

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは安全性が高く、長期間にわたり導入遺伝子の発現が得られることから、遺伝子治療領域における有力なベクターである。今回、アルギニンバゾプレシン (AVP) を先天的に欠損した遺伝性中枢性尿崩症ラット (尿崩症ラット) を用いて、ホルモン欠損症に対する遺伝子治療の有効性について検討した。

CMV プロモーターによりドライブされるラット正常 AVP 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを作製し、尿崩症ラットの両側視床下部視索上核 (SON) にラット定位脳手術装置を用いて合計 6×10^{10} genome copies 投与した (治療ラット)。また対照には、 β -galactosidase 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを用いた (対照ラット)。治療ラットにおいてベクター投与後 70 週を越えて尿量の減少と尿浸透圧の増加がみられ、尿崩症が改善した。また対照ラットに比べ有意な体重の増加がみられた。

次に導入遺伝子による AVP 産生を確認するため、ベクター投与 10 週後に治療ラットの脳を摘出し AVP 免疫染色を施行したところ、SON に AVP 陽性細胞を多数みとめた。また下垂体中の AVP 含量を RIA にて測定したところ、治療ラットにおいて下垂体の AVP 含量が増加しており、導入遺伝子により視床下部で産生された AVP が下垂体に輸送されていることが示された。

導入遺伝子により産生された AVP の分泌動態を評価するため水制限、高張食塩水負荷、急性水負荷試験を行った。24 時間の水制限または高張食塩水投与により、血中 AVP は基礎値に比べ有意に増加した。一方急性水負荷により尿量が増加し尿浸透圧は低下し、水利尿がみられた。

以上より AAV ベクターを用いた中枢神経系に対する遺伝子導入では、長期間にわたる導入遺伝子の発現が示された。さらに治療ラットにおいて AVP が SON, 下垂体および血液中で検出されたことから、導入遺伝子により産生された AVP は通常の分泌経路をとるものと考えられた。また水制限や高張食塩水負荷により AVP 分泌が刺激され、水負荷により水利尿がみられたことから、導入遺伝子により産生され

た AVP の分泌を生理的刺激により制御することが可能であると推察された。

この実験モデルを用いることにより、ホルモン欠損症に対する遺伝子治療の検討や新たな AVP の生理作用の同定が可能になると期待される。

造血幹細胞分画を用いた新たな DNA チップ実験法による骨髄異形成症候群の病態解析

地域医療学系 血液・免疫疾患学 4 学年

上田 真寿

MDS は比較的発症率の高い疾患であるにもかかわらず適切な診断法・治療法が存在せず、我々は本目的のために MDS 各病期の患者骨髄より造血幹細胞相当分画を純化し、DNA チップ解析を用いて病態解明を行った。

AC133 は造血幹細胞に最も特異的なマーカーの一つである。学内外の共同研究施設の協力の基に様々な血液疾患患者フレッシュ検体より AC133 陽性分画のみを純化・保存する「Blast Bank」を設置した。

Mergen 社の HO3DNA チップとカスタムメイド DNA チップを用いて、Blast Bank 中の MDS サンプル RA11 例、RAEB 5 例、MDS-associated leukemia 14 例、また健常人 2 例より抽出した mRNA にて DNA チップ実験を行った。実験の結果、その結果予後不良群で高発現を呈する遺伝子群が 11、予後良好群で高発現をする遺伝子群が 6 同定された。予後良好群で高発現を示す遺伝子群のひとつとして PIASy 遺伝子が同定された。症例数を増加して行った定量的 real-time PCR 法によっても本遺伝子の発現変化が確認された。

次にインターロイキン 3 (IL-3) によって増殖し、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 添加によって成熟好中球に分化するマウス骨髄系細胞株 32D を用い、PIASy をテトラサイクリンと β エストロジェンの dual-regulation による遺伝子発現誘導システムを用いて発現させる系を構築した。PIASy を発現させた時の影響を観察した。具体的には、Wright-Giemsa 染色を用いた形態学的観察、フローサイトメーターによるアポトーシスの検討、を行い、PIASy 蛋白の発

現の有無に関してはウェスタンブロット法を用いた。発現誘導をかけてない時 (テトラサイクリン存在下) は mock 感染細胞, PIASy 導入細胞ともに同じような細胞増殖を示す。しかし, 発現誘導を行った細胞では PIASy を導入した細胞に明らかに細胞増殖抑制が認められる。また, 細胞の viability についてもトリパンブルー染色法にて確認したところ, PIASy 導入細胞において, viability の著明な低下を認めた。

分化傾向を確認するために G-CSF の存在下で継代培養を行い, 形態学的にも, フローサイトメーターを用いても, PIASy 導入細胞が, PIASy の発現誘導をかけることにより, アポトーシスを呈することを確認した。

細胞の特性を一致させることにより偽陽性結果をより排除した形での DNA チップ解析が可能であると思われる。また今回同定された PIASy の発現の変化は, MDS の病期進行の分子マーカーというだけでなく, メカニズムに関与している可能性も示唆された。今後は, PIASy に対する結合蛋白を同定し, 同分子の機能の解明につとめたい。

Molecular Genetics of Autism: Study of Methyl-CpG binding protein family genes in autistic patients

地域医療学系 生殖・発達医学 4 年
李 虹

自閉症は, 言語発達やコミュニケーション障害を主症状とする発達障害で, 遺伝子異常に起因するが, 多因子遺伝も想定され, 病因遺伝子は不明である。遺伝子不活化関連遺伝子 *MeCP2* が, 自閉症状を持つ Rett 症候群の病因遺伝子であることから, *MeCP2* と, その類縁で methyl-CpG binding domain を持つ *MBD1*, *MBD2*, *MBD3* 遺伝子が自閉症の候補遺伝子と考えられ解析した。また, 自閉症連鎖領域 7q31 にあり, 自閉症関連疾患の読字障害の病因遺伝子 *FOXP2* も解析した。

方法: 両親より informed consent の得られた自閉症患者 53 名より採血し, DNA 抽出。各遺伝子の各エクソンを PCR, DHPLC 法にて変異スクリーニングし, シークエンスで確認した。

結果: *MECP2* では, 正常多型のみ検出された。

MBD1 で, R269C のアミノ酸変異を来す C805T 変異が自閉症と軽度の知的障害を持つ男児 1 名と, 軽度のコミュニケーション障害を持つその父および自閉症状のない妹に検出され, 対照群 151 名で検出されなかった。他に正常多型が 6 か所あった。

MBD2 で, エクソン 1 の GGGGCC 2 回反復配列 (GR リピート) が 3 回反復する allele を患者 1 名, 対照群 2 名が, GGC (Gly) の 4 回反復配列が 5 回の allele を患者, 対照とも 4 名持っていた。

MBD3 で正常多型が 2 か所検出された。

FOXP2 で, CAA (Glu) の 5 回反復が 4 回の allele が自閉症 4 名, 対照 2 名に検出され, 他に正常多型が 5 か所検出された。

考察: *MBD1* の R269C は対照群で検出されず, cysteine rich region の近傍にあり, 新たに Cys に変異し蛋白構造変化が生じた可能性もあり, 自閉性障害との関連が推定された。*MBD2*, *FOXP2* では, 反復配列数の多型があったが, 患者, 対象群で頻度に差はなかった。*MeCP2*, *MBD3* を含め, 有意な変異は検出されず, 自閉性障害との関連性は低いと考えられた。自閉性障害と各遺伝子の関連確定に, さらに症例数を増やし解析するとともに, 機能解析も必要である。