

## 論文の内容の要旨

論文題目 インスレーターを搭載したアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) の開発

指導教員 矢野 哲准教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 17 年 4 月入学  
医学博士課程  
生殖・発達・加齢医学専攻  
氏名 内野 繭代

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) は非病原性で、様々な細胞へ感染し、比較的安定した遺伝子発現を示すことから、遺伝子治療のベクターとして開発が進められている。効率的な遺伝子発現を示すベクターの開発は遺伝子治療への応用にきわめて重要である。我々は、遺伝子発現の効率と継続性の向上を期待して、エピジェネティックな発現調節配列を持つ rAAV を作製し、マウスに接種して導入遺伝子の発現を調べた。エピジェネティックな遺伝子発現調節機構であるインスレーターの利用はひとつの効果的な手段となる可能性がある。これまでトリβグロビン遺伝子のインスレーターをレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターに搭載し、インスレーターが導入遺伝子の発現に与える効果についての報告はある。ウイルスベクターの臨床応用においては、インスレーターと結合するヒト細胞因子群との親和性を考慮して、ヒトインスレーターの応用が望ましい。しかし現在までに、ヒトインスレーターである DHS を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを作成し、その機能を動物実験で検証した研究はない。本研究では、ヒトを含めた複数の種由来のインスレーターおよび MAR を搭載した新しい rAAV を作成し、C2C12 細胞あるいはマウス四頭筋への形質導入能を調べた。

hEF1αプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現カセットを作製し、プロモーターの上流にヒト (AAVS1)、トリ (βグロビン 5' HS4)、ウニ (アリルスファターゼ) のインスレーターを挿入した。この rAAV を精製し、

4週齢のマウス (Balb/c) の大腿筋に  $1 \times 10^9$  ゲノムコピー接種して、1、3、6ヶ月後に大腿筋を回収した。その結果、DHS および cHS4 により、EF による遺伝子発現が、C2C12 細胞において2から3倍、マウス四頭筋においてそれぞれ1000倍および100倍に増強した。Ars および MAR では遺伝子発現の上昇は認められなかった。マウス筋肉におけるベクターゲノムのコピー数は、インスレーターの有無で変化が無かったことから、DHS および cHS4 は EF からの転写を増強したと考えることが出来る。

マウス筋肉における EF からの DHS により遺伝子発現増強レベルは、現在までにみつけられたプロモーター／エンハンサーとして最も効率のよい CMV と比べ遜色なかった。DHS および cHS4 は CMV からの遺伝子発現には影響しなかった。これらの結果は、比較的効率のよくないプロモーターの転写レベルを、ほぼ現在考えられる最大レベルまで DHS が増強したことを示唆する。

導入遺伝子の発現を治療戦略に沿った局所に限定するために、組織特異プロモーターの利用が期待されている。352bp の断片である DHS の転写増強作用は、組織特異的プロモーターなどの効率の悪いプロモーターを用いた rAAV の作成にあたり有用である可能性がある。今回の実験結果より、実際に CKM プロモーターでの有効性は示された。逆に組織特異性が維持されているかどうかは今後の更なる研究を要する。しかも DHS はサイズが小さく、ゲノムが小さいアデノ随伴ウイルスベクターへの搭載に適している。またインスレーターは周囲の遺伝子のエンハンサー、サイレンサーの影響やヒストンの修飾による不活化クロマチンの形成を遮断すると考えられ、遺伝子治療において導入遺伝子の保護に応用できると期待される。rAAV は染色体に組み込まれないが、今回の実験では24週までの期間で遺伝子発現の増強を認めており、インスレーターはエピソームに存在する導入遺伝子の保護にも貢献をしている可能性がある。

今回、MAR を用いた実験では導入遺伝子発現の昂進は得られなかった。インスレーターと MAR では遺伝子発現の際のベクターの構造、ゲノムやヒストンの修飾が異なり、それによって遺伝子の発現効率に与える影響も異なるのかもしれない。MAR 搭載 rAAV ではゲノムの環状 DNA の割合が減少しており、染色体への組み込みが促進されているか、rAAV ゲノムの2本鎖形成が阻害されている可能性が示唆された。

現段階では DHS の導入遺伝子発現昂進作用の分子学的メカニズムは明らかでない。CMV/E(-)に挿入された DHS は CMV エンハンサーを代償できなかったことから、昂進作用は古典的エンハンサーとは異なる可能性もある。ゲノム比較に基づく機能領域の絞り込みにより DHS の内部にはヒト・チンパンジー・サル・イヌ・ラット・マウスで非常によく保存された領域が大きく分けて3カ所あった(I、II、III)。このI・IIと重なるようにZNF143結合配列があり、そしてI

と II の間にもう 1 カ所 ZNF143 結合配列があり、それぞれを Z1、Z2、Z3 とし、これらの配列にはマウスの ZNF143 ホモログである Zfp143 が結合することが証明された。変異置換実験にて 3 カ所全てに変異導入したもの (nt. 69-253mmm) および Z1・Z3 の 2 カ所に変異導入したもの (nt. 69-253mwm) では増強効果が失われており、発現増強には Zfp143 が Z1 あるいは Z3 のいずれかに結合することが必要だと考えられた。ZNF143 はアフリカツメガエルの転写活性因子のヒトホモログであり、転写開始に関わると考えられており、DHS による遺伝子発現の昂進にも関与している可能性が高い。

過去の研究により rAAV ゲノムの大部分は染色体外のコンカテマーとして維持されることが示されていることから、DHS および cHS4 は細胞 DNA に導入されずに転写を増強するといえる。われわれは引き続き DHS が他のプロモーターへ同様の効果を示すかを調べている。転写の昂進は、これまであまり注目されなかったインスレーター機能の一つであり、そのメカニズムについては今後の研究を要する。DHS の機能に関する詳細な研究を進めているが、研究成果はインスレーターの理解、および遺伝子治療などの臨床研究に貢献すると考えられる。