

ヒトテロメア逆転写酵素遺伝子導入した鯨類細胞の性状解析

中田章史(北海道薬科大学)、落合真理、岩田久人(愛媛大学)

【研究目的】

鯨類などの野生動物は、実験動物と異なり、遺伝情報が少なく細胞学的な知見が乏しいのが現状である。その理由として、新鮮な試料の入手が困難であることや、実験動物化に不適、倫理的な問題等が挙げられる。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。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。

昨年度、安定した鯨類細胞資源を供するために、鯨類の初代培養細胞に対して、細胞の不死化で用いられているヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子の導入を試みた。その結果、ヒトテロメア逆転写酵素が挿入されていると思われる上皮様の細胞群が得られた。しかし、この細胞におけるヒトテロメア逆転写酵素の遺伝子発現についてはまだ不明である。本研究では、ヒトテロメア逆転写酵素遺伝子が導入された鯨類細胞株の特徴を明らかにすることを目的とした。また、鯨類細胞に対して安定的にヒトテロメア逆転写酵素 (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も行った。

【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 5×10^4 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。

・hTERT 遺伝子の発現解析

hTERT 導入オウギハクジラ細胞から RNA 抽出を行い、逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として、既報の hTERT 遺伝子のプライマーおよび鯨類のハウスキーピング遺伝子のプライマーを用いて RT-PCR を行なった。用いたプライマーは、不死化導入キット推奨の 1 Forward: GAAGGCGTCTGGGATGCGAA、1 Reverse: GAGTAGAGGAAGTGCTTGGT (Applied Biological Materials 社)、2 Forward: CGTCCAGACTCCGCTTCATC、2 Reverse: GAGACGCTCGGCCCTCTT (Gutkin et al., 2016)、3 Forward: GGAGCAAGTTGCAAAGCATTG、3 Reverse: TCCCACGACGTAGTCCATGTT (Tchirkov et al., 2003)、4 Forward: ATGCGTCGCAAACCTTTGGG、4 Reverse: ATGCGTGAAACCTGTACGCCT (Fujii et al., 2009)、5 Forward: TTCCTGCACTGGCTGATGAGT、5 Reverse: CTTCAAGTGCTGTCTGATTCC (Fujii et al., 2008)を用いた(図1)。ポジティブコントロールとして、Chen et al. (2016)が報告した鯨類のハウスキーピング遺伝子のプライマー、ACTB(F: AGGACCTCTATGCCAACACG, R: CCTTCTGCATCCTGTCAGC)、RPL4 (F: CAGCGCTGGTCATGTCTAAA、R: GCAAAACAGCCTCCTTGGT)、PGK1 (F: CACTGTGGCCTCTGGCATA、R: GCAACAGCCTCAGCATACTTC)、HPRT1 (F: GTGGCCCTCTGTGTGCTC、R: CTATTTCTGTTTCAGTGCTTTGATGT)、ヒト GAPDH(F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC、R: TGGTGAAGACGCCAGTGGA) (Shinojima et al., 2010) マウス GAPDH(F: CGGGGTCCCAGCTTAGGTTC、R: GCCCAATACGGCCAAATCCG) (Kanani et al., 2017)を用いた。RT-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。

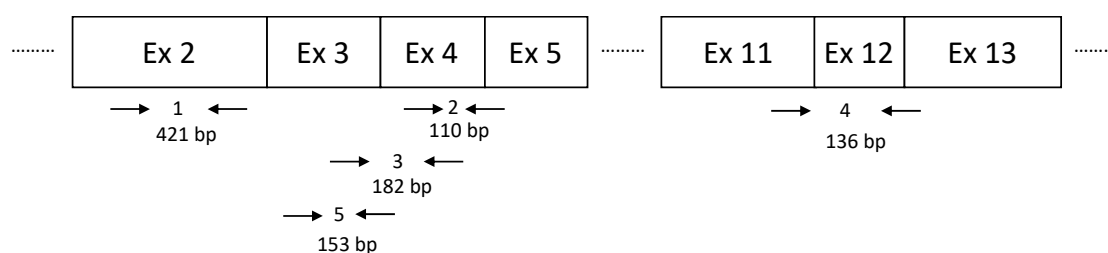
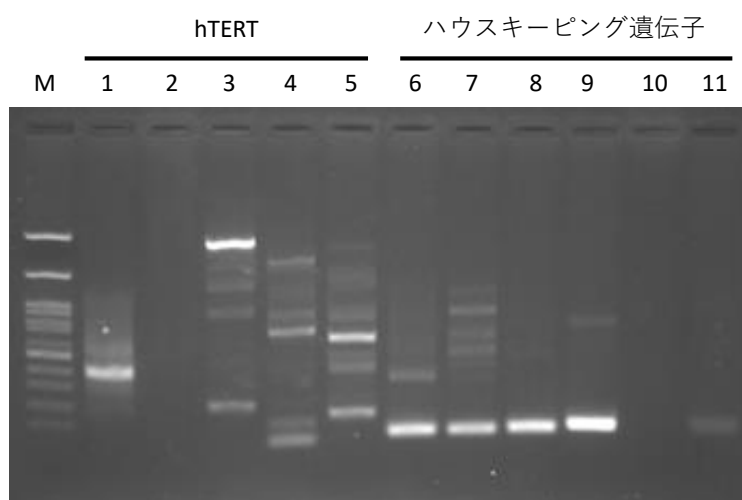


図1 ヒトテロメラーゼ遺伝子mRNA の一部と使用したプライマーの位置。

【研究成果】

研究期間内において、ハブスオウギハクジラの死亡漂着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。この得られた初代培養細胞に対して、hTERT 発現ベクターのトランスダクションを行った。その結果、多くの細胞が細胞障害のため、初代培養細胞が死滅し不死化導入は認められなかった。

一方、昨年度に hTERT 遺伝子を導入したオウギハクジラの細胞株は継代 38 代に達した現在も細胞は良好に増殖している。そこで、この樹立した細胞におけるヒトテロメア逆転写酵素の遺伝子発現について解析を行った。遺伝子発現の確認のために、既報の hTERT 遺伝子のプライマーおよび鯨類のハウスキーピング遺伝子のプライマーがオウギハクジラ細胞株に適応可能かどうか検討した(図2)。hTERT 遺伝子に関しては、2 のプライマー以外において遺伝子発現が確認された。1 のプライマーはシングルバンドで増幅していたため、hTERT 遺伝子の導入が確認された。また、3～5 に関しては非特異的なバンドの増幅があり、プライマーに問題があるのか遺伝子導入の際に組換えが生じた可能性がある。一方、ハウスキーピング遺伝子は、鯨類の遺伝子において若干非特異的な増幅があるものの、概ねオウギハクジラに対して適用できる可能性があることが判明した。



M: サイズマーカー、1~5: hTERT、6: ACTB、7: HPRT、8: PGK、9: ヒトGAPDH、10: マウスGAPDH

図2 ヒトテロメラーゼ遺伝子を導入したオウギハクジラ細胞から抽出した RNA の RT-PCR の結果。

【引用文献】

Chen IH, Wang JH, Chou SJ, Wu YH, Li TH, Leu MY, Chang WB, Yang WC. Selection of reference genes for RT-qPCR studies in blood of beluga whales (*Delphinapterus leucas*). PeerJ, 4: e1810. 2016.

Fujii H, Shao L, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A;106: 4360-5. 2009.

Gutkin A, Uziel O. Tumor cell derived exosomes contain *hTERT* mRNA and transform nonmalignant fibroblasts into telomerase positive cells. Oncotarget, 7: 59173-59188. 2016.

Kanani M, Rad JS, Karimian N, Ghasemzadeh A, Roshangar L. The effect of melatonin

on *Izumo1* gene expression, sperm motility and in vitro fertilization in mice. *Cres J Med Biol Sci*, 4: 139–143. 2017

Shinojima Y, Terui T, Hara H, Kimura M, Igarashi J, Wang X, Kawashima H, Kobayashi Y, Muroi S, Hayakawa S, Esumi M, Fujiwara K, Ghosh S, Yamamoto T, Held W, Nagase H. Identification and analysis of an early diagnostic marker for malignant melanoma: ZAR1 intra-genic differential methylation. *J Dermatol Sci*, 59: 98-106. 2010.

Tchirkov A, Rolhion C, Kémény JL, Irthum B, Puget S, Khalil T, Chinot O, Kwiatkowski F, Périssel B, Vago P, Verrelle P. Clinical implications of quantitative real-time RT-PCR analysis of *hTERT* gene expression in human gliomas. *Br J Cancer*, 88: 516-20. 2003.

【今後の問題点】

鯨類細胞に対して安定的にヒトテロメア逆転写酵素 (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。また、本研究で得られた hTERT 遺伝子を導入したオウギハクジラ細胞は、hTERT 遺伝子の発現が確認されているが、発現量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が必要である。