

氏名	吉崎 真理子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第3407号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	機能性遺伝子の細胞内送達のための新規システムである遺伝子治療用センダイウイルスベクター改良のための基盤研究
論文審査委員	教授 山田 秀徳 教授 尾坂 明義 教授 宍戸 昌彦 助教授 妹尾 昌治

学位論文内容の要旨

真核生物の細胞へ遺伝子を導入するためのデリバリーシステムとして、さまざまなウイルスを材料にしたベクターが開発されている。センダイウイルスの感染性を利用することによって、プラスミドのトランスフェクションでは決して実現できない導入効率を得ることができ、センダイウイルスベクターの場合、*in vitro*ではMOI=3で容易に100%の遺伝子導入が可能である。しかしながら、生体はウイルスの侵入、増殖から身を守るために巧妙な生体防御システムを進化の過程で獲得している。ウイルスベクターを作製するときには、生産性、感染トロピズム、遺伝子導入能、安全性とともに重要な検討項目として、免疫系の攻撃から回避する改変をおこなうことが開発のポイントになる。

そこで、本研究では生体防御系からの攻撃を少しでも回避することにより搭載遺伝子の発現持続、あるいは2回目のベクター投与を可能にすることを目的としたセンダイウイルスベクターの改良をまとめたものである。生体内免疫機構を回避する方法として、第二編ではセンダイウイルスの自立複製能によって細胞内に合成・蓄積されるウイルス由来のタンパク質を減らすために、ベクターゲノムから構造タンパク質の遺伝子をできるだけ除去したエンベロープ関連全遺伝子欠失型 SeV ベクターを作製し、その性状解析、ベクター投与後の生体内における免疫反応の減弱を証明した(獲得免疫回避法)。第三編では、細胞内で認識されるセンダイウイルス由来の一本鎖RNA、および、二本鎖RNAの量を減少させるため、まず転写・複製活性をある程度抑制させる点変異を同定した。その点変異を利用し、搭載遺伝子発現量を実用レベルで確保しながらも、自然免疫発動を回避できる可能性についてまとめた。

論文審査結果の要旨

ウイルスの感染性を利用して遺伝子導入用ベクターを作製し、生体に投与した場合、発現プラスミドでは得られない遺伝子導入・発現効率を実現できる。このウイルスの感染性と遺伝子発現機構をリバースジェネティクスを活用して改変し、さまざまな遺伝子治療用ベクターが開発されてきた。従来の治療法では処置が困難な疾患に対して、遺伝子治療は期待されている。しかし、2002年にレトロウイルスベクターの染色体挿入によって、患者が白血病になったことを契機に、遺伝子治療用ベクターに対して治療効果とともに、高い安全性が求められるようになった。

組換え体センダイウイルスベクターの問題点として、RNA依存性RNAポリメラーゼの自立複製能によって、センダイウイルス由来の蛋白質とRNAが細胞内に蓄積することにより、培養細胞では細胞障害性が確認されている。また、生体ではベクターを排除する免疫反応がおこる。

申請者は、これらの問題点を把握して、安全性とともにベクターの性能を向上することを目的に、本研究課題で2つの方法を採用した。第1の方法は、センダイウイルス (Sendai virus; SeV) ゲノムからエンベロープ関連の3種類の遺伝子を除くことである。この改良によって、自立複製時に欠失した遺伝子産物は合成されないため、免疫反応を含めた細胞側の反応を減弱できる可能性を示した。第2の方法では、RNA依存性RNAポリメラーゼであるSeVのL (Large protein; 巨大蛋白質) にY1214F変異を加えて自立複製能を低下させた。この改良の結果、治療効果に十分な搭載遺伝子の発現量を維持しつつ、SeV由来の蛋白質とRNAの量は最大限に減少させることを可能にした。さらに、申請者が同定したY1214F変異は、現在までに報告されているSeV変異のなかで、弱毒化の程度は最も効果的であった。また、Y1214F変異の位置は近縁のウイルスがもっているRNAポリメラーゼでよく保存されており、他種ウイルスからワクチンなどを作製するときに応用可能であることを示した。免疫系の現在の知見に照らして、センダイウイルス粒子の構成成分において、SeV RNAは自然免疫を発動し、SeV蛋白質は獲得免疫をおもに誘導しているのではないかということを申請者は推論した。自然免疫に対してはLの活性抑制で、獲得免疫にはエンベロープ関連3遺伝子の除去で対応できることを考察した。

以上のように本研究は、野生型センダイウイルスを排除する自然免疫と獲得免疫の2つの生体防御機構からセンダイウイルスベクターを効果的に回避できるようにした遺伝子治療用ベクターの改良について述べている。この2つの方法を組み合わせたベクターの開発は、将来の臨床試験への使用が期待される。したがって、本論文によって示された研究成果は、博士(工学)の学位論文として価値があると認める。