

審査の結果の要旨

氏名 鹿毛 秀宣

本研究はマウス肺において任意の遺伝子をノックダウンする系を確立するため、その前段階としてアデノ随伴ウイルス血清型 2 および 5 (AAV2/5) にマウス Tgfβ1 に対する short hairpin RNA (shRNA) を搭載し、マウス胚由来線維芽細胞 3T12-3 の Tgfβ1 の発現を抑制することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ウェブサイトで公開されているアルゴリズム、および論文で報告されているアルゴリズムを用いて Tgfβ1 に対する有効な siRNA 配列を決定した。その際、siRNA 配列の決定にはアルゴリズムによる効果予測は不十分で実験的な検証が必要なこと、強制発現された遺伝子と内在性の遺伝子とでは抑制効果が異なること、および用いるプラスミド骨格や細胞株によっても抑制効果が異なることを見出した。
2. RNA polymerase II (PolIII) プロモーター下に primary microRNA に基づく配列と shRNA を組込む方が PolIII プロモーターと通常型の stem-loop shRNA を用いるよりも効果が高いとする報告を検証した。その結果、我々の系では PolIII プロモーターである U6 プロモーターと通常型の stem-loop shRNA の効果が高いことが判明した。また、比較の際に PolIII プロモーター下に primary microRNA に基づく配列はプラスミドの transfection では効果がなく、核内に shRNA を導入する必要があることを見出した。
3. Tgfβ1 に対する shRNA を搭載した AAV2/5 を産生した。その際、凍結・融解と超音波破砕による細胞破砕が同等に有効であることを見出し、また、AAV2/5 の精製方法として市販のキットは無効で超遠心と透析を組み合わせる必要があることを示した。
4. U6 プロモーターと Tgfβ1 に対する shRNA を搭載した AAV2/5 をマウス胚由来線維芽細胞 3T12-3 に導入し、Western blot で Tgfβ1 タンパクが 40%まで抑制されることを示した。その際、mRNA は抑制されておらず、完全に相補的な siRNA であっても mRNA の切断ではなく翻訳抑制がおきることがあることを示した。

以上、本論文はマウス胚由来線維芽細胞 3T12-3 に U6 プロモーターと Tgfβ1 に対する shRNA を搭載した AAV2/5 を導入し、マウス Tgfβ1 の発現抑制に成功した。本研究は AAV を利用して線維芽細胞に遺伝子を導入し、また、AAV2/5 に shRNA を搭載して遺伝子の発現を抑制した点が初めてである。本研究は今後、これまで確立されていない肺特異的な遺伝子抑制を可能にすると思われ、学位の授与に値するものと考えられる。