながら分与元によっては微妙に異なるパターンを示す細胞もあり、経代中に出現した変異クローンに置き換わった可能性が考えられた。細胞バンクから入手した細胞であってもその性質は固定されたものではなく、臨床使用では厳密な安全性が要求されることから、品質管理の徹底が求められる。(竹内隆正、王麓那、神田忠仁)

## 発表業績一覧

### 1. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Onda, N., Oda, K., Okada, S., Kawana, Y., Nei, T., Takada, T., Toyoshima, S., Tsuchiya, A., Kondo, K., Yoshikawa, H., Tsutsumi, O., and Taketani, Y. : Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine*, 21:4256-4260, 2003.
- 2) Ogata, T., Kozuka, T., and Kanda, T. : Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 77: 9000-9007, 2003.
- 3) Kawana, K., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Kawana, Y., Matsumoto, K., Nakagawa, S., Onda, T., Kikuchi, A., Fujii, T., Kanda, T., and Taketani, Y. : Evidence for the presence of neutralizing antibodies against human papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata. *American J. Perinatology*, 20:11-15, 2003.
- 4) Enomoto, K., Enomoto, Y., Ishii, Y., Araie, M., and Kanda, T. : Genes up- or down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a. *BBRC*, 303:580-585, 2003.
- 5) Kukimoto, I., Elderkin, S., Grimaldi, M., Oelgeschläge, T., and Varga-Weisz, P. D. : The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding and assembly mediated by ACF. *Mol. Cell*, 13: 265-77, 2004.

## 遺伝子解析室

6) Kaizu M, Sato H, Ami Y, Izumi Y, Nakasone T, Tomita Y, Someya K, Takebe Y, Kitamura K, Tochikubo O, Honda M. Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype EV3 loop among subtype B framework. *Arch Virol*. 148:973-988, 2003.

7) Kaizu M, Ami Y, Nakasone T, Sasaki Y, Izumi Y, Sato H, Takahashi E, Sakai K, Shinohara K, Nakanishi K, Honda M. Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. *Virology*. 313(1): 8-12, 2003.

### 2. 和文発表

1) 森 清一郎、神田忠仁：遺伝子治療に用いられるウイルスベクター。臨床とウイルス、31 巻第 1 号、p3-12、2003 年。

## 11. 学会発表

### 1. 国際学会

1) Pumpradit W., Tomita Y., Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Sato H, Sawanpanyalert P. Neutralization Pattern of Plasma from HIV-1 Infected Thai Individuals against CRF01\_AE (clade E) Cloned HIV-1s Using Simple, Rapid, and Sensitive Plaque Neutralizing Antibody Assay. "Thai infectious disease society meeting" Hua-Hin beach, Thailand, 4-7 October, 2003.

### 2. 国内学会

1) Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Ono, F., Sata, T., and Kanda, T.: Systemic administration of

recombinant AAV-2 vectors in cynomolgus monkeys: organ-tropism and expression of transgene. 第 9 回日本遺伝子治療学会 (2003 年 7 月、東京)

2) 神田忠仁、川名 敬、尾崎さおり、榎本 裕：HPV がんの攻略。第 62 回日本癌学会総会 (2003 年 10 月、名古屋)

3) 神田忠仁、森 清一郎、竹内隆正、佐多徹太郎：アデノ随伴ウイルスベクターの体内動態。第 51 回日本ウイルス学会。ヒトパピローマウイルス 16 型キャプシド主構成蛋白質 L1 の変異解析。第 51 回日本ウイルス学会総会 (2003 年 10 月、京都)

4) 佐藤裕徳、富田宏美、横山勝：HIV-1 逆転写酵素のアロステリック調節機構の進化。第 51 回日本ウイルス学会総会 (2003 年 10 月、京都)

5) 久保嘉直、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：CD4-independent HIV-1 感染に対する cyclodextrin の阻害効果。第 51 回日本ウイルス学会総会 (2003 年 10 月、京都)

6) Kukimoto, I., Grimaldi, M., and Varga-Weisz, P.D.: The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding mediated by ACF. 第 76 回日本生化学会年会 (2003 年 10 月、横浜)

7) 松田昌和、千葉智子、佐藤裕徳、巖馬華、Lay Mint、柿沢淳子、濱武牧子、植田知幸、西澤雅子、杉浦互：相同組み換えを用いた CRF01\_AE 薬剤感受性の解析。第 16 回日本エイズ学会総会 (2003 年 11 月、神戸)

8) 横山勝、富田宏美、佐藤裕徳：HIV-1 逆転写酵素の核酸選択性制御と薬剤耐性の機構。第 16 回日本エイズ学会総会 (2003 年 11 月、神戸)

9) 緒方敏彦、神田忠仁：アデノ随伴ウイルス組み込み領域 (AAVS1) の insulator。分子生物学会 (2003 年 12 月、神戸)