【254】

氏　名（本籍）	小倉（おぐら）　剛（つよし）（愛媛県）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博　甲　第　4086　号
学位授与年月日	平成18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	人間総合科学研究科
学位論文題目	AAV（アデノ随伴ウイルス）ベクターを用いた胎児、新生児遺伝子治療の基礎的検討

主　査	筑波大学教授	博士（医学）	田　中　　誠
副　査	筑波大学助教授	医学博士	鴨　田　知　博
副　査	筑波大学助教授	博士（医学）	堀　　哲　夫
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	小野寺　雅　史

論文の内容の要旨

目的：

臨床遺伝子治療研究においては，遺伝子導入・発現効率の悪さから，いまだ期待される治療効果は得られていない。胎児・新生児遺伝子治療は少量のベクターで効果が期待できることなどの利点がある一方，その研究は端緒についたばかりで，成人遺伝子治療に比べ優位性は明らかではない。本研究の目的は，長期における遺伝子発現が期待できるAAVベクターを，ヒト胎児と同じ免疫学的成熟度にある新生仔マウスに用い，ベクター投与時期（新生仔と成体）の違いによる導入遺伝子の発現効率を比較することで，胎児・新生児遺伝子治療における優位性を明らかにすること，及び新生仔遺伝子治療導入における効果的な投与経路及び血清型の検討を行い，胎児・新生児遺伝子治療におけるベクターの至適投与法を明らかにすることである。

対象と方法：

ベクター投与時期の違いによる導入遺伝子の発現効率を比較するため，ヒト凝固第IX因子遺伝子（hFIX），β-galactosidase遺伝子（LacZ），及びホタルルシフェラーゼ遺伝子（Luc）を組み込んだAAV5型ベクター（AAV5-CMV-hFIX，AAV5-CMV-LacZ，AAV5-CMV-Luc）を作製し，C57BL/6マウス新生仔，成体にそれぞれ同量を腹注投与し，血中hFIX濃度測定による導入遺伝子発現効率の比較，X-gal染色によるβ-galactosidaseの発現部位の同定，BioluminescenceアッセイによるLuc発現部位の検討と発現強度の比較を行った。ベクター遺伝子（hFIX）の臓器別分布については定量的リアルタイムPCRにて検討した。また，新生仔遺伝子導入における効果的な投与経路及び血清型の検討をおこなうため，新生仔マウスを静注，腹注，筋注の3群に分け，それぞれに最適と考えられる血清型のAAV-CMV-hFIX（静注群，腹注群はAAV5，筋注群はAAV1）を投与し，導入遺伝子発現効率を血中hFIX濃度の比較により行った。ベクター遺伝子の臓器別分布についてはPCRを用いて検討し，導入遺伝子発現部位の解析はAAV-CMV-LacZ投与後のX-gal染色にて行った。腹注関してはAAV5に加え，AAV1～4型で導入遺伝子について比較した。

結果：

血中 hFIX 濃度は，新生仔の方が成体より有意に高かった。また成体投与において血中 hFIX 濃度は雌で低く，性別による違いは有意であったが，新生仔投与群では性差は認められなかった。LacZ や Luc の発現は主に腹膜で認められ，その強度に関しては新生仔のほうが成体より有意に高く，また成体のみ腹膜での発現強度に有意な性差を認めた。ベクター遺伝子はその多くが腹膜に存在していた。AAV-CMV-hFIX の投与経路別にみた血中 hFIX 濃度は，AAV1 型ベクター筋注投与で最も高く，次いで腹注（AAV5 型），静注（AAV5 型）の順であった。導入遺伝子発現の高かった筋注群での各臓器別 PCR では，投与部位筋肉のみベクター遺伝子が陽性であり，性腺等その他臓器への導入は認められなかった。また AAV-LacZ を筋注した後の各組織 X-gal 染色でも筋組織のみ発現が確認された。1 ～ 5 型の AAV-CMV-hFIX をそれぞれ新生仔マウスに腹注した結果，血中 hFIX 濃度は AAV1 で最も高く，次いで AAV5，AAV2 の順であった。AAV-CMV-hFIX の筋注と腹注を比較したところ，血中 hFIX 濃度は同程度であった。

考察：

新生仔期にベクターを投与すれば，成体に成熟してもその効果は持続する。成体腹注投与群では腹膜での導入遺伝子発現に雄優位の性差を認めたが，肝臓以外の組織で性差の報告をしたのは初めてである。従って，胎児・新生児を対象にすれば導入遺伝子発現効率における性差の問題を解決できるかもしれない。新生仔遺伝子導入での検討では，AAV1 型ベクターの筋注が効果的で安全性が高く，有用な投与法であることが示唆された。新生仔腹注投与においても AAV1 型が 2 型や 5 型より有効であり，同じ 1 型ベクターの筋注投与と導入遺伝子発現効率が同等であることから，腹注は多量のベクターの投与が必要な場合のよい経路と考えられた。

結論：

AAV ベクターは，成体に比べ新生仔に投与した方が遺伝子発現効率が高い。至適投与法として，AAV1 型の筋注もしくは腹注が好ましく，特に多量投与を考慮する場合は腹注投与が適していることが明らかとなった。以上の結果から新生仔遺伝子導入の優位性が確認され，臨床遺伝子治療での胎児・新生児遺伝子導入の有用性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

遺伝子治療の現状は，導入遺伝子の発現効率の悪さから，いまだ期待される治療結果が得られていない。筆者らは特に免疫学的に寛容な新生児期における治療に着目し，マウス新生仔を用いて AAV ベクターの投与時期の違いによる遺伝子導入の発現効率，及び最も効果的な投与経路や血清型の検討を行った結果，新生児期における遺伝子治療の優位性や性差の欠如，至適投与法，血清型などを明らかにした。本研究は今後のトランスレーショナルスタディーを十分に視野に納め，広く単一遺伝子疾患に対する胎児・新生児遺伝子治療を飛躍的に進歩させる可能性を有する貴重な基礎研究であると考えられる。

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。