The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus |
| Author(s) | 大石, 真久 |
| Citation | 大阪大学, 2009, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49813 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【27】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 大　石　真　久（おお いし まさ ひさ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２２７３６　号 |
| 学位授与年月日 | 平成21年３月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>医学系研究科予防環境医学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus<br>（水疱性口内炎ウイルス（VSV）の糖タンパク質を用いたシュードタイピングにより引き起こされるレトロトランスダクションの問題点） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　塩田　達雄<br>（副査）<br>教　授　生田　和良　　教　授　松浦　善治 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

〔目　　的〕

水疱性口内炎ウイルスのエンベロープタンパク質（VSV-G）を用いたシュードタイピングは現在広く利用されている。その理由として、シュードタイプしたウイルスの細胞への吸着と融合が特異的なレセプターではなく、膜成分

そのものを介して起こるため細胞指向性が高い点と、高力価での産生が容易であるという点等が挙げられる。私は、ヒト腎臓由来の細胞株 293T 細胞にヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）のプロウイルス DNA クローンと VSV-G 発現ベクターを共にトランスフェクション（リン酸カルシウム法）により導入したとき、培養上清中の HIV-1 カプシドタンパク質（p24）の量が、プロウイルス DNA クローンを単独で導入したときに比べて約 20 倍高いことを見出した。そこでこの VSV-G による p24 産生量の増強の機序、ならびにそれが原因で引き起こされる問題点を明らかにすることを本研究の目的とした。

〔方法ならびに成績〕

まず、p24 産生量の増強がトランスフェクション後のいつ起こるのかを調べるため、p24 量の経時変化を調べた。その結果、トランスフェクション後 24 時間後以降に p24 量の著しい増強が観察された。この結果を踏まえて、p24 量の増強が起こる理由として、VSV-G をシュードタイプした HIV-1 が 293T 細胞へ再感染した結果、子孫ウイルスの産生が促され培養上清中の p24 量が増加したとの作業仮説を立てた。この仮説を検討するために、HIV-1 の pol 遺伝子の変異体、VSV-G の膜融合能欠損変異体、ならびに逆転写酵素阻害剤を使用して HIV-1 の感染サイクルを止め、子孫ウイルスの産生を阻害する実験を行った。

1. HIV-1 の pol 遺伝子の変異体は逆転写酵素の大部分が欠失し、感染細胞での逆転写反応が起こらないと推測された。
2. VSV-G の膜融合能欠損変異体は細胞表面へのタンパク質発現は正常であるが、膜融合能が欠如しているため、再感染の頻度自体が著しく減少すると推測された。
3. 逆転写酵素阻害剤には AZT を用いた。この薬剤の存在下では逆転写反応が阻害されるため、感染細胞内で逆転写反応が起こらないと推測された。

その結果、期待通り全ての実験において p24 量の増強が観察されなくなった。したがって VSV-G をシュードタイプした HIV-1 が 293T 細胞に再感染し、その感染細胞から新たに HIV-1 が産生されたために p24 量の増強が起こることが示唆された（以後、この現象をレトロトランスダクションと呼ぶ）。

レトロトランスダクションによる問題点を明らかにする目的で、この現象の前後における培養上清中のウイルス粒子当たりの VSV-G 量を検討した。VSV-G 量はそのポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法にて定量した。その結果、トランスフェクション後 48 時間後の培養上清中の単位 p24 量当たりの VSV-G 量は、24 時間後と比較して約 5 分の 1 に減少した。さらに、HIV-1 のプロモータ領域を含む LTR の制御下でルシフェラーゼを発現する M8166/H1Luc 細胞を用いて、トランスフェクション後 24 と 48 時間後のウイルスの単位 p24 量当たりの感染価を検討した。その結果、48 時間後の方が 24 時間後と比較して単位 p24 量当たりの感染価が約 3.6 分の 1 に減少した。これはレトロトランスダクションが起こると VSV-G をシュードタイプしていないウイルス粒子の割合が増加することを示唆しており、相対的に VSV-G をシュードタイプした感染性のあるウイルスの量が減少する可能性があると考えられた。

〔総　　括〕

VSV-G によるシュードタイピングには多くの利点があるが、本研究により問題点も指摘された。第 1 に VSV-G をシュードタイプした HIV-1 を得る場合、レトロトランスダクションが起こるため、ウイルスを回収するタイムポイントによって VSV-G をシュードタイプする HIV-1 の量に差異が生じる点。第 2 にウイルス産生時の条件次第でレトロトランスダクションの発生の有無が変化するため、得られたウイルスを感染させる場合や、そのウイルス量を比較する場合、結果に対して予期しない偏りが生じる可能性がある点である。これらの問題を回避するためには、レトロトランスダクションの起こらない早期にウイルスを回収する、もしくは別のエンベロープタンパク質でシュードタイピングを行う方法等が挙げられる。

## 論文審査の結果の要旨

HIV-1ゲノムを利用した遺伝子導入において、水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質(VSV-G)によるウイルスのシュードタイピングは、広く利用されている。当論文にて申請者は、VSV-Gによるシュードタイピングを行うと、産生されたシュードタイプウイルスが同じプレート内の非産生細胞に再感染するレトロトランスダクションが生じることを見出した。この現象により、ウイルスを回収する時点により、真にシュードタイプされたウイルスの割合が大きく変化する。したがって、得られたシュードタイピングウイルスを使用する場合やシュードタイピングを行ってウイルスの感染性を比較する場合、レトロトランスダクションにより結果に偏りが生じる。これを回避するためには、早期にウイルスを回収する、もしくはレトロトランスダクションの生じないVSV-G以外のタンパク質でシュードタイピングをする等の方法が挙げられる。VSV-Gによるシュードタイピングは臨床研究にも用いられ、そこでは厳密な制御が要求される。当論文はVSV-Gを用いたシュードタイピングを最適化するための必要な知見であり、学位論文に値する。