

Title	Constructing Adenoviral Vectors by Using the Circular Form of the Adenoviral Genome Cloned in a Cosmid and Cre-loxP Recombination System
Author(s)	田代, 文
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43056
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	田 代 文
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 9 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 10 月 29 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Constructing Adenoviral Vectors by Using the Circular Form of the Adenoviral Genome Cloned in a Cosmid and the Cre- <i>loxP</i> Recombination System (Cre- <i>loxP</i> 組換えシステムを利用した簡便なアデノウイルスベクター作製法)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮 崎 純 一 (副査) 教 授 岡 野 栄 之 教 授 金 田 安 史

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

今日、多くの疾患において特定の遺伝子の関与が明らかとなり、遺伝子 DNA を細胞や生体に直接導入する遺伝子治療も行われ始めている。遺伝子導入の際、種々のウイルスベクターあるいは非ウイルスベクターが用いられるがそれぞれに長所短所があり、また改良を必要とする点も多い。その中でアデノウイルスベクターは高い導入効率を持ち非分裂細胞への導入も可能なベクターとして注目されている。しかしながら、アデノウイルスはゲノムサイズが36 kb と大きく、外来遺伝子を組込んだベクターの作製には複雑な手順を要する。これまでに報告されたベクター作製法には、組換え率の低さや DNA 構築の複雑さなどの問題があり、さらなる改良が模索されている。一方近年、*loxP* 配列に挟まれた部分が効率的に切り出される P1 ファージ由来の cre-*loxP* 組換えシステムがさまざまな研究に用いられるようになった。そこでこの cre-*loxP* 組換えシステムを用い、さらに長い DNA の操作に適しているコスミドを組み合わせ、簡便に効率よくアデノウイルスベクターを作製する方法を開発することを目的として本研究を行った。

[方法ならびに成績]

1. 発現カセットを組み込んだアデノウイルスベクターの構築

最初にコスミドベクターに *loxP* 配列をタンデムに2個つないだものを導入し、pLC コスミドを作製した。次にアデノウイルスゲノム（環状）の E1 領域を欠失させたものを pLC コスミドの *loxP* 間にライゲーションした後、*in vitro* パッケージングによりバクテリオファージラムダの頭部に収容し、pALC コスミドを作製した。発現カセットとして、CAG プロモーターの下流に、マウスインターロイキン5、EMC ウイルス由来 IRES、EGFPcDNA を結合した断片を作製した。pALC コスミドと IL-5-EGFP の発現カセットをライゲーションし、ラムダファージの頭部にパッケージングして pALC-IL-5 を作製した。pALC-IL-5 と cre レコンビナーゼを発現する pMC1-cre プラスミドを293細胞にコトランスフェクションした。cre レコンビナーゼが存在すると、トランスフェクション後8日以内に全ての293細胞においてウイルス増殖 (CPE) が認められ、効率よく *loxP* に挟まれたコスミド部分が切り出され、感染性のアデノウイルスベクターが産生されたことが示された。

2. ウイルス DNA の解析

CPE の観察された293細胞の培養液の遠心上清を別の293細胞に感染させ、全面に CPE が確認できた細胞について、凍結・融解を6回繰り返して得たウイルス懸濁液からウイルスベクター DNA を回収した。制限酵素による解析結果より pALC-IL-5 の中のコスミド本体の DNA は cre レコンビナーゼの発現によって除去され、その結果形成された発現カセットを含む38 kb のアデノウイルスゲノムがウイルス粒子に収容されたことが示された。

3. 感染細胞における EGFP、IL-5 の発現

ウイルスのブラークが発達するに従い、すべてのブラークの周辺に強い EGFP 蛍光が認められた。IL-5 と EGFP は IRES により bicistronic に転写されることが考えられるが、実際10個のウイルスクローンについて調べたところ、それらはすべて EGFP を発現し、培養上清中に高レベルの IL-5 も発現していることが示された。

[総括]

本研究により開発されたアデノウイルスベクターの構築法の特徴は、これまでに報告された方法と比較して、非常に簡便で効率がよいということである。大きなサイズの DNA を扱うことの困難さは、コスミドを用いることにより、またコスミドベクター部分の除去は、cre-*loxP* 組換えシステムとパッケージングサイズによる選択を利用することによって、それぞれ改善することができた。この方法を用いることにより、遺伝子治療やさまざまな生命科学実験への組換えアデノウイルスベクターの利用が促進されるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、部位特異的な組換えを起こす cre/*loxP* システムとコスミドベクターを組み合わせ、簡便に効率良くアデノウイルスベクターを構築する方法を開発したものである。

アデノウイルスベクターは高い導入効率を持つがゲノムサイズが大きく、これまでに報告されたベクター作製法には組換え率の低さや DNA 構築の複雑さなどの問題があり、まだ改良段階にある。

E1 領域を欠失させたアデノウイルスゲノムに *loxP* 配列ではさまれたコスミドと発現カセットを組み込んだコスミドベクターを作製し、cre 発現プラスミドと共に293細胞に cotransfection したところ、transgene を発現するウイルスベクター産生が確認された。また、得られたウイルス DNA では、cre/*loxP* システムによりコスミド部分が完全に除去されていた。この方法の特徴は、大きなサイズの DNA を容易に扱えるコスミドを用い、cre-*loxP* 組換えシステムとパッケージングサイズによる選択を利用して、目的とする組換えウイルスベクターを効果的に選択できることである。

本研究により開発された構築法を用いることにより、これまでの方法と比較して、より簡便に効率よく組換えアデノウイルスベクターを作製することが可能となった。今後アデノウイルスベクターの遺伝子治療やさまざまな生命科学実験への利用が促進されるものと考えられ、学位に値するものと考えられる。