

審査の結果の要旨

氏名 佐久間 龍太

本研究は後天性免疫不全症候群(AIDS)に対する遺伝子治療用ベクターの開発を念頭に、1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)ベクターのプロトタイプであるHXNベクターにレンチウイルスに特徴的な効率の良い感染に関わる塩基配列 central polypurine tract and central termination sequence(cPPT/CTS)を挿入し、その性状を解析し、HIV-1ベクター開発のための基礎的な知見を得ることを目的としたものであり、以下の結果を得ている。

1. HXNにHIV-1の塩基配列cPPT/CTSを含む178塩基の断片(SCC)を挿入しHXNの遺伝子導入効率にどのような影響が出るかを、HeLa細胞を指示細胞としてG418耐性をマーカーとして調べた結果、SCCを挿入した場合、遺伝子導入効率が変わらないことが示された。更に、cPPT/CTSを含む282塩基の断片(SCCよりも5'に104塩基長い領域、LCC)をHXNに挿入した場合、ベクター粒子の産生はHXNと同程度であったにもかかわらず、遺伝子導入効率が低下することが示された。
2. HXNにLCCを挿入したベクターのcDNAが核へ侵入した後のインテグレーションまでのいずれかの段階で阻害されていることが示された。LCCを挿入したHXNのベクターRNA/cDNAの核への侵入量を、2LTR環状cDNA量を指標としてPCR法で調べた結果、LCCを挿入したベクターcDNAもHXNと同程度に核へ侵入していることが示された。インテグレーションしたベクターcDNA量をAlu-PCR法を用いて調べた結果、HXNにLCCを挿入したことでインテグレーションしたcDNA量が減少したことが示された。SCCを挿入したHXNのcDNAのインテグレーション量はHXNと同程度であることが示された。
3. 一部のインテグレーションしたcDNAからのマーカー遺伝子発現をベクターの構造を模したレポータープラスミドにLCCを挿入して調べた結果、LCCを挿入したことで内部プロモーターからの遺伝子発現が低下することが示され、LCCを挿入したHXNでも遺伝子発現が抑制された可能性があることが示された。レポータープラスミドは[LTR-hTK-ルシフェラーゼ]の構造を持つ。この構造からLTRを除いても、hTKプロモーターの代わりにTKプロモーターを用いてもルシフェラーゼ

活性は変わらず、ルシフェラーゼ活性の低下は[LTR-LCC-hTK]の構造に特異的であることが示された。LCC の欠損変異体を挿入したレポーターアッセイの結果、ルシフェラーゼ活性の低下には LCC の 5' 側の 13 塩基(HIV-1_{LAI} のゲノム上で 4256-4268 番目の塩基)が関与していると考えられた。

4. LCC と SCC の差の 104 塩基の領域(dZ)を HXN に挿入したベクターの産生実験を行った結果、ベクター-RNA を含まない粒子が得られた。ベクター産生細胞を核分画と細胞質分画に分けて、それぞれから RNA を抽出しベクター特異的な RT-PCR で RNA を検出した結果、細胞質分画にはベクター-RNA は検出されず、細胞質分画からは検出されることを示した。よって、HXN ベクターに dZ を挿入することで、ベクター-RNA が細胞質に輸送されなくなったことが示唆された。

5. HXN をコードするプラスミドと HIV-1 の感染性クローンを 293T 細胞に co-transfection して培養上清中に放出される粒子量を測定した結果、粒子量がベクタープラスミドの量依存的に低下することが示された。dZ を挿入した HXN をコードするプラスミドを co-transfection に用いた結果、HXN をコードするプラスミドを用いた結果よりも粒子量が減少したことが示され、dZ を挿入した HXN が HIV-1 の増殖を抑制できる可能性が示された。

以上、本論文は AIDS 治療に利用可能な HIV-1 ベクター開発において、ePPT/CTS を挿入した事による遺伝子導入効率への影響の解析から、HIV-1 の感染を抑制する標的としての塩基配列 dZ の発見に至った。HIV-1 の感染、増殖を抑制する HIV-1 ゲノム内在塩基配列の報告は現在まで無く、本論文で報告された知見は全く新しいものである。dZ はベクターの感染を阻害する配列であると同時に、HIV-1 の内在配列でもある。従って、ベクター感染阻害のメカニズムが明らかになれば、HIV-1 の感染を阻害する研究に発展することが期待できる。よって、本論文は学位の授与に値するものと考えられる。