

## 論文内容の要旨

氏名	野田正志
Development of alternative gene transfer techniques for ex vivo and in vivo gene therapy in a canine model	
(和訳)	
犬モデルにおける ex vivo および in vivo 遺伝子治療のための代替遺伝子導入技術の開発	

### 論文内容の要旨

血友病は、第 VIII 因子(FVIII)や第 IX 因子(FIX)の凝固活性の欠損によって起こる遺伝性の出血性疾患です。血友病の治療法として、近年、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が注目されています。我々はこれまでに、血友病の遺伝子治療をさらに発展させるために、2 種類の新規遺伝子導入技術を開発し、血友病 A マウスを用いてその有効性を検証してきました。すなわち、自己細胞を用いた ex vivo 遺伝子治療と piggyBac ベクターを用いた非ウイルス性 in vivo 遺伝子治療である。本研究では、これらの 2 種類の遺伝子導入技術を臨床に応用するために、犬モデルを用いて 2 つの技術の有効性と安全性を調べた。特に、イヌへの遺伝子導入の技術的手順の検証に重点を置いた。

正常なビーグル犬に、ex vivo および in vivo の遺伝子導入技術を用いて GFP (Green Fluorescence Protein) 遺伝子を導入した。ex vivo 遺伝子導入では、イヌの末梢血由来の血管内皮前駆細胞 (BOECs) にレンチウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入し、増殖させて細胞シートとして作製し、イヌの大網に移植した。In vivo での遺伝子導入は、イヌに非ウイルス性の piggyBac ベクターを用いて GFP 遺伝子を導入し、肝臓を標的としたハイドロダイナミックジーンデリバリー (HGD) システムによる遺伝子導入を行った。

いずれの遺伝子導入システムにおいても、遺伝子導入時に大きな有害事象は認められなかった。ex vivo 遺伝子導入に関しては、移植 4 週間後に行った大網における生検の組織学的所見から、移植した GFP 陽性 BOEC が脂肪下組織層に管腔構造を形成していることが明らかになり、炎症所見もなく、検出された GFP シグナルは 6 カ月間維持された。これらの結果から、移植された BOEC は、導入された遺伝子の発現を低下させることなく、レシピエントの大網内で効率的に生着し、成熟した内皮細胞に分化し、新しい血管構造を形成することが示唆された。In vivo での遺伝子導入については、肝生検サンプルを分析した結果、遺伝子導入後 1 週間で注入した肝葉では約 90% 以上の肝細胞が GFP シグナルに陽性であったが、その後、シグナルは徐々に減少していった。

本研究では、2 種類の新規遺伝子導入技術を用いて、犬モデルにおける ex vivo および in vivo 遺伝子治療の有効性と安全性を実証した。今後、血友病患者への臨床応用に向けては、血友病の犬モデルと FVIII (または FIX) 遺伝子を用いて、これらの技術による治療効果を実際に評価する必要がある。