

# 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

研究代表者：横山 和尚（理化学研究所）

## I 試験研究の全体計画

### 1. 研究の趣旨

ヒトの全ゲノム構造の概要が明らかにされ、世は、ゲノム情報をもとにした創薬開発が華やかになり、構造生物学を主体としたプロテオミクスの時代に突入した。又、最近ではナノテクノロジーや幹細胞生物学等の分野で新技術が開発されてきている。遺伝子導入を目的とした次世代ベクター開発や遺伝子治療も将来最も期待される分野である。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その対策は、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、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いる。これらの組換えウイルスの検出時に、比例対照となる「標準ウイルス」材料が必要とされている。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の開発を推進することが急務である。

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。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、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。まずクオリティ・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を行

う。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みに限定した。特にアデノウイルス、レトロウイルス、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。即ち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。

本年度は本研究課題の最終年度であり、「組換えウイルス・コアバンク」の創設を行うための最後の整備、管理項目に主眼をおく。SOPの作成・改良と組換えウイルス株の調整プロトコル等を整備し、仮公開したデータベースを更に充実させる。そして来年度の本格分譲に備え万全の対策を練ることを目標にする。

### 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することが必要である。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

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、及び組換えウイルスの分子検出に関する研究を行う。又、組換えウイルスデータベースの整備を行い一般公開し、情報の交換を行い、本格運用のための体制を整える。

### (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。現在までに組換えアデノウイルス 257 株、組換えアデノウイルス作製用コスミド 445 株、組換えレトロウイルス産生用ベクター 49 株、組換え AAV 作製用プラスミドベクター 3 株、クローン化ウイルス遺伝子断片 33 株、アデノウイルス野生株並びに分離株 32 株を保存した。昨年の組換えウイルスコアバンクの仮開設を本運用に切り替えるための準備を行う。組換えアデノウイルス作製の手順書の見直し、遺伝子材料の検証を行いデータベースの品質の改良を行う。品質管理では、自律増殖可能アデノウイルス (RCA) を検出するための PCR による検出方法の SOP の改訂作業を行う。分譲業務は「組換え DNA 実験指針」「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行う。更に、組換えウイルスデータベースの入力及びメンテナンスを農水省より引継ぎ、本プロジェクト終了後の体制に備える。

### (2) 組換えウイルスの変異検出法に関する研究 (理化学研究所)

昨年に続き組換えウイルスの変異点の新規検出法の開発を行う。又、組換えウイルス DNA を用いた変異ウイルス DNA の定量化の技術開発を推進し、高感度変異検出技術の構築を目指す。変異点が他の方法で判明している場合は、「Taq Man」5'-nuclease 法を用いて組換えアデノウイルスアデノウイルス調製時に野生株に対してどのくらいの割合の変異株が検出できるかを癌抑制遺伝子 p53 を例にとり解析する。更に変異点が未知の変異の同定も蛍光標識ヌクレチドを使用した新規の手法 (ダイターミネーターインコーポレーション法) を開発し、その有効性を検定する。

### (3) 組換えウイルスの分子検出法に関する研究 (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 (PNA-CSA 法) の開発、TRC (転写、逆転写反応の組み合わせ) INAF (発蛍光プローブ) による検出法を検討し改良を加える。これと並行して、各検査法のマルチプレックス化を行い、総合的な分子診断システムの構築を目指す。

### (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 (微生物資源研究所)

各ウイルスの標準取扱手順書 (SOP) の作成と整備を更に推し進める。特に第 II グループで開発されたプロトコル集の情報をデータベースに入力し、更に品質を高める。組換えウイルスのデータベースの一般公開及び組換えウイルスコアバンクの創設に向けた取り組みとしては、ユーザーが使いやすいデータベース及びウェブページ (ホームページ) を目指して、ウェブ機能の充実化 (メタタグの挿入、検索機能の追加、リンクサイト集、ウェブ画面の再検討等)、データ更新機能の整備等を実施する。

## 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あるいは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 (札幌医大)

平成 13 年度までに作成し、生物活性の検討から有用性の確認された新規のアデノウイルスベクター F-RGD などに関して、下記の(A)–(D)の方法を組み合わせることでその生物活性を検討する。

(A) アポトーシス関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、薬剤感受性遺伝子などを高発現するアデノウイルスベクターを用いて、アポトーシス耐性の分子メカニズムを解析する。

(B) E1 部分欠失アデノウイルスが、腫瘍細胞に対して比較的特異的に強い増殖を示すことを利用して、p53・p16/Rb などの腫瘍抑制遺伝子に変異を持つ腫瘍細胞特異的な遺伝子導入ベクターを開発する。

(C) 自殺遺伝子導入療法やサイトカイン遺伝子導入による免疫強化療法などの腫瘍に対して細胞傷害を得る手段を組み合わせた効果的な治療ベクターを開発する。特に、免疫強化療法に関しては、以下の(D)に述べるような組織標的性の高い神経幹細胞移入などと組み合わせることによって、局所に適切に治療分子を発現させ、安全性と特異性を高める。

(D) 間葉系幹細胞や神経幹細胞などの組織標的性の高い正

常細胞をベクターのキャリアーとして用いるミサイル療法的な細胞投与療法の基礎的な検討を行う。

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）

平成13年度の研究成果を基盤に以下の研究を実施する。1) SDF-1 $\alpha$ をリガンドとした挿入型キメラ Env 標的レトロウイルスベクターに関し、リガンド-受容体間相互作用とウイルスベクターの細胞内侵入との直接共役を確認する。このために、SDF-1 $\alpha$ キメラ Env に各種1アミノ酸変異を導入し、CXCR4 特異的遺伝子導入能を調べる。2) CXCR4 特異的遺伝子導入の効率は同種指向性遺伝子導入の効率の1/100程度である。この効率を高めるために、SDF-1 $\alpha$ キメラ Env を Env として持つ自己複製可能なウイルスを作製し、ウイルス増殖過程におけるランダムな変異によって生じる細胞侵入効率の良いキメラ Env 遺伝子を回収する。3) 低濃度の可溶性 SDF-1 $\alpha$ によって細胞を前処理すると、阻害ではなく、逆に、SDF-1 $\alpha$ キメラ Env ベクターの CXCR4 依存的遺伝子導入を促進することを見出している。この機構を解明する。以上より標的細胞種特異的遺伝子導入ベクターの開発を目指す。

③ 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）

AAV ベクターに関して以下の点を重点化して開発研究とする。(A)樹立したパッケージング細胞株について、より良いベクター産生効率を目指した改良を行う。(B)標的臓器別の至適な AAV ベクターの構築に関する検討を引き続き継続する。筋肉・神経・肝臓をはじめとする幅広い標的臓器を対象として遺伝子導入効率の高い AAV の血清型を検討し、至適 Cap 蛋白質を持った AAV ベクターを作製する。至適プロモーターに関しても同様に検討を継続し、両方の側面から各標的臓器における遺伝子発現効率の最適化を図る。(C)AAV ベクターで導入した遺伝子の検出法の応用については、遺伝子導入を行った動物個体の臓器を用いて検討を行い、ヒトに対する遺伝子治療に際しての安全性評価の基礎データとする。

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Ⅱ期の目標は①変異解析システムの開発及び変異予測システムの開発といったデータバンクを利用した数学的研究、②導入遺伝子に変異が生じない遺伝子導入法及び導入ベクターの開発、の2つからなる。

① 遺伝子変異の発生機構を調べるために、バイオインフォマティクスを駆使して、第Ⅰ期の研究成果及びレトロウイルスに関するデータベースを元に、変異予測シミュレーションシステムの確立を試みる。

② 変異を生じる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を開発する。すなわち(1)プロウイルス DNA を合成し、組み込み蛋白であるインテグラーゼを発

現ベクター或いは精製体と組み合わせ、新たな組み込み型合成ベクターの開発をすすめる。(2)組み込みに必要な LTR 配列を持つ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（キメラウイルスベクター）を作製し、遺伝子導入効率及び変異頻度を調べる。

(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）

前年度から引き続き各種ウイルス毎の遺伝子配列多重データの収集・整備をすすめる。これらのデータを用いてウイルス毎の塩基置換のパターンの推定と各種方法の評価を行う。これらの過程で、分子系統分類、塩基置換速度の推定、および置換パターンの推定に関して精度をあげるために配列データの種類と数を増やしていく。必要によっては、新規の配列決定をおこなう。これらの過程を通して得られた結果に関して、ウイルス毎の塩基置換速度、塩基置換パターンの推定に加えて、ウイルス毎、遺伝子毎の変換領域の探索とその置換パターンの抽出を併せて行っていく。得られた結果に関しては、統合データベースに取り込んでいくことにより、ウイルス進化パターンデータベースの一部として、将来の利用が可能な形で整理していく。これらの方法やシステムを用いて、ベクター候補であるアデノウイルスや HIV を用いた推定置換パターンや組み替え領域の推定結果の応用への適用を目的とした、ベクター開発グループとの連携を強化する。

(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、開発元とは異なる研究施設による、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）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。モデル実験として、引き続き日本医大のグループで検討中の組換え HIV ウイルスベクターのバリデーションを行い、SOP の作成を行う。また、京都大学で検討中の新規高感度検出法のバリデーションを行い、そのプロトコールを SOP 化する。

最後に、今まで開発された SOP をデータベースに取り込み一般公開してその評価を受ける。

### 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した SOP の作成、そしてデータベース開発を主流とすることを重点項目にし

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。更に、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

れることを独立法人農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。更に、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転送
3. 研究運営		
所 要 経 費 ( 合 計 )	154 百万円	133 百万円

## II 平成14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)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

(注：◎は研究代表者)

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
鷓 飼 英 世	理化学研究所 遺伝子材料開発室 バイオリソース研究協力員
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
鈴 木 恵理香	理化学研究所 遺伝子材料開発室 バイオリソース研究協力員
長 村 吉 晃	㈱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
榊 佳 之	東京大学 医科学研究所 教授
斎 藤 泉	東京大学 医科学研究所 教授
清 水 信 義	慶應義塾大学 医学部 教授
鶴 尾 隆	東京大学 分子生物学研究所 所長

(注：○は運営委員長)