



Title	Development of High-Throughput Functional Screening of Therapeutic Genes, Using a Hemagglutinating Virus of Japan Envelope Vector
Author(s)	西川, 智之
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47453
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	にし かわ とも ゆき 西 川 智 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20580 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 4 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	Development of High-Throughput Functional Screening of Therapeutic Genes, Using a Hemagglutinating Virus of Japan Envelope Vector (HVJ-E ベクターを用いた治療用遺伝子の機能的ハイスループットスクリーニングの開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金田 安史 (副査) 教 授 野島 博 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

ポストゲノムの創薬開発には2万数千種類と推定されるヒト遺伝子の機能解析を迅速に行う必要がある。本研究では HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) エンベロープベクターを用いた機能スクリーニングの開発とともに血管新生を促進または抑制する因子の探索を行い、新規血管新生ペプチドを同定した。

〔 方法ならびに成績 〕

1. HVJ-E ベクターを用いた治療用遺伝子の機能的ハイスループットスクリーニングの開発

血管内皮細胞増殖促進あるいは抑制因子を探索するために、HVJ-E ベクターによるヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) に対する最適な遺伝子導入効率で、ヒト心臓 cDNA ライブラリー (約 1×10^7 クローン) を 96 ウェルプレートに播種された HAEC に導入した。7 日後に MTS[3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]アッセイにより細胞増殖率の最高値または最低値を示すウェルより抽出された pDNA を大腸菌に導入して、遺伝子のクローニングを行った。我々のハイスループットスクリーニング法は従来のレトロウイルスなどを用いて行われている方法と比較して、候補遺伝子同定のときの PCR を必要とせず大腸菌に形質転換するだけの簡単な作業で済むため、非常に簡便かつ迅速である特徴を有する。単離された各々のクローンは再度 HAEC に導入され MTS アッセイ、さらに c-fos プロモーターアッセイによって候補遺伝子の絞込みを行った。最終的に血管新生を促進する遺伝子としてクローン p3743 が、抑制する遺伝子として pCMV9 と pCMV15 が同定された。

pCMV9 は CHMP1B(charged multivesicular body protein /chromatin-modifying protein) または CHMP1.5 であり、細胞内輸送系に関与する CHMP family に属するものであった。CHMP1B は血管内皮細胞だけでなく、A431 (類表皮癌細胞) においても有意に増殖活性を抑制した。一方、pCMV15 は細胞骨格を構成する分子、ミオスピリンの C 末端の一部 (11923-12282bp) であった。

2. 合成ペプチド (AG30) の血管新生促進機能の解析

血管新生促進遺伝子として同定された p3743 (309bp) の活性部位の探索からこの遺伝子の活性中心であると考え

られる部位 (93bp) が同定され、この部位の塩基配列をもとに 30 アミノ酸からなるペプチド (AG30) が合成された。培養細胞での検討において、AG30 は濃度依存的に (10 ng/ml-10 μ g/ml) HAEC の増殖能、遊走能、管腔形成能を増加させた。また、血管平滑筋に対しての増殖活性も有していた。AG30 は cationic あるいは hydrophobic なアミノ酸に富み、構造予測では抗菌ペプチドに特徴的な α Helix 構造をとることが予測された。実際に、大腸菌に対する抗菌作用、CD スペクトル解析で α Helix 構造も確認された。FITC ラベルした AG30 は添加後 24 時間以降で徐々に核への移行がみられた。AG30 で HAEC を刺激すると 72 時間後に血管新生に関与する報告のある Angiopoietin2、Interleukin8、Jagged1、VEGF、Insulin-like growth factor-1 などの mRNA レベルの有意な増加が確認され、いくつかの因子を活性化することで血管新生機能を有することが予想される。

In vivo での解析として、マトリゲルに AG30 を添加し C57BL/6 マウスの背部皮下に注入した結果、コントロールペプチドに比し AG30 群では内皮細胞と平滑筋細胞を伴う新生血管の増加が確認された。FITC-Lectin による内皮細胞遊走の定量化では FGF2 群とほぼ同程度の活性であった。

[総 括]

今回開発された HVJ-E ベクターを用いた治療用遺伝子の機能的ハイスループットスクリーニング法は短期間で効率よく候補遺伝子を探索可能であることが証明され、血管新生促進及び抑制遺伝子が同定された。血管新生促進遺伝子配列により合成されたペプチド AG30 は *in vitro*、*in vivo* 両方において強い血管新生作用が示された。このスクリーニングシステムを用いてさらなる治療用遺伝子の同定が期待され、AG30 においては難治性虚血疾患等の治療に応用される事が期待される。

論文審査の結果の要旨

近年の遺伝子治療に関するベクター開発や遺伝子導入技術は日々進歩しているが、遺伝子治療の中心となる治療用遺伝子は現在まで限られた数しか報告が無い。本研究は、遺伝子治療に使用される治療用遺伝子の単離を目的とし、膨大な遺伝子群よりその機能をもとに遺伝子の探索を行えるスクリーニングシステムの開発を行った。そのスクリーニングシステムに HVJ-E ベクターを用いる事により、より簡便に膨大な数の遺伝子を様々な種類の細胞株に導入が可能となった。さらに大腸菌への形質転換を利用する事によって、候補となり得る遺伝子の選別・単離がより確実かつ迅速に行えるようになった。このスクリーニングシステムを用いて血管新生遺伝子の探索が行われ、同定されたクローンの遺伝子配列をもとに血管新生因子ペプチド、AG30、が合成された。種々の解析の結果、AG30 には血管新生促進作用のみならず抗菌作用も併せ持つ事が確認された。In vitro の解析において AG30 は VEGF よりも強い血管新生作用があり、種々の血管新生関連遺伝子を惹起する事が確認され、in vivo での解析においては FGF-2 と同等の血管新生作用や、徐放化によって虚血下肢モデルマウスの著明な血流改善が見られた。将来的には AG30 の虚血性疾患や潰瘍への臨床応用が期待される。本研究により開発されたスクリーニングシステムを利用する事によりさらなる新規治療用遺伝子の単離が期待されるとともに、血管新生ペプチド AG30 の合成と詳細な解析は学位の授与に値すると思われる。