

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560242

研究課題名(和文) 無血清培地開発と血清非依存性細胞株樹立法の確立

研究課題名(英文) Development of serum-free medium and the establishment of serum-independent cell lines

研究代表者

中村 隆範 (Nakamura, Takanori)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70183887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動物血清に含まれる細胞増殖促進/阻害に関わるタンパク因子、脂質、有機酸を、血球系細胞をモデルに同定・プロファイリングし、100%輸入血清(FBS)に頼る細胞培養法の改善を図ることを目的とした。その結果、LDLなどのリポ蛋白質が細胞の増殖制御に有効なことが考えられた。また、クエン酸やピルビン酸など有機酸に増殖促進効果が認められ、組換えアルブミンも重要な増殖促進因子であることが確認できた。さらに、解析したところコレステロールが最も重要な脂質であることがわかり、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸と組換えアルブミンを加えることで、低タンパク質無血清培地の試作品を調製できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was an objective to identify and profile the protein factors, lipids and organic acids included in the animal serum, participating in the cell proliferation and/or growth inhibition by using T-cell lines. In addition, we planned the improvement of the cell culture method to rely on in 100% import serum (FBS). As a result, it was thought that lipoprotein such as the LDL was effective for the cell proliferation. In addition, the promotional effect was accepted by organic acids including citric acid and pyruvic acid and was able to confirm that the recombinant albumin was also an important promotional factor in the cell culture. Furthermore, after analyzing it, we understood that cholesterol was the most important lipid and was able to prepare a trial product of the low protein serum-free medium by adding in, transferrin, selenious acid and recombinant albumin.

研究分野：細胞生物学

キーワード：血清 無血清 FBS リポタンパク質 アルブミン 有機酸 T細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで既知のケモカインとは異なるガレクチン、galectin-9 の構造特性と生理活性の相関性を明らかにしてきた。また、galectin-9 の比較対象として使用した galectin-8 に強い好中球接着誘導作用と活性酸素産生誘導作用を見出し、好中球の細胞応答がインテグリン M と結合することで開始することを明らかにした (N. Nishi et al. Glycobiology, 13, 755-63 (2003))。さらに、各種血球由来培養細胞に対する細胞応答 (細胞接着とアポトーシスを指標) を調べ、細胞接着については細胞毎に発現しているインテグリンファミリーが、ガレクチン受容体であることを明らかにした (L.-H.Lu et al. J.Biochem., 141, 157-172 (2007)、H.Yamamoto et al. J. Biochem., 143, 311-324 (2008))。最近、ガレクチン-9 の構造変化や立体構造解析を通じて、臨床応用に向けた改変ガレクチン-9 の開発にも取り組んでいる (A.Ito et al. Glycobiology, 23, 920-925 (2013)、Y.Nonaka et al. J. Biochem., 153, 463-471 (2013))。

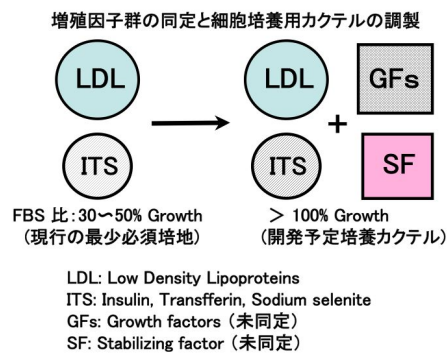
ガレクチンファミリーは α -ガラクトシドを持った糖鎖を特異的に認識する動物レクチンで、細胞増殖、アポトーシスや細胞接着・遊走など基本的な生物活性に関わる。また、炎症反応やがんの発症・転移・進行など病態との関連性も深く、新たな免疫抑制剤、がんの治療薬としての利用も検討されている。一方、ガレクチンによるアポトーシスや細胞接着誘導実験中に、無血清下で各種血球細胞が、ガレクチンの有無に関わらず培養プレートに強く接着し、増殖抑制あるいはアポトーシス・ネクローシスを誘導することも分かった。つまり、血清には血球系細胞の非特異的接着を抑制する因子が存在し、これらはアルブミン、IgG など血清中の主要な蛋白質でないことが分かった。また、動物血清に含まれる血球細胞の増殖阻害因子の一つが IgM であることも見出した。こうした、ガレクチンの研究を通して、本来浮遊性の血球系細胞の非特異的接着を抑制したり、増殖促進/阻害する因子群を同定・プロファイリングをして、FBS を代替し得る新たな無血清培地を開発し、同時に血清に依存しないで増殖する細胞株の簡便な樹立法を確立することを着想するに至った。

我々研究者は、比較的多くの細胞種に対して共通して高い増殖活性を有する血清を選抜・購入している。一般的には増殖因子の含有量が高いものが血清として優れた性質を持つと信じられているが、我々は血清中の接着及び増殖抑制因子や、他のタンパク質、脂質、有機酸の存在にも目を向ける必要があると考え、血清の力価に大きな影響を及ぼして

いる増殖促進/抑制因子の実体解明を急いできた。その結果、コレステロールの供給源となる LDL は重要なものの、加熱などで生じる酸化 LDL が一転して強い細胞毒性を示すことも分かった。しかしながら、血清の力価を決定しているその他の各種因子のプロファイリング・評価は全体としてまだ十分になされていない。

2. 研究の目的

本研究では、動物血清に含まれる細胞増殖促進/阻害や細胞接着制御に関わるタンパク因子群および脂質、有機酸を、浮遊血球系細胞をモデルに同定・プロファイリングし、100% 輸入牛胎児血清 (FBS) に頼る、現在の細胞培養法の改善を図る (細胞培養用カクテルの調製)。さらに、同定した増殖因子・接着制御因子群の添加や、脂質合成酵素群の遺伝子導入による血清に依存しない細胞株の簡便な樹立法を確立する。新しい無血清培地は iPS 細胞を利用した各種分化細胞の樹立・大量生産に寄与し、無血清下で増殖する樹立株を用いれば、有用なタンパク製剤やワクチン用ウイルスの生産にも役立つことが期待できる。



3. 研究の方法

平成 26 年度は、(1) Jurkat, Molt-4 などの T 細胞系の株細胞の増殖活性を指標に、血球接着阻害因子 (補体成分 C4bp, H 因子及びリポ蛋白質 LDL/VLDL) の細胞接着・増殖に及ぼす効果を詳しく調べた。(2) FBS やブタ血清から増殖に必須のタンパク因子群の同定・プロファイリング、脂肪酸や有機酸の効果などを調べた。(3) 我々はこれまでに、高い LDL 要求性を有する Jurkat 細胞から、LDL 低依存性の Jurkat 細胞亜株を樹立することができ、この樹立株ではコレステロールの生合成関連酵素群と LDL 受容体遺伝子の発現が亢進していることが分かった。そこで、今回見出した、LDL 低依存性株の樹立法が、他の細胞系でも可能かどうか、コレステロールの生合成関連酵素群と LDL 受容体遺伝子の発現を指標に比較・検討することとした。

平成27年度は、(1) LDLを代替する脂質のスクリーニングを行った。対象とする脂質についてはすでに検討中であつたもので、LDLには及ばないものの一定の増殖促進効果を示す候補を見出していた。(2) この脂質と血清量を低減できることがよく知られている、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸(合わせてITSと略す)の混合物、組換えアルブミン、微量元素、抗酸化物質などを組み合わせた低タンパク質無血清培地の試作品を調製した。この低タンパク質無血清培地を調製する上で、必須の要件である組換えトランスフェリンは植物細胞で発現されたものが市販されていて、天然のトランスフェリンに匹敵する細胞増殖促進効果を持つことを確認していた。(3) Jurkatで実施したLDL除去血清中で馴化するLDL低依存性細胞株の樹立法から、組換えアルブミン、組換えトランスフェリンを利用した新しい馴化培地の開発に転換するために再検討を開始することとした。(4) LDL低依存性Jurkat細胞株の樹立によって、コレステロール生合成関連酵素群の遺伝子を細胞に人工的に導入すれば、LDL非依存性株の簡便な樹立が期待できるようになった。そこで、遺伝子を高効率で導入できるHEK293、CHO細胞などタンパク発現系にも広く利用される細胞株について、コレステロール生合成関連遺伝子を導入すれば実際に血清非依存性細胞株が樹立できるかどうか検討することとした。

4. 研究成果

平成26年度

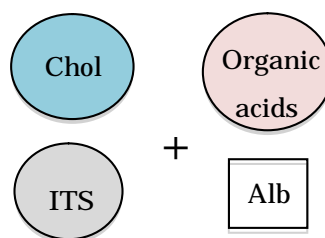
(1) C4bp, H因子は補体系の制御因子と知られているが、一方でその疎水性の性質のためか、浮遊系血球細胞が培養ディッシュに非特異的に接着することを効果的に阻害し得ることがわかった。ただし、補体系因子に増殖効果そのものが認められなかったことから、総括として、今後の研究において補体系因子のさらなる解析は中止することとした。(2) 一方、LDLなどリポタンパク質の増殖に対する効果がさらに確認できたが、リポタンパク質は血液由来成分であり酸化されやすく細胞毒性を表すこともあるので実際の細胞培養には不向きである。リポタンパク質に代わる代替の脂質成分のスクリーニングが必要とされることが分かった。(3) 必須脂肪酸であるリノレン酸、リノール酸に増殖促進効果はみられないものの、クエン酸やピルビン酸など有機酸に増殖促進効果が認められた。(4) FBSやブタ血清から増殖に必須のタンパク因子群の同定を進めたが、血清の主要タンパク質であるフェツインやアルブミンの画分から増殖活性をうまく分離できなかった。そこで、血清の影響を受けていない植物細胞で発現した組換えアルブミンの増殖活性を調べたところ、明らかな増殖促進効果が認められた。このように、脂肪酸や脂溶性ホルモンの影響を除去した組換えアルブミンが、血清に依存しない細胞培養系のコンポーネントとして利用

できることが分かった。(5) LDL除去血清中で馴化するLDL低依存性細胞株の確立に関して検討ができなかったが、これは十分な量のLDL除去血清が調製できなかったことによる。血清を低減する従来の馴化方法や、組換えアルブミンを利用した新しい馴化培地の開発など再検討する必要があることが分かった。

平成27年度

(1) LDLを代替する脂質のスクリーニングを急ぎ、市販のコレステロール含有脂質混合物が一定の増殖促進効果を持つこと。さらに解析したところコレステロールが最も重要な増殖促進効果を示す脂質であることが分かった。(2) コレステロールとインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸(合わせてITSと略す)の混合物、組換えアルブミンを加えることで、低タンパク質無血清培地(最少無血清培地用カクテル)の試作品を調製できた。この低タンパク質無血清培地を調製する上で、必須の要件である組換えトランスフェリンは植物細胞で発現されたものが市販されていて、天然のトランスフェリンに匹敵する細胞増殖促進効果を持つことが再度確認できた。しかしながら、さらに計画していた(3)この無血清培地の試作品を利用した、新しいLDL非依存性細胞株樹立のための馴化法の確立や(4)コレステロール生合成関連酵素群の遺伝子を細胞に人工的に導入して、LDL非依存性株が簡便に樹立できるかどうか検討する実験計画も着手できなかった。一方で、(5)メタボロミクス解析から、細胞増殖に影響を与える可能性のある低分子性の候補分子を血清中に見出すことができた。

最少無血清培地用カクテル



Chol: Cholesterol

ITS: Insulin, Transferrin, Selenite

Organic acids: pyruvate, citrate

Alb: recombinant human albumin

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2件)

Cooperative Interactions of Oligosaccharide and Peptide Moieties of a

Glycopeptide Derived from IgE with Galectin-9. Nakakita S, Itoh A, Nakakita Y, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Nishi N. *J Biol Chem*. 2016 Jan 8;291(2):968-79. doi: 10.1074/jbc.M115.694448. Epub 2015 Nov 18.

Crystal structure of a *Xenopus laevis* skin proto-type galectin, close to but distinct from galectin-1. Nonaka Y, Ogawa T, Yoshida H, Shoji H, Nishi N, Kamitori S, Nakamura T. *Glycobiology*. 2015 Jul; 25(7): 792-803. doi: 10.1093/glycob/cwv020. Epub 2015 Mar 24.

〔学会発表〕(計8件)

小川 崇, 東海林 博樹, 野中 康宏, 舘野 浩章, 平林 淳, 西 望, 中村 隆範

Functional and expression analysis of Galectin-4 in *Xenopus* digestive tract and human colon carcinoma

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 (合同大会) 2015年12月1日-4日 神戸市

野中 康宏, 小川 崇, 吉田 裕美, 東海林 博樹, 西 望, 神鳥 成弘, 中村 隆範

「ツメガエル皮膚ガレクチンの立体構造とアロステリックな挙動についての解析」

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 (合同大会) 2015年12月1-4日 神戸市

野中 康宏, 小川 崇, 吉田 裕美, 東海林 博樹, 西 望, 神鳥 成弘, 中村 隆範

「ツメガエル皮膚ガレクチンの構造・機能解析とgalectin-1との比較」第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24-26日 徳島市

野中 康宏, 小川 崇, 吉田 裕美, 東海林 博樹, 西 望, 神鳥 成弘, 中村 隆範

「ツメガエル由来の二種のプロト型ガレクチンについてのX線結晶構造解析」 第14回四国免疫フォーラム 2015年6月20日 愛媛県東温市

山下 賀容子, 中村 隆範

「K562細胞の増殖における必要因子について」 第87回日本生化学会大会、2014年10月15日-18日 京都

野中 康宏, 小川 崇, 吉田 裕美, 東海林 博樹, 西 望, 神鳥 成弘, 中村 隆範

「アフリカツメガエル皮膚由来ガレクチンの立体構造と機能の解析」 第87回日本生化学会大会、2014年10月15日-18日 京都

小川 崇, 東海林 博樹, 野中 康宏, 舘野 浩章, 平林 淳, 西 望, 中村 隆範

「ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン4の発現及び機能解析」

第87回日本生化学会大会 2014年10月15 -18日 京都

野中 康宏, 小川 崇, 吉田 裕美, 東海林 博樹, 西 望, 神鳥 成弘, 中村 隆範

「アフリカツメガエルの皮膚および遍在型ガレクチンの立体構造解析」 第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月25-27日 横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 隆範 (NAKAMURA, Takanori)

香川大学・医学部・教授

研究者番号 : 70183887