

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)	氏名	梶原 亮太
学位授与の要件	学位規則第4条第1項・2項該当		
論 文 題 目			
鶏卵バイオリアクターに必要な技術に関する研究 (Study on technology required for chicken egg bioreactor system)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	堀 内	浩 幸
審査委員	教 授	山 本	卓
審査委員	准教授	船 戸	耕 一
審査委員	助 教	松 崎	芽 衣
〔論文審査の要旨〕			
<p>本論文は第1章緒言、第2章「ニワトリ ES 細胞の培養条件の検討」、第3章「鶏卵バイオリアクター-in vitro 評価系の構築」、第4章総合考察、第5章総括から構成されている。</p> <p>第1章では、研究の背景として、近年のバイオ医薬品の需要が高まりを見せる中、ニワトリはその生産性の高さから有用物質を生産するバイオリアクター（鶏卵バイオリアクター）としての利用が進められていること、そのためには、ゲノム編集技術を含めた鶏卵バイオリアクターに必要な技術開発と生産系の短期での評価系の必要性が論じられた。これは、鶏卵バイオリアクター化において取り扱いが難しい始原生殖細胞（PGC）のルートしか開発されておらず、またニワトリの開発に至っては、PGCの遺伝子改変からバイオリアクター化まで2～3年を要し、さらにバイオリアクター化が成功した後にしか、その生産量や生物活性が評価できないことが、鶏卵バイオリアクターの実用化の障壁になっていることが紹介された。</p> <p>第2章では、PGCの代替ルートとして、ニワトリ胚性幹細胞（ES細胞）の有用性と問題点が指摘され、ニワトリ ES細胞の問題点である生殖細胞への分化能を得るための新たな培養方法の開発とその知見が示された。梶原氏は、マウス ES細胞の多能性維持に重要な Wnt/β-catenin シグナルの活性化に着目し、ニワトリ ES細胞で Wnt/β-catenin シグナルの活性化を行なったところ、予想に反して、細胞形態、増殖能、多能性維持や生殖細胞で機能する転写因子の発現が低下することを見出した。次に、逆にニワトリ ES細胞で Wnt/β-catenin シグナルの抑制化を行なったところ細胞形態、増殖能、多能性維持や生殖細胞で機能する転写因子の発現が上昇することを発見し、この条件下で培養したニワトリ ES細胞がキメラ形成能を有することも明らかにした。</p> <p>第3章では、PGCやES細胞を用いた鶏卵バイオリアクター化で問題になる作出期間の長さとその後の生産物の評価を短期間に培養細胞で可能にする研究が報告された。現在、実用化が目指されている鶏卵バイオリアクター化では、卵白中の最大成分であるオボアルブミン（OVA）の転写翻訳系の利用が主流であるが、鶏卵1個あたりのOVA量が2gであるのに対して現状の手法での生産量は60mgに留まっており、また生産物を精製したところ、生物活性が消失していた。これを事前に評価するためには、培養細胞を用いたin vitroでの評価系が有効であるが、現在までにOVAを産生する卵管内分泌細胞の培養細胞が完全に樹立されていない。そこで本研究では、ニワトリ胚線維細胞株であるDF1細胞のOVA遺伝子を強制発現させるために、</p>			

細胞内恒常発現遺伝子である EF1 α のプロモーターを OVA 遺伝子座のエクソン 1 と開始コドンを含むエクソン 2 の上流に、ゲノム編集によりそれぞれノックインした。その結果、両方の系で mRNA の発現が認められたが、エクソン 1 の上流に EF1 α のプロモーターをノックインした場合に高い翻訳活性が認められた。そこでエクソン 1 の上流に EF1 α のプロモーターをノックインした DF1 細胞クローンを用いて、ヒト線維芽細胞増殖因子 2 (hFGF2) 遺伝子を開始コドン直下もしくは終止コドン直前もしくは直下に OVA 遺伝子と共発現させる形で 2A ペプチドもしくは IRES 配列を繋ぎ目にゲノム編集技術によりノックインした。その結果、hFGF2 を 2A ペプチドで開始コドン直下に連結させた場合で、最も高い hFGF2 の転写産物が得られることがわかった。

第 4 章では、それぞれの本研究成果に対して、これまでの知見と比較する形で、総合考察が行われていた。なお本研究は、遺伝子改変ニワトリを作出する上でこれまで PGC ルートのみでしか作出できなかったのに対して、新たに ES 細胞ルートの利用の可能性を示す重要な知見を得た。また鶏卵バイオリクター化で問題になる事前評価系を構築し、その有用性を証明している。

本研究は、食品や医薬品製造に重要な役割を担っているニワトリをさらに有効活用するために、ゲノム編集を含む遺伝子改変技術に有用な多くの知見を発見した。今後、これらの成果は、ニワトリでの遺伝子改変技術に大きな発展に寄与することが期待される。

以上、審査の結果、本論文は統合生命科学研究科学位論文評価基準を満たし、梶原氏は博士(学術)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。