

氏 名	李 東 嵐
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2767 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Adeno-Associated Virus Type 2 Rep40 Modulates the Proliferation Rate of Rep52-Expressing HeLa Cells (アデノ随伴ウイルス 2 型 Rep40 蛋白は、Rep52 蛋白強制発現 HeLa 細胞の増殖を制御する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 章 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 前 川 平

論 文 内 容 の 要 旨

アデノ随伴ウイルス 2 (AAV-2) は 4680 ヌクレオチドの一本鎖 DNA を持つヒトパルボウイルスである。ウイルス遺伝子は *rep*・*cap* の二つの翻訳領域を含み、その両端に 145 ヌクレオチドからなる ITR (Inverted Terminal Repeat) 領域を含む。*rep* 遺伝子の二箇所のプロモーターから 4 種類の非構造蛋白 (Rep68/78, Rep40/52) が翻訳され、*cap* 遺伝子からは 3 種類の構造蛋白 (VP-1・VP-2・VP-3) が翻訳される。Rep68/78 蛋白はウイルス遺伝子の複製・遺伝子導入・遺伝子発現調節に関与する酵素活性を有し、Rep40/52 蛋白はウイルス粒子の生成に関与している。

AAV-2 は病原性の報告が現時点ではなく、幅広い種類の細胞に感染可能で、非分裂細胞へも感染する能力をもつなど遺伝子治療用ベクターとしての特長を有する。しかし、治療用ウイルスの産生効率が低いことや、Rep 蛋白が細胞増殖を抑制するなど解決すべき問題がある。そこで HeLa 細胞を用いて Rep 蛋白の発現量と細胞増殖抑制効果の関係について検討した。

AAV-2 の *rep* 遺伝子を CMV プロモーター下流に組み込み、Rep 発現プラスミド (野性型) と、*rep* 遺伝子の ATP 結合部位に点変異のあるプラスミド (変異型) を作成した。点変異によって Rep68/78 は機能を失う。燐酸カルシウム法によってプラスミドを HeLa 細胞に導入し、野性型および変異型 Rep 蛋白を発現する HeLa 細胞クローンを得た。

Rep モノクローナル抗体を使った Western blot 法で各クローンの Rep 蛋白を分析した。Rep40 蛋白、Rep40/52 蛋白、変異型 Rep68/78 および Rep40/52 蛋白を発現している 3 つの HeLa 細胞クローンが得られた。野性型 Rep68/78 蛋白を発現しているクローンはなかった。

それぞれのクローンの細胞増殖速度を生細胞数計測、MTT アッセイによって調べた。Rep40/52 蛋白発現クローン、変異型 Rep68/78 および Rep40/52 蛋白発現クローンはコントロール HeLa 細胞に比べ増殖速度が遅く、Rep40/52 蛋白の発現が HeLa 細胞の細胞増殖を抑制することが示された。

Rep40/52 蛋白を発現するクローンの中にさらに増殖速度の遅いクローン (w-15, w-13) があり、細胞分裂時間は 33.54 時間であった。また、Rep40 蛋白を高発現しているクローンは細胞増殖速度が速く、細胞分裂時間はコントロール HeLa 細胞と差がなく 23.35 時間であった。これら Rep40/52 蛋白を発現する HeLa 細胞クローンの増殖速度の違いが、それぞれの Rep40/52 蛋白の発現量と関連があるかを検討するために Western blot 法で発現量を分析した。Rep40 蛋白および Rep52 蛋白の発現量と増殖速度には相関がなかった。Rep40 蛋白と Rep52 蛋白の発現量の比 (Rep40/Rep52) は、増殖速度が速いクローンほど Rep40/Rep52 比が高くなった。

HeLa 細胞において Rep52 蛋白は細胞増殖を抑制する効果があると考えられた。その抑制効果は Rep52 蛋白の発現量に対する Rep40 蛋白の発現量によって影響されていると推察される。これまで Rep52 蛋白が HL60 細胞に対して細胞増殖を抑制する報告はあるが、Rep40 蛋白の細胞増殖に対する影響は報告がない。HeLa 細胞において、Rep40 蛋白は Rep52 蛋白による細胞増殖抑制効果を調節すると考えられた。PI 染色によるフローサイトメトリーによって Rep40/52 蛋白発現クローンの細胞周期は G2/M 期で停止していた。

論文審査の結果の要旨

アデノ随伴ウイルス2 (AAV-2) は遺伝子治療用ベクターとしての特長を有する。しかし、治療用ウイルスベクターとしては、産生効率が低く、翻訳される Rep 蛋白が細胞増殖を抑制するなど解決すべき問題がある。そこで HeLa 細胞を用いて Rep 蛋白の発現量と細胞増殖抑制効果の関係について検討した。

AAV-2 の *rep* 遺伝子を CMV プロモーター下流に組み込み、Rep 発現プラスミド (野性型) と、*rep* 遺伝子の ATP 結合部位に点変異のあるプラスミド (変異型) を HeLa 細胞に導入した。得られた Rep40 蛋白、Rep40/52 蛋白、変異型 Rep68/78 および Rep40/52 蛋白を発現している複数の HeLa 細胞クローンについて検討した。Rep40/52 蛋白のみを発現するクローンでもコントロール HeLa 細胞に比べ増殖速度が遅く、Rep40/52 蛋白の発現が HeLa 細胞の細胞増殖を抑制することが示された。Rep40 蛋白に対して Rep52 蛋白の発現量の多いクローンは増殖速度が遅い傾向がみられた。したがって、HeLa 細胞において Rep52 蛋白は細胞増殖を抑制する効果があり、その抑制効果は Rep52 蛋白に対する Rep40 蛋白の発現量によって影響されていると推察された。

以上の研究は、AAV における Rep 蛋白の作用を解明したものであり、遺伝子治療にもちいる AAV ベクターの産生効率を高めるために寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) 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16年2月26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。