

平成20年 3月

# 山田秀俊 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三  
副主査 難 波 栄 二  
同 押 村 光 雄

## 主論文

Introduction of a CD40L genomic fragment via a human artificial chromosome vector permits cell type-specific gene expression and induces immunoglobulin secretion

(ヒト人工染色体を用いたゲノムフラグメント導入によるCD40L遺伝子の細胞特異的発現と抗体分泌誘導)

(著者：山田秀俊、李艶澤、西川光郎、押村光雄、井上敏昭)

平成20年 Journal of Human Genetics 掲載予定

# 学位論文要旨

**Introduction of a CD40L genomic fragment via a human artificial chromosome vector permits cell type-specific gene expression and induces immunoglobulin secretion  
(ヒト人工染色体を用いたゲノムフラグメント導入によるCD40L遺伝子の細胞特異的発現と抗体分泌誘導)**

CD40Lの変異はX連鎖型高IgM免疫不全症を引き起こす。CD40Lは主に活性化CD4陽性T細胞に発現しておりCD40を介してB細胞やマクロファージを活性化する働きがある。そのためCD40Lに変異があるとB細胞のクラススイッチなどが正常に機能せず免疫不全に陥る。ウィルスベクターを用いたCD40Lに対する遺伝子治療実験はBrawnら(1998年)によっておこなわれ、モデルマウスにおいて遺伝子補充によって免疫不全が改善することが報告されたが、ウィルスベクターでは導入遺伝子の発現調節ができないためCD40Lの異所性に発現が引き起こされ、結果マウスはlymphomaになった。このことから、CD40Lの変異によって引き起こされる免疫不全には遺伝子補充による治療が有効であると考えられるが、導入遺伝子は厳密に制御される必要があるためにウィルスベクター等の既存ベクターではアプローチしにくい疾患であると考えられる。本研究では、HACベクターを用いて制御領域を含むゲノム配列を導入することで細胞特異的な発現を誘導することができるか、また発現蛋白は機能的であるかを検討した。

## 方法

マウスCD40Lゲノム領域を保持するBACクローン (RP23-153G22) より発現制御領域を含むゲノムフラグメント (21, 342bp) をloxP-neo再構築サイトを保持するPACベクターにサブクローニングし、HACに搭載するためのmCD40L-PACベクターを構築した。その後、HACを保持するCHO細胞にCD40L-PAC、及びCre発現ベクターのpBS185ベクターをリポフェクション法により導入し、G418セレクションによってNeoの再構築が起こったCD40Lゲノムを搭載したHACを保持するCHO細胞株を得た。

## 結果と考察

mCD40L-HACの発現を解析するため、human CD4-positive active T cell lineであるJurkat細胞、human myeloid cell lineであるU937細胞にmCD40L-HACをCHO細胞より微小核融合法を用いて導入した。G418選択で得られたそれぞれ20クローンについてゲノムPCR、

FISH解析を行いmCD40L-HACの保持率がJurkatクローンでは94%以上であること、U937クローンは96%以上であることを確認した。微小核融合法による導入効率は $\sim 2.4 \times 10^{-5}$ であった。これらクローンを用いてフローサイトメトリー解析を行った結果、Jurkatクローンでは全細胞中平均8% (range 5-20%) の細胞がmCD40Lを発現していた。本実験で用いたJurkat細胞は約10%の細胞がヒトCD40Lを発現しており、mCD40Lの発現の割合はこれと近い値であった。また、ヒトとマウスのCD40Lを両方発現している細胞は平均1%程度であったことから、ヒトとマウスの発現は確率的発現であることが示唆された。U937クローンではmCD40Lの発現は観察されなかった。また、これらのCD40L発現についてはRT-PCRによっても確認された。以上のことからmCD40L-HACを用いることで細胞依存的なCD40Lの発現を誘導されることが示唆された。また、Jurkat細胞で発現しているmCD40Lが機能的であるかを検討するため、mCD40L-HAC発現Jurkat細胞とCD40L欠損マウス由来B細胞を7日間共培養することでIgG産生を促すかを培養液を用いたELISA解析によって検討した。ネガティブコントロールとしてJurkat細胞をポジティブコントロールとしてPMA、ionomycinによって刺激したnormal mouse T細胞 (30%がCD40L陽性) を用いた。Jurkat細胞との共培養では培養液中にIgGが検出されなかったのに対し、mCD40L-HAC保持Jurkat細胞との共培養をした培養液中には6.8-9.8  $\mu\text{g/ml}$ のIgGが検出された。またこの値は刺激したnormal mouse T cellと共培養した培養液中から検出された値 (9.9-12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) と近い値であった。以上のことからHAC上のゲノムフラグメントより発現したmCD40LはB細胞のIgG産生を促すことが示された。

## 結 論

今回の結果から、発現制御領域を含むCD40Lゲノムフラグメントを搭載したHACを用いることで機能的なCD40Lを細胞特異的に発現誘導することが可能であることが示唆された。このことは、ウィルスベクター等の既存のベクター系を用いた遺伝子治療では実現が困難であった導入遺伝子の生理的発現をゲノム-HACを用いた遺伝子導入法が実現できる可能性を持っていることを示す結果であり、HAC vectorとBAC engineeringを組み合わせた新規遺伝子治療法開発に向けたイニシャルステップとなる研究である。