

氏名(本籍)	なか まる けん じ 中丸健治(広島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2424号
学位授与年月日	平成12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	SIVagmをベースとした遺伝子治療用ウィルスベクターの開発およびその応用
主査	筑波大学教授 医学博士 中内啓光
副査	筑波大学教授 医学博士 赤座英之
副査	筑波大学併任教授 医学博士 松田道行 (国立国際医療センター研究所)
副査	筑波大学助教授 医学博士 川上康

論文の内容の要旨

(背景と目的)

生体組織中の細胞はほとんどが非分裂状態にあるため、既存のレトロウイルスベクターでは遺伝子導入効率が極端に低く、遺伝子治療を行う上で大きな問題となっている。そこで本研究ではSIVagmTYO-1をベースとした、非分裂状態の細胞に対して遺伝子導入が可能である遺伝子治療用レンチウイルスベクターを開発し、その性能を検討することを目的とした。

(対象と方法)

- 1) ベクターの力価および安全性の向上のためSIVagmTYO-1株をベースに、ベクター粒子形成に必要なタンパクを供給するパッケージングベクター、治療用遺伝子を搭載するジーントランスファーベクター、外殻タンパク質を供給するVSV-G供給ベクターの3種類のベクターを作製し、これらを293T細胞に導入し、治療用ベクター(SIVagmベクター)を産生した。
- 2) マーカー遺伝子としてEGFP遺伝子を導入したSIVagmベクターをヒト末梢血単核細胞、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞、カニクイザル骨髓CD34陽性細胞に感染させ、フローサイトメトリーならびにコロニーアッセイ法により遺伝子導入効率と導入遺伝子の発現の持続を解析した。

(結果)

作製したSIVagmベクターは増殖状態および細胞周期を停止させた293細胞、ヒト神経芽細胞、ラット脳初代培養中の終末分化ニューロンのそれぞれに対して高い遺伝子導入効率を示した。同様にヒト末梢血単核球、T細胞、ヒトおよびカニクイザル由来のCD34陽性細胞にも高い効率で遺伝子導入可能であることが示された。さらにヒト臍帯血由来CD34陽性細胞にEGFP遺伝子を導入し、この細胞をNOD/SCIDマウスに移植したところ、6週以上の長期間にわたりマウスの末梢血、脾臓、骨髓のそれぞれにヒト血液細胞が既存し、それらにおいて高い効率でEGFPの発現が確認された。

(考察)

既存のレトロウイルスベクターに比較して、今回作製したSIVagmベクターが非分裂細胞に対して高い遺伝子導入効率を持っていることが示された。HIV-1やFIV由来のレンチウイルスベクターも同様に非分裂細胞に対して高い遺伝子導入効率を持っているが、ベースとして使用したウイルスの病原性が高く、安全性が懸念されている。SIVagmベクターのベースとなったSIVagmベクター-TYO-1は病原性がないことが確認されており、既存のレンチウイルスベクターより安全性が高いと考えられる。また、造血幹細胞は遺伝子治療の標的細胞として理想的であるとされているにもかかわらず、大部分が非分裂状態にあるためレトロウイルスを使用した遺伝子治療が困難であった。今回の研究でSIVagmベクターが臍帯血由来のCD34陽性細胞に高い効率で遺伝子導入できたことは造血幹細胞を標的とした遺伝子治療への応用の可能性を示唆するものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

造血幹細胞をはじめとする種々の幹細胞は多能性と自己複製能を持つことから遺伝子治療の標的細胞として注目されている。ところが一般的に幹細胞は非分裂状態にあるため、現在最も良く利用されているレトロウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であった。本論文において筆者は、サル由来のレンチウイルスをベースに用いたベクターを作製することにより、非分裂細胞への高い導入効率と安全性の両方を満足する遺伝子治療用ベクターの開発を試みた。各種安全性の検討などが残されてはいるものの、今回作製したベクターは高い基本性能を示しており、我が国で作製された遺伝子治療用ベクターとして今後実際に応用される可能性が十分に期待できるすぐれた研究である。以上より、本研究は博士論文として十分であると評価した。

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。