

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ヒトゲノム大規模改変技術の開発と応用
Title(English)	
著者(和文)	大野知幸
Author(English)	Tomoyuki Ohno
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12265号, 授与年月日:2022年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:相澤 康則,林 宣宏,清尾 康志,廣田 順二,白木 伸明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12265号, Conferred date:2022/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

論 文 要 旨

(和文2000字程度)

報告番号	乙 第	号	氏 名	大野 知幸
------	-----	---	-----	-------

本学位論文では、ヒトゲノム大規模改変技術を新規に開発した。また本技術によって非コード領域の機能解析や産業上有用な細胞の作製を行い、本技術の有効性を示している。

第1章では、ヒトゲノム中の98%以上を占める非コード領域の機能解析が進まない現状を解説している。非コード領域の機能解析をするためには、広いゲノム領域に対して、選択マーカー等の痕跡を残さない改変を両アレルで実施できる技術を確認する必要性があり、それらを満たす新規技術の開発を本論文の目的としたことを述べている。

第2章では、新規に考案したゲノム改変技術Universal Knock-in System (UKiS) の設計原理について解説している。UKiSは、相同組換えによる変異導入を二段階に分けて行うことで、対象ゲノム領域の両アレルを任意の配列に改変可能であると述べている。

第3章では、UKiSの有効性を検証するため、疑似二倍体細胞HCT116を用い、がん抑制遺伝子 *TP53* の第一イントロンに対し欠失や置換などの様々な変異導入を行っている。その結果、UKiSが1万塩基対を超える領域を、精密かつ両アレルで改変するのに有効な技術であることを実証している。

第4章では、前章で作製した第一イントロン変異細胞株における *TP53* 発現解析を定性的および定量的な観点から行っている。各イントロン変異細胞株での転写産物の配列解析の結果から、ヒトの *TP53* 第一イントロン内に、適切なスプライシングに必要な配列が存在する可能性を示唆している。また、イントロン変異が *TP53* 発現量に及ぼす影響を検証した結果から、第一イントロン内の霊長類特異的配列が *TP53* の発現を抑制している可能性を述べている。

第5章では、霊長類特異的レトロトランスポゾンである *Alu* 配列に注目し、ヒト *TP53* 第一イントロン内の *Alu* 配列が *TP53* 発現に与える影響の検証を行っている。 *Alu* 配列は *TP53* 第一イントロン内に17個存在し、第一イントロン配列の51%を占めている。これら全ての、あるいは一部の *Alu* 配列を *TP53* 第一イントロン内からUKiSによって除いたのちに *TP53* 発現への影響を検証した。その結果、イントロン内の複数の *Alu* 配列が相加的に *TP53* の転写を抑制する機構の存在を示唆している。

第6章では、HCT116細胞を用いて、全長が10万塩基対以上の3つの遺伝子 (*CD44*, *MET*, *APP*) の全イントロンをそれぞれ欠失した細胞株の作製を行い、各遺伝子発現にイントロンが与える影響を検証している。その結果、UKiSが長鎖遺伝子領域に対しても効率よく改変が可能であること、および遺伝子によって転写におけるイントロンの必要性が大きく異なることを示している。

第7章では、UKiSを活用し、近年創薬や疾患メカニズム研究などで注目される、疾患モデル細胞の作製を行っている。具体的にはトリプレットリピート病を対象とし、それに属する脊髄小脳変性症2型 (SCA2) のモデル細胞の作製を試みている。SCA2発症は、*ATXN2* 遺伝子のCAGリピート数が34を超えることに起因すると考えられている。本章ではUKiSによって、HCT116細胞内での *ATXN2* のCAGリピート数を改変し、CAGリピート数が非疾患型の細胞と疾患型の細胞の同時作製を行ったことで、UKiSが疾患モデル細胞の作製においても有効であることを実証している。さらに作製した細胞株での *ATXN2* 発現解析の結果から、CAGリピートの伸長が *ATXN2* の発現を抑制することを示している。

第8章では、様々な組織や臓器の細胞に分化可能であり、ゲノムの機能解析や疾患モデル細胞研究に用いられる人工多能性幹細胞 (iPS細胞) に対して、UKiSによるゲノム改変が可能であるかを検証している。その結果、UKiSによって1万塩基対を超えるゲノム領域の両アレルをiPS細胞内で正確に改変可能であることを示している。またUKiSの工程を経ても、iPS細胞内での未分化マーカー遺伝子発現が維持されていることから、UKiSがiPS細胞のゲノム改変にも有効な技術であると述べている。

第9章では、以上の結果をまとめ、今後の展望が議論されている。

以上のように、本学位論文では、新規に開発したヒトゲノム大規模改変技術UKiSを用い、ヒトゲノム非コード領域の機能解析を行い、イントロン内の *Alu* 配列が遺伝子発現を抑制する機構や、全長が10万塩基対以上のヒト遺伝子のイントロン欠失の影響について、新たな知見を示した。さらに、UKiSが疾患モデル細胞の作製やiPS細胞のゲノム改変に有効な手法であることを示した。本学位論文で開発したUKiSは今後、ゲノムの大部分を占める非コードゲノム領域の機能解析や、疾患モデル細胞に限らない、細胞治療や再生医療のための細胞作製など、ヒトゲノム大規模改変が重要となる分野において、活用が期待される技術であると論じている。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論 文 要 旨 (英 文) (300語程度)

Dissertation Summary (approx. 300 words in English)

報告番号 For administrative use only	乙 第 号	氏 名	大野 知幸
<p>Identifying functional elements from the vast noncoding regions of the human genome is a major challenge in genomics research. An efficient, scarless, biallelic, and gene-wide mutagenesis technology is necessary for direct functional analysis of endogenous noncoding regions, such as introns, in gene regulation. Given these backgrounds, as described in the chapter 1, the purposes of this thesis are set to (1) establish the genome editing technology, which meets these requirements above, and (2) elucidate the feasibility and values of the technology.</p> <p>Chapter 2 describes the design principle of the Universal Knock-in System (UKiS), a newly devised genome modification technology in this thesis. With UKiS, both alleles in the target genomic region can be modified into desired sequences without any scar by introducing mutations via homologous recombination with two-step positive and negative selection. In chapter 3, 4 and 5, this thesis applies UKiS to the first intron of <i>TP53</i> in the near-diploid cell line HCT116 for proofing concept and screening for gene-regulatory elements. Complete deletion of the intron, its substitution with mouse and zebrafish syntenic introns, and precise removal of retrotransposon-derived elements were all efficiently achieved in both alleles, revealing a suppressive role of intronic <i>Alu</i> elements in <i>TP53</i> expression. In Chapter 6, this thesis performs 100 kb-scale whole-intron deletions of three genes and evaluate their impacts on gene expression. In Chapter 7, this thesis utilizes UKiS to generate isogenic disease model cells for spinocerebellar degeneration type 2 (SCA2) by introducing a mutation in the CAG repeat of <i>ATXN2</i>, the causative gene of SCA2. Chapter 8 demonstrates the applicability of UKiS for human induced pluripotent stem cells by deletion of <i>TP53</i> first intron without losing stemness. Conclusions of this thesis are presented in the chapter 9, where significance and prospects of this these projects are discussed.</p>			

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.