

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25640117

研究課題名(和文)希少動物由来の培養細胞バンクとiPS細胞樹立の試み

研究課題名(英文) Establishment of cellular bank of critically endangered animals and challenge to the iPS cell transformation

研究代表者

福田 智一 (Tomokazu, Fukuda)

岩手大学・理工学部・教授

研究者番号：40321640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は絶滅危惧動物からの初代培養細胞の作成と、遺伝子導入によるiPS細胞もしくは無限分裂のような付加価値を加えた細胞の作成を目的とした。無限分裂細胞の誘導には主にレンチウイルスを用いた。レンチウイルスは核膜を通過できる性質を持つために、細胞分裂状態でしか遺伝子できないレトロウイルスよりも遺伝子導入効率において優れているとされている。我々は変異型CDK4、サイクリンD、TERTをサイトメガロウイルス由来のプロモータの制御下に発現するレンチウイルスを混合感染を行い、無限分裂誘導を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish the functional new cell lines (iPS cell lines and immortalized cell line) from critically endangered animals. We used the sea turtles, and lowland anoa, and african savanna elephant. The primary cells shows enlarged cytoplasm after the specific times of cell divisions. In these cell lines, senescence associated protein, p16 is expected to accumulated in its cytoplasm. In general, senescence cells shows positive staining for SA-beta galactosidase staining.

For the induction of immortalized cell lines, the genetic introduction by lentiviruses were used. The primary cells of the critically endangered animals were immortalized with the expression of mutant cyclin dependent kinase (CDK4) and Cyclin D, and enzymatic subunit of human derived telomerase.

研究分野：資源保全学、細胞生物学、遺伝学

キーワード：資源保存 生物多様性 遺伝学 細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、レッドリストに掲載される絶滅危惧種の数は増加している。特にウミガメ類は繁殖地である砂浜の喪失や四輪駆動車の乗り入れによって、繁殖が困難になっている。加えてアジア地方では高価な鼈甲の材料として違法な狩猟が続いており、個体数が減少している。これらの希少ウミガメ類を繁殖させる活動が行われている。しかし個体を繁殖させるには多くの時間と費用が必要である。我々はウミガメ類の培養細胞を保存し、我々の次世代の研究のために利用すること、加えて近年樹立された*iPS*細胞樹立技術を爬虫類に適用することを発想した。

また我が国の絶滅危惧種の数には年々増加の一途を辿っている。個体を保護センターや動物園にて繁殖が可能であればそれが最も良い方法であると考えられるが、それらの個体レベルの保護活動では対処できないほど絶滅久々に瀕する動物数の数が増加している。また環境省の保護活動に費やされる予算も欧米と比較して大きく開きがある。

このような絶滅危惧種の増加に対して、米国ではサンディエゴ動物園が絶滅危惧種の生殖細胞、体細胞、DNAを含む全ての生物資料を保存する **Frozen Zoo** プロジェクトを1970年代から大規模に実施している。また同様の趣旨のプロジェクトとして **Frozen Ark** プロジェクトが進行している。これらは例え絶滅に至ったとしても、次世代に細胞や生物資料として研究を継続できるように整備したもので、70年代より大型の予算が投入されている。一方、我が国では国立環境研究所はタイムカプセル事業を開始したが、欧米のプロジェクトと比較すると予算、人員ともに1/50以下である。このような状況の中、研究代表者は絶滅危惧種由来の培養細胞を作成するとともに、*iPS*細胞のように高付加価値の細胞を作成することを発想した。

一方、*iPS*細胞は京都大学の山中教授らの研究チームによって報告された我が国独自の研究成果である。*iPS*細胞はノーベル賞対象に選出された画期的技術であるが、我が国の純粋な国産技術と言える。従来の日本人研究者のノーベル賞受賞対象の研究は多くの研究活動が海外で行われたものであり、国産技術といえるような例はなかった。一方、*iPS*細胞技術は山中教授が独自に奈良先端大学および京都大学にて行った研究である。我が国で開発された*iPS*細胞技術は現在、再生医療の切り札として臨床応用が期待されている。この技術を異分野に取り込むことによって、様々な異分野融合研究が展開できると考えられる。

また、共同研究者である国立がんセンター研究所の清野透分野長は、ヒトの細胞において24番目のアミノ酸が変異したサイクリン依存性キナーゼ4(CDK4)およびその結合タンパク質であるサイクリンD、ヒトテロメラーゼ酵素サブユニット(TERT)の発現によっ

て、元となる細胞の性質を残したまま無限に分裂することを見出した。初代培養細胞は細胞老化するとp16と呼ばれる老化タンパク質が蓄積する。このp16タンパクはCDK4およびサイクリンD複合体に結合し、RBタンパク質がリン酸化されることで、細胞周期が停止する。清野分野長はp16タンパク質が結合するCDK4の結合部位である25番目のアミノ酸へ突然変異を導入することで、p16の負の制御をバイパスすることに成功した。我々はCDK4、サイクリンDの遺伝子がアミノ酸配列において酵母からヒトに至る広い範囲で保存されていることを見出し、ヒト変異型CDK4、サイクリンD、TERTを導入することで、ウシ、ブタ、サルにおいて元の染色体パターンを保持したまま無限に分裂することを見出した。これらの状況から、絶滅危惧動物から初代培養細胞を作成、そして安定的に保存可能とすること、様々な機能的な細胞を作り出すことを発想した。

## 2. 研究の目的

本研究は絶滅危惧動物からの初代培養細胞の作成と、遺伝子導入による*iPS*細胞もしくは無限分裂のような付加価値を加えた細胞の作成を目的とした。

対象とした動物はアカウミガメ、タイマイ、ヒメウミガメ、ローランドアノア(絶滅危惧スイギュウ)、アフリカサバンナゾウである。初代培養細胞は一定の回数細胞分裂を経た後に、細胞質の大型化した老化細胞の形態をとる。老化した細胞はp16を代表とする老化タンパク質が蓄積していると考えられ、概してβガラクトシダーゼ染色に陽性を示す。このことから **senescence associated beta-gal** 陽性と呼ばれている。本研究においても **SA-βgal** 陽性を細胞老化の指標として評価した。

無限分裂細胞の誘導には主にレンチウイルスを用いた。レンチウイルスは核膜を通過できる性質を持つために細胞分裂状態でしか遺伝子でできないレトロウイルスよりも遺伝子導入効率において優れているとされている。我々は変異型CDK4、サイクリンD、TERTをサイトメガロウイルス由来のプロモータの制御下に発現するレンチウイルスを混合感染を行い無限分裂誘導を行った。

また我々の先行研究によって得られた無限分裂細胞は元の染色体パターンを維持していることが明らかとなっているので、将来的に発生工学的手法を適用することで、得られた細胞の元に個体を再生出来る可能性がある。また得られた細胞は無限に分裂するために研究材料として世界中の研究者と研究材料として共有化することができる。さらに絶滅危惧種の個体を保存、次世代に継承できることが理想であるが、年々増加する絶滅危惧種の全てを個体で保全することは不可能である。このような保全が難しくなった動物由来の培養細胞および無限分裂細胞を作成することは学

術的意義がある。

### 3. 研究の方法

まず、初代培養細胞に関して述べる。アカウミガメ、ヒメウミガメ、タイマイに関しては名古屋港水族館にて飼育されている個体から組織のサンプリングを行った。名古屋港水族館ではこれらのウミガメの人工繁殖を行っている。人工繁殖されたウミガメを放流させる際にプラスチックタグを打ち込む作業が行われており、その際に生じる小さな組織片を元に初代培養を行った。初代培養のための培地は DMEM/F12 もしくは RPMI1640 を使用し、基礎培地に 10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質を使用した。またローランドアノアに関しては国内で飼育されていた最後のメス個体が死亡し、その耳組織から初代培養を行った。また遠隔地でのサンプリングや得られた組織の長期保存を考慮し、基礎培地に 10%DMSO を添加した不凍液を作成し、緩徐冷却を行うことで初代培養のための組織を長期保存することが可能であるかどうか検討した。

iPS 細胞の誘導のために山中 4 因子 (Oct3/4, Klf2, Sox2, c-Myc) および追加で Nanog と Lin28 を加えて合計 6 因子を発現する発現カセットを化学合成した。合成された発現カセットは制限酵素切断およびライゲーションにより PiggyBac トランスポゾンへ導入を行った。得られた PiggyBac リプログラミングベクターをリポフェクションを用いて初代培養細胞へ導入した。リポフェクション後に PiggyBac トランスポゾンに含まれるハイグロマイシン耐性遺伝子を利用し、導入された細胞のみを選択した。

無限分裂細胞を作成するために、組換えレンチウイルスを作成した。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、組換えウイルスを含む培養上清を得た。得られたウイルス上清をポリエチレングリコール 6000 を含む濃縮溶液を加え、4°Cにて 16 時間沈殿を作成した。得られたウイルス溶液を 4°Cにて 3500rpm でスウィングローターの遠心分離を行い、ウイルスペレットを得た。得られたウイルスペレットを対象となる細胞の至適化培地 1.5ml にて懸濁し、ポリブレンを 10 $\mu$ g/ml の最終濃度になるように添加した。組換えウイルスの感染は 3.5cm ディッシュにて 48 時間実施した。また遺伝子導入の効率を推定することを目的にオワンクラゲの蛍光タンパク質(EGFP)を発現するレンチウイルスを導入し、サロゲートマーカーとしておおよその遺伝子導入効率を検出した。

### 4. 研究成果

アカウミガメ 15 頭、タイマイ 18 頭、ヒメウミガメ 2 頭より初代培養細胞を得ることに成功した。タイマイおよびヒメウミガメにおいて RPMI1640 基礎培地が適していること、加えてアカウミガメの細胞の場合、DMEM/F12 混合培地が適していることを明らかにした。加えて培養温度として 26-7°C が一番適していることを明らかにした。

またこれらの培養細胞から染色体標本を作成し、正常染色体パターンがこれらの 3 種のウミガメ種に共通に 2n=56 であることを世界で初めて明らかにした。特にアカウミガメにおいては戦後間もない時期に報告された 2n=58 の論文が存在し、これらの 3 種の染色体数は異なるとの学説が主であった。一方、我々はこれらの 3 種のウミガメの染色体パターンが共通していることを明らかにした。現在、世界中でこれらのウミガメ類の交雑種の出現が問題化している。3 種のウミガメ類は近い生息領域を持ちながら、独立した種として何百万年の長い年月を経て進化した。我々の研究はこれらの 3 種のウミガメがどのように独立した種として形成されてきたか研究する上で重要な知見をもたらした。

また、初代培養細胞に用いる組織を培養細胞用不凍液を使用して長期保存することを試みた。これは野生動物の組織は極地や遠隔地で採取されることも多く、短時間で組織培養へ持ち込むことが難しいケースも存在することから、研究の適用範囲を広げるために重要な保存技術である。結果、培養細胞用の不凍液に浸漬し、緩徐冷却を併用することによって半年間液体窒素に凍結保存された場合でも初代培養が可能であることが示された。

さらに作成したタイマイ由来の初代培養培養細胞へ iPS 細胞へのリプログラミングを試みた。リプログラミング因子には山中 4 因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, cMyc)に加えて Lin28 および Nanog の合計 6 因子を発現するトランスポゾンを用いた。また Oct3/4 においては転写活性化能力を強化した改変型 Oct3/4(M3O-Oct3/4)を用いた。M3O-Oct3/4 はマウスおよびヒトにおいてリプログラミング効率を飛躍的に上昇させること、加えて生殖細胞系列に寄与する割合が上昇することが報告されている。リプログラミング因子の下流に IRES(Internal Ribosomal Entry Site)および EGFP が存在している。リポフェクション法にてタイマイ由来の初代培養細胞へ導入し、細胞が EGFP の蛍光タンパク質を発現することを検出し、導入したリプログラミング 6 因子が発現することを確認した。しかしながらリプログラミングに伴う細胞の小型化などの形態変化は認められなかった。このことから爬虫類では山中 4 因子による iPS 細胞への幹細胞シグナルの遺伝子ネットワークが保持されていない可能性が考えられた。

さらにアカウミガメの初代培養細胞へ変異

型 CDK4、サイクリン D、TERT を導入し無限分裂細胞化を試みた。上述した遺伝子を導入した細胞は安定的に 40 回以上の細胞継代を可能とし、さらに導入遺伝子のタンパク質発現もウェスタンブロットにて検出した。結果、細胞分裂回数が累積で 70 を越す、事実上無限分裂細胞と言える細胞株の作成に成功した。現在、導入した細胞のテロメラーゼ活性を検出し、さらに変異型 CDK4、サイクリン D のみでどこまで細胞分裂が可能か検討を行っている。現在、学術論文として投稿し、レビューの指摘を元に論文内容を修正中である。

また絶滅危惧スイギュウの一種であるローランドアノアの初代培養細胞から無限分裂細胞を得ることに成功した。ローランドアノアはインドネシアを原産とする野生スイギュウであるが食肉目的とした乱獲と森林の減少によって絶滅の危機に瀕している。我々は国内最後の個体となったメスの死亡個体より初代培養細胞を作成し、その初代培養細胞を変異型 CDK4、サイクリン D、TERT の発現によって無限分裂へ誘導することを試みた。得られた細胞を元にウェスタンブロットにて期待される組み合わせで導入遺伝子の発現がタンパク質レベルで検出された。加えてテロメア伸長活性が TERT を導入したのみで検出された。また野生型の細胞と同様の核型を保持したまま細胞分裂していることを染色体分析から明らかにした。さらに変異型 CDK4、サイクリン D の 2 遺伝子のみの導入では細胞老化に至るまでの期間を延長できるが、無限分裂には至らないことを明らかにした。さらに得られた無限分裂細胞は野生型細胞に比べて細胞回転が早いことを細胞周期解析により明らかにした。

#### 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 6 件)

1. Fukuda T, Iino Y, Eitsuka T, Onuma M, Katayama M, Murata K, Inoue-Murayama M, Hara K, Isogai E, Kiyono T (2016) 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* 68: 1937-1947.
2. Katayama M, Kiyono T, Horie K, Hirayama T, Eitsuka T, Kuroda K, Donai K, Hidema S, Nishimori K, Fukuda T (2016) Establishment of an immortalized cell line derived from the

prairie vole via lentivirus-mediated transduction of mutant cyclin-dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase reverse transcriptase. *Exp Anim* 65: 87-96.

3. Fukuda T, Iino Y, Onuma M, Gen B, Inoue-Murayama M, Kiyono T (2015) Expression of human cell cycle regulators in the primary cell line of the African savannah elephant (*Loxodonta africana*) increases proliferation until senescence, but does not induce immortalization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 52: 20-26.
4. Young JL, Wise SS, Xie H, Zhu C, Fukuda T, Wise JP (2015) Comparative cytotoxicity and genotoxicity of soluble and particulate hexavalent chromium in human and hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) skin cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 178: 145-155.
5. Fukuda T, Katayama M, Kinoshita K, Kasugai T, Okamoto H, Kobayashi K, Kurita M, Soichi M, Donai K, Uchida T, Onuma M, Sone H, Isogai E, Inoue-Murayama M (2014) Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 50: 381-383.
6. Wise SS, Xie H, Fukuda T, Douglas Thompson W, Wise JP (2014) Hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to hawksbill sea turtle cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 279: 113-118.

[学会発表] (計 5 件)

- ①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. 野生動物医学会. 2016 年 9 月 16 日~18 日. 宮崎
- ②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
- ③片山雅史, 清野透, 大沼学, 西森克彦, 村山

美穂, 福田智一. ヒト由来遺伝子を使用した鳥類の不死化細胞の樹立の試み. 日本野生動物医学会. 2015年7月30日~8月2日. 酪農学園大学

④飯野佑佳, 清野透, 永塚貴弘, 片山雅史, 土内憲一郎, 黒田健吾, 村田浩一, 大沼学, 福田智一. 染色体異常を伴わないローランドアノア線維芽細胞由来の不死化細胞樹立の試み. 日本野生動物医学会. 2015年7月30日~8月2日. 酪農学園大学

⑤福田智一, 飯野佑佳, 大沼学, 村山美穂, 清野透. CDK4, Cyclin D, TERT の発現はアフリカバンナゾウ由来の培養細胞の分裂回数を増加させるが無限分裂化までは至らない. 日本野生動物医学会. 2015年7月30日~8月2日. 酪農学園大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 智一 (FUKUDA TOMOKAZU)

岩手大学・理工学部・教授

研究者番号：40321640

### (2) 研究分担者

村山 美穂 (MURAYAMA, MIHO)

京都大学・野生動物研究センター・教授

研究者番号：60293552