

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 稲 恭 宏

本研究は、ヒトのAIDSにおける遺伝子治療の可能性を調べるために、AIDSの動物モデルであるMAIDS(マウス後天性免疫不全症候群)の系にて、レトロウイルスベクターを用いて、野生型マウスの骨髄細胞に変異型 (Xid型) Btk遺伝子を導入し、致死線量の放射線を照射した野生型マウスに移植する方法を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 脾細胞の染色体DNAを用いたサザンブロッティング法の結果、Neo群で3.7 kb、Wild Btk群 および Xid Btk群 で 6.4 kb のバンドが検出され、ともに同程度の遺伝子の導入を確認した。脾細胞のウェスタンブロッティング法の結果、約76kDのBtkタンパクの発現を確認した。その発現の程度は、デンシトグラフAE-6920M-05型 (ATTO社製) にて測定したところ、Neo群ではB6マウスと同程度であったのに対し、Wild Btk 群 と Xid Btk 群では、その発現が約1.5倍程度に上昇していた。したがって、ゲノムに組み込まれたBtk cDNAが発現していることが確認された。

2. 骨髄細胞移植から6週目に眼下静脈叢から採取した末梢血を用いて、FACSscanにより各群の末梢血B細胞表現型を比較した結果、B6マウスのB細胞はsIgMが中等度、sIgDが強度の発現を示していた。これに対しB6.xidマウスでは、sIgMが強度で、sIgDが中等度から強度の発現を示していた。Neo群とWild Btk群では、B6マウスとほぼ同じパターンであったが、Xid Btk 群では、sIgM陽性sIgD低発現の細胞集団が増加し、B6.xidマウスに近い表現型を示した。血清免疫グロブリン濃度については、B6.xidマウスとB6.xidマウスの骨髄細胞を移植したB6マウスでは、血清中IgM、IgG2a濃度が、B6マウスの10%以下に低下していた。Neo 群 と Wild Btk 群は、B6マウスやB6マウスの骨髄細胞を移植したB6マウスと同程度であったが、Xid Btk群ではそれらの約40~50%のレベルに低下していた。抗CD38モノクローナル抗体刺激による脾細胞の増殖応答は、Neo群とWild Btk 群では、B6マウスと同程度の

増殖応答を示したのに対し、Xid Btk 群 では、それらの約 1/4 程度の応答にとどまり、B6.xidマウスのレベルに近い応答を示した。以上より、野生型およびXid型Btk遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込んで骨髄細胞に感染導入して移植したところ、骨髄細胞移植が成立し、Btk 遺伝子が脾細胞に発現して機能し、Xid 型Btk遺伝子を導入した場合、sIgM、sIgDの発現パターン、血清中IgM、IgG2a濃度、抗CD38モノクローナル抗体刺激による脾細胞の増殖応答、いずれにおいても、Xidマウスに近似した表現型を示した。また、これらの指標の動態の違いから、Btkがこれらに関与するメカニズムの違いがある可能性が示唆された。

3. Neo 群、Wild Btk 群と比較して、Xid Btk 群では、ウイルス感染に伴う脾臓重量の増加が抑制され、脾細胞のConA刺激による増殖応答の低下、さらに血清中IgM、IgG2a濃度の上昇もほとんど認められず、B6.xidマウスと同様にMAIDS発症遅延効果が認められた。脾細胞ゲノム中の LP-BM5 MuLV遺伝子をサザンブロッティング法によって調べた結果、Xid Btk 群でも、Neo 群、Wild Btk 群と同様に LP-BM5 MuLV 遺伝子のバンドが検出され、Neo 群、Wild Btk 群と同様に、LP-BM5 MuLV 遺伝子の染色体DNAへの組込みは成立していることが確認された。したがって、Xid Btk群では、ウイルスの感染は起こっているが、その感染細胞が十分に増殖できないことが示唆された。LP-BM5 MuLV投与後の生存率曲線も、Neo 群、Wild Btk群と比較して、Xid Btk 群では、ウイルス投与後の生存率の上昇が観察された。すなわち、死亡開始の時期が約5週間遅れ、全マウスが死亡するまでの期間が約13週間延長することが確認された。

以上、本論文は、AIDSの動物モデルであるMAIDS(マウス後天性免疫不全症候群)の系において、レトロウイルスベクターを用いて、野生型マウスの骨髄細胞に変異型(Xid型) Btk遺伝子を導入し、致死線量の放射線を照射した野生型マウスに移植する方法を確立した。その結果、Xidマウスに近い末梢血B細胞表現型を示すマウスが得られ、これらのマウスで LP-BM5 MuLVを用いた感染実験を行ったところ、野生型Btk遺伝子を導入したマウスと比較して、MAIDSの発症遅延効果が認められた。以上より、MAIDSの発症に 変異型(Xid型) Btk が抑制的に作用することを初めて確認した。本研究は、いまだ発症のメカニズムには不明な点も多く、有効な免疫学的治療法の確立が期待されているAIDSの発症遅延を惹起し得る可能性もあると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。