

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

白倉 雅之

論文題目 Study on the gene therapy for brain ischemia using Sendai virus vectors.

(センダイウイルスベクターを用いた脳虚血遺伝子治療に関する研究)

本論文は、脳虚血モデルを用いてセンダイウイルスベクターの有効性及び安全性を明らかにしたものである。4章より構成されている。第1章ではウイルスベクターに関する総論がのべられている。センダイウイルス (SeV) はパラミクソウイルス科の RNA ウイルスで、齧歯類における呼吸器病ウイルスであり、ヒトへの病原性は報告されていない。また、SeV ベクターは神経系および筋肉で効率良く目的の遺伝子を大量に発現させることが報告されている。レトロウイルスベクターと違い、ウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれることなく遺伝子発現を行うことが可能であり、ヒトへの臨床応用を考えた場合、安全性が高いと考えられる。また、本モデルで対象にした脳虚血等の脳血管障害は主要な生活習慣病であり、高齢化に伴い患者数が増加し、大きな社会問題となることが予想される。従来の治療法として、抗脳浮腫療法や抗血栓療法などが用いられているが、十分な成果は得られていない。そのような背景から新たな治療法の一つとして、遺伝子治療の応用が考えられている。本研究では、SeV ベクターを用い、脳虚血遺伝子治療の可能性を探るために、スナネズミ脳虚血モデルにおいて有効性と安全性の評価を行った。

第2章では、野生型ウイルスに治療用遺伝子を搭載した SeV ベクター (付加型 SeV ベクター) を用いて、スナネズミ脳虚血モデルにおける評価を実施した。治療用遺伝子は神経細胞保護作用を有することが知られ、神経変性疾患治療の候補因子であるグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) を用いた。GDNF 搭載ベクターによる虚血実施 4 日前投与では、海馬 CA1 領域の神経細胞を保護することが確認された。しかし、実際の臨床応用を考慮した場合、虚血実施後にベクターを投与しなければならない。そこで、GDNF に加えて、神経細胞保護効果を有すると報告されている神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、インスリン様成長因子 (IGF1) および血管内皮増殖因子 (VEGF) をそれぞれ搭載したベクターを用いて、虚血実施 30 分後にウイルスベクターの投与を試みた。その結果、GDNF、NGF および BDNF 搭載ベクターで有意な保護効果が得られた。さらなる虚血後の時間

の延長を求めて、虚血 4 時間後投与また 6 時間後投与による検討を実施した。その結果、GDNF および NGF 搭載付加型 SeV ベクターによって保護効果が確認された。虚血 4 時間後投与は実際に臨床応用を想定できる時間である。他のウイルスベクターにおいて、虚血 4 時間後投与あるいは 6 時間後投与での保護効果は、これまで全く報告されていず、センダイウイルスベクターの臨床的有用性が明らかになった。

第 3 章では、安全性を高めるため F 遺伝子欠失型 SeV ベクターを用いて、同様に評価を実施した。この型のベクターは F 遺伝子を欠失しているため、初代ウイルス粒子は放出されるが、ウイルス外被蛋白は細胞膜と融合できないため、その粒子は非感染性粒子であり、安全性が高いと考えられる。付加型 SeV ベクターと同様、GDNF および NGF 搭載ベクターは虚血 4 時間後投与において有意な保護効果が得られた。しかしながら、GDNF および NGF 搭載付加型ベクター投与群と比較して、保護効果は弱まった。また、保護効果の持続性を検討するために実施した 28 日後評価群では、保護効果はほとんど見られなかった。これは放出粒子が宿主反応を強く惹起したため、局所での炎症反応が起きたことによると考えられた。

第 4 章では、さらに安全性を高め、かつ宿主反応性を弱めベクターの有効性を挙げるため、MF 両遺伝子欠失型 SeV ベクターを用いて、同様に評価を行った。このベクターは M 遺伝子を欠失させることによりウイルス粒子の放出が検出されず、細胞障害性及び宿主反応性が軽減されることが期待される。このベクターを用いて検討を行った結果、GDNF 搭載 MF 両遺伝子欠失型 SeV ベクターで高い神経細胞保護効果が得られた。また、GDNF 発現量においても付加型 SeV ベクターと同程度であった。さらに、脳内における病理組織学的検索を行った結果、組織傷害性が軽減されていた。このことは虚血 4 時間後投与という実際に臨床応用を想定できる時間で効果があり、なおかつ安全性が向上したことを示している。

以上、本論文は SeV ベクターが中枢神経系において高効率、高発現能を持ち、SeV ベクターを用いた脳虚血遺伝子治療の可能性を示唆するものである。また、SeV ベクターは中枢神経系において非常に高い発現能を有することから、他の神経変性疾患の治療への応用が可能であると考えられる。獣医学及び医学領域での応用が期待される研究であり、臨床応用に必要な多くの知見を提供した。よって、審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。