

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	山本 祐介
論文題目	導入遺伝子の発現制御を可能にする新規ボルナ病ウイルスベクター REVec-L2b9 の開発		
(論文内容の要旨)			
<p>ウイルスベクターは効率的な遺伝子導入システムであるが、多くのウイルスベクターは実用化する上で問題を抱えている。例えば、持続しない一過性の遺伝子発現や宿主へのウイルス由来配列の挿入による変異原性、そして細胞傷害性などが挙げられる。また、ウイルスベクターの遺伝子発現をより効率的にし、かつ安全性を高めるには、外来遺伝子の発現制御機構を組み込む必要がある。</p> <p>ボルナ病ウイルス (Borna disease virus : BoDV) は一本鎖のマイナス RNA をゲノムに持つ RNA ウイルスであり、細胞傷害性が極めて低い。また、宿主の細胞核内で長期間持続感染する、そして宿主域が非常に広いといったウイルスベクターに適した性質を持っている。この BoDV の性状を利用した新規ウイルスベクターとして RNA virus-based episomal vector (REVec) が開発されている。REVec は導入遺伝子の発現を長期間持続できる優れたウイルスベクターで、より安全性を高める研究が進んでいる。しかしながら、REVec を実用化する上において遺伝子発現制御機構を持たないことが大きな障害となっている。</p> <p>そこで申請者は、RNA ウイルスベクターである REVec に適した遺伝子発現制御機構として、テオフィリン依存的な自己開裂型リボスイッチ、L2bulge9 (L2b9) の検討を試みた。申請者は、REVec に L2b9 による遺伝子発現制御機構を組み込んだ新しい RNA ウイルスベクター、REVec-L2b9 の開発に成功し、培養細胞でのその有効性の検討を行った。まず、レポーター遺伝子である GLuc (Gaussia Luciferase) の 3' 末端非翻訳領域に L2b9 を導入した REVec-GLuc-L2b9 を作製したところ、発現するルシフェラーゼ活性がテオフィリン非存在下では抑制され、テオフィリン存在下で亢進した。また、L2b9 による発現制御は GLuc mRNA にのみ起こり、mRNA と同じプラス鎖 RNA である REVec のアンチゲノム RNA の発現量には影響を及ぼさないことを示した。さらに、テオフィリンによる REVec-GLuc-L2b9 の発現制御は不可逆性のものではなく、テオフィリンを除去することで再び発現抑制が戻る可逆性の制御であることも明らかにした。</p> <p>次に申請者は、REVec-L2b9 に small GTPase の一種である Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac1) の恒常活性型変異体、RacQ61L を導入し、細胞膜に形成されるひだ状構造 (ruffling) の発現制御を試みた。REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞にテオフィリン処理を行うと、ruffling を形成する細胞数が増加することが判明した。また、REVec-RacQ61L-L2b9x2 においても、L2b9 による発現制御は RacQ61L mRNA にのみ起こることを示した。さらに、テオフィリン処理を行った REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞からテオフィリンを除去すると、約 1 日で ruffling を形成した細胞数がコントロールと同等のレベルまで減少することを明らかにした。</p> <p>以上の結果から、申請者は導入遺伝子の発現制御が可能な新しい RNA ウイルスベクターシステム、REVec-L2b9 を樹立し、今後の遺伝子治療や <i>ex vivo</i> での細胞治療などへの応用性を示した。</p>			

( 論文審査の結果の要旨 )

本論文は、ボルナ病ウイルス (BoDV) を基盤とした新規 RNA ウイルスベクター、REVec の技術改良を行うことで、低分子化合物を用いた外来遺伝子の発現調整可能な次世代 REVec の開発に成功したことを示したものである。

現在、遺伝子治療や細胞治療に用いられるウイルスベクターは、レンチウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクターにほぼ絞られてきている。しかし、両ベクターともに、遺伝子導入における安全性や安定性の面でいまだ短所が存在している。REVec は BoDV のユニークなウイルス学的性状を利用した新しいウイルスベクターである。REVec は、染色体上でエピソーマル RNA として存在するため、分裂細胞でも安定して発現を維持できる。また、iPS 細胞などの幹細胞への導入効率も高いことが示されている。しかながら、REVec は RNA ウイルスを基盤としているため、遺伝子の発現量を調節するのが難しいという側面があった。そこで申請者は、ベクターに挿入した外来遺伝子の発現を任意に調節できる技術の開発に取り組み、低分子有機化合物であるテオフィリンに依存的な自己開裂型リボスイッチ、L2bulge9 (L2b9) を使用することでその課題の解決を試みた。申請者は、レポーター遺伝子である GLuc を発現する REVec を用いて、GLuc の非翻訳領域に L2b9 配列を組み込んだ REVec-GLuc-L2b9 を作製した。その結果、これらウイルスベクターから発現するルシフェラーゼ活性がテオフィリン非存在下では抑制され、テオフィリン存在下で亢進することを示した。また、この制御がベクターの複製には影響を及ぼさないこと、GLuc の発現調整が不可逆性のものではなく、可逆的に制御できることも証明している。さらに、ベクターに Rac1 の恒常活性型を導入することで、テオフィリン処理により、細胞形態を可逆的に操作できることを示し、その応用性も示すことに成功している。申請者が樹立した REVec-L2b9 は、導入遺伝子の発現制御可能な RNA ウイルスベクターとして、今後、遺伝子治療や *ex vivo* での細胞治療などへの応用が期待できると考えられたことから、本論文は RNA ウイルスベクターの新しい応用を示した極めて意義のあるものと考えられた。

本論文は申請者のウイルス学や遺伝子治療に関する高度で幅広い学識と優れた研究能力を示し、論理的かつ一貫性を持って記述されている。また生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念を提示している。よって、本論文は博士 (生命科学) の学位論文としての価値あるものと認めた。さらに令和2年1月28日に公聴会を実施し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 平成 年 月 日