

ブタ角膜組織片の保存法を検討する必要がある。そこで、まず平成19年度では、皮膚組織の被検物質浸透性試験などで用いられているブタ皮膚組織と同様に凍結保存法による保存法の検討、および標準物質（無刺激：10% Tween-20、MAS25：10% SLS、MAS50：Triton X-100）曝露によるフルオレセイン浸透性について検討した。フルオレセインの浸透性評価には、BCOPの試験法に準じて標準物質を一定時間ブタ角膜組織上に添加した後、さらにフルオレセインを添加して一定時間角膜組織と反応・洗浄した後、フルオレセインの濃度を分光光度計で測定した。

B-2. 供試細胞

研究に使用した細胞は、正常角膜輪部組織から分離培養した角膜上皮細胞（HCE）、入手することが可能であった2種類のヒト正常角膜上皮細胞株（HCEC-2：KURABO、EHXV：J-TEC）、およびSV40によって不死化されたヒト角膜上皮細胞株（HCE-T：Riken BRC）の4種類を用いた。

B-2-1. HCEの初代分離培養

研究目的での使用として米国アイバンク（Northwest Lions Eye Bank）より眼球を購入し、研究に用いた。

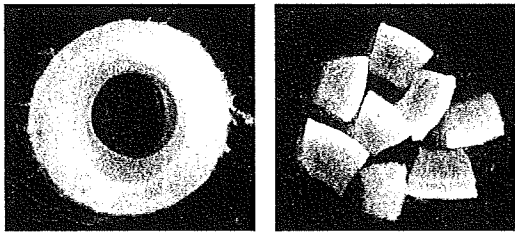


眼球組織から前眼部を摘出し、一部は組織標本作成のために迅速固定液（SUPER FIX；倉敷紡績株式会社）を用いて固定し、通常の方法でパラフィン切片標本作製した。作製した標本は、組織形態の観察を行うため、Hematoxylin-Eosin（HE）染色を行った。さらに角膜上皮幹／前駆細胞マーカーの免疫組織染色として、上皮系幹／前駆細胞マーカーとして知られているIntegrin $\beta 1$ （CD29）、角膜上皮幹／前駆細胞マーカーとして知られているp63、および分担研究者の山本が上皮系・間葉系幹細胞マーカーとしての有用性を報告しているlow-affinity neurotrophin receptor p75（p75NTR）の各抗体を用いて実施した。

P75NTRの別名はp75 nerve growth factor receptorと呼ばれ、CDナンバーは271（CD271）である。近年、上皮系／間葉系幹細胞マーカーとして注目されており、眼科領域では水晶体上皮幹／前駆細胞、網膜幹／前駆細胞に発現していることを山本が報告した。（Yamamoto N. Med Mol Morphol, 2010 in press.）

摘出した前眼部から水晶体、虹彩、毛様体などの組織を切除した。さらに角膜輪部の周辺組織のみを残し、角膜中心部や眼球結膜も切除した。

次にデスメ膜と一緒に角膜内皮細胞を剥離し、角膜輪部を8等分に分割し、コラゲナーゼ（新田ゼラチン）と細胞分散溶液を加えて37℃で30分間酵素処理した。酵素処理終了後、リン酸緩衝液（PBS）で遠心洗浄を行い、培養した。



CnT-20を用いて培養した細胞を用いて、発現している細胞マーカーの解析と遺伝子導入実験を行った。細胞マーカーの解析は、角膜組織から分離直後の細胞、2継代目、および4継代目の細胞を用いて、角膜上皮幹/前駆細胞マーカーとして知られているp63、上皮系幹/前駆細胞マーカーとして知られているIntegrin $\beta 1$ (CD29)、low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75NTR)、nerve growth factor (NGF) のhigh-receptorであるTrkA、および角膜上皮細胞の特異的マーカーの1つであるkeratin-3の発現について、各種抗体の細胞免疫染色を行い、蛍光顕微鏡、またはFlow cytometryにて観察した。

B-2-2. HCEC-2

ヒト角膜上皮から分離・培養し、2次培養後に凍結保存された正常ヒト角膜上皮細胞(HCEC-2, lot NO. KC-4009, KURABO)を用いて、マーカーのプロトコールに基づき無血清培地(EpiLife™+HCGS)にて培養した細胞(3次培養細胞)、および血清含有上皮細胞培養用培地(M-Stars C)にて培養した細胞(3次培養細胞)を用いた。

B-2-3. EHXV (J-TEC)

ヒト角膜上皮から分離した正常ヒト角膜上皮細胞(EHXV)を本研究の遂行のためだけに特別に株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

(J-TEC)より供与して頂いた。本細胞は、3T3-J2細胞をフィーダー細胞として、アッセイ培地(J-TEC)で培養した細胞を用いた。

B-2-4. HCE-T

ヒト角膜上皮から分離・培養した正常ヒト角膜上皮細胞をSV40-adenovirus組換えウイルスベクターを用いて不死化したヒト角膜上皮細胞株である。64kDケラチン産生能があり、ウイルス粒子は産生しなくなったと報告されている。細胞株樹立時にクローニングを行っておらず、さらに複数回にわたる継代培養によって細胞分化能(重層化能)が減衰したと報告されている。培地は理化学研究所バイオリソースセンターの能書に従って培養した。

B-3. 発現ベクターの構築

ヒトの正常角膜上皮を用いた眼刺激性試験・毒性試験代替法の開発において、まず、使用する細胞特性などを安定して供給できるようにしなければならない。しかし、ヒト角膜上皮細胞は、初代培養が難しく、さらに継代・維持することができない細胞として知られている。そこで、細胞特性を維持させることを目的とし、2種類の不死化遺伝子(SV40 Large T Ag遺伝子: SV40、Telomerase Reverse Transcriptase: hTERT)を2種類のベクター(定常的に発現するベクター: Stable ベクター、発現コントロールベクター: Control ベクター)に組み込み、計4種類のベクターを構築した。

SV40 Large T Ag遺伝子(Simian virus: SV40)は、サルを宿主とするポリオーマウイルスであり、アカゲザル

の腎臓の細胞から分離された。不死化遺伝子SV40-T 抗原は、細胞周期を制御する働きを持つ癌抑制遺伝子p53の働きを阻害し、結果として細胞の増殖を促す作用を持つと考えられている。

本研究で使用したSV40は、K12株由来大腸菌 (XL1-Blue) に組み込まれたpBluescript II KS (-) ベクター (3.0 kbp) に導入されたpBS-SVT: SV40 Large T AgをJCRB Gene Bank (財)ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンク ; Resource ID : VG042) より購入した。SV40 Large T Ag遺伝子の5'末端領域の配列はSequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて解析した。次にSV40 Large T Ag遺伝子 (約2.5 kbp) をPCRで増幅した後、ベクターDNAのマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag遺伝子を挿入・ligationさせた。この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimer & Probeの作製のため、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

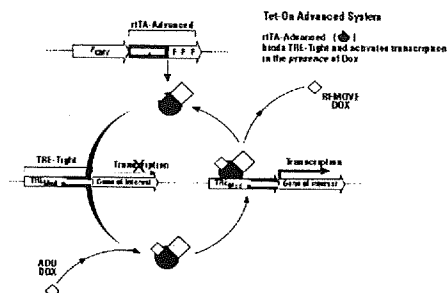
Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)は、テロメア長さを維持することができる細胞のリボ核タンパク質の逆転写酵素である。テロメアとは、真核生物の染色体の末端にある反復DNA領域であり、染色体末端を複製・保護する機能を有している。原核生物の染色体は環状であるため、複製が終結するということがおこらないが、真核生物の通常のラギング鎖DNAが複製される際には、細胞分裂時にテロメアが短くなり、細胞がテロメア依存的

に老化すると考えられている。テロメラーゼは、自身のRNA部分を鋳型として直鎖状の染色体の3'末端にTTAGGG反復配列を付加することによってテロメア長を維持することができる。これはヒトの癌細胞によくみられるパスウェイであり、テロメアのホメオスタシス (恒常性) を保っている。テロメア長が細胞の増殖能を制御して細胞が無限に分裂するには、テロメアの維持が不可欠であると考えられている。

本研究で使用したhTERTは、The Global Bioresource Center の American Type Culture Collection (ATCC) から cDNA を購入した。hTERTを含むプラスミドDNAを抽出・精製した後、EcoR I で消化し、hTERTを含む約3.4kbp断片を回収し、ベクターDNAのマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCRで増幅させたhTERT遺伝子を挿入・ligationさせた。この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認するため、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

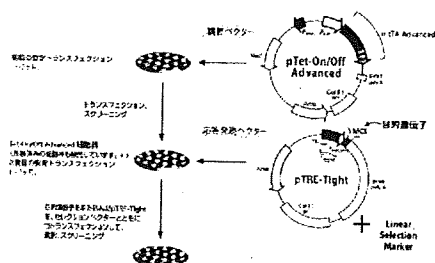
発現コントロールベクターシステムは、Tet-Onシステム ((Clontech Lab., Inc. Cat. No. 631018) を使用した。テトラサイクリン遺伝子発現誘導系は、大腸菌テトラサイクリン耐性オペロンの転写調節に働くTet リプレッサー (TetRタンパク質) とTetオペレーター配列(tetO配列-Tetオペロン上流のDNA配列)の特性を利用し、真核生物での転写制御システムとして開発された。TetリプレッサーはtetR遺伝子産物でテトラサイクリン非存在時にのみtetO 配列に結合し、テト

ラサイクリンがTetリプレッサーに直接結合するとtetO 配列に結合できなくなる。本システムでは、ヘルペスウイルス由来のVP16 転写活性化ドメインをTetR と融合し転写活性化因子(r)tTAとして働かせ、培地中のテトラサイクリンの濃度を調節することにより、TREプロモーター (tetO 配列が7回連続したTet応答配列をもつCMV 最小プロモーター) の下流に組み込んだ目的の遺伝子の発現レベルを定量的に調節することができる。発現の調節は厳格かつ可逆的でリーク (非誘導時の発現) はほとんど見られない。また目的遺伝子の発現調節は誘導後、速やかに行なわれることが知られている。



(Tet-On Advanced Sytemマニュアルより引用)

Tet-On Advanced Inducible Gene Expression Systemでは、まず第1段階として、pTet-On Advanced ベクター (調整ベクター) を導入させ、次にpTRE-Tight ベクター (目的遺伝子を組み込んだ応答発現ベクター) を導入させるといふ、2段階の遺伝子導入ス



テップを必要とする。

(Tet-On Gene Expression Sytemマニュアルより引用)

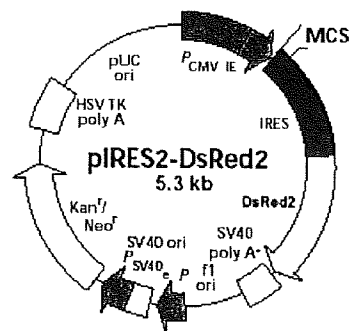
B-3-1. Stable SV40 Large T Ag 遺伝子-pIRES2-DsRed ベクター (S-SV40)

SV40 Large T Ag gene Plasmid DNAをEcoR I 消化し、SV40遺伝子を含む約2.5kbp断片を回収した。

精製した断片を pIRES2-DsRed Express ベクター DNA (Clontech Lab., Inc. Cat. No. 632463) の Multiple Cloning Site (MCS : EcoR I サイト) に挿入した (図-1)。Pcmv プロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

S-SV40 が挿入された pIRES2-DsRed-Express ベクターを大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体より Plasmid Mega Kit (QIAGEN)を用いて Plasmid DNAを抽出、精製した。

図-1 pIRES2-DsRedのベクター Map



B-3-2. Control SV40 Large T Ag 遺伝子 - pTRE-Tight ベクター (C-SV40)

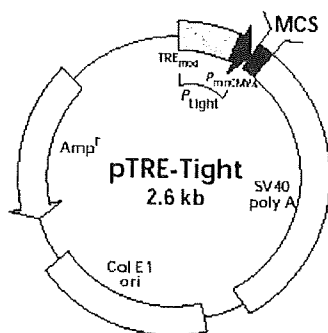
SV40 Large T Ag gene Plasmid DNA をEcoR I 消化し、SV40遺伝子を含む約2.5kbp断片を回収した。

精製した断片を pTRE-Tight ベク

ター DNA (Clontech Lab., Inc. Cat. No. 631059)のMCS (EcoR I サイト) に挿入した (図-2)。PminCMVプロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

C-SV40が挿入されたpTRE-Tightベクターを大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体よりPlasmid DNAを抽出、精製した。

図-2 pIRES2-DsRedのベクター Map



B-3-3. Stable telomerase reverse transcriptase-pIRES2-DsRed ベクター (S-hTERT)

hTERT Plasmid DNAをEcoR I 消化し、hTERT遺伝子を含む約3.4kbp断片を回収した。

精製した断片をpIRES2-DsRed Express ベクター DNAのMCS (EcoR I サイト) に挿入した。Pcmvプロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

S-hTERT が挿入されたpIRES2-DsRed-Express ベクターを大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体よりPlasmid DNAを抽出、精製した。

B-3-4. Control telomerase reverse

transcriptase - pTRE-Tight ベクター (C-hTERT)

hTERT Plasmid DNAをEcoR I 消化し、hTERT遺伝子を含む約3.4kbp断片を回収した。

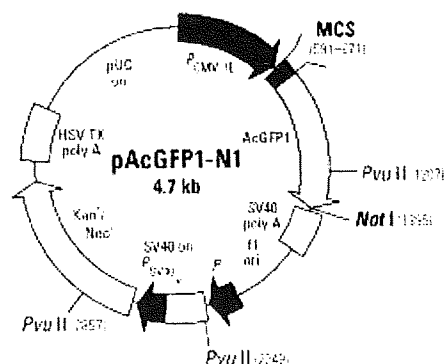
精製した断片をpTRE-Tight ベクター DNAのMCS (EcoR I サイト) に挿入した。PminCMVプロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

C-hTERTが挿入されたpTRE-Tightベクターを大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体よりPlasmid DNAを抽出、精製した。

B-3-5. SV40 Large T antigen - GFP ベクター (SYN-2245-1) の構築

まず、SV40 Large T Ag遺伝子の5'末端領域の配列はSequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて解析した。

次に遺伝子クローン (VG0402) を鋳型として、終止コドンを除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域 (2,479bp) を増幅した。ベクターDNA (pAcGFP-N1) のマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag 遺伝子をIn-Frameとなるように挿入・ligationさせた。



この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimerを作製し、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

B-3-6. SV40 Large T antigen ORF - GFP ベクター (SYN-2245-2) の構築

遺伝子クローン (VG0402) を鋳型として、終止コドンとアミノ酸配列の非翻訳領域(合計:355bp)を除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域 (2,124bp) を増幅した。ベクターDNA (pAcGFP-N1) のマルチクロニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag ORF遺伝子をIn-Frameとなるように挿入・ligationさせた。この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimerを作製し、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

B-3-7. hTERT - GFP ベクター (SYN-2142-1) の構築

Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)は、テロメア長さを維持することができる細胞のリポ核タンパク質の逆転写酵素である。テロメアとは、真核生物の染色体の末端にある反復DNA領域であり、染色体末端を複製・保護する機能を有している。原核生物の染色体は環状であるため、複製が終結するという事はおこらないが、真核生物の通常のラギング鎖DNAが複製される際には、細胞分裂時にテロメアが短くなり、細胞がテロメア依存的

に老化すると考えられている。テロメラーゼは、自身のRNA部分を鋳型として直鎖状の染色体の3'末端にTTAGGG反復配列を付加することによってテロメア長を維持することができる。これはヒトの癌細胞によくみられるパスウェイであり、テロメアのホメオスタシス (恒常性) を保っている。テロメア長が細胞の増殖能を制御して細胞が無限に分裂するには、テロメアの維持が不可欠であると考えられている。

本研究で使用したhTERTは、The Global Bioresource Center の American Type Culture Collection (ATCC) から cDNA を購入した。hTERTを含むプラスミドDNAを抽出・精製した後、EcoR I で消化し、hTERTを含む約3.4kbp断片を回収し、ベクターDNAのマルチクロニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCRで増幅させたhTERT遺伝子を挿入・ligationさせた。この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認するため、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

B-4. 細胞への遺伝子導入

細胞への遺伝子導入方法は、リポフェクション法 (8試薬×4条件) とエレクトロポレーション法で検討した。

リポフェクション法で使用した試薬は、Lipofectin Reagent (Invitrogen)、Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen)、FuGENE® (Roche)、TurboFect™ in vitro Transfection Reagent (Fermentas)、Nano Juice™ Transfection Kit (TAKARA Bio)、TransIT®

Transfection Reagent (TAKARA Bio)、GenJet™ Transfection Reagent (SigmaGen Lab)、およびCellpfect™ Transfection Kit (GE Healthcare Life Sciences)の8種類を用いた。DNAと各試薬との混合条件は、1:1、1:2、1:3、1:4の4条件を検討した。

エレクトロポレーション法は、Gene Pulser Xcell (BIO-RAD) を使用した。10⁶ cell/mlの細胞に対して2 mmのキュベットを使用し、条件はExponential wave、またはSquare waveを用いて、電圧は75~200 V、Pulse lengthは10 or 20 msec、パルス数は1回、または2回とした。

なお、平成20年度の研究においては、まずS-SV40とS-hTERTの遺伝子導入を検討した。ベクターにDsRedが組み込まれているため、導入された細胞は、倒立蛍光顕微鏡で観察することにより、GFPベクターと比較すると若干暗いが蛍光を判別することができる。

さらに、平成21年度ではおよそ10 µl程度の微量サンプル量で遺伝子導入ができる新しいエレクトロポレーション法による検討を行った。なお、平成21年度に作製した新しいベクターには Green Fluorescent Protein (GFP) が目的遺伝子の直後に連結して組み込まれているため、導入された細胞は、倒立蛍光顕微鏡で観察することと緑色の蛍光を発していることから、遺伝子導入効率を判別することができる。

B-5. HCE-TのCloningと細胞特性

HCE-T細胞をFACS Vantage SE (BD) を用いて、Integrin β1でのセルソーティングを行い、Cloningを行った。また角膜上皮細胞の特異的マーカーの1つであるKeratin-3の発現

が継代培養によって変化しないかどうかを検討した。

B-6. HCE-NYとHCE-Tの選択分離と細胞特性

HCE細胞にSV40 Large T antigenを導入した細胞 (HCE-NY) とHCE-T細胞にhTERT遺伝子を導入した細胞 (HCE-T hTERT) をセルソーター (FACS Vantage SE; BD) を用いて、GFPの蛍光でセルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った。

B-7. HCE-T hTERTを用いた三次元角膜培養モデル作製の試み

HCE-TにhTERT遺伝子を導入したことによる細胞分化能の回復を評価した。

HCE-T hTERTをセルカルチャーインサート上に播種し、無血清培地 (CnT-20) で3日間コンフルエントになるまで培養した。その後、血清含有培地 (アッセイ培地; J-TEC) で培養し、その後セルカルチャーインサートの内側の培地を抜き取り、既報のようにエアリフト法による培養を行い、HCE-T hTERTの分化能 (細胞重層化) を評価した。

B-8. ヒト不死化角膜上皮細胞株における角膜上皮細胞特異的マーカーを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株 (HCE-NY) を用いて、Triton X-100を被験物質 (24時間反応) として、角膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。なお、検討したTriton X-100の処理濃度は、100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6,

0.8, 0 $\mu\text{g/ml}$ とした。

なお、同時に既報に基づいた Neutral Red法による細胞生存率も検討した。

(倫理面への配慮)

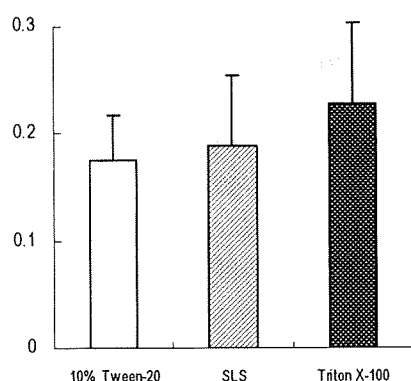
本研究で使用したヒト正常角膜上皮細胞は、市販されている細胞、研究用で販売・分譲されている細胞、および研究用として購入した眼球（角膜）組織から分離培養した細胞を用いているため、特別な倫理面への配慮は必要ないと考えている。

C. 研究結果

C-1. ブタ角膜組織を用いた試験法の開発に関する結果と今後の展開

凍結ブタ角膜組織片での評価では、BCOP と同様にフルオレセインを用いた浸透性を評価した。結果として、標準物質の無刺激と MAS25、および MAS50 の間での違いは検出されたが、無刺激でのフルオレセインの浸透性が予想よりも高かったため、ベース値が高いものとなっており、有意差を出すことは出来なかった (Table 1.)。

Table 1.



この原因として、凍結処理によりブタ角膜の角膜上皮細胞のバリア機能が

著しく破綻するためであると推察した。そこで現在、ヒト角膜の移植片を一定期間冷蔵で保存することができる角膜保存溶液での検討を開始している。

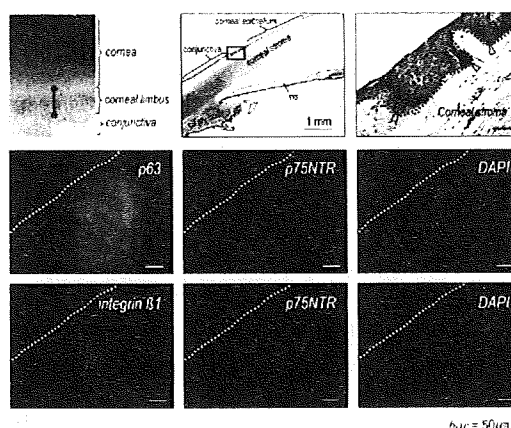
C-2. 正常ヒト角膜輪部由来細胞 (HCE) の培養と分析

C-2-1. ヒト角膜輪部組織の染色

ヒト角膜輪部組織には、角膜上皮幹/前駆細胞が存在することは、既に多くの論文で報告されている。そこで、今回使用した角膜輪部組織における角膜上皮幹/前駆細胞の存在を確認した。

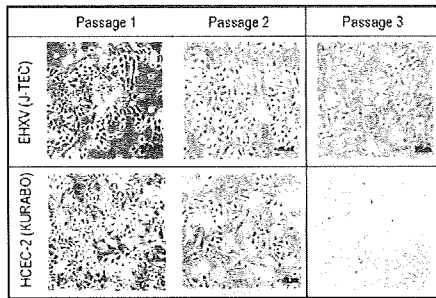
角膜輪部組織の組織切片標本をH.E.染色したところ、角膜上皮の基底領域の細胞で、メラニン顆粒を有し、周辺の細胞よりも細胞核の大きさも細胞全体の大きさも小さく、細胞が凝集している（クラスターを形成している）ような細胞集団が存在していた。

免疫組織染色の結果では、Integrin $\beta 1$ (CD29)、p63、およびp75NTR陽性の細胞は、角膜上皮の基底領域の細胞で最も強いシグナルが観察され、角膜上皮の表面に近づくにつれ、それらのシグナルは減少した。



C-2-2. HCEC-2とEHXVの継代培養

無血清培地 (EpiLife-KG2: EpiLife™+HCGS) を用いて、Non-CoatのディッシュでFeeder細胞の無い培養条件で細胞の継代培養実験を行った。

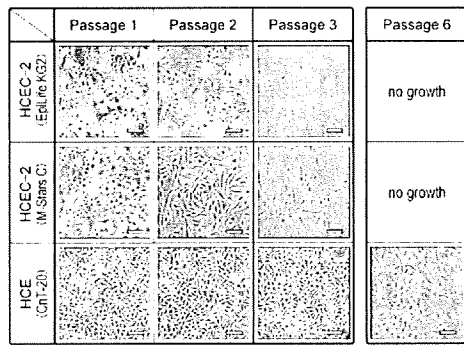


HCEC-2は3継代目で殆どの細胞が増殖しなくなった。EHXVは3継代目で細胞の膨化が顕著となり、4継代目で細胞が殆ど増殖しなくなった。

C-2-3. HCEC-2とHCEの継代培養

HCEC-2は、無血清培地(EpiLife™+HCGS)と血清含有上皮細胞培養用培地 (M-Stars C) で培養した。HCEは、PCT Corneal Epithelium Medium (CnT-20) を用いて培養した。

HCEC-2は、2継代目で既に上皮細胞様形態から変化し始め、3継代目では多くの細胞がディッシュに接着することが出来ず、その後、継代することが出来なかった。



HCEは、4継代目までは上皮細胞様

の多角形の細胞形態を呈しており、6継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察された。

C-2-4. 正常ヒト角膜輪部由来細胞 (HCE) の分析

角膜組織から分離直後の細胞、2継代目、および4継代目の細胞を用いて、p63、Integrin β1 (CD29)、p75NTR、TrkA、およびkeratin-3の発現を検証した。

分離直後の細胞では、p63陽性細胞は40.4 ± 2.1 %、Integrin β1陽性細胞は34.4 ± 2.0 %、p75NTR陽性細胞は28.4 ± 3.1 %、TrkA陽性細胞は24.8 ± 3.2 %、keratin-3陽性細胞は70.3 ± 2.7 %であった。

2継代目と4継代目の細胞では、p63陽性細胞は78.6 ± 2.4 %と49.6 ± 4.7 %、Integrin β1陽性細胞は98.7 ± 0.4 %と97.0 ± 1.1 %、p75NTR陽性細胞は70.2 ± 5.0 %と7.8 ± 0.8 %、TrkA陽性細胞は85.5 ± 5.3 %と23.8 ± 2.0 %、keratin-3陽性細胞は98.6 ± 0.5 %と98.2 ± 0.5 %であった。

C-3. 構築した発現ベクターの解析

C-3-1. SV40のベクター作製

挿入するSV40の準備としてPCRによる目的領域を増幅した。Forward PrimerとReverse Primerは以下のように設計した。

SV40-Forward Primer :

CGGAATTCATGGATAAAGTTTTTAAACAG

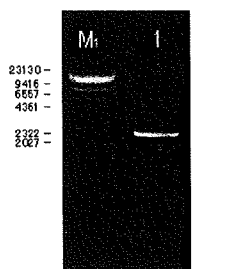
SV40-Reverse Primer :

CGGGATCCGGATCCAGACATGATAAGATAC

次に、以下の条件でPCR Mixtureを調整し、PCRを実施した。

Template (10 ng/ μ l)	1.0 μ l
Forward Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
5 \times PrimersSTAR buffer	10 μ l
dNTPs Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	33.5 μ l

PCRサイクルは、98℃：10秒、55℃：10秒、72℃：2分で実施した。次に3 μ lのPCR Productsを用いて、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



M1 : λ -Hind III DNA Marker
1 : Clone 1553 \times dil (1 μ l)

以上の結果から、約2.6KbpのSV40 PCR Productsを増幅させることができた。

次にベクター (Stable ベクターの場合は、pIRES-DsRed ベクター、Control ベクターの場合は、pTRE-Tight ベクター) と PCR ProductsのLigationさせるため、切断酵素 (EcoR I と BamH I) を用いて切断処理を行った。

《PCR Productsの切断酵素処理》

PCR Products	0.5 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10 \times K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

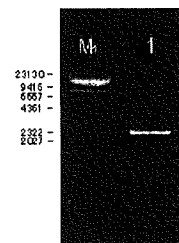
酵素処理は、37℃で4時間行った。

《ベクターの切断酵素処理》

ベクター	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10 \times K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

酵素処理は、37℃で16時間行った。

次に3 μ lの切断酵素処理後のベクターを用いて、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



M1 : λ -Hind III DNA Marker
1 : pTRE-Tight-EcoR I BamH I

以上の結果から、約2.6Kbpの切断酵素処理したベクターが確認できた。

次にPCR Productsと切断酵素処理したベクターを以下の条件でLigationさせた。

使用キット：DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

Insert DNA	100 ng
ベクター DNA	50 ng
Solution I	5 μ l
H ₂ O	Up to 10 μ l

16℃で2時間、Ligationさせた。

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

Gently mix 10 μ l reaction mixture / 100 μ l E.coli Competent Cell(JM109)

↓

On ice for 30 min.



Incubate cells for 45 sec. at 42°C



On ice for 1 min.



Add SOC medium up to 1 ml incubate by shaking (160-225 rpm) for 1 hour at 37°C



1 ml is recommended for plating on dish (Amp)



Incubate overnight at 37°C

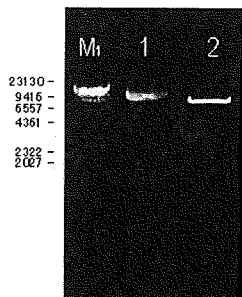
C-3-2. hTERTのベクター作製

SV40と同様にhTERTのPCRを行い、hTERTのPCR Productsを作製し、ベクターとのLigationを行うため、制限酵素 (EcoR I) 処理を以下のように実施した。

《PCR Productsの切断酵素処理》

PCR Products	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10×H buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

制限酵素を用いて、37°Cで3時間処理した。切断酵素処理前 (レーン1) と切断酵素処理後 (レーン2) のhTERT Plasmidを各3 μ lずつ使用して、1%Agarose Gelにて電気泳動した。

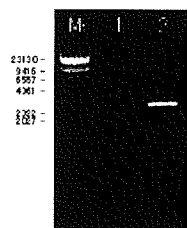


Mh : λ -Hind III DNA Marker
1 : Clone 1918 template plasmid
2 : Clone 1918 template - EcoR I

《ベクターの切断酵素処理》

ベクター	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10×H buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

制限酵素を用いて、37°Cで16時間処理した。切断酵素処理前 (レーン1) と切断酵素処理後 (レーン2) のベクター DNAを各3 μ lずつ使用して、1%Agarose Gelにて電気泳動した。



Mh : λ -Hind III DNA Marker
1 : pTRE-Tight plasmid
2 : pTRE-Tight-EcoR I

以上の結果から、約2.6Kbpの切断酵素処理したベクターが確認できた。

次にPCR Productsと切断酵素処理したベクターを以下の条件でLigationさせた。

使用キット : DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

Insert DNA	70 ng
ベクター DNA	50 ng
Solution I	5 μ l
H ₂ O	Up to 10 μ l

16°Cで2時間、Ligationさせた。

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

Gently mix 10 μ l reaction mixture / 100 μ l E.coli Competent Cell(JM109)



On ice for 30 min.

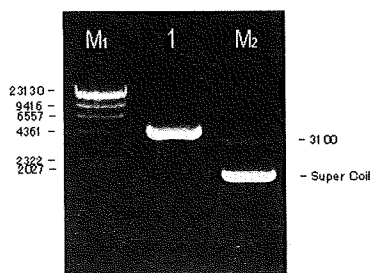


Incubate cells for 45 sec. at 42°C

↓
 On ice for 1 min.
 ↓
 Add SOC medium up to 1 ml
 incubate by shaking (160-225 rpm)
 for 1 hour at 37°C
 ↓
 1 ml is recommended for plating on
 dish (Amp)
 ↓
 Incubate overnight at 37°C

C-3-3. S-SV40に導入されたSV40の Plasmid DNA (Clone 2040)の 確認

S-SV40が挿入された
 pIRES2-DsRed-Expressベクター
 を大腸菌に形質転換し、液体培養した。
 培養菌体より Plasmid Mega Kit
 (QIAGEN)を用いて抽出、精製した
 Plasmid DNAを電気泳動して確認し
 た。



M1 : λ -Hind III DNA Marker
 1 : Clone 2040-4 5× dil (1 μ l)
 M2 : pUC119 (200ng/6 μ l)

得られたPlasmid DNAを吸光度計
 (Nanodrop Spectrophotometer :
 ND-1000)にて測定したところ、
 A260/A280のratioは1.94、濃度は1.37
 μ g / μ lであり、純度の高いPlasmid
 DNAを得ることができた。

次に精製したSV40 Plasmid DNA
 を細胞へ導入した際の検出のため、リ
 アルタイムPCR法でのPrimerと

Probeの作製を行うこととした。しか
 し、購入・使用したJCRB Gene Bank
 のSV40の完全長のDNAシーケンスデ
 ータは公表されていないため、
 pIRES2-DsRedベクターのMCSの上
 流領域からのSequence Primerを設
 計し、Sequencer (3730 XL DNA
 Analyzer, ABI)で解析を行いながら、
 MCS内を順方向、または逆方向でシー
 ケンスを行った。作製したシーケンス
 Primerは、以下のとおりである。

pIRES-DsRed Express Primer :

AATGGGCGGTAGGCGTGT

Primer-1 :

CAATGGCCTGAGTGTGCAAA

Primer-2 :

AAGGTAGAAGACCCCAAG

Primer-3 :

GTTGTTATTGCTTGGGATGT

Primer-4 :

GTTAATTTGCCCTTGGACAG

Primer-5 :

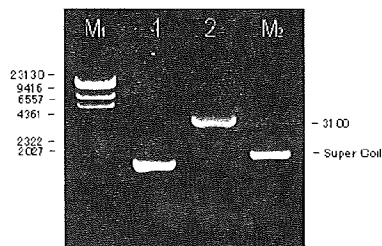
GATTGGCTAAGAAACAGTGA

これらのPrimerを用いて、SV40の
 全長シーケンスデータを得ることが
 できた。

C-3-4. C-SV40に導入されたSV40の Plasmid DNA (Clone 1553)の 確認

C-SV40が挿入された pTRE-Tight
 ベクターを大腸菌に形質転換した。
 アンピシリンを含むLB寒天平板で培
 養し、発育してきたコロニーを釣菌し、
 アンピシリンを含む2 mlのLB液体
 培地で8時間、37°C、200 rpmの条件
 で振盪培養した。次に Main culture
 として、500 μ lの振盪培養した菌液
 をアンピシリンを含む1 LのLB液体
 培地で16時間、37°C、150 rpmの条
 件で振盪培養した。培養した菌液を

Endo-Free Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Code NO. 12362)を用いて抽出、精製したPlasmid DNAを電気泳動して確認した。

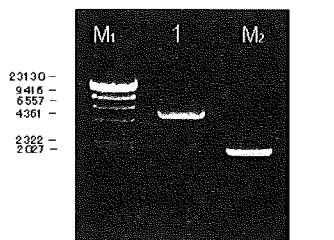


M1 : λ -Hind III DNA Marker
 1 : pTRE-Tight 10 \times dil (1 μ l)
 2 : Clone 1553-12 10 \times dil (1 μ l)
 M2 : pUC119 (200ng/6 μ l)

得られたPlasmid DNAを吸光度計 (Nanodrop Spectrophotometer : ND-1000) にて測定したところ、A260/A280のratioは1.96、濃度は0.51 μ g/ μ lであり、純度の高いPlasmid DNAを得ることができた。

C-3-5. S-hTERTに導入されたhTERTのPlasmid DNA (Clone 1956) の確認

S-hTERT が挿入された pIRES2-DsRed-Express ベクターを大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体より Plasmid Mega Kit (QIAGEN)を用いて抽出、精製したPlasmid DNAを電気泳動して確認した。



M1 : λ -Hind III DNA Marker
 1 : Clone 1956-2 . 5 \times dil (1 μ l)
 M2 : pUC119 (200ng/6 μ l)

得られたPlasmid DNAを吸光度計 (Nanodrop Spectrophotometer : ND-1000) にて測定したところ、A260/A280のratioは1.96、濃度は0.75 μ g/ μ lであり、純度の高いPlasmid DNAを得ることができた。

次にSV40 Plasmid DNAと同様に精製したhTERT Plasmid DNAを細胞へ導入した際の検出のため、リアルタイムPCR法でのPrimerとProbeの作製を行うこととした。しかし、今回、購入・使用したhTERTの完全長のDNAシーケンスデータは公開されていないため、pIRES2-DsRed ベクターのMCSの上流領域からのSequence Primerを設計し、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer)で解析を行いながら、MCS内を順方向、または逆方向でシーケンスを行った。作製したシーケンスPrimerは、以下のとおりである。

pIRES-DsRed Express Primer :

AATGGGCGGTAGGCGTGT

Primer-1 :

AACCAGCACGTCGTCGCC

Primer-2 :

GCGTACACCGGGGGACAA

Primer-3 :

CCAGACCCGCCGAAGAAG

Primer-4 :

GGATGAAGCGGAGTCTGG

Primer-5 :

GGAGACCACGTTTCAAAA

Primer-6 :

TCGCCAGCATCATCAAAC

Primer-7 :

GGCTGCGTGGTGAAGTTG

Primer-8 :

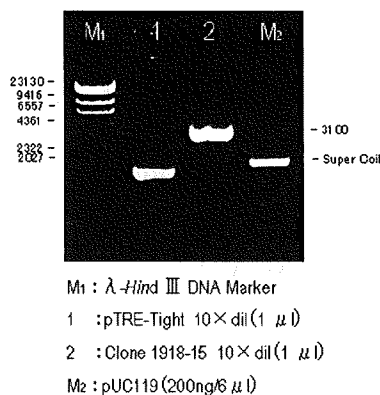
ACACGGCCTCCCTCTGCT

これらのPrimerを用いて、hTERTの全長シーケンスデータを得ること

ができた。

C-3-6. C-hTERT に導入された hTERT の Plasmid DNA (Clone 1918)塩基配列確認

C-hTERT が挿入された pTRE-Tight ベクターを大腸菌に形質転換した。アンピシリンを含む LB 寒天平板で培養し、発育してきたコロニーを釣菌し、アンピシリンを含む 2 ml の LB 液体培地で 8 時間、37℃、200 rpm の条件で振盪培養した。次に Main culture として、500 μ l の振盪培養した菌液をアンピシリンを含む 1 L の LB 液体培地で 16 時間、37℃、150 rpm の条件で振盪培養した。培養した菌液を Endo-Free Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Code NO. 12362)を用いて抽出、精製した Plasmid DNA を電気泳動して確認した。



得られたPlasmid DNAを吸光度計 (Nanodrop Spectrophotometer : ND-1000) にて測定したところ、A260/A280のratioは2.00、濃度は2.13 μ g/ μ lであり、純度の高いPlasmid DNAを得ることができた。

C-3-7. SV40 Large T antigen – GFP ベクター (SYN-2245-1)の解析 挿入するSV40の準備としてPCRに

よる目的領域を増幅した。Forward PrimerとReverse Primerは以下のように設計した。

SV40-Forward Primer :

CGGAATTCATGGATAAAGTTTTAAACAG

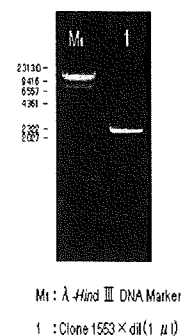
SV40-Reverse Primer :

CGGGATCCGGATCCAGACATGATAAGATAC

以下の条件でPCR Mixtureを調整し、PCRを実施した。

Template (10 ng/ μ l)	1.0 μ l
Forward Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
5 \times PrimersSTAR buffer	10 μ l
dNTPs Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	33.5 μ l

PCRサイクルは、98℃ : 10秒、55℃ : 10秒、72℃ : 2分で実施した。次に3 μ lのPCR Productsを用いて、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



以上の結果から、約2.6KbpのSV40 PCR Products (VG0402遺伝子クローン) を増幅させることができた。

そこで、この遺伝子クローンを鋳型として、終止コドンを除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域 (2,479bp) を増幅したPCR Products を電気泳動とシーケンスした。



M : Supercoiled DNA Ladder Marker

1 : SYN2245-1

次にベクターDNA (pAcGFP-N1ベクター) のマルチクローニングサイトとPCR ProductsをLigationさせるため、切断酵素 (EcoR I と BamH I) を用いて切断処理を行った。

《PCR Productsの切断酵素処理》

PCR Products	0.5 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10 \times K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

酵素処理は、37 $^{\circ}$ Cで4時間行った。

《ベクターの切断酵素処理》

ベクター	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10 \times K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

酵素処理は、37 $^{\circ}$ Cで16時間行った。

次にPCR Productsと切断酵素処理したベクターを以下の条件でLigationさせた。

使用キット : DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

Insert DNA	100 ng
ベクター DNA	50 ng
Solution I	5 μ l
H ₂ O	Up to 10 μ l

16 $^{\circ}$ Cで2時間、Ligationさせた。

この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimerを作製し、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

Gently mix 10 μ l reaction mixture / 100 μ l E.coli Competent Cell(JM109)

↓

On ice for 30 min.

↓

Incubate cells for 45 sec. at 42 $^{\circ}$ C

↓

On ice for 1 min.

↓

Add SOC medium up to 1 ml incubate by shaking (160-225 rpm) for 1 hour at 37 $^{\circ}$ C

↓

1 ml is recommended for plating on dish (Amp)

↓

Incubate overnight at 37 $^{\circ}$ C

C-3-8. SV40 Large T antigen ORF - GFP ベクター (SYN-2245-2) の解析

SV40 Large T antigen – GFP ベクター (SYN-2245-1)と同様の手法で発現ベクターを作製した。

VG0402遺伝子クローンを鋳型として、終止コドンとアミノ酸配列の非翻訳領域 (合計: 355bp) を除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域 (2,124bp) を増幅した。



M : Supercoiled DNA Ladder Marker
1 : SYN2245-2

ベクターDNA (pAcGFP-N1) のマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag ORF 遺伝子をIn-Frameとなるように挿入・ligationさせた。この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimerを作製し、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

C-3-9. hTERT - GFP ベクター (SYN-2142-1)の解析

SV40と同様にhTERTのPCRを行い、hTERTのPCR Productsを作製し、ベクターとのLigationを行うため、制限酵素 (EcoR I) 処理を以下のように実施した。

《PCR Productsの切断酵素処理》

PCR Products	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l

10×H buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

制限酵素を用いて、37°Cで3時間処理した。切断酵素処理前 (レーン1) と切断酵素処理後 (レーン2) のhTERT Plasmidを各3 μ lずつ使用して、1%Agarose Gelにて電気泳動した。

《ベクターの切断酵素処理》

ベクター	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10×H buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

制限酵素を用いて、37°Cで16時間処理し、約2.6Kbpの切断酵素処理したベクターが確認できた。

次にPCR Productsと切断酵素処理したベクターを以下の条件でLigationさせた。

使用キット : DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

Insert DNA	70 ng
ベクター DNA	50 ng
Solution I	5 μ l
H ₂ O	Up to 10 μ l

16°Cで2時間、Ligationさせた。

この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認するため、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。



M Supercoiled DNA Ladder Marker
1 SYN2142-1

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

Gently mix 10 μ l reaction mixture / 100 μ l E.coli Competent Cell(JM109)



On ice for 30 min.



Incubate cells for 45 sec. at 42°C



On ice for 1 min.



Add SOC medium up to 1 ml incubate by shaking (160-225 rpm) for 1 hour at 37°C



1 ml is recommended for plating on dish (Amp)



Incubate overnight at 37°C

C-4. 細胞への遺伝子導入結果

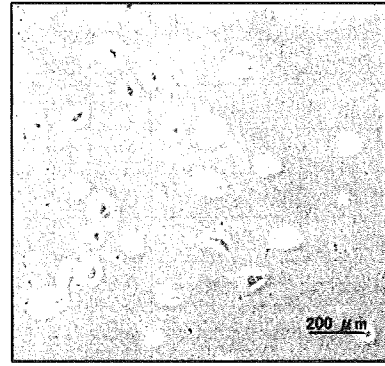
細胞への遺伝子導入方法は、リポフェクション法とエレクトロポレーション法で検討した。

C-4-1. HCEC-2への遺伝子導入

購入後 1 継代目の細胞を無血清培地 (EpiLife-KG2 : EpiLife™+HCGS) と3%血清を含む培地 (M-stars C) で培養した。

次に継代した細胞が60%程度のサブコンフルエントになった状態で、Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) と FuGENE® (Roche) を用いてS-SV40とS-hTERTの遺伝子導入を検討した。

無血清培地で培養した細胞は、導入後、直ちに多くの細胞が死滅し、僅かに生存した細胞の遺伝子導入率はほぼ0%であり、細胞は増殖することはなかった。



一方、3%血清培地で培養した細胞は、導入後、多くの細胞が生存したが細胞の形態は、円形から線維芽細胞様に伸張してしまった。生存した細胞における遺伝子導入率は一過性のものであったが1%程度であり、定常発現する細胞は観察されなかった。



C-4-2. リポフェクション法による遺伝子導入

各種試薬のリポフェクション法 (8 試薬×4条件) を用いて遺伝子導入効率を検討した。なお、遺伝子導入実験の際に使用した培地はOpti-MEM I Reduced-Serum Medium、検討細胞はEHXV (J-TEC)、導入遺伝子はS-SV40を用いた。

遺伝子導入24時間後に、蛍光倒立顕微鏡 (Power IX-71, Olympus) を用いてDS-Redの蛍光 (遺伝子が導入された細胞) が観察された細胞の割合は以下のとおりであった。

導入条件	1	2	3	4
Lipofectin Reagent	1.5	3.2	5.5	3.3
Lipofectamine 2000 Reagent	2.4	5.5	7.1	6.1
FuGENE	1.2	2.1	4.9	3.3
TurboFect in vitro Transfection	0.5	1.1	1.5	0.9
Nano Juice Transfection Kit	0.1	0.5	0.8	0.3
TransIT Transfection Reagent	0.4	1.5	2.1	1.7
GeneJet Transfection Reagent	0.9	1.1	2.8	1.5
Cellpfect Transfection Kit	0.2	0.3	0.9	0.7

(%)

- ・ 導入条件 1 DNA : 試薬 = 1 : 1
- ・ 導入条件 2 DNA : 試薬 = 1 : 2
- ・ 導入条件 3 DNA : 試薬 = 1 : 3
- ・ 導入条件 4 DNA : 試薬 = 1 : 4

Lipofectamine 2000 Reagentにて導入条件 3 (DNA : 試薬 = 1 : 3) で遺伝子導入を実施した時の細胞を蛍光倒立顕微鏡で観察した。

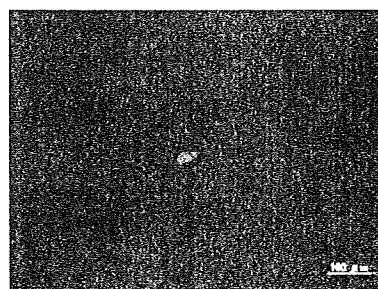


次に、遺伝子導入後に7日間培養した細胞を継代した後、再度、蛍光倒立顕微鏡を用いて、DS-Redの蛍光が観察された細胞は以下のとおりであった。

導入条件	1	2	3	4
Lipofectin Reagent	0.0	0.3	0.7	0.3
Lipofectamine 2000 Reagent	0.2	0.5	1.0	0.3
FuGENE	0.2	0.5	0.8	0.5
TurboFect in vitro Transfection	0.0	0.1	0.3	0.2
Nano Juice Transfection Kit	0.0	0.0	0.0	0.0
TransIT Transfection Reagent	0.0	0.0	0.2	0.0
GeneJet Transfection Reagent	0.0	0.0	0.2	0.0
Cellpfect Transfection Kit	0.0	0.0	0.1	0.0

(%)

Lipofectamine 2000 Reagentにて導入条件 3 (DNA : 試薬 = 1 : 3) で遺伝子導入を実施した時の細胞を蛍光倒立顕微鏡で観察した。



継代後にDS-Redの蛍光が観察された細胞は、遺伝子導入 24 時間後に観察された細胞よりも減少していた。遺伝子導入 24 時間後に観察された細胞は、一過性に発現が観察された細胞であり、継代後にも観察された細胞は、遺伝子が定常発現している可能性がある。しかし、現段階では、蛍光が観察された細胞の増殖性は非常に悪かった。

C-4-3. エレクトロポレーション法による遺伝子導入

エレクトロポレーション法では、Gene Pulser Xcell (BIO-RAD) を使用した。10⁶ cell/ml の細胞に対して 2 mm のキュベットを使用し、以下の 8 条件で遺伝子導入を検討した。

条件	波形	電圧 V	P.L.	Pulse 数
1	Exp	200	—	1
2	Exp	100	—	1
3	Exp	75	—	1
4	Squ	150	20	1
5	Squ	100	20	1
6	Squ	100	10	1
7	Squ	100	10	2
8	Squ	75	10	2

波形 Exp : Exponential Wave
 波形 Squ : Square Wave
 P. L. : Pulse length (msec)

エレクトロポレーション法を用いた実験結果は、ほとんどの細胞に遺伝子導入されなかった。

C-4-4. HCE への SV40 Large T antigen 遺伝子の導入

CnT-20で継代培養したHCEにSV-40 Large T antigen遺伝子を導入した。遺伝子導入は、微量エレクトロポレーション法を用いた。

遺伝子導入4時間前に培地を50% FBS含有Opti-MEM培地に変えた。2 × 10⁵ cell/mlに調整したHCEを遠心してペレットにした。このペレットをResuspension bufferで再懸濁し、この懸濁液に遺伝子 (SYN-2245-1、SYN-2245-2) を2 μg加えた。

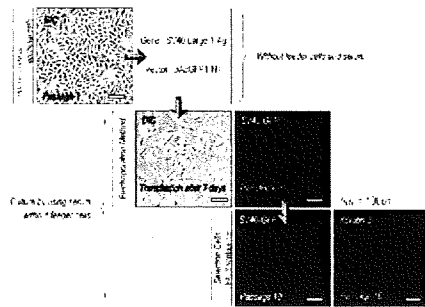
条件	波形	電圧V	P.L.	Pulse数
1	Squ	750	30	1
2	Squ	1000	30	1
3	Squ	2000	30	1
4	Squ	750	30	2
5	Squ	1000	30	2

波形 Squ : Square Wave
 P. L. : Pulse length (msec)

遺伝子導入24時間後に、蛍光倒立顕微鏡 (Power IX-71、Olympus) を用いて GFP の蛍光 (遺伝子が導入された細胞) を観察した。エレクトロポレーション法を用いた実験結果は、条件5が最も遺伝子の導入効率が良く、およそ21%の細胞に遺伝子が導入されていた。遺伝子が導入された細胞の名称は、『HCE-NY』とした。

C-4-5. HCE-NY細胞の選択分離

HCE-NYはGFPが導入されているため緑色の蛍光を発するが、遺伝子が導入されなかったHCE細胞は蛍光を発しない。そこで、セルソーター (FACS Vantage SE; BD) を用いて、GFPの蛍光でセルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った。ソーティングと継代培養を10回繰り返して実施し、HCE-NY細胞の純度は99.99%になった。なお、このHCE-NYでは、keratin-3を発現していた。



C-4-6. HCE-T への hTERT 遺伝子の導入

継代培養したHCE-TにhTERT遺伝子を導入した。遺伝子導入は、微量エレクトロポレーション法を用いた。

2 × 10⁵ cell/mlに調整したHCE-Tを遠心してペレットにした。このペレットをResuspension bufferで再懸濁し、この懸濁液に遺伝子 (SYN-2142-1) を2 μg加えた。

条件	波形	電圧V	P.L.	Pulse数
1	Squ	750	30	1
2	Squ	1000	30	1
3	Squ	2000	30	1
4	Squ	750	30	2
5	Squ	1000	30	2

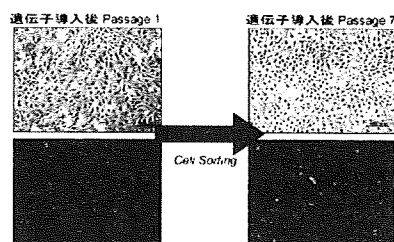
波形 Exp : Exponential Wave
 波形 Squ : Square Wave
 P. L. : Pulse length (msec)

遺伝子導入 24 時間後に、蛍光倒立顕微鏡 (Power IX-71, Olympus) を用いて GFP の蛍光 (遺伝子が導入された細胞) を観察した。エレクトロエレクトロポレーション法を用いた実験結果は、条件 5 が最も遺伝子の導入効率が高く、およそ 27% の細胞に遺伝子が導入されていた。遺伝子が導入された細胞の名称は、『HCE-T hTERT』とした。

C-4-7. HCE-T hTERT細胞の選択分離

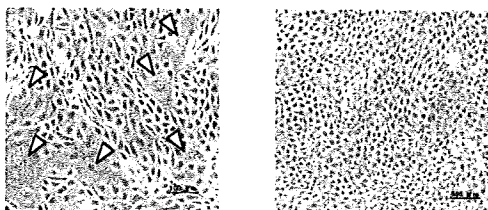
HCE-T hTERTはGFPが導入されているため緑色の蛍光を発するが、遺伝子が導入されなかったHCE-T細胞は蛍光を発しない。そこで、セルソーター (FACS Vantage SE ; BD) を用いて、GFPの蛍光でセルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った。

ソーティングと継代培養を7回繰り返して実施し、HCE-T hTERT細胞の純度は99.99%になった。

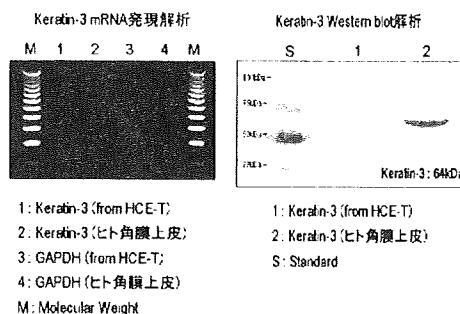


C-5. HCE-TのCloningと細胞特性

Integrin $\beta 1$ を細胞表面マーカーとして、Integrin $\beta 1$ 陽性細胞を分離したことにより、細胞形態を比較的揃えることができた。

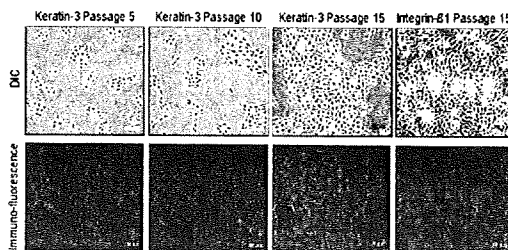


Cloning した HCE-T 細胞における角膜上皮細胞の特異的マーカーの 1 つである Keratin-3 の発現について、PCR と Western blot による解析を行った。



以上の結果から、Integrin $\beta 1$ で Cloning した HCE-T 細胞から Keratin-3 の mRNA と Keratin-3 のタンパク質が検出された。

さらに細胞継代による Keratin-3 と Integrin $\beta 1$ の発現について抗体を



用いて細胞染色した。

以上の結果から、Integrin $\beta 1$ で Cloning した HCE-T 細胞は、継代しても Keratin-3 と Integrin $\beta 1$ の発現は発現し続けていた。

なお、既に三次元培養についての検討も開始しており、HCE-T 細胞が重層化することを倒立顕微鏡にて確認した。