

# 博士論文（要約）

細菌人工染色体を用いた DNA ウイルスの  
遺伝子改変系の構築および  
イヌを対象とした疾患への応用

松郷 宙倫

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 目次                                   | 1  |
| 略語                                   | 2  |
| 序章                                   | 6  |
| ウイルスベクターの歴史                          | 7  |
| 獣医学分野におけるウイルスベクターの歴史                 | 8  |
| 細菌人工染色体                              | 9  |
| 図表                                   | 11 |
| 第一章一節 細菌人工染色体を用いたイヌアデノウイルスの遺伝子改変系の構築 | 14 |
| 要旨                                   | 15 |
| 背景と目的                                | 16 |
| 材料と方法                                | 19 |
| 結果                                   | 24 |
| 考察                                   | 27 |
| 図表                                   | 29 |
| 他の節および章を公開できない理由                     | 37 |
| 引用文献                                 | 38 |
| 謝辞                                   | 70 |

## 略語

ACTB: actin beta

ADP: adeno death protein

BAC: bacterial artificial chromosome

BAdV1: bovine adenovirus 1

BSA: bovine serum albumin

BtAdV-A: bat adenovirus species A

BtAdV: bat adenovirus

CAdV1: canine adenovirus type1

CAdV2: canine adenovirus type2

CAdV: canine adenovirus

CHV-1: canine herpesvirus 1

cH3N2: canine H3N2 virus

cH3N8: canine H3N8 virus

CIV: canine influenza virus

CP: chloramphenicol

CPE: cytopathic effect

CRFK: Crandell feline kidney

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DTT: dithiothreitol

E1: early region 1

EMA: European medicines agency

FCS: fetal calf serum

FDA: food and drug administration

FITC: fluorescein isothiocyanate

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HA: hemagglutinin

HAdV14: human adenovirus 14

HAdV14p1: human adenovirus 14 variant

HAdV5: human adenovirus 5

HAdV-C: human adenovirus species C

HAdV: human adenovirus

HEK293T: human embryonic kidney 293T

HRP: horseradish peroxidase

HSV-1: herpes simplex virus type 1

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IFA: indirect immunofluorescence assay

IL-12: interleukin-12

ITR: inverted terminal repeat

LB: Luria-Bertani

MAdV2: mouse adenovirus 2

MDCK: Madin-Garby canine kidney

MLD<sub>50</sub>: mouse median lethal dose

MLP: major late promoter

MOI: multiplicity of infection

MYXV: myxoma virus

NA: neuraminidase

NCS: newborn calf serum

NMPA: national medical products administration

NS1: non-structural protein 1

ORF: open reading frame

OV: oncolytic virus

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PEI: polyethylenimine

PFU: plaque forming unit

PKR: protein kinase R

PRV: pseudorabies virus

PS: phosphatidylserine

PVDF: polyvinylidene fluoride

RNR: ribonucleotide reductase

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SDS: sodium dodecyl sulfate

SFDA: state food and drug administration

SOB: super optimal broth

TCID<sub>50</sub>: median tissue culture infectious dose

TERT: telomerase reverse transcriptase

WT: wild type

galK: galactokinase

## 序章

## ウイルスベクターの歴史

古くから感染症に罹患したがん患者のがんが縮小したという報告があり、病原体であるウイルスを疾患の治療に用いるという逆転の発想は、1950年代にはすでに存在していた (Southam and Moore, 1952; Southam, Hilleman and Werner, 1956; Asada, 1974)。しかし、その当時はウイルスの研究は緒に就いたばかりであり、遺伝子改変技術も存在していないため、ウイルスの野外株をそのままがん患者に投与するという方法しかなかった。そのため、ウイルス投与後の患者に重篤な副作用が多数報告され、ウイルスをがん治療に用いるという考えは頓挫することとなった。その後、シークエンسや遺伝子クローニングなどの技術が進展し、ヒトの疾患の遺伝子レベルでの解析が進むと同時に、ウイルスの遺伝子レベルでの解析も進んだ。ヒトの疾患の原因遺伝子が同定されると、その正常遺伝子を外部から供給して治療を行う遺伝子治療という考えが登場した。その治療用遺伝子の運び手としてウイルスが注目されることとなった。中でも、ヒトアデノウイルスはウイルスの増殖に初期遺伝子である E1 領域の発現が必須であることがわかり、E1 を欠損させた非増殖型のウイルスはその安全性の高さから遺伝子治療ベクター開発の主役となった (Graham *et al.*, 1977; Anderson, Blaese and Culver, 1990)。1980年代は、アデノウイルスのような大型 DNA ウイルスの遺伝子を改変する方法として、哺乳類培養細胞を用いて組換えウイルスを選択するという手法に頼っていたが、その効率の悪さがこの分野の進展を妨げていた (Post and Roizman, 1981; Berkner and Sharp, 1983)。1990年代には、プラスミドをベースとしたウイルス遺伝子改変法が確立され、多くの遺伝子治療ベクターの作出が可能になった (Cunningham and Davison, 1993; Hehir *et al.*, 1996; Mizuguchi and Kay, 1998)。また、この方法は、ウイルスの特定の遺伝子を修飾や欠損させることで正常細胞における増殖性や *in vivo* における病原性を大きく低下するが、がん細胞においては高い増殖性を維持したような腫瘍溶解性ウイルス (OV) (図 1) の構築に応用され、1950年代に頓挫したウイルスを用いたがん治療法の開発研究が実施されるようになった (Martuza *et al.*, 1991; Mineta,



Rabkin and Martuza, 1994; Bischoff *et al.*, 1996)。現在までにアデノウイルス、ヘルペスウイルス、レオウイルス、麻疹ウイルスなどの様々なウイルスをベースとした OV が開発され、その一部はすでに実用化されている（表 1）。

また、2020 年に発生した COVID-19 パンデミックにおいて、SARS-CoV-2 ウイルスの防御抗原であるスパイクタンパク質を発現するアデノウイルスベクターワクチンは、高い防御効果を示し、世界中で用いられた (Zhu *et al.*, 2020; Logunov *et al.*, 2021; Sadoff *et al.*, 2021; Voysey *et al.*, 2021)。

### 獣医学分野におけるウイルスベクターの歴史

医学分野においては、1980 年代から遺伝子治療用ベクターの開発が進み、1990 年代にはそれと並行して OV の研究も進展し、多くのウイルスベクターの構築やそれらの実用化を目指した臨床試験が行われるようになった。その一方で、獣医学分野におけるウイルスベクターの開発は遅れている。イヌアデノウイルス (CAAdV) を用いたウイルスベクターの構築は 1997 年に初めて報告されたものの、哺乳類培養細胞を用いた従来の組換え技術により作出しており、その作出効率は極めて低かった (Klonjowski *et al.*, 1997)。その後、プラスミドをベースとした CAAdV の遺伝子改変系の確立により 2003 年には、獣医学分野では初となる CAAdV をベースとした OV 候補株の作出が報告されたが (Hemminki *et al.*, 2003)、この方法ではゲノムの任意の領域を組換えることが困難であり、さらに CAAdV についての基礎的な性状解析も遅れていることもあり、その後の進展は少ない。2020 年 12 月時点で、獣医学分野における OV に関する報告は少なく、PubMed に収録されている論文数は医学分野の 1/50 程度にとどまっている。これまでに CAAdV 以外に、レオウイルスや麻疹ウイルス、ワクシニアウイルス、水泡性口内炎ウイルスなどをベースとした OV が報告されているものの（表 2）、その多くはヒトを対象とした OV を用いており、イヌやネコの腫瘍細胞における増殖性、傷害性は低く、その抗腫瘍効果も低くなることが予想される。また、医学分野に

においては最も有望な OV 候補の一つであるヘルペスウイルスをベースとした OV 開発については獣医学分野ではこれまでに報告されていない(Gentschev *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2018)。

## 細菌人工染色体

細菌人工染色体(BAC)ベクターは、F 因子プラスミドのレプリコンである複製起点 *repE*、*sopA* 遺伝子、*sopB* 遺伝子、*sopC* 領域を持つクローニングベクターであり、大腸菌ゲノムが保持されるのと同様の仕組みによって大腸菌内で厳密に 1-2 copy/cell で保持される(Shizuya *et al.*, 1992)。そのため、極めて不安定な DNA インサートであっても保持することが可能であり、300kbp 程度の外来性 DNA をクローニングすることが可能であり、プラスミドやコスミドベクターに比べ、インサート DNA の安定性およびクローニング可能なキャパシティが高い。DNA ウイルスの遺伝子改変系において、BAC ベクターを用いた初めての報告は 1993 年のバキュロウイルスへの応用である(Luckow *et al.*, 1993)。その後、ヘルペスウイルス(Messerle *et al.*, 1997)やポックスウイルス(Domi and Moss, 2002)など他の大型 DNA ウイルスにおいても BAC を用いた遺伝子改変系の報告が続いた。大腸菌内で 1-2 copy/cell で保持されるという BAC のユニークな性質を利用して、相同性組換えに関わるタンパク質を発現させることでインサート DNA の任意の部位での組換えが可能となる。具体的には、λファージ由来のタンパク質を用いる Red/ET システムが広く用いられており、この技術により BAC ベクターにクローニングされたウイルスゲノムの任意の部位を組換えることができる(Zhang *et al.*, 1998; Muirers *et al.*, 1999)。

本研究では、複数の大型 DNA ウイルスを対象に、簡便で効率的な BAC ベクターをベースとする遺伝子改変系を確立することを目的とした。さらに、構築したウイルスベクターが、イヌの疾患予防や治療に応用できるかを検討した。特に、イヌのがんを対象とした OV 療

法への応用性について評価した。

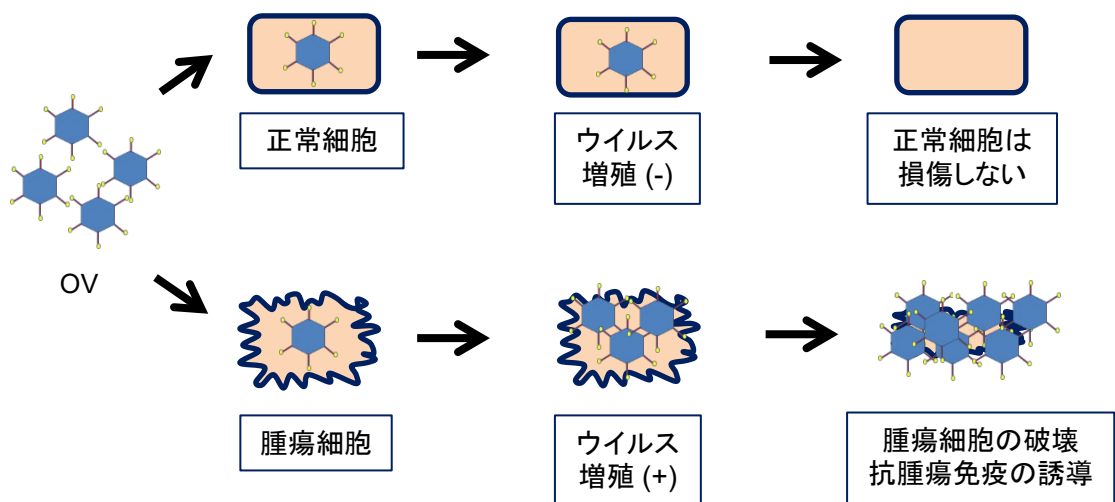


図1 OVのイメージ図

正常細胞にOVが感染しても、ウイルスは増殖せず、正常細胞は損傷しないのに対して、腫瘍細胞にOVが感染するとウイルスは増殖し、腫瘍細胞を破壊し、ウイルスが周囲の腫瘍細胞へと拡散すると同時に、腫瘍抗原が放出され、抗腫瘍免疫が誘導される。

表1 医学分野において臨床試験が行われたOV

| Family          | Virus                               | Reference                       |
|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Adenoviridae    | ICOVIR-5                            | (García et al., 2019)           |
|                 | VCN-01                              | (Garcia-Carbonero et al., 2019) |
|                 | DNX-2401                            | (Lang et al., 2018)             |
|                 | Enadenotucirev (ColoAd1)            | (Garcia-Carbonero et al., 2017) |
|                 | CG0070                              | (Packiam et al., 2018)          |
|                 | OBP-301                             | (Khan et al., 2019)             |
|                 | H101                                | (Garber, 2006)                  |
| Herpesviridae   | HSV1716                             | (Streby et al., 2017)           |
|                 | HF10                                | (Hirooka et al., 2018)          |
|                 | G207                                | (Markert et al., 2014)          |
|                 | T-VeC<br>(Talimogene laherparepvec) | (Andtbacka et al., 2019)        |
|                 | G47Δ                                | (Ma, He and Wang, 2018)         |
|                 | NV1020                              | (Geevarghese et al., 2010)      |
| Poxviridae      | Pexa-Vec (JX-594)                   | (Breitbach et al., 2015)        |
|                 | PROSTVAC                            | (Gulley et al., 2019)           |
| Parvoviridae    | ParvOryx                            | (Geletneky et al., 2012)        |
| Reoviridae      | Reolysin                            | (Mahalingam et al., 2018)       |
| Picornaviridae  | PVSRIP0                             | (Desjardins et al., 2014)       |
|                 | Cavatak                             | (Annels et al., 2019)           |
| Paramixoviridae | MV-NIS                              | (Galanis et al., 2015)          |
|                 | NDV-HUJ                             | (Freeman et al., 2006)          |
| Rhabdoviridae   | VSV-IFNβ-NIS                        | (Felt and Grdzlishvili, 2017)   |
| Retroviridae    | Toca511                             | (Cloughesy et al., 2020)        |

表2 獣医学分野において報告されたOV

| Family          | Virus                | Reference                 |
|-----------------|----------------------|---------------------------|
| Adenoviridae    | OC-CAVE1             | (Hemminki et al., 2003)   |
|                 | ICOCaV17             | (Laborda et al., 2014)    |
|                 | HAdV5                | (Ternovoi et al., 2005)   |
| Poxviridae      | MYXV                 | (Urbasic et al., 2012)    |
|                 | GLV-1h68             | (Gentshev et al., 2009)   |
|                 | GLV-1h109            | (Patil et al., 2012)      |
|                 | GLV-5b451            | (Adelfinger et al., 2014) |
|                 | ALVAC-fIL2           | (Jourdier et al., 2003)   |
|                 | NYVAC-fIL2           | (Jourdier et al., 2003)   |
| Reoviridae      | Reolysin             | (Hwang et al., 2018)      |
| Paramixoviridae | rMV-SLAMblind        | (Shoji et al., 2016)      |
| Rhabdoviridae   | VSV-IFN $\beta$ -NIS | (Naik et al., 2018)       |

## 第一章

### 第一節

細菌人工染色体を用いた

イヌアデノウイルスの遺伝子改変系の構築

## 要旨

イヌアデノウイルス (CAdV) は、イヌ科の動物に伝染性肝炎を引き起こすイヌアデノウイルス 1 型 (CAdV1) と伝染性喉頭気管炎を引き起こすイヌアデノウイルス 2 型 (CAdV2) の二つの病原型に分けられる。また、CAdV はイヌやヒトにおける組換えワクチンや遺伝子治療に応用できるウイルスベクターのバックボーンになりうる。これまでのプラスミドをベースとした遺伝子改変系による CAdV ベクターの構築は、そのゲノムサイズの大きさが技術的な隘路になっていた。そこで、本研究では、細菌人工染色体 (BAC) を用いた CAdV の感染性クローンを構築し、BAC の遺伝子改変技術によって簡便かつ効率的に遺伝子改変したウイルスを作出することを可能とした。このシステムの有用性を示すために、初期遺伝子 E1 領域を欠損させた CAdV2 変異体を作成した。この変異体は、培養細胞においては弱毒化していた。これらの結果から、本研究で構築した BAC をベースとした CAdV の遺伝子改変系は、CAdV の基礎研究や実用的な研究のための有用なツールになると考えられる。



## 背景と目的

イヌアデノウイルス (CAdV) は、二本鎖 DNA ウイルスでアデノウイルス科マストアデノウイルス属に属し、イヌアデノウイルス 1 型 (CAdV1) とイヌアデノウイルス 2 型 (CAdV2) の二つの病原型に分けられる。CAdV1 はイヌやオオカミ、クマ、アカギツネなどで伝染性肝炎や脳炎を引き起こす (Walker, Abbondati, *et al.*, 2016; García Marín *et al.*, 2018; Balboni *et al.*, 2019)。一方で、CAdV2 はイヌにおいて伝染性喉頭気管炎を引き起こす (Ditchfield, Macpherson and Zbitnew, 1962)。これらの病原性の違いに関わる分子基盤はわかっていない。近年、野生動物やアニマルシェルターにおける CAdV の感染が報告されており (Decaro *et al.*, 2007; Walker, Fee, *et al.*, 2016)、感染防御のために CAdV1 に抗原交差性のある弱毒化 CAdV2 生ワクチンが広く用いられている。

現在、様々なアデノウイルスベクターが基礎研究や応用研究に広く用いられている。後者は、組換えワクチンや遺伝子治療の目的で構築され、ヒトにおいてはすでに承認されているものや臨床試験の段階にあるものが複数ある。ウイルス増殖に必須な E1 領域などの遺伝子を治療用の外来遺伝子や抗原遺伝子に置換した非増殖型のベクターは、遺伝子治療や組換えワクチンに用いることができる。一方で、腫瘍選択性をもつ増殖型ベクターは、腫瘍溶解性ウイルス (OV) として用いられる (Fueyo *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003)。様々なヒトアデノウイルス (HAdV) をベースとした遺伝子治療用のベクターが長年、ヒトの臨床試験で評価されてきたが、患者が保有する HAdV に対する液性または細胞性の獲得免疫が効率的な遺伝子の導入や持続的な遺伝子の発現を妨げてきた。これらの免疫は、OV の効果も弱めることになる。一方で、ヒトはイヌのウイルスである CAdV に対する獲得免疫を持っておらず (Kremer *et al.*, 2000)、そのため、CAdV をベースとしたベクターはヒトへの臨床応用が期待される。加えて、CAdV はイヌのがん治療のための OV になる潜在性もある (Sánchez *et al.*, 2018)。

ウイルスゲノムに任意の遺伝子改変を行うことを可能とする遺伝子改変技術は、CAAdV の病原性などの基礎研究や CAAdV をベースとするベクターや組換えワクチンなどの実用的な研究に使用できる強力な手法である。これまでに CAAdV を含め、組換えアデノウイルスを構築する複数の技術が報告されてきた。*In vitro* ligation やそれを改良した手法は、外来遺伝子を制限酵素で切断したアデノウイルスの DNA と直接結合させる方法であり、ユニークな制限酵素サイトが必要であり、さらに結合効率も低かった(Mizuguchi and Kay, 1998; Hu *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2015)。哺乳類細胞を用いた相同性組換えの手法では、相同配列で挟まれた外来遺伝子とアデノウイルスの DNA を細胞に導入し、組換えウイルスを作出する。この方法では長い相同配列および複数回のブランク純化が必要であった(Klonjowski *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2002)。細菌をベースとした相同性組換えの手法では、大腸菌 BJ5183 株における相同性組換えによってウイルスゲノムの全長をプラスミドにクローニングする。この方法は、感染性分子クローンの作出やウイルスゲノムの改変に広く用いられてきた。しかしながら、この手法は長い相同配列とユニークな制限酵素サイトが必要であった(Charrier *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1999; Van Olphen and Mittal, 1999; Kremer *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2002)。酵母人工染色体 (YAC) をベースとした手法は、酵母を必要とし、頻繁には用いられてこなかった(Ketner *et al.*, 1994)。

これらの問題を解決するために、本節では、細菌人工染色体 (BAC) をベースとした CAAdV の遺伝子改変系の構築を目的とした。この手法では、BAC の組換え技術により 50 bp という非常に短い相同配列によって容易に遺伝子改変を行える(Warming *et al.*, 2005)。加えて、この BAC をベースとした遺伝子改変系の有用性を示すために、E1 欠損 CAAdV2 変異体を構築し、その性状解析を行った。

## 材料と方法

### 細胞とウイルス

イヌ由来腎臓細胞 (MDCK) と MDCK-CA $\Delta$ V2-E1-26 細胞 (下記参照) は 5% ウシ胎仔血清 (FCS) 加 DMEM 培地で、37°C、5% CO $_2$  インキュベーターで培養、継代した。CA $\Delta$ V1 (D43 株(Ochi *et al.*, 1956))、CA $\Delta$ V2 (A2 株(Tohya *et al.*, 1989)) は 1%FCS 加 DMEM 培地で MDCK 細胞を用いて増殖させた。CA $\Delta$ V2- $\Delta$  E1-Venus (下記参照) は MDCK-CA $\Delta$ V2-E1-26 細胞で増殖させた。変異ウイルスを伴う遺伝子組換え実験は、大臣確認を受けた後に実施した (確認番号: 29 受文科振第 1086 号)。

### ウイルスのゲノム配列の決定

次世代シーケンサーを用いてウイルスのゲノム配列を決定した。CA $\Delta$ V1 と CA $\Delta$ V2 をそれぞれ感染させた細胞の上清を超遠心によって濃縮し、50  $\mu$ L のウイルス液から QIAamp DNA mini kit (QIAGEN)を用いてウイルス DNA を抽出した。ライブラリーの調整は NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs) を用いて行った。次世代シーケンスには Ion PGMTM Hi-QTM View OT2 kit および Ion PGMTM Hi-QTM View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用した。いずれもプロトコルに従って実施した。出力されたデータは CLC Genomics Workbench version 8 (CLC bio) を用いて解析した。CA $\Delta$ V1 から得られたデータは既報の CA $\Delta$ V1 (GenBank Accession Nos. AC\_000003 および NC\_001734)の配列データにマッピングした。CA $\Delta$ V2 から得られたデータは既報の CA $\Delta$ V2 (GenBank Accession No. U77082) にマッピングした。決定した配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank, and European Molecular Biology Laboratory (EMBL) に登録した (Accession Nos.: CA $\Delta$ V1 D43 strain, LC557010; CA $\Delta$ V2 A2 strain, LC557011)。

## 細菌人工染色体ベクターへの CAdV ゲノムのクローニング

使用したプライマーは表 1-1-1 に記載した。ガラクトキナーゼ (galK) とカナマイシン耐性遺伝子 (kanR:以後 Kn と記載する) を同一のプロモーター下にクローニングするために、pGalK (National Cancer Institute) から galK 発現カセットをプライマーペア pUC19-GalK F/Kn-GalK R を用いて PCR で増幅し、pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) から Kn をプライマーペア GalK-Kn F/pUC19-Kn R を用いて増幅した。そして、それらの PCR 産物をプライマーペア pUC19-GalK F/pUC19-Kn R を用いて PCR で増幅、結合させた。その PCR 産物を制限酵素 HindIII-XbaI で処理したのち、制限酵素 HindIII-XbaI で処理した pUC19 ベクターに Ligation-Convenience Kit (NIPPON GENE) を用いてクローニングした。得られたプラスミドを pGalK-Kn と名付けた。50 bp の相同配列および制限酵素サイトを galK 発現カセットに付加するために、プライマーペア CAdV1-ITR-GalK F1/CAdV1-ITR-GalK R1 または CAdV2-ITR-GalK F1/CAdV2-ITR-GalK R1 を用いて、pGalK から galK 発現カセットを増幅した。その後、それらの PCR 産物はそれぞれ CAdV1-ITR FR2 または CAdV2-ITR FR2 を用いて増幅した。それらの PCR 産物は、制限酵素 BamHI で処理し、同じく BamHI で処理した pSMART BAC に CopyRight v2.0 BAC Cloning Kit (Lucigen) を用いてクローニングし、プラスミドを BAC-Optimized Replicator v2.0 Electrocompetent cells (Lucigen) に MicroPulser (BioRad) を用いて、プレセットの Ec1 条件で導入した。得られた BAC クローンは pBAC-CAdV1-ITR-GalK および pBAC-CAdV2-ITR-GalK と名付けた。CAdV1 と CAdV2 のゲノムの全長をクローニングするために、大腸菌 SW102 株 (National Cancer Institute) を用いた。SW102 株は、欠損している galK を除き機能的なガラクトースオペロンを保持しており、また 42°C において Red recombinase が誘導される (Warming *et al.*, 2005)。まず、pBAC-CAdV1-ITR-GalK または pBAC-CAdV2-ITR-GalK を保持した SW102 株を 12.5 µg/mL のクロラムフェニコール (CP) を加えた LB 培地 1 mL で 32°C で一晩培養

した。翌日、前日から培養していた大腸菌液 0.5 mL を CP を含む LB 培地 10mL に希釈し、OD<sub>600</sub> が 0.4-0.6 に到達するまで 1.5-2 時間 32°C で培養した。そして、42°C で 15 分間培養し、Red recombinase を誘導した。その後、10-15 分間氷上で大腸菌を冷やし、冷却した H<sub>2</sub>O で三回洗浄し、大腸菌のペレットを 30-50 µL の冷却した H<sub>2</sub>O で懸濁し、氷上に静置した。25 µL の大腸菌液を CAdV1 の DNA 1 µg または CAdV2 の DNA 500 ng と混ぜ、MicroPulser を用いて、プレセットの Ec1 条件でエレクトロポレーションを行った。導入後、CP を含む LB 培地で大腸菌を 32°C で 4.5 時間培養した。その後、大腸菌を M9 培地で 2 回洗浄し、グリセロール、ロイシン、ビオチン、2-デオキシガラクトース、CP を含む M63 最少培地で 3 日間 32°C で培養した。その後、大腸菌のコロニーは以下のプライマーペアを用いて PCR でスクリーニングした。CAdV1 に対しては、SL1/CAdV1 259 R、SL1/CAdV1 30090 F、pSMART BAC 159 R/CAdV1 259 R、pSMART BAC 159 R/CAdV1 30090 F、CAdV2 に対しては、SL1/CAdV2 300 R、SL1/CAdV2 30880 F、pSMART BAC 159 R/CAdV2 300 R、pSMART BAC 159 R/CAdV2 30880 F を用いた。PCR 陽性のクローンは制限酵素で処理し、断片の大きさを電気泳動で確認した。得られた BAC クローンをそれぞれ pBAC-CAdV1 と pBAC-CAdV2 と名付けた。

### 組換え野生型 CAdV の作出

組換え野生型 CAdVs (CAdV-rWTs) を作出するために、それぞれの株のウイルスゲノムをもつ BAC クローンを制限酵素 PvuI で処理、線状化し、PEI (Polysciences) を用いて、MDCK 細胞にトランスフェクトした。5-6 日後に培地と細胞を併せて 3 回凍結融解処理をし、遠心して得られた上清を MDCK 細胞に接種した。CPE が 50-80% の細胞に広がった時点で、上清を回収し、-80°C で保存した。回収したウイルスから DNA を抽出し、各種制限酵素処理後にアガロースゲル電気泳動を行い、それらの切断パターンを野生型 CAdVs (CAdV-WTs) のものと比較することで、CAdV-rWTs が作出できていることを確認した。

## 細菌人工染色体ベクターにおける CAdV のゲノムの改変

E1 領域を欠損した CAdV2 の感染性分子クローンを構築するために、galK-Kn カセットを pGalK-Kn からプライマーペア CAdV2-E1-GalK-Kn F/CAdV2-E1-GalK-Kn R を用いて PCR で増幅した。pBAC-CAdV2 を保持した SW102 株に Red recombinase を加熱誘導し、その後、100 ng の PCR 産物をエレクトロポレーションによって導入した。1 時間培養したのち、CP と 25 µg/mL のカナマイシンを含む LB プレートで培養した。18-24 時間後、大腸菌のコロニーを CP と D-ガラクトースを含むマッコニー寒天培地に継代した。寒天培地上で赤色の大腸菌のコロニーを形成した GalK 陽性大腸菌を CP とカナマイシンを含む LB 培地に移し、一晚培養した。翌日、CP を含む LB 培地 10mL に一晚培養した大腸菌液 0.5mL を希釈し、32°C で 1.5-2 時間培養した後、ヒートショックによって Red recombinase を誘導した。また、Venus 発現カセットを Venus 発現プラスミド (pcDNA3.1-Venus) からプライマーペア CAdV2-Venus cassette F/CAdV2-Venus cassette R を用いて PCR で増幅した。精製した PCR 産物 100 ng を大腸菌内に導入し、galK-Kn カセットを置換した。4.5 時間培養したのち、M9 培地で大腸菌を 2 回洗浄し、グリセロール、ロイシン、ビオチン、2-デオキシガラクトース、CP を含む M63 最少培地で 3 日間 32°C で培養した。生育した大腸菌のコロニーをスクリーニングし、陽性クローンを選別した。得られた BAC クローンを pBAC-CAdV2-ΔE1-Venus と名付けた。

## E1 欠損 CAdV2 変異体の作出

E1 発現プラスミドを構築するために、CAdV2 の E1 領域(Kremer *et al.*, 2000)を PCR で増幅し、制限酵素 HindIII-XhoI で処理した pKS336 ベクターにクローニングし、プラスミド pKS-CAdV2-E1 を作製した。このプラスミドを制限酵素 BsaI で処理、線状化し、PEI を用いて MDCK 細胞にトランスフェクションした。24 時間後、15 µg/mL のブラストサイジ

ンを加え、さらに 4-5 日培養したのち継代し、細胞コロニーを形成させた。これらのコロニーのスクリーニングを行い、得られたクローンの一つを MDCK-CAdV2-E1-26 細胞と名付け、その後の実験に用いた。cGAPDH、E1A、E1B の発現はそれぞれプライマーペア cGAPDH F/cGAPDH R、CAAdV2-E1A F/CAAdV2-E1A R、CAAdV2-E1B F/CAAdV2-E1B R を用いて RT-PCR で確認した。

組換え CAdV を作製するため、pBAC-CAdV2- $\Delta$ E1-Venus を制限酵素 PvuI によって処理、線状化し、PEI を用いて MDCK-CAdV2-E1-26 細胞にトランスフェクションした。5-6 日後、培地と細胞を併せて 3 回凍結融解処理し、遠心上清を MDCK-CAdV2-E1-26 細胞に接種した。CPE が 50-80% の細胞に広がった時点で、上清を回収し、-80°C で保存した。

#### 組換えウイルスの培養細胞における増殖性

MDCK 細胞に CAdV-rWTs あるいは CAdV-WTs を MOI=0.01 で接種した。37°C で 1 時間吸着させ、1%FCS 加 DMEM 培地で 2 回洗浄後、1%FCS 加 DMEM 培地で 6 日間培養した。培養上清を 1 日ごとに回収し、ウイルス力価を測定した。MDCK 細胞を用いたプラークアッセイでウイルス力価を測定した。12well プレートの細胞にウイルスを 1 時間、37°C で吸着させ、接種液を除去したのち、1%FCS、0.8%アガロース加 MEM 培地を加えて培養した。4 日後、アガロース加培地を除去した細胞をメタノールで固定し、0.1%クリスタルバイオレットで染色し、プラーク数を測定した。

組換えウイルス CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の増殖性を調べるために、MDCK 細胞と MDCK-CAdV2-E1-26 細胞に CAdV2- $\Delta$ E1-Venus および対照となる CAdV2-rWT をそれぞれ MOI=0.2 で接種し、上記の手順後、1%FCS 加 DMEM 培地で培養した。ウイルス力価は、MDCK-CAdV2-E1-26 細胞を用いた TCID<sub>50</sub> 法によって測定した。MDCK 細胞で増えた CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の E1 が欠損していることを確認するために、CAdV2- $\Delta$ E1-Venus および対照となる CAdV2-rWT を感染させた細胞の培養上清からウイルス DNA を抽出し、

それらをテンプレートにプライマーペア CAdV2-hexon F/CAdV2-hexon R、CAdV2-E1A F/CAdV2-E1A R を用いて、ヘキソンと E1A 遺伝子の領域をそれぞれ PCR で増幅した。

### 統計解析

CAdV-WTs、CAdV-rWTs の MDCK 細胞における増殖性、CAdV2-rWTs、CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の MDCK 細胞と MDCK-CAdV2-E1-26 細胞におけるウイルスの増殖性の結果は、Student's t-test を用いて解析を行い、統計学的に有意な差を求めた。



## 結果

### BAC をベースとした CAdV 遺伝子改変系の構築

CAdV の感染性 BAC クローンを構築するために、最初に CAdV1 と CAdV2 のゲノムの全長の塩基配列を次世代シーケンサーにより決定した。その結果、CAdV1 と CAdV2 のゲノムはそれぞれ 30533 bp と 31320 bp であり、また、各遺伝子はそれぞれのリファレンスのウイルスのものにマッピングされた。それらの配列をもとに、pBAC-CAdV1-ITR-GalK と pBAC-CAdV2-ITR-GalK を構築し、SW102 株内で Red recombinase による相同性組換えによって、それぞれのウイルスゲノム全長を BAC ベクターに挿入した。PCR によって大腸菌のコロニーのスクリーニングを行い、CAdV1 および CAdV2 のゲノム全長をそれぞれもつ BAC クローン pBAC-CAdV1 と pBAC-CAdV2 を構築した(図 1-1-1A)。pBAC-CAdV1 と pBAC-CAdV2 は制限酵素切断解析から、それらの配列の正当性を確認した(図 1-1-1B)。

### 組換え CAdV1 と CAdV2 の作出およびそれらの増殖性

制限酵素によって pBAC-CAdV1 または pBAC-CAdV2 から CAdV のゲノム DNA 配列を切り出し、MDCK 細胞にトランスフェクションしたところ、3-4 日後に明瞭な CPE が認められ、感染性ウイルス (CAdV-rWTs) の作出に成功した。CAdV-rWTs のゲノムの制限酵素切断パターンは、CAdV-WTs のものと同一であり (図 1-1-2A, B)、そのゲノム構造の正当性が確認された。加えて、CAdV-rWTs の MDCK 細胞における増殖性を調べたところ、それぞれの野生型ウイルス (CAdV-WTs) と同等の増殖性を示した (図 1-1-3A, B)。これらの結果から、pBAC-CAdV1 と pBAC-CAdV2 から作出された組換え CAdV-rWTs は、野生型の表現型をもつことがわかり、BAC をベースとした CAdVs の感染性クローンが確立され、それらを変異ウイルス作製のための遺伝子改変系へ応用できると考えられた。

## E1 欠損 CAdV2 変異体の作出

アデノウイルスの E1 領域は、E1A 遺伝子と E1B 遺伝子に分けられる。E1A タンパク質は、ウイルスの他の初期遺伝子の発現を活性化させ、また宿主タンパク質と結合し、細胞周期を S 期に移行させ、ウイルスの DNA の複製を促進させる (Frisch and Mymryk, 2002)。E1B 遺伝子は E1B 19K と E1B 55K の主に二つのタンパク質をコードしている。E1B 19K タンパク質はアポトーシスを抑制し、E1B 55K タンパク質はウイルスの後期 mRNA を選択的に宿主の核に輸送する (Blackford and Grand, 2009)。これらの遺伝子は、ウイルスの効率的な増殖に必要であり、E1 領域または E1A 遺伝子の欠損により、マストアデノウイルス属のほとんどのアデノウイルスは正常な細胞で増殖が抑制されるため、E1 欠損ウイルスは安全な遺伝子導入用のベクターとして用いることができる (Bangari and Mittal, 2006)。

構築した BAC をベースとする遺伝子改変系の有用性を示すために、E1 領域を欠損した CAdV2 変異体の作出を試みた。まず、pBAC-CAdV2 の E1 遺伝子領域を Venus 発現カセット配列に置換した pBAC-CAdV2- $\Delta$ E1-Venus を構築した (図 1-1-4)。組換え E1 欠損 CAdV2 を作出するために、CAdV2 の E1 タンパク質を恒常的に発現する MDCK-CAdV2-E1-26 細胞を樹立した。MDCK-CAdV2-E1-26 細胞における CAdV2 の E1A と E1B の mRNA 発現は RT-PCR によって確認した (図 1-1-5)。次に、MDCK-CAdV2-E1-26 細胞に pBAC-CAdV2- $\Delta$ E1-Venus から切り出した CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の DNA をトランスフェクションした。回収した上清を MDCK 細胞に感染させたところ Venus の蛍光発現が検出された (図 1-1-4) ことより、CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の作出が確認された。

## E1 欠損 CAdV2 変異体の増殖性

他のマストアデノウイルスと同様に、CAdV2 が効率的に増殖するために E1 遺伝子産物を必要とするかを調べるために、MDCK 細胞と MDCK-CAdV2-E1-26 細胞における CAdV2- $\Delta$ E1-Venus と CAdV2-rWT の増殖性を比較した。MDCK 細胞において、CAdV2-

$\Delta$ E1-Venus の増殖性は CAdV2-rWT に比べ、100 倍以上低かった。一方で、MDCK-CAdV2-E1-26 細胞では、その差は小さかった (図 1-1-6A)。

CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の DNA と MDCK-CAdV2-E1-26 細胞のアデノウイルスに由来する DNA の間で、重複する領域において相同性組換えが起こり、CAdV2- $\Delta$ E1-Venus が E1 遺伝子を再獲得し、MDCK 細胞において増殖できるようになった可能性がある (Lochmüller *et al.*, 1994; Hehir *et al.*, 1996)。その可能性を検証するために、MDCK 細胞で増殖させた CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の DNA を抽出し、E1 遺伝子領域の有無を PCR によって調べた。その結果、CAdV2- $\Delta$ E1-Venus の DNA において、ヘキソン遺伝子領域は検出されたが、E1A 遺伝子領域は検出されなかった (図 1-1-6B)。これらの結果から、E1 遺伝子産物は CAdV2 の MDCK 細胞における増殖に必須ではないが、効率的な増殖には必要であることがわかった。

## 考察

大型で不安定な DNA 断片をクローニングし、大腸菌内で増やすことを目的とした BAC をベースとした遺伝子改変系は、主にヘルペスウイルスのようなゲノムサイズの大きな DNA ウイルスに用いられてきた(Messerle *et al.*, 1997)。しかし近年、HAdV やサルアデノウイルスの遺伝子改変にも用いられており、他のアデノウイルスにも応用できると考えられた(Dicks *et al.*, 2012; Mück-Häusl *et al.*, 2015)。そこで本研究では、BAC をベースとした CAdV の遺伝子改変系を構築した。

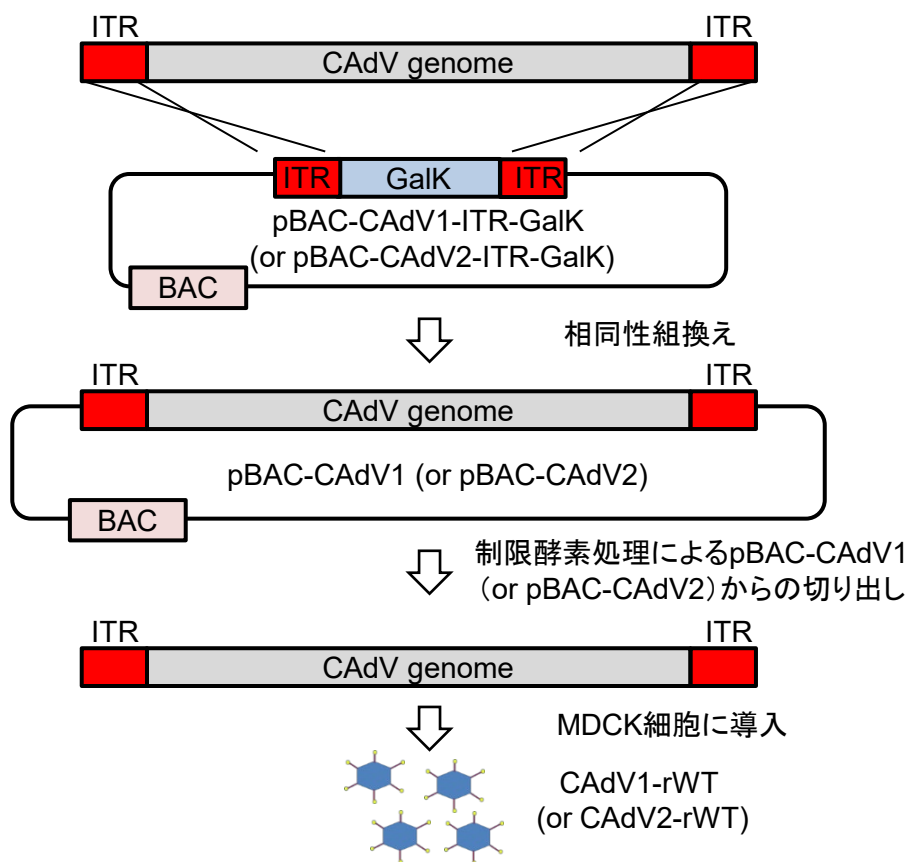
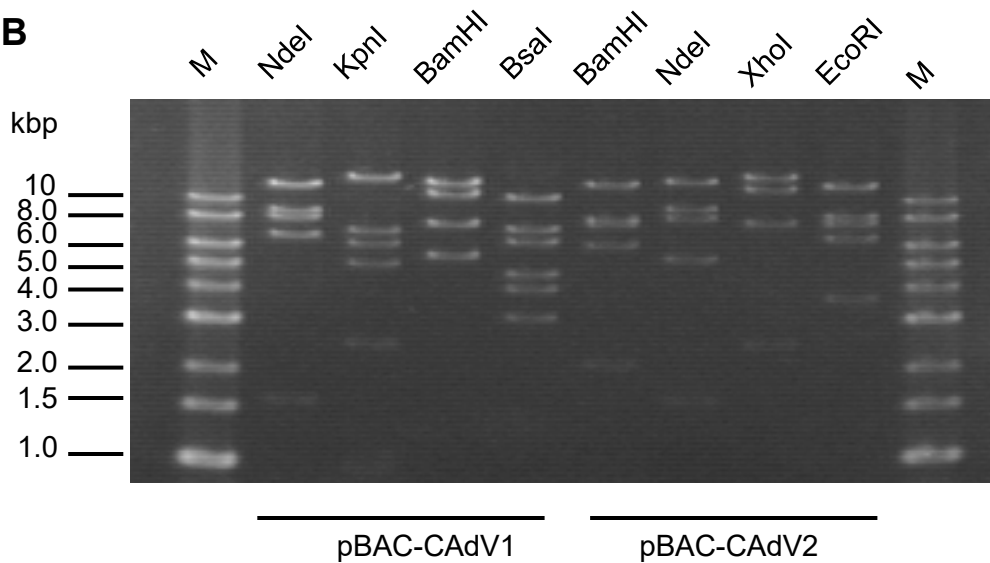
CAdV の病原性解析のような基礎研究や、CAdV をベースとする組換えワクチンや遺伝子導入ベクターの開発のような実用的な研究を行うために、ウイルスゲノム上に任意の遺伝子改変を導入できる遺伝子改変系は必須のツールである。これまでの CAdV の遺伝子改変系は、*in vitro* ligation、哺乳類細胞や大腸菌内での相同性組換えなどを用いる方法であった。これらの手法は、プラスミドにおけるウイルス DNA の不安定さに加え、ゲノムを改変するために、ユニークな制限酵素サイトや長い相同配列が必要であり、感染性分子クローンや変異ウイルスを作出するために非常に多くの時間と労力を必要とした(Klonjowski *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2015)。そのような問題を解決するために、本研究ではわずか 50 bp の短い相同配列しか必要としない BAC のクローニング手法(Warming *et al.*, 2005)を CAdV の遺伝子改変系に応用し、野生型と同等の表現型を示す CAdV1 と CAdV2 の感染性 BAC クローンの作出に成功した。さらに、E1 欠損 CAdV2 変異体の作出にこのシステムを用いることで、BAC の組換え手法によって容易に遺伝子改変できることを示した。これらのことから、本研究で開発した BAC を用いた遺伝子改変系は、簡便かつ効率的に組換え CAdV を作出できる手法であり、既存の手法より優れている。

将来的には、E1 欠損 CAdV2 変異体は組換えワクチンや、遺伝子導入ベクター、OV のバ

ックボーンとして用いられる可能性がある(Kremer *et al.*, 2000; Bangari and Mittal, 2006; Bru, Salinas and Kremer, 2010)。興味深いことに、この CAdV2 変異体は、野生型ウイルスに比べ増殖性は劣るものの、MDCK 細胞で増殖することができた。マストアデノウイルス属のアデノウイルスにおいて、ウイルスの増殖における E1 遺伝子の要求性はウイルス種によって異なる。例えば、E1 欠損ヒトアデノウイルス 5 型 (HAdV5) は、正常細胞では増殖しないため、安全なベクターとして長年用いられている(Jones and Shenk, 1979)。一方で、E1A 欠損マウスアデノウイルス 1 型は、*in vitro* において、野生型ウイルスと同程度増殖する(Ying, Smith and Spindler, 1998)。本研究では、MDCK 細胞以外の細胞を調べていないが、一部の細胞では E1 様因子が発現しており、E1 欠損 HAdV5 の増殖を支持することがわかっている(Imperiale *et al.*, 1984; Spergel and Chen-Kiang, 1991; Spergel *et al.*, 1992)。そのため、MDCK 細胞が E1 欠損 CAdV2 の増殖を支持するような E1 様因子を発現しているか否かは興味深い。

本研究において、E1 欠損 CAdV2 変異体は、MDCK 細胞において野生型ウイルスより増殖性が低いということが明らかになり、このことからこの変異体は *in vivo* においても弱毒化している可能性が考えられ、CAdV に対する弱毒生ワクチンとしての潜在性がある。従って、これまでの研究においても試みられているように、狂犬病やイヌジステンパーウイルス、イヌインフルエンザウイルスなどのイヌで問題となる他の病原体の抗原を搭載したこの変異体ベースの組換えウイルスは、イヌ科の動物への多価ワクチンとして応用できるかもしれない(Fischer *et al.*, 2002; Tordo *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2017)。

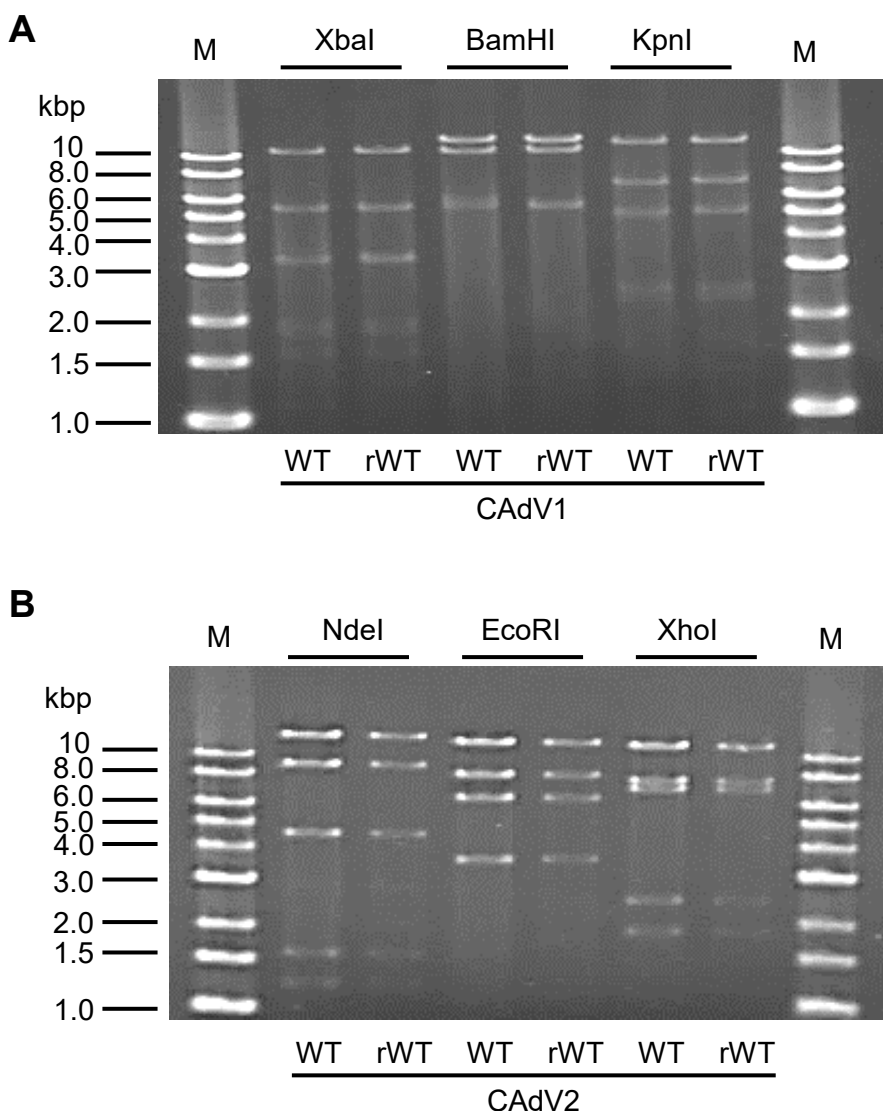
本節をまとめると、簡便で効率的に CAdV ゲノムの遺伝子改変を行うことのできる BAC を用いた遺伝子改変系を初めて開発した。この遺伝子改変系は、CAdV の基礎研究および実用的な応用研究の両方に有用なツールとなると期待される。

**A****B**

### 図1-1-1 イヌアデノウイルス(CAdV)ゲノムの細菌人工染色体(BAC)ベクターへのクローニング

(A) pBAC-CAdV1-ITR-GalK (または pBAC-CAdV2-ITR-GalK) を持った大腸菌 SW102 株に、CAdV1 (または CAdV2) の DNA を導入した。pBAC-CAdV1-ITR-GalK (または pBAC-CAdV2-ITR-GalK) は、ガラクトキナーゼ発現カセットの両端に約 50-bp のウイルスゲノムの ITR の配列をもつ。Red recombinase による組換え後、GalK を用いて大腸菌の選抜を行い、pBAC-CAdV1 (または pBAC-CAdV2) を得た。その後、このプラスミドを制限酵素処理し、ウイルスゲノムを切り出し、MDCK 細胞にトランスフェクションし、組換え野生型ウイルスである CAdV1-rWT (または CAdV2-rWT) を作出した。

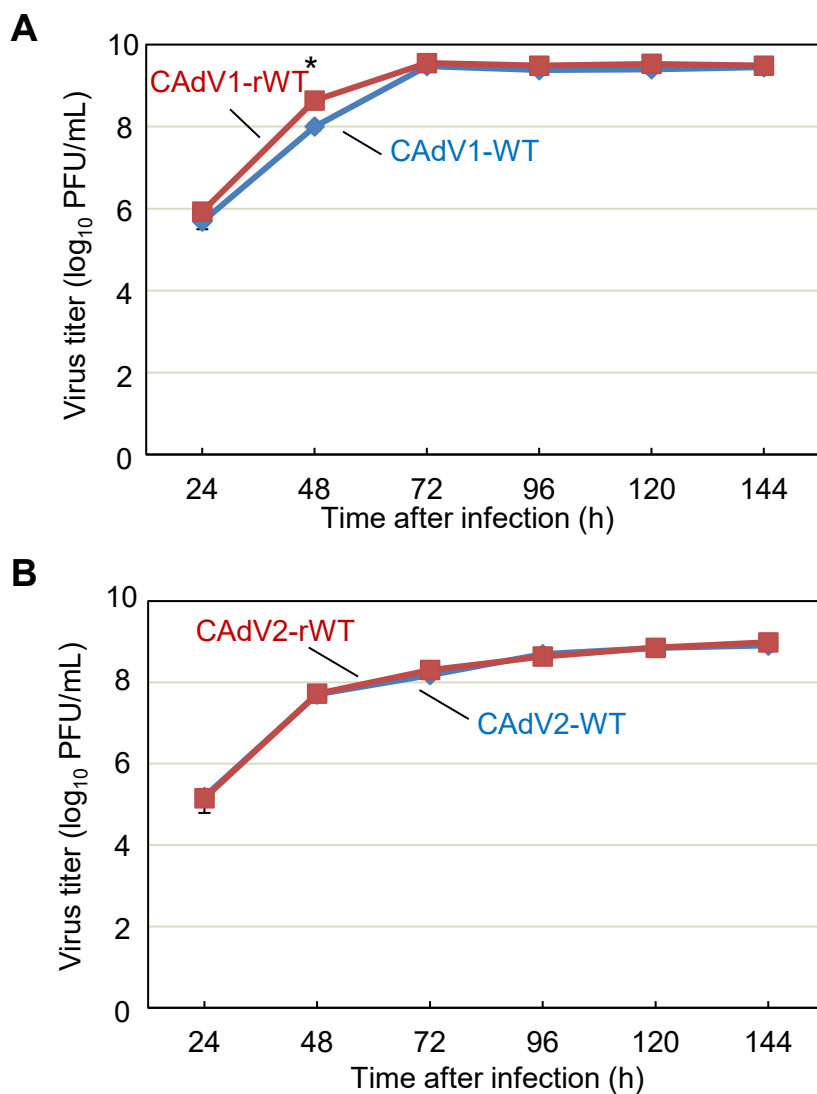
(B) pBAC-CAdV1 と pBAC-CAdV2 の制限酵素による解析。pBAC-CAdV1 を NdeI、KpnI、BamHI、BsaI で、pBAC-CAdV2 を BamHI、NdeI、XhoI、EcoRI で制限酵素処理した。pBAC-CAdV1 の切断後の断片の予想される分子量は、NdeI については 13099、8710、8038、6737、1603 bp であり、KpnI については 16319、7077、6210、5110、2490、981 bp であり、BamHI については 13573、10982、7620、5549、463 bp であり、BsaI については 10530、7212、6386、4670、4041、3117、825、493、471、153、147、142 bp である。pBAC-CAdV2 の切断後の断片の予想される分子量は、BamHI については 13521、7998、7620、6151、2109、851、722 bp であり、NdeI については 14820、9059、8127、5363、1603 bp であり、XhoI については 16628、12194、7688、2462 bp であり、EcoRI については 13014、8192、7592、6532、3642 bp である。M は 1-kb DNA ラダーマーカーを示している。



### 図1-1-2 野生型(WT)、組換え野生型(rWT)ウイルスゲノムの制限酵素による解析

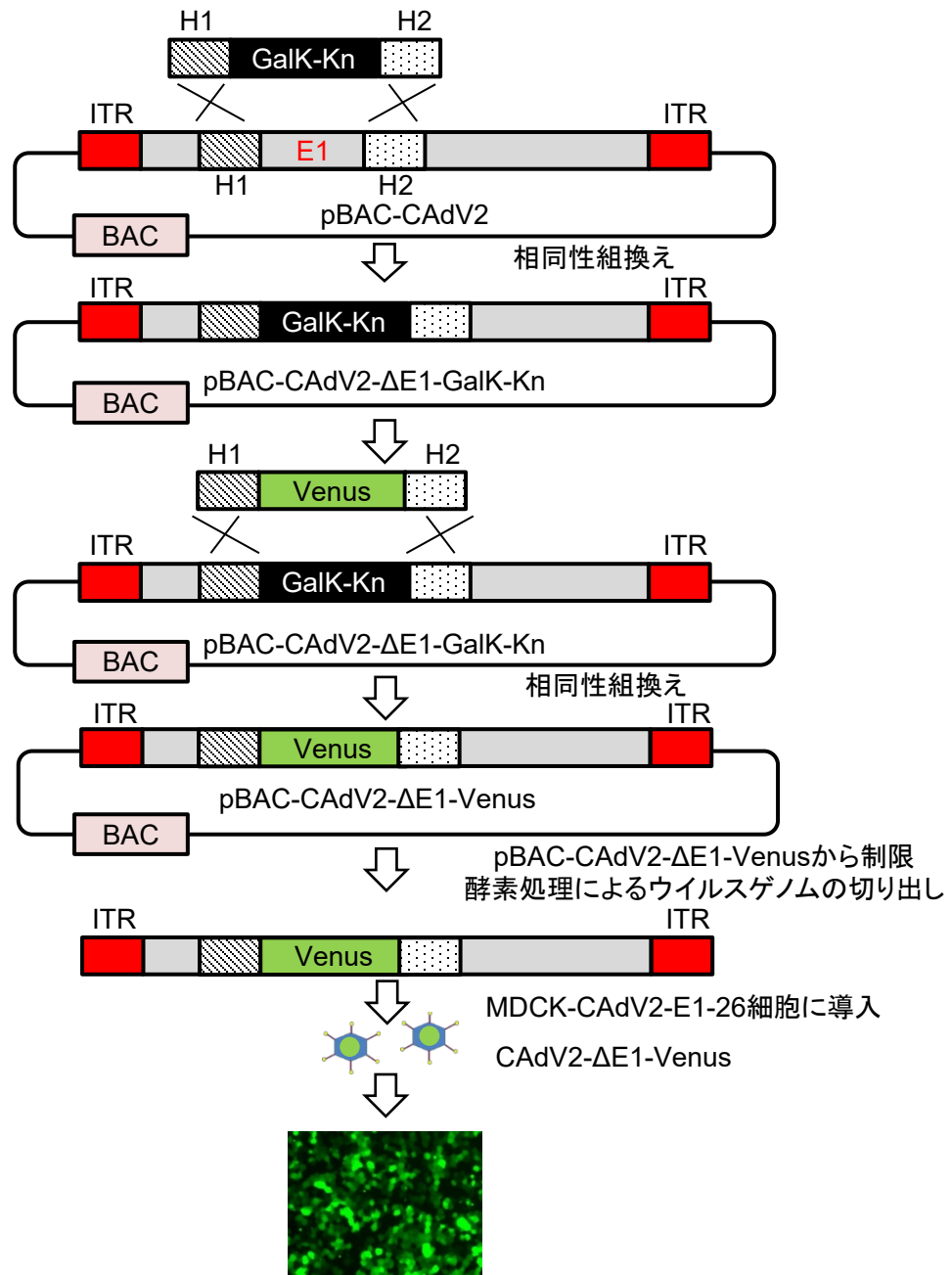
(A) CAdV1-WT、CAdV1-rWTのウイルスゲノムをXbaI、BamHI、KpnIで制限酵素処理した。切断後の断片の予想される分子量は、XbaIについては11250、5551、3383、3301、1955、1834、1587、775、519、333、45 bpであり、BamHIについては13554、10982、5534、463 bpであり、KpnIについては12573、7077、5110、2490、2302、981 bpである。(B) CAdV2-WT、CAdV2-rWTのウイルスゲノムをNdeI、EcoRI、XhoIで制限酵素処理した。切断後の断片の予想される分子量は、NdeIについては14820、9059、4585、1603、1253 bpであり、EcoRIについては13014、8192、6504、3610 bpであり、XhoIについては12194、7688、7089、2462、1887 bpである。Mは1-kb DNAラダーマーカーを示している。





**図1-1-3 野生型(WT)と組換え野生型(rWT)ウイルスの増殖曲線**

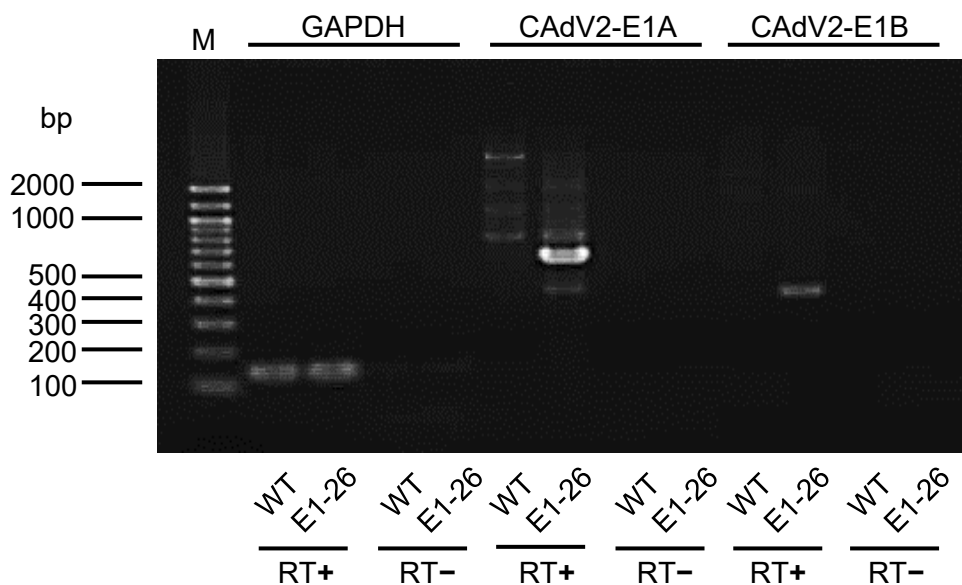
MDCK細胞に(A) CAAdV1-WTまたはCAAdV1-rWT (B) CAAdV2-WT またはCAAdV2-rWTをMOI=0.01で接種した。経時的に培養上清を回収し、プラークアッセイによってウイルス力価を測定した。3回の独立した実験で得られたデータを平均し、標準偏差を付与した。アスタリスクは統計学的に有意な差を示している(\*は $p<0.05$ )。



CAV2-ΔE1-Venusを感染させたMDCK細胞

#### 図1-1-4 E1欠損 CAdV2変異体の作出

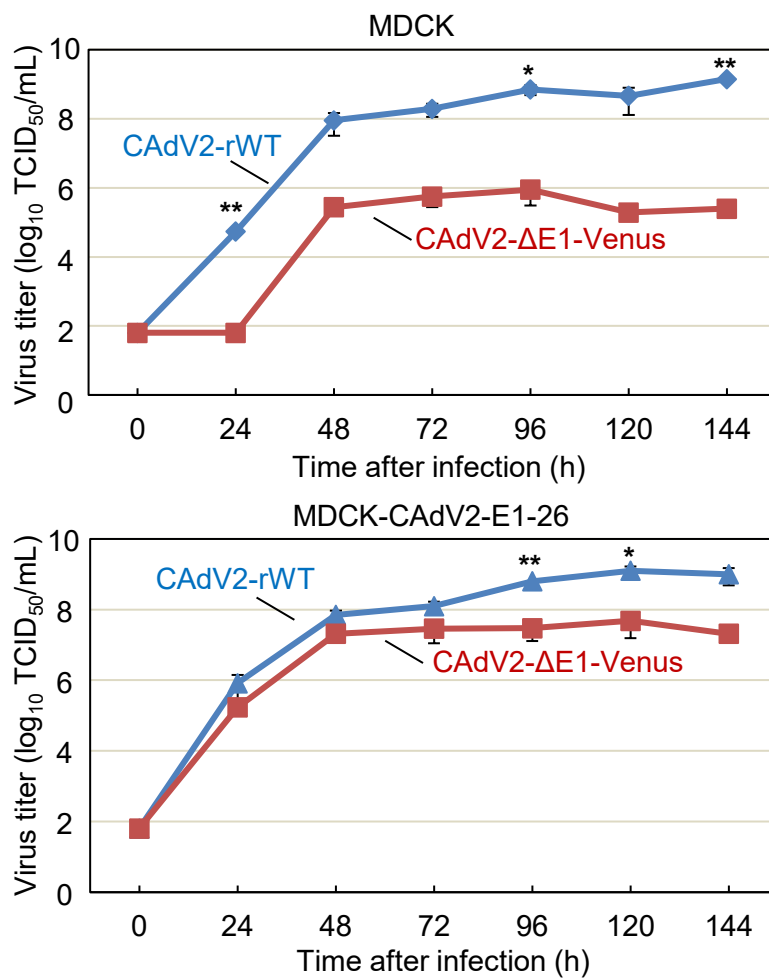
pBAC-CAdV2のE1領域をVenus発現カセットに置換した。両端に相同性配列1 (H1)、相同性配列2 (H2)をもつガラクトキナーゼ、カナマイシン発現カセット (galK-Kn)をPCRによって増幅し、pBAC-CAdV2をもつ大腸菌SW102株に導入した。相同性組換え後、大腸菌をGalKとKnによって選抜し、pBAC-CAdV2-ΔE1-GalKを得た。両端に相同性配列1 (H1)、相同性配列2 (H2)をもつVenus発現カセットをPCRによって増幅し、pBAC-CAdV2-ΔE1-GalKをもつ大腸菌SW102株に導入した。相同性組換え後、GalKに対する選抜を行い、pBAC-CAdV2-ΔE1-Venusを得た。制限酵素で処理したpBAC-CAdV2-ΔE1-VenusをMDCK-CAdV2-E1-26細胞にトランスフェクションし、CAdV2-ΔE1-Venusを得た。MDCK細胞にCAdV2-ΔE1-VenusをMOI=0.4で接種し、蛍光顕微鏡でVenusの発現を確認した。感染24時間後の細胞を示した。



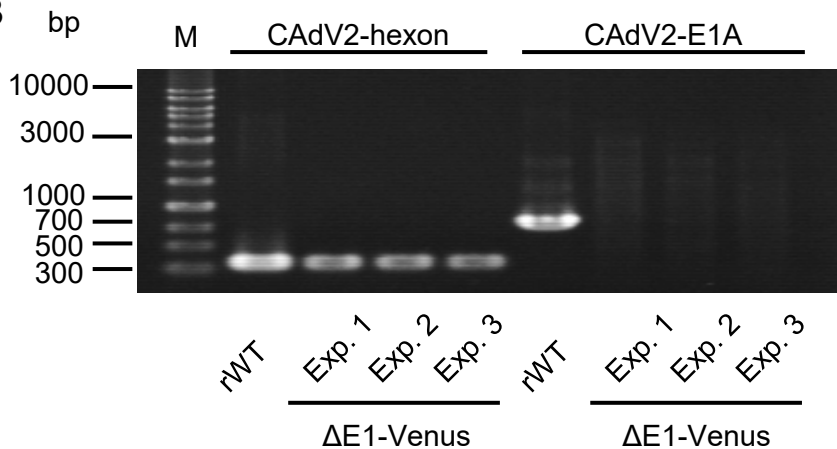
**図1-1-5 MDCK-CAAdV2-E1-26細胞におけるCAAdV2 E1遺伝子の発現**

MDCK細胞(WT)およびMDCK-CAAdV2-E1-26細胞(E1-26)からRNAを抽出した。イヌグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)、CAAdV2-E1A、CAAdV2-E1Bに特異的なプライマーを用いて、逆転写を行う場合(RT+)と逆転写を行わない場合(RT-)にわけてRT-PCRを行った。Mは100-bpラダーマーカを示している。

**A**



**B**



### 図1-1-6 CAAdV2-ΔE1-Venusの性状解析

(A) CAAdV2-rWTおよびCAAdV2-ΔE1-Venusの増殖曲線。MDCK細胞とMDCK-CAAdV2-E1-26細胞にCAAdV2-rWTまたはCAAdV2-ΔE1-VenusをMOI=0.2で接種した。経時的に培養上清を回収し、MDCK-CAAdV2-E1-26細胞でウイルス力価(TCID<sub>50</sub>/mL)を測定した。3回の独立した実験で得られたデータを平均し、標準偏差を付与した。アスタリスクは統計学的に有意な差を示している(\*はp<0.05、\*\*はp<0.01)。(B) CAAdV2-rWTおよびCAAdV2-ΔE1-Venusの解析。3回の異なる実験によりCAAdV2-ΔE1-Venusを作出した(Exp.1、2、3)。MDCK細胞で増殖させたCAAdV2-rWTおよびCAAdV2-ΔE1-VenusからウイルスDNAを抽出し、CAAdV2のヘキソン、E1A遺伝子に特異的なプライマーでPCRを行った。Mは1-kb DNAラダーマーカーを示している。

表1-1-1 本章第一節の解析に用いたプライマー

| Primer                 | Sequence (5' – 3')  | Sequence capitalized                     |
|------------------------|---|--|
| pUC19-Galk F           | gacgTCTAGAcctgtgacaattaatcacc   | restriction enzyme site                  |
| Kn-Galk R              | ccatctgttcaatcatGTACAGCCTCCTTcagcactgctcgtccttg                           | Shine-Dalgarno (SD) sequence             |
| Galk-Kn F              | AGGAGGCTGTACatgattgaacaagatggattg   | Shine-Dalgarno (SD) sequence             |
| pUC19-Kn R             | ggtcAAGCTTtcagaagaactgctcaagaag   | restriction enzyme site                  |
| CAdV1-ITR-Galk F1      | GGACAAAGAGGTGTGGCCTAAATGTTGTTTTTcctgtgacaattaatcaccg                      | inverted terminal repeats (ITR) sequence |
| CAdV1-ITR-Galk R1      | GGACAAAGAGGTGTGGCCTAAATGTTGTTTTTcagcactgctcgtccttg                        | inverted terminal repeats (ITR) sequence |
| CAdV2-ITR-Galk F1      | GGACAAAGAGGTGTGGCTTAAATTTGGGCGTTcctgtgacaattaatcaccg                      | inverted terminal repeats (ITR) sequence |
| CAdV2-ITR-Galk R1      | GGACAAAGAGGTGTGGCTTAAATTTGGGCGTTTcagcactgctcgtccttg                       | inverted terminal repeats (ITR) sequence |
| CAdV1-ITR FR2          | atctGGATCCTTAAATTAACGATCGcatcatcaataataatcacaggacaagaaggtggtgacctaaatgttg | inverted terminal repeats (ITR) sequence |
| CAdV2-ITR FR2          | atctGGATCCGCGGCGCGGATCGcatcatcaataataatcacaggacaagaaggtggtgacctaaatgttg   | inverted terminal repeats (ITR) sequence |
| SL1                    | cagtcacgttacgctgagtc  |  |
| SMART BAC 159R         | aacctctaacgtgccgatcag   |  |
| CAdV1 259R             | gtctcaaggctagacaataaacc   |  |
| CAdV2 300R             | acattaggcgtggaggaaactg  |  |
| CAdV1 30090F           | gtctgtgagctccagatgag  |  |
| CAdV2 30880F           | agaggagagctatgaggatg  |  |
| CAdV2-E1-Galk-Kn F     | GGTTTTTCGCCACGCCCTTTGGGTAAATTTATTTCCCTATACGCGGCCCTTcctgtgacaattaatcaccg   | homologous sequence                      |
| CAdV2-E1-Galk-Kn R     | ATTCTCTGCACAACCCCCCGAGGGCTGCAATTACACACATTGACAAAAGTtcagaagaactgctcaagaaggg | homologous sequence                      |
| CAdV2-Venus cassette F | ATTCTCTGCACAACCCCCCGAGGGCTGCAATTACACACATTGACAAAAGTgacattgattttagctag      | homologous sequence                      |
| CAdV2-Venus cassette R | GGTTTTTCGCCACGCCCTTTGGGTAAATTTATTTCCCTATACGCGGCCCTTccatagagccccaccatcc    | homologous sequence                      |
| cGAPDHF                | cgatggtgaagggtcggatg  |  |
| cGAPDH R               | actggaaacatgtacaccatgtagtt  |  |
| CAdV2-E1A F            | agagctactggaagagtgcc  |  |
| CAdV2-E1A R            | tctgttgtctcaggctctg   |  |
| CAdV2-E1B F            | cacittagaataatgccagag   |  |
| CAdV2-E1B R            | ctttcactaatgcaacacac  |  |
| CAdV2-hexon F          | tacatgaatgttagattacc  |  |
| CAdV2-hexon R          | gggtgatgctctgaaigtg   |  |

第一章第二節、第二章、第三章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため、公表できない。5 年以内に出版する予定である。

第四章の内容は、イヌの癌を対象とした腫瘍溶解性ウイルスに関する特許申請に関わるため公表できない。5 年以内に特許取得予定である。

## 引用文献

Adams, V. J. *et al.* (2010) 'Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK', *Journal of Small Animal Practice*, 51(10), pp. 512–524.

Adelfinger, M. *et al.* (2014) 'Evaluation of a new recombinant oncolytic vaccinia virus strain GLV-5b451 for feline mammary carcinoma therapy', *PLoS ONE*, 9(8), pp. e104337.

Adler, H., Messerle, M. and Koszinowski, U. H. (2001) 'Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences', *Journal of Virology*, 75(12), pp. 5692–5696.

Anderson, W. F., Blaese, R. M. and Culver, K. (1990) 'The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol', *Human Gene Therapy*, 1(3), pp. 331–362.

Andtbacka, R. H. I. *et al.* (2019) 'Final analyses of OPTiM: A randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III-IV melanoma', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), pp. 145.

Annels, N. E. *et al.* (2019) 'Phase I trial of an ICAM-1-targeted immunotherapeutic-coxsackievirus A21 (CVA21) as an oncolytic agent against non muscle-invasive bladder cancer', *Clinical Cancer Research*, 25(19), pp. 5818–5831.

Asada, T. (1974) 'Treatment of human cancer with mumps virus', *Cancer*, 34(6), pp. 1907–



1928.

Aye, Y. *et al.* (2014) 'Ribonucleotide reductase and cancer: Biological mechanisms and targeted therapies', *Oncogene*, 34(16), pp. 2011–2021.

Bah, E. S. *et al.* (2020) 'Retargeted and stealth modified oncolytic measles viruses for systemic cancer therapy in measles-immune patients', *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(10), pp. molcanther.0134.2020.

Balboni, A. *et al.* (2019) 'Genetic characterization of canine adenovirus type 1 detected by real-time polymerase chain reaction in an oral sample of an Italian wolf (*Canis lupus*)', *Journal of Wildlife Diseases*, 55(3), pp. 737–741.

Bangari, D. S. and Mittal, S. K. (2006) 'Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors', *Vaccine*, 24(7), pp. 849–862.

Barroga, E. F. *et al.* (1999) 'Establishment and characterization of the growth and pulmonary metastasis of a highly lung metastasizing cell line from canine osteosarcoma in nude mice', *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(4), pp. 361–367.

Bartha, A. (1961) 'Experiments to reduce the virulence of Aujeszky's virus.', *Magy. Allatorv. Lapja*, 16, pp. 42–45.

Bergman, P. J. (2007) 'Canine oral melanoma', *Clinical Techniques in Small Animal Practice*,

22(2), pp. 55–60.

Berkner, K. L. and Sharp, P. A. (1983) ‘Generation of adenovirus by transfection of plasmids’, *Nucleic Acids Research*, 11(17), pp. 6003–6020.

Bischoff, J. R. *et al.* (1996) ‘An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells’, *Science*, 274(5286), pp. 373–376.

Blackford, A. N. and Grand, R. J. A. (2009) ‘Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: Multiple roles in viral infection and cell transformation’, *Journal of Virology*, 83(9), pp. 4000–4012.

Boldogkői, Z. *et al.* (1999) ‘Construction of a recombinant herpesvirus expressing the jellyfish green fluorescent protein’, *Luminescence*, 14(2), pp. 69–74.

Borland, S. *et al.* (2020) ‘Influenza A virus infection in cats and dogs: A literature review in the light of the “One Health” concept’, *Frontiers in Public Health*, 20(8), pp. 83.

Breitbach, C. J. *et al.* (2015) ‘A phase 2, open-label, randomized study of Pexa-Vec (JX-594) administered by intratumoral injection in patients with unresectable primary hepatocellular carcinoma’, *Methods in Molecular Biology*, 1317, pp. 343–357.

Bricker, T. L. *et al.* (2020) ‘A single intranasal or intramuscular immunization with chimpanzee adenovirus vectored SARS-CoV-2 vaccine protects against pneumonia in hamsters’, *bioRxiv*, preprint.

- Bru, T., Salinas, S. and Kremer, E. J. (2010) 'An update on canine adenovirus type 2 and its vectors', *Viruses*, 2(9), pp. 2134–2153.
- Bunpapong, N. *et al.* (2014) 'Genetic characterization of canine influenza A virus (H3N2) in Thailand', *Virus Genes*, 48(1), pp. 56–63.
- Card, J. P. *et al.* (1992) 'Pseudorabies virus envelope glycoprotein gI influences both neurotropism and virulence during infection of the rat visual system.', *Journal of Virology*, 66(5), pp. 3032–3041.
- Chartier, C. *et al.* (1996) 'Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*.', *Journal of Virology*, 70(7), pp. 4805–4810.
- Chen, Y. *et al.* (2000) 'Pre-existent adenovirus antibody inhibits systemic toxicity and antitumor activity of CN706 in the nude mouse LNCaP xenograft model: Implications and proposals for human therapy', *Human Gene Therapy*, 11(11), pp. 1553–1567.
- Chen, Y. *et al.* (2018) 'Emergence and evolution of novel reassortant influenza A viruses in canines in southern China', *mBio*, 9(3), pp. e00909–18.
- Cheng, P. H. *et al.* (2015) 'Oncolytic replication of E1b-deleted adenoviruses', *Viruses*, 7(11), pp. 5767–5779.

Cheng, T. *et al.* (2017) 'A novel oncolytic adenovirus based on simian adenovirus serotype 24', *Oncotarget*, 8(16), pp. 26871–26885.

Cloughesy, T. F. *et al.* (2020) 'Effect of vocimagene amiretrorepvec in combination with flucytosine vs standard of care on survival following tumor resection in patients with recurrent high-grade glioma: A randomized clinical trial', *JAMA Oncology*, 6(12), pp. 1939–1946.

Crawford, P. C. *et al.* (2005) 'Epidemiology: Transmission of equine influenza virus to dogs', *Science*, 310(5747), pp. 482–485.

Cunningham, C. and Davison, A. J. (1993) 'A cosmid-based system for constructing mutants of Herpes simplex virus type 1', *Virology*, 197(1), pp. 116–124.

Decaro, N. *et al.* (2007) 'Infectious canine hepatitis: An “old” disease reemerging in Italy', *Research in Veterinary Science*, 83(2), pp. 269–273.

Delva, J. L. *et al.* (2020) 'The attenuated pseudorabies virus vaccine strain Bartha K61: A brief review on the knowledge gathered during 60 years of research', *Pathogens*, 9(11), pp. 897.

Desai, P. *et al.* (2001) 'A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation', *Journal of Virology*, 75(21), pp. 10259–10271.

Desjardins, A. *et al.* (2014) 'Oncolytic polio/rhinovirus recombinant (PVSRIPO) in recurrent glioblastoma (GBM): First phase I clinical trial evaluating the intratumoral administration',

*Neuro-Oncology*, 16(suppl 3), pp. iii43–iii43.

Dicks, M. D. J. *et al.* (2012) ‘A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: Improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity’, *PLoS ONE*, 7(7), pp. e40385.

Dijkstra, J. M., Mettenleiter, T. C. and Klupp, B. G. (1997) ‘Intracellular processing of pseudorabies virus glycoprotein M (IgM): gM of strain Bartha lacks N-glycosylation’, *Virology*, 237(1), pp. 113–122.

Ditchfield, J., Macpherson, L. W. and Zbitnew, A. (1962) ‘Association of canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis (“Kennel Cough”): A preliminary report.’, *The Canadian Veterinary Journal*, 3(8), pp. 238–247.

Domi, A. and Moss, B. (2002) ‘Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), pp. 12415–12420.

van Doremalen, N. *et al.* (2020) ‘ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques’, *Nature*, 586(7830), pp. 578–582.

Doronin, K. *et al.* (2000) ‘Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein’, *Journal of Virology*, 74(13), pp. 6147–6155.

Doronin, K. *et al.* (2003) 'Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of Adenovirus', *Virology*, 305(2), pp. 378–387.

Du, W. and Searle, J. (2012) 'The Rb pathway and cancer therapeutics', *Current Drug Targets*, 10(7), pp. 581–589.

Felt, S. A. and Grdzlishvili, V. Z. (2017) 'Recent advances in vesicular stomatitis virus-based oncolytic virotherapy: A 5-year update', *Journal of General Virology*, pp. 2895–2911.

Fischer, L. *et al.* (2002) 'Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge', *Vaccine*, 20(29–30), pp. 3485–3497.

Fleming, J. M., Creevy, K. E. and Promislow, D. E. L. (2011) 'Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: An investigation into age-, size-, and breed-related causes of death', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), pp. 187–198.

Folegatti, P. M. *et al.* (2020) 'Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial', *The Lancet*, 396(10249), pp. 467–478.

Freeman, A. I. *et al.* (2006) 'Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme', *Molecular Therapy*, 13(1), pp. 221–228.

- Frisch, S. M. and Mymryk, J. S. (2002) 'Adenovirus-5 E1A: Paradox and paradigm', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 441–452.
- Fueyo, J. *et al.* (2000) 'A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo', *Oncogene*, 19(1), pp. 2–12.
- Galanis, E. *et al.* (2015) 'Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer', *Cancer Research*, 75(1), pp. 22–30.
- Garber, K. (2006) 'China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment.', *Journal of the National Cancer Institute*, 98(5), pp. 298–300.
- Garcia-Carbonero, R. *et al.* (2017) 'Phase 1 study of intravenous administration of the chimeric adenovirus enadenotucirev in patients undergoing primary tumor resection', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1), pp. 71.
- Garcia-Carbonero, R. *et al.* (2019) 'Systemic administration of the hyaluronidase-expressing oncolytic adenovirus VCN-01 in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer: First-in-human clinical trial', *Annals of Oncology*, 30, pp. v271–v272.
- García, M. *et al.* (2019) 'A Phase 1 trial of oncolytic adenovirus ICOVIR-5 administered intravenously to cutaneous and uveal melanoma patients', *Human Gene Therapy*, 30(3), pp. 352–364.

García Marín, J. F. *et al.* (2018) 'Canine adenovirus type 1 (CAV-1) in free-ranging European brown bear (*Ursus arctos arctos*): A threat for Cantabrian population?', *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), pp. 2049–2056.

Geevarghese, S. K. *et al.* (2010) 'Phase I/II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver', *Human Gene Therapy*, 21(9), pp. 1119–1128.

Geletneky, K. *et al.* (2012) 'Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol', *BMC Cancer*, 12.

Gentschev, I. *et al.* (2009) 'Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: Preclinical development of a therapeutic agent', *Cancer Gene Therapy*, 16(4), pp. 320–328.

Gentschev, I. *et al.* (2014) 'Oncolytic virotherapy of canine and feline cancer', *Viruses*, 6(5), pp. 2122–2137.

Gräble, M. and Hearing, P. (1990) 'Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant.', *Journal of Virology*, 64(5), pp. 2047–2056.



Graham, F. L. *et al.* (1977) 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *Journal of General Virology*, 36(1), pp. 59–72.

Gulley, J. L. *et al.* (2019) 'Phase III Trial of PROSTVAC in asymptomatic or minimally symptomatic metastatic castration-resistant prostate cancer', in *Journal of Clinical Oncology*, pp. 1051–1061.

Hackenbrack, N. *et al.* (2017) 'Evolution and cryo-electron microscopy capsid structure of a north american bat adenovirus and its relationship to other mastadenoviruses', *Journal of Virology*, 91(2), pp. e01504-16.

Hayashi, K. (1995) 'Role of tight junctions of polarized epithelial MDCK cells in the replication of herpes simplex virus type 1', *Journal of Medical Virology*, 47(4), pp. 323–329.

He, T. C. *et al.* (1998) 'A simplified system for generating recombinant adenoviruses', in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp. 2509–2514.

Hehir, K. M. *et al.* (1996) 'Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence.', *Journal of Virology*, 70(12), pp. 8459–8467.

Hemminki, A. *et al.* (2003) 'A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model', *Molecular Therapy*, 7(2), pp. 163–173.

Hemminki, O. *et al.* (2011) 'Oncolytic adenovirus based on serotype 3', *Cancer Gene Therapy*, 18(4), pp. 288–296.

Hemminki, O., Dos Santos, J. M. and Hemminki, A. (2020) 'Oncolytic viruses for cancer immunotherapy', *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1), pp. 84.

Hirooka, Y. *et al.* (2018) 'A Phase I clinical trial of EUS-guided intratumoral injection of the oncolytic virus, HF10 for unresectable locally advanced pancreatic cancer', *BMC Cancer*, 18(1).

Hirt, B. (1967) 'Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures', *Journal of Molecular Biology*, 26(2), pp. 365–369.

Hong, S. H. *et al.* (1998) 'Establishment and characterization of two cell lines derived from canine spontaneous osteosarcoma', *Journal of Veterinary Medical Science*, 60(6), pp. 757–760.

Houng, H. S. H. *et al.* (2010) 'Genome sequences of Human Adenovirus 14 isolates from mild respiratory cases and a fatal pneumonia, isolated during 2006-2007 epidemics in North America', *Respiratory Research*, 11(1), pp. 116.

Hu, R. *et al.* (2006) 'Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein', *Microbes and Infection*, 8(4), pp. 1090–1097.

- Huang, T. G. *et al.* (2003) 'Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment', *Gene Therapy*, 10(15), pp. 1241–1247.
- Hwang, C. C. *et al.* (2013) 'Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor', *PLoS ONE*, 8(9), pp. e73555.
- Hwang, C. C. *et al.* (2018) 'Oncolytic reovirus therapy: Pilot study in dogs with spontaneously occurring tumours', *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(2), pp. 229–238.
- Ibricevic, A. *et al.* (2006) 'Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells', *Journal of Virology*, 80(15), pp. 7469–7480.
- Igase, M. *et al.* (2015) 'The oncolytic effects of reovirus in canine solid tumor cell lines', *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(5), pp. 541–548.
- Imperiale, M. J. *et al.* (1984) 'Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes: evidence for a cellular E1A-like activity.', *Molecular and Cellular Biology*, 4(5), pp. 867–874.
- Inoue, K. *et al.* (2004) 'Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines', *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(11), pp. 1437–1440.
- Inoue, M. *et al.* (2015) 'A current life table and causes of death for insured dogs in Japan', *Preventive Veterinary Medicine*, 120(2), pp. 210–218.

- Jones, N. and Shenk, T. (1979) 'Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells', *Cell*, 17(3), pp. 683–689.
- Jourdier, T. M. *et al.* (2003) 'Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2)', *Gene Therapy*, 10(26), pp. 2126–2132.
- Kamiki, H. *et al.* (2019) 'Adaptation of H3N2 canine influenza virus to feline cell culture', *PLoS ONE*, 14(10), pp. e0223507.
- Kasza, L. and Griesemer, R. A. (1967) 'The production of cytopathic changes in canine cell lines by infectious agents: Cell lines derived from melanoma and thyroidal carcinoma', *Veterinary Pathology*, 4(4), pp. 378–390.
- Ketner, G. *et al.* (1994) 'Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), pp. 6186–6190.
- Khan, U. *et al.* (2019) 'Phase II study of a telomerase-specific oncolytic adenovirus (OBP-301, Telomelysin) in combination with pembrolizumab in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma.', *Journal of Clinical Oncology*, 37(15\_suppl), pp. TPS4145–TPS4145.
- Kim, M. H., Kim, H. J. and Chang Id, J. (2019) 'Superior immune responses induced by intranasal immunization with recombinant adenovirus-based vaccine expressing full-length

Spike protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus', *PLoS ONE*, 14(7), pp. e0220196.

Klonjowski, B. *et al.* (1997) 'A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo', *Human Gene Therapy*, 8(17), pp. 2103–2115.

Klupp, B. G. *et al.* (1995) 'Mutations affecting the UL21 gene contribute to avirulence of pseudorabies virus vaccine strain Bartha', *Virology*, 212(2), pp. 466–473.

Klupp, B. G. *et al.* (2002) 'Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein', *Journal of Virology*, 76(6), pp. 3065–3071.

Kobayashi, T. *et al.* (2019) 'Characterization of a novel species of adenovirus from Japanese microbat and role of CXADR as its entry factor', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–13.

Kohl, C. *et al.* (2012) 'Genome analysis of bat adenovirus 2: Indications of interspecies transmission', *Journal of Virology*, 86(3), pp. 1888–1892.

Kremer, E. J. *et al.* (2000) 'Canine adenovirus vectors: an Alternative for adenovirus-mediated gene transfer', *Journal of Virology*, 74(1), pp. 505–512.

Kuhn, I. *et al.* (2008) 'Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer', *PLoS ONE*, 3(6), pp. e2409.

Laborda, E. *et al.* (2014) 'A pRb-responsive, RGD-modified, and hyaluronidase-armed canine oncolytic adenovirus for application in veterinary oncology', *Molecular Therapy*, 22(5), pp. 986–998.

Lang, F. F. *et al.* (2018) 'Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma', *Journal of Clinical Oncology*, 36(14), pp. 1419–1427.

Laval, K. *et al.* (2018) 'Virulent pseudorabies virus infection induces a specific and lethal systemic inflammatory response in mice', *Journal of Virology*, 92(24), pp. e01614-18.

Lee, C. *et al.* (2010) 'Protective efficacy and immunogenicity of an inactivated avian-origin H3N2 canine influenza vaccine in dogs challenged with the virulent virus', *Veterinary Microbiology*, 143(2–4), pp. 184–188.

Leege, T. *et al.* (2009) 'Phenotypic similarities and differences between UL37-deleted pseudorabies virus and herpes simplex virus type 1', *Journal of General Virology*, 90(7), pp. 1560–1568.

Li, S. *et al.* (2010) 'Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China', *Infection, Genetics and Evolution*, 10(8), pp. 1286–1288.

Li, Y. *et al.* (2010) 'Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats', *Journal*

*of Virology*, 84(8), pp. 3889–3897.

Lin, W. *et al.* (2019) 'Commercial vaccine against pseudorabies virus: A hidden health risk for dogs', *Veterinary Microbiology*, 233, pp. 102–112.

Lin, Y. *et al.* (2016) 'Enhanced replication of avian-origin H3N2 canine influenza virus in eggs, cell cultures and mice by a two-amino acid insertion in neuraminidase stalk', *Veterinary Research*, 47(1), pp. 53.

Liu, B. L. *et al.* (2003) 'ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties', *Gene Therapy*, 10(4), pp. 292–303.

Lochmüller, H. *et al.* (1994) 'Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants ( $\Delta E1 + \Delta E3$ ) during multiple passages in 293 Cells', *Human Gene Therapy*, 5(12), pp. 1485–1491.

Logunov, D. Y. *et al.* (2021) 'Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia', *The Lancet*, 397(10275), pp. 671–681.

Long, S. *et al.* (2005) 'The canine telomerase catalytic subunit (dogTERT): Characterisation of the gene promoter and identification of proximal core sequences necessary for specific transcriptional activity in canine telomerase positive cell lines', *Gene*, 358(1–2), pp. 111–120.

Luckow, V. A. *et al.* (1993) 'Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*.', *Journal of Virology*, 67(8), pp. 4566–4579.

Lyoo, K. S. *et al.* (2015) 'Comparative analysis of virulence of a novel, avian-origin H3N2 canine influenza virus in various host species', *Virus Research*, 195, pp. 135–140.

Ma, W., He, H. and Wang, H. (2018) 'Oncolytic herpes simplex virus and immunotherapy', *BMC Immunology*, 19(1), pp. 40.

Mahalingam, D. *et al.* (2018) 'A phase ii study of pelareorep (REOLYSIN®) in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic adenocarcinoma', *Cancers*, 10(6).

Majem, M. *et al.* (2006) 'Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-  $\Delta$ 24RGD', *Cancer Gene Therapy*, 13(7), pp. 696–705.

Markert, J. M. *et al.* (2014) 'A phase 1 trial of oncolytic HSV-1, g207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses', *Molecular Therapy*, 22(5), pp. 1048–1055.

Martinez-Sobrido, L. *et al.* (2020) 'Characterizing emerging canine H3 influenza viruses', *PLoS Pathogens*, 16(4), pp. e1008409.



Martuza, R. L. *et al.* (1991) 'Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant', *Science*, 252(5007), pp. 854–856.

Messerle, M. *et al.* (1997) 'Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp. 14759–14763.

Mettenleiter, T. C. *et al.* (1987) 'Role of a structural glycoprotein of pseudorabies in virus virulence.', *Journal of Virology*, 61(12), pp. 4030-4032.

Mettenleiter, T. C. *et al.* (1988) 'Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence.', *Journal of Virology*, 62(8), pp. 2712–2717.

Mineta, T., Rabkin, S. D. and Martuza, R. L. (1994) 'Treatment of malignant gliomas using ganciclovir-hypersensitive, ribonucleotide reductase-deficient herpes simplex viral mutant', *Cancer Research*, 54(15), pp. 3963-3966.

Mizuguchi, H. and Kay, M. A. (1998) 'Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method', *Human Gene Therapy*, 9(17), pp. 2577–2583.

Mochizuki, M., Morimitsu, M. and Sato, H. (1984) 'Plaques formed by canine adenovirus serotypes in MDCK cell culture', *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University*, 34, pp. 105–108.

Mondal, M. *et al.* (2020) 'Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy', *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 16(10), pp. 2389–2402.

Moon, H. *et al.* (2015) 'H3N2 canine influenza virus with the matrix gene from the pandemic A/H1N1 virus: Infection dynamics in dogs and ferrets', *Epidemiology and Infection*, 143(4), pp. 772–780.

Moormann, R. J. M. *et al.* (1990) 'Inactivation of the thymidine kinase gene of a gI deletion mutant of pseudorabies virus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain', *Journal of General Virology*, 71(7), pp. 1591–1595.

Morrison, M. D. *et al.* (2002) 'Generation of E3-deleted canine adenoviruses expressing canine parvovirus capsid by homologous recombination in bacteria', *Virology*, 293(1), pp. 26–30.

Mück-Häusl, M. *et al.* (2015) 'Ad 2.0: A novel recombineering platform for high-throughput generation of tailored adenoviruses', *Nucleic Acids Research*, 43(8), pp. e50.

Muyrers, J. P. P. *et al.* (1999) 'Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination', *Nucleic Acids Research*, 27(6), pp. 1555–1557.

Nagaike, K. *et al.* (2004) 'Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*', *Vaccine*, 22(29–30), pp. 4069–4074.

Nagase, M. *et al.* (1992) 'Establishment and characterization of a canine mast cell line (LuMC)',

*Journal of Veterinary Medical Science*, 114, pp. 267.

Naik, S. *et al.* (2018) 'Comparative oncology evaluation of intravenous recombinant oncolytic vesicular stomatitis virus therapy in spontaneous canine cancer', *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(1), pp. 316–326.

Nakatake, M. *et al.* (2019) 'Partial deletion of glycoprotein B5R enhances vaccinia virus neutralization escape while preserving oncolytic function', *Molecular Therapy - Oncolytics*, 14, pp. 159–171.

Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y. (2009) 'Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus', *Nature*, 459(7249), pp. 931–939.

Ning, Z. Y. *et al.* (2012) 'Tissue distribution of sialic acid-linked influenza virus receptors in beagle dogs', *Journal of Veterinary Science*, 13(3), pp. 219–222.

Nogales, A., Huang, K., *et al.* (2017) 'Canine influenza viruses with modified NS1 proteins for the development of live-attenuated vaccines', *Virology*, 500, pp. 1–10.

Nogales, A., Rodriguez, L., *et al.* (2017) 'Temperature-sensitive live-attenuated canine influenza virus H3N8 vaccine', *Journal of Virology*, 91(4), pp. e02211-16.

Nordlund, P. and Reichard, P. (2006) 'Ribonucleotide reductases', *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), pp. 681–706.

Ochi, Y. *et al.* (1956) 'Studies on infectious hepatitis in the dog (I)', *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 3(1), pp. 55–62.

Ogawa, H. *et al.* (2017) 'Characterization of a novel bat adenovirus isolated from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*)', *Viruses*, 9(12), pp. 371.

Ohashi, E. *et al.* (2001) 'Effect of retinoids on growth inhibition of two canine melanoma cell lines', *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(1), pp. 83–86.

Van Olphen, A. L. and Mittal, S. K. (1999) 'Generation of infectious genome of bovine adenovirus type 3 by homologous recombination in bacteria', *Journal of Virological Methods*, 77(2), pp. 125–129.

Packiam, V. T. *et al.* (2018) 'An open label, single-arm, phase II multicenter study of the safety and efficacy of CG0070 oncolytic vector regimen in patients with BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: Interim results', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 36(10), pp. 440–447.

Parker, J. N. *et al.* (2000) 'Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), pp. 2208–2213.

Patil, S. S. *et al.* (2012) 'Virotherapy of canine tumors with oncolytic vaccinia virus GLV-1h109

expressing an anti-VEGF single-chain antibody', *PLoS ONE*, 7(10), pp. e47472.

Patterson, W. R. and Gauntt, C. J. (1978) 'Production of group- and type-specific antigens during non-permissive infection of dog kidney cells with herpes simplex virus type 2', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 80(1), pp. 243–251.

Pavlin, D. *et al.* (2012) 'IL-12 based gene therapy in veterinary medicine', *Journal of Translational Medicine*, 10, pp. 234.

Pelka, P. *et al.* (2008) 'Intrinsic structural disorder in adenovirus E1A: a Viral molecular hub linking multiple diverse processes', *Journal of Virology*, 82(15), pp. 7252–7263.

Peters, C. *et al.* (2018) 'Restriction of replication of oncolytic herpes simplex virus with a deletion of  $\gamma$  34.5 in glioblastoma stem-like cells', *Journal of Virology*, 92(15), pp. e00246-18.

Peters, C. and Rabkin, S. D. (2015) 'Designing herpes viruses as oncolytics', *Molecular Therapy - Oncolytic*, 2, pp. 15010.

Pitts, J. D. *et al.* (2014) 'Crystal structure of the herpesvirus inner tegument protein UL37 supports its essential role in control of viral trafficking', *Journal of Virology*, 88(10), pp. 5462–5473.

Poon, A. C., Matsuyama, A. and Mutsaers, A. J. (2020) 'Recent and current clinical trials in canine appendicular osteosarcoma', *Canadian Veterinary Journal*, 61(3), pp. 301–308.

Post, L. E. and Roizman, B. (1981) 'A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: a gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth', *Cell*, 25(1), pp. 227–232.

Qi, H. *et al.* (2020) 'Establishment of a fosmid library for pseudorabies virus SC strain and application in viral neuronal tracing', *Frontiers in Microbiology*, 11, pp. 1168.

Quint, W. *et al.* (1987) 'Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: A new generation of "live" vaccines', *Journal of General Virology*, 68(2), pp. 523–534.

Radke, J. R., Yong, S. L. and Cook, J. L. (2016) 'Low-level expression of the E1B 20-kilodalton protein by adenovirus 14p1 enhances viral immunopathogenesis', *Journal of Virology*, 90(1), pp. 497–505.

Reddy, P. S. *et al.* (1999) 'Development of porcine adenovirus-3 as an expression vector', *Journal of General Virology*, 80(3), pp. 563–570.

Richards, A. L. *et al.* (2017) 'The pUL37 tegument protein guides alpha-herpesvirus retrograde axonal transport to promote neuroinvasion', *PLoS Pathogens*, 13(12), pp. e1006741.

Roberts, A. P. E. *et al.* (2009) 'Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1', *Journal of Virology*, 83(1), pp. 105–116.

Rodriguez, L. *et al.* (2017) 'A live-attenuated influenza vaccine for H3N2 canine influenza virus', *Virology*, 504, pp. 96–106.

Sadoff, J. *et al.* (2021) 'Interim results of a phase 1–2a trial of Ad26.COV2.S Covid-19 vaccine', *New England Journal of Medicine*, pp. NEJMoa2034201.

Sánchez, D. *et al.* (2018) 'Oncolytic viruses for canine cancer treatment', *Cancers*, 10(11), pp. 404.

Sauthoff, H. *et al.* (2003) 'Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: Virus persists and spreads systemically at late time points', *Human Gene Therapy*, 14(5), pp. 425–433.

Sayedahmed, E. E. *et al.* (2018) 'A bovine adenoviral vector-based H5N1 influenza -vaccine provides enhanced immunogenicity and protection at a significantly low dose', *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 10, pp. 210–222.

Scott Weese, J. *et al.* (2019) 'Emergence and containment of canine influenza virus A(H3N2), Ontario, Canada, 2017-2018', *Emerging Infectious Diseases*, 25(10), pp. 1810–1816.

Shizuya, H. *et al.* (1992) 'Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), pp. 8794–8797.

Shoji, K. *et al.* (2016) 'Development of new therapy for canine mammary cancer with recombinant measles virus', *Molecular Therapy - Oncolytics*, 3, pp. 15022.

Sleeckx, N. *et al.* (2011) 'Canine mammary tumours, an Overview', *Reproduction in Domestic Animals*, 46(6), pp. 1112–1131.

Smith, G. A. and Enquist, L. W. (2000) 'A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), pp. 4873–4878.

Song, D. *et al.* (2008) 'Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs', *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), pp. 741–746.

Song, D. *et al.* (2012) 'A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea', *Journal of General Virology*, 93(3), pp. 551–554.

Soudais, C., Boutin, S. and Kremer, E. J. (2001) 'Characterization of cis-acting sequences involved in canine adenovirus packaging', *Molecular Therapy*, 3(4), pp. 631–640.

Southam, C. M., Hilleman, M. R. and Werner, J. H. (1956) 'Pathogenicity and oncolytic capacity of RI virus strain RI-67 in man', *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 47(4), pp. 573–582.



Southam, C. M. and Moore, A. E. (1952) 'Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to egypt 101 virus', *Cancer*, 5(5), pp. 1025–1034.

Spergel, J. M. *et al.* (1992) 'NF-IL6, a member of the C/EBP family, regulates E1A-responsive promoters in the absence of E1A.', *Journal of Virology*, 66(2), pp. 1021–1030.

Spergel, J. M. and Chen-Kiang, S. (1991) 'Interleukin 6 enhances a cellular activity that functionally substitutes for E1A protein in transactivation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(15), pp. 6472–6476.

Streby, K. A. *et al.* (2017) 'Intratumoral injection of HSV1716, an oncolytic herpes virus, is safe and shows evidence of immune response and viral replication in young cancer patients', *Clinical Cancer Research*, 23(14), pp. 3566–3574.

Suenaga, T. *et al.* (2014) 'Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system', *Microbiology and Immunology*, 58(9), pp. 513–522.

Taipale, K. *et al.* (2016) 'Predictive and prognostic clinical variables in cancer patients treated with adenoviral oncolytic immunotherapy', *Molecular Therapy*, 24(7), pp. 1323–1332.

Tan, B. *et al.* (2016) 'Novel bat adenoviruses with an extremely large E3 gene', *Journal of General Virology*, 97(7), pp. 1625–1635.

Tanaka, M. *et al.* (2003) 'Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing

a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: Viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo', *Journal of Virology*, 77(2), pp. 1382–1391.

Ternovoi, V. V. *et al.* (2005) 'Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells', *Journal of Virology*, 79(2), pp. 1308–1311.

Todo, T. *et al.* (2001) 'Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), pp. 6396–6401.

Tohya, Y. *et al.* (1989) 'Large and small plaque variants of canine adenovirus 2 isolate.', *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 51(6), pp. 1267–1269.

Tollefson, A. E. *et al.* (1996) 'The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells.', *Journal of Virology*, 70(4), pp. 2296–2306.

Tomishima, M. J. and Enquist, L. W. (2001) 'A conserved  $\alpha$ -herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins', *Journal of Cell Biology*, 154(4), pp. 741–752.

Tordo, N. *et al.* (2008) 'Canine adenovirus based rabies vaccines.', *Developments in biologicals*, 131, pp. 467–476.

Tu, L. *et al.* (2017) 'Evaluation of protective efficacy of three novel H3N2 canine influenza

vaccines', *Oncotarget*, 8(58), pp. 98084–98093.

Urbasic, A. S. *et al.* (2012) 'Oncolysis of canine tumor cells by myxoma virus lacking the *serp2* gene', *American Journal of Veterinary Research*, 73(8), pp. 1252–1261.

Uyama, R. *et al.* (2006) 'Establishment of four pairs of canine mammary tumour cell lines derived from primary and metastatic origin and their E-cadherin expression', *Veterinary and Comparative Oncology*, 4(2), pp. 104–113.

Voorhees, I. E. H. *et al.* (2017) 'Spread of canine influenza a(H3N2) virus, United States', *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), pp. 1950–1957.

Voysey, M. *et al.* (2021) 'Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK', *The Lancet*, 397(10269), pp. 99–111.

Walker, D., Abbondati, E. *et al.* (2016) 'Infectious canine hepatitis in red foxes (*Vulpes vulpes*) in wildlife rescue centres in the UK', *Veterinary Record*, 178(17), pp. 421.

Walker, D., Fee, A.S. *et al.* (2016) 'Serological and molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom', *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1–12.

Wang, T. *et al.* (2018) 'Construction of an infectious bacterial artificial chromosome clone of a pseudorabies virus variant: Reconstituted virus exhibited wild-type properties in vitro and in

vivo', *Journal of Virological Methods*, 259, pp. 106–115.

Warming, S. *et al.* (2005) 'Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection', *Nucleic Acids Research*, 33(4), pp. 1–12.

De Wind, N. *et al.* (1993) 'Ribonucleotide reductase-deficient mutants of pseudorabies virus are avirulent for pigs and induce partial protective immunity', *Journal of General Virology*, 74(3), pp. 351–359.

Wirth, T. *et al.* (2003) 'A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer', *Cancer Research*, 63(12), pp. 3181–3188.

Wold, W. S. *et al.* (1984) 'Mapping a new gene that encodes an 11,600-molecular-weight protein in the E3 transcription unit of adenovirus 2.', *Journal of Virology*, 52(2), pp. 307–313.

Xie, X. *et al.* (2018) 'Comparison of the virulence of three H3N2 canine influenza virus isolates from Korea and China in mouse and Guinea pig models', *BMC Veterinary Research*, 14(1), pp. 149.

Yamamoto, M. *et al.* (2003) 'Transcription initiation activity of adenovirus left-end sequence in adenovirus vectors with E1 deleted', *Journal of Virology*, 77(2), pp. 1633–1637.

Yazawa, M. *et al.* (1999) 'Measurement of telomerase activity in dog tumors', *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(10), pp. 1125–1129.

- Ying, B. *et al.* (2009) 'INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, replicates in Syrian hamsters but not mice: Comparison of biodistribution studies', *Cancer Gene Therapy*, 16(8), pp. 625–637.
- Ying, B., Smith, K. and Spindler, K. R. (1998) 'Mouse adenovirus type 1 early region 1A is dispensable for growth in cultured fibroblasts', *Journal of Virology*, 72(8), pp. 6325–6331.
- Yu, Z. *et al.* (2015) 'A simplified system for generating recombinant E3-deleted canine adenovirus-2', *Plasmid*, 77, pp. 1–6.
- Yuan, Z. G. *et al.* (2010) 'Generation of E3-deleted canine adenovirus type 2 expressing the Gc glycoprotein of Seoul virus by gene insertion or deletion of related terminal region sequences', *Journal of General Virology*, 91(7), pp. 1764–1771.
- Yun, C. O. *et al.* (2005) 'ADP-overexpressing adenovirus elicits enhanced cytopathic effect by induction of apoptosis', *Cancer Gene Therapy*, 12(1), pp. 61–71.
- Zhang, Y. *et al.* (1998) 'A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*', *Nature Genetics*, 20(2), pp. 123–128.
- Zhou, P. *et al.* (2018) 'PB2 E627K or D701N substitution does not change the virulence of canine influenza virus H3N2 in mice and dogs', *Veterinary Microbiology*, 220, pp. 67–72.
- Zhu, F. C. *et al.* (2020) 'Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored

COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial', *The Lancet*, 396(10249), pp. 479–488.

Zhu, H., Hughes, J. and Murcia, P. R. (2015) 'Origins and evolutionary dynamics of H3N2 canine influenza virus', *Journal of Virology*, 89(10), pp. 5406–5418.

van Zijl, M. *et al.* (1988) 'Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments.', *Journal of Virology*, 62(6), 2191-2195.

van Zijl, M. *et al.* (1991) 'Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera.', *Journal of Virology*, 65(5), pp. 2761–2765.

Zou, A. *et al.* (2004) 'Overexpression of adenovirus E3-11.6K protein induces cell killing by both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms', *Virology*, 326(2), pp. 240–249.

## 謝辭

本研究をまとめるにあたり、多くの方のご協力を賜りました。東京大学獣医微生物学研究室の堀本泰介教授には、学部時代から7年間、研究に対する心構えから研究の計画、論文執筆に至るまで懇切丁寧にご指導いただきました。心より感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり、同研究室の村上晋准教授には実験の細部まで手厚くご指導頂きました。深く感謝申し上げます。さらに同研究室の上間亜希子特任助教にも研究のご指導を賜りましたことを感謝申し上げます。また同研究室の皆様には研究面、生活面の双方において大変お世話になりました。ありがとうございました。

東京大学獣医外科学研究室内の皆様には、イヌ腫瘍由来培養細胞を快く分与していただきましたことを心より感謝申し上げます。

最後に研究生生活、学生生活を支えてくれた家族・友人達に心より感謝申し上げます。