

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成14年度博士課程入学
氏名 水越 文徳
指導教員 辻本 元

論文題目

Studies on preclinical approach for antiviral therapy
in feline immunodeficiency virus infection

(ネコ免疫不全ウイルス感染症における抗ウイルス療法に関する前臨床的研究)

ネコ免疫不全ウイルス(FIV)は、ヒトにおいて AIDS を引き起こすヒト免疫不全ウイルス(HIV)と同じくレトロウイルス科レンチウイルス属に属するウイルスであり、FIV と HIV の間にはウイルス学的に類似する点が多い。さらに、ネコにおける FIV 感染症では、臨床的および病理学的にヒトの AIDS と類似した免疫不全症の発症が認められる。これらのことから、ネコにおける FIV 感染症はヒト AIDS の動物モデル系として活用されてきた。また、FIV 感染症は、世界中で高い感染率を示し、それに対する有効な抗ウイルス療法は臨床応用されておらず、小動物臨床において重要な感染症の一つとされている。

HIV 感染症に対する治療法として複数の逆転写酵素阻害薬およびプロテアーゼ阻害薬を組み合わせた HAART 療法が開発され、その高い抗ウイルス効果が示されてきた。しかし、薬剤耐性ウイルスの出現、副作用の発現、高額な医療費などの問題を生じ、またウイルスの完全抑制は不可能であることがわかり、これらの薬剤とは全く作用の異なる薬剤の開発が期待されている。

レトロウイルスと宿主標的細胞との関連に関する詳細な研究により、これまでになく機序によって有効性を示す抗ウイルス療法を開発することが考えられるようになった。FIV は HIV と共通のウイルスレセプターである CXCR4 (CXCR4) を介して宿主細胞に侵入することから、CXCR4 に対するアンタゴニストを使用することによって新しい抗 HIV 薬を開発できる可能性が考えられる。また、HIV 及び FIV の標的細胞への吸着・侵入過程には、エンベロープ糖タンパク質を構成する膜貫通タンパク質 gp41

を介した標的細胞の細胞膜との融合が必須であり、その融合過程を阻害する薬剤も新規の抗ウイルス剤として使用できる可能性がある。さらに、病原体を直接の標的にする方法とは別に、宿主が本来持っている免疫力を高めてウイルス増殖を抑制する方法として、樹状細胞 (dendritic cell, DC) を用いた細胞免疫療法も有望と考えられる。

そこで、本研究では、FIV 感染症に対する新しい治療法の開発を目的とし、新たに開発された CXCR4 アンタゴニスト (第一章) および膜融合阻害剤 (第二章) の抗ウイルス効果をネコの培養細胞の系で検討した。次いで、DC を用いた細胞免疫療法の開発に必要な基盤を確立するため、FIV 感染ネコと非感染ネコから採取した DC の性状および機能を比較検討した (第三章)。

第一章：ネコ由来培養細胞における CXCR4 アンタゴニストによる FIV 感染阻害

CXCR4 の本来のリガンドである SDF-1 や低分子化合物の AMD3100 は、CXCR4 に作用し、FIV および HIV の複製を阻害することが示されているが、それらの薬物動態の不安定性や強い副作用のために実用化に至らなかった。次いで、CXCR4 アンタゴニストペプチドが開発され、そのうちの T140 は優れた抗 HIV 効果を示したが、血清中で不安定であるために臨床応用に至らなかった。最近になって、京都大学のグループが血清中でも安定な T140 の誘導体として TN14003 および TE14011 を開発した。そこで、本章では、これら T140 の誘導体の FIV 効果を検討することとした。はじめに、CXCR4 を発現しているネコリンパ腫由来細胞株 (3201) をこれら T140 誘導体で処理した後、抗 CXCR4 抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行った。その結果、抗 CXCR4 抗体の結合が阻害されたことから、TN14003 および TE14011 がネコ CXCR4 に効率良く結合することが示された。また、CXCR4 を発現している HeLa 細胞と FIV が持続感染している CRFK 細胞は共培養すると合胞体を形成するが、その共培養系に T140 誘導体を添加したところ、その用量依存的に合胞体の形成が阻害されることが示された。また、CXCR4 を発現しているネコリンパ系細胞株 (Kumi-1) に FIV を感染させると、6 日目には培養上清中に明らかな逆転写酵素活性の上昇が認められるが、これら T140 誘導体を添加した場合には、用量依存的にウイルス増殖が抑制された。本章における研究結果により、新しく開発された CXCR4 アンタゴニストである TN14003 および TE14011 がネコの培養細胞系において効率良く抗ウイルス効果を示すことが明らかとなった。

第二章：ネコ由来培養細胞における FIV gp41 のアミノ酸配列を利用した膜融合阻害剤による FIV 感染阻害

HIV が標的細胞に侵入する際には、エンベロープタンパク質の gp41 が細胞の膜に挿入され、3 本の gp41 の N 末端側の heptad repeat 1(HR1)領域と C 末端側の HR2 領域が互いに接近して 6-helix bundle を形成する。それによって、ウイルス側の膜と標的細胞の膜が融合し、ウイルスが侵入するための孔が形成される。そこで、このような 6-helix bundle 構造の形成を阻害する薬剤が抗 HIV 活性を有することが期待された。優れた抗 HIV 活性をもつ HR2 由来のペプチドとして開発された C34 は溶媒中の安定性がないために臨床応用には至らなかった。その後、グルタミンとリジンで salt bridge を形成させて水溶性を高める X-EE-XX-KK コンセプトと呼ばれる技術の応用によって、その水溶性および安定性が増すことが示された。本章では、FIV gp41 の N 末端側 HR1 領域または C 末端側 HR2 領域の配列を基に作製された膜融合阻害剤である FIV-C35 および FIV-N36、また X-EE-XX-KK コンセプトを応用して作製された FIV-C35EK1、FIV-C35EK2 および FIV-C35EK3 の抗 FIV 活性を検討した。CXCR4 発現 HeLa 細胞と FIV 持続感染 CRFK 細胞の共培養系に FIV-C35 または FIV-C35EK1 を添加した場合、その用量依存的に合胞体形成が阻害され、その抗ウイルス活性が示された。また、FIV に感受性があるネコリンパ系細胞株 (MYA-1) に FIV-C35 または FIV-C35EK1 の存在下で FIV を感染させたところ、用量依存的に培養上清中の逆転写酵素活性の低下が認められた。一方、過去の HIV における報告と同様、gp41 の HR1 配列由来の FIV-N36 には抗 FIV 活性は認められなかった。相互作用面と予想される部位の領域においてグルタミンとリジンを置換した FIV-C35EK2 および FIV-C35EK3 は抗 FIV 活性を示さなかった。本章における研究結果から、新たに開発された膜融合阻害剤のうちで強力な抗ウイルス活性を示すペプチドを同定することができた。

第三章：FIV 感染ネコおよび非感染ネコにおける末梢血単球由来 DC の比較検討

DC はナイーブ T 細胞に作用を及ぼす唯一の抗原提示細胞(APC)で、末梢組織で抗原を取込み、その情報を MHC 分子を介してナイーブ T 細胞やメモリー T 細胞に情報を伝え、抗原特異的な免疫反応を誘導する。1990 年代に DC に分化させる方法がマウスやヒトなどで確立され、その後、DC を用いた細胞免疫療法に

関する臨床試験が盛んに行われてきた。しかし、臨床的に有効な DC 療法の確立のためにはさらなる検討が必要とされている。本研究においては、FIV 感染症における DC による免疫療法の確立に向け、FIV 感染ネコおよび非感染ネコにおける末梢血単球由来 DC の比較検討を行った。AC(asymptomatic carrier)期の FIV 感染猫および非感染健康猫の末梢血液から単球を分離し、組換えネコ IL-4、GM-CSF および非働化自己血漿を加えた培養液で培養し、得られた細胞の性状を、その形態、表面抗原、食作用および混合リンパ球反応(MLR)によって評価した。感染猫および非感染猫の単球由来付着細胞は、いずれも IL-4、GM-CSF 存在下で樹状突起を呈し、DC に特徴的な形態を示した。これら細胞は、APC に特徴的な表面形質を示し、マンノース受容体に依存するデキストラン捕食能を持ち、MLR 誘導能を示したことから、DC に分化していることが示された。FIV 感染猫由来細胞では、非感染猫由来細胞と比べて CD1a の発現が低下していたが、形態および機能のいずれにおいても、両群の間に差は認められなかった。これらの結果より、FIV 感染猫でも非感染猫と同様に単球の DC への分化誘導が可能であることが示された。

本研究における一連の成果により、CXCR4 アンタゴニストおよび膜融合阻害剤といった新しい抗ウイルス薬候補剤が培養細胞系において優れた抗 FIV 効果を示すことが明らかとなり、また FIV 感染症における DC を用いた細胞免疫療法の基盤が確立された。これらの成果は、現時点では培養細胞系における所見にとどまっているが、今後、感染ネコ生体内において応用可能なものと考えられた。これら FIV 感染症に対する抗ウイルス療法の開発に関する研究は、小動物臨床において大きな問題となっている FIV 感染症に対する新規治療法の開発に有用な所見を提供するものであるばかりではなく、FIV 感染症を HIV 感染症の動物モデルとしてとらえた場合には、ヒトの AIDS に対する治療法の進展にも寄与するものと考えられる。