

氏名(本籍)	こばやし かず と 小林 和人 (東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第 3443 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 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	先天性代謝性疾患の遺伝子治療システムの開発とその実証 - 肥満・糖尿病モデル動物の <i>ob/ob</i> マウスを例に -
主査	筑波大学教授 獣医学博士 八神 健一
副査	筑波大学教授 医学博士 長澤 俊郎
副査	筑波大学助教授 博士(医学) 渡辺 重行
副査	筑波大学講師 医学博士 谷中 昭典

論文の内容の要旨

(目的)

ob/ob マウスは第 6 番染色体上の *ob* 遺伝子にナンセンス変異を起こし、レプチンを欠損するため、著明な肥満と高インスリン血症を伴い糖尿病を発症する。*ob/ob* マウスに高用量のレプチンを投与すると、肥満の改善・インスリン抵抗性の低下に伴う糖代謝異常の改善がみられる。そこで、*ob/ob* マウスを用いて遺伝子治療による代謝異常の治療モデルを開発することを目標とした。

(対象と方法)

1) *ob/ob* マウスへの正常骨髄の移植: レシピエントには 8 週齢または 13 週齢の *ob/ob* マウス (B6.V-Lep^{ob}) を、ドナーには *ob/ob* マウスまたは GFP トランスジェニックマウスを用いた。レシピエントに 850cGy の全身照射後、治療群に対しては GFP トランスジェニックマウスの全骨髄、対照群には *ob/ob* マウスの全骨髄を経静脈的に移植した。飼育には高脂食を用い体重の変化や血中レプチン値、インスリン値、血糖ならびに脂質系パラメーターを経時的に観察した。

2) 骨髄前駆細胞を用いた *ob/ob* マウスの *ex vivo* 遺伝子治療: レシピエントには 8 週齢の *ob/ob* マウスを、ドナーには C57BL/6J マウスを使用した。レシピエントに 850cGy の全身照射後、治療群に対してはレプチンと hrGFP を CMV プロモーター下で共発現するレンチウイルスベクターで遺伝子導入した骨髄前駆細胞を、対照群は hrGFP のみを発現する同様のベクターを導入した骨髄前駆細胞を、*ob/ob* マウス由来のコンペティター細胞とともに経静脈的に移植した。飼育には普通餌を用い体重の変化や血中レプチン値、インスリン値、血糖ならびに脂質系パラメーターを経時的に観察した。

(結果)

1) *ob/ob* マウスへの正常骨髄の移植: *ob/ob* マウスにレプチン遺伝子を保有する GFP トランスジェニックマウスの全骨髄を移植したが、血中にレプチンは検出されなかった。また、治療群と *ob/ob* マウスの全骨髄を用いた対照群との間に、体重ならびに糖・脂質パラメーターの有意差を認めなかった。非照射非治療群と

の比較では明らかな体重減少 ($p < 0.01$) を認めたが、血糖や脂質系のパラメーターに有意差を認めなかった。

2) 骨髄前駆細胞を用いた *ob/ob* マウスの *ex vivo* 遺伝子治療：レンチウイルスベクターでレプチンと hrGFP を強制発現させた骨髄前駆細胞を移植した治療群では血中濃度は低いものの持続したレプチンの発現が見られ、hrGFP のみを強制発現させた骨髄前駆細胞を移植した対照群と比較し、体重増加が有意に抑制された。しかし、血糖や脂質系パラメーターに有意差は見られなかった。腹部遮蔽下での照射後にレプチンを強制発現させた骨髄前駆細胞を移植したマウスの 1 例では、長期にわたるレプチン発現と体重減少、さらにインスリン抵抗性の改善が認められた。

(考察)

骨髄には造血幹細胞だけでなく様々な幹細胞が存在すると考えられるが、レプチンは本来そのほとんどが脂肪細胞から分泌される。従って移植された骨髄が血液系細胞以外に分化する必要があるが、移植後に血中レプチンは検出されず、GFP 陽性の脂肪細胞は認められなかったことから、骨髄中の幹細胞がレシピエントに生着かつ分化し、十分量のレプチンを産生するのは困難と思われた。

レプチンを強制発現するレンチウイルスベクターによる *ex vivo* の遺伝子治療では、低濃度でも持続的なレプチンの発現により体重増加が抑制されたが、インスリン抵抗性など代謝系パラメーターの改善は認められなかった。レプチンにはインスリン分泌抑制の直接作用もあるが、生理的な濃度では中枢性の摂食抑制や基礎代謝の亢進による体脂肪量の制御がインスリン抵抗性を低下させると思われる。本研究により、レンチウイルスベクターと骨髄前駆細胞を用いた *ex vivo* の遺伝子治療の系が機能することが示されたが、インスリン抵抗性を改善させるには発現量が十分でなかったと考えられる。今後、遺伝子導入後の細胞培養、移植細胞数などの至適条件を検討することで臨床への応用が期待できる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、肥満や糖尿病等の先天性代謝疾患の遺伝子治療法の開発を目的として、レプチン遺伝子を欠損する肥満・糖尿病モデル動物である *ob/ob* マウスに対し、レンチウイルスベクターを用いて骨髄前駆細胞へのレプチン遺伝子の導入による *ex vivo* 遺伝子治療を行った。その結果、血中濃度は低いものの持続したレプチンの発現が見られ、対照群と比較し体重増加が有意に抑制された。また、1 例のマウスでは、長期にわたるレプチン発現と体重減少さらにインスリン抵抗性の改善が認められた。

本研究は、マウス個体数の確保や遺伝子治療後の観察期間が長いことなど、実験上の様々な制約のために標本数が不十分であり、学術誌への公表には至っていないが、治療効果を示した点は遺伝子治療への応用として評価できる。

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。