

論文の内容の要旨

論文題目 HIV 特異的遺伝子治療用ベクターの開発とその応用

指導教員 井上純一郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 山本 拓也

【研究の背景】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者数は 3000 万人以上であると考えられている (2008 年現在)。抗 HIV 薬の誕生により後天性免疫不全症候群 (AIDS) 死亡率は劇的に減少した。しかしこれら抗 HIV 薬により HIV 感染者は体内のウイルスを完全に排除することは出来ず、また耐性ウイルスの出現、高すぎる薬価など未解決の問題は後を絶たない。そのためエイズワクチンの開発は急務かつ必須であると考えられる。エイズワクチンを取り巻く現状として 2007 年に最も期待されていた米メルク社と NIH の共同開発による AIDS ワクチンの臨床試験がなされたが、期待された予防効果は認められず打ち切りとなった。しかしながら HIV に感染しても AIDS にならない、いわゆる長期未発症者と呼ばれる人が HIV 感染者の中で数%いる事を考慮すると、HIV は決して免疫系によってコントロールできないウイルスであるとは考えられず、エイズワクチンの開発は悲観的状況ではないと思われる。

そのような背景を考慮し、本研究ではウイルス複製の特異的な抑制と宿主免疫反応によるウイルス排除機構を協調させ、より強力で効果的な AIDS ワクチンの開発を目指し、遺伝子特異的発現抑制機構である RNAi を応用した遺伝子

治療用ベクターを開発することを目的とした（第二章）。また開発したベクターを治療用ベクターと意義付け、実際の HIV 慢性感染者に応用するための検討を、特に HIV 特異的な CD4 陽性 T 細胞の機能異常に着目して行った（第三章）。

HIV 特異的 shRNA 発現レンチウイルスベクターの開発（第二章）

RNAi による遺伝子配列特異的な発現抑制は、ウイルス感染における宿主自然抵抗性を賦与するための有効な手法と考えられる。AIDS の原因ウイルスである HIV-1 は 3 つの構造遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*)、2 つの調節遺伝子 (*tat*, *rev*)、そして 4 つのアクセサリー遺伝子 (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) を持つ。このうちアクセサリー遺伝子の 1 つである *nef* 遺伝子は HIV-1、HIV-2、サル免疫不全ウイルス (SIV) に共通に存在している。SIVmac239 を用いたサルの感染実験より、Nef が AIDS 発症において不可欠な因子であることが報告され、更に AIDS 長期未発症患者由来 HIV-1 の *nef* 領域に欠損および変異が確認されたことから、Nef が HIV-1 の病原性に関わる因子であるということが強く示唆されている。

そこで本研究では、末梢血単球由来マクロファージ (MDM)、樹状細胞 (MDDC) における HIV-1 Nef の機能制御とそれに伴う HIV 複製抑制を目的として、*nef* 遺伝子を標的とした short-hairpin を形成する RNA (shRNA) 発現レンチウイルスベクターの構築を行い、RNAi によるウイルス抑制効果について解析した。

結果としては、Nef 遺伝子の 366 番目の塩基から始まる siRNA が最も効果的に *nef* 遺伝子発現を抑制する事、この配列を標的とした shRNA 発現レンチウイルス (Lenti shNef366) は *nef* mRNA だけでなく HIV genome RNA 全長も破壊できる事、MDM において長期間ウイルス複製を抑制出来るが事が明らかとなった。またこの時、HIV 感染 MDM において Nef 発現により異常に発現誘導されるケモカインも Lenti shNef366 で抑えられる事、RNAi 効果を回避して産生されたウイルスの T 細胞への感染性が著しく低下している事も併せて明らかとなった。更にサイトカイン刺激による潜伏 HIV 持続感染細胞の再活性化に伴うウイルス産生も抑制し、MDDC による抗原提示を介した HIV 伝播も抑制するため、Lenti shNef366 は非常に効果的に HIV 複製を抑制する事が示唆された。

以上、Lenti shNef366 は HIV 特異的な遺伝子治療用ベクターとして非常に有用であると考えられる。

HIV 特異的 shRNA 発現レンチウイルスベクターの応用（第三章）

HIV 特異的記憶 CD4 陽性細胞は長期未発症者あるいは急性期に抗 HIV 療法を受けて血中ウイルス量の低い人では HIV 抗原に対する増殖能が極めて高い事、HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖応答能と血中ウイルス量とは逆相関することが知られている。また病態進行と HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の数に相関はないが、HIV 感染進行感染者ではこれら細胞の増殖能が低下していることから、HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能、特に慢性感染期における抗原特異的増殖はウイルス制御に重要であると考えられる。

そこで第二章での結果を踏まえ、Lenti shNef366 を用いることにより HIV 複製を阻害することで HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能異常が回復され得るか否かを検討した。対象患者としてはフランスの大規模なコホートの 1 つである IMMUNOCO コホートより選択した慢性感染期患者を選択した。

その結果、Lenti shNef366 導入により血中ウイルス量の高い患者群(>10000 copies/ml)で有意に HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の細胞増殖能が回復した。これら患者では Lenti shNef366 導入により他の抗原特異的反応、例えば CMV 抗原や PPD 抗原に対する反応性に影響はなかった。つまり Lenti shNef366 は HIV 特異的に複製を抑制し、それにより HIV 特異的な免疫反応を維持、回復出来ることが強く示唆された。これは抗 HIV 薬でウイルス量を減少させるだけでは成し得なかった結果で、AIDS 治療を考える際に非常に有用であると考えられる。

これらの結果を総合して考えると、Lenti shNef366 の導入により HIV 特異的な免疫応答を担う CD4 陽性細胞に HIV 抵抗性が賦与され、その機能異常も回復するため、現行のワクチン戦略と併用することにより、一層強力な治療用ワクチンベクターとなる事が期待される。