

氏名（本籍）	青木 海
学位の種類	博士（スポーツ医学）
学位記番号	博甲第 9978 号
学位授与年月	令和 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Utilization of Taqman qPCR method for detecting gene doping by adenovirus vector (アデノウイルスベクターによる遺伝子ドーピング検出の ための Taqman qPCR 法の活用)
主査	筑波大学教授 博士（体育科学） 前田清司
副査	筑波大学教授 理学博士、博士（医学） 武政 徹
副査	筑波大学准教授 渡部厚一
副査	筑波大学教授 博士（医学） 竹越一博

論文の内容の要旨

青木海氏の博士学位論文は、アデノウイルスベクターによる遺伝子ドーピングの検出法を、Taqman qPCR法を用いて検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

第1章では、著者は本論文の研究背景として、ドーピングと遺伝子ドーピング、その背景となる遺伝子編集技術について先行研究に基づいてまとめている。そして、これらの背景を踏まえ、本論文全体の目的は、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子ドーピングの検出法を確立することである、と述べられている。

第2章は、ドーピングや遺伝子ドーピングの概要について、先行研究のまとめを行ったものである。さらに、著者は遺伝子ドーピングのターゲットとなりうる遺伝子であるエリスロポエチンの生理的作用や、ドーピングとして用いられた際の運動能力の向上に関する先行研究についても概観している。

第3章では、著者はこれらの先行研究をまとめ、3つの研究課題を設定し、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子ドーピングの検出法を確立することを目的として述べている。

第4章では、実験1として、アデノウイルスベクターにより外因性遺伝子を導入する遺伝ドーピング模倣モデルを作成し、三種類のPCR法により生体サンプルから単回及び経時的に検出できるのか、げっ歯類を用いて検証している。実験1で用いた導入遺伝子はmCherryと呼ばれる赤色蛍光タンパクであり体内での機能は有していないが、アデノウイルスベクターにより、静脈注射及び筋肉への局所注射で導入可能である事が示され、遺伝子ドーピングの模倣モデルを確立している。次に、著者は導入遺伝子断片を三種類のPCR法、すなわち、半定量PCR、定量PCR、デジタルPCRにより検出可能であることを明らかにしている。加えて、方法による検出感度はデジタルPCR、定量PCR、半定量PCRの順に高く、サンプルによる検出感度は血球分画DNA、血漿細胞遊離DNA分画、フンの順に高いことも述べている。単回の検出法を元に、著者は最も検出感度の高いデジタルPCRを用いて経時的な導入遺伝子の検出も行っており、アデノウイルスベクター投与後7日目まで導入遺伝子を検出できることを明らかにしている。

第5章では、実験2として、Taqman probeを用いた定量PCRの特異性と正確性の検証を遺伝子ドーピングのターゲットになりうるエリスロポエチンのプラスミドDNAを用いて行っている。その結果、SYBR Greenを用いた定量PCRと比較してTaqmanを用いた定量PCRでは検出感度が高く、特異的かつ高感度に導入遺伝子を検出可能であると著者は述べている。

第6章では、実験3として、エリスロポエチン遺伝子を含むアデノウイルスベクターを用いた遺伝子ドーピングモデル動物を作成し、モデル動物から導入遺伝子を経時的に検出できるかを検証している。著者はエリスロポエチン遺伝子を含むアデノウイルスベクターを投与した場合、赤血球数、ヘモグロビン数、白血球数が対照群と比較して増加する表現系が得られることを明らかにしている。また、このモデル動物の肝臓中ではエリスロポエチンが対照群と比較して増加しており、血球パラメーターの増加はエリスロポエチン増加による影響であると著者は述べている。加えて、著者は経時的に導入遺伝子を検出できること、特にテンプレートDNAを増加させてもPCR阻害がなく、7日間検出できることを明らかにしている。

第7章では、総合討論として、著者はドーピングの検出は100%の感度である必要があることを念頭に、現状の技術やコスト面からTaqman probeを用いた検出系を遺伝子ドーピング検出系として用いることが適していると述べている。さらに、本論文の限界点として、投与ベクターの共通遺伝子配列による検出やロボットを用いた全自動のハイスループットアッセイを確立することで本研究結果をより支持できることについても言及している。

最後の第8章は、本論文の結論として、PCRをベースとした検出系によりアデノウイルスベクターによる遺伝子ドーピングの検出が可能であることについて述べている。

審査の結果の要旨

(批評)

青木海氏の博士学位論文は、アデノウイルスを用いた遺伝子ドーピングについて、遺伝子ドーピングモデルを確立した上で、検出法を検証した点において新規性がある。特に、現場応用への可能性を見据え、Taqman qPCRの妥当性や特異性を確立し、一滴の血液から遺伝子ドーピングの証拠を検出できることを見出したことは博士論文の研究として非常に優れている。

令和2年12月29日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（スポーツ医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。