

審査の結果の要旨

氏名 前川 文

本研究は、第一世代アデノウイルスベクター (FG AdV) から発現しているウイルス関連 RNA (VA RNA) のコード領域を破壊し、FLP で除去可能な VA RNA 遺伝子に置換した pre-vector を通常のパッケージング細胞である 293 細胞で作製した後、FLP 高発現 293 細胞に導入することで、VA 欠失 AdV を高力価で簡便に作製する「新規 VA 欠失 AdV 作製法」を開発したものであり、下記の結果を得ている。

1. 本法では、通常通り 293 細胞を用いて高力価に作製した pre-vector から、VA RNA コード領域を FLP により環状に切り出すことで VA 欠失 AdV を作製しているため、FLP 高発現 293 細胞で十分に VA RNA を欠失できているかについて 2 種類の方法で検討を行った。まず一つ目として、ベクターの増殖しない HuH-7 細胞に得られたベクターを導入し、ベクターゲノムの DNA 構造を Southern blot で、VA RNA 発現の残存の有無を northern blot で検討したところ、VA RNA は検出感度以下であった。さらに VA RNA の定量を qPCR により行ったところ、pre-vector の混入は 3% 以下であった。2 つ目として、ベクターが複製増幅する条件下において更に高感度な VA RNA の検出を Southern blot 及び northern blot により行ったところ、非常に微量な VA RNA しか検出されなかった。これらの結果から、FLP 高発現 293 細胞により VA RNA を高効率に欠失できており、本法により作製したベクターが VA 欠失 AdV であることが示された。
2. VA 欠失 AdV のベクター力価は、pre-vector と比べ約 1/10 (8-14%) に留まっていたが、これまでに他の方法で作製されている VA 欠失 AdV の約 100 倍の力価を示しており、通常の実験に十分に応用可能な力価であると考えられた。
3. VA RNA 発現プラスミドにより目的遺伝子の発現効率が上昇するという報告があったため、pre-vector と VA 欠失 AdV の目的遺伝子発現効率を比較したところ、VA RNA の有無に関わらず同程度であった。従ってベクターゲノム上の VA RNA は目的遺伝子の発現には影響せず、VA 欠失 AdV の有用性には問題ないことが示された。

以上、本論文は FG AdV で唯一残存していたウイルス遺伝子発現産物である VA RNA 遺伝子を欠失した VA 欠失 AdV を高力価で簡便に作製する新規作製法を確立し報告した。目的遺伝子導入ツールまたは機能解析などで応用されるベクターとして、ウイルス由来発現産物が無いことは重要な事であり、本研究により作製が可能となった VA 欠失 AdV の意義は高く、学位の授与に値するものと考えられる。