

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成10年度博士課程 進学

氏名 佐藤英次

指導教官名 高橋英司

### 論文題目 Development of Feline Immunodeficiency Virus Vaccines Using a Feline Herpesvirus Type 1 Vector

(ネコヘルペスウイルス1型をベクターに用いたネコ免疫不全ウイルスワクチンの開発)

ネコ免疫不全ウイルス(FIV)は、1986年にアメリカで後天性免疫不全症(AIDS)様症状を呈したネコから初めて分離されて以来、世界各国でその感染が報告されている。FIVはヒト免疫不全ウイルス(HIV)と同じくレトロウイルス科レンチウイルス属に分類され、CD4陽性細胞の減少、慢性の難治性感染症の誘導、著明な消瘦、貧血、日和見感染、腫瘍などのAIDS様症状を引き起こす。宿主に引き起こす症状がHIVと似ているばかりでなく、生物学的性状及び遺伝子構造もHIVと多くの相同性を有しているため、医学領域においてもHIVの動物モデルとしての有用性が期待されている。FIV分離株は非常に遺伝学的多様性に富んでおり、それは外被糖タンパクをコードする envelope(*env*)遺伝子において顕著である。これはウイルス自身の性質(複製過程でエラーを生じやすい逆転写酵素)と宿主の免疫機構から免れるため変異体が生じた結果によるものと考えられる。またレトロウイルスが宿主に感染すると、宿主は生涯、そのウイルスを体内から駆逐できないとされている。FIVの感染および発症防御を目指した予防並びにFIV感染後の治療に関して今日まで多くの研究が行われているが、上記のウイルス学的性質によりその開発が困難なものになっている。これまで報告があった中で最も有効性の高いFIVワクチンはFIV感染細胞を不活化したもので、そのワクチンには、FIV抗原(特にEnv蛋白)が大量に含まれており、それが、ワクチンの有効性につながったと考えられている。しかしながら、そのワクチン検定において攻撃に用いたウイルスが、*in vitro*で継代を繰り返しネコへの感染効率が落ちていたこと、さらに他の株よりも中和さ

れやすいということがその後明らかにされ、heterologous な株の攻撃に対する感染防御や長期免疫の誘導能等に疑問が持たれている。

本研究では、FIV の感染および発症を防御できるようなワクチン開発を目的として、ネコヘルペスウイルス 1 型(FHV-1)をベクターに用いて FIV の抗原蛋白(コア蛋白(Gag)および Env 蛋白)を発現する組換えウイルスを構築し、その性状解析を行った。本論文の内容は以下の 3 章より構成されている。

## 第一章 FIV の Gag 前駆体蛋白を発現する組換え FHV-1 の構築

本章では、新たな FHV-1 ベクターの構築と、このベクターを用いた FIV の Gag 前駆体蛋白を発現する組換え FHV-1 の作出を試みた。以前、横山らは FHV-1 の thymidine kinase(TK)遺伝子中央部(450 bp)を欠損させて弱毒化した組換え FHV-1(C7301*d*/TK)を作製したが、トランスファーベクターの construct 上、外来遺伝子を効率よく発現させるためには、その欠損部位に挿入する外来遺伝子の翻訳産物を TK の N 末端部との融合蛋白として発現させる必要があった。本章で用いる外来遺伝子の翻訳産物、FIV Gag 蛋白は N 末端がミリスチン化され粒子形成される。Gag 蛋白を TK 蛋白と融合させることでミリスチン化が阻害されないように、C7301*d*/TK の TK 遺伝子開始コドンを含む N 末端部を削除した新たな組換え FHV-1(*dd*/TK)を作製した。次に、*dd*/TK の TK 欠損部位に遺伝子相同性組換え技術を用いて FIV(TM2 株)の Gag 蛋白をコードする遺伝子を挿入して組換え FHV-1(*dd*/TK-gag)を作出した。両ウイルスの組換えは PCR 法及び Southern blot 法にて確認した。また *in vitro* における両ウイルスの増殖能は親株 FHV-1 のそれとほぼ同じであり、上述のような遺伝子欠損と遺伝子挿入によっても増殖能が変わらないことが示された。*dd*/TK-gag は *in vitro* においてイムノブロット法により、免疫原性を保持している 50 kDa の前駆体 FIV Gag 蛋白を発現することがわかった。また、*dd*/TK-gag による Gag 蛋白の発現は間接蛍光抗体法(IFA)においても確認された。すなわち、本ベクターを用いると、外来遺伝子の翻訳産物が自然な状態で発現できることが示唆された。FIV の *gag* 遺伝子は *env* 遺伝子に比べて変異が少ない上、FIV の発症防御に有効な細胞性免疫の標的には Gag 抗原も含まれることから、本組換えウイルス *dd*/TK-gag は有効な FIV 生ワクチンの候補として考えられる。

## 第二章 FHV-1 gC promoter を用いた、組換え FHV-1 における FIV Env 蛋白の効果的な発現

FIV のワクチン開発において、Gag 蛋白の他に Env 蛋白も標的とする抗原として重要である。本章では、一章と同様に FHV-1 ベクターを用いて FIV の Env 蛋白を発現する組換えウイルスの作出を試みた。FHV-1 TK 欠損株(C7301*dTK*)の TK 欠損部位に FIV Env 蛋白をコードする遺伝子を挿入し、組換えウイルス(*dTK-env*)を得た。さらに Env 蛋白の発現効率を上げるため、この *env* 遺伝子の上流に FHV-1 の gC promoter を挿入し、もう一つの組換えウイルス(*dTK(gCp)-env*)を得た。両ウイルスの組換えの確認は、Southern blot 法にて行った。また *in vitro* における両ウイルスの増殖は親株 FHV-1 のそれとほぼ同じであり、外来遺伝子の挿入によっても増殖能が変わらないことが示された。次に、これら組換え FHV-1 が *in vitro* で FIV Env 蛋白をどのように、またどの程度発現しているのかを、抗 FIV Env 抗体を用い調べた。IFA により、組換えウイルスの感染した細胞における Env 蛋白の発現形態が、イムノブロット法により主として Env 蛋白 130 kDa を発現していることがわかった。酵素免疫抗体法(ELISA)によると、両組換えウイルスは親株の FIV(TM2 株)よりも多くの Env 蛋白を発現しており、また *dTK(gCp)-env* は *dTK-env* よりも 4 倍以上の Env 蛋白を発現していることが明らかとなった。さらにフローサイトメトリー解析により、組換えウイルスの感染した細胞表面上に Env 蛋白が発現していることが示され、その発現は特に *dTK(gCp)-env* において著しかった。この Env 蛋白の細胞表面発現は、gC promoter 下流に存在する FHV-1 糖蛋白 gC のシグナル領域 (N-末端領域) と FIV の Env 蛋白がつながった fusion の効果であり、*dTK(gCp)-env* による Env 蛋白の大量発現は gC promoter によるものであることがわかった。FIV の Env 抗原は、宿主に中和抗体を誘導して主に感染防御免疫を誘導できる。以上のことより、*dTK(gCp)-env* も Gag 発現組換え FHV-1 と同様に有効な FIV 生ワクチンの候補に挙げられる。

### 第三章 FIV の Gag 蛋白を発現する組換え FHV-1 のさらなる開発

本章では、第一章で作製した *ddTK-gag* による FIV Gag 蛋白の発現能を高めるため、さらなる組換え FHV-1 を作出し、*ddTK*、*ddTK-gag* と併せ、*in vitro* および *in vivo* における性状解析を行った。*ddTK-gag* による FIV Gag 蛋白の発現効率を上げるため、この *gag* 遺伝子の上流に FHV-1 の gB promoter を挿入し、新たな組換えウイルス、*ddTK(gBp)-gag* を得た。このウイルスの *in vitro* における増殖能は親株 FHV-1 とほぼ同じであった。*ddTK(gBp)-gag* は *in vitro* においてイムノブロット法により、主として 50 kDa の前駆体 FIV Gag 蛋白を発現することがわかり、この Gag 蛋白発現は IFA においても確認された。ELISA によると、*ddTK(gBp)-gag* は *ddTK-gag* よりも 3 倍以上の Gag 抗原を発現してい

ることがわかり、Gag 蛋白発現の増大に成功した。*ddITK(gBp)-gag* と *ddITK-gag* については、ネコにおける増殖性、安定性、及び FIV の Gag 蛋白に対する抗体誘導能を検討した。9 週齢の SPF ネコ各群 2 頭に、*ddITK*、*ddITK-gag* および *ddITK(gBp)-gag* を眼窩内、鼻内および口腔内におよそ 3 週間隔で 3 回接種した。その結果、免疫したネコに抗 FIV Gag 抗体の誘導は認められなかったが、接種した組換え FHV-1 の感染はすべて成立しており、再分離されたウイルスには TK 遺伝子の復帰や挿入 *gag* 遺伝子の欠失などは見られず安定であった。また、これら組換えウイルスによる病原性は見られず、安全性も確認された。

FHV-1 は本研究のように弱毒化しても主として口腔や鼻腔等の粘膜で増殖するという特性から粘膜免疫を誘導でき、生ウイルスであるため外来挿入遺伝子の翻訳産物を native な形である程度持続的に発現するという特色を持っている。実際、これまで FHV-1 をベクターに用いて作製された組換えウイルスのうち、ネコ白血病ウイルス、ネコカリシウイルスにおいてワクチンとしての有効性が確認されてきた。本研究で構築した Gag 発現組換え FHV-1 はネコに抗 FIV Gag 抗体を誘導しなかったものの、いくつかの FIV ワクチン研究では、抗 FIV 抗体非存在下で FIV の攻撃から防御できたという報告がある。また、組換えウイルスの感染性、安定性および安全性は接種したネコにおいて確認されたことから、このような組換えワクチン戦略はさらなる改良は必要であるが、理想的な FIV ワクチン開発に向けて有用な知見を与えるものと考えられ、今後の発展に期待がもたれる。