

[課程—2]

審査の結果の要旨

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。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。ヒト由来インスレーターの詳細な解析も併せて行い、以下の結果を得た。

- ① hEF1 α 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 1×10^9 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。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なかったことから、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。
- ② 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。
- ③ 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、実際に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。

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。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。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、学位の授与に値するものと考えられる。