

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、遺伝子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、遺伝子組換えウイルス DNA、それらの感染細胞、遺伝子組換えウイルス導入細胞の収集・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世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普及し始めている現在、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けでなく、遺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、組換えウイルス・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)遺伝子組換えウイルス・コアバンクの高度利用に関する研究より構成される。

[大項目]

「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」

[中項目]

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

遺伝子組換えウイルス、遺伝子組換え細胞、遺伝子組換え個体、遺伝子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 (Se-quence 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。

[小項目]

(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)

ウイルス組換え体細胞 (細胞染色体内に組換えウイルス遺伝子が組み込まれたもの) と組換えウイルス感染細胞 (感染後も安定な細胞形態を維持しながら細胞染色体内に組換えウイルス遺伝子が組み込まれていないもの) の収集、受入検査を行い、生産、品質管理検査、保存、分譲の各ステップで必要な SOP を整備して行く。

(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，それらの組換え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。

保存用薬剤存在下で凍結保存した組換えウイルスの感染効率，及び，遺伝子発現効率より最適保存条件のクリーニングを行う。データ入力中の組換えウイルスデータフォーマットの改良を行う。又，プロモーター部分を改変し，宿主特異的，臓器特異的，新規ベクターを構築する。

(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）

組換えコアバンク創設のための各系統ウイルス親株，変異株及び遺伝子組換えウイルス株の DNA に対応した STS/ETS マーカーの検索と収集を行う。STS/ETS マーカーの同定のための連続的プライマースキャンニング法の研究開発，及び遺伝子組換えウイルス株の変異，組換え点の同定のためのシーケンスキャンニング法の研究開発を行う。その他，理化学研究所・ジーンバンク室・DNA 開発銀行に委託された完全長，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，汎用の多い癌，発生，老化，分化，アポトーシス，細胞周期，免疫，神経の各分野で，代表される遺伝子クローンの遺伝子組換えウイルス化を行う。

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入力フォーマットの設計を完了し，既存のインハウスデータを用いて試験データの入力と，入力プログラムの動作確認を行う。既存の関連データベースを参照しデータベースに必要な，閲覧，検索システムについて調査を行い，それに基づき，データ構築部ソフトウェアの設計をシステムエンジニアを使って行う。

[中項目]

2. 組換えウイルス・コアバンクの高度利用に関する研究

遺伝子組換えウイルス，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，新しい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。

[小項目]

(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。

細胞増殖，腫瘍抑制，アポトーシス，細胞周期などに関連した遺伝子ならびにその変異体遺伝子を発現する組換えアデノウイルス又は，レトロウイルスを作成する。アデノウイルスに関しては，ヒトアデノ S 型の野性型の他，ファイバー変異型，ヘキソン変異型，ペントンベース変異型，制限増殖型などの変異株を作成する。

又，これらの免疫原性について検討すると予期不可能な変更の高感度検出法に関してもその開発を行う。

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（AAV）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。

AAV ベクターで組み込まれた遺伝子の PCR 法による高感度検出を ITR（inverted terminal repeat）領域に設定した primer を用いた long PCR や nested PCR を利用して行う。得られた DNA 断片はダイレクトシーケンスを行い，変異等の有無の解析する。AAVSI 特異的外来遺伝子組み込み法（TVI 法）による外来性遺伝子導入部位の解析を FLSH によりマッピングする。アデノウイルス部位を組み込んだ AAV ベクターの作製及びその AAV ベクターの作用の検討，E4orf6 及び E1b は協調して，2 本鎖合成を促進すると考えられるので，これらを組み込んだ AAV ベクターを作製する。

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。

変異、組換えをはじめとする病原性ウイルスの出現しない組換え HIV ベクターが CD4⁺ 細胞に特異的に高率で感染する事を明らかにすると共に HIV ベクターにより非分裂期のリンパ球、マクロファージへの遺伝子導入の可能性について検討する。HIV ベクターが感染体に組み込まれた細胞株を樹立し、その挿入部位の構造解析を行う。AAV ベクターについても同様の解析する。

(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発展させる。

更に、特異的配列へのインターカレーションで、蛍光強度が増強する蛍光色素の選定とプローブ内の標識位置が発蛍光に及ぼす影響を解析する。PNA（ペプチド核酸）による常温ハイブリッド法の開発も行う。

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（ファイバー-FIAH）と新規開発研究を行う。

アデノ随伴ウイルス（AAV）感染細胞や AAV をベクターとして外来遺伝子が導入されたヒト細胞を試料に、ウ

イルス DNA の宿主染色体への挿入部位を FISH と高精度バンディングとの併用法により同定する。

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。

アジア産マカク属サル、特にカニクイザル、アカゲザル、ブタオザルはオンコウイルス亜科に属する TypeD レトロウイルスに自然感染しており、SIV と同様の免疫不全状態を引き起こす。血清学的に陰性でも潜伏感染している個体が存在する事、同じレトロウイルスである SIV と組換え体ウイルスを体内で形成する可能性がある。サルエイズウイルス感染初期、中期、末期、長期感染生存ザルの血液、各臓器から SIV ウイルス遺伝子を RT-PCR、PCR 法を用いて検出し、その Quasi-species の解析を通じて感染個体内での組換え体の検出を行う。

(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。この様な予想外の突然変異に起因するウイルスの性質の変化はウイルスの感染予防、ワクチン開発によって重要な問題となる。突然変異の起こるパターンを予測をウイルス遺伝子変異データベースをもとに作成し、そのデータを分子進化的に解析する事によってウイルスの進化パターンを明らかにする。不測の感染などの自己の防止を目指すと共に、ワクチンの開発を支援する事を目的としたシステムの開発を目指す。各種ウイルス遺伝子の多重配列データベースを作成し、その分子系統樹を作成する。そして、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。

(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

技術的成熟化を促進するため、発売元とは異なる研究施設による、組換え体ウイルス遺伝子の新高感度検出法のバリデーション（評価試験）を行う。その結果は随時開発元にフィードバックされ、確定し、標準化されたプロトコール（Standard Operation Procedure, SOP）の作成に関する研究を行う。モデル実験をして、ヒト C 型肝炎ウイルスを対象として、SOP を作成する。

3. 年次計画

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
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	← ウイルス、標準株及び組換え細胞の収集と品質管理 →		組換えウイルス株の収集と STS/ETS マーカーの収集と情報の整理		
(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				組換えウイルスデータベースの公開と情報交換	
(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	← 完全長寄託 cDNA を利用した新規ウイルスベクターの作成 →			← 取りまとめデータベース化 →	
	← 新規組換えウイルス作成、発現特異的ベクターの構築 →			← データベース化 →	
	← 汎用ウイルスベクターの STS/ETS 化の評価研究 →			← STS/ETS の多様性検定のため SNP 法の開発 →	
	← 組換えウイルスデータベースの基本設計と管理保管に関する研究 (変異置換, 性状等) →			← ネットワーク構築 →	
(4) 組換えウイルスデータベースの作成と品質管理に関する研究				(1, 2 の成果の取りまとめのデータベース化及びネットワーク構築)	
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	← 各種アデノ組換えウイルスの作成 (細胞増殖, 癌アポトーシス etc) →			← データベース化 →	
	← アデノキャピドタンパクの変異同定、制限増殖型アデノウイルス変異体の作成、左記ウイルスの生物活性 →			← データベース化 →	
② DNA 及び RNA 組換えウイルス遺伝子の新規検出法に関する研究	← 各種ウイルスの高感度同定法のための新規技術の開発 →			← 各種ウイルスの変異点の同定 →	
				← 変異検出法のデータベース化 →	
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	← AVV ベクターの挿入部位の分子生物学的解析 →		← AVV ベクターの遺伝子治療のための改変 →		← AVV ベクターの有効性のデータベース化 →
④ 組換えウイルスの細胞内動態に関する研究	← HIV ベクターの細胞株より挿入部位クローニングと解析 →		← 遺伝子治療のためのベクターの安定性の解析 →		← ベクターの細胞内動態の解析 →
					← 局在性, 安定性, ベクターの保持に関するデータベース化 →
(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に関する研究	← IM-PCR の臨床検体への適用と蛍光プローブの開発 →		← PNA 法と挿入特異配列の決定 →		← in situ LCR 法、クロマチン構造の解析 →
	← FISH 法による宿主染色体への組み込み同定と安定性の研究 →		← 2色ファイバー FISH の開発 →		← RNA 増幅法挿入配列の不安定要因の解析と安定化を標的とするウイルス配列のデータベース化治療薬の開発 →
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					← 各種組み込みウイルスの同定 →
					← 分子診断染色体レベルのデータベース化 →
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補入 →
(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)	152 百万円	158 百万円			

II 平成11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	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
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
鷗 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 鏝三郎	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)