

審査の結果の要旨

氏名 関貴弘

著者らの研究グループでは、我国で分離された麻疹ウイルスHL株(MV-HL)を元に全ゲノムcDNAクローンを作製し、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ウイルス遺伝子の改変が容易であり、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。

本研究ではこのリバーシジェネティクス系を用いて、ワクチン開発が急務となっているC型肝炎ウイルス(HCV)に対する免疫誘導用ウイルスベクターあるいは安全性の高い肝がん治療用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い、下記の結果を得ている。

1. 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膜タンパクのE1、E2及びE12のフラグメントを挿入した組換えゲノムcDNAクローンを作製し、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。
2. 得られた組換えウイルスは親株の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、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。また、挿入したフラグメントの種類や長さによる増殖能への影響はわずかなものであった。
3. 組換えウイルスにおけるHCV膜タンパクの発現について、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)を用いて検討し、HCV膜タンパクがウイルスの増殖に際してMV由来タンパクと同様に高発現していることがわかった。IP及びWBからは予想される分子量を持ったHCV膜タンパクが発現された後、適切に糖鎖修飾され、本来のHCV膜タンパク同様に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。さらに本来のHCV膜タンパク同様に細胞内小胞体への局在も確認できた。以上の結果から、各組換えウイルスが発現する膜タンパクは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。
4. 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

クローニングした後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 タンパク、あるいは水疱性口内炎ウイルス (VSV)-G タンパク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 の作出に成功した。

5. rMV-H- α AFP、rMV-G- α AFP は共に 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 に比較して肝がん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。
6. 本組換えウイルスをヒト肝がん由来細胞 PLC/PRF/5、Hep3B、Li-7、HepG2、HT-17、HuH-7、及び肝内胆管がん細胞由来細胞 IHGGK に感染させ α AFP-ScFv の効果を検討した結果、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 rMV-G- α AFP の肝がん治療用ベクターとしての有用性が示唆された。

以上、本論文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の機能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へ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、学位の授与に値するものである。