

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	蝶野 英人
論文題目	Development of retroviral vector technology and application to HIV-1 gene therapy （レトロウイルスベクター導入法の開発と HIV 感染症遺伝子治療法への応用）		
（論文内容の要旨）			
フィブロネクチンは脊椎動物の細胞が分泌する高分子の糖タンパク質であり、細胞表面、間質、血液中などに存在し、細胞の接着、伸展、分化、増殖などを促す。フィブロネクチンの細胞接着ドメインとヘパリン結合ドメインから構成される組換えフィブロネクチン CH-296（商品名 RetroNectin）は、レトロウイルスベクターを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入に有効な物質である。レトロウイルスベクターは、生命工学・医学分野の基礎研究における動物細胞用発現ベクターとして、また、根治が困難な病気に対する遺伝子治療用のベクターとして汎用性の高いベクターである。本研究では、CH-296 によるレトロウイルスベクターでの高効率遺伝子導入法の開発を行い、また、遺伝子治療のための遺伝子導入細胞調製法の確立を行った。さらに大腸菌由来の RNA 分解酵素 MazF を用いて HIV-1 感染症に対する遺伝子治療法の開発研究を行った。			
1. 組換えフィブロネクチン CH-296 によるレトロウイルスベクターでの遺伝子導入技術の開発			
遺伝子治療法は、従来の方法では根治が困難な疾患を治療できる可能性を秘めた画期的な治療法として期待が寄せられている。中でも、患者より血球系の細胞を体外に取り出して培養し、レトロウイルスベクター用いて遺伝子導入して加工した細胞を患者に投与する遺伝子治療法は、目的細胞の染色体に治療遺伝子を確実に組み込むことができ、治療遺伝子の恒常的な発現が期待される治療法である。レトロウイルスベクターでの動物細胞への遺伝子導入効率を飛躍的に向上させる物質として、組換えフィブロネクチン CH-296（RetroNectin）が利用されている。しかし、レトロウイルスベクターには産生細胞が分泌する種々のタンパク質などが混入しており、これらの物質が遺伝子導入に阻害的に働く場合がある。本研究では、この問題を解決するために、CH-296 のウイルス結合能を利用してレトロウイルスベクターを CH-296 上に固相化した後、阻害物資を除去し、効率良く遺伝子導入を実施できる方法（RetroNectin bound virus 法；RBV 法）を開発した。 RBV 法を用いることにより、遺伝子導入が困難とされていた造血幹細胞に 90%以上の高効率で遺伝子導入できることを見出した。さらに、低速遠心と RBV 法を組み合わせることで、レトロウイルスベクターの CH-296 上への結合が亢進することを見出した。また、CH-296 上に結合したベクターの安定性は、上清をアルブミン含有リン酸バッファーに置換することで飛躍的に向上することを見出した。			
2. 組換えフィブロネクチン CH-296 刺激法によるレトロウイルスベクターあるいはレンチウイルスベクターでの末梢血リンパ球への遺伝子導入法の最適化			
CH-296 が有するもう 1 つの機能として、細胞接着シグナルを介してリンパ球を刺激し、抗 CD3 抗体と相まって T 細胞を刺激培養することで、未分化な（ナイーブな）表現型を保持した細胞を大量に増やすことができる。そこで、ヒト T 細胞を CH-296 と抗 CD3 抗体で刺激培養し、緑色蛍光タンパクを搭載したレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターで遺伝子導入を行い、遺伝子導入細胞を調製した。その結果、抗 CD3 抗体単独や抗 CD3 抗体／抗 CD28 抗体共刺激と比較してより多くのナイーブ様遺伝子導入 T 細胞が調製できることを見出した。また、CH-296 と抗 CD3 抗体での共刺激培養法では、ガス透過性培養バッグを用いた閉鎖系遺伝子導入細胞を調製することにより、容易にスケールアップできることを見出した。			

3. 大腸菌由来 RNA 分解酵素を用いた HIV-1 感染症に対する遺伝子治療法の開発

次に遺伝子治療に用いる遺伝子治療剤の開発研究を行った。HIV-1 感染症に着目し、HIV-1 の複製メカニズムを利用し、HIV-1 の複製が引き金となって大腸菌の RNA 分解酵素 MazF が発現し HIV-1 のゲノムを破壊する戦略を考案し、HIV-1 の LTR プロモーターの下流に *mazF* 遺伝子を接続したレトロウイルスベクターを開発した。遺伝子導入細胞の調製には、上記で開発してきた RBV 法を使用した。遺伝子導入細胞が HIV-1 に感染すると、HIV-1 複製の初期に発現する Tat タンパク質が引き金となって MazF が発現する。MazF の発現は HIV-1 LTR プロモーターにより制御されるため、その発現は Tat 依存的であり、細胞に対して MazF が毒性を示すことなく、HIV-1 の複製を効果的に抑制することに成功した。

次に、MazF 導入細胞の安全性を確認するため、霊長類モデルでの実験を行った。カニクイザル末梢血 CD4 陽性 T 細胞より RBV 法で閉鎖系遺伝子導入細胞の調製を行い、10⁹ 個以上の細胞を調製して自家移植を行い、半年間にわたりサル個体における遺伝子導入細胞の追跡と安全性の評価を実施した。MazF 導入細胞は半年間にわたって末梢血中に検出可能なレベルで存在し、脾臓や各リンパ節においても生着が確認された。サル血清中において MazF に対する抗体は検出されず、また、MazF 導入細胞投与に伴う重篤な有害事象は認められず、安全性が確認された。さらに、遺伝子導入細胞移植後半年以上経過したサルから MazF 導入細胞を分離し、試験管内にてサル／ヒト免疫不全キメラウイルス (SHIV) 感染実験を行い、SHIV に対する抵抗性を保持していることが示された。このように MazF が制限的に発現するシステムを用いることで、抗原性が低く、安全性の高い遺伝子治療法が提供できると考えられる。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字×3 6 行で作成し、合わせて、3, 0 0 0 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、4 0 0 ～ 1, 1 0 0 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ～ 2, 0 0 0 字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターで遺伝子導入して加工した細胞を患者に投与する遺伝子治療法は、従来の方法では根治が困難な疾患を治療できる可能性を秘めた画期的な治療法として期待される。本論文では、CH-296 を用いたウイルスベクターでの遺伝子導入技術を開発し、実用化に向けて末梢血 T 細胞への遺伝子導入法と拡大培養法を確立し、さらに、大腸菌由来の RNA 分解酵素 MazF の HIV-1 感染症遺伝子治療法への応用のための有効性と安全性を示した。その主な成果は以下の 3 点に大別できる。

(1) RBV 法はレトロウイルスベクターでの遺伝子導入効率を向上させ、さらに低速遠心法と組み合わせることでその効率は飛躍的に上昇することを見出した。また、CH-296 上に結合したウイルスベクターは 4℃での保存安定性が飛躍的に向上し、Ready to use なベクター結合容器を提供することを可能にした。

(2) ヒト T 細胞を CH-296 と抗 CD3 抗体で刺激培養し、緑色蛍光タンパクを搭載したレトロウイルスベクターあるいはレンチウイルスベクターで遺伝子導入を行い、抗 CD3 抗体単独や抗 CD3 抗体／抗 CD28 抗体共刺激と比較してより多くのナイーブ様遺伝子導入 T 細胞が調製できることを見出し、また、ガス透過性培養バッグを用いた閉鎖系遺伝子導入細胞調製方法を確立した。

(3) 大腸菌の RNA 分解酵素 MazF が HIV-1 複製時にのみ制限的に発現するベクターを開発し、ヒト CD4 陽性 T 細胞に導入し、抗 HIV-1 効果を確認した。また、霊長類モデルを用いて、MazF 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞の自家移植実験を行い、MazF が制限的に発現するシステムを用いることで、抗原性が低く、安全性の高い遺伝子治療法が提供できることを示した。

以上のように、本論文はレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入技術の研究を行い、ウイルスベクターの有効的な利用方法や安定化の方法を開発し、その技術を用いてヒト末梢血 T 細胞の遺伝子導入と培養法を確立し、さらに微生物由来の RNA 分解酵素が HIV-1 感染症遺伝子治療法に有効であることを明らかにしたものであり、遺伝子工学、微生物学、応用生物科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 24 年 2 月 15 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Web での即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降