

学 位 論 文 題 名

Basic studies for the construction of a retroviral
vector system to transfer vector genes into the
central nervous system

（中枢神経親和性レトロウイルスベクター系構築の基礎的研究）

学位論文内容の要旨

レトロウイルスが細胞に感染すると、その遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれる。レトロウイルスベクター系は、この性質を利用して遺伝子導入に広く用いられている。しかしながら現在用いられているベクター系は、標的細胞の性状により、必ずしも十分な遺伝子導入効率を得られない。これまでに、中枢神経系細胞に遺伝子を導入するための新しいベクター系を構築する目的で、フレンドマウス白血病ウイルス (Friend MLV) から、ラットの中枢神経系ならびにグリア系の細胞でよく増殖する FrC6 ウイルスならびにその遺伝子クローン A8 が分離された。A8 ウイルスは、ラットの中枢神経系ならびにグリア系細胞でよく増殖し、この増殖にはウイルス遺伝子の *env* 及び末端反復配列を含む領域が関与する。*env* 遺伝子にコードされる *env* タンパク質は、ウイルス感受性細胞への吸着ならびに細胞内侵入に関与することによりウイルスの宿主域を規定している。*env* タンパク質は、ベクター遺伝子の導入効率に最も影響を及ぼすことから、その生物性状を明らかにする必要がある。本研究は A8 ウイルスの *env* タンパク質が中枢神経系細胞へのウイルス感染性を高め、外来遺伝子の導入効率の上昇に貢献することを明らかにした。

FrC6 ならびに A8 ウイルスの *env* タンパク質を検出するために、まず単クローン抗体 (MAb) を作成した。Friend MLV 持続感染細胞株 FB α ならびに FrC6 ウイルス持続感染細胞株 FrC6 を認識する 30 クローンが得られた。次に A8 ウイルスと非神経親和性の Friend MLV 野生株 57 ウイルスを用いて、抗体の生物活性を解析した。得られた 30 クローン中、2 クローン (MAb 25, 85-1) に中和活性が認められた。MAb 85-1 は、A8 ならびに 57 ウイルスに対して中和活性を示したが、A8 ウイルスに対する活性は 57 ウイルスの約 25 倍高い値であった。また MAb 25 は、A8 ウイルスのみを中和した。免疫沈降法により、4 つの IgG 抗体が *env* タンパク質を認識することが明らかとなった。これらの 2 クローン (MAb 85-1, 111-3) は、表在型糖タンパク質である gp70 を、また残り 2 クローン (MAb 73-1, 97-1) は、膜貫通型タンパク質である p15E を認識していた。gp70 を認識する MAb 111-3

はA8ウイルス特異的であり、他の3抗体は両方のウイルスを認識していた。gp70に対するMAb 85-1, 111-3は、尿素により変性したタンパク質には結合しなかった。一方、p15Eに対する抗体は、いずれも尿素処理タンパク質にも結合した。以上の結果から、中枢神経系においてよく増殖するA8ウイルスのgp70は、非神経親和性である57ウイルスのgp70と抗原性が異なることが明らかとなった。A8ウイルスと57ウイルスを区別するMAb 85-1, 111-3は、*env*タンパク質の高次構造が形成する抗原決定基を認識し、両ウイルスのp15Eを認識する抗体は高次構造非依存性であることが判明した。

A8ウイルスの*env*タンパク質(A8-*env*)の生物性状を明らかにするために、レトロウイルスベクター系を用いてA8-*env*を持つ偽ウイルスを作成した。レトロウイルスベクター系では、ウイルスにより運ばれるベクター遺伝子を、ウイルス粒子の形成を行うパッケージング細胞に導入することにより、偽ウイルスが得られる。そこで偽ウイルスCREを産生するモロニーマウス白血病ウイルス(Moloney MLV)由来のパッケージング細胞 ψ CREに、A8-*env*を発現するベクター遺伝子を導入し、偽ウイルスCRE-A8を得た。偽ウイルスを感染させてベクター遺伝子(neo^r)を導入し、薬剤(G418)耐性を獲得した細胞のコロニー数を偽ウイルスの感染価とした。偽ウイルスCRE-A8は、ラットグリア系細胞株C6ならびにF10に対して、繊維芽細胞株NIH 3T3とほぼ同程度の高い感染価を示した。一方A8-*env*を持たない偽ウイルスCREは、NIH 3T3細胞に比べ、ラットグリア系細胞株に対して明らかに低い感染価を示した。MAb 85-1は、ラットグリア系細胞株に対する偽ウイルスCRE-A8の感染性を中和したが、A8-*env*を持たない偽ウイルスCREは、中和しなかった。この結果は、A8-*env*がCRE-A8ウイルス粒子に取り込まれていることを示す。さらにMAb 85-1と補体の存在下で、著しく感染価が低下したことから、偽ウイルスCRE-A8粒子のほとんどは、A8-*env*を持つことが示された。同様に、抗Moloney MLV血清と補体によっても感染価が著しく低下したことから、CRE-A8ウイルス粒子のほとんどがA8ウイルスならびにMoloney MLV由来の*env*タンパク質を発現していることが明らかとなった。以上の結果から、A8-*env*は偽ウイルスCRE-A8粒子に取り込まれ、ラットグリア系細胞に対するCRE-A8ウイルスの感染効率を高めていることが判明した。

以上の成績は、A8ウイルスの*env*タンパク質を導入したレトロウイルスベクター系を構築することにより、効率よく中枢神経系細胞に遺伝子導入することが可能であることを示す。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 渡 邊 智 正
副 査 教 授 林 正 信 (酪農学園大学)

学 位 論 文 題 名

Basic studies for the construction of a retroviral vector system to transfer vector genes into the central nervous system

(中枢神経親和性レトロウイルスベクター系構築の基礎的研究)

レトロウイルスが細胞に感染すると、その遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれる。レトロウイルスベクター系は、この性質を利用して遺伝子導入に広く用いられている。これまでに、中枢神経系細胞に遺伝子を導入するための新しいベクター系を構築する目的で、フレンドマウス白血病ウイルスから、ラットのグリア系の細胞でよく増殖するウイルス FrC6 ならびにその遺伝子クローン A8 が分離された。ウイルスの *env* タンパク質は、細胞への吸着ならびに細胞内侵入に関与することが知られている。本研究では A8 ウイルスの *env* タンパク質 (A8-*env*) の性状を明らかにし、ウイルスの中枢神経系細胞への感染性ならびに、外来遺伝子の導入にどのような影響をおよぼすか検討を行った。

まず FrC6 ならびに A8 ウイルスの *env* タンパク質に対する単クローン抗体 (MAb) を作出し、得られた抗体を用いて、中枢神経系に親和性を示すウイルスと非親和性ウイルスの *env* タンパク質の性状を検討した。その結果中枢神経系においてよく増殖する A8 ウイルスの A8-*env* は、非神経親和性ウイルスの *env* タンパク質と抗原性が異なることが明らかとなった。抗原性の相異を区別しうる MAb は、*env* タンパク質の高次構造が形成する抗原決定基を認識していた。

次に A8-*env* の生物性状を明らかにするために、レトロウイルスベクター系を用いて A8-*env* を持つ偽ウイルスを作成した。レトロウイルスベクター系では、ウイルスにより運ばれるベクター遺伝子を、ウイルス粒子の形成がおこるパッケージング細胞に導入することにより、偽ウイルスが得られる。偽ウイルスは、ラットグリア系細胞株に対して、繊維芽細胞株 NIH3T3 とほぼ同程度の高い感染価を示したが、A8-*env* を持たない偽ウイルスは、ラットグリア系細胞株で低い感染価を示したにすぎなかった。A8-*env* は偽ウイルス粒子に取り込まれ、ラットグリア系細胞に対する感染効率を高めていることが判明した。

本研究により、中枢神経親和性の A8 ウイルスの *env* タンパク質を導入したレトロウイルスベクター

系を構築することにより、効率よく中枢神経系細胞に遺伝子を導入することが可能となった。この研究はこれまで困難であった神経系細胞への遺伝子導入に重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は、池田富夫氏が博士（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。