

京都大学	博士（医科学）	氏 名	渡 邊 哲 史
論文題目	Tropisms of AAV for Subretinal Delivery to the Neonatal Mouse Retina and Its Application for <i>In Vivo</i> Rescue of Developmental Photoreceptor Disorders (アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの新生児マウス網膜に対する標的細胞特異性の比較と視細胞発生異常のレスキューへの応用)		
(論文内容の要旨)			
生体内における遺伝子機能の解析を行う簡便な手法として、生体エレクトロポレーション法やウイルスベクターによる生体遺伝子導入技術がある。網膜への生体遺伝子導入法として生体エレクトロポレーション法がよく用いられてきたが、遺伝子導入できる網膜細胞種が限られていた。この問題を解決するために、アデノ随伴ウイルス（AAV）に着目した。AAVは神経細胞を含む様々な細胞種への高い遺伝子導入効率、低い細胞毒性や免疫原性、及び長期間の発現持続性を示すことから、細胞の標識、過剰発現やノックダウンによる遺伝子の機能解析や遺伝子治療において有用なウイルスベクターである。AAVは表面構造の違いから血清型により分類されており、血清型によって標的細胞への感染効率が異なることが知られている。AAVによる網膜への遺伝子導入において、これまで成体網膜における AAV の標的細胞特異性についてはよく調べられてきたが、発生期網膜へ導入した場合の標的細胞特異性や感染効率について詳細な報告はなかった。本研究において、異なる血清型の AAV の発生期網膜への導入における標的細胞特異性及びその有用性を調べた。 まず、中枢神経系に感染することが知られていた 7 種類の血清型（AAV1, 2, 5, 8, 9, 10, 11）について、ユビキタスプロモーターである CAG プロモーター制御下において mCherry を発現する AAV-CAG-mCherry を作製し、新生児網膜に導入し、2 週間後、各血清型の AAV の感染効率を網膜細胞種別に定量的に調べた。どの血清型の AAV も複数種類の網膜細胞を標的細胞とし、AAV5 は視細胞に、AAV10 は水平細胞及び神経節細胞に、AAV9 は双極細胞とミュラーグリア細胞を除く全ての細胞種に高効率に遺伝子導入できることが示された。次に、AAV による発生期網膜への遺伝子導入の有用性を確認するため、視細胞の発生異常及びそれに伴う視細胞変性の表現型を示す <i>Crx</i> (<i>Cone-rod homeobox</i>) 欠損マウス網膜のレスキュー実験を行った。視細胞へ選択的で高い遺伝子導入効率を示した AAV5 の血清型を用いて、視細胞特異的な発現を駆動する <i>Crx 2kb</i> プロモーター制御下において Flag-<i>Crx</i> を発現する AAV5-<i>Crx2kb</i>-Flag-<i>Crx</i> (AAV5-<i>Crx</i>) を作製した。この AAV を新生児 <i>Crx</i> 欠損マウス網膜に導入し、同様にリン酸緩衝生理食塩水を導入したものをコントロールとした。<i>Crx</i> 欠損マウスにおいて視細胞遺伝子の顕著な発現減少及びそれに伴う外節の形成不全や視細胞の細胞死が観察されていたが、AAV5-<i>Crx</i> の導入によりこれらの表現型の有意な回復が見られた。さらに、導入後 6 週間及び 15 週間の AAV5-<i>Crx</i> 投与マウスとコントロールマウスにおいて網膜電図（ERG）を測定した。コントロールマウスにおいては視細胞の発生異常により ERG の波形が見られなかったが、AAV5-<i>Crx</i> 投与マウスにおいては ERG の波形が検出され網膜生理機能の回復が見られた。 本研究において、発生期網膜への導入における、中枢神経系に感染することが知られていた 7 種類の AAV の標的細胞特異性を明らかにし、この方法により、生体エレクトロポレーション法などの従来の遺伝子導入法を用いては導入が困難であった網膜細胞種へ高効率に遺伝子導入できることが明らかとなった。また、<i>Crx</i> 欠損マウス網膜のレスキュー実験からこの方法の有効性が示された。さらに、<i>Crx</i> を原因遺伝子とする、網膜発生期から生じうる比較的重篤なヒト網膜変性症の AAV による遺伝子治療の可能性が示唆された。			

（論文審査の結果の要旨）
生体遺伝子導入法は遺伝子機能の解析を行う上で、重要な研究手法である。網膜においては生体エレクトロポレーション法がよく利用されてきたが、遺伝子導入可能な網膜細胞種が限られていた。この問題を解決するため、本研究は AAV による遺伝子導入法に着目した。これまで新生児マウス網膜へ AAV を導入した場合の標的細胞特異性を定量的に調べた報告はなかった。まず、7 種類の血清型の AAV について発生期網膜への導入における標的細胞特異性を調べた。各網膜細胞種への遺伝子導入に適した血清型を同定した。次に、視細胞発生異常及び変性を示す <i>Crx</i> 欠損マウス網膜の AAV によるレスキュー実験を行った。視細胞特異的に Flag-Crx を発現する AAV5 を導入し、網膜発生期から <i>Crx</i> 欠損マウスにおいて <i>Crx</i> の発現を回復させた。これにより、 <i>Crx</i> 欠損マウスの網膜における表現型が回復した。以上の結果より、従来法では導入困難な網膜細胞種への遺伝子導入が AAV により可能になることを示し、また、AAV による遺伝子導入の視細胞発生の解析における有用性を示し、さらに、視細胞発生異常を伴う遺伝性網膜変性疾患の遺伝子治療の可能性を示唆した。
以上の研究は、新生児マウス網膜への AAV の導入により、AAV の標的細胞特異性及び遺伝子機能解析における有用性を明らかにし、生体遺伝子導入による網膜における遺伝子機能や細胞機能の解析に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 2 7 年 3 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降