

# 学位論文審査結果の要旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 乙 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	大塚 順平
審 査 委 員	主 査 稲垣 昌樹 副 査 山崎 英俊 副 査 溝口 明		

(学位論文審査結果の要旨)

Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector

【主論文審査結果の要旨】

著者らは論文において下記の内容を述べている。

【背景】

世界3大感染症である結核、マラリア、エイズを含む多くの感染症で有効なワクチンは存在していない。また、2001年以降、Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)、インフルエンザ(H1N1)、Middle East Respiratory Syndrome (MERS)、エボラ出血熱、ジカ熱など人類を脅かす新興・再興感染症が発生してきた。今後も予期せぬ発生が予想されるため、これら感染症に対する有効なワクチンの開発が強く望まれている。

【目的】

現在のワクチンは、生ワクチン、不活化ワクチンが主流となっているが、ワクチンが有効な感染症は限られている。多くの感染症では、有効なワクチン作製が困難であり、新しいタイプのワクチン開発の必要性が高まっている。本研究では、組換えウイルスを用いて、安全性が高く、抗原遺伝子産物を直接ウイルスベクターに搭載した次世代型の組換えウイルスワクチンの開発を目指した。

【方法】

パラミクソウイルス科ルブラウイルス属の Human parainfluenza virus type 2 (hPIV2)を組換えウイルスベクターとして利用した。野生型では多重感染能を持ち問題となるので、安全性を考慮し hPIV2 のウイルスゲノムから F 遺伝子を除いた欠損

型ウイルス hPIV2 $\Delta$ F を作製した。また、F タンパクを欠損ウイルスに供給するため Vero 細胞に hPIV2 F 遺伝子を導入して、恒常的に F タンパクを発現する細胞を構築し、特性解析を行った。

A 型インフルエンザウイルス間で非常に良く保存されている万能抗原である M2 タンパクの遺伝子 (M2) を搭載した M2-hPIV2 $\Delta$ F を作製し、ヒト由来の A549 細胞に感染させ、また、EGFP-hPIV2 $\Delta$ F をシリアンハムスターに経鼻投与し、ウイルスベクターの発現解析を行った。

#### 【結果】

Vero 細胞に hPIV2 F 遺伝子を導入して恒常的に F タンパクを発現する Vero/BC-F 細胞を構築した。Vero/BC-F 細胞は特性解析により、F タンパクは細胞膜表面上に局在し、細胞毒性を示さない程度の量を発現していた。また、hPIV2 HN タンパクを共発現させた時、細胞融合を誘導したことから F タンパクとして機能していることが示唆された。hPIV2 ゲノムから F 遺伝子を取り除いた hPIV2 $\Delta$ F (phPIV2 $\Delta$ F :

T7 RNA polymerase で転写させる) はリバースジェネティクス法 (Vero/BC-F 細胞に phPIV2 $\Delta$ F と hPIV2 NP/P/L、T7 RNA polymerase の各々の発現ベクターを co-transfection する) でシードウイルスを作製した。Vero/BC-F 細胞で hPIV2 $\Delta$ F を 4 継代した上清からウイルス RNA を精製し RT-PCR/PCR による F 遺伝子の不検出と Vero 細胞に hPIV2 $\Delta$ F を感染させたところ F タンパクの発現がないことからウイルスゲノム内から F 遺伝子が欠損していることを確認した。また、少なくとも 10 継代した hPIV2 $\Delta$ F では、Vero/BC-F 細胞の染色体 DNA または mRNA に由来する F 遺伝子が hPIV2 $\Delta$ F と組換えを生じなかった。また、EGFP を搭載した hPIV2 $\Delta$ F (EGFP-hPIV2 $\Delta$ F) を Vero または Vero/BC-F 細胞に感染させたところ Vero/BC-F 細胞でのみ感染が広がり、感染 6 日後では最大で  $6.0 \times 10^8$  Tissue Culture Infectious Dose<sub>50</sub>/ml のウイルス力価が得られた。

M2-hPIV2 $\Delta$ F を A549 細胞に感染させた時、M2 タンパクの高発現を確認した。また、EGFP-hPIV2 $\Delta$ F をハムスターに経鼻投与し、3 日後の気道組織で GFP の発現を確認した。

Vero/BC-F 細胞は、パラミクソウイルス科の F タンパクを恒常的に発現する世界で初めて樹立された細胞株である。また、hPIV2 $\Delta$ F は Vero/BC-F 細胞でのみ増殖するため安全性が高く、搭載した外来遺伝子は *in vitro/in vivo* で高発現されるウイルスベクターであることを示した論文であり、学術上極めて有益であり、学位論文として価値のあるものと認めた。

Gene Therapy 2014;21:775-784

Published online: June 19, 2014 DOI: 10.1038/gt.2014.55.

Ohtsuka J, Fukumura M, Tsurudome M, Hara K, Nishio M, Kawano M, and Nosaka T.