

学位論文題名

核酸を用いたマウス肝炎ウイルス（MHV）の
増殖阻害に関する研究

—特にリボザイムについて—

学位論文内容の要旨

近年、様々な型の核酸を用いたウイルス遺伝子の発現制御の研究が盛んに行なわれており、ウイルス感染に対する遺伝子治療への応用の期待も高まっている。アンチセンス核酸は、ウイルスの特定タンパク質をコードする mRNA に相補的な塩基配列を有する核酸であり、それを用いた当該タンパク質の発現制御の様々な検討がなされてきた。最近では、切断活性を有するリボザイムの塩基配列をアンチセンス核酸に組み込み、より効果的なウイルスの増殖阻害を得る試みもなされている。本研究においては、実験用マウスに重篤な肝炎や腸炎、呼吸系の疾患などを引き起こすマウス肝炎ウイルス（MHV）に対してリボザイムを含めた各種のアンチセンス核酸が抗ウイルス効果を持つか否かについて検討すると共に、近年、注目されている DNA ワクチネーションについても検討した。さらに MHV においてはウイルスの持続感染機構に不明な点が多いので、そのことについても検討し、以下に示す成績を得た。

1. MHV の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (*pol*) 遺伝子 mRNA に対するハンマーヘッド型リボザイムを発現するベクターを構築し、このリボザイムの *in vitro* での切断活性について検討した。切断部位は *pol* 遺伝子 mRNA の +238 番目に存在するシトシン塩基の直後である。リボザイムの切断活性は反応温度、 Mg^{2+} 濃度およびリボザイムと標的である *pol* 遺伝子 mRNA の濃度比に依存して進行し、本研究で作製したリボザイムが *in vitro* で期待された切断活性を有することが示された。さらに、リボザイムのアンチセンス配列の長さが酵素活性に及ぼす影響を検討したところ、アンチセンス配列の長さの短い方がリボザイムの切断は効率的におこることが示された。

2. アンチセンス配列の長さの異なる二種類のリボザイムを細胞内で発現するベクターを構築し、MHV に高感受性のマウスのアステロサイトーマに由来する DBT 細胞に導入した。各リボザイムを高発現する形質転換細胞について、急性感染期におけるウイルスの増殖に対するリボザイムの効果を検討したところ、どちらのリボザイ

ムを発現する細胞においても効果的に MHV の増殖が阻害された。細胞内でリボザイムによる切断産物は検出できなかったが、リボザイム配列を含まないアンチセンス RNA を発現する細胞よりも増殖抑制の程度は大きく、細胞内でもリボザイムとして作用していることが示唆された。

3. MHV に持続感染した細胞をクローン化することによって、持続感染した細胞の特徴を解析した。クローン化した全ての細胞は、ウイルスの重感染に対して抵抗性を示し、細胞に何らかの変異が起こっていることが示唆された。また、持続感染状態にある細胞は細胞内のウイルスの存在とウイルス粒子の産生性が様々であることが示され、そのことが持続感染状態の成立に重要であると考えられた。

4. リボザイム配列を含むアンチセンス RNA 発現細胞において、MHV 持続感染におけるウイルス遺伝子の転写およびウイルス粒子の産生は顕著に抑制されており、アンチセンス RNA が持続感染状態のウイルス増殖の抑制にも効果的であることが示された。

5. MHV の転写や複製のプロモーターである MHV のリーダー RNA に対するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドは 0.001 から 0.1 μM の濃度範囲で、塩基配列および濃度に依存して MHV の増殖を阻害し、通常为非修飾型のアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも 100~1000 倍低い濃度で効果を有することを示した。また、0.5 μM 以上の濃度では塩基配列に非特異的に MHV の増殖を阻害した。

6. ラウス肉腫ウイルスの long terminal repeat (LTR) をプロモーターとして、MHV のヌクレオキャプシドタンパク質を発現するプラスミドベクター pRSV-mRNA7 を、C57BL/6 マウスに筋肉内投与した場合に、このマウスでは MHV の接種後、非投与のマウスで観察された血管性細胞浸潤と神経細胞の壊死性変化を伴う急性脳炎の組織像は観察されなかった。

本研究の結果は、様々なアンチセンス核酸が急性および持続感染期における MHV の増殖を効果的に抑制することを示した。さらに、DNA ワクチネーションの有効性も示唆した。しかし、これらの核酸が示す抗ウイルス効果の機序については今だ不明な点も多く、さらに詳細な検討が必要であると考えられた。また、より効果的なウイルス増殖阻害効果を得るために、いかにしてこれらの発現ベクターを目的の臓器に導入し高発現させるかというドラッグ・デリバリー・システムの開発や、体内での代謝、各組織への分布などの検討が今後の課題となるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 智 正

副 査 教 授 喜 田 宏

副 査 教 授 小 沼 操

副 査 酪農学園大学教授 林 正 信

学 位 論 文 題 名

核酸を用いたマウス肝炎ウイルス (MHV) の 増殖阻害に関する研究

—特にリボザイムについて—

近年、様々な型の核酸を用いてウイルス遺伝子の発現制御に関する研究が盛んに行なわれており、ウイルス感染に対する遺伝子治療への応用の期待も高まっている。本研究においては、ウイルスの特定タンパク質の mRNA に相補的なアンチセンス核酸や切断活性を有するリボザイム、さらに MHV に対する DNA ワクチネーションによって、実験用マウスに重篤な肝炎、腸炎、呼吸器系の疾患などを引き起こす MHV の増殖を抑制できるか否かについて検討した。

MHV の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (*pol*) mRNA を切断するハンマーヘッド型リボザイムの発現ベクターを構築し、*in vitro* での切断活性について検討した。リボザイムの切断活性は反応温度、 Mg^{2+} 濃度および標的となる *pol* 遺伝子 mRNA の濃度に依存して変化した。さらに、長さの短いリボザイムの方が長いものよりも切断効率が良いことが示された。

次に、リボザイムの細胞内発現ベクターを構築し、MHV 高感受性のマウスアストロサイトーマに由来する DBT 細胞に導入した。リボザイムを高発現する形質転換細胞について、急性および慢性感染期におけるリボザイムの影響を検討したところ、MHV の増殖が効果的に阻害された。

また、MHV の転写や複製のプロモーターである MHV のリーダー RNA に対するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドは $0.001 \sim 0.1 \mu M$ の濃度範囲で、塩基配列および濃度に依存して MHV の増殖を阻害した。

ラウス肉腫ウイルスの末端反復配列をプロモーターとして、MHV のヌクレオキャプシドタンパク質を発現するプラスミドベクターを、C57BL/6 マウスに筋肉内投与した。MHV 接種後、非投与のマウスで観察された血管性細胞浸潤と神経細胞の壊死性変化を伴う急性脳炎の組織像は、投与マウスでは観察されなかった。この結果は、プラスミドベクターの投与によって MHV 感染に対する抵抗性が投与マウスに付与されたためであると考えられた。

本研究は、リボザイムを含めた様々なアンチセンス核酸や DNA ワクチネーションのためのプラスミド DNA が、MHV に対して抗ウイルス効果を有することを示したものであり、その予防治療における興味深い知見を提供するものである。よって、審査員一同は前田秋彦氏が博士 (獣医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。