

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	乙 三重大学大学院医学系研究科 医科学専攻 病態解明医学講座 感染症制御医学・分子遺伝学分野	氏 名	おおつか じゅんぺい 大塚 順平
<p>主論文の題名</p> <p>Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector</p> <p>主論文の要旨</p> <p>我々は、human parainfluenza virus type 2 (hPIV2)をベースにして、現在、ワクチンが存在していない感染症に対して、それらの抗原となりうる遺伝子を搭載させた組み換えウイルスを利用した新規ワクチンの構築を目指した。自然界で組み換えウイルスが自然増殖することは重大な問題となるため、組み換えウイルスが感染性ウイルスを産生出来ない様にウイルスゲノムの1遺伝子を欠損させて、自然界では感染回数を1度に制限する工夫をした。そのため、この組み換えウイルスが感染性を保持するウイルスとして増殖させるために、欠損させた遺伝子を恒常的に発現するパッケージング細胞を樹立し、組み換えウイルスを感染させて増殖させるシステムを構築した。さらにこれらのシステムを使用して作られた新規の組み換えウイルスベクターの特性解析を行った。</p> <p>hPIV2 ウイルスゲノムから細胞融合に関わるFタンパク質(Fusion protein)の遺伝子を欠損させたので、Vero細胞にhPIV2F遺伝子を導入し恒常的にFタンパク質が発現するパッケージング細胞を樹立し、限界希釈法で得られた細胞株(Vero/BC-F)の特性解析を行った。Vero/BC-F細胞は、導入したhPIV2F遺伝子の発現による細胞の増殖抑制は無く、Vero細胞と同等の増殖速度を示した。しかし、Vero/BC-F細胞でさらにhPIV2Fタンパク質を過剰発現させたところ死細胞が有意に増加しており細胞毒性が現れた。そして、発現しているFタンパク質は細胞膜上に存在しており、hPIV2HN遺伝子を共発現させた時、細胞融合が起こり多核巨細胞を誘導したことからVero/BC-F細胞のFタンパク質は生理活性を維持していることが示された。また、細胞のhPIV2F mRNAは短期間培養細胞(数か月)と長期間培養細胞(2.5年以上培養)の両方で検出されたが、長期間培養細胞では短期間培養細胞の約1/5程度まで減少していた。</p> <p>リバースジェネティックス法でhPIV2F欠損レプリコンを作製し、Vero/BC-F細胞に導入すると感染回数に制限なく増殖し、さらにウイルスゲノムにさらなる変異が無</p>			

い RNA レプリコンが取り込まれた感染性粒子が産生された(hPIV2 Δ F)。hPIV2 Δ F を Vero 細胞に感染させた時、初感染は起こるが細胞融合は誘導されず、hPIV2F タンパク質の発現や感染性粒子のウイルスも確認出来なかったことから非伝播性の能力を保持していることが分かった。また、Vero/BC-F 細胞に感染させた時、少なくとも 10 回の継代までは hPIV2 Δ F に組み換えが起こらず野生型に戻らないことも確認した。また EGFP 遺伝子を搭載した組み換えウイルスは最大 6.0×10^8 tissue culture infections dose (TCID₅₀)/ml の高力価のウイルスを産生した。さらにウイルス生産性に関しては、短期間培養細胞と長期間培養細胞で hPIV2F の mRNA 量に差があったが、ほぼ同等の力価となった。

A 型インフルエンザウイルスの万能抗原をコードする M2 遺伝子を hPIV2 Δ F に組み込んだ組み換えウイルスを作製し、ヒト肺がん細胞株(A549)に感染させたところ非常に高い M2 タンパク質の発現があった。さらに EGFP を組み込んだ組み換えウイルスをハムスターに経鼻投与したところ、気管組織で GFP タンパク質の発現が確認された。

以上のことから、Vero/BC-F 細胞は、細胞障害を起こさない程度の hPIV2F タンパク質が発現し細胞膜上で生理活性を保持している。また、長期間培養においては mRNA の量は減少するが十分量の F タンパク質を組み換えウイルスに供給することが可能であり、シードウイルスから高力価の組み換えウイルスベクターの生産・回収を容易に行うことが可能である。組み換えウイルスは in vivo で外来遺伝子のデリバリーやタンパク質を高発現させる能力を併せ持っており、hPIV2F タンパク質非存在下では 1 度しか感染しない非伝播性のウイルスベクターであることから hPIV2 Δ F ベクター/ Vero/BC-F 細胞システムは安全性が高く、人に対する遺伝子治療や組み換えワクチンの開発に応用することが期待できると考えられた。