

氏名(本籍)	石井 亜紀子 (徳島県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第 1,719 号		
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Duchenne 型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の基礎的研究		
主査	筑波大学教授	医学博士	濱口 秀夫
副査	筑波大学教授	医学博士	能勢 忠男
副査	筑波大学教授	医学博士	林 英生
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪 正直
副査	筑波大学助教授	医学博士	濱野 建三

論文の内容の要旨

(目的)

Duchenne 型筋ジストロフィーは、ジストロフィン遺伝子の異常によって起こる致死的な X連鎖劣性遺伝病で、骨格筋と心筋の障害が主な異常所見である。この疾患は遺伝病の中では発生頻度も突然変異率も高く、現在有効な治療法がないことから、遺伝子治療法の開発が期待されている。本研究は、Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子治療の基礎研究として、骨格筋細胞に対する安全で効率の高い遺伝子導入法を確立することを目的とした。このために、アデノウイルスベクターとカチオン性脂質の骨格筋に対する遺伝子導入効率を、*in vitro* 及び *in vivo* の実験により比較検討した。

(方法)

導入遺伝子として大腸菌 LacZ 遺伝子を用いた。ヒトアデノウイルス 5 型 DNA の E1, E3 遺伝子を欠失させ、マウスミオシン H 鎖 IIB プロモーター、LacZ 遺伝子などを組み込んだ組み換えアデノウイルス (AxMHLacZ) を作製し、ベクターとして用いた。この他に、東京大学齊藤教授より供与された、ニワトリ β アクチンプロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサーなどを組み込んだアデノウイルスベクター (AxCALacZ)、及び SV40 ウイルスプロモーターなどを組み込んだアデノウイルスベクターを用いた。

in vitro 実験では、C3H マウス大腿部骨格筋由来細胞株 (C2 細胞と高分化型の C2/4 細胞) を培養し、組み換えアデノウイルスを感染させた。*in vivo* の実験では、5-6 週齢の C57BL/10 マウスまたは BALB/c マウスの前脛骨筋に組み換えアデノウイルスを含む溶液を注入して、ウイルスを感染させた。

使用したカチオン性脂質は、monocationic lipid (ML)、ML と中性脂質の混合物、polycationic lipid (PL)、及び PL と中性脂肪の混合物である。導入 DNA として、ミオシン H 鎖 IIB プロモーター、LacZ 遺伝子などを組み込んだプラスミド DNA (p-192 MHC-IIBlacZ) など、8 種類のプラスミド DNA を作製または入手し、実験に用いた。*in vitro* の実験では、DNA/カチオン性脂質複合体存在下で C2 細胞、C2/4 細胞を 5 時間培養して遺伝子を導入した。*in vivo* の実験では、8 週齢のウイスターラットのひらめ筋に PL/プラスミド DNA 複合体溶液を注入した。

(結果と考察)

アデノウイルスを用いた培養骨格筋細胞株への遺伝子導入では、分化後の細胞にも組み換えアデノウイルスが感染し、導入遺伝子が良好に維持された。また、導入遺伝子の発現 (β -galactosidase 活性) 量はプロモーターの転写活性の強さと関連し、アクチンプロモーターとサイトメガロウイルスエンハンサーを組み込んだ AxCA-LacZ ベクターで最も多かった。骨格筋特異的なミオシン H 鎖 IIB プロモーターは活性が低かった。

5-6 週齢のマウスへの *in vivo* 遺伝子導入でも、アクチンプロモーターとサイトメガロウイルスエンハンサーを組み込んだ組み換えアデノウイルス (AxCALacZ) で顕著な効果が観察された。特に C57 BL/10 マウスでは、筋注後 7 日で 66%、14 日で 50%、28 日で 10%、180 日で 6% と、高率の β -galactosidase 陽性筋線維が認められた。BALB/c マウスでは C57 B/10 マウスにくらべて、 β -galactosidase 活性が低く、CD8 陽性細胞などの単核球の浸潤が激しかったが、 α v インテグリンの発現には差がなかった。このことから、両純系における導入遺伝子の発現の違いはアデノウイルスと導入遺伝子に対する細胞性免疫の違いによることが示唆された。

カチオン性脂質を用いた培養骨格筋細胞株への遺伝子導入では、リン酸カルシウム法にくらべて導入効率が高く、特に PL で高かった。しかし PL は ML に比して細胞障害性が強かった。また、ラットひらめ筋への PA/DNA 複合体の筋注では遺伝子導入効率がきわめて低く、強い細胞障害性が観察された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子治療法の開発は、重要な課題として国内外で関心がもたれている。本研究で著者は、骨格筋細胞に対する安全で効率の高い遺伝子導入法の確立をめざして、*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝子導入実験を精力的に行い、アデノウイルスベクターを用いることにより、5-6 週齢の C57 BL/10 マウスの骨格筋に高度の遺伝子導入ができることを初めて示した。これまでのところ、新生仔マウスでのみ高度の導入遺伝子の発現が報告されているので、この研究成果は高く評価できる。Duchenne 型筋ジストロフィーの場合は、正常の 20-30% のジストロフィン遺伝子の発現があれば治療効果がえられると考えられることから、本研究はこの疾患の遺伝子治療法の開発に寄与するものと期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。