

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

2000年6月にヒトの全ゲノム遺伝子構造の概要が決定され、2001年2月にその全塩基配列が公表された。今後この情報を基にしたポストゲノムに学問の関心が集まると思われる。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の研究開発もその代表的なプロジェクトのひとつである。近年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、現在までに膨大な数にのぼってきている。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法の開発と対策は、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にもかかわらずこの分野は極めて遅れている。

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。これらの遺伝子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ていく事が急務である。本研究は、このような状況を鑑み、第I期においては2つのテーマを柱に研究を推進してきた。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、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を推進し、先導的な成果を上げてきた。さらに、Iのテーマの組換えウイルスコアバンクの創設を推進するために実質的かつより実践的な研究技術開発を推進する必要性を第I期の反省として強く感じた。こうした第I期の成果と反省をふまえ、第II期においては、クオリティ・マスを達成させるための①新規材料の開発 ②品質管理及び安定性検定の技術開発 ③データベースの公開を目標に300株以上の組換えウイルス株の作成のみならず、「品質」に重点を置いたバンクの創設がなされる。第IIグループの高度利用に関する研究部門は組換えウイルスの作成、バン

ク業務のための新規材料開発につながるもののみを選別した。ここで開発された研究成果は直接バンクへ改変組換えウイルス株や、感染細胞として寄託される。また、その方法論はStandard Operation Protocol (SOP) 化され、データベースに組み込まれ、公開されていく。以上の観点より第II期はアデノ、レトロ、AAV、HIVを重点化し、応用研究開発およびこれらの成果を抽出したSOP作成、変異予測を含めた組換えウイルスのデータベース開発を目標に研究を行う。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、組換えウイルス、およびDNAそれらの感染細胞、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、組換えウイルスの改変とその動態、特に宿主との相互作用に関する研究開発をIIのテーマとして研究を推進する。

2. 研究概要

現在、多種多様な遺伝子組換えウイルスの開発は、バイオテクノロジー産業及び医薬産業では、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に関する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。又、遺伝子治療の場合に限らず、広く普及してしまった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」及び遺伝子組換えウイルス材料の整備は緊急に必要である。標準化された品質管理の行き届いた組換えウイルス株の提供が必要である。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)遺伝子組換えウイルス・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。

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 (Sequense Tagged Sites) / ETS

(Expression Tagged Sites) マーカーの収集と保管, 組換えウイルスの品質管理技術, 特に遺伝子の変異検出と変異頻度の定量化, および組換えウイルスの分子検出に関する研究を行う。また, 組換えウイルスデータベースの整備を行い一般公開し, 情報の交換を行う。

(1) 組換えウイルス資源の開発と保存及びその安定性に関する研究(理化学研究所)

動植物のDNA組換え体の原料となる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の保存, 検出や品質管理の標準化と普及に資するため, 収集・受入検査・生産・品質管理検査・保存・分譲の各段階に関わる技術の開発・改良に関する研究を行う。また, 班内に向けた遺伝子材料の提供のために組換えウイルス親株, 組換えウイルス粒子, 組換えウイルスDNAおよびそれらの遺伝子断片同定のためのSTS/ETSマーカーの収集, 保管および分譲を行い, 組換えウイルス・コアバンクの仮開設を行う。第I期では組換えウイルス感染細胞31株, アデノウイルス標準株29株, 組換えアデノウイルス91株, 組換えアデノウイルス作製用コスミドベクター107株, 組換えレトロウイルス産生用ベクター49株, アデノアソシエートウイルスベクター3株, 組換えアデノウイルス作製用コスミドベクター及びデータ登録中のもの130株を作製してきた。さらにこれを発展させ, クリティカル・マスを目指す。さらに安定性に関しては組換えウイルスの取り扱い中の安全性, すなわち適切な廃棄処理を行うために, 組換えウイルスの失活条件を検討する。他の研究班で作出された新規の組換えアデノウイルスベクター(ファイバー変異体)について保存条件および失活条件を検討し, 保存技術および安全性確保に応用する。さらに, 複製可能なウイルスの検出法も検討する。これまでに, 寄託を受けた遺伝子材料のうち品質検定を終了し公開可能となった材料から, 順次, その遺伝子材料情報を組換えウイルスデータベースで公開するとともに組換えウイルスコアバンクを仮開設し試験分譲作業を開始する。

(2) 組換えウイルスの変異検出法の開発に関する研究(理化学研究所)

第I期, 第II班で行われたDNA及びRNA組換えウイルス遺伝子の新規検出法の開発は, 差異点が未知の組換えウイルスの変異の検出には適用できなかった。この点を解決するための方策を重点化する。本年度は, 組換えウイルスの変異点の新規検出法の開発を行う。また, 組換えウイルスDNAを用いた変異頻度の定量化の技術開発を推進し, 組換えウイルスの安定性を検討して, 高感度変異検出技術の構築を目指す。例えば, 変異点が未知のものを高感度に検出する手法として, まず試験管内で組換えウイルスDNA及びRNAを使用した変異検出スクリーニング法を開発し, 比較検討する。さらに組換えウイルスの変異頻度を現在遺伝子治療が行われている癌抑制遺伝子p53を使用して行う。

第I期までに, 新規のp53の変異点を同定してきたので, これを使用して, リアルタイムPCR法で変異の検出の感度を査定する。

(3) 組換えウイルスの分子検出法の開発に関する研究(京都大学)

第I期において新規分子診断法として自ら開発したRNA診断法を組換えウイルス感染細胞に適用し, 実用化を目指す。IM-PCR法(インターカレーションモニタリングPCR法), 生体試料からの直接PCR法, in situ PCR法, PNA(ペプチド核酸)による遺伝子検査法の開発, TRC(転写, 逆転写反応の組み合わせ) INAF(発蛍光クローブ)による検出法を検討し改良を加える。

(4) 組換えウイルスデータベースの作成と整備技術に関する研究(独立行政法人農業生物資源研究所)

利用価値の高い組換えウイルスデータベースを構築するため, 遺伝子材料情報の調査・検討, データベースの入力項目の選定, 構造決定および入力フォーマットの作成等を平成11年度までに実施してきた。平成12年度は, さらにデータベーススキーマの設計, 入力プログラムの開発を重点的にすすめるとともに, 作成したプロトタイプ組換えウイルスデータベースにアデノウイルスとレトロウイルスの遺伝子材料情報を入力し, 研究者に試験的に公開した。平成12年度に作成した入力フォーマット, データベース構造に基づき, 平成13年度は, 遺伝子材料情報としてアデノ随伴ウイルスとHIVウイルスの情報を収集し, 入力, 整備する。また, 各ウイルスの標準取り扱い手順(SOP)の作成と整備を実施する。さらに, 文献情報, その他のプロトコル情報等の一般情報についても収集し, 整備する。また, 必要に応じて第3期で作成したデータベースの見直し, 改良を行う。

2. 組換えウイルス・コアバンクの高度利用に関する研究

(1) 組換えウイルス・コアバンクの高度利用に関する研究

組換えウイルスと宿主細胞との相互作用を分子レベルで理解し, これらを改変することにより, より特殊化された宿主に感染域を持つ組換えウイルス, 感染性や持続性の高い組換えウイルス株, 臓器特異性を有する組換えウイルスを構築する。ここで開発された研究成果は, 直接バンクへ遺伝子資源として, 情報として寄託され, データベース化される。

① 組換えアデノウイルス遺伝子の改変と宿主との相互作用に関する研究(札幌医科大学)

第I期までに, 細胞増殖, 腫瘍抑制関連遺伝子群, アポトーシス関連遺伝子群, 細胞周期関連遺伝子群, 制限増殖型アデノウイルス, キャプシド変異アデノウイルス, を作製し, これらを用いて生物活性を解析してきた。これらの改変型組換えアデノウイルス株は特に世界的成果として注目される。第II期は新規にファイバー変異型アデノウイルスベクターを単鎖抗体, ペプチドガンドを用いて作成したり, キャプシド蛋白変異株も作成する。また, これらの生

物活性の検討、最適な宿主細胞株を樹立する。さらに高い力価のウイルスを効率よく得られるシステムを作り、バンク業務に役立てる。平成13年度は、従来のベクターよりはるかに標的選択性の高い新規ファイバー変異型アデノウイルスF-40/STAA並びにアデノウイルスの宿主域を修飾できる単鎖抗体を樹立する事を目指す。

② 組換えレトロウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究（理化学研究所）

個体に存在する多種多様な細胞のうち特定の細胞種にのみ遺伝子導入が可能で、マウスレトロウイルス由来のレトロウイルスベクター（標的レトロウイルスベクター）を開発する。このようなベクターは目的の細胞にのみ遺伝子導入することでベクターとしての有効性、安全性を飛躍的に高めるものである。またレトロウイルスベクターの個体への直接投与の可能性をもたらす。EGF受容体もしくはCXCR4（CXCケモカイン受容体4）を過剰発現するヒト細胞に特異的に遺伝子導入可能なマウスレトロウイルスベクターを開発する。

③ 組換えアデノ随伴ウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究（自治医科大学）

第I期では組換えAAVベクターの高感度検出法として、ベクター部分を使用した手法とNested PCR法を組み合わせ成功させた。また、AAVベクターで導入した遺伝子の発現を促進するため、 γ 線照射、トポソメラーゼの阻害剤を用いた。さらに部位特異的組み込み法としてRepをコントロールする方法を開発した。これらの成果をふまえて、第II期ではさらにベクター作製法の改良を加える。AAVベクターによって遺伝子導入が可能な臓器組織に関して、各々に最適な発現を得るためのベクター構築を検討する。さらには、AAVベクターを用いて導入した遺伝子の検出法の改良をはかると共に遺伝子D購入を行った動物における宿主側因子の変化を検索する。また、肝臓及び骨格筋に対して遺伝子導入、発現の良好なベクター構築につき、キャプシド及びプロモーターの点から検討する。第I期で行ったAAVベクターで導入した遺伝子の検出法について、さらに改善あると共に、AAVによる遺伝子導入を行った動物個体レベルでの免疫反応などにつき検討する。

④ 組換えHIVウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究（日本医科大学）

第I期では病原性ウイルスの出現しない組換えHIVベクターのパッケージング方法を確立し、また、HIVベクターの安全性を検証するためにHSV-TK遺伝子を使用し、10%以上の癌に変異が生じていることを明らかにした。導入遺伝子において変異が集中する領域が認められたことから、何が変異を引き起こしたのかを明らかにすることを試み、さらに変異頻度の低い遺伝子導入法の開発を目指す。遺伝子変異の発生機構を調べるために、異なる遺伝子を有するベクターを作製し、変異の種類や頻度を検討する。また、

これまでに得られた実験結果及びレトロウイルスに関するデータベースをもとに、変異予測シュミレーションシステムの確立を試みる。変異を起こす主要な原因と考えられる逆転写の過程を含まない遺伝子導入法として、レトロウイルスゲノムを組み込んだハイブリッドアデノウイルスベクターを作製し、遺伝子組み込みの効率及び変異頻度を調べる。さらに、プロウイルスDNAを合成し、インテグラーゼ発現ベクターあるいは精製インテグラーゼと組み合わせた新規の遺伝子組み込み型合成ベクターの開発を進める。

(2) 分子進化を基盤とした組換えウイルスベクターの変異予測に関する研究（国立遺伝学研究所）

ウイルスの高変異性のメカニズムの理解は、組換えウイルスの利用においても、安全性および効果の維持という観点から重要である。本研究ではこれまでに、分子進化学的手法及び生命情報科学的なアプローチを用いてウイルスの進化パターンを明らかにするためのデータベースの整備と方法の開発を進めてきた。今期はこれらの方法を実際のウイルスベクター候補ウイルスに応用し、（アデノウイルス、AIDSウイルス等に応用し）その変異性をモデル化するとともに、データベース、および解析システムの実用化を進めベクター開発グループとの連携をはかる。基本データとなるウイルス遺伝子配列の収集とデータベース化を継続して行う。これらのデータを用いてウイルスの分類毎の進化速度、進化パターンの推定とデータベース化を継続して進める。これらのデータは統合組み換えデータベースの一部として提供されることになる。また、蓄積されるデータを用いてウイルス遺伝子進化パターンを抽出する方法の開発・評価をおこなうとともに、これらのデータをベクター開発グループに提供することにより、HIV、アデノウイルスなどの推定変異パターンの検証と遺伝子内可変領域の推定結果の応用への利用を目的とした情報提供システムの構築をすすめる。

(3) 組換えウイルス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（東邦大学）

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進行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、理化学研究所のグループが開発した検出法を(1)ヒトアデノウイルス感染細胞を対象として、SOPを作成する。次に、日本医大グループのHIV組換えウイルスの検出法のバリデーションとその標準化の検討を実施する。理化学研究所のグループで同定されたアデノウイルスベクターのSTS/ETSのうち、一部のものはPCR反応で不適切なバンドや、増幅されなかったりするプライマーの組み合わせがあったので、この点を改良し、最適化を図り、再現性と定量性のあるSOPの作成を行う。さらに、日本医大のグループで検討中の組換え

アデノウイルスと組換え HIV ウイルスの高感度検出法のバリデーションとその標準化を開始する。

3. 研究推進の方策

第Ⅰグループは第Ⅱグループの基盤研究の上に成り立っており、組換えウイルス株の作製、そのバンク業務のための品質管理技術、新規材料開発、変異検出技術、安全性検定法の開発につながるものであり、一体化している。第Ⅱ期では、比較的遺伝子導入技術開発がよく行われているアデノウイルス、AAV、レトロウイルス、HIVに重点化し、応用研究開発及びこれらの成果を抽出するSOP作成、そしてデータベース開発が主流となることを重点項目にした。これらの目的にそぐわないグループは、第Ⅱ期に除くか大幅な方法論の変更を行った。以上より、全ての成果が理研

の組換えウイルスバンクに組み入れられる様な体制をとった。例えば各種改変組換えウイルスは札幌医大、日本医大、自治医大と理研が、変異予測の遺伝研は理研、日本医大と連携を保って研究を推進する。さらに、組換えウイルスの作製法、検出方法は東邦大学により標準化されSOPとして完成される。これらは、各組換えウイルスの情報に一体化、データベースに取り入れることを農水省資源研を中心に遺伝研、理研が協力して行う。以上より、各グループ間の連携を保ち本研究を進める。さらに、毎年ウイルス研究会を開催し、日本の各バンク関係者の意見をまとめ活性化させる。成果の普及は、インターネットを介して世界に広がるだけでなく、文書としても総説として特集を組み、学術誌をはじめとして公開する予定である。

4. 年次計画

研 究 項 目	13 年 度	14 年 度
1. 組換えウイルスバンク創設のための整備技術に関する研究		
(1) 組換えウイルス資源の開発と保存及びその安定性に関する研究	組換えウイルスの作成とデータベースの公開化 安全評価試験	ウイルスコアバンクの仮設置 データベース化
(2) 組換えウイルスの変異検出法の開発に関する研究	変異頻度定量化と新規変異法の開発	データベース化
(3) 組換えウイルスの分子検出法の開発に関する研究	感染細胞を利用した検出法の実証試験	データベース化 SOP化
(4) 組換えウイルスデータベースの作成と整備技術に関する研究	HIV, AAV データベース SOP と Tip のデータベース化	データベースの公開と情報交換
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改変及びその動態		
① 組換えアデノウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	改変組換えアデノウイルスの作成と SOP 化	データベース化
② 組換えレトロウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	改変組換えレトロウイルスの作成と SOP 化	データベース化
③ 組換えアデノ随伴ウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	改変組換え AAV ウイルスの作成と SOP 化	データベース化
④ 組換え HIV ウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	改変組換え HIV ウイルスの作成と SOP 化	データベース化
(2) 分子進化を基盤とした組換えウイルスベクターの変異予測に関する研究	HIV, Ad, AAV 等の変異予測プログラムの開発	データベースの公開と情報交換
(3) 組換えウイルス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	Ad, HIV 検出法の SOP 化と TIP の評価試験	SOP のデータベースへのトランスファー
3. 研究運営		
所 要 経 費 (合 計)	154 百万円	

II 平成13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) 組換えウイルス資源の開発と保存及びその安定性に関する研究	理化学研究所	村田 武英
(2) 組換えウイルスの変異検出法の開発に関する研究	理化学研究所	横山 和尚
(3) 組換えウイルスの分子検出法の開発に関する研究	京都大学	上田 國寛
(4) 組換えウイルスデータベースの作成と整備技術に関する研究	独立行政法人農業生物資源研究所	長村 吉晃
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改変及びその動態		
① 組換えアデノウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	札幌医科大学	濱田 洋文
② 組換えレトロウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	理化学研究所	天沼 宏
③ 組換えアデノ随伴組換えウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	自治医科大学	小澤 敬也
④ 組換え HIV ウイルスの改変と宿主との相互作用に関する研究	日本医科大学	島田 隆
(2) 分子進化を基盤とした組換えウイルスベクターの変異予測に関する研究	国立遺伝学研究所	五條堀 孝
(3) 組換えウイルス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	東邦大学	小林 芳郎
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 遺伝子材料開発室長
天沼 宏	理化学研究所 分子細胞生物学研究室主任研究員
上田 國寛	京都大学 化学研究所教授
小澤 敬也	自治医科大学 教授
五條堀 孝	国立遺伝学研究所 教授
小林 芳郎	東邦大学 教授
島田 隆	日本医科大学 教授
長村 吉晃	独立行政法人農業生物資源研究所 DNAバンク科長
濱田 洋文	札幌医科大学 教授
村田 武英	理化学研究所 遺伝子材料開発室研究員

(注：○は運営委員長)