

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05831

研究課題名(和文)イルカにおける不死化細胞株の樹立

研究課題名(英文)Establishment of immortal dolphin cell line

研究代表者

伊藤 琢也 (ITOU, Takuya)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20307820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、増殖能を有したイルカ組織由来の不死化細胞の樹立を試みた。イルカの諸臓器から一般的な組織培養条件のもとで培養を試みたところ、腎臓および肺組織を由来とする細胞において、数継代の培養が維持され、細胞株の樹立には、これらの臓器由来細胞を選択することが有用であると判断された。なお、これら培養細胞は継代を重ねると分裂能力が低下し、継代不可能となったため、細胞不死化の誘導に関与するSV40T抗原遺伝子およびTERT遺伝子を腎臓由来細胞に導入し、細胞の継代を重ねることによって増殖能を維持したまま継代可能な細胞を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イルカの生理学および細胞生物学的研究を行う場合は、入手できた生体試料を起点にして研究が始まるため、実験計画の立案や実験内容、回数に制約が大きく、また得られる研究データも個体差が大きく影響して、科学研究に重要な再現性や精度の高い実験の遂行が困難である。このように、生体試料を高品質な状態で安定的に入手することが難しいイルカの生物学的研究には、機能が不変で安定した生体反応や高精度、再現性の高い結果が期待できる、永続的に増殖する不死化培養細胞が有用である。本研究で得られた細胞は、特定されていない海生哺乳類のイルカ健康や生命を脅かすウイルス感染症の原因病原体の検出や病態発現機序究明に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to establish proliferative dolphin tissue-derived immortalized cells. When culturing from various organs of dolphins was attempted under general tissue culture conditions, several passages of culture were maintained in cells derived from kidney and lung tissues. Therefore, it was determined that it would be useful to select cells derived from these organs to establish cell lines. In addition, these cultured cells became incapable of passage due to a decrease in mitotic ability after repeated passages. When the SV40T antigen gene and TERT gene involved in the induction of cell immortalization were introduced into kidney-derived primary cells and cell culture was continued, passageable cells could be established while maintaining proliferative capacity.

研究分野：農学

キーワード：イルカ 培養細胞 腎臓 不死化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

野生および飼育下の鯨類では数多くの感染症が報告されていて、それらの健康や生命を脅かし、野生下においては時に個体群を絶滅に導く要因に成りえる。中でもウイルスを原因とする感染症については一部明らかになっているが、病原体が同定されず未だ原因が特定できていないものが多い。その理由として、陸生哺乳類ではウイルスの分離・培養に不可欠な生細胞として不死化して永久増殖能を有した多種多様な株化培養細胞が利用可能であるが、鯨類ではそのような半永久的に増殖可能で広く利用可能な株化細胞は現在存在していない。

株化細胞の樹立は、一般的に動物の臓器や組織から得られる「初代培養細胞を培養下で植継ぎ継代を重ねることによって自然発生的に株化細胞を得る方法」と「腫瘍ウイルス由来遺伝子を初代培養細胞に導入してガン化に似た状況を強力に誘発して株化細胞を得る方法」の2つがある。前者の場合、その成功は動物種や試行回数に依存するところがあり、後者では遺伝子導入できる細胞種の制限や導入後の外来ウイルス遺伝子による正常遺伝子発現の攪乱影響を排除できない課題がある。鯨類ではこれまで新鮮組織を出発材料とした初代培養細胞の作出やある程度継代が可能な細胞株の樹立は我々を含めて数例の報告がある (Michael *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2005; Burkard *et al.*; Suzuki *et al.*, 2016)。しかし、いずれも完全な不死化細胞株の樹立には成功していないと考えられ、そのことは ATCC 等の国際的な細胞バンクに利用可能な鯨類由来細胞が存在しないことによって裏付けられている。鯨類由来の不死化細胞株の樹立を成功させるには、鯨類細胞が生体内で置かれている生化学的環境の把握と人工培養下でのその再現、および鯨類細胞における細胞増殖・老化に関する遺伝子発現調節の分子機構の解明が不可欠と考えられ、これらの課題解明が鯨類の不死化細胞樹立につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、これまで鯨類では得られていない半永久的に利用可能なイルカ由来不死化培養細胞株の樹立が目的である。

一般的に細胞培養を行う場合、培養液の調整・選択は重要で通常各種栄養成分を含む人工培養液と細胞増殖因子など生理活性物質を含む牛胎児血清を用いるが、既存の培養液は陸生哺乳類の細胞生存や細胞増殖に最適化された成分組成である。イルカを含む海生哺乳類の体液組成の基本性状は陸生動物と類似しているが、血中尿素濃度や浸透圧調節機構など、劇的に異なる要素もある。したがって、イルカの細胞を適正環境状態で維持するためにはその体液組成の特徴を把握し、可能な限りイルカの体液組成に近づけた培養液を用いることが妥当と考えられる。このイルカ培養細胞の増殖維持に最適化した培地の作製を目指す。

また細胞不死化に関わる分子機構は完全に解明されていないが、多数の不死化細胞株が樹立されている陸生哺乳類では、細胞増殖や細胞老化に関わる遺伝子の制御による細胞不死化の促進が報告されているため、それらの相同遺伝子はイルカの細胞においても不死化制御の候補となりうる。それら候補遺伝子を含む細胞不死化関連遺伝子をイルカで探索するためにイルカの初代培養細胞およびその継代細胞(老化細胞)を用いた発現遺伝子群の比較解析を行い、不死化関連遺伝子を同定し、外来遺伝子導入やゲノム編集技術等を応用してそれらの遺伝子の人為的制御を行うことによって無限増殖能を有したイルカ不死化細胞の樹立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) イルカ組織由来細胞の初代培養

関係部署の許可を得て新鮮なイルカの臓器を入手し、各臓器の組織を無菌的に切り出して細切、あるいは蛋白質分解酵素を用いて分散させた細胞を培養フラスコに播種して、各種培養液に種々の濃度の牛胎児血清(FBS)および抗生物質を添加した培地によって組織培養を行った。これらの培養フラスコで増殖が認められた細胞を初代培養細胞として凍結保存、あるいはトリプシン/EDTAによってフラスコから剥離したのち、新しいフラスコに播種することによって継代を行った。細胞増殖については、継代時の生細胞数のカウントおよび継代可能回数によって評価した。

#### (2) 細胞不死化のための外来遺伝子導入

陸生哺乳類細胞の初代培養細胞において分裂回数の延長を誘導する作用が報告されている外来遺伝子が複数知られている。その一つに、細胞の複製老化を誘導する腫瘍抑制遺伝子に結合して不活性化することで、細胞を不死化させる働きがあるウイルス遺伝子である simian virus 40 (SV40) large T (T) 抗原がある。SV40T 抗原の使用は、様々な培養細胞を不死化する方法であることが示されている。また、ヒト細胞などでは、テロメアの長さが細胞の分裂寿命に大きく影響することが知られ、テロメラーゼ逆転写酵素タンパク質(TERT)の発現調節による細胞の不死化手法が報告され、通常はほとんどの体細胞で不活性な状態である同タンパク質を、hTERT の導入で強制発現させることによって、細胞は複製老化を回避するのに十分なテロメア長を維持し、細胞株の不死化が促進されることがある。さらに、これらの細胞増殖に関わる外来遺伝子を共発現させると、特定の機能を維持した細胞が不死化された報告もある (Matsumura *et al.*, 2004;

Yang *et al.*, 2007)。そこで、本研究ではイルカの腎臓を由来として得た初代培養細胞に SV40T 抗原および hTERT 遺伝子をウイルスベクターによって導入し、培養を継続することによって不死化細胞の作出を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 初代培養細胞の培養

イルカの組織由来の細胞について初代培養と培養条件の最適化を検討した。イルカの諸臓器から一般的な組織培養条件(10%FBS 添加 D-MEM、5%CO<sub>2</sub>、37℃)のもとで培養を試みたところ、腎臓および肺組織を由来とする細胞において、数継代の培養が維持されることを確認した。諸臓器由来細胞の初代培養は数例試みたが、いずれの場合においても腎臓および肺由来の細胞で数回の継代が可能であった例が観察されたため、標準的な組織培養条件下におけるイルカ由来細胞株の樹立には、これらの臓器組織を材料とする細胞を選択することが有用であろうと判断された。数継代の増殖が確認できた培養細胞は凍結保存処理を行い、-80℃ 保冷庫で保管した数か月後に凍結融解した場合も再培養可能であることも確認した。なお、これら培養細胞はいずれも継代を重ねると分裂能力が低下し、継代不可能となったため、増殖能力が活発な時期の細胞と分裂能力が低下した細胞を採材して遺伝子発現解析に供する試料を確保した。

##### (2) 外来遺伝子導入による腎臓由来細胞の不死化

初代培養細胞のうち、比較的増殖能が高い腎臓由来細胞(図1)を用いて、不死化の誘導に関する SV40T 抗原遺伝子および hTERT 遺伝子を導入し、その後、導入細胞の継代を重ねることによって非導入細胞では増殖能が失われた継代数を超えても増殖能を維持したまま継代可能な細胞を得ることができた(図2)。なお本細胞からは遺伝子導入に用いたウイルスベクターを由来とするキャプシド蛋白質は検出されなかったため、増殖細胞にはベクターウイルスの残存がないことを確認した。2021年5月10日現在で、培養開始後日数は150日、PDL(集団倍加レベル)は60を超えている(図3)。

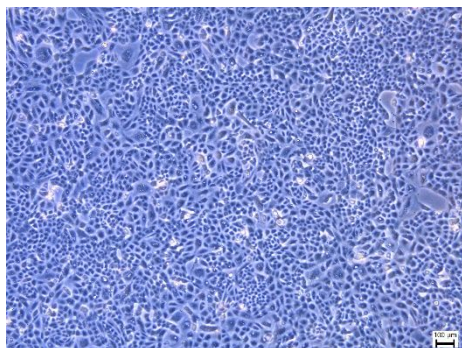


図1 初代培養腎臓細胞

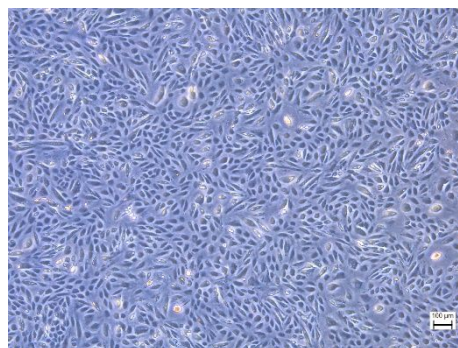


図2 遺伝子導入後の腎臓細胞

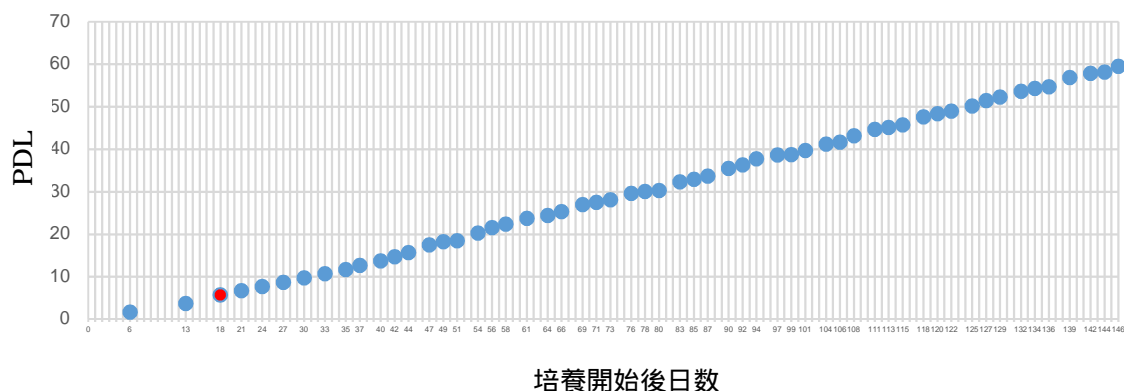


図3 遺伝子導入後のイルカ腎臓由来細胞の集団倍加レベル(PDL)  
赤は外来遺伝子を導入した継代ポイントを示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Mana, Hosoya Sho, Yoshikawa Sota, Ohki Shun, Kobayashi Yuki, Itou Takuya, Kikuchi Kiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 A highly flexible and repeatable genotyping method for aquaculture studies based on target amplicon sequencing using next-generation sequencing technology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43336-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yokomori Tamu, Tozaki Teruaki, Mita Hiroshi, Miyake Takeshi, Kakoi Hironaga, Kobayashi Yuki, Kusano Kanichi, Itou Takuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Heritability estimates of the position and number of facial hair whorls in Thoroughbred horses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-019-4386-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Yuki, Shimazu Tsukika, Murata Koichi, Itou Takuya, Suzuki Yoshiyuki	4. 巻 262
2. 論文標題 An endogenous adeno-associated virus element in elephants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 10～14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2018.04.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki A., Segawa T., Sawa S., Nishitani C., Ueda K., Itou T., Asahina K., Suzuki M.	4. 巻 126
2. 論文標題 Comparison of the gut microbiota of captive common bottlenose dolphins <i>Tursiops truncatus</i> in three aquaria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 31～39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jam.14109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hidaka Yuya, Lim Chang-Kweng, Takayama-Ito Mutsuyo, Park Chun-Ho, Kimitsuki Kazunori, Shiwa Nozomi, Inoue Ken-ichi, Itou Takuya	4. 巻 252
2. 論文標題 Segmentation of the rabies virus genome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 68 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.05.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yuki, Shimazu Tsukika, Murata Koichi, Itou Takuya, Suzuki Yoshiyuki	4. 巻 262
2. 論文標題 An endogenous adeno-associated virus element in elephants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 10 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.04.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kano Rui, Kobayashi Yuki, Nishikawa Akitoyo, Murata Ryo, Itou Takuya, Ito Takaaki, Suzuki Kazuyuki, Kamata Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Next-generation Sequencing Analysis of Bacterial Flora in Bovine <I>Prototheca</I> Mastitic Milk	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 E41 ~ E46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3314/mmj.18-00004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 二見 健人、小林 由紀、遠藤 智子、伊藤 琢也
2. 発表標題 LPS で刺激されたイルカ PBMC における炎症性サイトカインの発現動態
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中曽根英、鈴木亮彦、岡崎雅子、R. Jory Brinkerhoff、佐藤真伍、小林由紀、伊藤琢也
2. 発表標題 飼育下アザラシにおける腸内細菌叢のメタ 16S rRNA 解析
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳 皓大, 瀬川 太雄, 鈴木 美和, 岩田 秀一, 澤 修作, 加来 雅人, 駒場 昌 幸, 小林 由紀, 伊藤 琢也
2. 発表標題 バンドウイルカから分離された腸内定着性に優れた乳酸菌の探索
3. 学会等名 第24回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 亮彦, 瀬川 太雄, 澤 修作, 西谷 知佳, 植田 啓一, 伊藤 琢也, 朝比奈 潔, 鈴木 美和
2. 発表標題 国内飼育下バンドウイルカの腸内細菌叢の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第32回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 末吉 益雄、高井 伸二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 312
3. 書名 動物の衛生 第2版	

1. 著者名 Itou T, Markotter W, Nel LH.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 World Health Organization	5. 総ページ数 202
3. 書名 Laboratory Techniques in Rabies, Fifth Edition, Volume 2. (Eds) Charles E Rupprecht, Anthony R Fooks, Bernadette Abela-Ridder.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鈴木 美和  (SUZUKI Miwa)  (70409069)	日本大学・生物資源科学部・教授    (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------