

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、ヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子を導入することで不死化細胞の樹立を試みているが、不死化の誘導には至っていない。

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。本研究では、効率よく hTERT 遺伝子の導入を行うために、ポリブレン以外の遺伝子導入補助剤を検討し不死化細胞の樹立を目指すことを目的とする。

【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。

・トランスフェクション

培養細胞に対して hTERT 発現ベクターウイルス上清および SV40 T 抗原遺伝子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。TransDux MAX Lentivirus Transduction Enhancer (System Bioscience 社、米国) を添加し、hTERT 発現ベクターを含むウイルス上清、または SV40 T 抗原遺伝子発現ベクターウイルス上清を細胞に添加した。トランスフェクション後、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 による導入遺伝子の検出

トランスフェクション後のスナメリ細胞の DNA を鋳型として、hTERT 遺伝子および SV40 T 抗原遺伝子の確認のためにダイレクト 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 SV40 T 抗原遺伝子の確認には、メーカー推

奨 の SV40 F: 5' GACTCAGGGCATGAAACAGG 3'、SV40 r: 5' ACTGAGGGGCCTGAAATGA 3' 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】

鯨類の細胞はポリブレンに感受性があると考えられたため、代替の遺伝子導入補助剤を使用して不死化を誘導する hTERT 遺伝子または SV40 T 抗原遺伝子の導入を試みた。

その結果、hTERT 遺伝子の導入を試みた全てのスナメリ細胞で hTERT 遺伝子の増幅が検出されなかった(図1)。検出する hTERT 遺伝子バンドのサイズは 500bp であるため、いくつかのレーンで観察されているバンドは非特異的な増幅と考えられる。加えて、遺伝子導入後のスナメリ細胞株は、継代後に細胞の増殖が鈍化したため、遺伝子が導入されなかったと考えられる。

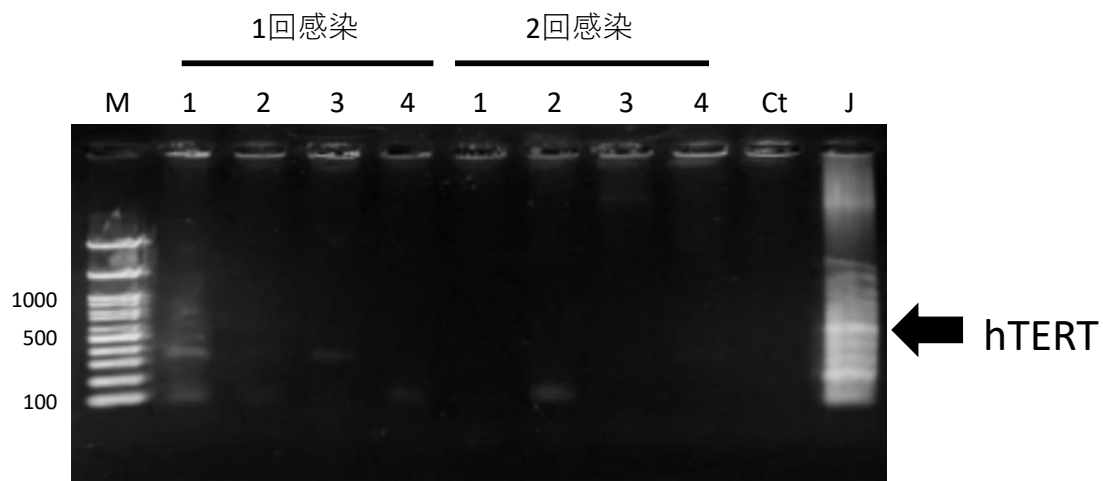


図1 M: サイズマーカー、1: MOI: 1, 6hr、2: MOI: 2, 6hr、3: MOI: 3, 6hr、4: MOI: 3, 24hr、Ct: スナメリ細胞、J: ヒト白血病由来 Jurkat 細胞

一方、SV40 T 抗原遺伝子の導入を試みた全てのスナメリ細胞で SV40 T 抗原遺伝子の増幅が確認できた(図2)。そのため、SV40 T 抗原遺伝子が導入された細胞株は不死化が誘導されている可能性が高い。

hTERT 遺伝子は、高い多重感染度 (Multiplicity of Infection; MOI) においても全く遺伝子の導入が確認されなかったが、SV40 T 抗原遺伝子に関しては低 MOI でも遺伝子導入が可能であることが判明した。このことから遺伝子によって導入効率が異なる可能性があることが示された。

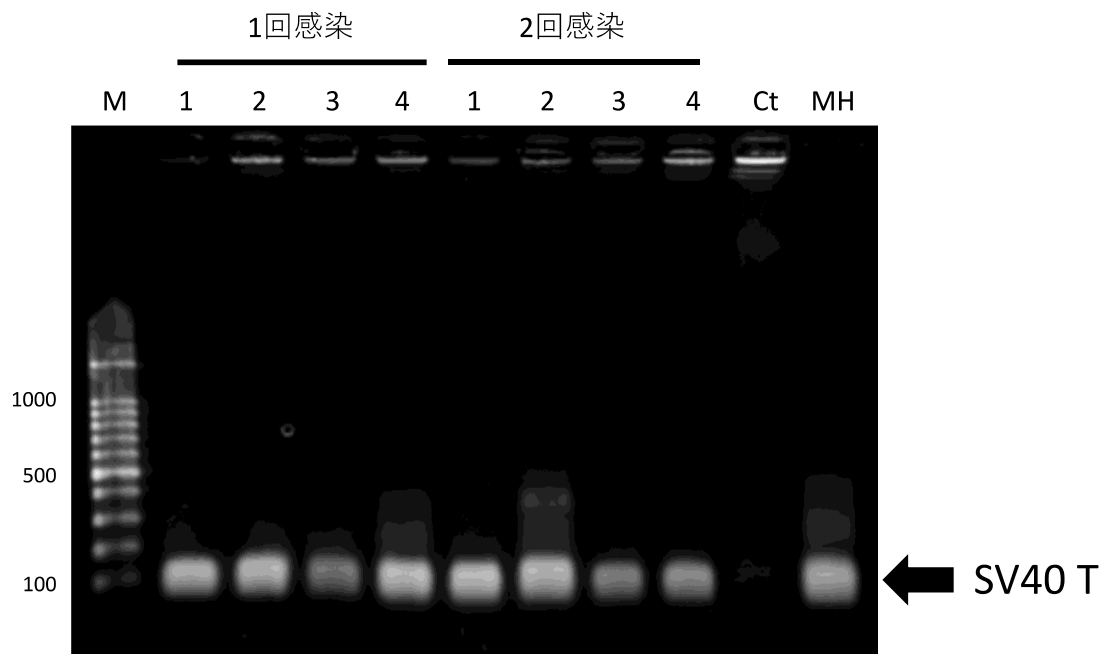


図1 M: サイズマーカー、1: MOI: 1, 6hr、2: MOI: 2, 6hr、3: MOI: 3, 6hr、4: MOI: 3, 24hr、Ct: スナメリ細胞、MH: SV40 T 抗原遺伝子導入ヒト細胞株 MH7A 細胞

【今後の問題点】

本研究で使用した遺伝子導入剤は細胞毒性が低かったが、hTERT 遺伝子の導入には至らなかった。遺伝子導入が困難な細胞に対する遺伝子導入剤が存在しているため、鯨類の細胞に最適な遺伝子導入補助剤を考慮する必要がある。一方で SV40 T 抗原遺伝子に関しては容易に導入されたことから、導入する遺伝子によって導入効率が異なる可能性が示された。

今後、遺伝子による導入効率の違いや SV40 T 抗原遺伝子を導入したスナメリ細胞の特徴を明らかにしていきたい。