

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書

平成30年 2月28日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 北海道薬科大学

職 講師

氏名 中田章史

e-mail nakata\_a@hus.ac.jp

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

鯨類バイオリソースの基盤整備

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 中田章史	北海道薬科大学	講師	
分担者 栗原望 落合真理	宇都宮大学 愛媛大学	講師 特定研究員	
拠点対応教員 岩田久人	愛媛大学	教授	

3 研究内容（別紙）

## 鯨類バイオリソースの基盤整備

中田章史(北海道薬科大学)、栗原望(宇都宮大学)、落合真理、岩田久人(愛媛大学)

### 【研究目的】

野生動物は、実験動物と異なり、遺伝情報が少なく新鮮な試料の入手が困難であるため、細胞学的な知見が乏しいのが現状である。しかしながら、野生動物でも適切に組織の処理を行えば、細胞学的研究につながると考えている。しかしながら、鯨類は、実験動物化に不適、新鮮な試料の入手が困難、倫理的な問題等で細胞学的な研究が立ち遅れているのが現状である。そのため、鯨類の細胞培養法の確立および培養細胞を得ることで、様々な分野で再現性のある解析が可能となる。一方で、初代培養細胞は細胞分裂回数が有限であり、継代を繰り返すことでゲノムに変化が生じ、再現性のある結果を得ることができない可能性がある。これを回避するために、ヒトまたは実験動物では、p53/RB siRNA、SV40 T 抗原発現用ベクターを利用して細胞の不死化が行われている。さらに近年、ゲノム不安定性の誘発が少ないテロメア逆転写タンパク質(TERT)を発現させるベクターも開発・利用されてきている。初代培養細胞の保存だけでなく細胞系が樹立できれば、安定的な細胞資源の供給および再現性のある解析結果の担保が可能となる。本研究では、鯨類の細胞培養法の確立および細胞株の樹立化を試みるために上記の細胞不死化技術が適用可能かどうか検討することを目的とした。

### 【研究内容】

#### ・初代培養細胞の作成

新鮮な死亡漂着個体から組織を採取後、培養液中に浸漬して研究室に冷蔵で運搬した。組織は抗生物質を含む培養液で洗浄し、細切した。細切した組織片は培養フラスコに静置して、適切な培養液を用いて培養を行った。

#### ・細胞株の樹立

初代培養細胞に対してhTERT 発現ベクターウイルス上清(Applied Biological Materials 社、米国)を用いて細胞の不死化を試みた。まず、24 ウェルプレートに初代培養細胞を  $5 \times 10^4$  細胞を播いた。ポリブレン溶液(ナカライテスク社、日本)を最終濃度  $2 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  になるように添加し、hTERT 発現ベクターを含むウイルス上清のトランスダクションを1~2 回行なった。トランスダクション後、ウイルス上清を除去し、適切な培養液下で培養を

行った。1 週間培養後、細胞を適切なディッシュに継代培養し、染色体、DNA、RNA 標本を作成した。

#### ・PCR による hTERT 遺伝子の確認

正常ヒトゲノム DNA、SV40 T 抗原遺伝子導入ヒト細胞株 DNA、正常オウギハクジラ属細胞 DNA、hTERT 導入オウギハクジラ属細胞 DNA を鋳型として、hTERT 遺伝子の確認のために PCR を行った。hTERT 遺伝子の確認には、メーカー推奨の hTERT F: 5' GAAGGCGTCTGGGATGCGAA 3'、hTERT r: 5' GAGTAGAGGAAGTGCTTGGT 3' をプライマーとして用いた。PCR の条件は、95°C、5 分の初期変性後、94°C、10 秒の変性、55.0°C、30 秒のアニーリング、68.0°C、30 秒の伸長反応を 30 サイクル、72°C、7 分の最終伸長を行った。

#### 【研究成果】

研究期間内において、カマイルカ (SNH17024) 及び種不明オウギハクジラ属 (SNH17034) の死亡漂着および混獲個体から初代培養を行ったところ、線維芽細胞を含む初代培養細胞を得ることができた。これら初代培養細胞は、現在北海道薬科大学にて -80°C で保管しており、愛媛大学 es-BANK に移管する予定である。

得られた初代培養細胞のうち、種不明オウギハクジラ属 (SNH17034) の細胞の増殖が比較的良好であったため、この細胞に対して hTERT 発現ベクターのトランスダクションを行った。鯨類細胞における hTERT 発現ベクターの最適なトランスダクション条件決定のため、初代培養細胞に対するポリブレン溶液の濃度およびトランスダクションの回数を検討した。その結果、10 条件中 9 条件において細胞障害のため、初代培養細胞が死滅したが、ポリブレン濃度 6  $\mu$ g/ml、hTERT 発現用ベクターのトランスダクションを 2 回実施した細胞群において、1 週間培養後、細胞の増殖が確認された。トランスダクション前の細胞群では、線維芽細胞と上皮細胞が混在した状態であったが、増殖が確認された細胞群では敷石状の細胞が多く存在していた(図1)。今後は、この上皮様細胞の由来が最初に存在していた上皮細胞なのか、トランスダクションによる形態変化であるかについて解析する必要がある。また、得られた細胞群は、2 月末の現在も細胞の増殖が確認されている(継代 13 代)。さらに、この細胞株の特徴を明らかにするために、染色体、DNA、RNA 標本を作成し、引き続き解析する予定である。

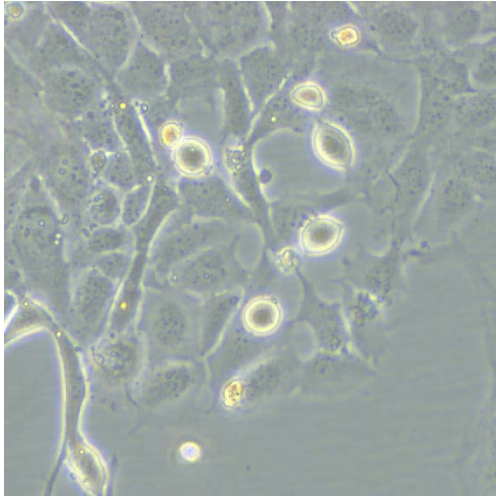


図1 hTERT 遺伝子導入した鯨類細胞。敷石状の細胞形態を示している。

本研究で得られた hTERT 遺伝子導入した鯨類細胞への hTERT 遺伝子の導入の有無を確認するために、正常ヒトゲノム DNA、SV40 T 抗原遺伝子導入ヒト細胞株 DNA、正常オウギハクジラ属細胞 DNA、hTERT 導入オウギハクジラ属細胞 DNA を鋳型として、hTERT 遺伝子の増幅を行なった(図2)。その結果、hTERT 導入オウギハクジラ属細胞 DNA においては hTERT 遺伝子が検出された。しかしながら、hTERT 遺伝子の発現を確認していないため、今後、この細胞における遺伝子発現を確認する必要がある。

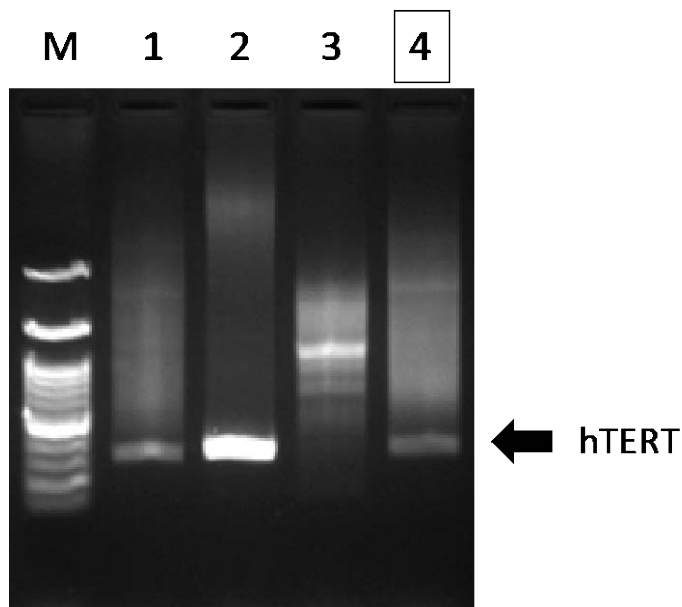


図 2 M:分子サイズマーカー、1:正常ヒトゲノム DNA、2:SV40 導入ヒト細胞株 DNA、3:オウギハクジラ属細胞 DNA、4:hTERT 導入オウギハクジラ属細胞 DNA

### 【成果発表】

落合真理, 栗原望, 松田純佳, 中郡翔太郎, 塩崎彬, 中田章史, 松石隆, 国末達也, 岩田久人 : 鯨類由来線維芽細胞を用いた環境汚染物質の毒性影響評価. 日本セトロジー研究会第 28 回大会. 札幌市. 2017.6.

### 【今後の問題点】

本研究で得られた hTERT 遺伝子を導入した鯨類細胞は、ゲノム中に hTERT 遺伝子が存在することが示唆されているが、遺伝子発現についてはまだ不明である。そのため、この細胞株の特徴を明らかにするためにさらなる解析を継続している。

また、鯨類細胞に対して安定的に hTERT 遺伝子を導入する条件を検討するために、複数種の鯨類細胞に対しても検討する必要がある。