The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Development of Vectors with Optimized Transgene Expression for Gene Therapy
Author(s)	徐, 志利
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44149
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　徐　　志　利（ジョ シリ）

博士の専攻分野の名称　博　士（薬　学）

学　位　記　番　号　第　17779　号

学位授与年月日　平成15年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

薬学研究科応用医療薬科学専攻

学　位　論　文　名　Development of Vectors with Optimized Transgene Expression for Gene Therapy
（最適な遺伝子発現能を有した遺伝子治療用ベクターの開発）

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　真弓　忠範

（副査）
教　授　前田　正知　　教　授　山元　　弘　　教　授　馬場　明道

論　文　内　容　の　要　旨

遺伝子治療の実用化を推進するためには、安全性が高く、機能面で優れた遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術の開発が極めて重要である。遺伝子治療用ベクターは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別されるが、一般にウイルスベクターは遺伝子導入効率に優れているが安全面での問題が懸念され、逆に非ウイルスベクターは安全性に優れているが、遺伝子導入効率が低いことが問題となっている。遺伝子発現調節にかかわる配列を含めた治療用遺伝子はウイルスベクターと非ウイルスベクターに共通に必要とされる要素であるが、その効率化・最適化に主眼を置いた系統的研究は非常に少ないのが現状である。遺伝子発現ユニットを最適化して目的とする遺伝子の発現レベルを最大化することで、ウイルスベクターの場合には投与量の減少に伴う副作用の軽減、安全面での向上が期待できるし、非ウイルスベクターの場合には遺伝子発現効率の向上に直結する。

そこで本研究では、ウイルスベクターの代表として最も遺伝子導入効率に優れているとされるアデノウイルス（Ad）ベクターを、非ウイルスベクターとしてはカチオン化ポリマー・プラスミド複合体あるいはプラスミド（裸 DNA）を用い、遺伝子発現に関与する各種シス因子の評価、および最適化を行った。また、将来の遺伝子治療においては、目的遺伝子の発現レベルを自由にコントロールできるベクターが有効性や安全性の向上に必要と考えられるので発現制御型ベクターの開発も行った。

まずは、プラスミドベクターにおいて、各種転写活性化因子の系統的機能評価を in vitro と in vivo（マウス肝臓と筋肉）の条件下で検討した。その結果、βアクチンプロモーター/CMV エンハンサー/βアクチンイントロン/SV40 P(A)/SV40 エンハンサーからなるベクターと、CMV プロモーター/CMV エンハンサー/イントロン A/SV40 P(A)/SV40 エンハンサーからなるベクターが、最も高い遺伝子発現効率を示した。

次に、様々な転写活性化因子を有した Ad ベクターの活性を検討したところ、CMV プロモーター/CMV エンハンサーの下流にイントロン A の配列を付加することにより遺伝子発現は 10～50 倍上昇し、その活性はβアクチンプロモーター/CMV エンハンサー/βアクチンイントロンからなるベクターよりやや高く、最大の発現効率を示した。

更なる遺伝子発現効率の向上を目指して、転写後修飾の因子として mRNA の P(A)化の修飾、mRNA の核外輸送や翻訳の促進作用を有している Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element（WPRE）を付与

したAdベクターを作製し、機能評価を行った。WPREを付与したベクターでは、WPREがないベクターに比べ数倍の遺伝子発現を示し、結果として最高の活性を示したCMVプロモーター/エンハンサー/イントロンA/WPREを有したAdベクターは、最も一般的なCMVプロモーター/エンハンサーだけを有したAdベクターに比べ、in vitroで10～120倍、in vivo肝臓では700倍以上の活性を示した。最も強力に外来遺伝子を発現出来る各種シス因子の組み合わせは、有効性の向上が期待できるばかりでなく、投与量の減少によるAdベクターの副作用軽減（免疫反応等）にもつながることから、本結果は遺伝子治療応用研究、及び遺伝子機能解析を目的とした基礎研究の分野において重要な知見を提供するものと考えられた。

一方、理想的な遺伝子発現制御系を搭載したベクターとしては、basal活性が低く、高い最大活性を示すこと、in vivoにも適用できることなどの用件が必要と考えられる。また、目的にもよるが、発現をpositiveに制御できるシステムの方が、negativeに制御できるシステムよりも遺伝子治療や遺伝子機能解析などの多くの目的には適していると考えられる。そこで、様々な発現制御系を搭載したAdベクターの系統的評価、及び最も汎用されているテトラサイクリンオペロンを利用したTet-onシステムを搭載したAdベクターの改良を行った。

まず、Tet-onシステム、T-RExシステム、Ecdydsoneシステム、Mifepristoneシステム（GeneSwitch又はAntiprogestin）、そしてRapamycinシステムを搭載したAdベクターの機能を、inducerに対する感受性、非誘導時の遺伝子発現レベル（basal活性値）、誘導時の遺伝子発現レベルの点で評価した。その結果、いずれのパラメーターからもRapamycinシステムが最も優れていることが判明した。他の発現系に関してもそれぞれに特徴を有しており、目的により各発現系を使い分けることで、効率良く遺伝子発現レベルを調節することが可能と考えられた。

一方、Tet-Onシステムの改良として、テトラサイクリン制御性のサイレンサーであるtTSを付与し、rtTA（Tet-onシステムの転写活性化因子）の発現レベルを上昇させるためにイントロンAの配列を付与し、かつ単一のAdベクターで3者（目的遺伝子、rtTA遺伝子、tTS遺伝子）の遺伝子をAdゲノムの異なった領域から発現させたところ、basal活性の低下および最大活性の上昇が認められ、遺伝子発現誘導能の飛躍的な改善が認められた。従って、トリプル遺伝子発現系を搭載したAdベクターとrtTA、tTS遺伝子を用いることで、効率良く外来遺伝子の発現をpositiveに制御できるAdベクターの開発に成功した。

以上、遺伝子発現に関わる各種転写活性化因子等を最適化することで、優れた遺伝子発現能を示すベクターの開発に成功し、その有用性を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

今後より一層遺伝子治療の実用化を推進するためには、機能面で優れた遺伝子治療用ベクターの開発および関連する遺伝子導入・発現技術の開発が極めて重要である。しかしながら、遺伝子発現の効率化・最適化に主眼を置いた系統的研究は非常に少ないのが現状である。

そこで著者は、治療用遺伝子の発現に影響を与えるコンポーネントであるプロモーター、エンハンサー、イントロン、ポリアデニレーションシグナル（P(A)配列）等の組み合わせを最適化することで遺伝子発現効率の最適化を行った。ウイルスベクターの代表として最も遺伝子導入効率に優れているとされるアデノウイルスベクターを、非ウイルスベクターとしてはカチオン化ポリマー・プラスミド複合体あるいはプラスミド（裸DNA）を用い、各種の遺伝子発現に関与するシス因子の評価・最適化をin vitro、in vivo（マウス）で行った。その結果、

1）CMVプロモーター/エンハンサー/イントロンA/WPREを有したAdベクターは、最も一般的なCMVプロモーター/エンハンサーだけを有したAdベクターに比べ、in vitroで10～120倍、in vivo肝臓では700倍以上の活性を示した。

また、将来の遺伝子治療においては、目的遺伝子の発現レベルを自由にコントロールできるベクターが有効性や安全性の向上のために必要であると考えられる。そこで、発現制御系の系統的機能評価も合わせて検討した結果、

2）Tet-onシステムの改良型として、テトラサイクリン制御性のサイレンサーであるtTSを付与し、rtTA（Tet-onシステムの転写活性化因子）の発現レベルを上昇させるためにイントロンAの配列を付与し、かつ単一のAdベクタ

ーで3者（目的遺伝子、rtTA 遺伝子、tTS 遺伝子）の遺伝子を Ad ゲノムの異なった領域から発現させたところ、basal 活性の低下および最大活性の上昇が認められ、遺伝子発現誘導能の飛躍的な改善が認められた。

以上、遺伝子発現に関わる各種転写活性化因子等を最適化することで、優れた遺伝子発現能を示すベクターの開発に成功し、その有用性を明らかにした点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。