

# 組換えウイルス・コアバンクの創設とその高度利用のための 基盤技術に関する研究

## I 試験研究の全体計画

### 1. 研究の趣旨

最近の組換え遺伝子工学の進歩発展に伴い、高発現能力を有し、広範囲な宿主に対して遺伝子導入が可能なウイルスベクターが注目を集めている。そして、将来のより改善された遺伝子治療のための組換えウイルスベクターの開発研究がこれに拍車をかけている。この組換えウイルスベクターを基盤とする組換え個体及び組換え体マテリアルの総算出数は年々増大の傾向を示し、近年では膨大な数にのぼっている。しかしながら、その安全性、生産性に関する審査規定は現在のところ皆無に等しい。更に、病原性、非病原性ウイルスの迅速な検出と対策は、医療分野では常時整備されていなければならない不可欠の技術である。また農林水産分野では、高い生産性を維持するため、動植物のウイルス感染を防ぐことは必須技術となってくる。これらの組換えウイルスの検出に関する比例対照となる「標準ウイルス」材料は生命科学の各分野で必要とされている。そこで、ウイルス粒子の収集、品質管理、保存、供給ができる「公的」なバンクを設立し、分子生物学、遺伝子工学を基盤とした組換えウイルス遺伝子の体系的な検出法を開発し、技術として確立していくことが急務である。

特に、組換えウイルス作成のための親株としての野生型ウイルス、組換えウイルス DNA、それらの感染細胞、ウイルス組換え導入細胞の収集・品質管理・保存・供給システムの構築、標準株の蓄積と安全管理体制の構築、インターネットの利用による遠隔地統合型バンク運営体制の構築を I のテーマとし、予想外に変異する組換えウイルス遺伝子の変異法則性の研究、組換え個体及び組換えマテリアル内での新規体系的検出システムの開発を II のテーマとして研究する。

### 2. 研究概要

現在、多種多様な組換えウイルスの開発は、バイオテクノロジー産業ではもはや必須の基礎技術として認知されている。それらを利用して算出された大量の組換え生物は、すでに官民を問わず斯界の研究室に広範囲に分布している状況にある。しかしながら、これら組換えウイルス個体、マテリアル内での変異組換え、再構成の規則性、及び体系的検出法の創出とそれを利用した組換えウイルスの多様性等の情報は全く整理されていない。遺伝子治療においては、使用したウイルスベクターに関する安全性試験は必須である。しかし、わが国で初めて実施された遺伝子治療の症例

では、わが国における法的バックアップ体制が不整備のため、ウイルスベクターの安全性試験は 100%米国の技術に頼らざるを得なかった。わが国には安全性試験の技術蓄積の基盤となる参照材料コレクションがないことも、その重要な原因である。更に、国内独自の技術によらず、外国の技術を用いる際に、高額な特許料を外国に支払うことになり、国内産業の推進を考慮すると、懸念すべき状況である。第一例が成功したため遺伝子治療がまさに普及しようとしている現在、それらの整備は焦眉の急である。遺伝子治療の場合に限らず、広く普及してしまっただ伝子組換え技術の産物の膨大さを考慮すれば、少なくとも参照コレクションのコアとなる「標準」及び組換えウイルス材料の整備は緊急に必要である。これが本プロジェクトでいう、ウイルス・コアバンクの創設である。

以上のように本研究開発では(1)組換えウイルス・コアバンク創設を目指し、その整備技術に関する研究とそれをバックアップするための(2)組換えウイルス・コアバンクの高度利用に関する研究より構成される。

#### 1. 組換えウイルス・コアバンク創設のための整備技術に関する研究

組換えウイルス、組換え細胞、組換え個体、組換えマテリアル及びそれらの遺伝子断片同定のための STS (Sequense Tagged Sites)/ETS (Expression Tagged Sites) マーカーの収集と保管、組換えウイルスデータベースの作成及び品質管理の技術に関する研究を行う。

##### (1) 組換えウイルス感染細胞の収集と保管に関する研究 (理化学研究所)

組換えウイルス感染細胞の材料収集と保管に関する研究を行う。

##### (2) 組換えウイルス親株、組換えウイルス粒子及び組換えウイルス DNA の収集と保管に関する研究 (理化学研究所)

本プロジェクトの期間中、理化学研究所ジーンバンク室に組換えウイルス・コアバンクを仮設置する。DNA 組換え体の原料となる野生型ウイルス、組換えウイルス、組換えウイルス DNA、それらの感染細胞、ウイルス組換え細胞を収集保存する。また、それらの遺伝子同定のための STS/ETS マーカーの収集と保管を行うと同時に、安定で品質の高い生物資源の管理技術の研究開発を行う。

##### (3) STS/ETS マーカーの検索と組換えウイルス改変技術に関する研究 (理化学研究所)

各ウイルス親株のゲノム DNA を STS/ETS マーカーは組換えウイルスの基準対象となる。そこで(A)各系統のウイルスに対する STS/ETS マーカーの収集を行い(B)まず寄託

された完全長，cDNA クローン化断片をアデノウイルス，レトロウイルス，アデノアソシエートウイルスベクターに組み込み，新規組換えウイルスベクターを作成する。更に，(C)プロモーター部位宿主特異的，臓器特異的プロモーターに置換し，発現特異的新規ベクターを構築する。また，各ウイルス遺伝子断片の変異及び組換え，置換による多様性を検索する SNPs 法を開発する。

(4) 組換えウイルス・データベースの作成（農林水産省生物資源研究所）

組換えウイルス及びウイルスベクター作成に使用される遺伝子断片を整理しその性状，変異箇所の多様性，変異頻度，高感度検出法等の情報に関してデータベースを作成しその品質管理を行う。

2. 組換えウイルス・コアバンクの高度利用に関する研究

組換えウイルス，更に組換えウイルスを用いて作成された組換え細胞や組換え動植物個体における変異株の体系的検出法の技術開発を行う。また，汎用されつつあるウイルスベクターを基盤として，簡便・迅速・高感度，低コスト化学を図るウイルス遺伝子検出法の技術開発を展開し，新規手法の構築を行う。また，新規組換えウイルスベクターの構築と宿主，臓器特異性を有する新規ウイルスベクターの開発を行うと同時にウイルスベクター遺伝子断片の変異の多様性を検索するシステムを開発する。

(1) 組換えウイルス遺伝子の高感度検出法に関する研究

組換えウイルス遺伝子の高感度検出法の研究開発及び変異置換の検定に関する新規手法を考案し，遺伝子治療のためのベクターの改変と新規ベクターの構築に関する研究開発を行う。

① アデノ，レトロ組換えウイルスの改変と変異検出法に関する研究（財 癌研究会癌研究所）

遺伝子発現能力が高く，最近，頻繁に遺伝子導入に使用されているアデノウイルス，レトロウイルスのベクターの改変とその標的細胞に対する生物活性，及び変異同定の検出法に関する研究開発を行う。

② DNA および RNA 組換えウイルス遺伝子の新規検出法に関する研究（厚生省国立感染症研究所）

ヒトパルボウイルス，ヘルペス群ウイルス（単純ヘルペスウイルス），水痘帯状疱疹ウイルス，サイトロガロウイルス，エプシュタインバールウイルス，ヒトヘルペスウイルス 6，7，8 型，ワクシニアウイルス，アデノウイルス，ポリオーマウイルス，パピローマウイルス，ヒトおよびサル免疫不全ウイルス等の組換えウイルス検出のための新規検出技術の開発を行う。

③ アデノ随伴組換えウイルスの改変とその組み込み機構に関する研究（自治医科大学）

アデノアソシエートウイルスベクターの発現効率・存在様式に及ぼす因子の解析を行うと同時に組み込み機構の解析を行う。

④ 組換えウイルスの細胞内動態に関する研究（日本医科大学）

組換えウイルスの挿入部位の同定，及びベクターの安定性，変異，組換えをはじめとする細胞内動態を明らかにするための高度検出法の研究を行う。

(2) 組換えウイルス感染細胞，感染個体の分子診断学的研究と体系的検出法の実証試験に関する研究

(1)で開発された各種の体系的検出法をもとに，研究最先端のいわば現場材料である標準化されていない組換えウイルス感染細胞，感染個体等から，高感度の遺伝子検出を試みる。組換えウイルスの中には宿主の染色体 DNA の中に挿入されずに保持されつづけるものもあるが，挿入され再編成をおこすものも多く，これら突然変異体をも検出する手法として，*in situ* hybridization 法や連鎖分析マーカーの研究開発を行いつつ，宿主染色体レベルでの挿入部位の座位の決定等も行い，体系的検出法の妥当性の検証（実証試験）を行う。その結果は随時，(1)の開発元にフィードバックされ，また SOP 作成過程にもフィードバックされる。

① 組換えウイルス臨床検体の新規分子診断法に関する研究（京都大学）

組換えウイルス臨床検体の新規分子診断法として自ら開発した RNA 診断の新規手法，インターカレーションモニタリング，PCR 法に更に開発し，高感度の分子診断法を進展させる。

② FISH 法と高精度バンディング法による組換えウイルスの分子診断法に関する研究（東京医科歯科大学）

各種組換えウイルス感染細胞において，ウイルス DNA 断片の宿主染色体 DNA への挿入部位の検索を行うため，高精度バンディング法と FISH 法の改良と新規開発研究を行う。

③ 組換え SIV ウイルス感染個体を利用した組換えウイルスの分子診断法に関する研究（厚生省国立感染症研究所）

SIV 感染及び組換え SIV ウイルス感染個体内での組換えウイルスの同定，検出を血液，各種臓器より行い，生体内での変異，組換えの法則性を明らかにする。

(3) 組換えウイルスの分子進化の数学的解析に関する研究（文部省国立遺伝学研究所）

ウイルスは元来，体内で増殖するが，その過程で遺伝子変異をおこす。予想外のウイルス感染の予防とワクチンの開発のため，ウイルス遺伝子変異データベースを設計する。このウイルス遺伝子の変異速度を数学的に解析し，生物の進化過程を明らかにする。例えばインターフェロン (IFN) 抵抗性を示す C 型肝炎ウイルスの遺伝子は特定の部位が変異しており，この塩基配列の変異と IFN 抵抗性は相関している。この変異速度を計算して変異部位を予測できるプログラムを開発し，将来の変異遺伝子検出・ワクチン開発等に役立てるための研究を行う。

(4) 組換えウイルス遺伝子の高感度検出法のバリデーショ



研究項目	平成10年度	平成11年度	平成12年度	平成13年度	平成14年度
③ 組換え SIV 感染個体を利用した組換えウイルスの分子診断法に関する研究	SIV の分子診断法の研究開発				
	SIV 組換えウイルスの作成とその感染性の検証				
	高感度組換えウイルスの体系的検出法の開発				
(3) 組換えウイルスの分子進化の数学的解析に関する研究	各ウイルス遺伝子分子進化同定法の開発		モデル個体を利用した分子進化の実証と検定		データベース化とウイルスデータベースへの挿入
(4) 組換えウイルス遺伝子の高感度バリデーションとその SOP に関する研究	ウイルス検出のため新規手法の開発とその評価試験の実際			SOP による評価	SOP プロトコールの作成とデータベース化
所要経費 (合計)	188 百万円				

## II 平成10年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 組換えウイルス・コアバンク創設のための整備技術に関する研究		
(1) 組換えウイルス感染細胞の収集と保管に関する研究	理化学研究所	大野 忠 夫
(2) 組換えウイルス親株, 組換えウイルス粒子及び組換えウイルス DNA の収集と保管に関する研究	理化学研究所	村田 武 英
(3) STS/ETS マーカーの検索と組換えウイルス改変技術に関する研究	理化学研究所	横山 和 尚
(4) 組換えウイルス, データベースの作成	農林水産省農業生物資源研究所	鶴川 義 弘
2. 組換えウイルス・コアバンクの高度利用に関する研究		
(1) 組換えウイルス遺伝子の高感度検出法に関する研究		
① アデノ, レトロ組換えウイルスの改変と変異検出法に関する研究	(財)癌研究会癌研究所	濱田 洋 文
② DNA および RNA 組換えウイルス遺伝子の新規検出法に関する研究	厚生省国立感染症研究所	小島 朝 人
③ アデノ随伴組換えウイルスの改変とその組み込み機構に関する研究	自治医科大学	小澤 敬 也
④ 組換えウイルスの細胞内動態に関する研究	日本医科大学	島田 隆
(2) 組換えウイルス感染細胞感染個体の分子診断学的研究と体系的検出法の実証試験に関する研究		
① 組換えウイルス臨床検体の新規分子診断法に関する研究	京都大学	上田 國 寛

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
② FISH法と高精度バンディング法による組換えウイルスの分子診断法に関する研究	東京医科歯科大学	池内達郎
③ 組換えSIV感染個体を利用した組換えウイルスの分子診断法に関する研究	厚生省国立感染症研究所	向井鏡三郎
(3) 組換えウイルスの分子進化の数学的解析に関する研究	文部省国立遺伝学研究所	五條堀 孝
(4) 組換えウイルス遺伝子の高感度検出法のバリデーション(評価試験)とその標準化(SOP)に関する研究	(株)ジャパンエナジー	阿部慎一郎
3. 研究運営	理化学研究所	横山和尚

### Ⅲ 運営委員会

委 員	所 属
○横山和尚	理化学研究所 ジーンバンク室副主任研究員
阿部慎一郎	(株)ジャパンエナジー 主席研究官
天沼宏	理化学研究所 細胞分子研究室主任研究員
池内達郎	東京医科歯科大学 助教授
上田國寛	京都大学 化学研究所教授
鶴川義弘	農林水産省 農業生物資源研究所 DNAバンク科長
大野忠夫	理化学研究所 ジーンバンク室長
小澤敬也	自治医科大学 教授
小島朝人	厚生省 国立感染症研究所室長
五條堀孝	文部省 国立遺伝学研究所教授
島田隆	日本医科大学 教授
鶴尾隆	東京大学 分子細胞生物学研究所教授
濱田洋文	(財)癌研究会 癌研究所分子治療部長
向井鏡三郎	厚生省 国立感染症研究所主任研究員
村田武英	理化学研究所 ジーンバンク室研究員

(注：○は運営委員長)