

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 渡 辺 卓 郎

本研究は成人T細胞性白血病（ATL）及びホジキン病の遺伝子治療に組み換えアデノウィルスを用いる可能性に関して基礎的検討を行う目的で、成人 T 細胞性ウィルス（HTLV-1）感染細胞株、ホジキン由来細胞株等の培養細胞系と ATL 患者から得られた末梢血単核球を用い、組み換えアデノウィルス感染の実験系で解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. GFP を搭載した組み換えアデノウィルス（AxCAGFP）を用いた培養細胞への感染実験の系で、レーザー共焦点顕微鏡、蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー、サザン・プロット等による解析を行った。HTLV-1 感染細胞株（MT1、MT2、Tlom1、HUT102）、ホジキン由来細胞株（HDLM2、L428、L540）では組み換えアデノウィルスによって血球系細胞では例外的に高い効率で遺伝子導入が可能であることを示した。特に HTLV-1 感染細胞株の感受性の高さは解析に用いた他の T 細胞株（Jurkat、CEM、Molt4）に比べてオーダーのレベルで高く、アデノウィルスに対する感受性の高い細胞として知られる HeLa に匹敵するなど、血球系細胞としては突出した感受性の高さを示した。
2. アデノウィルスの感染効率を規定する宿主側の因子としてコクサッキーウィルス・アデノウィルス・レセプター（CAR）や、インテグリン $\alpha\beta3$  及び $\alpha\beta5$  等が知られている。一般に血球系細胞ではこれらの宿主因子の発現レベルが低く、そのことが組み換えアデノウィルスによる遺伝子導入効率の低さの原因と考えられている。本研究では HTLV-1 感染細胞株におけるこれら既知の宿主側因子の発現についての解析を RT-PCR 及びフローサイトメトリー等により行った。インテグリンは MT1 で $\alpha\beta5$  の発現が認められる以外は発現を認めなかった。CAR の発現は HTLV-1 感染細胞株の全てで認められたが、比較対象とした他の T 細胞株の全てでも CAR の発現が認められ、HTLV-1 感染細胞株の突出した感受性の高さは CAR の発現のみでは説明できず他に未知の宿主因子の関与が示唆された。
3. ATL 患者から得られた末梢血単核球に対して AxCAGFP の感染実験を行い、蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーにより GFP の発現を解析した。GFP の発現が CD25 陽性細胞に特異的であり、腫瘍細胞選択的な遺伝子導入の可能性が示唆された。CAR の発現が CD25 陽性細胞に特異的に認められ、腫瘍細胞への選択的な遺伝子導入への CAR の特異的な発現の関与が示唆された。一方 CAR 陽

性細胞においてもその遺伝子導入の効率は100%には至らず、ここでも既知の宿主因子以外の因子の関与が示唆された。またCD25陽性細胞への遺伝子導入効率は遺伝子治療への応用を想定した場合には不十分なレベルであった。

4. ATL 腫瘍細胞ではNF- $\kappa$ Bの構成的活性化が見られることが報告され、腫瘍の増殖に関与していることが示唆されている。本研究では培養細胞の系で、IkB $\alpha$ の変異体であるmIkBの遺伝子をドミナント・ネガティブ体として搭載した組み換えアデノウイルス(AxCAmIkB-M)を用いた感染実験を行い、mIkB遺伝子の導入によりHTLV-1感染細胞においてNF- $\kappa$ Bの構成的な活性化が抑制されることをEMSAによる解析で示した。またMTTアッセイ等を用いた解析でmIkB遺伝子の導入によりcell viabilityが低下すること、TUNEL法による解析ではアポトーシスが誘導されることを示した。
5. ホジキン細胞ではNF- $\kappa$ Bの構成的活性化が報告され、過剰発現したCD30の自己凝集によりそれが生じること、細胞増殖や抗アポトーシス効果に関与すること等を示唆する報告がある。本研究ではCD30の細胞質内領域を欠失させた変異体CD30dの遺伝子をドミナント・ネガティブ体として搭載した組み換えアデノウイルスAxCACD30dを作成し、ホジキン由来細胞株への感染実験を行った。CD30d遺伝子の導入によりNF- $\kappa$ Bの構成的活性化が抑制されることをレポーター遺伝子・アッセイにより示し、さらにその下流にあるIL-13の過剰産生が抑制されることをELISA及びノザン・プロットにより示した。また、MTTアッセイを用いた解析でCD30d遺伝子の導入によりcell viabilityが低下すること、TUNEL法による解析ではアポトーシスが誘導されることを示した。

以上、本論文は組み換えアデノウイルスによるHTLV-1感染細胞株、ホジキン由来細胞株への遺伝子導入の系をATL及びホジキン病の遺伝子治療のモデルとして解析し、臨床応用への可能性と問題点を明らかにした。特にHTLV-1感染細胞株で認められた突出した感受性の高さは既出の報告に例のない新規性の高いものである。一般にアデノウイルスに対して感受性が低いとされる血球系細胞に高い効率で遺伝子導入が可能であること、腫瘍特異的な遺伝子導入の可能性を示した本研究は、アデノウイルス感染に関与する新たな宿主因子の存在を示唆し、腫瘍への高い効率、高い特異性での遺伝子導入を実現する上での基礎的知見として、遺伝子治療の開発において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。