TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo University of Marine Science and Technology (東京海洋大学)

クルマエビ株化細胞樹立のための研究

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2022-06-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Thammasorn, Thitiporn メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/2470

［課程博士］（博士論文審査及び最終試験の結果要旨）

学生氏名：Thitiporn Thammasorn

博士論文題目：Study on the establishment of continuous cell culture from Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*（クルマエビ株化細胞樹立のための研究）

博士論文審査：

申請者から提出された論文については審査委員と申請者の間で質疑応答が行われ、一部修正が行われた。公開発表会は 2022 年 2 月 14 日に実施され、博士論文としての質を十分に確保しているとの結論に至った。

エビの細胞培養研究は、エビの病原体の細胞・分子レベルでの研究、診断ツールの開発を進める上で重要である。エビの細胞培養研究は、1986 年以来 30 年以上にわたって取り組まれてきた。しかし、エビの培養細胞株の樹立に成功した例はない。本研究は、クルマエビの細胞株の樹立のための分子生物学的な情報基盤を構築することを目的として実施した。

エビの細胞増殖および細胞停止を制御する分子機構を調べるために、エビの初代培養細胞を用いた研究を行った。トランスクリプトーム解析（RNA-Seq）により、エビ初代細胞の遺伝子発現プロファイリングを行い、次に、エビ初代細胞とエビ組織（培養前）の遺伝子発現の変化を調べるために 2 つの研究を行った。①エビ精巣初代培養細胞と培養前の組織とで異なる遺伝子発現パターンを持つ遺伝子が 100 個以上見出された。発現量が異なる遺伝子（DEG）の内、細胞周期関連遺伝子の遺伝子発現パターンが、初代細胞と正常組織とで明らかに異なることがわかった。エビの初代細胞では、いくつかの細胞周期関連遺伝子で発現量が減少していた。これらの遺伝子は、細胞増殖制御、G1/S 期移行、有糸分裂への移行に必要である。しかし、細胞周期停止を誘導する遺伝子のいくつかは、培養条件下で発現が上昇した。これらの遺伝子は、培養条件下での細胞増殖や細胞停止に必須な役割を担っている可能性が示された。②造血組織、リンパ様組織、精巣、卵巣の 4 種類の初代細胞で RNA-seq 解析を行った。4 種類の臓器の初代細胞で共発現している DEG が 50 以上あることがわかった。発現量が上昇した DEG は、ユビキチンシステムと成長停止を促進する遺伝子と同定された。さらに、4 種類の初代細胞から 76 個の遺伝子が細胞周期関連プロセスに関連していることが判明した。さらに、細胞周期制御遺伝子の細胞老化に関与する遺伝子においても発現量に変化がみられた。これらの結果は、細胞増殖と細胞停止に本質的な役割を果たすと思われるエビ初代細胞下の分子機構と主要な分子経路について、さらなる理解を深めるものである。いくつかの候補遺伝子は、細胞増殖を維持し、エビの連続細胞株を樹立するための遺伝子操作の代替ターゲットとなる可能性がある。

エビ培養細胞株の樹立を目指し、3 つの方法（①RNA 干渉による遺伝子サイレンシング、②3 次元細胞培養技術、③化学処理）を実施した。まず、dsRNA 接種による遺伝子サイレンシングでは、細胞周期阻害遺伝子である RB と p53 を標的とした。RB および p53 発現抑制細胞では、Cyclin B および Cyclin E の発現レベルが有意に増加した。しかし、RB と p53 の mRNA レベルは、6 日で無処理群と同程度に戻ることがわかった。これらの結果から、この方法では、恒久的な遺伝子ノックダウンを行うことはできなかった。 3 次元細胞培養法を用いてエビの細胞培養を行った。3 次元細胞培養は、細胞が成長し、周囲と相互作用するための人工的な環境を 3 次元的に作り出す細胞培養法の 1 つである。96 ウェル U 字底マイクロプレートを用いて、エビの細胞を 3 次元スフェロイドとして培養した。播種 2 日目には、エビ細胞の自発的な自己凝集が確認された。5 日目以降、複数の細胞が凝集し、丸いスフェロイドを形成し、スフェロイドの周囲に複数の細胞が存在するようになった。培養 7 日目と 9 日目にスフェロイドサイズと細胞増殖の増加が観察され、その後 14 日目以降に顕著な減少が見られた。しかし、21 日以上生存を維持することができなかった。最後に、強力な変異原である N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine（MNNG）を用いてエビの細胞を化学処理し、不死化細胞株への形質転換を試みたが、2 次元および 3 次元培養細胞の無制限な増殖は、MNNG 処理では起こらないことが示唆された。

以上の結果から、いくつかの遺伝子は、細胞増殖の維持とエビ連続培養細胞の樹立を目的とした遺伝子操作のターゲットとなる可能性があることが示された。また、エビ連続培養株の樹立は成功しなかったが、3 次元培養による細胞周期関連遺伝子の発現は、細胞増殖に向けて回復していることが確認された。これらの知見を活用することで、将来的に不死化細胞株の樹立を成功させることが期待される。以上の内容から、学生から提出された博士論文は、国内外の研究の水準に照らし、各研究分野における学術的意義、新規性、独創性及び応用的価値を有しており、博士の学位に値することを審査委員一同確認した。

最終試験の結果要旨：

最終試験は 2 月 14 日に行われた。まず、学術論文は第 1 著者(Thammasorn T, Nozaki R, Kondo H, Hirono I. (2020) Investigation of essential cell cycle regulator genes as candidates for immortalized shrimp cell line establishment based on the effect of in vitro culturing on gene expression of shrimp primary cells, Aquaculture, 529:735733)として公表済みであるとともに、国際学会での発表が 2 回あることと合同セミナーは企業型セミナーを履修していること確認した。大学院海洋科学技術研究科が指定した研究者倫理教育を修了していることを確認した。大学院海洋科学技術研究科が指定した方法により剽窃のチェックを行った結果、問題は認められなかった。学術論文は英語で書かれており、かつ、国際会議で、英語で発表しており、英語の学力については問題ないと判断した。また、申請者に対して、論文内容について最終確認のための質疑応答を行い、その内容は十分であった。一方、専門知識については公開発表会(2 月 14 日)当日の質疑や予備審査時でのディスカッションを含め十分であると審査委員一同確認した。以上から、学生について博士論文審査、最終試験とも合格と判定した。