

論文の内容の要旨

論文題目 Basic Research on Development of the Measles Virus Vector for Induction of Immune Response and Tumor Targeting Therapy.

(和訳) 免疫誘導あるいは腫瘍標的治療用麻疹ウイルスベクター開発に関する基礎的研究

指導教官 甲斐知恵子教授
東京大学大学院医学系研究科
平成12年4月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
関 貴弘

麻疹ウイルス(MV)は、牛痘ウイルス(RPV)、イヌジステンパーウイルス(CDV)などとともにパラミクソウイルス科モービリウイルス属に分類されており、そのウイルスゲノムはマイナス一本鎖の RNA から成るモノネガウイルスである。モービリウイルスは伝播力や病原性が強いという特徴を持ち、それぞれの動物種において最も重要なウイルス感染症の一つである。中でも MV はヒトを唯一の自然宿主とするウイルスであり、以前は自然病態を再現する良い感染実験モデルがなかったが、我々はサルで発疹を誘発する独自のウイルス株(MV-HL 株)を用いてモデル実験系を確立している。また、モノネガウイルスでは困難とされてきた cDNA クローンからの感染性ウイルスを作出するリバーシジェネティクス法が近年に至って確立され、現在モノネガウイルスの研究が飛躍的に進んでいる。

著者らの研究グループでは、我国で分離された MV-HL 株を元に全ゲノム cDNA クローンを作製し、ウイルス構成タンパクである nucleocapsid (N)、phospho (P)、large (L) タンパクのサポーティングプラスミドと共に細胞に導入することで感染性のウイルス粒子を回収する方法(リバーシジェネティクス系)の確立に成功している。本リバーシジェネティクス系では各構造蛋白遺伝子間に制限酵素認識配列を配してあるため組換えが容易であり、未だ解明されていない病原性発現機構や宿主特異性決定機構の解析に役立つばかりでなく、新型ワクチン開発やウイルスベクターへの応用等に有用であると期待される。本研究ではこの新リバーシジェネティクス系を用いて、免疫誘導あるいは腫瘍標的治療用麻疹ウイルスベクターへの開発を行うための基礎的研究を行った。本論文は以下の2章より構成される。

第一章:組換え麻疹ウイルスベクターを用いた C 型肝炎ウイルス膜タンパクの発現

MV を含むモービリウイルス属は先進国においてはワクチン接種によって良くコントロールされており、その免疫誘導能及び免疫持続効果が優れている。また、著者らの研究グループは組換え CDV ベクターを用いて原虫感染症に対する二価ワクチン開発を試み、モービリウイルスが多価ワクチン開発に有効なベクターである事を既に明らかにしている。一方、C 型肝炎ウイルス(HCV)は全世界で 1 億 7 千万人、日本においても 200 万人以上の抗体陽性者がいると推定されている。しかし、現在のところ唯一の治療方法であるインターフェロン療法、特に最も有効であるリバビリンとの併用でも HCV の型によっては患者の 5 割程度にしか効果がないと言われている。さらに、薬剤が高価でかつ長期投与が必要であること等から C 型肝炎に対するワクチン開発は急務となっている。本章においては、MV をベクターとして HCV 膜蛋白を組込んだウイルス(rMV-Es)を作製し、MV-HCV 二価ワクチン開発のための基礎研究を行った。

我々が既にリバーシジェネティクス系を確立している組換え MV ベクターの N 遺伝子と P 遺伝子の間に PCR により増幅した HCV 膜蛋白の E1、E2、E12 のフラグメントを挿入し組換えゲノム cDNA クローンを作製した。得られた組換えプラスミドを、MV の N、P、L 蛋白を発現するサポーティングプラスミドと共に 293 細胞に導入し、3 日後に B95a 細胞と共培養することで rMV-E1、rMV-E2、rMV-E12 の 3 種の組換えウイルスの作出に成功した。これらの組換えウイルスも親株の rMV と同様に B95a 細胞で多核巨細胞型の細胞変性効果を示し、その大きさや性状などで特に差異は認められなかった。

本組換えウイルスの増殖能力を親株と比較すると増殖は約一日遅いピークを示したものの、最大力価は同程度のものが得られ、挿入したフラグメントの種類や長さによる差異はわずかなものだった。また、感染細胞のペレットから回収した cell associated virus とメディアウム中から回収した cell free virus を比べてもウイルス力価に大きな差異は無く、培養上清中にも多くのウイルス粒子が放出されていることがわかり、これらの結果から本組換えウイルスにおいても親株同様に効率良くウイルスの増殖、回収が出来ることが明らかとなった。

HCV 膜蛋白の発現については間接蛍光抗体法 (IFA)、免疫沈降法 (IP) 及びウェスタンブロット法 (WB) を用いて検索した。IFA の結果からいずれの HCV 膜蛋白も CPE を形成している細胞に強く発現が見られ、ウイルスの増殖に際して MV 由来蛋白と同様に高発現していることがわかった。さらに本来の HCV 膜蛋白同様に細胞内小胞体への局在も確認できた。IP 及び WB からは予想される分子量を持った HCV 膜蛋白が発現された後、適切に糖鎖修飾され、本来の HCV 膜蛋白同様に HCV-E1 と E2 でヘテロダイマーを形成していることが確認できた。

以上の結果から、各組換えウイルスが発現する膜蛋白は HCV-E1、E2 本来の構造・性質を保持していると考えられ、本組換え麻疹ウイルスベクターが外来タンパクの効率的な発現ベクターとして利用でき得ることが示された。

第二章:腫瘍標的治療用麻疹ウイルスベクターの開発

1970年代始めに麻疹に感染した後にリンパ腫が縮小した症例が報告されて以来、麻疹ウイルスを癌治療用ウイルスとして応用しようという試みがなされており、近年では麻疹ウイルス弱毒生ワクチンの卵巣癌に対する治療効果を検討するため第一相臨床試験に進んだ例もある。麻疹ウイルス(MV)は本来肝臓では増殖しないため、肝癌細胞に感染、増殖して破壊できる組換えMVを構築できれば癌部を破壊し、非癌部を破壊しない有効な肝癌治療ベクターとしての利用が期待できる。また、RNAウイルスであるMVはその生活環が細胞質に局限されており、宿主細胞のDNAに組込まれないことから、安全性の高い肝癌治療ベクターとなりうる。

第二章では肝癌特異的に感染する組換えMVの開発を目指して、肝癌特異的マーカーであるalpha-fetoprotein (AFP)に対するモノクローナル抗体の抗原認識部位(ScFv)遺伝子を組み込んだrMV- α AFPを作出し、肝癌に特異的に感染するMVベクターの開発を試みた。まず、 α AFPモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマOM3-1.1よりH鎖及びL鎖の遺伝子断片をクローニングした。これらをリンカー配列で繋ぎ、さらにウイルス粒子上に発現させるためMV-H、あるいはVSV-Gの膜貫通配列を付加した一本鎖抗体発現ユニット(ScFv)を構築した。これを組換えMVベクターのN-P遺伝子間に挿入し、組換えウイルスrMV-H- α AFP、rMV-G- α AFPのレスキューに成功した。

rMV-H- α AFP、rMV-G- α AFP共にB95a細胞では効率良く増殖し、親株と同等力価のウイルスが得られた。また、HepG2細胞におけるrMV-G- α AFPの増殖曲線は親株に比べて10倍以上高いウイルス力価を示し、rMV-G- α AFPが親株のrMVに比較して肝癌細胞内で効率良く増殖することが明らかとなった。rMV-H- α AFPは親株のrMVに比較して顕著な差は認められなかった。

次に、本組換えウイルスをヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5、Hep3B、Li-7、HepG2、HT-17、HuH-7、及び肝内胆管癌細胞由来細胞IHGGKに感染させ α AFP-ScFvの効果を検討した。Multiplicity of infection (MOI) = 0.1 TCID₅₀で3日間感染後、MV-Nに対するモノクローナル抗体を用いて感染効率を検討したところ、いずれの細胞においてもrMV-G- α AFPの感染効率が親株のrMVやrMV-H- α AFPに比較して上昇していた。PLC/PRF/5、Hep3B、Li-7細胞でのCPE数を比較したところ、rMV-G- α AFPでは他株の2-5倍の感染効率が得られた。

以上の結果からAFPに対するScFvタンパクをVSV-Gの膜貫通領域と融合する形で発現する組換えウイルスrMV-G- α AFPは肝癌由来細胞に対する感染増強効果をもたらすことが明らかとなり、本組換えMVの肝癌治療ベクターとしての有用性が示唆された。この結果は肝癌特異的抗原に対するモノクローナル抗体が得られた際には、より特異性の高い治療用ベクターが開発できる可能性を示すものである。

本研究の成果は麻疹ウイルスリバーシジェネティクス系がウイルスタンパク機能の遺伝子か

らの解析等の基礎研究に有用であるだけでなく、新型ワクチン並びに治療用ベクター開発などの有用性を示したもので、麻疹ウイルスベクターの応用的領域を新たに開く多大な知見を与えたと考えられる。