

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 島間 真一

ネコフォーミーウイルス (FFV) は、非病原性レトロウイルスであり、分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも感染し、宿主ゲノムへウイルス遺伝子を挿入することから遺伝子治療用ベクターとしての応用が期待されている。しかし、内在性レトロウイルスによって自己増殖性ウイルスが出現する可能性や、有効な感染性ウイルスクローンが樹立されていない点等が問題となっている。本研究は、FFV を骨格とした新しいレトロウイルスベクターシステムを構築することを目指して、持続感染機構の解明、転写機構の解析および感染性遺伝子クローンの作製を行った。論文の内容は、以下の3章より構成される。

第1章 脱アセチル化酵素阻害剤 (トリコスタチン A) による FFV 持続感染細胞からのウイルスの再活性化

FFV の持続感染状態からウイルス再活性化に影響を及ぼす因子について検討するために、*in vitro* での FFV 持続感染モデルを作製し、3 種類のアセチル化剤またはメチル化剤を培養上清に添加した。ヒストンの脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TA) を FFV 持続感染細胞に添加した場合に、FFV Coleman 株の LTR プロモーターが活性化され、持続感染細胞から培養上清中へウイルス産生量が濃度依存的に増大することが示された。しかし、5-Azacytidine や Sodium Butyrate では目立った効果が見られなかった。ヒストンのアセチル化による FFV の再活性化は Coleman 株に特異的であり、S7801 株や Sammy-1 株、ヒトフォーミーウイルス (HFV) では効果的ではなかった。ウイルス株間で薬剤感受性に違いが認められた原因には、LTR プロモーター内の欠損領域 (nt. 615-641) や、Gag の開裂様式の違いが関与する可能性が示された。

第2章 FFV 急性感染および持続感染における遺伝子発現の比較

FFV 転写機構の解明を目指して、急性感染状態、持続感染状態および TA 添加による再活性化状態での各遺伝子の発現パターンを比較した。転写産物の解析から、それぞれの感染細胞では特徴的な mRNA 発現パターンが示された。その転写パターンを元に、急性感染ではウイルスゲノム内に存在が報告されている 2 種類のプロモーター (LTR プロモーター: LTR と内部プロモーター: IP) の両方が活性化されるのに対して、持続感染では IP の活性が特徴的に低下していることが考えられた。このことは、翻訳産物の解析によっても確かめられた。また TA 添加によるウイルスの再活性化は、細胞の形態的には急性感染状態へ移行しているにも関わらず、実際には持続感染の転写パターンを維持したままゲノムに挿入された LTR が直接活性化されていることがわかった。本研究によって、*in vivo* における FFV の急性感染状態とそれに続く持続感染状態では異なる複製機構を利用する可能性が示された。

第3章 FFV 感染性クローン及び HFV との Env 組換えウイルスの作製と塩基配列の決定

FFV をウイルスベクターへ応用することを目指して、感染性 FFV 遺伝子クローンの作製と塩基配列の決定を行った。FFV Coleman 株感染性クローン (pSKY3.0) および S7801 株感染性クローン (pSKY5.0) は、それぞれ 11,694 および 11,660 塩基をコードし、プロトタイプである FUV 株と高い相同性を示した。両プラスミドは CRFK 細胞に導入後、TA 処理を行うことで感染性ウイルスクローンが効率良く回収され、導入後 3 日目に、それぞれ $>10^6$ 、 $>10^3$ TCID₅₀/ml の高力価のウイルスを産生した。また、pSKY3.0 の *env* および *bel-1* の 5'側一部を含む領域を HFV の相同遺伝子と組換えたプラスミド (pSKY4.0) は、BHK-21 細胞へ導入後 TA 処理を行うことで、 10^5 TCID₅₀/ml のウイルスを産生した。SKY3.0 および SKY4.0 は、それぞれ CRFK、BHK-21 細胞でのみ明瞭な CPE を形成するが、*in vitro* での感染性は広い宿主域にわたることが示された。また SPF ネコに接種後 30 日で、血清中に Gag に対する抗体価と、末梢血リンパ球から *gag*、*env*、*bel-1* に対する特異的遺伝子が検出された。したがってこれらは、*in vivo* においても複製可能であることが示唆された。

以上本論文は、FFV の転写機構の解明と感染性ウイルスクローンの樹立に成功しており、今後レトロウイルスベクターの安全性と利便性の向上にも大きく貢献できるものと考えている。従って審査委員一同は、本論分が博士 (獣医学) 論文として価値あるものと認めた。