

審査結果の要旨

氏名 島 誠一

本研究は、慢性骨破壊疾患である関節リウマチ（RA）において誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の発現が RA の病態に関与している可能性を明らかにするため、iNOS 発現を特異的に抑制可能で、薬理的な副作用を起こさないアンチセンス遺伝子導入法を用いて検討を行った。生体への遺伝子導入は病原性がなく、ヒトの遺伝子治療において安全かつ有効であると考えられているアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた。まず、アジュバント誘導型関節炎（AIA）ラットにおいて、現在使用可能な 1 型から 5 型までの 5 種類の AAV セロタイプ（AAV1-AAV5）の中でどの AAV セロタイプが最も遺伝子発現が高いか検討を行った。次に、その AAV ベクターを用いた iNOS antisense 遺伝子治療が AIA ラットにおいて有効であるか否か検討を行った。本研究により得られた結果は下記の通りである。

1) AAV ベクターによるセロタイプ間の遺伝子発現効率の検討：各セロタイプの AAVLacZ ベクターを作製し、正常ラットおよび AIA ラット（ともに 9 週齢）の右側足関節に遺伝子導入し、導入後 28 日目に LacZ 遺伝子の発現効率を比較したところ、AIA ラット群において 5 種類の AAV セロタイプの中で AAV3 が最も発現が高く、他のセロタイプを遺伝子導入した群の 2 倍以上の値を示した。また LacZ 遺伝子の発現は骨芽細胞、破骨細胞および滑膜細胞に認められた。一方、正常ラット群における LacZ 遺伝子の発現量は 5 種類のセロタイプがすべて AIA ラット群より低値を示した。これより AAV ベクターによる遺伝子導入において長期間（28 日）遺伝子が発現し、正常ラットより関節炎ラットにおいて高い遺伝子発現量が得られ、そのなかで AAV3 が最も遺伝子発現量が高いことが示された。

2) 後肢足の腫脹および体重の測定：3 種の AAV3 ベクター（AAV LacZ, AAV iNOS sense, AAV iNOS antisense）を作製し、それぞれを AIA ラット（9 週齢）の右側足関節に遺伝子導入し、7 日毎に後肢足の腫脹および体重の測定を行った。

その結果、AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群における後肢足の腫脹は AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群に比較し有意に減少していた。また体重についても同様に、AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群で有意に増加していた。以上より iNOS antisense を導入した AIA ラットにおいては後肢足の腫脹を減少するとともに体重も増加しており関節炎の症状が改善することが示された。

3) レントゲンのおよび組織学的評価：遺伝子導入後 28 日目に屠殺し、右側後肢足のレントゲンおよび組織学的評価を行った。その結果、レントゲンの評価において、正常ラット群と比較して AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群では重度の骨浸潤および破壊像が認められた。これらの骨破壊が AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群において改善された。組織学的評価において、AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群ではパ Nusantara 形成に伴う骨破壊が認められた。これに対して、AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では滑膜組織による骨浸潤および骨破壊が抑制されていた。またレントゲンのおよび組織学的スコアにおいて、AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群より有意に低いスコアを示した。以上から AAV3 iNOS antisense は AIA ラットにおける炎症および骨破壊を抑制することが示された。

4) 白血球数および血中 nitrate/nitrite の測定：遺伝子導入後 28 日目に屠殺し、白血球数および血中 nitrate/nitrite を測定した。その結果、正常ラットに比べ、AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群では白血球数が増加していた。これに対し AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では白血球数が減少した。以上から AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では関節における炎症の抑制に伴い白血球数も減少することが示された。また、血清中の nitrate/nitrite の産生は正常ラット群と比較し、AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群において増加していた。これに対し AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群における血清中の nitrate/nitrite の産生は AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群に比べ有意に減少した。以上から iNOS antisense を導入した AIA ラット群では血清中の nitrate/nitrite の産生が抑制された。

5) iNOS 発現量の免疫組織学的検討：遺伝子導入後 28 日目に右側後肢足の iNOS の免疫組織学的検討を行った。その結果、iNOS 蛋白は AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群において強い染色性が認められた。これに対し AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では iNOS の染色性は大幅に減弱した。これにより iNOS antisense を導入した AIA ラット群における iNOS 蛋白の発現は LacZ または iNOS sense を導入した AIA ラット群と比較し、著明に減少していた。

以上、本論文は iNOS が RA の病態において非常に重要なはたらきをしていると共に、RA の骨破壊の治療において iNOS をターゲットとした治療法が有用であり、また安全性の高い AAV ベクターによる遺伝子治療により臨床応用が可能であると示唆された。本研究は RA における遺伝子治療の開発に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。