

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 竹内 隆正

本研究は癌の集学的治療の一翼を担うものとしての遺伝子治療における新たな戦略を模索する中で、細胞の分裂・増殖に必須の核構造蛋白質であるラミン B1 の発現抑制によって、非分裂細胞と分裂細胞を弁別して細胞毒性を発揮させることを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. PCR による RNAi 誘導カセットの構築から、同カセットを持つアデノ随伴ウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターの作製、さらに培養細胞におけるノックダウンの確認までが一貫して行える汎用性のある実験系が構築された。
2. PCR 産物およびウイルスベクターによる RNAi 誘導により HeLa S3 細胞においてラミン B1 のノックダウンが可能であることを、RNA レベルでは定量的 RT-PCR を用いて、蛋白質レベルでは免疫細胞化学を用いて示した。またノックダウン効率が標的配列により異なることを示した。
3. 正常ヒト網膜色素上皮由来二倍体細胞 ARPE19 細胞を接触阻止のかかった状態にして、ラミン B1 を標的とする RNAi を誘導するレンチウイルスベクターを感染させると、感染後約 3 週間の時点で、マーカー遺伝子である緑色蛍光蛋白質を発現している細胞数は陰性対照レンチウイルスベクターを感染させた場合と差がなく、非分裂細胞では細胞死に至るほどの細胞毒性は見られなかった。
4. 増殖状態にあるヒト子宮頸癌由来 HeLa S3 細胞にラミン B1 を標的とする RNAi を誘導するレンチウイルスベクターを感染させ、ブラストシジン S により遺伝子導入細胞を選択したところ、感染後 2 週間の時点でのコロニー数は陰性対照レンチウイルスベクターを感染させた場合の約半数に減少していた。また高力価のアデノ随伴ウイルスベクターにより約 90%の細胞が遺伝子導入される状況で、感染後の細胞増殖を WST-1 を用いて評価したところ、感染後 3 日目において非感染細胞あるいは陰性対照アデノ随伴ウイルスベクター感染細胞と比較して約 50%の増殖抑制が見られた。この増殖抑制は統計学的に有意なものであった。

5. RNAi 誘導アデノ随伴ウイルスベクター感染後の細胞増殖およびラミン B1 減少を経時的に観察すると感染後 3 日目以降は細胞の脱落は見られず、ラミン B1 減少細胞の割合が減少していた。また感染効率が低い場合にはラミン B1 減少細胞が出現しても培養全体での増殖抑制は見られないことからウイルスベクターの多重感染によるロックダウン効率の上昇が増殖抑制には必要であると考えられた。同時にアデノ随伴ウイルスベクターのエピソームとして存在する感染様式が、癌の遺伝子治療においては不利であると考えられた。

以上、本論文はラミン B1 に対する RNAi 誘導戦略が癌治療への応用が可能であることを示し、具体的なウイルスベクターに関する検討も加えたものである。本研究では新しい技術である RNAi を応用した新規の癌遺伝子治療戦略が提示され、今後の発展が期待されるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。