

氏名(本籍)	種 <sup>たね</sup> 市 <sup>いち</sup> 大 <sup>だい</sup> 喜 <sup>き</sup> (青森県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6591号			
学位授与年月日	平成25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	人間総合科学研究科			
学位論文題目	新規ペプチドベクター「NTP」を用いた細胞形質転換法の開発			
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	公衆衛生学博士	我妻 ゆき子	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	三好 浩 稔	
副査	筑波大学助教	博士(医学)	西村 健	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

遺伝子治療は高度先進医療技術として期待は大きいですが、ウイルスベクターの使用は体細胞変異や癌化などの重篤な副作用が生じる可能性があるため、安全なシステム開発が求められている。本研究では、HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr の核移行能に着目し、核移行に必要な最小機能ドメインとして同定されたアミノ酸配列 (C45D18) を基に新たに開発されたペプチドベクター (NTP: Nuclear Trafficking Peptide) を用いて、より安全な形質転換法の開発を目的とした。特に、NTP システムの機能性、有用性及び安全性について評価した。

### (対象と方法)

NTP について、培養細胞内への取り込み能、細胞毒性、細胞内に取り込まれた融合タンパク質の動態を既存のペプチドベクターを用いた場合と比較した。また、NTP システムの iPS 細胞樹立への有用性を検証するために、iPS 樹立に必須とされる4種の転写因子に NTP を付与して iPS 細胞の作製を検討した。さらに、NTP の遺伝子治療への応用のために、NTP 付き制限酵素を用いて部位特異的な外来遺伝子挿入法の開発およびそのメカニズムを検討した。また、NTP の作用機序を検討するため、NTP と Vpr の核移行能に共通する細胞因子を TOF-MS 分析や免疫沈降法により同定した。

### (結果)

NTP は、培養細胞内への取り込み効率が既存のペプチドベクターよりも優れ、取り込まれた融合タンパク質が効率よく核内に移行することが明らかとなった。また、既存のペプチドベクターである Tat 由来ペプチドは細胞毒性を示したが、NTP には細胞毒性が認められなかった。NTP を融合させた4転写因子により、3週間で iPS 細胞を樹立することができ、樹立した iPS 細胞が germline transmission を示した。さらに、NTP 付き制限酵素により DNA 二重鎖切断 (DSB: DNA double strand break) 部位を誘導し、レンチウイルスベクターを感染させることで DSB 部位選択的に目的の遺伝子を挿入できることを明らかにした。また、Vpr に結合する細胞因子として SNF2h を同定し、SNF2h のノックダウンにより Vpr 及び NTP のクロマチンリクルートメントが減少し、DSB 誘導能も低下した。

## (考察)

NTP を付加したタンパク質により iPS 細胞の樹立や部位特異的な DSB の誘導が明らかにされたことから、NTP システムが細胞内で十分に機能していることが証明された。また、iPS 細胞の作製において、一般的なレトロウイルスベクターを用いる樹立法に比較して短期間で樹立でき、germline transmission も確認できたことから、NTP システムの iPS 細胞樹立への有用性が確認された。また、DSB 特異的なウイルス DNA の挿入は、人工制限酵素 ZFN (Zinc finger nuclease) を用いた場合にも認められ、多方面の研究で応用が期待される。NTP の核移行の機序について、Vpr に結合する細胞因子として SNF2h を同定し、Vpr や NTP のクロマチンリクルートメントに SNF2h が関与することを明らかにした。これは、NTP の核移行等の作用機序を理解するための重要な手がかりとなる。

## 審査の結果の要旨

本研究は、HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr の核移行に必要な最小機能ドメインとして同定されたアミノ酸配列 (C45D18) を基に、新たに開発されたペプチドベクター NTP の評価と作用機序の解明を目的としたものである。既存のペプチドベクターと比較して遺伝子導入の効率が高く、細胞毒性も低いこと、ゲノムの特定領域への DSB 誘導及び DSB 部位への外来遺伝子の挿入が可能であることを明らかにした。遺伝子治療や再生医療研究における細胞の形質転換に有用であり、将来的な臨床応用も期待できる優れた研究である。

平成 25 年 1 月 17 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。