2022年度学内研究助成 成果報告書

① 報告者所属・氏名

生活科学部　食生活科学科・中村彰男

② 事業名

ヒト未分化正常細胞より不死化細胞株を樹立する。

③ 事業の目的

医薬品や機能性食品の機能性評価にはこれまでは実験動物が基本的に使用されてきた。しかしながら、多くの市民団体や動物愛護団体が、動物実験を廃止するように食品メーカーに対して要望を行った結果、2018 年には日清食品や味の素など 13 の日本の食品メーカーが動物実験を廃止する方向に要望に同意した。さらに、翌年の 2019 年には「動物愛護管理法」が改正され、動物実験の実施はますます厳しい状況となっている。

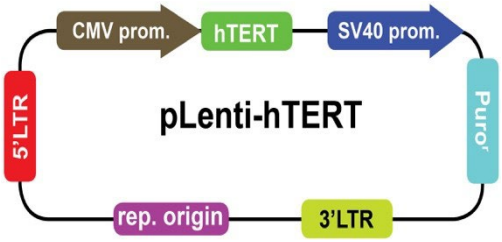
このような背景において、実験動物に代替する方法としてヒト初代正常培養細胞を用いた細胞モデルに注目が集まっている。研究代表者も昨年度の本大学の研究助成を活用し、細胞モデルを用いた「妊娠糖尿病妊婦における胎生期脳プログラミングと先制医療」の研究をヒト胎児のアストログリア細胞や血管平滑筋細胞をモデルとして細胞モデルによる実験を実施した。ところが、ヒト初代正常培養細胞には寿命があり、ヒト胎児のアストログリア細胞は 7 世代前にその寿命により増殖が停止する。がん細胞などの細胞株であれば一度購入すれば、増殖継代させることでほぼずっと使用可能であるが、ヒト初代正常培養細胞には早期の細胞寿命という問題が研究遂行の妨げとなっていた。そのため、細胞寿命が向かえると新たに非常に高価なヒト初代正常培養細胞を幾度も購入しなければならない。購入するヒト初代正常培養細胞は必ずしも同じではなく、摘出した臓器の遺伝的な背景などではロット間で若干異なる場合などもあり安定した機能評価の壁となっている。そこで、本研究ではヒト初代正常培養細胞にヒトテロメア逆転写タンパク質（*hTERT*; Human Telomerase Reverse Transcriptase ）をレンチウイルスにより遺伝子導入して、*hTERT*の発現により細胞の分裂に伴う細胞老化を回避させることで、ヒト初代正常培養細胞の不死化株の樹立に挑戦する。本研究でヒト初代正常培養細胞の不死化株が得られれば、実験動物に代替する細胞モデルとして利用する。

④ 事業実績・研究成果（具体的に）

不死化細胞株樹立実験では、ヒト初代正常培養細胞として、ヒト胎児由来のアストログリア細胞を用いた。本実験は遺伝子組換え実験に相当するので、本学の遺伝子組換え実験の規程に従い遺伝子組み換え実験委員会の承認を得た（今年度中に申請）。実験の概略はレンチウイルスを用い

て、ヒトテロメア逆転写タンパク質（hTERT）を遺伝子導入して細胞の不死化細胞株を樹立する。

方法Ⅰ．ヒト胎児由来アストログリア細胞への hTERT の遺伝子導入



ヒト胎児アストログリア細胞（Cell Applications Inc. CAU.S.A）に米国の Applied Biological Materials（APB）社の *hTERT* 遺伝子を含むレンチウイルスを 2μg/ml の Polybrene 用いて遺伝子導入した。*hTERT* 遺伝子は CMV プロモーターにより導入細胞内で発現する。また、選択用薬剤耐性マーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子が SV40 プロモーター下流で発現するように挿入されているため、*hTERT* 遺伝子が導入された細胞株は培地に最終濃度 2 μg/mL のネオマイシンを加えることにより12台まで安定細胞株を単離した。

方法Ⅱ．不死化ヒト胎児アストログリア細胞の遺伝子発現の確認

ネオマイシンによりスクリーニングした不死化ヒト胎児アストログリア細胞株は継代9パッセージで、得られた不死化ヒト胎児アストログリア細胞群とコントロール細胞群から RNA の抽出を行った。RNA の抽出は FastGene™ RNA Premium Kit（日本ジェネティクス、東京、日本）を使用し、添付のプロトコールに従いゲノム DNA の除去を行い、全 RNA を単離した。単離した RNA は、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡株式会社、東京、日本）で cDNA を合成し、*hTERT* 遺伝子、アストログリア細胞のマーカー遺伝子である *GFAP* 遺伝子、解糖系の GAPDH の発現をリアルタイム PCR で確認した。リアルタイム PCR は KOD SYBR® qPCR Mix（東洋紡株式会社、東京、日本）を用いて StepOnePlus™リアルタイム PCR システム（Applied Biosystems,CA, U.S.A.）にて解析した。*hTERT* 遺伝子遺伝子に関しては PCR 反応産物を2%TAE アガロースゲルで電気泳動後、PCR 産物を確認した。qPCR に用いたプライマーは *hTERT* 遺伝子には abm-hTERT-F（5'-TGGTTTCTGTGTGGTGTCA-3'）および abm-hTERT-R（5'-TTGTCGCCTGAGGAGTAGA-3'）、アストログリアのマーカーである Human *GFAP* 遺伝子として hGFAP-F570（5'-TGGAGAAGGAAGATTGAGTCGC-3'）および hGFAP-R691（5'-ACGTCAAGCTCCACATGGACCT -3'）、ハウスキーピング遺伝子には Human 18S rRNA を内在性のコントロールとして、h18S rRNA-F（5'-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3'）および h18S rRNA-R（5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3'）を使用した。

結果と考察： ヒト胎児アストログリア細胞にレンチウイルスを用いて *hTERT* 遺伝子および薬剤耐性選択マーカーとしてネオマイシン耐性を導入した。遺伝子導入した細胞は継代12パッセージを越えてもネオマイシン存在下で増殖を続けた。通常、購入したヒト胎児アストログリア細胞は継代9パッセージくらいから細胞分裂が停止する。継代9パッセージのコントロール群と *hTERT* 遺伝子導入細胞群でリアルタイム PCR を行った。*hTERT* 遺伝子導入細胞群では *hTERT* 遺伝子発現はリアルタイムPCRにて確認できたが、コントロール群では発現はしていなかった。そこで、それぞれのPCR反応

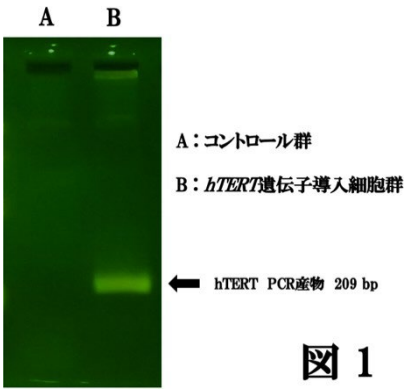


図 1

液をアガロース電気泳動で解析したところ、209bpに *hTERT* 遺伝子導入細胞群のみバンドが確認できた。このことから、*hTERT* 遺伝子は正常にヒト胎児アストログリア細胞に遺伝子導入および発現していたことが明らかとなった（図1）。Human 18S rRNA を内在性のコントロールとした場合、解糖系の Human *GAPDH* 遺伝子の発現は両者で変化はなかったが、Human *GFAP* 遺伝子の発現レベルは *hTERT* 遺伝子導入細胞群で有意に 2.4 倍に増加していた（図2）。*hTERT* 遺伝子導入細胞群ではコントロール細胞群と比較するとアストログリアのマーカー遺伝子である Human *GAPDH* 遺伝子の発現が増加していたが、その理由はわからない。

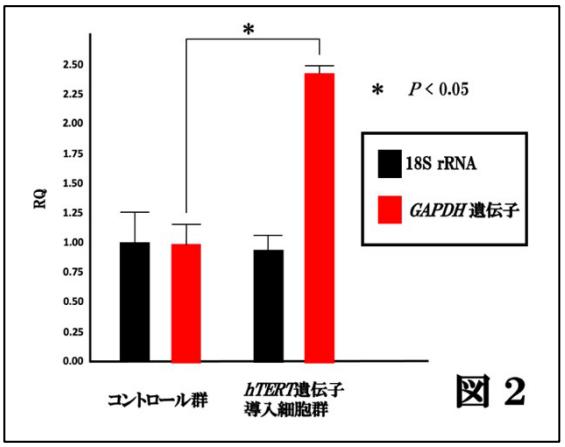


図 2

結論： ヒト胎児アストログリア細胞にレンチウイルスを用いて、ヒトテロメア逆転写タンパク質を遺伝子導入し、不死化ヒト胎児アストログリア細胞安定細胞株の樹立に成功した。今後はこの細胞株を用いてアルツハイマー性痴呆症の原因の分子レベルでの解明およびアストログリア細胞の細胞死を防ぐ機能性食品成分の探索研究に利用したい。

⑤ 研究成果の発表・活用（学会発表・論文掲載・地域連携・産学連携など）

【総説】

1. 河原田律子，大上桜香，小浜智子，**中村彰男**，子宮内高血糖環境を改善する n-7 系不飽和脂肪酸 -神経細胞への効果，**糖尿病と妊娠**，2023 (in press)（**査読あり**）

2. **中村彰男**、河原田律子、DOHaD研究最前線；子宮内高血糖環境が次世代に及ぼす影響と先

制医療,DOHaD研究-日本DOHaD学会設立10周年記念号-,11(2):117-125,2023(査読あり)

3. 中村彰男, DOHaD研究への憧憬と学会との出会い, DOHaD研究-日本DOHaD学会設立10周年記念号-, 11(1): 26-27, 2023

4. Nakamura, A.* Nakamura, H., and Kawaharada, R., Inflammatory Diseases and the Role of n-7 Unsaturated Fatty Acids as Functional Lipids. *In book:* Fatty Acids - Recent Advances, 2022, DOI:10.5772/intechopen.107354 ＊Corresponding Author （査読あり）

【学会発表】 2022 年度

1. 中村彰男、わが国の DOHaD 研究 10 年の歩みと今後の展望、妊娠期の過栄養による糖化ストレスが次世代に及ぼす影響、シンポジウム自由集会 3 -DOHaD 研究会-、第93回日本衛生学会学術総会、東京、大田区産業プラザ、2023年3月14-16日 **招待講演**

2. 堤咲樹、吉崎瞳、鳥海旭、大金恵利、大上桜香、河原田律子、中村彰男、パルミトレイン酸は糖尿病の母親の高血糖による胎児の脳神経細胞の AGEs 生成をで抑制できるか、日本農芸化学会2023年度広島大会、広島、2023年3月14-17日

3. 堤咲樹、吉崎瞳、河原田律子、鳥海旭世、大上桜香、大金恵利子、中村彰男、妊娠期の n-7系不飽和脂肪酸摂取は糖代謝異常の母親から生まれた産仔の脳神経細胞が受ける糖化ストレスを改善できるか？、公益社団法人日本食品科学工学会 令和5年度 関東支部大会、東京、2023年3月11日

4. 吉崎瞳、堤咲樹、河原田律子、鳥海旭世、大上桜香、中村彰男、母体の高血糖環境により生成される終末糖化産物が胎児の骨格筋の分化に及ぼす影響と機能性脂質による改善効果について、公益社団法人日本食品科学工学会 令和5年度 関東支部大会、東京、2023年3月11日

5. Kawaharada, R., Okami, H., Yoshizaki, H., Toriumi, A., Nakamura, A., Effect of hyperglycemia during pregnancy on brain neurons in infants, 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo, 6-12 December 2022

6. Yoshizaki, H., Kawaharada, R., Okami, H., Toriumi, A., Tsutsumi, S., Nakamura, A., Effects of extracellular and intracellular advanced glycation end products in an intrauterine hyperglycemic environment on fetal skeletal muscle, 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo, 6-12 December 2022

7. 河原田律子, 小浜智子, 中村彰男、子宮内高血糖環境を改善する n-7 系不飽和脂肪酸 -神経細胞への効果- 第38回日本糖尿病;妊娠学会年次学術集会 2022年11月5日

8. 吉崎瞳、鳥海旭世、大金恵利子、大上桜香、河原田律子、中村彰男、子宮内高血糖環境下における終末糖化産物の蓄積が胎児骨格筋の発生に及ぼす影響、第44 回日本臨床栄養学会総会・第43回日本臨床栄養協会総会・第20回大連合大会、岩手、2022年10月7-9日

9. 吉崎瞳、鳥海旭世、大金恵利子、堤咲樹、大上桜香、河原田律子、中村彰男、子宮内高血糖環境が筋芽細胞に及ぼす影響と機能性脂質による改善効果、第69回日本栄養改善学会学術総会、

岡山、ハイブリッド開催、2022年9月16-18日
10.野口礼於奈、中村彰男、高橋果林、塚越絵理、荒明奈美、神戸ひより、玉木歩乃華、増田 記子、河原田律子、調理に用いた劣化油脂が心血管系の栄養シグナルに与える影響、第69回日本栄養改善学会学術総会、岡山、ハイブリッド開催、2022年9月16-18日
11.中村彰男、基調講演-ゲノム編集とデザイナーベビー-、第3回分子栄養学合同セミナー、群馬県 高崎市 2021年9月2日- 9月3日

⑥ 今後の展開・継続性について

今後は得られた不死化ヒト神経アストログリア細胞株を用いて糖尿病患者におけるアルツハイマーや神経疾患の原因の分子レベルでの解明とこの不死化細胞株を用いて未病対策としての新規食品成分の探索研究に用いる。

12.