

氏 名	ひ の しんじろう 野 信 次 朗
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2729 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	Sea Urchin Insulator Protects Lentiviral Vector from Silencing by Maintaining Active Chromatin Structure (ウニ由来インスレーターは、活性型クロマチン構造を維持することにより、レンチウイルスベクターのサイレンシングを抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 松 岡 雅 雄

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に代表されるレンチウイルスを利用したベクターは、ニューロン、肝細胞、種々の幹細胞などの非分裂もしくは分裂に乏しい細胞にも効率よく外来遺伝子を導入できることから、遺伝子治療への応用が期待されている。レンチウイルスベクターは宿主細胞染色体に組み込まれ、細胞分裂とともに娘細胞へ受け継がれるため長期に亘って発現が持続する。その一方で、導入遺伝子発現は組み込み部位周辺のクロマチン高次構造の影響を受けることになり発現の組み込み部位依存性 (ポジション効果) や経時的な発現低下 (サイレンシング) といった宿主からの発現抑制を受ける。遺伝性疾患に対する遺伝子治療においては有用遺伝子の生涯に亘る発現が重要であることから特にサイレンシングは克服すべき問題であると考えられる。本研究ではクロマチンインスレーターと呼ばれる DNA 断片を HIV 由来レンチウイルスベクターに組み込むことにより導入遺伝子発現の安定化を試みた。インスレーターはクロマチン構造の境界線として機能すると考えられ、導入遺伝子の前後に挿入することによって発現が宿主染色体の影響から独立することが期待された。

まず、HIV 由来ベクター、pHR'内部にレポーターカセット (サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターおよびハイグロマシニン耐性/EGFP 融合遺伝子) を組み込むことによりコントロールベクター、HR/cHG を作製した。続いて 3'-U3 領域にユニアリアルサルファターゼ遺伝子由来インスレーター (ArsI) を双方向に搭載したベクターを作製した (HR/A+ 及び HR/A-)。3'-U3 領域に挿入した ArsI はベクターウイルスの導入後、逆写反応の過程で 5'-U3 領域にコピーされ、その結果レポーターカセットを 2 つの ArsI が挟むことになる。これらのベクターをヒト骨髓性白血病由来 HL-60 細胞に導入し、PCR 法にて全長の ArsI が存在することを確認した。また、各ベクターの力価はいずれのベクターにおいても同程度であったことから、ArsI がベクター産生、発現に影響を与えないことが示された。これらのベクターを用いて Ins の HIV ベクターサイレンシングに対する効果を検討したところ、HL-60 細胞及び CCE マウス ES 細胞において HR/A- ではレポーター遺伝子のサイレンシングが回避された。一方、ヒト赤芽球 K562、ヒト肝腫瘍細胞 Huh-7 及びヒト乳癌由来 MCF-7 ではいずれのベクターでもサイレンシングが認められた。これらのことから、ArsI は HIV ベクターにおいて挿入方向依存的かつ細胞種依存的にサイレンシングを抑制することが示された。一方、HL-60 細胞において、HR/A+ 及び HR/A- のいずれもがポジション効果を抑制した。このことから、ArsI による抗サイレンシングと抗ポジション効果は異なる機序によるものであることが示唆された。

さらに ArsI による抗サイレンシングの機序を検討する目的で、クロマチンの高次構造を規定する要素であるヒストンアセチル化の解析を行った。その結果、サイレンシングが回避された HR/A- の CMV プロモーター領域では、サイレンシングを受けたベクターと比較して高度にアセチル化されていることがわかった。このことから ArsI はベクター内部のヒストンアセチル化を維持することによりレポーター遺伝子の発現を安定化させていることが示唆された。

以上の結果から、ArsI を搭載したレンチウイルスベクターは、有用な遺伝子治療ツールになり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

レンチウイルスベクターは、遺伝子治療への応用が期待されているが、クロマチン高次構造の変化による経時的な発現低下（サイレンシング）が誘発される。遺伝子疾患の治療では長期に亘る発現が重要でありサイレンシングは克服すべき問題である。

申請者はクロマチンインスレーターと呼ばれる DNA 断片を HIV 由来レンチウイルスベクターに組み込むことにより導入遺伝子発現の安定化を試みた。インスレーターはクロマチン構造の境界線として機能し、導入遺伝子発現を宿主染色体の影響から防護することが期待された。レポーター遺伝子を搭載した HIV ベクターを作製し、両端にウニアルサルファターゼ遺伝子由来インスレーター（ArsI）を双方向に組み込んだ。このベクターを細胞株に導入し ArsI の抗サイレンシング効果を解析した結果、ArsI は HIV ベクターにおいて挿入方向依存的かつ細胞種依存的にサイレンシングを抑制することが示された。さらに ArsI による抗サイレンシングの機序を検討する目的で、クロマチンの高次構造を規定する要素であるヒストンアセチル化の解析を行った結果、ArsI はベクター内部のヒストンアセチル化を維持することによりレポーター遺伝子の発現を安定化させていることが示唆された。

以上の研究はインスレーターの抗サイレンシング作用を明らかにするとともに、遺伝子治療のためのベクターの開発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1月29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。