

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	篠 田 康 彦
論文題目	Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector (薬剤誘導性レンチウイルスベクターの開発とそれによる細胞障害性遺伝子、ならびに、抗 HIV 遺伝子の効率的な導入 一次世代レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療に向けてー)		
(論文内容の要旨)			
レンチウイルスベクターは、細胞のゲノムへ目的遺伝子を安定に組み込むことができ、その持続的な発現を可能とする性質を有する。さらに、このベクターは非分裂細胞にも遺伝子導入が可能な特性をもつことから、神経細胞や血液幹細胞のような静止期細胞への遺伝子導入にも用いることができ、遺伝子治療への応用が期待されている。			
一方、レンチウイルスベクターの問題点としては、感染性ウイルスの産生に抑制的に作用する分子やプロデューサー細胞に対して致死的に作用する分子をコードする遺伝子の導入が不可能であるという点が挙げられる。このことは、がん細胞を標的とした細胞障害性分子や抗 HIV 分子を導入する遺伝子治療開発にとって解決すべき問題点である。そこで本研究では、新規誘導システムを確立することにより、これまで困難であった目的遺伝子の導入を可能とするレンチウイルスベクターの開発を試みた。			
まず、ウイルス増殖に必要な遺伝子領域のほとんどを欠いた self-inactivating lentiviral vector (SIN ベクター) に、ミフェプリストンと調節タンパク質複合体によって目的遺伝子の発現が誘導可能なプロモーター (薬剤誘導性プロモーター) 配列を挿入した (F ベクター)。また、ウイルス RNA の合成に用いられるプロモーター (ウイルスプロモーター) に対して、転写単位 (薬剤誘導性プロモーター、目的遺伝子、レポーター遺伝子、ポリ(A) 鎖) を逆方向に配位した SIN ベクター (R ベクター) を作製した。			
作製した SIN ベクターの性質を調べるため、F ベクターと R ベクターにヒト CD14 遺伝子を挿入した。これらベクターの感染性ウイルス作出時に、プロデューサー細胞における CD14 の発現を検討した。その結果、F ベクターによるウイルス作出時にプロデューサー細胞で CD14 の強い発現がみられたのに対し、R ベクターではその発現がほとんどみられなかった。また、作製した各ウイルスにより CD14 遺伝子をヒト細胞に導入したところ、両ベクターともミフェプリストン添加による CD14 の発現誘導がみられた。			
次に、目的遺伝子として細胞に対して障害活性をもつウシ水泡性口内炎ウイルス M (VSVM) 遺伝子を F ベクターと R ベクターにそれぞれ挿入し、感染性ウイルスの作出を試みた。その結果、VSVM 挿入 R ベクターからのみウイルスが産生された。このウイルスにより標的細胞へ VSVM 遺伝子を導入したところ、ミフェプリストン存在下でその発現の誘導がみられた。			
最後に、R ベクターによる抗 HIV 分子の導入を検討した。HIV-1 出芽抑制分子である vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) のドミナントネガティブ変異体 (VPS4B KQ) 遺伝子を R ベクターに挿入し、感染性ウイルスの作出を試みた。その結果、ウイルスが産生され、このウイルスにより VPS4B KQ を導入した細胞で、ミフェプリストン添加による VPS4B KQ の発現誘導が確認された。そして、発現した VPS4B KQ により HIV-1 粒子の放出が約 50 % 抑制された。			
本研究結果は、薬剤誘導性プロモーター配列の挿入、さらに、転写単位のウイルスプロモーターに対する逆方向への配位がレンチウイルスベクターの有用性を広げることを示している。今回構築された薬剤誘導性レンチウイルスベクターは、感染性ウイルスの作出を抑制するような遺伝子の導入を目的とする遺伝子治療にとって極めて有効なアプローチであり、次世代レンチウイルスベクターシステムの礎となるものと考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)
本論文は、薬剤添加により導入遺伝子の発現誘導が可能な新規レンチウイルスベクターを開発した成果である。この成果により、これまで極めて困難であった細胞障害性分子やウイルス産生抑制分子の発現誘導が可能となった。
その手法の新しいところは、薬剤誘導性遺伝子発現ユニット (プロモーター、目的遺伝子、レポーター遺伝子、ポリ A 鎖付加配列) の方向性を、ウイルス作出に用いるプロモーターに対して逆方向にした点にある。さらに、mRNA 安定化配列であるウッドチャック肝炎ウイルス由来の Woodchuck post-regulatory element (WPRE) を薬剤誘導性遺伝子発現ユニットと逆方向に 3' LTR の上流に挿入することで、導入遺伝子の非誘導時の発現、すなわちリークがほぼ完全に抑制された。
本論文で構築されたウイルスベクターにより HIV-1 複製後期過程を特異的に抑制することもでき、そのプロセスの詳細な解析が可能となる。さらに、臨床分野においては、細胞障害性遺伝子の導入によるがん治療への応用が考えられる。
以上の研究は、新たな遺伝子導入法の開発研究に貢献し、ウイルス複製過程の解明ならびにウイルスベクター法の開発に寄与するところが大きい。
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、本学位申請者は、平成 22 年 2 月 18 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