

論文の内容の要旨

農学生命科学科 獣医学専攻
平成13年度博士課程 入学
氏名 郡山 尚紀
指導教官 甲斐 知恵子

論文題目

Application of recombinant CDVs as leishmania vaccine and delivery vector

(組換えイヌジステンパーウイルスのリーシュマニアワクチンおよびデリバリーベクターとしての応用)

ジステンパーはイヌにおける代表的なウイルス性伝染病で、呼吸器系、消化器系、中枢神経系で病変が診られる致死率の高い疾病として知られている。原因となるイヌジステンパーウイルス (CDV) は麻疹ウイルス、牛痘ウイルスなどと共に、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) モービリウイルス属 (Morbillivirus) に分類される。最近まで CDV が属する一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルス (モノネガウイルス) では、ゲノム cDNA クローンから感染性ウイルスを作出することができなかった。しかし、1994年に狂犬病ウイルスにおいて初めて感染性ウイルス作出系 (リバースジェネティクス系) が開発され、著者らの研究グループも 1999年に世界で初めて CDV リバースジェネティクス系の開発に成功した。リバースジェネティクス系により、ウイルス構成遺伝子の欠失や交換、変異の導入や外来遺伝子の挿入を行った組換えウイルスの作出が可能になった。その結果、性質の異なるウイルス株での遺伝子解析の比較だけではわからなかった、病原性の決定機序や特異的な宿主を決定する機構等のウイルス学上重要な問題の解明に大きく寄与することとなった。さらに、液性免疫だけではなく細胞性免疫を誘導する優れた特性を生かしたウイルスベクターの開発やその応用も盛んに進められている。

本研究ではまず、蛍光蛋白 EGFP (Enhanced green fluorescent protein) 発現組換え CDV を用いて、イヌ海馬における CDV の感染動態の解析を行った (第 1 章)。次に CDV デリバリーベクターへの応用例として、CDV リバースジェネティクス系により抗酸化酵素 Superoxide dismutase 1 (SOD1) 発現組換えウイルスを作出し、その評価を行った (第 2 章)。そして、リーシュマニア感染症に対する 2 価ワクチンベクターとして、リーシュマニア抗原発現組換え CDV を作出し、イヌに対する感染実験を行いその有効性を検討した (第 3 章)。また、CDV の基礎的な研究として、CDV P 蛋白のモノクローナル抗体を作出し、その性状の解析を行った (第 4 章)。最後に CDV ゲノムの性状を電子顕微鏡下での解析から新たな知見が得られたのでその報告も行った (第 5 章)。

第一章：EGFP 発現 CDV を用いたイヌ海馬における CDV 感染動態の解析

イヌの CDV 感染症では中枢神経系への感染が多く認められるが、中枢神経系における CDV の感染拡大様式は明らかにされていなかった。本章では、感染細胞で蛍光を発する EGFP-CDV をイヌ海馬スライスに感染させ、中枢神経系での CDV の感染動態を解析した。ビブラトームでスライス状にした海馬スライスを器官培養して 3 週間後にウイルス液を滴下し自然感染させた。感染動態は共焦点顕微鏡下で蛍光を指標として経時的に観察した。CDV 感染後、24 時間目には既に蛍光が観察され経時的に周囲の細胞へと伝播した。ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに対する特異的マーカー抗体でそれぞれ免疫染色を行ったところ、感染細胞の 80% 以上がニューロンであることが明らかになった。ニューロンでの感染動態を経時的に観察したところ、シナプスを介して隣接するニューロンに感染していることがわかった。ニューロンでのウイルス膜蛋白の動態を特異抗体を用いた免疫染色で調べたところ、F と H はニューロン全体に分布しているのに対して、M は細胞体の他に一部の軸索やシナプスでのみ発現がみられた。感染 3 ヶ月目に海馬スライスを電子顕微鏡下で観察したところ、シナプス末端でリボヌクレオキャプシドの蓄積がみられ、更にシナプス外にウイルス粒子を観察することができた。これらの結果から、CDV は中枢神経系ではシナプス末端からシナプス外にウイルス粒子を放出し、隣接するニューロンのシナプスを介してウイルスの侵入・伝播が起これると考えられた。

第二章：デリバリーベクターとしての CDV の利用：抗酸化治療に向けたイヌ SOD1 発現組換え CDV の作出

酸化ストレスは神経障害の主な原因と考えられ、標的細胞への抗酸化酵素 SOD の導入は効果的な治療法の一つとして期待されている。本章では CDV リバースジェネティクス系によりイヌ SOD1 発現組換えウイルスの作出を行った。イヌ SOD1 遺伝子をクローニングし、CDV リバースジェネティクス系に従ってウイルスレスキューを行い、SOD1-CDV の作出に成功した。感染細胞での CPE の形状やウイルス増殖曲線は元株 Yanaka 株と比較し顕著な相違は認められなかった。western blot と SOD 活性測定により感染細胞で SOD 活性を持

つ機能的な蛋白が十分量発現していることがわかった。第1章では、CDV はニューロンに対して高い感受性があることが明らかになった。本章での結果から、SOD1-CDV はニューロンに感染し機能的な SOD1 を産生するデリバリーベクターとしての有用性が示唆された。

第三章：CDV およびリーシュマニア感染症に対する組換え CDV 二価ワクチンの開発

リーシュマニア原虫症はサシチョウバエを媒介昆虫とし、ヒトやイヌ等に感染して皮膚および内臓に重篤な病巣を形成する人獣共通感染症である。ヒトでは熱帯の発展途上国を中心に毎年4千万人以上の感染例が報告されている。この保有宿主ともなるイヌで感染を防ぐことはヒトリーシュマニア症の対策としても有用と考えるが、未だ有効なワクチンは開発されていない。本章では、原虫に対する有効な多価ワクチンの開発を目的として、リーシュマニア抗原を発現する組換え CDV の作出を試みた。リーシュマニア抗原として TSA, LmSTI1 を選択し、CDV リバースジェネティクス系により組換え CDV (TSA-CDV, LmSTI1-CDV) の作出に成功した。これまでに作出成功した LACK-CDV と同様、この2つの組換え CDV は元株 Yanaka 株と比べ、ウイルス増殖速度・CPE の形状に顕著な差異は認められなかった。特異抗体を用いた解析により、組換え CDV 感染細胞において抗原蛋白の発現が確認できた。これら組換え CDV を6週齢の幼犬に静脈内接種したところ、体温・リンパ球数・臨床所見においても変化がなく、組換え CDV は病原性がなく安全であることが証明できた。CDV ワクチンとしての有効性は既に LACK-CDV 接種犬が CDV 強毒株チャレンジに対して完全な抵抗性を示したことから証明している。リーシュマニアチャレンジ実験では、リーシュマニア接種後10週目まで、接種部位で形成される結節の大きさを指標としてリーシュマニア増殖抑制能を検討した。抵抗性誘導能は LACK-CDV で最も顕著であったが、TSA-CDV, LmSTI1-CDV, LACK-CDV を混合して接種したイヌでは結節形成の増大を抑制するのみでなく消失も早め、有効性を示した。これらの結果から、本章で作出した組換え CDV はリーシュマニア症に対する多価ワクチンとしての有効であると考えられた。

第四章：CDV P 蛋白に対するモノクローナル抗体による認識部位の検索

モービリウイルスゲノムは6つの構成遺伝子をコードし、その一つである P 遺伝子からは P、V、C の蛋白が翻訳される。P 蛋白はこれまでウイルスの転写や複製に必要であることが知られているが最近病原性の発現に関わっていることが報告されている。本章では、P 蛋白の機能解析ツールとして CDV Yanaka 株 P 蛋白に対するモノクローナル抗体を作出しその解析を行った。P と V 蛋白は一部同一のアミノ酸配列を持つため、P 特異的な領域について組換え蛋白を作出し、常法に従ってハイブリドーマを作出して、最終的に7つのモノクローナル抗体を得た。これら抗体間の交差反応性を調べたところ、2つのグループ (I: 13Ea, 52G, 36Ba, 42Ba, 99Bb, II: 33Ba, 36E) に分かれた。更にモービリウイルス間での交差反応性を調べたところ、I 型は Yanaka 株と系統的に近縁なハクビシン由来 CDV

Haku93 株と Haku00 株と、更に 99Bb 以外の I 型は RPV (RBOK 株, L 株)とも反応し、I 型は更に 2 つに分けられることがわかった。一方、得られた抗体は全て CDV Snyder Hill 株, Onderstepoort 株及び MV Edmonston 株, HL 株に対して反応を示さなかった。以上の結果から、P 蛋白特異的領域には少なくとも三つの抗体認識部位が存在することがわかった。

第五章：CDV 粒子内ゲノムの電子顕微鏡学的解析

モービリウイルスでは、ウイルスゲノムの動態や形態学的な性状は感染細胞内に比べて、ウイルス粒子内についてはよくわかっていない。本章ではウイルス粒子内にパッケージングされた CDV ゲノムの形態学的性状について解析を行った。感染細胞から放出されるウイルス粒子を濃縮した培養液からショ糖密度勾配を用いて超遠心分離で分画し、ウイルス分画を電子顕微鏡下で解析した。ウイルス粒子に取り込まれるウイルスゲノム全長はこれまで報告されていた 1000nm よりも極めて長いものが多く観察され、一つのウイルス粒子内に複数のウイルスゲノムが取り込まれている可能性が示唆された。更にフィラメント状のウイルスゲノムは主に直径が太いタイプ (long filamentous type: LF) で、一部で、細いタイプ (small filamentous type: SF) が存在することがわかった。第 4 章で作出した CDV P 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて免疫電子顕微鏡法で解析したところ、P 蛋白は SF の表面には存在せず、一方 LF 上では全体を覆っていることがわかった。これらの結果から、ウイルス粒子内にパッケージングされたウイルスゲノムは多様な形態を構成していることが明らかになった。

本研究では、CDV リバーシジェネティクス系によって作出した組換え EGFP-CDV による中枢神経系での CDV 感染動態の検索、デリバリーウイルスとして利用可能なイヌ SOD1 発現する組換え CDV の作出、更に有効な二価ワクチンウイルスとしてリーシュマニア抗原を発現する組換え CDV の有用性を示すことができた。一方将来的にはより安全で有効なウイルスベクターの開発のためにも CDV の基礎的な研究を行い、病原性やウイルス複製に関与する CDV P 蛋白に対するモノクローナル抗体を作出し、電子顕微鏡解析によりウイルス粒子内のゲノムの形態で新しい知見を得ることができた。本研究成果は、CDV の基礎的な新知見のみならずウイルスベクター開発を大きく進展させる有用な知見や成果を与えるものであると考える。