

審査の結果の要旨

氏名 新井 徹

本研究は増殖する広範な種の細胞に対して遺伝子を効率よく導入する方法を確立するために、VSV-G(水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質)をエンベロープタンパクの代わりに用いるシュードタイプレトロウイルスベクター産生系の樹立とシュードタイプベクターのウイルス学的特性の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 安定したレトロウイルスベクター産生細胞の樹立には、*gag*, *pol*, *env*と導入遺伝子を含むベクターDNA の発現が必要であるが、*env*の代替とする VSV-G の恒常的な発現では細胞障害性が示されることが知られていた。そのため Cre リコンビナーゼによる *loxP* 配列の部位特異的組換えを利用して、VSV-G の発現を厳密に制御した発現誘導ユニットを構築し、*gag*, *pol*を発現する細胞(FLY)に導入した。クローン選択の結果、Cre リコンビナーゼの導入により VSV-G シュードタイプベクターを高産生するパッケージング細胞株(PtG-S2)を樹立した。
2. PtG-S2 の性質を解析するために β -galactosidase を含むベクターDNA を導入したところ、VSV-G の発現は厳密に制御されており誘導前には全くシュードタイプベクターを産生しない一方で誘導後数日で 10^6 感染粒子(IU)/ml という実用上十分な産生量が得られた。このシュードタイプベクターは超遠心操作により 10^9 感染粒子 IU/ml まで濃縮可能であり、 5×10^6 IU/ml 中に自己増殖可能な組換えベクターは含まれていなかった。
3. VSV-G 高産生誘導株を効率よく選択するために、発現誘導ユニット中の薬剤耐性遺伝子の 3'-非翻訳領域に mRNA 不安定化配列を導入した。このことにより薬剤耐性遺伝子産物は 1/30 程度に減少し、プロモーター活性の弱い細胞は選択薬剤により淘汰させることで、Cre リコンビナーゼによる誘導後には同一プロモーターにより発現される

VSV-G が高発現するクローンを効率よく選択することができた。

4. β -galactosidase を含むベクターDNA を導入した PtG-S2 から産生された VSV-G シュードタイプベクターによる遺伝子導入のウイルス学的性質を β -galactosidase 導入を指標として調べたところ、繊維芽細胞・ヒト固形癌細胞など 3 種の細胞株に対して用量依存的な遺伝子導入が可能であった。この導入は、細胞とウイルスベクターが制限なくランダムに遺伝子導入をする時に予想される Poisson 分布による用量依存性と近似していた。またこの遺伝子導入性状は超遠心濃縮に影響されるものではなく、VSV-G シュードタイプベクターの特性であると考えられた。
5. 従来、遺伝子導入方法として汎用されてきたアンフォトロピックエンベロープを *env* として用いるアンフォトロピックベクターでは、全細胞に遺伝子導入することができないことが多いことが報告されていた。前項と同時に遺伝子導入の用量依存性を調べたところ低用量では用量依存的な導入が見られたが、高用量では導入の頭打ちもしくは低下が見られた。この原因はウイルスベクター溶液中に含まれる多量の可溶性のアンフォトロピックエンベロープタンパクおよび非感染粒子が、導入細胞上の受容体と結合することにより感染粒子による遺伝子導入効率を低下させると考えられた。
6. VSV-G による遺伝子導入は制限なく行われていると考えられたため、通常のレトロウイルスで見られる干渉現象(レトロウイルス産生細胞上では受容体がエンベロープと結合しているために、同一エンベロープを持つレトロウイルスは感染しないという現象)が見られるかを検討した。第 4 項から予想されるとおり VSV-G シュードタイプベクターは干渉現象は見られなかった。

以上、本論文は高効率の遺伝子導入を可能とする VSV-G シュードタイプベクターの産生系を樹立すると共にそのウイルス学的特性を明らかにしたと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。