

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 馬場 健司

ネコ免疫不全ウイルス(Feline immunodeficiency virus, FIV)は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、免疫不全症候群を引き起こすことが知られている。免疫反応によって排除されず、持続感染の状態では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 感染症の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 FIV 特異的 small interfering RNA (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。siRNA は 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 の増殖は特異的に抑制された。さらに、その増殖抑制効果について詳細に検討した結果、siRNA は用量依存的に FIV の増殖を抑制すること、およびその効果は一過性であることが示された。そこで、FIV 特異的 short hairpin RNA (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る。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。FIV 持続感染 Tリンパ系細胞株(FL4)に FIV *gag* 遺伝子特異的な shRNA を発現するレトロウイルスベクターを感染させ、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 の増殖が著しく低下していた。この結果から、FIV 産生 Tリンパ系細胞に FIV 特異的 shRNA を安定に導入することにより、明らかな FIV 増殖抑制効果を得られることが示された。次に、FIV 非感染 Tリンパ系細胞株(MyA-1)に本レトロウイルスベクターを感染させた後、FIV 感染に対する抵抗性を検討した。しかし、FIV 特異的 shRNA 安定導入細胞における FIV の増殖抑制は認められず、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。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

FIV 感染症の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。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を投与し、ネコ体内における導入遺伝子の検出を行った。末梢血中のベクター遺伝子は、投与 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。骨髄中のベクター遺伝子は、投与 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。投与 28 日目における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。さらに、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。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。

以上、FIV 感染症の遺伝子治療の開発に向けて一連の検討を行った本論文は、学問的に、また応用上価値ある論文であり、審査員一同は博士(獣医学)の学位論文に値するものと認めた。