

氏 名（本籍）	うち 内	やま 山	とおる 徹
学位の種類	博 士（医 学）		
学位記番号	医 博 第 2 3 7 2 号		
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻		
学位論文題目	X 連鎖重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療 への自殺遺伝子の応用		

（主 査）

論文審査委員	教授 土 屋	滋	教授 貫 和 敏 博
	教授 阿 部 俊 明		

論文内容要旨

研究の目的

X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)は細胞性免疫と液性免疫の両方に欠陥を有する疾患であり、その責任遺伝子はサイトカイン受容体の共通サブユニットである共通 γ 鎖(γ c鎖)である。根治的治療として骨髄移植が挙げられるが、HLA一致同胞が存在しない場合には生着不全やGVHDの危険性が高いことから、近年造血幹細胞を利用した遺伝子治療が行われるようになった。これまでにフランスとイギリスにおいてレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が行われてきたが、その多くの症例で免疫系の再構築が得られ、その有用性が証明された。しかしフランスで行われた11例中3例で、遺伝子治療の3年後にレトロウイルスベクターの遺伝子挿入変異による発癌(リンパ球性白血病)が報告され、 γ c鎖の導入部位が原癌遺伝子であるLMO2の転写開始部位であることが判明した。今回われわれは、白血病が発症した際に癌化した細胞を殺すことができるよう、 γ c鎖遺伝子と自殺遺伝子であるHerpes simplex virus thymidine kinase(HSVtk)を同時に含むレトロウイルスベクターを開発した。X-SCID患者から樹立したB細胞株にこのベクターを感染させ、導入した γ c鎖の発現を確認した後、ganciclovir(GCV)による処理をおこなうことで γ c鎖導入細胞が消失するかどうかを解析した。

方法

マウス幹細胞ウイルス(Murine stem cell virus, MSCV)のLTRを持つレトロウイルスベクター、pD Δ NsamIRESEGFPを用いて、ヒト γ c鎖およびHSVtk遺伝子を持つベクターpD- γ c/TKを作製し、X-SCID患者(Patient 1, Patient 2)から樹立したB細胞株に遺伝子導入を行った。導入した γ c鎖の発現はモノクローナル抗体であるTUGh4を用いフローサイトメーターにて確認した。またその機能については γ c鎖に直接会合するtyrosine kinaseであるJak 3分子のリン酸化により確認した。

次に同時に組み込んだ自殺遺伝子HSVtkの効果を検討するため、遺伝子導入したB細胞株をganciclovir(GCV)を含む倍地にて14日間培養した。GCVの濃度は0.1, 1.0, 10, 25, 50, 100 μ Mとし、それぞれの濃度において γ c鎖発現細胞が消失するかどうかを経時的に解析した。同時に、遺伝子が導入されていない細胞を同様の条件で培養することで、GCVの細胞毒性(細胞の増殖と生存度への影響)についても検討した。

結果

pD- γ c/TKにより遺伝子導入を行った結果、患者細胞表面には γ c鎖が発現し(patient 1:13%, patient 2:8%)、この発現は5ヶ月以上安定して認められた。IL-2刺激後には正常人B細胞

と同様に Jak3 分子のリン酸化が認められ、導入した γc 鎖によるサイトカインシグナルの伝達を確認された。

遺伝子導入細胞を GCV により処理したところ、4 日後より γc 鎖発現細胞の減少が認められ、14 日目には $10 \mu\text{M}$ 以上の濃度ですべての γc 鎖発現細胞が消失した。その後も GCV 非存在下で培養を継続したが、 γc 鎖発現細胞が再出現することはなかった。GCV 濃度 $25 \mu\text{M}$ までは細胞増殖、生存度ともコントロール (GCV なし) との差はなく、細胞毒性は認められなかった。

考 察

以上の結果より、in vitro における実験では、他の細胞へ影響を与えない濃度 (10 および $25 \mu\text{M}$) の GCV で γc 鎖発現細胞のみ選択的に殺すことが可能であった。一般に GCV の臨床使用時 (5 mg/kg) の血中濃度は $3 \sim 40 \mu\text{M}$ であり、今回の有効濃度は最高血中濃度以下ではあるものの最低血中濃度よりは高い値である。ただし GCV の有効濃度は細胞の種類によって異なり、これまでの報告ではリンパ球に HSVtk を導入した場合には $1 \mu\text{M}$ で消失していること、我々が今回使用した細胞が EBV-transformed B lymphoblastoid cell line であることなどから、実際はより低濃度でも有効であると考えられる。現在、in vivo におけるこのレトロウイルスベクターの有用性について、 γc ノックアウトマウスを用いて研究中である。

審査結果の要旨

X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)は細胞性免疫と液性免疫の両方に欠陥を有する疾患であり、その責任遺伝子はサイトカイン受容体の共通サブユニットである共通 γ 鎖(γ c鎖)である。根治的治療として骨髄移植が挙げられるが、HLA一致同胞が存在しない場合には生着不全やGVHDの危険性が高いことから、近年造血幹細胞を利用した遺伝子治療が行われるようになった。これまでにフランスとイギリスにおいてレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が行われてきたが、その多くの症例で免疫系の再構築が得られ、その有用性が証明された。しかしフランスで行われた11例中3例で、遺伝子治療の3年後にレトロウイルスベクターの遺伝子挿入変異による発癌(リンパ球性白血病)が報告され、 γ c鎖の導入部位が原癌遺伝子であるLMO2の転写開始部位であることが判明した。今回申請者は、白血病が発症した際に癌化した細胞を殺すことができるよう、 γ c鎖遺伝子と自殺遺伝子であるHerpes simplex virus thymidine kinase(HSVtk)を同時に含むレトロウイルスベクターを開発し、発症した白血病細胞を自殺遺伝子により治療可能かどうかの検討を行った。

マウス幹細胞ウイルス(Murine stem cell virus, MSCV)のLTRを持つレトロウイルスベクター、pD Δ NsamIRESEGFPを用いて、ヒト γ c鎖およびHSVtk遺伝子を持つベクターpD- γ c/TKを作製し、X-SCID患者(Patient 1, Patient 2)から樹立したB細胞株に遺伝子導入を行った。

同時に組み込んだ自殺遺伝子HSVtkの効果を検討するため、遺伝子導入したB細胞をganciclovir(GCV)を含む培地にて14日間培養した。GCVの濃度は0.1, 1.0, 10, 25, 50, 100 μ Mとし、それぞれの濃度において γ c鎖発現細胞が消失するかどうかを経時的に解析した。pD- γ c/TKにより遺伝子導入を行った結果、患者細胞表面には γ c鎖が発現し(patient 1:13%, patient 2:8%)、この発現は5ヶ月以上安定して認められた。IL-2刺激後には正常人B細胞と同様にJak3分子のリン酸化が認められ、導入した γ c鎖によるサイトカインシグナルの伝達が確認された。

遺伝子導入細胞をGCVにより処理したところ、4日後より γ c鎖発現細胞の減少が認められ、14日目には10 μ M以上の濃度ですべての γ c鎖発現細胞が消失した。その後もGCV非存在下で培養を継続したが、 γ c鎖発現細胞が再出現することはなかった。

以上の結果より、in vitroにおける実験では、他の細胞へ影響を与えない濃度(10および25 μ M)のGCVで γ c鎖発現細胞のみ選択的に殺すことが可能であった。

TK遺伝子導入細胞にGCVを投与し白血病細胞の治療を行ったという報告は少ない。挿入変異による白血病発症に対応可能な方法の1つであり、今後の安全な遺伝子治療の実現に向けた有益な実験結果が得られている。将来の大きな発展を期待させる貴重な実験結果である。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。