

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 29 年度博士課程進学
松郷 宙倫
指導教員 堀本 泰介

論文題目 細菌人工染色体を用いた DNA ウイルスの遺伝子改変系の構築
およびイヌを対象とした疾患への応用

アデノウイルスやヘルペスウイルスは、遺伝子治療用のベクターやベクターワクチン、あるいは腫瘍溶解性ウイルス（OV）のバックボーンとして注目され、医学領域において研究が進展しており、獣医学領域においてもその応用が期待されている。これらの目的に応用できる組換えウイルスの構築には、それぞれのウイルスに対する遺伝子改変技術が必要になるが、特に獣医学領域にベクターとして適用できる動物由来のアデノウイルスやヘルペスウイルスについての遺伝子改変技術は確立されていない。これらの DNA ウイルスは、そのゲノムサイズが大きいため、通常のプラスミドをベースとしたウイルスゲノムのクローニングや意図する変異の導入は極めて困難である。この問題に対応するために、本論文では、複数のアデノウイルスやヘルペスウイルスについて細菌人工染色体（BAC）をベースとした遺伝子改変系を確立し、それをもとにイヌを対象とした疾患への応用を目指したウイルスベクターを構築し、その評価を行った。

第一章 第一節

細菌人工染色体を用いたイヌアデノウイルスの遺伝子改変系の構築

イヌアデノウイルス（CA_{AdV}）は、イヌ科の動物に伝染性肝炎を引き起こすイヌアデノウイルス 1 型（CA_{AdV1}）と伝染性喉頭気管炎を引き起こすイヌアデノウイルス 2 型（CA_{AdV2}）の二つの病原型に分けられる。また、CA_{AdV} はイヌやヒトにおける組換えワクチンや遺伝子治療に応用できるウイルスベクターのバックボーンになりうる。これまでのプラスミドをベースとした遺伝子改変系による CA_{AdV} ベクターの構築は、そのゲノムサイズの大きさが技術的な隘路になっていた。そこで、本研究では、BAC を用いた CA_{AdV} の感染性クローンを構築し、BAC の遺伝子改変技術によって簡便かつ効率的に遺伝子改変したウイルスを作

出することを可能とした。このシステムの有用性を示すために、初期遺伝子 E1 領域を欠損させた CAdV2 変異体を作出した。この変異体は、培養細胞においては弱毒化していた。これらの結果から、本研究で構築した BAC をベースとした CAdV の遺伝子改変系は、CAdV の基礎研究や実用的な研究のための有用なツールになると考えられる。

第一章 第二節

イヌアデノウイルスの増殖性を規定する新規タンパク質の同定

犬伝染性喉頭気管炎の病原体である CAdV2 の分離株には、大小の異なるサイズのプラークを形成するバリエーション (L および S) が混在しているが、その分子基盤は明らかになっていない。本節では、第一節で構築した BAC を用いた遺伝子改変系と同様の方法で、L および S バリエーションの遺伝子改変系を構築し、プラークサイズの違いを決定している因子の同定を試みた。バリエーション間で異なるゲノム塩基配列を基に作出した変異ウイルスの解析により、ヘキソン遺伝子 ORF 内に位置する 18408 番目の塩基がグアニン (g) のウイルス (L-rWT) は L と、アデニン (a) に置換した変異ウイルス (L-g18408a) は S とそれぞれ同等の増殖性を示し、この一つの塩基の違いが増殖性 (プラークサイズ) を規定していることがわかった。同塩基の違いはヘキソン遺伝子に対しては同義置換であることから、18410 番目から始まる別フレームにある ORF にコードされる未知タンパク質 X の存在と、そのウイルス増殖性への関与を疑った。L-rWT は L-g18408a より X の発現量が高いこと、その開始コドン直後に終止コドン挿入することで X を発現しないようにした変異ウイルス (DelX) は、L-rWT よりも増殖性が低くなることが明らかになった。また、L-rWT は、L-g18408a や DelX に比べ細胞死を早く引き起こしていることがわかり、X が細胞死を誘導してウイルスの細胞外への放出を促進している可能性が示唆された。本研究により、これまで報告のない新規タンパク質 X が CAdV2 の増殖性を規定していることがわかった。この成果は、CAdV の病原性などの基礎研究や、効率的なベクターウイルスや腫瘍溶解性ウイルスの構築などの応用研究に貢献すると考えられる。

第二章

イヌアデノウイルスベクターを用いたイヌインフルエンザワクチン候補株の作出

イヌインフルエンザウイルス (CIV) は、アメリカ、中国、韓国などで流行しており、イヌに呼吸器症状を引き起こす。イヌはヒト、鳥、ブタなど他の動物由来のインフルエンザウイルスにも感受性があり、CIV はそれらのウイルスと組換え (遺伝子交雑) を起こしたりそれ自体が変異を起こしたりすることでヒトに感染性をもつ変異ウイルスが出現する可能性があることから、公衆衛生上においても注意すべきウイルスである。その見地からも、CIV のワクチンによる予防と制御が期待される。第二章では、CIV のワクチン開発を目的に、第一章第一節で確立した E1 欠損型の CAdV2 をベクターに CIV の防御抗原である HA を発現する組換えウイルス (CAdV2- Δ E1-HA) を構築し、その CIV に対する防御効果を評価し

た。マウスに CAdV2- Δ E1-HA を経鼻または筋肉内に 2 週間おきに計 2 回免疫したところ、CIV と CAdV2 両方に対する中和抗体の上昇が見られた。最初の免疫から 4 週間後にマウス馴化 CIV で攻撃したところ、非免疫群に比べて免疫群は体重減少の程度が軽減し、さらに肺のウイルス力価も減少し、CIV に対するワクチン効果が認められた。経鼻免疫群の方が筋肉内免疫群よりも防御効果が高かった。本研究で構築した CAdV2- Δ E1-HA は、CIV と CAdV 両方に対して効果的な多価のベクターワクチン候補株になると期待される。

第三章

細菌人工染色体を用いたコウモリアデノウイルスの遺伝子改変系の構築と腫瘍溶解性ウイルス候補株の構築

OV 療法は、腫瘍細胞で選択的に増殖するウイルスを用いる新たな腫瘍の治療法である。イヌの腫瘍を標的とした CAdV を基盤とした OV 開発へのアプローチについては、いくつか報告があるものの、腫瘍溶解性 CAdV は、広く使われている CAdV ワクチンによって誘導される抗 CAdV 中和抗体によってその抗腫瘍効果が減弱する可能性がある。この問題を解決するために、私は当研究室で分離されたコウモリアデノウイルス (BtAdV) に着目した。BtAdV の Mm32 株および Vs9 株は、イヌ由来 MDCK 細胞で効率的に増殖するだけでなく、抗 CAdV 中和抗体と交叉反応しないことがわかっており、BtAdV は有望な OV の候補と考えられる。まず、BtAdV のイヌ腫瘍由来の培養細胞における増殖性と細胞傷害性を調べたところ、Mm32 は CAdV に匹敵する増殖性、細胞傷害性を示すことがわかった。そこで、Mm32 に腫瘍選択性を付加するために、BAC をベースとした BtAdV の遺伝子改変系を構築し、イヌのテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター (cTERTp) を Mm32 の E1A 転写制御領域に挿入した Mm32-E1Ap+cTERTp を作出した。イヌ正常培養細胞における Mm32-E1Ap+cTERTp の増殖性、細胞傷害性は、同様な BAC システムにより作出した組換え野生型 Mm32 (Mm32-rWT) と同等であった一方で、イヌ腫瘍培養細胞における Mm32-E1Ap+cTERTp の増殖性、細胞傷害性は Mm32-rWT よりも高かった。これらの結果から、本研究で作出した Mm32-E1Ap+cTERTp は、イヌの腫瘍を標的とした OV として有望であることが分かった。本研究は、BtAdV の遺伝子改変系を構築した初の報告であり、イヌの腫瘍を標的とした OV の開発研究のみならず、遺伝子治療用のベクター構築や基礎研究にも貢献する。

第四章

細菌人工染色体を用いた仮性狂犬病ウイルスの遺伝子改変系の構築と腫瘍溶解性ウイルスの構築

イヌの主な死因の一つであるがんに対する新たな治療法として、腫瘍選択的に増殖するウイルスを用いる OV 療法は最も有望な方法の一つである。医学分野において、最も有効な OV 療法として、ヘルペスウイルスをベースとする OV の開発が進み一部実用化されて

いるが、獣医学分野においてはこれまでに報告がない。本研究では、イヌの OV 療法の開発を目指し、仮性狂犬病ウイルス（豚ヘルペスウイルス 1 型）（PRV）をベースとする OV 候補株の構築を目的とした。まず、BAC を用いて PRV の遺伝子改変系を構築したところ、組換え PRV は野生型ウイルスと同等の増殖性、病原性を示した。次に、PRV に腫瘍選択性を付加するために、神経侵襲性に関わる UL37 の R2 領域への変異の導入（37R2）、非分裂細胞における増殖に関わる UL39 の欠損（39Δ）、およびその両方を改変（37R2/39Δ）した組換えウイルスを作出し、それらの性状を解析した。39Δ と 37R2/39Δ は *in vitro* において腫瘍細胞選択的に増殖し、マウスにおける病原性が高度に弱毒化していた。イヌ骨肉腫細胞 HMPOS を移植したヌードマウスを用いて、*in vivo* における抗腫瘍効果を調べたところ、37R2/39Δ は腫瘍の成長を有意に抑制した。これらの結果から、37R2/39Δ は、安全性、抗腫瘍効果の両方の点においてイヌの腫瘍を標的とした非常に有望な初めてのヘルペスウイルスベースの OV として獣医学領域に適用できると期待される。

本研究を総括すると、BAC を用いた複数の DNA ウイルスの遺伝子改変系を初めて確立し、イヌの疾患に対するそれらの応用性と有用性を評価した。また、CAAdV2 の遺伝子改変系を活用して、ウイルスの増殖性を規定するこれまでに報告のない新規タンパク質を同定した。この成果は、CAAdV の病原性を解明する上で重要な知見になるだけでなく、CAAdV ベクターウイルスの産生効率を上昇させる技法への応用性も期待できる。CIV の HA を搭載した組換え CAAdV2 は、CIV 感染に対する高い防御効果を示し、CIV のみならず CAAdV1 と CAAdV2 にも有効なこれまでに例のない多価のベクターワクチン候補株になることが期待される。同様な戦略は、イヌの他の病原体に対するワクチン開発にも応用可能であると考えられる。BtAdV に関しても同様の手法で遺伝子改変系を構築し、イヌのがん治療に有望な組換え OV ウイルス候補株を作出した。BtAdV の活用はこれまでに報告がない独創的な戦略である。腫瘍溶解性 PRV は、イヌの腫瘍細胞に対して高い選択性と抗腫瘍効果を示し、イヌの新たながん治療への応用が期待される。総じて、本研究は、イヌのがん疾患や感染症を含む重要な疾患に対して革新的で独創的な予防法や治療法の開発につながる知見を提供した。