

審 査 結 果 の 要 旨

論文題目「独自の手法を応用した、新しい遺伝子ノックダウンシステムの開発」

学位申請者 三浦 浩美

本論文は、ヒト疾患モデルとして有用なマウス系統を簡便に且つ正確に樹立するための独自の遺伝子操作マウス作出技術の開発とその有効性に関して検討した論文である。

具体的には、申請者らは RNA 干渉による特定遺伝子の発現抑制（ノックダウン）技術を応用し、全く新しい独自の手法による遺伝子ノックアウトシステムの開発を行っている。本論文は3部より構成され、第1章では特定ゲノム領域に正確に1コピーの人工的な microRNA (amiRNA: artificial microRNA) を挿入するためのベクターの開発に成功している。第2章では、amiRNA を実際にマウスゲノムに挿入した遺伝子ノックダウンマウスの作出を行い、個体レベルでの遺伝子発現抑制及び amiRNA 発現に伴う副次的悪影響（毒性）について明らかにしている。さらに、第3章では、近年開発された CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を利用して、amiRNA を特定遺伝子のイントロン領域に方向性を決めて挿入することによって、特定遺伝子の発現パターンに合わせて amiRNA を発現させることに成功し、コンディショナル（組織・時期特異的）に遺伝子発現をノックダウンすることを可能とする新たな手法の開発を行っている。以上の結果から、本研究により開発された種々の手法は、ヒト疾患研究に用いる疾患モデル動物の新たな作出技術として極めて有効な方法であり、医学・生物学研究のための基盤的生殖工学技術として有用であると結論づけた。

本論文に対して、各審査委員から次のような質疑がなされた。

- 1) 遺伝子欠損マウスと遺伝子ノックダウンマウスの各々の利点と欠点の比較。
- 2) amiRNA の設計方法、及び配列による効果の差について。
- 3) amiRNA の翻訳抑制及び mRNA の分解といった作用以外（クロマチン構造等）への影響の有無。
- 4) amiRNA 配列のプロセッシングについて。
- 5) レポーターの有無による amiRNA 発現量の増減と、プロモーターの強弱との関連。
- 6) amiRNA 配列の導入箇所としての「イントロン領域」と「Rosa26 遺伝子座領域」の違いについて。
- 7) Rosa26 遺伝子座領域で組織特異的なプロモーターを用いて発現した amiRNA と、組織特異的な遺伝子のイントロン領域に amiRNA を挿入した結果の相違について。
- 8) 組織、発生時期、及び系統の違いによるそれぞれの遺伝子ノックダウンの不均一性について。
- 9) ノックダウンされた遺伝子から作られるタンパク質の量的違いと個体の表現型との関連について。
- 10) 今後のコンディショナル遺伝子ノックダウンマウスの作出について。

これらの質問に対して本申請者は、本論文から得られた実験結果、ならびに多くの関連論文の知見に基づく文献的考察を踏まえ、論理的かつ適切に回答し、本論文における当該分野における意義づけと将来における発展性を明らかにした。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。
したがって、申請者 三浦 浩美 は東海大学博士（医学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	博士（医学）	秦野 伸二	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	理学博士	木村 穰	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	安藤 潔	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	深川 雅史	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	理学博士	谷口 泰史	医学部准教授	（医学研究科先端医科学専攻）