

審査の結果の要旨

氏名 山本拓也

本研究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 ワクチン開発をめざすため、RNAi 誘導型 HIV 特異的遺伝子治療用ベクターを作製することを目的とした。作製したベクターを評価するため HIV-1 複製に対する効果を検討した。さらに宿主免疫応答に伴う潜伏感染ウイルスの再活性化に対する効果、ならびにそれに伴う HIV-1 特異的記憶 CD4 陽性細胞の機能異常が回復されるかを検討し、下記の結果を得ている。

1. 恒常的 Nef 発現 HeLa-CD4 細胞を用い、HIV *nef* 遺伝子に対する siRNA 配列を選択し、siRNA 導入による RNAi 効果を検討した。その結果、*nef* 遺伝子の ATG から数えて 355 番目の塩基 (Nef355)、366 番目の塩基 (Nef366) から始まる配列を標的とした siRNA で非常に強い *nef* mRNA、Nef 蛋白質発現抑制効果が確認された。この効果は Nef355 と比較して Nef366 でより顕著であった。
2. Nef366 配列を標的とする RNAi 誘導型レンチウイルスベクター (Lenti shNef366) を作製した。Lenti snNef366 を初代培養マクロファージに導入し、導入 2 日後に HIV を感染させたところ *LacZ* 遺伝子を標的とした RNAi 誘導型レンチウイルスベクター (Lenti cont) を導入した場合と比べ、70%程度 of HIV 複製抑制効果が確認された。またこの効果は 2 週間以上にわたり長期間維持される事が分かった。
3. Lenti shNef366 導入マクロファージより RNAi 効果を回避して産生された HIV (HIV Lenti shNef366) と Lenti cont 導入マクロファージより産生された HIV (HIV Lenti cont) の感染性を、HIV-1 LTR の下流に EGFP 遺伝子をもつ DNA を導入した T 細胞株である CEMx174 CCR5 LTR-EGFP 細胞を指標として、EGFP 陽性細胞数で指標に比較した。その結果、HIV Lenti shNef366 の感染性は HIV Lenti cont と比較して 50%程度に減弱することが確認された。
4. 潜伏 HIV 持続感染 T 細胞株ならびに単球系細胞株に Lenti shNef366 を導入した場合、サイトカイン刺激に伴う HIV 再活性化による HIV 産生量が 50%程度に抑制される事が確認された。
5. HIV 慢性感染期患者由来 PBMC を用いた解析により、Lenti shNef366 を導入することで、特に高ウイルス血症の患者において抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の抗原特異的増殖能が改善するという結果が得られた。また他の抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞には影響を及ぼさず、HIV 特異的免疫反応のみに影響する事が明らかとなった。
6. Lenti shNef366 導入により機能改善が見られた HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の細胞表現型をフローサイトメーターにより解析した結果、HIV 慢性感染期で特に機能異常が見られる Intermediate な分化段階 (CD28+CD27⁻、CD28+CD27⁻) の細胞集団で

以上、本論文では HIV 特異的遺伝子治療用ベクターによる HIV 複製抑制効果および HIV 慢性感染期における抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能改善が示されている。この事は、これまでの抗 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、HIV 複製を抑制すると同時に抗原特異的免疫応答の機能異常を改善するという報告であり、AIDS 治療ならびに AIDS ワクチン開発を考える際に非常に有用であると考えられる。よって本論文は学位の授与に値するものと考えられる。