

吉信 公美子氏の学位論文審査の要旨

(学位申請者氏名)

論文題目

Tamoxifen feeding method is suitable for efficient conditional knockout

(タモキシフェンを食べさせる方法は効率的なコンディショナルノックアウトに適している)

近年の遺伝子改変技術の進歩により Cre ドライバーシステムは、医学・生命科学研究において条件付きノックアウトでマウス個体の表現型の解析を行うための有用な手段とされる。タモキシフェン誘導型 Cre ドライバーマウスは、薬剤投与により時間空間的ノックアウトを可能とする。タモキシフェンの投与は、腹腔内投与または胃ゾンデを使った経口投与により、複数回投与する方法が一般的に行われる。しかしながら、これらの強制投与はマウスへの侵襲性の可能性が懸念される。そこで本研究は、より安全にタモキシフェンを投与するため、タモキシフェンを混合した餌をマウスに与え、効率よく Cre 組換えを誘導する最適条件の検討を行った。

申請者は、Anderson ら (Transgenic Res., 2010) のタモキシフェンを粉餌に混ぜて食べさせる方法を採用し、効率的に Cre 組換えを起こす条件の最適化を行なった。全身での Cre 組換え誘導を検討するために、すべての臓器で Cre-ER^{T2} を発現するマウス (Ayu21-B165-CAG-Cre-mER^{T2}) を作製した。LacZ レポーターマウスである ROSA26R と交配して得られたマウスに対して、摂餌量増加の工夫、餌のタモキシフェン濃度、投与期間の検討を行った。Cre 組換えによりレポーターマウスの lacZ が発現することを利用して、主要臓器の X-gal 染色により評価を行った。各臓器の染色度合いを数値化することにより、個体ごとの組換え効率を評価した。

その結果、タモキシフェンを粉餌の摂餌量は、給餌器への馴化あるいは絶食、個飼いすることで増加することを見出した。投与量や投与期間を検討した結果、2.0mg TAM/g feed の濃度で5日投与することで良好な結果が得られること、摂餌法による Cre 組換え効率は、腹腔内投与で得られたそれと同等であることが判明した。さらに妊娠マウスに摂取させることにより、出生前や胎児期のマウスの組換え誘導も可能であることを示した。Cre 組換え誘導は全身で起こったが、モザイクであったためタモキシフェンの混合量を増やすことで組換え効率を上げることも検討した。しかしながら、タモキシフェン濃度を上げると摂餌量が減少するため、今回検討した最大の濃度である 2.0mg TAM/g feed は上限であると結論した。妊娠マウスには成体の摂餌条件を変えることで、出生前や胎児期のマウスの組換え誘導も可能となった。しかし、出生数は通常餌を与えた場合と比べ少なかったため、タモキシフェンが母体や胎児に毒性を及ぼしたことが示唆され、妊娠マウスには低用量で短期間投与する必要性を示した。これら一連の研究を総合して、摂餌によるタモキシフェン投与は、マウスへの傷害のリスクを最小限に抑え、実験者の負担も軽減できるため、マウスと研究者の両方にとって有用な方法であると結論した。

審査では、①LacZ 染色スコア法の客観性について、②臓器ごとによる組換え効率の違いについて考えられる理由、③摂餌法と腹腔内投与によるターゲット臓器へのルートの解剖学的違いについて、④プロモーターの違いによる Cre および LacZ 発現強度について、⑤タモキシフェン投与後 Cre 核移行が誘導されるタイミングについて、⑥肝臓におけるタモキシフェンの代謝と LacZ 染色への影響、⑦ベータガラクトシダーゼ活性のバックグラウンドの理由について、⑧タモキシフェン混合量によって摂餌が減る理由、⑨タモキシフェンや Cre 自体による毒性、⑩条件付きノックアウト法のモザイクの問題、などについての質疑応答がなされ、申請者からは概ね適切な回答と考察がなされた。

本研究は、近年医学・生命科学研究において重要なツールである Cre ドライバーシステムにおける効率的な条件付きノックアウト法のタモキシフェン投与法を検討した点で意義のある研究であり、学位授与に値すると評価された。

審査委員長 染色体制御学担当教授 石黒 啓一郎

(署名)

石黒 啓一郎