

P抗原との蛍光二重染色、in situ hybridization法を併用したPVB19DNA-蛋白の二重染色を実施した。

【結果】 PCR法でFFPE組織と凍結組織のいずれかでPVB19が検出された症例は39/112例(34.8%)で、FFPE組織陽性かつ凍結組織陽性の症例は10/112例だった。10例に対し免疫染色でPVB19関連蛋白を解析し、10/10例で遠位尿細管上皮の一部に陽性を確認。さらに陽性上皮頂端側の大半にP抗原の発現がみられた(76.61±18.73%, $P<0.01$)。PVB19DNAと関連蛋白は多くの部位で共局在していた。【結語】 PVB19は約1/3の健常腎に存在していることが判明した。また、PVB19は遠位尿細管上皮頂端側のP抗原を介して侵入し、PVB-19DNAと関連蛋白が共局在していることから増殖可能な形で潜在していることが示唆された。

7-1.

植物由来エクソソームを担体としたゲノム編集技術の開発

(医学部医学科3年)

○永松 由衣

(大学：分子病理学分野)

梅津 知宏、黒田 雅彦

【背景】 当研究室はこれまでに、アセロラ果汁から抽出されるエクソソーム様小胞をドラッグデリバリーシステム(DDS)担体とすることで、siRNAなどの経口投与を可能とする核酸医薬品を開発してきた。また、このアセロラ由来小胞は核酸以外の薬剤も送達可能であることが明らかとなっている。そこでCRISPR/Cas9システムを経口投与で標的臓器へ送達する新規のゲノム編集治療法の開発を目指し、本研究では、アセロラ由来小胞を担体としたCas9/gRNA複合体(RNP)の様々な培養細胞への導入を試みた。

【方法】 Alpha-galactosidase A (GLA) 遺伝子に対する1 μM gRNAと1 μM Cas9タンパク質をRNP(Ribonucleoprotein)として複合体化させたものを、 4.0×10^6 particles/mlのアセロラ由来小胞と混合して氷上で30分反応させた。その後、この複合体を2種類の細胞株(HEK293, HUVEC)に添加した。コントロール群では、アセロラ由来小胞の代わりにLipofectamineTM RNAiMAXを用いてRNPを導入し

た。Cas9 RNP導入48時間後、培養細胞からゲノムDNAを抽出してgRNAのターゲット配列周辺領域(PAM配列含む)をPCR増幅した。そのPCR産物をサンガーシーケンスにて配列を解析し、TIDEを用いてゲノム編集効率を数値化した。

【結果】 アセロラ由来小胞を担体として用いたHEK293細胞では、PAM配列の下流からシーケンス波形の乱れが生じていた。InDel挿入効率は18%であり、コントロールの23.8%と匹敵するゲノム編集効果が得られた。さらに、血管内皮細胞HUVECでも同様の編集効果が観察された。また、98°Cで加熱したアセロラ由来小胞を担体とした場合も同程度の編集効率を示した。

【考察】 本研究によって、アセロラ由来小胞を担体として培養細胞へCRISPR/Cas9システムを導入可能であることが明らかとなり、細胞種によらずゲノム編集効果を誘導できることも示唆された。現在は、アセロラ由来小胞とRNPの複合体形成メカニズムを解析しながら、遺伝性神経疾患に対する経口ゲノム編集治療への応用を目指している。2種類のgRNAを導入してC9orf72遺伝子のGGGGCCリピート配列を除去するCRISPR/Cas9システムの構築を行っている。

7-2.

免疫抑制分子CD96は細胞外領域依存的にDNAM-1-CD155結合を阻害する

(医学部医学科5年)

○服部 杏、橋本 竜二

(大学：免疫学)

若松 英、町山 裕亮、豊田 博子

古畑 昌枝、西嶋 仁、竹内 新

横須賀 忠

【背景】 TIGITとCD96は疲弊化T細胞に高発現している免疫抑制分子であり、免疫チェックポイント分子阻害剤の標的として注目されている。TIGITとCD96は活性化補助刺激分子DNAM-1と同じCD155(ポリオウイルス受容体PVR)をリガンドとすることから、DNAM-1-CD155結合を阻害する可能性もあるが、T細胞と腫瘍細胞が接着する際の結合阻害関係は明らかにされていない。

【目的】 当研究室で確立した人工平面脂質二重膜