別添資料リスト

1. 麻疹ウイルスの分類・構造・複製様式
2. PVRL4 の構造と MV-H との相互作用
3. イヌ乳ガン細胞株を用いた rMV-SLAMblind の抗腫瘍能評価
4. MV 野外株のカニクイザルに対する病原性試験
5. MV-HL(7+) ゲノム cDNA 塩基配列（非公開）
6. rMV-HL(7+)構築図
7. pMV-HL(7+) 構築 primer 配列（非公開）
8. 本遺伝子組換え MV 作出用遺伝子カセット構築図
9. rMV-SLAMblind の in vitro 感受性試験
10. 供与核酸の由来および機能
11. pGEM-5z, pMDB1 プラスミドマップ
12. pMV-SLAMblind 構築図
13. リバースジェネティクス模式図
14. シーケンシングによる接種ウイルス内の導入変異部位の配列確認
15. PCR 法によるワクチニアウイルス検出試験
16. rMV-EGFP-SLAMblind の細胞継代による変異復帰の有無の確認試験（一部非公開）
17. rMV-SLAMblind のヒト膵臓癌及び乳癌細胞移植マウス接種後のウイルス H 遺伝子配列解析
18. 組換え MV 接種動物からのウイルス排出検出試験
19. rMV-SLAMblind のビーグルに対する安全性試験（一部非公開）
20. rMV-SLAMblind の霊長類サルに対する病原性試験
21. ヒト乳ガン細胞株 Xenograft モデルを用いた、rMV-SLAMblind の抗腫瘍効果の評価試験
22. 治療施設地図および室内配置図（非公開）
23. 治療施設内動線（非公開）
24. P2 試験室・P2A 治療室登録確認証明（非公開）
25. 東京農工大 動物医療センター会議 議事録 2014 年 12 月 11 日（非公開）
26. P2 試験室・P2A 治療室見取り図詳細および室内写真（非公開）
27. 遺伝子組換え MV の運搬容器、注入セット（非公開）
28. 東京農工大・医療廃棄物処理規程（省略）
29. 本遺伝子組換え MV の使用方法
30. クリーンブース、HEPA フィルター資料（省略）
31. rMV-SLAMblind の腫瘍移植マウス接種後の尿中ウイルス排出試験
32. 東京農工大学イヌ遺伝子組換え麻疹ウイルス治療安全委員会細則
33. 飼い主への同意説明書

資料1　麻疹ウイルスの分類・構造・複製様式

図1　麻疹ウイルス(measles virus: MV)の学問上分類とウイルス粒子構造

分類:
一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(モノネガウイルス目)
パラミクソウイルス科モービリウイルス属

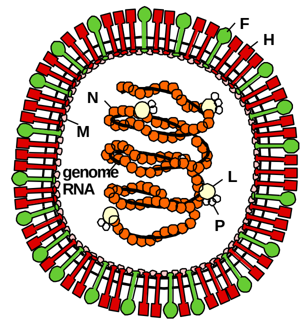
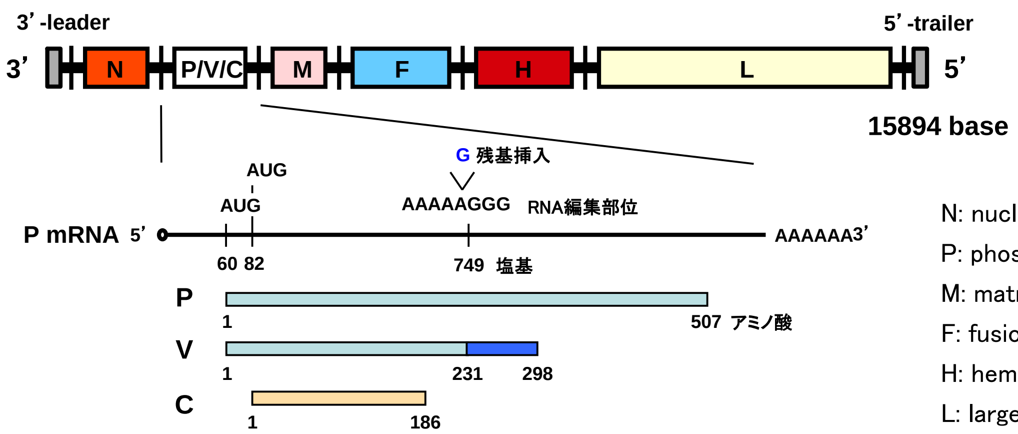


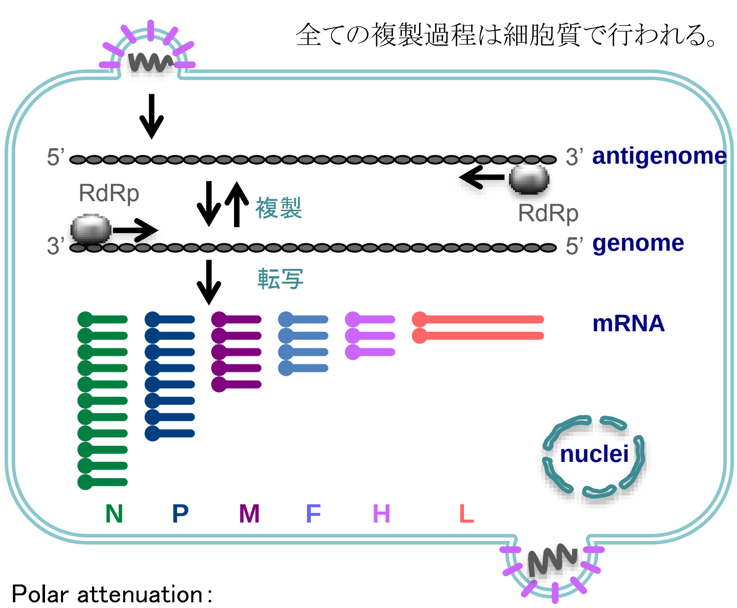
図2　MV　RNA ゲノム構造



N: nucleoprotein
P: phosphoprotein
M: matrix protein
F: fusion protein
H: hemagglutinin protein
L: large protein

RNA編集:
パラミクソウイルス科に共通の機構で、RNA依存RNAポリメラーゼ(RdRp)によるP遺伝子転写時に、一定の割合でRNA編集部位にG残基が挿入される。
これにより、下流の読み枠がP蛋白と異なるV蛋白が産生される。

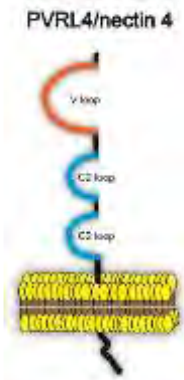
図3　麻疹ウイルスの細胞内増殖様式



Polar attenuation:
モノネガウイルスに共通の機構で、RdRpによる各遺伝子転写の際に、ゲノム上流の遺伝子mRNA量が最も多く、下流に行くに従いmRNA量が段階的に減少する現象。

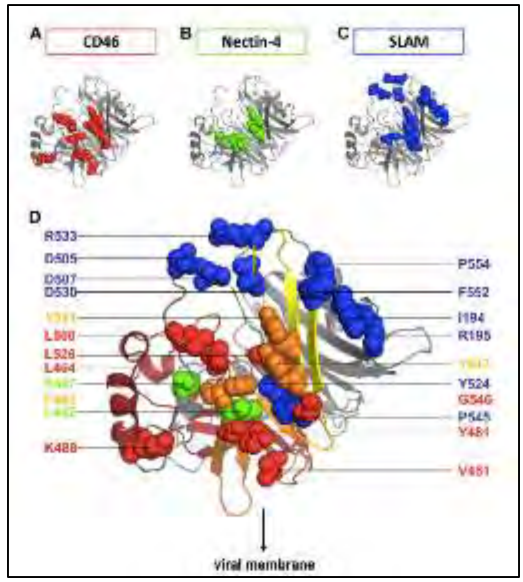
資料　２　PVRL4の構造とMV-H蛋白との相互作用

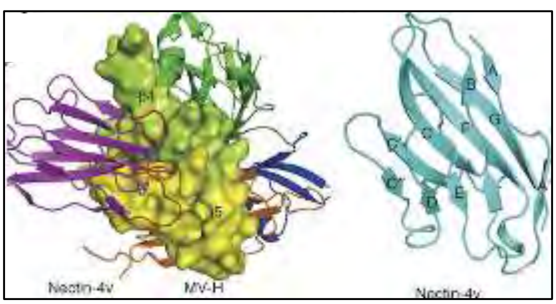
1） PVRL4の立体構造模式図
（文献11）



MV-H蛋白はPVRL4の
V domainに結合する（文献14）

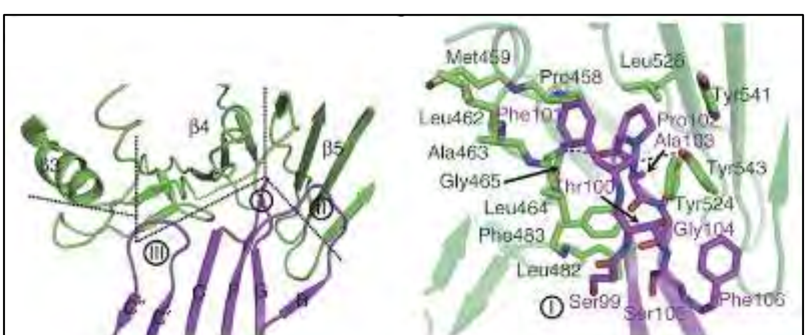
2） MV-H蛋白の高次構造と
レセプター結合領域（文献18）





3） 左：PVRL4 V domain（紫）とMV-Hの
結合状態の立体構造

右：PVRL4 V domain立体構造（水色）
（文献15）



4） 右：PVRL4 V domainとMV-Hの結合は3カ所（I, II, III）

左：結合部位Iの立体構造の詳細。PVRL4 V domain内F-G loop上のsite I 内 Phe-Pro-Ala-Gly がH蛋白と相互作用する。（文献15）

5） 動物種間での PVRL4 一次配列の比較

動物種によるヒト PVRL4（全長）との相同性

イヌ	94%
ヒツジ	92%
マウス	92%
ハヤブサ	78%
ゼブラフィッシュ	71%

PVRL4 V domain の配列比較

```
                                                   site II                   site III
ヒト              1 PAGELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARVDAGEGAQELALLHSKYGLH   60
イヌ              1 -PGELETSDLVTVVLGQDAKLPCFYRGDPGEQVGQVAWARVDAGEGARELALLHSKYGLH   59
ヒツジ            1 LAGELETSDLVTVVLGQDARLPCFYRGDPGEQVEQVAWARVDAGEGGRELALLNSKYGLH   60
マウス            1 SAGELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGQVAWARVDPNEGIRELALLHSKYGLH   60
ハヤブサ          1 RSGVVEVERSVTAVLGQDVVLPCRYRAQEQEQVVQVTWLKRGPTGEGAEVAVLNQQHGEH   60
ゼブラフィッシュ  1 DFVAPPPNYSLTSLAEEETILPCRYEPDAESTVVQVTWFQEKPDGTKEQIITAHHVNGKT   60
                    ....... .*....... ***.*...  ..* **.*....  ..  .........*..

                                                              site I
ヒト             61 VSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPP   120
イヌ             60 VSAAYEGRVEQPPPPRSPLDGAVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPP   119
ヒツジ           61 VSSAYEGRVEQPPPPRNPLDGAVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPP   120
マウス           61 VNPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPP   120
ハヤブサ         61 VLEPYAGRVLRRAGGALE-DGAIILRNAVQGDEGDYECHLITFPLGNFEGRLTLKVLVPP   119
ゼブラフィッシュ 61 AFGPWADRVEFNSNQPTK-DSSLVIKITKISDEGKYTCHVSTFPFGNFETELSLLVYTHP   119
                     .  ....**....... ..*. .........***.*.*...***.*.*.....*.*...*

ヒト             121 LP   122
イヌ             120 LP   121
ヒツジ           121 LP   122
マウス           121 LP   122
ハヤブサ         120 LP   121
ゼブラフィッシュ 120 IS   121
                      ..
```

＊site I内の FPAG 配列が H蛋白との結合に特に重要。
ハヤブサ、ゼブラフィッシュは1アミノ酸異なるため、
H蛋白との親和性は低いと考えられる。

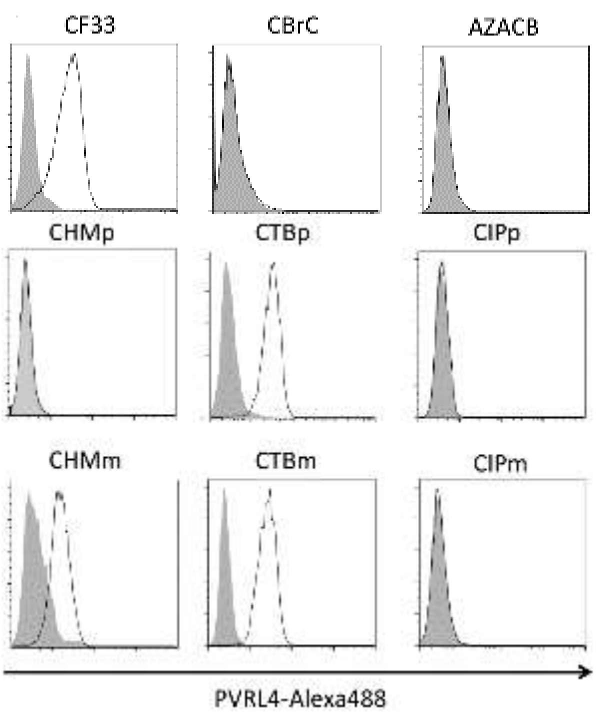
資料3

イヌ乳ガン細胞株を用いたrMV-SLAMblindの抗腫瘍能評価

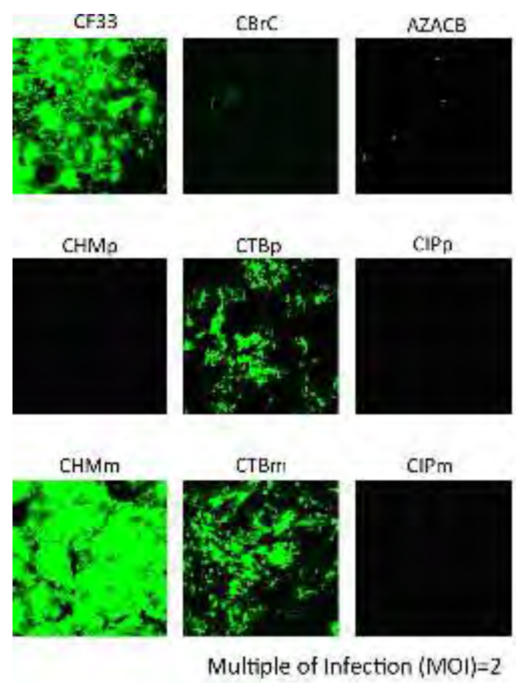
・イヌ乳ガン細胞株９種のPVRL4発現を検索し、陽性細胞にはrMV-SLAMblindが感染・増殖して細胞死を誘導することを明らかにした（図１）。

・PVRL4陽性イヌ乳ガン細胞株（CF33）を皮下移植したマウスXenograftモデルを用い、rMV-SLAMblindを腫瘍内投与することで抗腫瘍効果を示す事を明らかにした（図2）。

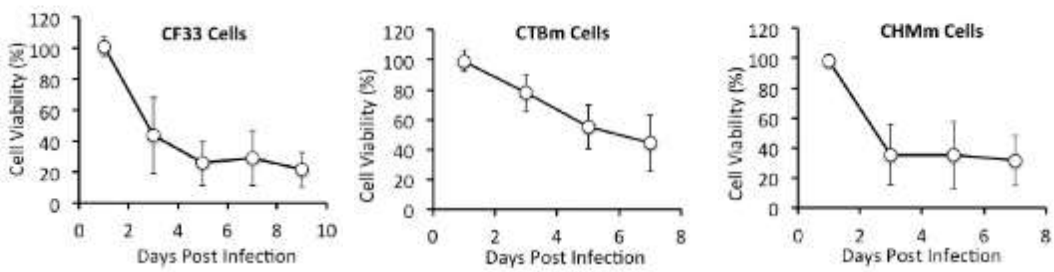
図１: イヌ乳がん細胞株のレセプターの発現およびウイルス感染



1) FACSによるPVRL4発現
イヌ乳ガン細胞株の検索

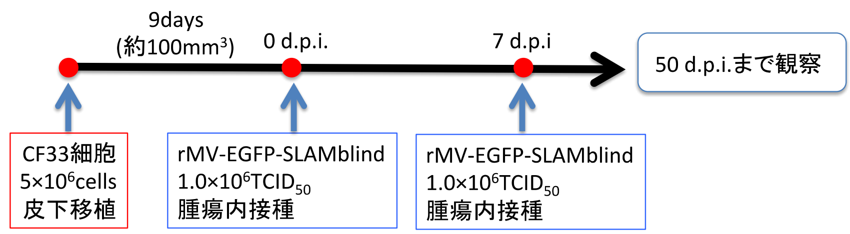


2) イヌ乳ガン細胞株への
rMV-EGFP-SLAMblind感染

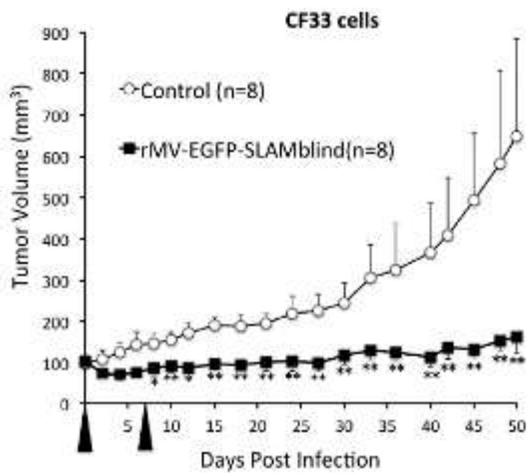


3) rMV-EGFP-SLAMblind感染による*In vitro*での細胞傷害性試験 (WST-1 assay)

図２：イヌ乳ガン細胞株Xenograftモデルを用いた、rMV-SLAMblindの抗腫瘍効果の評価試験



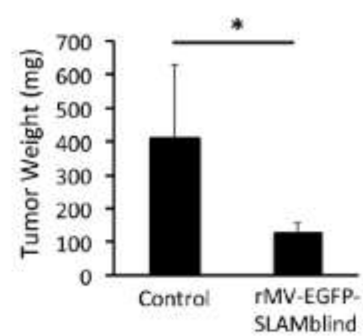
1)　試験スケジュール



mean±SD
Welch's t test
＊　:P<0.05
＊＊:P<0.01

2) 腫瘍サイズの経時的測定

50 days



mean±SD
Student t test
＊:P<0.05

3) ウイルス接種50日後に摘出した腫瘍の写真および重量

資料4　MV野外株のカニクイザルに対する病原性試験

MV-HL株（ウイルス力価 $10^{5.5}$ $TCID_{50}$）またはMV-IC-B株（$10^{6.0}$ $TCID_{50}$）（共に野外株）をカニクイザルに接種

・接種14日まで臨床症状の観察

			臨床症状	
ウイルス	頭数	接種法	発疹	コプリック斑
HL株	4	皮下	++	+
	4	静脈	++	++
	3	鼻腔内	++	+
IC-B株	6	皮下	++	++
	4	静脈	++	++
	3	鼻腔内	++	+

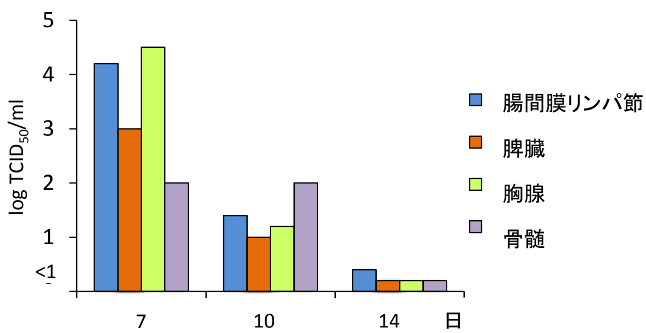
++ 全面；+ 局所的

・IC-B株接種後8日目の発疹の様子

どの接種ルートにおいても発症し、ヒトのはしかと同様の症状をしめす。

文献1から引用改変

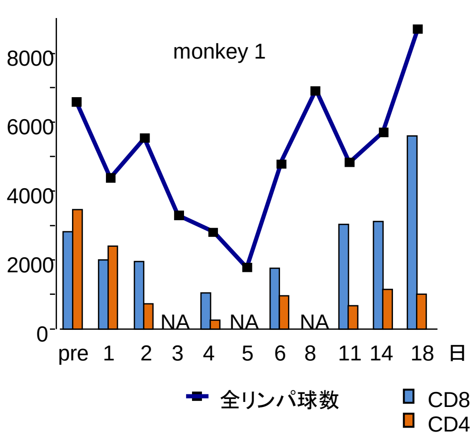
・HL株　皮下接種14日までの各リンパ組織のウイルス力価



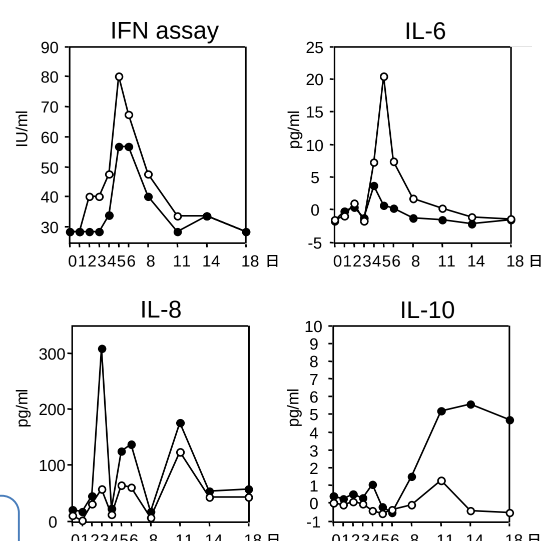
感染初期からリンパ組織で増殖する。また、血中白血球からもウイルスが検出される（data not shown）。

文献1から引用改変

・MV-HL株接種後のリンパ球数動態



・MV-HL株接種の血漿中サイトカイン濃度



感染後に一過性の激しい白血球減少と、各種サイトカインの産生が起こる。

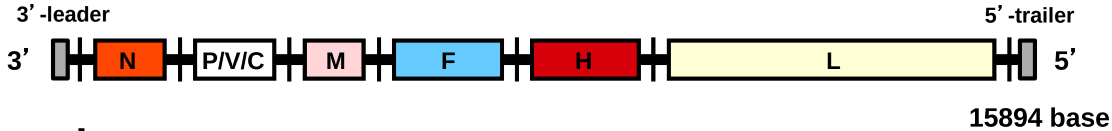
文献26から引用改変

＜結果＞

MV野外株は、カニクイザルに接種後、リンパ節で増殖してヒトの麻疹同様の症状と宿主免疫反応を引き起こす。

資料6　rMV-HL(7+)構築図

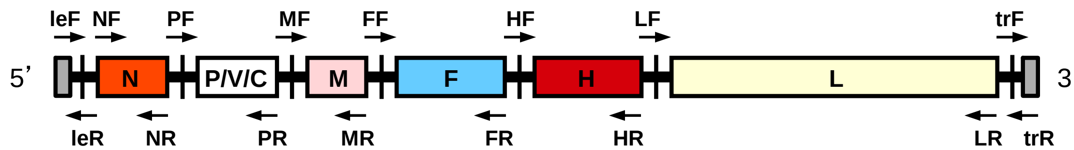
MV-HLゲノム



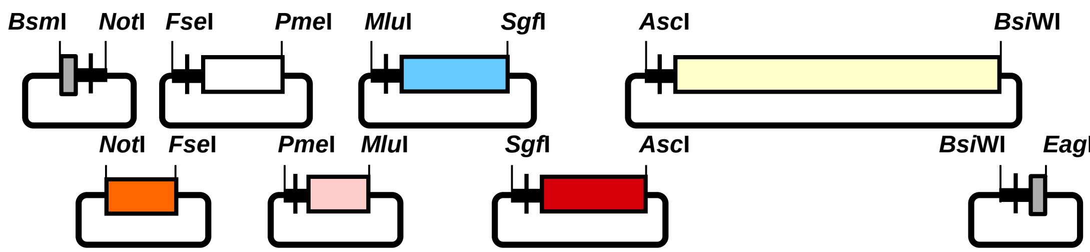
MV-HL感染B95a細胞からtotal RNAを抽出

random primerと逆転写酵素によりcDNA合成

制限部位を付加した各遺伝子特異的primer pair（資料7）を用いて各遺伝子を増幅

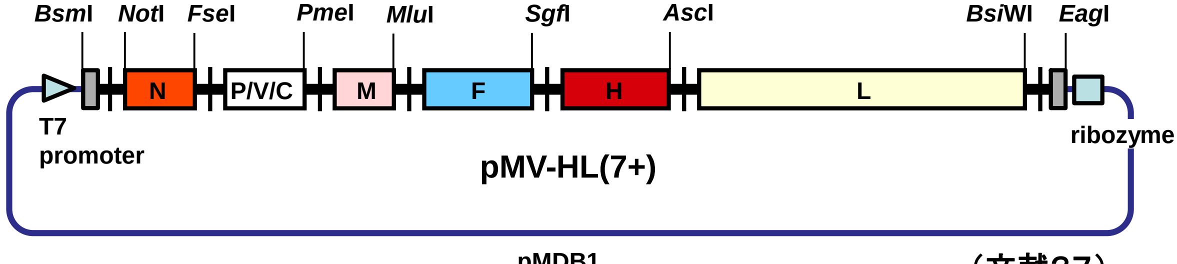


クローニングプラスミドに挿入し、シークエンシングで配列を確認



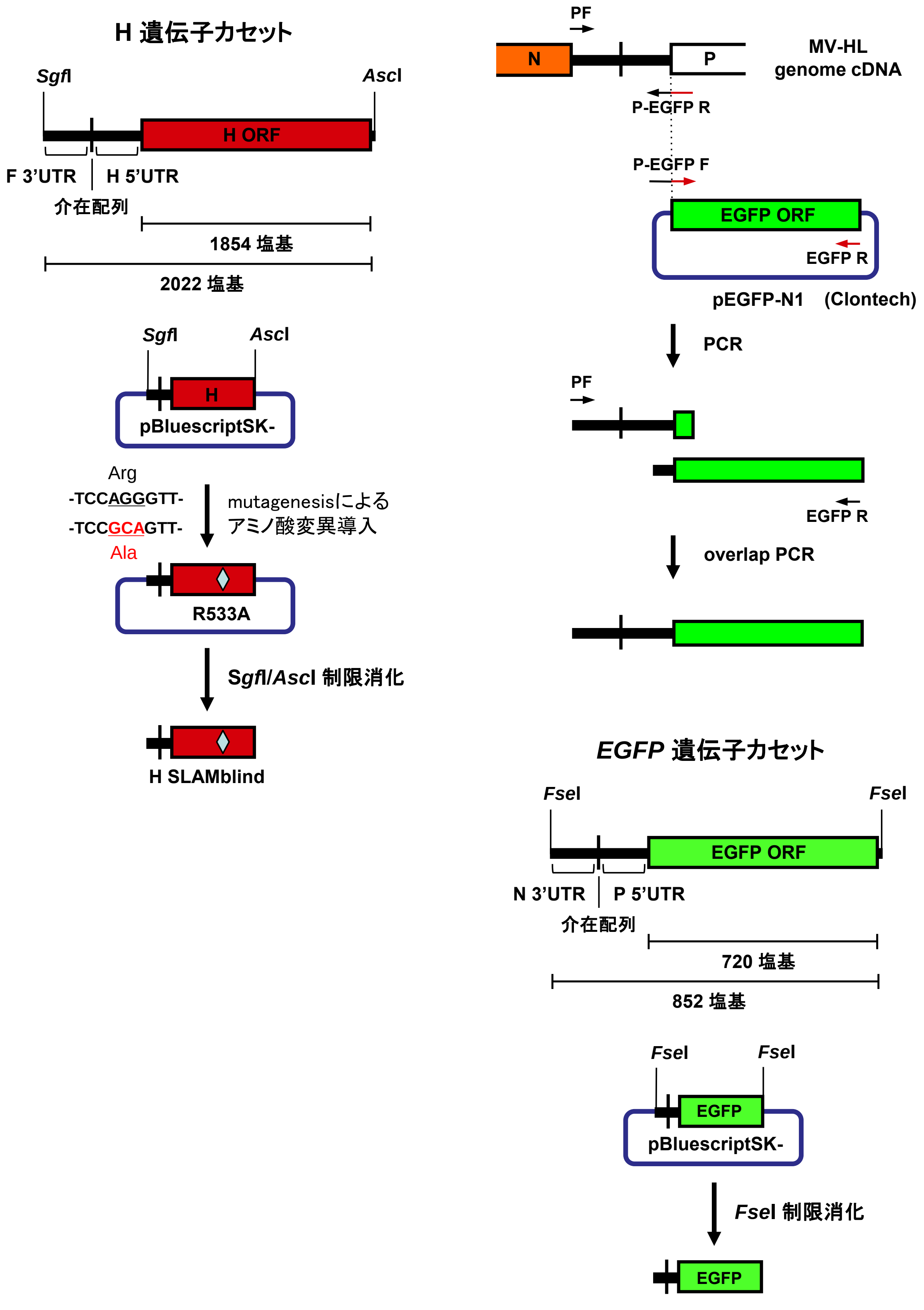
特異的制限酵素で遺伝子カセットを切り出し、隣接のカセットと結合していく

全長cDNAが連結されたら、BsmI/EagIで切り出し、pMDB1へ挿入



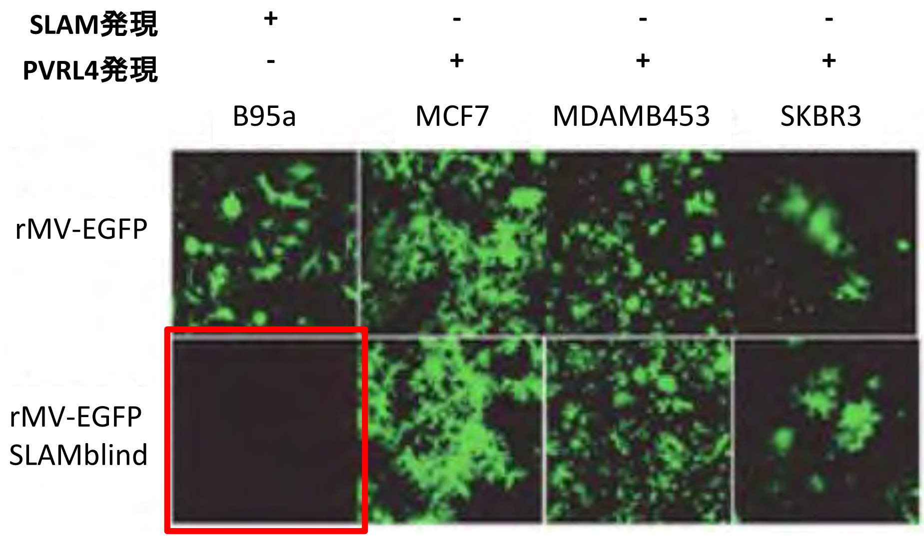
（文献37）

資料8　遺伝子組換えMV作出用遺伝子カセット構築図



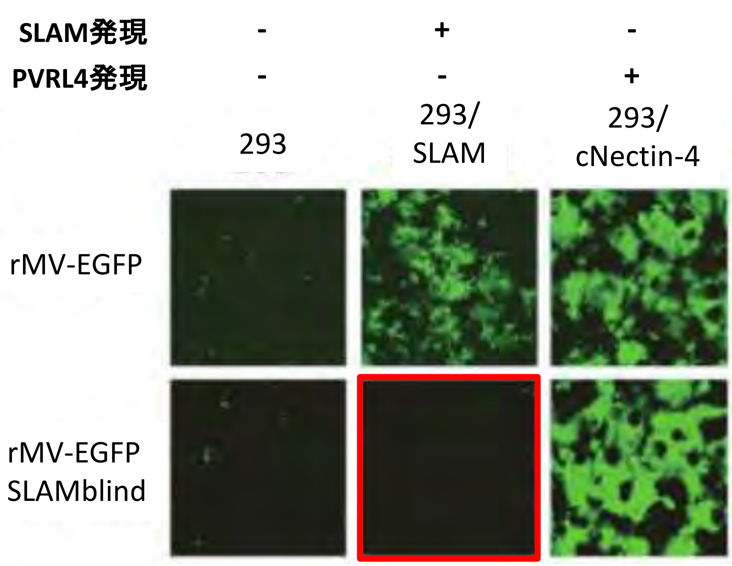
資料９　SLAMblind H遺伝子をもつ組換えMVの各種細胞株への感染性

１：　SLAM/PVRL4発現ヒト細胞株への感染性試験



文献35より引用改変

２：　イヌSLAM/PVRL4発現細胞株への感染性試験



文献21より引用改変

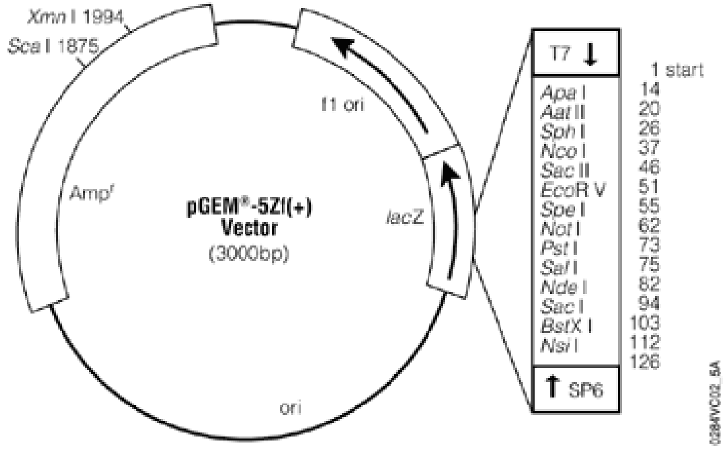
結果　SLAMblindウイルスはSLAM陽性細胞への感染能が消失した。

資料 10　本組換え体の作出に用いた供与核酸の構成要素の由来及び機能

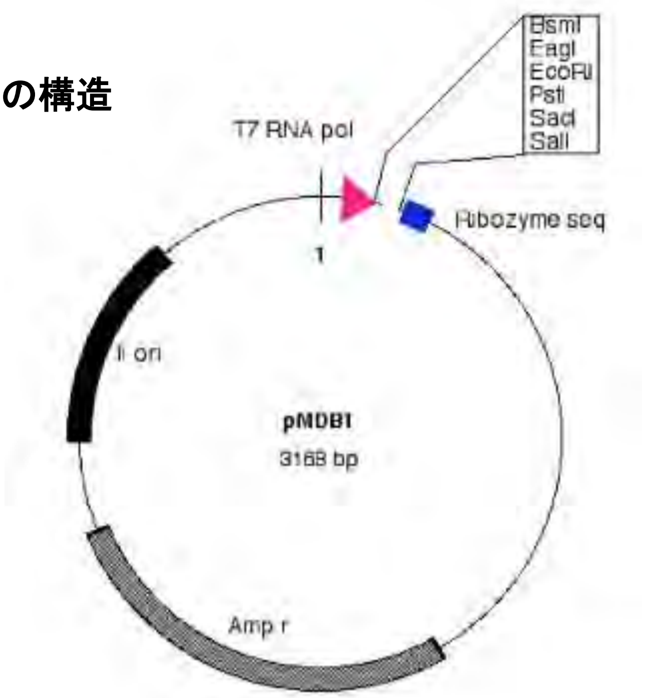
構成要素	サイズ（bp）	由来	機能
H SLAMblind 遺伝子カセット			
F 3'UTR	137	HV-HL ゲノム由来 cDNA	F 遺伝子 ORF 下流の非翻訳領域（生理的機能を持つ報告はない）。5'末端を *Sgf*I 制限配列に置換。
介在配列	3	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
H 5'UTR	20	HV-HL ゲノム由来 cDNA	H 遺伝子 ORF 上流の非翻訳領域（生理的機能を持つ報告はない）。
SLAMblind 遺伝子 ORF	1854（+8）	HV-HL ゲノム由来 cDNA	H 遺伝子からは、細胞膜上の MV 受容体への結合を担う H 蛋白が産生される。 H 蛋白のリンパ系細胞受容体 SLAM への結合能を欠損することを目的に、533 残基 Arg の Ala へのアミノ酸変異に相当する 3 塩基置換を導入してある（資料 35）。3'末端に *Asc*I 制限配列 8bp を付加。
EGFP 遺伝子カセット			
N 3'UTR	59	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
介在配列	3	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
P 5'UTR	59	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
EGFP 遺伝子 ORF	720（+8）	オワンクラゲ由来 cDNA	紫外線照射により緑色蛍光を発する。3'末端に *Fse*I 制限配列 8bp を付加。

資料11　pGEM−5z, pMDB1プラスミドマップ

pGEM-5zf(+)のマップ



pMDB1の構造

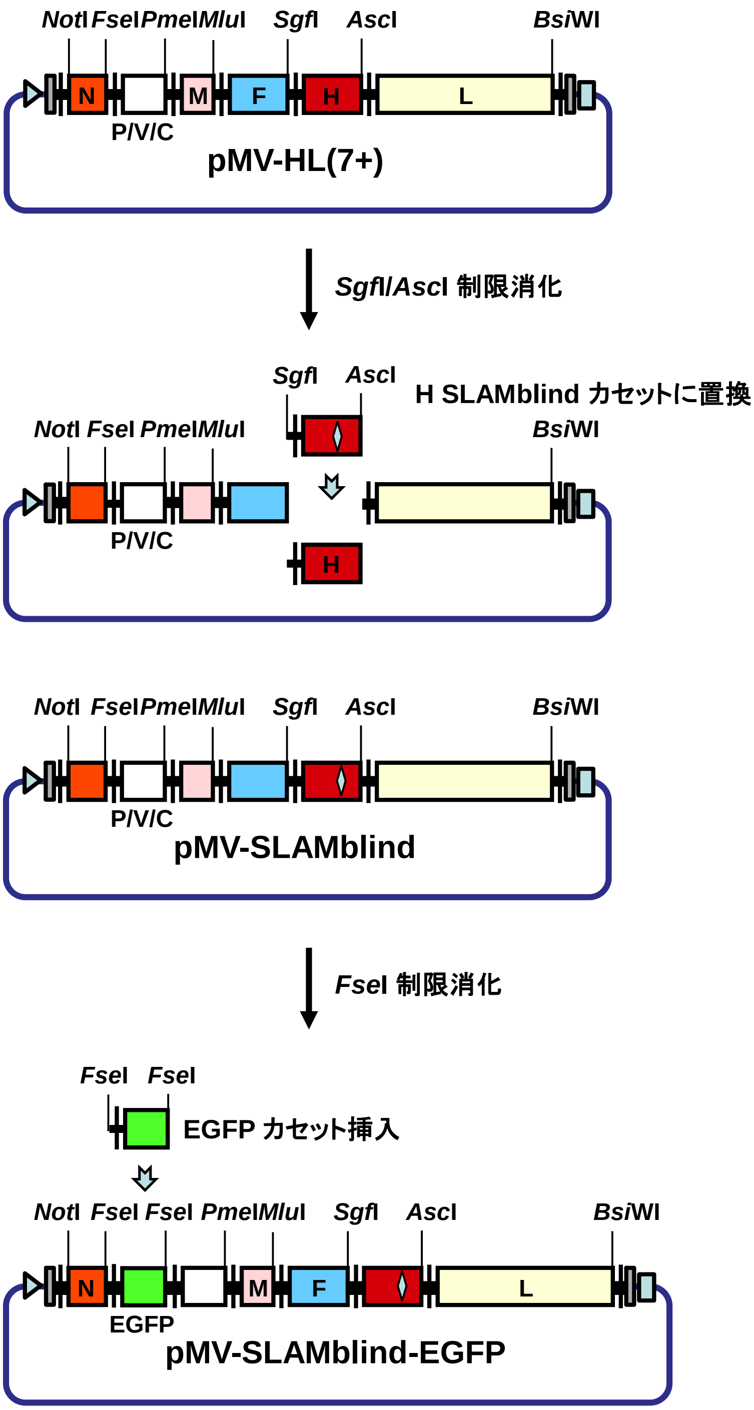


Plasmid name:pMDB1
Plasmid size:3168 bp
Constructed by:MD Baron and T barrett
Construction date:1997
Comment&Reference:J Virol, 1997, 71, 1265-1271

ウイルスゲノムcDNAは*Bsm*I−*Eag*I間に挿入した。

* T7RNA pol: T7RNA polymerase promoter
Ribozyme seq: hepatitis delta virus ribozyme sequence

資料12　pMV-SLAMblind構築図



資料13　　Reverse Geneticsの概要