

新規の不死化鯨類細胞の樹立の試み

中田章史(北海道科学大学)、落合真理、岩田久人(愛媛大学)

【研究目的】

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ため、変異原に対する生物影響を評価することが困難である。そのため、安定的に鯨類細胞資源を供することのできる細胞系の開発が求められている。これまでに申請者らは、オウギハクジラ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) 遺伝子を導入した不死化細胞を樹立したが、様々な染色体異常を有していた。

本研究では、鯨類において hTERT 遺伝子の導入が染色体異常を誘導しているのかを確認するために他の鯨類細胞に対しても hTERT 遺伝子の導入を行い、不死化細胞の樹立する条件を検討することを目的とする。

【研究内容】

・初代培養細胞の作成

混獲したスナメリから軟骨組織を採取後、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。

・hTERT 遺伝子の導入

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。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 $0.5 \sim 6 \mu\text{g/ml}$ 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、DNA、RNA 標本を作成した。

・PCR による hTERT 遺伝子の検出

hTERT 導入後のスナメリ細胞の 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】

申請者らは、ハブスオウギハクジラの初代培養細胞に対して hTERT 遺伝子を発現するレンチウイルスを使用して不死化の導入を行なったが、導入条件によっては細胞障害が誘発されることが判明した。そのため、スナメリの初代細胞に対してはハブスオウギハクジラで成功した事例を参考に遺伝子導入の条件を設定して実験を行なった。

遺伝子導入による hTERT 遺伝子の存在を確認するために、遺伝子導入した細胞から抽出した DNA を鋳型にして、hTERT 遺伝子の増幅を試みた。その結果、遺伝子導入を試みた全てのスナメリ細胞で hTERT 遺伝子が検出されなかった(図1)。

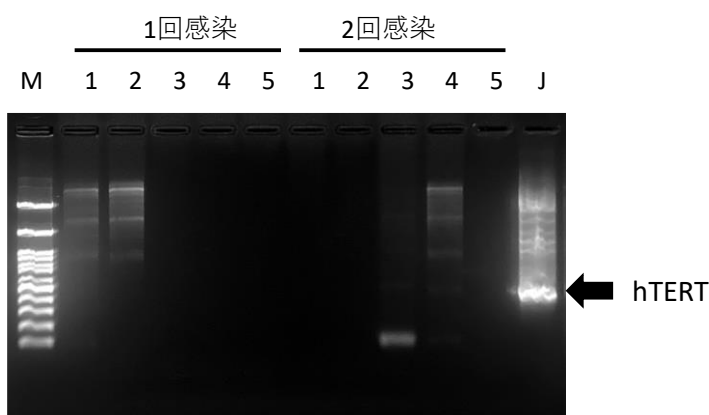


図1 M:サイズマーカー、1: ポリブレン濃度 0.5 μ g/ml、2: ポリブレン濃度 1 μ g/ml、3: ポリブレン濃度 2 μ g/ml、4: ポリブレン濃度 3 μ g/ml、5: ポリブレン濃度 6 μ g/ml、J:ヒト白血病由来 Jurkat 細胞

ポリブレンはレンチウイルスベクターを遺伝子導入する際に使用するが、細胞毒性が高いことが知られている。そのため、スナメリ細胞においてはポリブレンに対する感受性が高かったため、遺伝子導入されなかったと考えられる。

【今後の問題点】

遺伝子導入に使用するポリブレンは細胞毒性を示すため、標的細胞に対するポリブレンの最適濃度を検討する必要があると考えられる。また、近年、遺伝子導入が困難な細胞あるいはポリブレンに感受性のある細胞の場合は、代替の遺伝子導入補助剤として細胞膜-ウイルス粒子間の静電反発力を中和する試薬が選択される場合がある。そのため、鯨類の細胞に最適な遺伝子導入補助剤を考慮していきたい。