

平成21年 6月29日現在

研究種目 若手研究 (B)
研究期間: 2006~2008
課題番号: 18780081
研究課題名 (和文) ウシ脳由来機能性細胞株の樹立及びその利用技術の開発
研究課題名 (英文) Establishment and characterization of immortalized cell lines derived from bovine brain tissues
研究代表者 竹之内 敬人 (TAKENOUCHI TAKATO)
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター・主任研究員
研究者番号: 20292518

研究成果の概要:

本研究ではウシ胎子脳から機能性細胞株を樹立し、その特性解析を行うとともに牛海綿状脳症 (BSE) 研究への利用を検討した。その結果、内皮細胞様及び神経細胞様の性質を持つ新しいウシ脳由来細胞株を樹立した。これらの細胞には正常ウシプリオン蛋白の発現が確認され、BSE 研究への利用も期待された。そこで BSE プリオン感染実験を行ったが、現在までのところ持続感染細胞の樹立には至っておらず引き続き検討が必要である。

交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	800,000	0	800,000
2007年度	600,000	0	600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	180,000	2,180,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 農芸化学・応用生物化学

キーワード: ウシ脳由来細胞株、内皮細胞様細胞株、神経様細胞株、プリオン蛋白、BSE

1. 研究開始当初の背景

牛海綿状脳症 (BSE: bovine spongiform encephalopathies) は異常プリオン蛋白が病原体と考えられるプリオン病の一つであり、ヒトプリオン病である新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病との関連も疑われている。プリオン病には「種の壁」が存在し、動物種を越えた感染は一般に起こりにくいと考えられているが、まだ未解明の部分も多く残されており、さらなる研究の発展が必要である。異常プリオン蛋白と宿主との相互作用を調べる上でマウス培養細胞株を用いた *in vitro*

感染モデル系の有効性が知られている。BSE 研究においても *in vitro* 細胞モデル系の作出は異常ウシプリオン蛋白と宿主との相互作用の解析に役立つことに加え、貴重な研究材料である BSE 病原体を増やすという意味においても大変重要である。そのためには「種の壁」をクリアできるウシ脳由来の細胞株が必須となる。しかしながらこれまで胎子材料の採取機会が極めて限られることなどもあり、無限増殖能を持った汎用性のあるウシ脳由来細胞株を樹立しようという試みはまだない。BSE プリオンに感受性の高い細胞株を

スクリーニングするためにも、多様なウシ脳由来細胞株を樹立することには大きな意義があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、BSEなどウシの脳に病変を引き起こす感染症研究への利用をはかるため、ウシ胎子脳組織を材料として初代培養の後不死化遺伝子を導入し、神経細胞やグリア細胞等固有の特性を有した様々な機能性細胞株の樹立を行う。また、樹立された細胞株を用いてBSEプリオンの感染実験を行う。

3. 研究の方法

(1) ウシ胎子脳由来細胞の初代培養及び不死化細胞株の樹立：凍結保存したウシ胎子（3ヶ月齢、7ヶ月齢）脳組織を酵素処理により分散した後、10%ウシ胎子血清、上皮細胞増殖因子（EGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）などを添加した培地で初代培養を行った。この細胞にSV40-large T遺伝子を含むプラスミドpSV3neoを導入し、G418薬剤耐性を指標に不死化細胞株を樹立した。

(2) 不死化細胞株の特性解析

① 免疫染色：細胞を8穴チャンバースライドに播種し、ホルマリン溶液で固定した後、各種蛋白質に対する特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。

② ウェスタンブロット解析：細胞抽出液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離しメンブレンに転写した後、各種蛋白質に対する特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(3) 異常ウシプリオン蛋白の検出：異常ウシプリオン蛋白は正常型とその物理的・生化学的性質が異なるため、蛋白質分解酵素に対して部分抵抗性を持つ。よって細胞抽出液等をプロテアーゼKで処理した後ウェスタンブロットを行うことで異常ウシプリオン蛋白を検出した。

(4) BSEプリオンの*in vitro*感染実験：細胞をシャーレに播種し、BSE感染牛の脳ホモジネートを含む培地に暴露した。細胞は洗浄し過剰な脳ホモジネートを除去した後、継代培養を行った。各継代数で異常ウシプリオン蛋白を検出した。

4. 研究成果

(1) 内皮細胞様細胞株の樹立

3ヶ月齢ウシ胎子脳由来の初代培養細胞にSV40-large T遺伝子を導入し、2種類の新規細胞株（C6及びC9細胞）を樹立した。C6、C9細胞は敷石状の形態を呈し、集団倍加数

200回以上の増殖能を持っていた。またその細胞増殖能の維持にはbFGFの添加が重要であることがわかった。免疫染色の結果、内皮細胞マーカーであるvon Willebrand Factor（vWF）に陽性であった。さらに培地中からEGF、bFGFを除くことによって平滑筋細胞マーカーである α -smooth muscle actin陽性の細胞が増加した。内皮細胞としての機能を検討したところ、マトリゲル上での培養で血管様の管状網目構造が構築され、さらにDiI-labeled acetyl-low density lipoprotein（DiI-AcLDL）の取込みも観察された。

以上の結果から、C6、C9細胞は脳内血管を形成する内皮細胞様の性質を持つ細胞株であると推察された。また、内皮細胞から平滑筋細胞への分化転換（transdifferentiation）のモデルとして使える可能性が示唆された。これらの細胞株には正常ウシプリオン蛋白の発現が確認された。

(2) 神経様細胞株の樹立

7ヶ月齢ウシ胎子脳由来の初代培養細胞にSV40-large T遺伝子を導入し、限界希釈法により集団倍加数100回以上の紡錘状の形態を呈した単一の新規細胞株を樹立した（FBBC-1細胞、図1A）。FBBC-1細胞の増殖性は、増殖培地からEGF及びbFGFを除くことで有意に減少した。また神経細胞分化誘導剤として知られるジブチリルcAMP（dbcAMP）やforskolinで処理すると増殖抑制に加えて神経突起様の形態を誘導し（図1B、C）、神経細胞マーカー蛋白質であるtubulin β IIIの発現量も増加する（図1D）ことから神経前駆細胞の性質を持つ細胞株であることが示唆された。またこの細胞では、正常ウシプリオン蛋白の発現も確認された（図1E）。

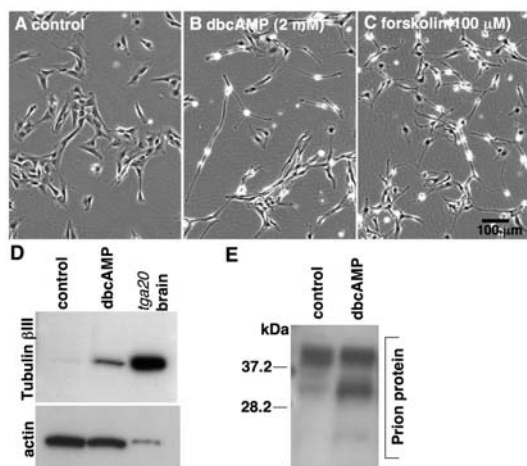


図1 FBBC-1細胞の形態（A）、神経様細胞への分化誘導（B-D）、正常ウシプリオン蛋白の発現（E）。Dではtubulin β III発現のポジティブコントロールとして正常プリオン蛋白高発現トランスジェニック

マウス (tga20) 脳抽出液を用いた。

これまでに汎用性のあるウシ由来の神経様細胞株はまだ存在しないので、ウシの神経系疾患やウシ脳機能研究のための新しい *in vitro* モデルとしてもその有用性は高いと考える。

(3) BSE プリオン感染実験

FBBC-1 細胞を用いて BSE プリオンの *in vitro* 感染実験を行った。細胞をシャーレに播種し、イギリスより輸入された野外発生 BSE 感染牛脳ホモジネートに暴露した。過剰な脳ホモジネートを洗浄後 5 回の継代の後、各継代数においてプロテアーゼ K 抵抗性の異常ウシプリオン蛋白をウエスタンブロット法により検出した。その結果、2 継代目までは異常ウシプリオン蛋白が検出され、エンドサイトーシス等で異常型が細胞内に取り込まれていることが示唆されたが、5 継代目では異常型は完全に消失してしまい持続的な感染は確認できなかった。問題点として野外発生 BSE 感染牛脳ホモジネートでは感染因子の劣化・減少が考えられるため、実験的に BSE を感染させた牛の比較的新鮮な脳ホモジネートでも検討したが、残念ながら現在までのところ持続的な *in vitro* 感染系の確立には至らなかった。

また *in vitro* 感染系の成立には細胞での正常プリオン蛋白の高発現も重要であることが知られている。FBBC-1 細胞の内因性の正常ウシプリオン蛋白の発現量では不十分であった可能性も考えられるため、ウシプリオン蛋白遺伝子をほ乳動物細胞発現ベクターである pCEP4 に組み込んだプラスミドを作製し、この細胞株への遺伝子導入について検討した。その結果、リポフェクタミン法により FBBC-1 細胞には遺伝子導入が可能であることがわかった。今後は選択薬剤を用いて安定的に正常ウシプリオン蛋白を高発現する FBBC-1 細胞株を樹立し *in vitro* 感染実験を検討したいと考えている。

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 7 件)

- ① Takenouchi T., Nakai M., Iwamaru Y., Sugama S., Tsukimoto M., Fujita M., Wei J., Sekigawa A., Sato M., Kojima S., Kitani H., and Hashimoto M., The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells. *J. Immunol.*, 182: 2051-2062, 2009. (査読有)
- ② Takenouchi T., Iwamaru Y., Sato M.,

Yokoyama T., Kitani H., Establishment of an SV40 large T antigen-immortalized bovine brain cell line and its neuronal differentiation by dibutyryl cyclic AMP. *Cell Biol. Int.*, 33: 187-191, 2009. (査読有)

- ③ 竹之内敬人, 岩丸祥史, 横山隆, 木谷裕, ミクログリア細胞株を用いたプリオン持続感染モデル系の作出とその特性解析、*生化学*, 80 巻 7 号 p642-646, 2008 年。(査読有)
- ④ Takenouchi T., Iwamaru Y., Sugama S., Sato M., Hashimoto M., and Kitani H., Lysophospholipids and ATP mutually suppress maturation and release of IL-1 β in mouse microglial cells using a Rho-dependent pathway. *J. Immunol.* 180: 7827-7839, 2008. (査読有)
- ⑤ Takenouchi T., Sato M., Kitani H., Lysophosphatidylcholine potentiates Ca²⁺ influx, pore formation and p44/42 MAP kinase phosphorylation mediated by P2X7 receptor activation in mouse microglial cells. *J. Neurochem.*, 102: 1518-1532, 2007. (査読有)
- ⑥ Takenouchi T., Iwamaru Y., Imamura M., Kato N., Sugama S., Fujita M., Hashimoto M., Sato M., Okada H., Yokoyama T., Mohri S., Kitani H., Prion infection correlates with hypersensitivity of P2X7 nucleotide receptor in a mouse microglial cell line. *FEBS Lett.*, 581: 3019-3026, 2007. (査読有)
- ⑦ Takenouchi T., Iwamaru Y., Sato M., Yokoyama T., Shinagawa M., Kitani H., Establishment and characterization of SV40 large T antigen-immortalized cell lines derived from fetal bovine brain tissues after prolonged cryopreservation. *Cell Biol. Int.*, 31: 57-64, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 竹之内敬人, 木谷裕、ミクログリアでの ATP による成熟型インターロイキン-1 β 産生に対するリゾリン脂質の効果、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡。
- ② 竹之内敬人, 岩丸祥史, 洲鎌秀永, 佐藤充, 橋本款, 木谷裕, リゾリン脂質と ATP はミクログリアにおける成熟型インターロイキン-1 β の産生を互いに抑制する、BMB2008、2008 年 12 月 8 日、神戸。
- ③ 竹之内敬人, 佐藤充, 木谷裕, リゾホスファチジルコリンによるミクログリア P2X7 受容体の機能調節、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 26 日、名古屋。
- ④ Takenouchi T., Sugama S, Sato M, Kitani H, Potentiation of nucleotides-induced P2X7

receptor activation by
lysophosphatidylcholine in mouse
microglial cells. Society for Neuroscience、
2007年11月7日、サンディエゴ(米国)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹之内 敬人 (TAKENOUCHI TAKATO)
独立行政法人農業生物資源研究所
遺伝子組換え家畜研究センター
主任研究員
研究者番号：20292518