

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07432

研究課題名(和文) 染色体不安定性を伴わない野生鳥類無限分裂細胞を用いた鳥インフルエンザ評価系の構築

研究課題名(英文) Establishment of evaluation system for the avian influenza

研究代表者

片山 雅史 (Katayama, Masafumi)

国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・特別研究員

研究者番号：80784090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鳥インフルエンザ評価系の構築を見据えた、野生鳥類由来の無限分裂細胞(不死化細胞)の樹立を試みた。これまで、ニワトリを含めた鳥類の不死化細胞の樹立は、数報のみであり、鳥類の不死化細胞の樹立は容易でない。本研究では、細胞周期関連2遺伝子および、TERT遺伝子を用いて、鳥類由来の不死化細胞の樹立を試みた。ニワトリおよび数種類の野生鳥類への遺伝子導入の結果、部分的に細胞老化現象が回避できた。さらに、前記の3遺伝子を導入した細胞において、数株の安定細胞増殖可能な細胞株取得に成功した。野生鳥類由来の不死化細胞の樹立報告はこれまで得られておらず、極めてユニークな細胞の樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish the wild avian derived immortalized cell line. The avian derived immortalized cell is rare, therefore establishment is not easy. To establish the immortalized cell, we used three genes (CDK4, CyclinD and TERT). The avian derived cells were increased cell division number by that of three genes, but did not immortalize. So we concluded that that of three genes are partially avoid the cellular senescence in the avian cells. Additionally, we obtained wild avian derived immortalized cells from three genes transfected avian cells. It's a very unique cells, because, as far as our knowledge, this is first report of wild avian derived immortalized cells.

研究分野：統合動物科学

キーワード：不死化細胞 鳥類 感染症評価系

## 1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザ、特に H5N1 ウイルスはヒトにおける発症が報告されており、死亡者も確認されている。幸いなことに、国内におけるヒトへの感染報告はないが、将来的に H5N1 ウイルスへの変異などからヒトへの感染や、ヒト-ヒト間の感染能力の獲得によりパンデミック感染の可能性も懸念されており、対策が必要である。

鳥インフルエンザは、海外の発生源から鳥インフルエンザ感染野生鳥類の侵入による伝播が示唆されている。一方で伝播主である野生鳥類のインフルエンザウイルスに関する種間の感染感受性や細胞内増殖性の差異は、これまで報告されていない。このような背景のもと、*in vitro* において、野生鳥類の評価系を構築できれば、鳥インフルエンザの伝播主が特定され、伝播経路がより詳細に明らかになるため、効率的な予防や囲い込みを計画することができる。

一方で初代培養細胞は、培養を続けると細胞増殖が停止する(細胞老化現象)。そのため、長期間の維持が難しく、性質も安定しないため、感染症の評価系としては不適切である。この点を解決するため、無限増殖細胞(不死化細胞)の樹立は極めて有用である。

これまで無限増殖細胞樹立のために、SV40T 遺伝子やヒトパピローマウイルス由来 E6E7 遺伝子が使用されてきた。これらの方法は、染色体不安定性を伴い、初代培養細胞と性質が変わる問題点がある。細胞周期と密接に関わるインフルエンザウイルス(分裂期の細胞には付着しない)の評価系構築を目指す本研究においては、初代培養細胞に近い無限増殖細胞の樹立が望ましい。

このような背景のもと、本研究では、比較的初代培養細胞の性質に近い、鳥類由来の不死化細胞の樹立を発想した。共同研究者の国立がん研究センターの清野主任分野長のグループにおいて、元の細胞の性質を保ったまま細胞老化を回避する方法として、ヒト由来変異型 CDK4, CyclinD1, TERT (telomerase reverse transcriptase) 導入方法が開発された(Shiomi et al. 2011. Gene Ther.)。このシステムは、p16 由来のシグナルを無効化させることで細胞老化を回避する。注目すべきは、がん抑制遺伝子としても知られる p53 は正常なまま細胞老化機構から抜け出す点である。加えて、テロメア長の短縮を回避するために、TERT 遺伝子を強制発現することによって、内在性の TERC (telomerase RNA component) を鋳型として、テロメアーゼが発現するシステムである。このシステムによって、多くの哺乳類細胞が不死化できることが報告されている。

このような背景のもと、本研究では変異型 CDK4, CyclinD1 を使用した無限増殖細胞の樹立を発想した。これらの遺伝子は哺乳類から酵母まで高い相同性を示しており、鳥類にも有効であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、野生鳥類の無限増殖細胞を樹立し、鳥インフルエンザの感染感受性と細胞内増殖の評価を実施する。将来的にはゲノム編集技術を利用し、より簡便な鳥インフルエンザウイルスの感染感受性と細胞内増殖に関する評価系構築を目的としている。

本研究では、線維芽細胞を用いて無限増殖細胞を樹立する。現在まで、鳥インフルエンザ特異的な受容体である 2,3 型受容体が鳥類の線維芽細胞に発現すること、皮膚組織においてインフルエンザウイルスが増殖することが確認されている。したがって、野生鳥類の線維芽細胞を利用することで、野生鳥類のインフルエンザウイルス感染の感受性と細胞内増殖に関する評価系が樹立できる大きな可能性が示唆されている。

野生鳥類の *in vitro* 研究自体が極めて限定されている当該分野において、このような野生鳥類の評価系構築は未だ報告がない。本研究が成功することで、致死性を示す人獣共通感染症である鳥インフルエンザの媒介主である野生鳥類の、インフルエンザウイルスに対する感染感受性や細胞内増殖の評価ができ、迅速な媒介主の推定が期待される。本提案は効果的なウイルス封じ込めや、パンデミックの抑制への貢献が期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、鳥類データベースが充実しているニワトリをモデル動物とし、インフルエンザの媒介主として考えられている猛禽類ならびに絶滅が危惧され、感染症の感受性の評価が必要と考えられたヤンバルクイナに関して、無限増殖細胞の樹立を試みた。本研究では、これらの鳥類由来の線維芽細胞へ変異型 CDK4, CyclinD および TERT の導入を実施した。遺伝子導入はレンチウイルスを用いて導入を実施した。具体的には、CSII-CMV-CDK4R24C, CSII-CMV-Cyclin D, CSII-CMV-TERT プラスミド(国立がんセンター研究所、清野透分野長から分与を受けた)および HIV-gp ならびに CMV-VSVG-RSV-REV パッケージプラスミド(理化学研究所、三好ユニトリリーダーより分与を受けた)をリポフェクション法によって 293T 細胞へ導入し、組み換えウイルスを含む培養上清を取得した。この上清を濃縮し、鳥類由来細胞へ導入した。なお、これらの遺伝子の導入前に、サルゲートマーカーとして EGFP を導入しその蛍光を確認することで、プロモーター活性を含めて、問題なく遺伝子が発現することを予め確認した。樹立した細胞は Population doubling level analysis により細胞増殖能力を解析した。

## 4. 研究成果

本研究では、まず、鳥類細胞の培地の検討を実施した。一般的な DMEM を始め数種類

の培地を用いて細胞増殖を検討したところ、KAv-1 培地が最も活発に細胞増殖できることを明らかにした。そこで、本研究では KAv-1 培地を用いて研究を実施した。

本研究では、ニワトリ、猛禽類、ヤンバルクイナのいずれにおいても、初代培養細胞と比較して、変異型 CDK4, CyclinD1, TERT 導入細胞(以降 K4DT 細胞)において、細胞増殖能力が亢進した。この結果をより詳細に明らかにするために、これらの遺伝子および細胞周期関連遺伝子のアミノ酸配列をヒト由来の配列と比較を実施した。猛禽類やヤンバルクイナのゲノム情報はこれまで、明らかになっていなかったため、これまで、このような比較を実施することは出来なかった。しかしながら、我々の研究グループでは、野生鳥類由来の全ゲノム解読を進めており、ゲノム情報を入手することができた。CDK4 に関しては、鳥類では、今の所明らかになっていないため、CDK4 と配列および機能が近似する CDK6 の配列と比較することで実施した。比較の結果、これらの遺伝子配列は TERT を除き、高い相同性を示す結果となった。特に、p16 との結合部位である CDK4R24 (CDK6R31)に関しては完全に一致することが明らかになった。これらの結果は、鳥類の細胞において、変異型 CDK4, CyclinD1 の導入により p16 由来のシグナルが無効化されていることを示すものである。一方で TERT に関しては約 70%程度の相同性しか示さなかったが、テロメラーゼ発現が確認できたことから、テロメア長修復機構は機能していると考えられた。以上の結果から、K4DT システムは鳥類においても機能できることが明らかになった。

しかしながら、K4DT 細胞は、細胞増殖は大幅に亢進するものの、最終的には細胞増殖が停止することが明らかになった。この問題を解決するために、様々な遺伝子を導入し、試行錯誤を繰り返したが、不死化まではたどり着けず、効率的な不死化細胞の樹立は出来なかった。

一方で、野生鳥類を含めて、K4DT 細胞の一部から、長期間の培養を経て不死した細胞株の取得に成功した。このような現象は、初代培養細胞では、認められなかった。この細胞は染色体の多倍体化が回避されていた。不死化細胞の樹立報告自体が限定されている鳥類において、野生鳥類由来の不死化細胞の樹立は、初めての報告であり、非常にユニークな細胞株の取得に本研究では成功した。この細胞株はハンドリングが容易であるため、感染症の評価系に使用することで、簡便な感染症評価系の構築が期待される。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Katayama M, Hirayama T, Tani T, Nishimori K, Onuma M, Fukuda T. Chick derived induced pluripotent stem cells by the poly-cistronic transposon with enhanced transcriptional activity. J Cell Physiol. 2018 Feb;233(2):990-1004. 査読有 doi:10.1002/jcp.25947.

2. Katayama M, Hirayama T, Kiyono T, Onuma M, Tani T, Takeda S, Nishimori K, Fukuda T. Immortalized prairie vole-derived fibroblasts (VMF-K4DTs) can be transformed into pluripotent stem cells and provide a useful tool with which to determine optimal reprogramming conditions. J Reprod Dev. 2017 Jun 21;63(3):311-318. 査読有 doi:10.1262/jrd.2016-164.

3. Fukuda T, Iino Y, Eitsuka T, Onuma M, Katayama M, Murata K, Inoue-Murayama M, Hara K, Isogai E, Kiyono T. Cellular conservation of endangered midget buffalo (Lowland Anoa, Bubalus quarlesi) by establishment of primary cultured cell, and its immortalization with expression of cell cycle regulators. Cytotechnology. 2016 Oct;68(5):1937-47. 査読有 doi:10.1007/s10616-016-0004-0.

[学会発表](計 5 件)

片山雅史, 平山貴士, 谷哲弥, 西森克彦, 大沼学, 福田智一. 転写活性強化型 Oct3/4 連結 poly-cistronic ベクターを用いたニワトリ体細胞由来 iPS 細胞の樹立. 第 23 回日本野生動物医学会大会. 2017 年 9 月 1 日~3 日. 東京.

福田智一, 鈴木真奈美, 片山雅史, 清野透, 大沼学. オガサワラオオコウモリ由来の無限分裂細胞の作成の試み. 第 23 回日本野生動物医学会大会. 2017 年 9 月 1 日~3 日. 東京.

片山雅史, 平山貴士, 谷哲弥, 西森克彦, 大沼学, 福田智一. 転写活性化型 Oct3/4 を用いたニワトリ体細胞由来 iPS 細胞の樹立. 日本動物細胞工学会 2017 年度大会 (The 30th Meeting). 2017 年 7 月 20 日~21 日. 松山.

片山雅史, 清野透, 大沼学, 村山美穂, 福田智一. ヤンバルクイナ線維芽細胞からの不死化細胞の樹立. 第 22 回日本野生動物医学会. 2016 年 9 月 16 日~18 日. 宮崎

福田智一, 飯野佑佳, 永塚貴弘, 大沼学, 片山雅史, 村田浩一, 村山美穂, 原久美子, 清野透. 絶滅危惧スイギュウの一種、ローランドアノア由来の無限分裂細胞の作成. 東北畜産学会. 2016 年 9 月 6 日~9 月 7 日. 盛岡

市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 雅史 (Katayama Masafumi)  
国立環境研究所・生物生態系環境研究センター・特別研究員  
研究者番号：80784090