

刺激性試験のための元の性質を維持しながら 無限分裂するヒト角膜上皮細胞の作成

岩手大学理工学部細胞工学・分子遺伝学研究室

福田 智一

The Draize test has been used on rabbits since the 1960s to evaluate the irritation caused by commercial chemicals in products such as cosmetics or hairdressings. However, since 2003, such tests, including the Draize test for cosmetics, have been prohibited in European countries because they are considered problematic to animal welfare. For this reason, replacement of *in vivo* methods with alternative *in vitro* methods has become an important goal. In this study, we established a corneal epithelial cell line co-expressing a mutant cyclin dependent kinase 4 (CDK4), Cyclin D1, and telomerase reverse transcriptase (TERT). The established cell line maintained its original morphology, and had an enhanced proliferation rate. Furthermore, the cells showed a significant, dose-dependent, decrease in viability in an irritation test using glycolic acid. These cells can now be shared with toxicology scientists, and should contribute to increasing the reproducibility of chemical testing *in vitro*.

1. 緒言

刺激性を含む化学物質の安全性を評価することは、化粧品および身の回りのシャンプーなどの生活用品を開発する上で重要な項目である。1960年代より、様々な刺激性を評価する方法が考案されてきた¹⁾。これらの方法のうち、ウサギを用いたドレイズ法は事実上の標準手法であった。しかし2003年より欧州ではあらゆる化粧品の安全性試験においてドレイズ法を含む動物実験が禁止されている。これらの動物実験の禁止は動物愛護の観点から実施されたものである。したがって眼を用いた動物の刺激性試験を代替する評価法を考案することは科学のおよび動物愛護の観点から重要な課題である。

角膜上皮細胞は眼球組織の最も外側に存在する上皮細胞であり、外界からの物質の侵入を防御している。刺激性によって最初に暴露されるのが組織の特性上、角膜上皮細胞であり、このことから角膜上皮細胞で試験管内刺激性試験を実施することは必然性がある。この考えのもとに、ウサギの初代角膜上皮細胞を用いて短期暴露法 (STE法) が開発された²⁾。この方法はウサギの角膜上皮細胞へ被験物質を短時間暴露し、細胞死の割合で刺激性を判定する。しかしこれらの細胞であったとしても、ウサギはウサギであり、人間とは本質的に異なる。このためにウサギの眼のデータはあくまでヒトの眼のモデルであり限界がある。このことから我々はヒト由来角膜上皮細胞によって試験管内の刺激

性試験の材料として利用できないかと考えた。しかし初代培養細胞は数回の細胞継代の後に細胞分裂を培養ストレスのために停止してしまう。無限に細胞分裂できないことはヘイフリック限界と呼ばれている³⁾。

細胞老化による分裂停止の限界を乗り越えるために様々な方法が従来用いられてきた。具体的にはSV40 ラージTやヒトパピローマウイルス由来のE6/E7 遺伝子産物である。これらの癌遺伝子産物は腫瘍抑制遺伝子であるp53やRBを不活性化することが知られており、無限分裂させる方法として最も一般的である⁴⁾。しかしこれらのSV40 ラージTやE6/E7 遺伝子の発現は染色体の異常を誘発することが知られている^{5,6)}。

2011年に新たな無限分裂の方法が報告された。塩見らによるとR24C変異を持つサイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、サイクリンD1、テロメア逆転写酵素 (TERT) の発現によってヒト筋肉由来細胞の無限分裂が可能になった⁷⁾。これらの細胞は分化能力および元の染色体パターンを維持していた。この方法は導入する遺伝子の末尾の文字から、K4DT法 (変異型CDK4, サイクリンD, TERT) と名付けられた。さらに我々の研究チームは新規に作られたK4DT法がウシ、ブタ⁸⁾、スイギュウ⁹⁾、サル¹⁰⁾、アメリカ平原ハタネズミ¹¹⁾を含む様々な動物種で適用可能であることを示した¹²⁾。この幅広い動物で使用可能である原理として、導入するCDK4およびサイクリンD1遺伝子のアミノ酸配列が進化の上で高い保存性を持つことが予想された¹²⁾。本研究ではヒト角膜上皮由来の無限分裂細胞が従来の動物を用いた刺激性試験の代換えになると予想される。本研究は毒性研究ならびに動物愛護の見地から見て重要な研究である。



Human-derived Corneal Epithelial Cells Expressing Cell Cycle Regulators as a New Resource for *in vitro* Ocular Toxicity Testing

Tomokazu Fukuda

Graduate School of Science and Engineering, Iwate University

2. 方 法

2. 1. 細胞およびその培養法

ヒト角膜上皮細胞は米国 Lifeline Cell Technology 社からクラボウ株式会社を通じて購入した。培養には Lifeline Cell Technology 社が提供する基礎培地および増殖因子を使用した。細胞の継代には 1XPBS にて洗浄し、Stem Pro Accutase によって細胞を剥離、分散を行った。剥離、分散した細胞は 800 G, 5 分間遠心を行い、ペレット化した後に新しい培地によって再度分散を行った。

2. 2. レンチウィルスの作製および感染

新規に無限分裂するヒト角膜由来上皮細胞を作製するために組み換えレンチウィルスの作製および濃縮を行った。組み換えレンチウィルスの基本骨格として理化学研究所バイオリソースセンターの三好博士より分与いただいた CSII レンチウィルスベクターを用いた。感染効率をモニタリングするために、発現ベクターのオープンリーディングフレームの下流に IRES (Internal Ribosomal Entry Sites) および Venus 蛍光タンパク質を持つ CSII-CMV-MCS-IRES-Venus ベクターを使用した。CSII-CMV-MCS-IRES-Venus のマルチプルクローニングサイトへ変異型 CDK4 およびサイクリン D のタンパク質翻訳領域を 2A 自己消化ペプチドで連結したインサートを挿入した。また、CSII-CMV-R24CCDK4 および CSII-CMV-CyclinD、そして CSII-CMV-TERT の 3 種の遺伝子をモノシストロニックに発現するレンチウィルスを混合した混合組み換えウィルス溶液を作製した。ウィルス作製は 293T 細胞へのリポフェクション法で行い、詳細に関しては我々の過去の研究報告に準拠した¹³⁾。TERT を発現するレンチウィルスはその他の CDK4 およびサイクリン D1 を発現するレンチウィルスと比較して、4 kb と長いインサートサイズを持つためにレンチウィルスのタイターが低くなる。このために K4DT 細胞へ追加でハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ TERT 発現レトロウィルスを重感染させ、ハイグロマイシン耐性の K4DT 細胞を K4DT+T と表記した¹⁴⁾。

2. 3. ウェスタンブロッティング

野生型、K4D および K4DT+T 細胞よりタンパク質を可溶化させるために、我々は 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15M NaCl, 1% Triton X-100, 2.5mg/mL のデオキシコール酸を含む溶液を使用した。CDK4 およびサイクリン D1 のタンパク質レベルを検出するために、それぞれに対する特異的抗体を使用した。またコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いて検出した。全ての検出において二次抗体として anti-mouse IgG もしくは anti-rabbit IgG を使用した。詳細な検出条件は過去に我々の研究室から発表した論文の内容に準拠した¹⁴⁾。検出は化学発光で行い、画像

は LAS4000 mini で取得した。

2. 4. Population doubling assay

初代および K4D, K4DT+T 細胞における細胞増殖活性を測定するために、連続的な細胞継代を行った。詳細には各継代開始時に 5×10^4 細胞を 3 つの 35mm dish へ播種した。その後、どれかのウェルがコンフルエントになった時点で全てのウェルの細胞を accutase 処理し、剥離した。全てのウェルに存在した細胞数を計測した。測定した細胞数から PDL 値を算出した。PDL = $\log_2 (A/B)$ の式に基づいた。B は各パッセージの最初に播種した細胞数、A は各パッセージの終わりに得られた細胞数である。それらの PDL 値を累積として計算した。

2. 5. PCR 解析

初代ヒト角膜上皮細胞、K4D および K4DT+T 細胞よりゲノム DNA を抽出した。導入した遺伝子内に設定したプライマー配列もしくは、ヒト由来結節性硬化症原因遺伝子 (TSC2) のエクソン内に設定したプライマー配列をコントロールとして使用した。TSC2 遺伝子はヒトゲノム上に 2 コピーしか存在せず、類縁した遺伝子が存在しないこと、偽遺伝子が存在しないことが知られていることから内部コントロールとして使用した。増幅には東洋紡の KOD-FX および特異的プライマーを用いて増幅を行った。PCR 産物は分子量マーカーとともに 1% アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドによって検出した。

2. 6. F-アクチンの染色

野生型、K4D および K4DT+T 細胞を Lab-Tek チャンバースライド中に細胞形態を確認するために播種した。4% パラフォルムアルデヒドで固定後、0.2% Triton × 100 溶液にてパーミアビライズ処理した後に F アクチンを染色するために 1/40 希釈したローダミン標識したファロイジン染色によって染色した。核染色を 1/300 希釈した DAPI 溶液を用いて行った。観察はキーエンス社の蛍光顕微鏡 BZ9000 にて実施した。

2. 7. 細胞周期解析

細胞周期解析を行うため、おおよそ 4×10^5 細胞の野生型、K4D および K4DT 細胞を 70% エタノールにて固定した。野生型、K4D および K4DT について 6 回分の細胞からデータを得た。固定した細胞は Millipore 社の cell cycle assay kit を用いて染色を行った。検出は Millipore 社の Muse Cell Analyzer を用いた。検出結果はノンパラメトリック法の多重比較である Steel 法を用いて有意差を検出した。

2.8. 刺激性試験

高橋らによって開発された短時間暴露法 (STE 法) を用いて試験管内の暴露を行った²⁾。我々はグリコール酸を陽性対象物質として用いた。初代培養細胞もしくは K4DT+T 細胞に関して、0.5% もしくは 5% のグリコール酸を 5 分間暴露した。PBS を陰性対象として用いた。PBS にて 2 回洗浄後、アキュターゼにて剥離した。剥離した細胞をトリパンブルーによって染色、生存細胞数、総細胞数を算出した。細胞生存率は総細胞数における生存細胞数によって算出した。

3. 結果

無限分裂するヒト由来角膜上皮細胞を作製するために、ポリシストロニックに変異型 CDK4 およびサイクリン D1 を発現するレンチウイルス (CSII-CMV-CDK4R24C-Cyclin D-IRES-Venus) およびモノシストロニックに発現するレンチウイルスの混合溶液 (CSII-CMV-CDK4R24C, CSII-CMV-CyclinD, CSII-CMV-TERT) を用いた。Figure 1A に導入したレンチウイルスの遺伝子構造を示す。K4DT の混合レンチウイルスを感染させた後に、前述したように TERT のウイルスのタイターが比較的低いために、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ TERT の発現レトロウイルスベクターの追加感染を行った。Figure 1B に PCR 法によるゲノム状の TERT の挿入遺伝子の検出結果を示す。

K4DT 細胞においてのみ、TERT 遺伝子の挿入が認められた。

Figure 2A に遺伝子導入後の細胞の形態を示す。変異型 CDK4 およびサイクリン D1、TERT の導入は細胞形態の変化を認めなかった。さらに詳細な細胞骨格の変化の可能性を考慮し、細胞骨格の主要要素である F-アクチン染色を行った。結果を Figure 2B に示す。その結果、野生型角膜上皮細胞と比較して有意な F-アクチンの分布変化は認められなかった。

Figure 3A に連続的な細胞継代を行った結果を示す。野生型細胞は継代 1 回にて細胞増殖を停止した一方、K4DT+T 細胞は PD20 を超える細胞増殖を示した。さらに K4D 細胞はおおよそ 3 回目の継代において細胞増殖を停止した。Figure 3B に継代 1 回目の細胞形態の様子を示す。野生型はほとんど細胞増殖を停止しているが、K4D および K4DT+T 細胞は継続的に細胞増殖していることがわかる。興味深いことに継代 3 回目において K4D 細胞の一部において上皮から間葉系の細胞への形態変化が認められた (Figure 3C and D)。

次に継代 1 回目の細胞において細胞周期に対する CDK4、サイクリン D1 および TERT の発現の影響を評価した。Figure 4A, B, C に示すように細胞周期の解析結果を示した。G0/G1, G2/M, S 期の細胞を異なる色で示した。K4D および K4DT 細胞において G2/M 期の細胞割合の増加と G0/G1 期の細胞の統計学的に有意な減少が野生型細胞

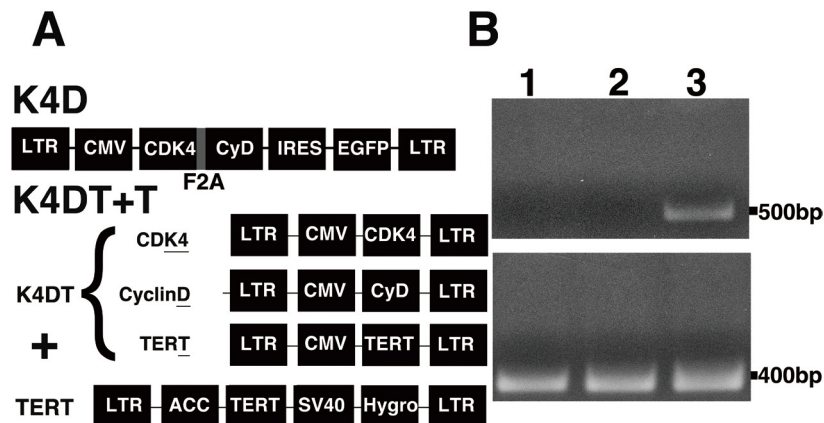


Figure 1 Schematic representation of the different expression vectors used in this study, and confirmation of genomic integration and protein expression.(A) Structure of the expression vectors used to establish the K4D and K4DT+T cell lines. LTR; long terminal repeat, CMV; cytomegalovirus promoter, Hygro; Hygromycin resistant gene. (B) Confirmation of the genomic integration of the TERT expression cassette by PCR: 1; primary cells, 2; K4D cells, 3; K4DT+T cells. The upper panel shows the specific 500 bp PCR product confirming the presence of the TERT expression cassette, whereas the lower panel shows the 400 bp PCR product derived from the human Tuberos Sclerosis Type II gene. (C) Detection of the introduced genes at the protein level by western blot analysis: 1; primary cells, 2; K4D cells, 3; K4DT+T cells. Western blots using anti-CDK4 (upper panel) , anti-Cyclin D (middle panel) , and anti-tubulin (lower panel) antibodies are shown.

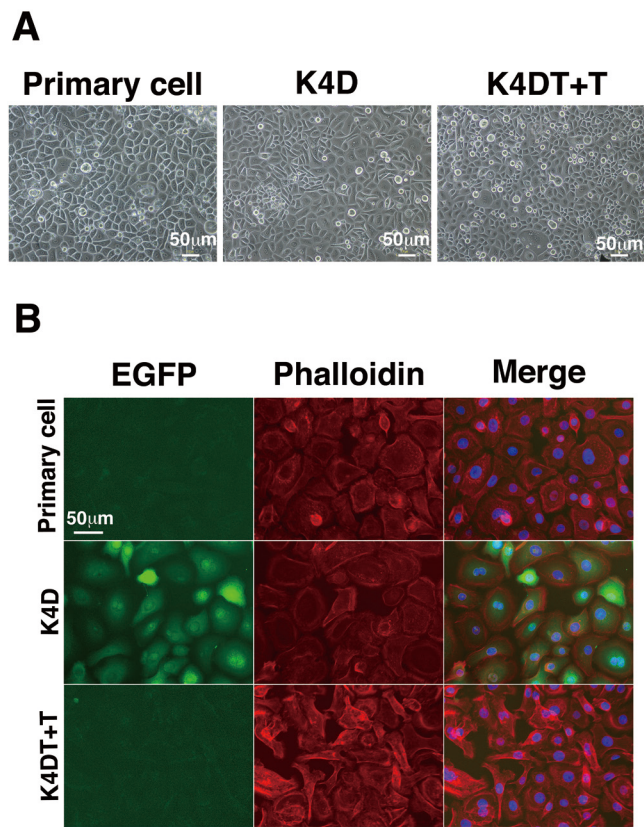


Figure 2 Cell morphology of primary, K4D, and K4DT+T cells. (A) Cell morphology using phase contrast microscopy at passage 0. (B) Morphological observation of the cytoskeleton (F-actin) and the nucleus, following staining with rhodamine-labelled phalloidin and DAPI, respectively. Left-hand panel, EGFP fluorescence, middle panel, phalloidin staining, right-hand panel, merged images of the phalloidin, DAPI, and EGFP stains.

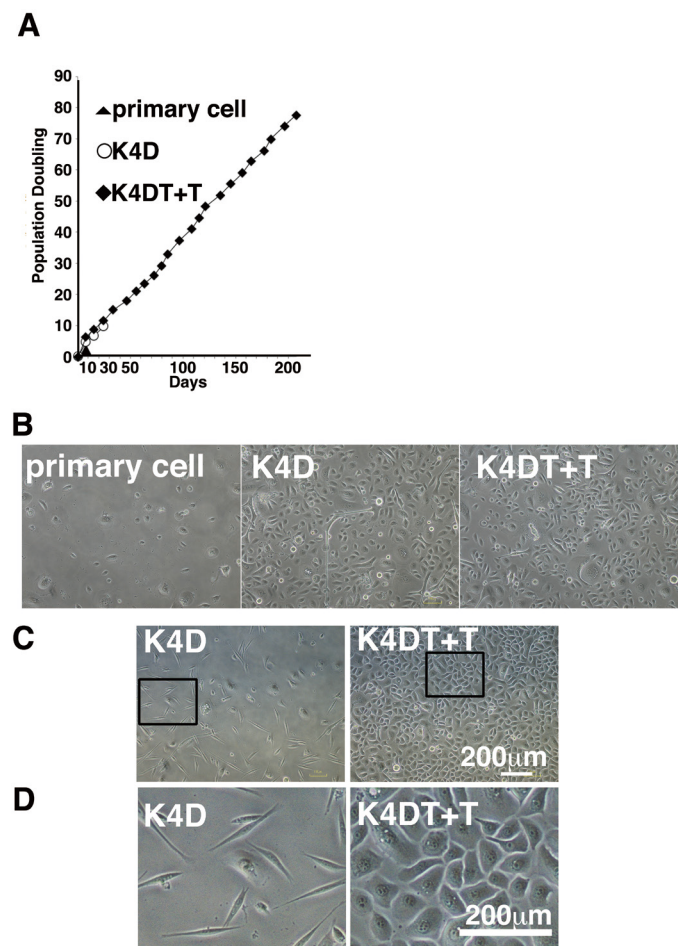


Figure 3 Cell growth status and morphological observation of primary, K4D, and K4DT+T cells. (A) Cell growth and sequential passaging of primary, K4D, and K4DT+T cell. Cell growth is represented by the cumulative population doubling value. (B) Morphological observation at passage 1 in the population doubling assay. (C) Cell morphology of K4D and K4DT+T cells at passage 3. Upper panels, lower magnification of K4D (left-hand panels) and K4DT+T cells (right-hand panels). Lower panels, higher magnification of K4D cells (left-hand panels) and K4DT+T cell (right-hand panels).

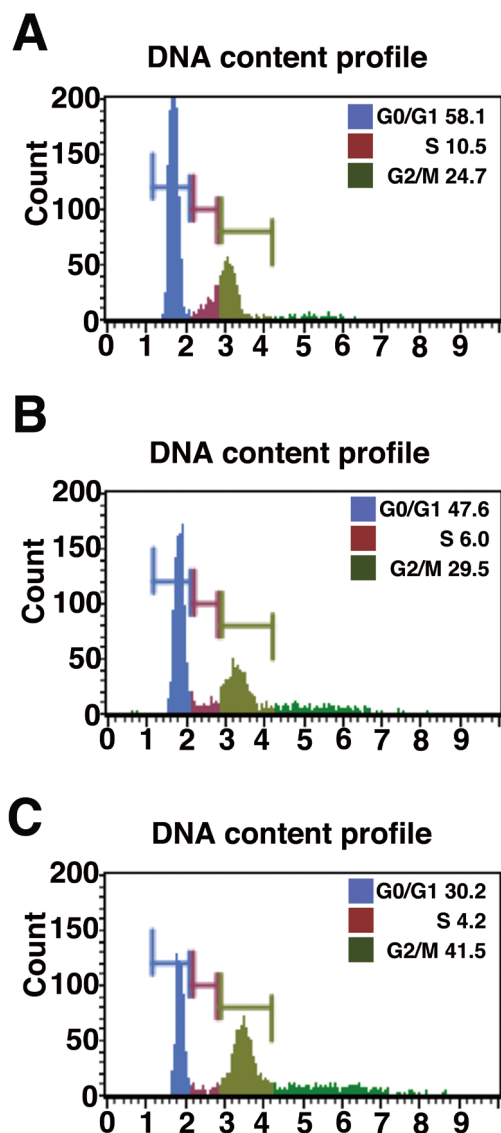


Figure 4 Cell cycle analysis of primary, K4D, and K4DT cells. (A) Cell cycle analysis of primary cells. (B) Cell cycle analysis of K4D cells. (C) Cell cycle analysis of K4DT+T cells.

胞と比較して認められた。これらの結果からヒト角膜上皮細胞において変異型CDK4およびサイクリンD1の発現によって細胞増殖および細胞回転が加速されていると結論した。

我々はK4D細胞において継代3回目周辺より間葉系細胞への形態変化が認められた。我々はこの原因を探るためにまず、細胞形態および下流に位置する蛍光タンパク質の発現量を蛍光顕微鏡にて検出を行った。Figure 5AおよびBに示すように、上皮形態を維持する細胞においてはEGFPを強く発現していたが、間葉系の細胞形態を示す細胞は比較的蛍光強度が弱かった。EGFPと変異型CDK4およびサイクリンD1の発現カセットはIRES配列で繋がれているため、両者の発現量は高い相関を持つと考えられ

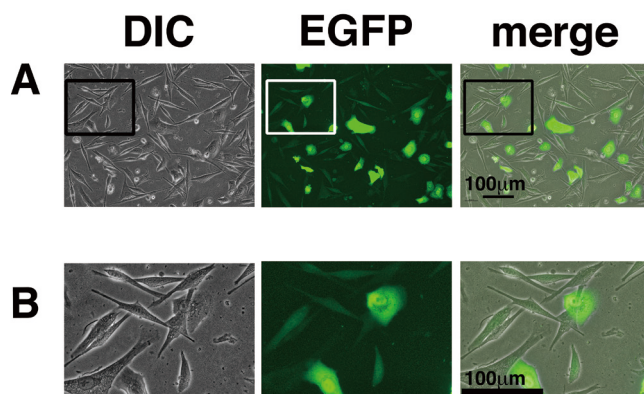


Figure 5 Cell morphology and EGFP expression of K4D cells at passage 3. (A) K4D cells at passage 3. Cell morphology by differential interference contrast microscopy (DIC, left-hand panel), EGFP fluorescence (EGFP, middle panel), and merged images (merge, right panel). (B) High magnification view of K4D cells at passage 3 by DIC (left-hand panel), EGFP fluorescence (EGFP, middle panel), and merged images (right-hand panel).

る。このことから蛍光強度が低下した間葉系細胞においては細胞内の変異型CDK4およびサイクリンD1遺伝子の発現量が上皮様形態の細胞と比較して低いと予想される。間葉系の形態を示す細胞の割合は継代数が増加するにつれ増加した。これらの状況からポリシストリロニックに変異型CDK4およびサイクリンD1を発現するヒト角膜上皮細胞は刺激性試験の代換えとして利用するためには安定性に欠けると判断した。

前述したように高橋らはウサギの角膜上皮細胞を利用して短時間暴露法(STE法)を開発した。これに従って0.5%および5%グリコール酸を用いて野生型およびK4DT+T細胞へ暴露を行い、STE法によって評価した。Figure 6Aに示したように野生型およびK4DT+T細胞は0.5%もしくは5%のグリコール酸によって有意に細胞数が低下した。また暴露後の細胞形態ではFigure 6Bに示したように細胞質内の空胞化や核の明瞭化を伴い、細胞の変性を示していた。これらの結果から我々の作製したヒト角膜由来のK4DT+T細胞は化学物質の刺激性を判断する上で有用な試験管内検出系になると考えられた。

4. 考 察

本研究において我々は新規ヒト角膜由来の無限分裂上皮細胞の作製に成功した。作製には変異型CDK4、サイクリンD1およびTERTを用いた。野生型のヒト角膜上皮細胞は低密度で播種することで1回の細胞継代にも耐えられず、細胞分裂を停止した。しかしK4DT+T細胞は低密度においてもより強い細胞増殖活性を示した。これらのK4DT+T細胞の特性は細胞のハンドリングのしやすさを示しており、再現性の良い試験結果を得る上で有用な性質

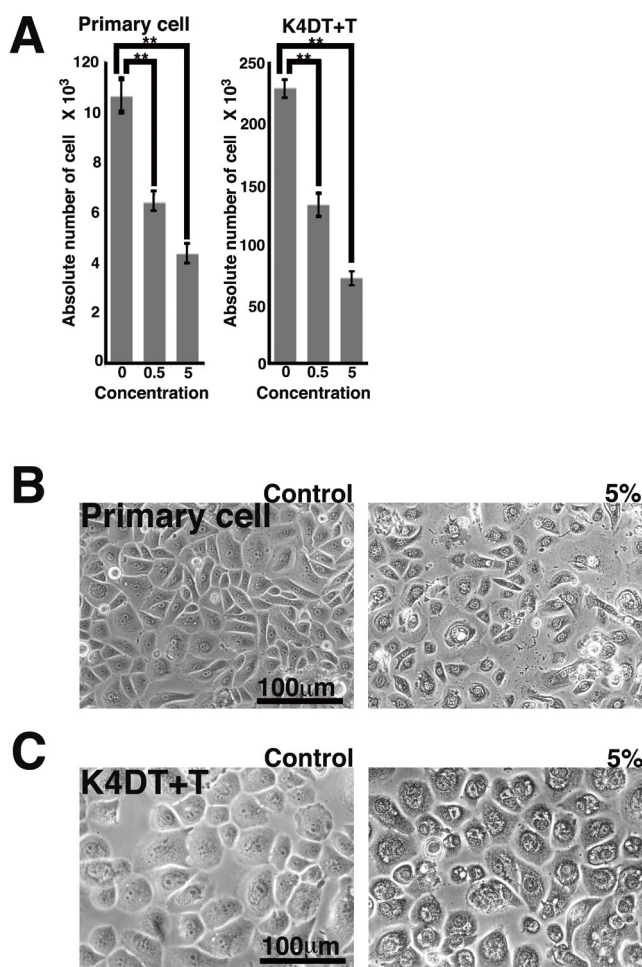


Figure 6 Assessment of glycolic acid (0.5% and 5%) as an irritant in primary and K4DT+T cells using the short time exposure (STE) method. (A) Number of primary and K4DT cells. The data are expressed as the mean, with the error bars representing the standard error. Two stars indicates a statistical significance more than 1%. (B) Cell morphology of PBS treated (control) primary cells (left-hand panel), and 5% glycolic acid treated primary cells (right-hand panel). (C) Cell morphology of PBS treated K4DT+T cells (left-hand panel) and 5% glycolic acid treated K4DT+T cells (right-hand panel).

と考えられる。また初代培養細胞の場合は、比較的短期間で細胞増殖活性を失うために繰り返しサンプリングと培養を繰り返さなければならない。このことは試験の再現性において影響する因子である。一方、我々の作製した無限分裂細胞は世界中の研究者と研究資産として共有化できるため、将来的に標準化のための材料として利用できる可能性がある。

細胞が培養ストレスに晒された場合、p16を含む老化蛋白質が蓄積することが知られている¹⁵⁾。老化蛋白質p16はCDK4-サイクリンD1蛋白質複合体に結合し、キナーゼ活性を抑制する。その結果、細胞周期のG1/S期への突入が抑制される。R24C突然変異を持つCDK4はp16の

結合部位である25番目のアミノ酸に突然変異を保つためにp16と結合しないために、p16による負の制御を受けることがない¹²⁾。結果的に腫瘍抑制遺伝子蛋白RBの恒常的リン酸化をもたらす、転写因子E2Fの遊離、そして下流の遺伝子の活性化をもたらす。変異型CDK4およびサイクリンD1の発現は細胞周期の加速をもたらすが、染色体末端のテロメア配列の短縮からは逃れることはできない。この制限を乗り越えるためにテロメア逆転写酵素 (TERT) の発現が必要である。我々が作製したK4DT+T細胞はテロメア発現カセットの導入を確認しているので、無限分裂に至っている可能性が高い。

興味深いことにポリシストロニックに変異型CDK4およびサイクリンD1を発現するレンチウイルスでは、ヒト角膜上皮細胞の上皮細胞の形態を維持できず、途中から間葉系の細胞形態を示す変化が認められた。これらの細胞形態の変化は原因として2つの可能性がある。1つめはテロメラーゼ活性がないためのテロメア長の短縮である。テロメア長の短縮のために細胞増殖が阻害された可能性がある。もうひとつの可能性はTERTが存在しないため、CMVプロモータの活性が低下したことである。詳細な分子メカニズムは明らかではないが、我々はTERTを同時発現した際に、CMVプロモータによって発現する変異型CDK4およびサイクリンD1の蛋白質レベルが明らかに上昇する例を経験した。本研究において認められた間葉系細胞の蛍光蛋白質の量は上皮様形態を示す細胞のものより明らかに低かった。細胞の上皮様形態を維持するためにはより高いレベルの変異型CDK4およびサイクリンD1蛋白質を必要とする可能性がある。

我々は新たなヒト角膜由来上皮細胞の作製の後に、刺激性試験を行った。結果を初代およびK4DT+T細胞の間で比較を行った。我々は陽性対象としてグリコール酸を選択した。グリコール酸への曝露は有意かつ容量依存的に生存細胞数の低下を引き起こした。我々の研究データは我々が樹立したK4DT+T細胞が化学物質の刺激性試験に使用できる可能性を示している。無限分裂細胞の使用は刺激性試験の再現性の向上に貢献すると考えられる。

4. 考 察

我々は変異型CDK4、サイクリンD1およびテロメア逆転写酵素の導入により、化粧品を含む様々な化学物質や日用品の刺激性を評価する試験管内実験系を構築した。本研究は刺激性試験の再現性の向上へ貢献すると考えられる。

(引用文献)

- 1) Buehler, E. V, and Newman, E. A. (1964). A comparison of eye irritation in monkey and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 701-10. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14235837> [Accessed September 3, 2018].
- 2) Takahashi, Y., Koike, M., Honda, H., Ito, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., et al. (2008). Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. *Toxicol. Vitro*. 22, 760–770. doi:10.1016/j.tiv.2007.11.018.
 - 3) Hayflick, L., and Moorhead, P. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13905658> [Accessed September 3, 2018].
 - 4) Tsao, S. W., Wang, X., Liu, Y., Cheung, Y. C., Feng, H., Zheng, Z., et al. (2002). Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1590, 150–158. doi:10.1016/S0167-4889 (02) 00208-2.
 - 5) Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S. -o., Gonzalez, S., et al. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10002–10007. doi:10.1073/pnas.170093297.
 - 6) Ray, F. A., Peabody, D. S., Cooper, J. L., Cram, L. S., and Kraemer, P. M. (1990). SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 42, 13–31. doi:10.1002/jcb.240420103.
 - 7) Shiomi, K., Kiyono, T., Okamura, K., Uezumi, M., Goto, Y., Yasumoto, S., et al. (2011). CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. *Gene Ther.* 18, 857–66. doi:10.1038/gt.2011.44.
 - 8) Donai, K., Kuroda, K., Guo, Y., So, K.-H., Sone, H., Kobayashi, M., et al. (2013). Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. *Anal. Biochem.* 443, 104–112. doi:10.1016/j.ab.2013.08.014.
 - 9) Fukuda, T., Iino, Y., Eitsuka, T., Onuma, M., Katayama, M., Murata, K., et al. (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. doi:10.1007/s10616-016-0004-0.
 - 10) Kuroda, K., Kiyono, T., Eitsuka, T., Isogai, H., Takahashi, K., Donai, K., et al. (2015). Establishment of Cell Lines Derived From the Genus *Macaca* Through Controlled Expression of Cell Cycle Regulators. *J. Cell. Biochem.* 116, 205–211. doi:10.1002/jcb.24963.
 - 11) Katayama, M., Kiyono, T., Horie, K., Hirayama, T., Eitsuka, T., Kuroda, K., et al. (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. doi:10.1538/expanim.15-0061.
 - 12) Fukuda, T., Eitsuka, T., Donai, K., Kurita, M., Saito, T., Okamoto, H., et al. (2018). Expression of human mutant cyclin dependent kinase 4, Cyclin D and telomerase extends the life span but does not immortalize fibroblasts derived from loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Sci. Rep.* 8, 9229. doi:10.1038/s41598-018-27271-x.
 - 13) Fukuda, T., Kondo, Y., and Nakagama, H. (2008). The anti-proliferative effects of the CHFR depend on the forkhead associated domain, but not E3 ligase activity mediated by ring finger domain. *PLoS One* 3, e1776. doi:10.1371/journal.pone.0001776.
 - 14) Gouko, R., Onuma, M., Eitsuka, T., Katayama, M., Takahashi, K., Nakagawa, K., et al. (2018). Efficient immortalization of cells derived from critically endangered Tsushima leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) with expression of mutant CDK4, Cyclin D1, and telomerase reverse transcriptase. *Cytotechnology* 70, 1619–1630. doi:10.1007/s10616-018-0254-0.
 - 15) Meerson, A., Milyavsky, M., and Rotter, V. (2004). p53 mediates density-dependent growth arrest. *FEBS Lett.* 559, 152–158. doi:10.1016/S0014-5793 (04) 00027-4.