

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 13 年度博士課程 入学

氏 名 馬場 健司
指導教員名 辻本 元

Fundamental Studies on the Gene Therapy for the Control of Feline Immunodeficiency Virus Infection (ネコ免疫不全ウイルス感染症の遺伝子治療に関する基盤的研究)

ネコ免疫不全ウイルス(Feline immunodeficiency virus, FIV)はヒト免疫不全ウイルス(Human immunodeficiency virus, HIV)と同様にレトロウイルス科レンチウイルス属に分類され、ネコに感染した場合ヒトにおける HIV 感染症と類似した免疫不全症候群を引き起こすことが知られている。その病態および臨床的特徴の類似点から FIV 感染症は HIV 感染症の有用な動物モデルとしても重要な感染症である。免疫反応によって排除されず、持続感染の状態ですべての宿主に対して致死的な病原性を示すウイルス感染症においては、その治療法を画期的に進歩させるための方法として遺伝子治療の開発が期待される。そこで本論文では、FIV 感染症に対する遺伝子治療の開発に向けた基盤を確立するため、以下のような一連の研究を行った。第 1 章ではネコ腎由来線維芽細胞株において FIV 特異的 small interfering RNA (siRNA)による FIV 増殖抑制効果を検討した。第 2 章ではレトロウイルスベクターを用いて FIV 特異的 short hairpin RNA (shRNA)をネコ T リンパ系細胞株に導入し、その FIV 増殖に対する効果を検討した。さらに第 3 章では *in situ* 遺伝子導入法の有用性を検討するため、shRNA 発現レトロウイルスベクターをネコの骨髄腔内に投与し、投与後の体内における導入遺伝子の検出を行った。

第1章 FIV 特異的 siRNA による FIV 増殖抑制効果

RNA 干渉(RNA interference, RNAi)はさまざまな種に共通した転写後遺伝子発現制御機構である。二本鎖 RNA は 21-23 塩基からなる siRNA に分解され、RNA 分解酵素と複合体を形成して mRNA を配列特異的に分解することが知られている。そこで第 1 章では、FIV 特異的 siRNA を作製し、その FIV 増殖抑制効果を検討した。FIV Petaluma 株の gag 遺伝子に相同性を有する 4 種類の siRNA を FIV 持続感染線維芽細胞株(CRFK/FIV)に導入した結果、いずれの siRNA を導入した場合にも FIV mRNA 量の減少および逆転写酵素活性の低下が認められ、FIV の増殖を特異的に抑制することが示された。さらに、4 種類の siRNA の中で最も高い増殖抑制効果を示した siRNA について詳細に検討した結果、その siRNA は用量依存的な FIV 増殖抑制効果を示したが、増殖抑制効果は一過性であり、48 時間後以降には FIV の増殖が徐々に回復することが示された。そこで、安定して siRNA を発現する細胞を得るため、FIV 特異的 shRNA を発現するプラスミドベクターを CRFK/FIV 細胞に安定導入し、FIV の増殖を検討した結果、導入 1 ヶ月後においても FIV の増殖は著しく抑制されており、持続的な FIV 増殖抑制効果を得られることが明らかとなった。本研究の結果、RNAi を用いた遺伝子発現制御技術を FIV 感染症に対する遺伝子治療法として利用できる可能性が示された。

第2章 ネコ T リンパ系細胞株における FIV 特異的 shRNA 導入による FIV 増殖抑制効果

FIV は生体内において主に T リンパ球に感染して増殖することから、T リンパ球を抗ウイルス遺伝子治療の標的とすることが必要と考えられた。そこで第 2 章では、レトロウイルスベクターを用いてネコ T リンパ系細胞株に FIV 特異的 shRNA を安定導入し、その FIV 増殖抑制効果を検討した。マウス白血病ウイルス(Murine leukemia virus, MLV)由来レトロウイルスベクターに FIV gag 遺伝子特異的な shRNA 発現カセットを組み込んでベクターゲノムを作製し、ネコ細胞への感染を可能にするためにエンベロープとして水疱性口内炎ウイルスエンベロープ(Vesicular stomatitis virus G protein, VSV-G)を用いたシュードタイプレトロウイルスベクターを作製した。まず、FIV をすでに産生している細胞における増殖抑制効果を検討するため、本レトロウイルスベクターを FIV 持続感染 T リンパ系細胞株(FL4)に感染させ、FIV 特異的 shRNA 安定導入細胞を得た。この FIV 特異的 shRNA 安定導入細胞においては、FIV mRNA の発現量が著しく減少しており、FIV p24 蛋白の発現量の減少および培養上清中の逆転写酵素活性の低下も確認された。これらの結果から、FIV 産生 T リンパ系細胞にレトロウイルスベクターによって FIV 特異的 shRNA を安定に導入することにより、明らかな FIV 増殖抑制効果が得られることが示された。次に FIV 感染に対して抵抗性を示す T リンパ系細胞を作製するため、本研究で作製したレトロウイルスベクターを用いて FIV 非感染 T リンパ系細胞株(MyA-1)に FIV 特異的 shRNA を安定導入した後、FIV Sendai-1 株および FIV Shizuoka 株を接種することにより

FIV 感染に対する抵抗性を検討した。しかしながら、FIV 特異的 shRNA 安定導入細胞におけるこれら FIV 株の増殖曲線と陰性対照 shRNA 導入細胞におけるウイルスの増殖曲線との間に有意な差が認められず、新たな FIV 感染に対して抵抗性を示す T リンパ系細胞を作製することはできなかった。その原因として、本細胞株では shRNA の発現量が不十分であった可能性、および導入 shRNA の塩基配列と完全な相同性を持たないウイルスが存在した可能性が考えられた。本研究により、FIV 感染症に対する治療的遺伝子導入法の有効性が示されたが、予防的遺伝子導入法の確立のためには発現効率やウイルス遺伝子の多様性に対する対応などについてさらなる検討が必要と考えられた。

第 3 章 ネコにおけるレトロウイルスベクターの骨髄腔内直接投与による実験的遺伝子導入法の検討

ネコにおける遺伝子治療開発における問題点の一つとして生体への有効な遺伝子導入法が確立されていないことがあげられる。FIV 感染症に対する遺伝子治療の開発においては、造血幹細胞が、その多能性および自己複製能から、遺伝子導入の最適な標的細胞であると考えられる。ネコの造血幹細胞を分離・純化するシステムはこれまでに確立されていないが、マウス、ヒツジおよびサルにおいては *in situ* 遺伝子導入法により造血幹細胞への遺伝子導入が可能であることが報告されている。そこで、第 3 章では、実験用ネコの骨髄腔内にレトロウイルスベクターの直接投与を行い、ネコ体内における導入遺伝子の検出を行った。レトロウイルスベクターとして蛍光マーカーである ZsGreen 発現カセットを有する VSV-G シュードタイプ MLV ベクターを用いた。3 頭のネコの左右の大腿骨髄腔内に上記のレトロウイルスベクターを投与し、3、7、14 および 28 日後に末梢血を採取した。また、投与後 7 日目および 14 日目

に骨髄穿刺により骨髄細胞を採取した。さらに、投与後 28 日にこれらのネコを殺処分し、骨髄およびリンパ系組織を含めた各種組織を採取した。これらの検体から高分子 DNA を抽出し、PCR 法によりベクター遺伝子の検出を行った。末梢血中のベクター遺伝子は、3 日目には 3 頭全頭に、7 日目には 3 頭中 2 頭において検出されたが、14 日目および 28 日目にはいずれのネコにおいても検出されなかった。骨髄中のベクター遺伝子は、7 日目および 28 日目とも 3 頭中 2 頭において検出された。組織中のベクター遺伝子は、脾臓、肝臓および小腸においては 3 頭中 2 頭に、リンパ節、肺および骨格筋においては 3 頭中 1 頭において検出された。これらの結果より、骨髄腔内へのレトロウイルスベクターの接種により、そのベクター遺伝子に由来するプロウイルスを有する細胞が接種後少なくとも 28 日目まで体内に存在していたことが示された。さらに、骨髄以外にも脾臓およびリンパ節においてベクター遺伝子が検出されたことから、造血幹細胞にも遺伝子導入された可能性が示唆された。投与 7 日目および 14 日目に採取した末梢血および骨髄細胞において蛍光マーカーである ZsGreen の発現をフローサイトメト

リーにより検討したが、検出可能な蛍光を示す細胞はいずれの検体においても認められなかったことから、導入された遺伝子の発現が不十分であることが示された。本章の結果から、レトロウイルスベクターの骨髄腔内直接投与により、ネコ生体内の細胞への遺伝子導入が可能であることが明らかとなったが、その導入・発現効率に問題があることが示され、今後はレンチウイルスベクター等を用いることにより、遺伝子導入法の改良を行う必要があるものと考えられた。

本研究では、FIV 感染症に対する遺伝子治療法の開発を目的とし、その基盤的研究を行った。第1章および第2章では、抗FIV遺伝子治療法として、RNAiによる遺伝子発現制御技術の応用に関してその有用性を示し、第3章では *in situ* 遺伝子導入法の可能性を示唆することができた。小動物臨床における遺伝子治療の開発はまだ始まったばかりである。現在のところ、人医領域においても感染症に対する遺伝子治療は臨床応用にまで至っていない。本研究は、ヒトおよび動物における感染症に対する遺伝子治療法の開発に有用な知見を提供するものと考えられた。