

平成10年度厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
『研究基盤高度化に必要ながん細胞、
幹細胞に関する研究』

報 告 書

研究代表者

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所

黒木登志夫

研究基盤高度化に必要ながん細胞、幹細胞に関する研究

主任研究者 黒木登志夫 昭和大学腫瘍分子生物学研究所・所長

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子治療に関する厚生科学研究の基盤整備の一環として、がん細胞株と幹細胞の二つのプロジェクトをもとに研究を行った。

- 1) ヒトがん細胞を中心とする細胞株の開発と供給：昭和大・腫瘍分子研（黒木登志夫）、横浜市立大・木原研（小山秀機）、岡山大・医（難波正義）、放影研（京泉誠之）は、ヒューマンサイエンス財団細胞バンクの支援組織として細胞株の樹立、育成、収集、品質管理にあたってきた。これらの4施設は155細胞株の親ストックを維持している。これらの登録細胞株の品質管理、特性解析、遺伝子変異を系統的に検討した。新たな細胞株の収集と開発、細胞株開発のため基礎研究などが細胞株供給と平行して進められた。本年度は新たにヒトがん細胞2株（肺腺がん株、ヒトT細胞白血病株）を登録した。またがん抑制遺伝子PTENのスクリーニング系を開発した。
- 2) 幹細胞の開発と応用：組織構築の中核を成す幹細胞の開発は、基礎研究にとって重大であるだけでなく、遺伝子治療、人工臓器などへの応用面が広い。本研究グループは生殖系列幹細胞(ES細胞) (国立遺伝研、中辻憲夫)、ヒト臍帯血幹細胞（兵庫医大、原 宏）、ヒト肝細胞（慈恵医大、永森静志）、ヒトケラチノサイト（昭和大、黒木登志夫）などの培養条件を検討した。本年度は特にラジアルフロー型バイオリアクターを小型化し、ヒト肝細胞を用いたバイオ人工肝臓の開発を進めた。

分担研究者

難波 正義	岡山大・医学部・分子細胞 医学研究所・教授
小山 秀機	横浜市立大・木原生物研究 所・所長
京泉 誠之	放射線影響研究所・副部長
石岡千加史	東北大・加齢医学研究所・ 助教授

中辻 憲夫	国立遺伝学研究所・系統 生物研究セ・教授
永森 静志	東京慈恵医大・内科・ 助教授
原 宏	兵庫医大・輸血部・教授

A. 研究目的

ヒトゲノム上の 30 億の塩基配列解析は、ゲノム研究先進諸国の共同作業により着々と進行しており、2003 年には完成するものと予想されている。ゲノム解析によりがん、エイズなどの難病に係わる遺伝子群が明らかにされ、それに基づく遺伝子治療も現実化してきた。

遺伝子機能を解析し、遺伝子治療を実施するためには、広範な研究領域からのバックアップ体制が必要である。遺伝子解析とその情報は国際的、国内的に研究基盤が整備され、データベース化が進みつつある。しかし、細胞レベル、個体レベルの研究基盤は、他の研究先進諸国に比べてわが国は大幅に遅れているのが現状である。特にそれ自身が生きた存在である細胞についての開発と供給に多くの労力を必要とする。

本研究はこのうち①がん細胞などの細胞株と②幹細胞(stem cell)についての研究基盤を確立し、ヒトゲノム解析と遺伝子治療をバックアップする目的で設定した。このような研究基盤の整備、高度化の必要性は科学技術基本法でも指摘されているところである。

B. 研究方法

1) 細胞株の品質管理と特性分析

マイコプラズマ感染は Vero 細胞との共培養および Hoechst 33258 による蛍光染色法によって検出した。マイコプラズマ染色が発見された場合は MC210 0.5 μ g/ml 添加により除染した。細胞株の種同定は Corning 社のオーセンティキットによるアイソザイム分析によった。接触阻止現象に鋭敏な細胞株 (3T3 細胞など) は培養細胞の形態と増殖によって判定した。

2) 細胞株の親ストックの維持

平成 7 年度後半からヒューマン・サイエンス財団が細胞株の供給業務を行うことになった。このため各研究施設は親ストックの維持を担当した。

3) 新たな細胞株の開発と収集

各研究施設で新たに株化し、特性解析、品質管理を終了した細胞を細胞バンクに登録する。また他の研究者によって有用な細胞株が樹立されたときにも、細胞バンクへの登録を依頼し、収集する。

4) 遺伝子変異のスクリーニング

本年度は各研究施設で保存している細胞株について、遺伝子の変異の有無を系統的に検索するためのアッセイ系の開発を行った。

5) 幹細胞の培養系

それぞれの班員の分担する幹細胞の培養系の樹立を行った。このうち臍帯血幹細胞、肝細胞、表皮細胞などのヒト細胞についてはインフォームドコンセントにより倫理面に配慮して、細胞、組織を入手、培養した。

C. 研究成果

1. ヒトがん細胞を中心とする細胞株の開発と供給

本研究組織を構成する 8 研究機関のうち、昭和大・腫瘍分子研 (黒木登志夫)、横浜市立大・木原研 (小山秀機)、岡山大・医 (難波正義)、放影研 (瀬山敏雄) は、厚生省 JCRB およびヒューマンサイエンス財団細胞バンクの支援組織として細胞株の樹立、育成、収集、品質管理にあたってきた。各研究者の専門とする細胞種は次の通りである。黒木登志夫 (ヒト上皮細胞、ヒトがん細胞、突然変異トランスフォ

一メーション検出系細胞) ; 小山秀機 (核酸代謝変異細胞、DNA 修復変異細胞) ; 難波正義 (ヒト肝および肝がん細胞) ; 瀬山敏雄 (ヒトがん細胞)。これらの細胞株の遺伝子変異の系統的検索は、石岡千加史 (東北大・加齢研) が担当した。

1) 細胞株の品質管理と分与 :

本研究に課せられた任務の一つは、研究者の要請に応じ細胞株を供給し、厚生科学に寄与することである。細胞株供給業務は、平成7年度後半期よりヒューマン・サイエンス財団に委託され、本研究グループはこれらの親ストックを保存することとなった。表1に4研究施設に登録している155株を示す。これらの細胞株について、マイコプラズマの感染をモニターし、汚染のない細胞株を供給した。

表 1. 研究施設別登録株数

施設	登録株数
昭和大・腫瘍分子研	27
岡山大・分細研	46
横浜市大・木原研	46
放影研	36
合計	155

本年度は SCID マウスに移植したヒト肺腺がんから樹立した細胞株とヒト T 細胞白血病より分離した T cell receptor β 遺伝子欠損変異株を、バンクに新たに登録した (放医研・京泉誠之)。

2) 機能を持ったヒト肝細胞株の樹立

ヒト胎児より得た肝細胞株に SV40LT 抗原を導入し、不死化したヒト肝細胞株を樹

立した。この細胞はアルブミン、AFP、transferrin、薬物代謝酵素など多くの酵素活性を保有しているところから、今後人工肝臓の実験に用いることができるであろう (岡山大・難波正義)。

3) DNA 合成に関する変異株の分析 :

小山ら (横浜市大・木原研) は胎児幹細胞 (ES 細胞) を用いて DNA 合成酵素 topoisomerase II のヘテロ変異株を樹立した。しかし、ホモ欠損株は樹立できなかった。また、マウス FM3A 株から新たに X 線感受性株 SX10 を分離し、新規の相補性群に入ること、17 番染色体に感受性座があることを明らかにした。

4) ヒトがん細胞の薬剤耐性 :

ヒト肺がん株を中心にシスプラチン感受性および EGF レセプター抗体 ZD1839 の細胞増殖抑制作用を検討した (昭和大・腫瘍分子研・黒木登志夫)。

5) ヒト上皮細胞への遺伝子導入 :

遺伝子治療の目的に開発されたアデノウイルスベクターを用い、ほぼ 100% の効率でヒト正常ケラチノサイトおよび器管培養系に遺伝子を導入するのに成功した (昭和大・腫瘍分子研・黒木登志夫)。

6) ヒトがん由来細胞株の遺伝子変異 :

ヒト細胞の遺伝子変異を系統的に明らかにする目的で、出芽酵母を用いる遺伝子診断系の開発を行った。本年度は、ストップコドンアッセイ (SC assay) により、がん抑制遺伝子 PTEN の変異スクリーニング系を開発した。さらに p53 遺伝子ホモログの一つ、p51 遺伝子の転写活性を指標とする機能診断系を開発し、p53 の変異の有無がすでに明らかな培養細胞について p51 変異の機能解析を行った (東北大・加齢研・石岡千加史)。

2. 幹細胞の開発と応用

幹細胞研究グループは平成9年度「ヒトゲノム遺伝子治療研究事業」の設定にあたって本研究班に参加した。研究対象として生殖系幹細胞（ES細胞；担当、国立遺伝研・中辻憲夫）、末梢血および臍帯血幹細胞（兵庫医大・輸血部・原 宏）、ヒト肝細胞（慈恵医大・内科・永森静志）、ヒト上皮細胞（昭和大・腫瘍分子研・黒木登志夫）を扱った。

1) 生殖系幹細胞（ES細胞）：

近郊系 C57BL/6 系統および遺伝研において確立された日本産野生マウス由来近交系 MSM 系統から数種類の ES細胞株を樹立し、キメラマウス形成能など特性解析を進めた。これらの細胞は遺伝子治療と細胞移植治療の基礎研究にとって価値が高いものである。（国立遺伝研・中辻憲夫）。

2) ヒト肝細胞：

ラジアルフロー型バイオリアクターの小型化を行い、ヒト肝由来細胞株を3次元培養した。高機能の細胞を長期培養が可能であることを証明し、アルブミン、肝特異的各種酵素などの高産生性を確認した。このような生理的機能を継続するためには三次元構造が重要であることが証明された（東京慈恵医大・永森静志）。

3) ヒト臍帯造血幹細胞の培養：

近畿地方の6医療機関により臍帯血バンクを設立し、20例の患者に供給してきた。今後、供給量を増すためには生体外で増殖させる *ex vivo expansion* が必要である。このために造血幹細胞の増幅を試みた。SCIDマウスに移植して2カ月後にヒト血液細胞が増幅していることを示した。しかし CD34(-) 細胞からの造血前駆細胞の産生は証明できなかった（兵庫医大・原

宏）。

4) ヒト表皮幹細胞の培養：

ヒトケラチノサイトの増殖・分化の制御機能を解析するため C キナーゼ各分子種、A キナーゼのアデノウイルスベクターを作製した。ヒトケラチノサイトの終末分化においては、分化した細胞では C キナーゼ eta 分子種が cyclin E-cdk2 と結合し cdk-2 キナーゼ活性を抑え終末分化に導くことを明らかにした（昭和大・腫瘍分子研・黒木登志夫）。

D. 考 察

1. ヒトがん細胞を中心とする細胞株の開発と供給

本研究の母体は1984年「対がん10カ年総合戦略」の一環として、がん研究振興財団の中に作られたリサーチ・リソース・バンク（Japanese Cancer Research Resources, JCRB）の細胞バンクである。JCRB 発足以来の10年間におよそ25,000件の細胞株を供給してきたが、本研究に所属する4研究施設はそのうち約25%を担当した。本研究はこのようなJCRBの実績の上にそれを継続、発展させるべく設定された。

現在培養細胞は最も一般的な実験材料となった。例えば1994年の日本癌学会機関誌（Japanese Journal of Cancer Research）に発表された論文191編中48%（92編）の論文は培養細胞を用いている。培養細胞はこのように標準的な研究材料となったが、研究者個人が自分の研究目的にあった細胞を樹立することは現実的ではない。このため、必要に応じて目的にあった細胞株を入手するのが普通である。米国においては古くから研究

資材の整備が進められ、1960年代には American Type Culture Collection (ATCC)が創設され、現在3,000株の細胞株を保有し、年間40,000株を分与している。わが国では1984年対がん10カ年総合戦略によって厚生省、文部省、科技庁のそれぞれに細胞バンクを発足させたが、最も機能しているのは本研究の前身となったJCRBであった。

平成7年度後半期から細胞株供給業務は、ヒューマン・サイエンス財団が分担することになった。本研究グループの各研究施設は今後、新しく有用な細胞株を樹立すべく培養細胞に関する基礎研究も進め厚生科学研究を支援したい。

2. 幹細胞の開発と応用

組織構築の中核を成す幹細胞の開発は、基礎研究にとって重大であるだけでなく、細胞移植、遺伝子治療などへの応用面が広い。中辻憲夫(国立遺伝研)の担当する生殖系列幹細胞株(ES細胞)は発生と分化研究にとって重要な材料となる。永森静志(慈恵医大)は培養ヒト肝細胞を用いた人工肝補助装置の開発を進めた。原宏(兵庫医大)の臍帯血造血幹細胞培養法は難治血液疾患治療への応用が約束されている。黒木登志夫(昭和大)のヒト上皮細胞は、皮膚移植に応用できる。これらの幹細胞はいずれも遺伝子治療に際して遺伝子担体として応用可能である。本研究は遺伝子治療の基盤技術開発の役割を果たしているといえよう。

3. 倫理面への配慮

ヒト細胞の利用は厚生科学審議会答申「ヒト組織の研究開発」(全班員に配布)に基づいて行う。すなわち適正な医療行為のもとに摘出されたヒト細胞を Informed

consentを得た後、研究に使用する。採取、研究にあたっては属する研究機関の倫理審議委員会の同意を得る。

E. 結 論

本研究の4研究施設はヒューマン・サイエンス財団による細胞株供給業務をバックアップし、細胞株と培養技術に関する基礎研究を進めている。また、生殖系列、ヒト肝、臍帯血、ケラチノサイトなど幹細胞の実験系はいずれも遺伝子治療、人工臓器などへの応用の可能性が高い。本研究はいずれもヒトゲノム遺伝子治療研究の基礎整備にとって不可欠である。

F. 研究発表

(研究代表者に関わる発表のみを示す。分担研究者の研究発表はそれぞれの報告書に記した。)

1. Ishida-Yamamoto, A., Kartasove, T., Matsuo, S., Kuroki, T. and Iizuka, H. Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.*, 108: 12-16, 1997.
2. Ilic, D., Kanazawa, S., Nishizumi, H., Aizawa, S., Kuroki, T., Mori, S. and Yamamoto, T. Skin abnormality in aged *gyn^{-/-}fak^{+/-}* mice. *Carcinogenesis*, 18: 1473-1476, 1997.
3. Kashiwagi, M., Kuroki, T. and Huh, N.: Specific inhibition of hair follicle formation by epidermal growth factor in an organ culture of developing mouse skin. *Develop. Biol.*, 189: 22-32, 1997.
4. Fujita, E., Khoroku, Y., Urase, K., Tsukahara, T., Momoi, M.Y., Kamagai, H., Takemura, T., Kuroki, T. and Momoi, T.

- Involvement of *Sonic hedgehog* in the cell growth of LK-2 cells, human lung squamous carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238: 658-664, 1997.
5. Jia, L.-Q., Osada, M., Ishioka, C., Gamo, M., Ikawa, S., Suzuki, T., Shimodaira, H., Niitani, T., Kudo, T., Akiyama, M., Kimura, N., Matsuo, M., Mizusawa, H., Tanaka, K., Koyama, H., Namba, MK., Kanamaru, R. and Kuroki, T.: Screening the *p53* status of human cell lines using a yeast functional assay. *Mol. Carcinog.*, 19: 243-253, 1997.
 6. Kuroki, T. and Rajewsky, M.: Sixth Japanese-German Workshop on molecular and cellular aspects of carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 76: 169-175, 1998.
 7. Chang, P.Y., Kozono, T., Chida, K., Kuroki, T. and Huh, N.-H.: Differential expression of Hox genes in multistage carcinogenesis of mouse skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248: 749-752, 1998.
 8. Takaishi, M., Takata, Y., Kuroki, T., and Huh, N.: Isolation and characterization of a putative keratin-associated gene expressed in embryonic skin of mice. *J. Invest. Dermatol.*, 111: 128-132, 1998.
 9. Kuroki, T.: Cancer as a disease of genes and a disease due to environmental factors. *Reviews in Toxicology*, 2: 113-118, 1998.
 10. Ohba, M., Isho, K., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., Huh, N. and Kuroki, T.: Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the η and δ isoforms of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 5199-5207, 1998.
 11. Chida, K., Tagawa, T., Nagamori, S. and Kuroki, T.: New synthetic peptides on nuclear localization signal derived from Jun by single amino acid substitutions. *Protein and Peptide Letters*, 5: 269-272, 1998.
 12. Chida, K., Nakada, T., Otsuka, H., Kuroki, T. and Satoh, H.: Assignment of protein kinase C η (PKC η) to mouse chromosome band 12C3-D2 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 82: 30-31, 1998.
 13. Chida, K., Sueyoshi, R. and Kuroki, T.: Efficient and stable gene transfer following microinjection into nuclei of synchronized animal cells processing from G1/S boundary to early S phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249: 849-852, 1998.
 14. Kawabe, S., Ikuta, T., Ohba, M., Chida, K., Ueda, E., Yamanishi, K., and Kuroki, T.: Cholesterol sulfate activates transcription of transglutaminase 1 gene in normal human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 111: 1098-1102, 1998.
 15. Ishino, K., Ohba, M., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K. and Kuroki, T.: Phorbol ester-induced G1 arrest in BALB/MK-2 mouse keratinocytes is mediated by δ and η isoforms of protein kinase C. *Jap. J. Cancer Res.*, 89: 1129-1133, 1998.
 16. Song, H.-J., Poy, G., Darwiche, N., Lichti, U., Kuroki, T., Steinert, P.M. and Kartasova, T.: Mouse SPR2 genes: A clustered family of genes showing differential expression in epithelial tissues. *Genomics*, 55: 28-42, 1999.

17. Chida, K., Tagawa, T., Nagamori, S. and Kuroki, T.: Nuclear translocation of Fos is stimulated by interaction with Jun through leucine zipper. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999 (in press).
18. Kuroki, T.: Protein kinase C-mediated signal transduction and its implication in skin carcinogenesis. In Proc. of 19th World Congress of Dermatology, 1999 (in press).

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
（分担）研究報告書

胎児性幹細胞株の樹立

（分担）研究者 中辻 憲夫 国立遺伝学研究所系統生物研究センター 教授

研究要旨 2種類のマウス系統からの新たな胚幹細胞株（ES細胞株）の樹立に成功するとともに、キメラマウス形成能などの特性解析を進めた。

A. 研究目的

遺伝子治療や細胞移植医療に関する基礎研究に用いるための細胞株としては、各種臓器構築の基になる幹細胞株の意義が大きい。そのための基礎的研究を行うために、各種マウス系統からの未分化幹細胞株の樹立を行いそのキメラマウス形成能などの特性について研究して新たな胚幹細胞株を用いた手法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

現在広く用いられている胚幹細胞株（ES細胞株）は129系統マウス由来のものが殆どであるが、目的によっては他のマウス系統からのES細胞株を用いて比較する必要がある。そのため、幾つかのマウス系統からES細胞株を樹立するとともに、キメラ形成能などの特性を検定する。129系統に比較して詳細な系統特性の蓄積があり免疫学的研究などに広く使用されているC57BL/6系統を用いる。また野生型マウスと似た行動特性を示し、通常マウス系統との遺伝学的多型を利用できるものとして、日本産鼠から遺伝研において近交化されたMSM系統を用いる。MSM系統は通常のマウス系統に比較して脳機能解析や遺伝子マッピングに有用である。細胞株樹立条件の細部を検討してES細胞株を樹立

し、正常核型を持つものを選別したのちに、キメラ形成能などについて検定した。

C. 研究結果

C57BL/6系統とMSM系統から採取した胚盤胞を使用して各々多数のES細胞株を樹立した。染色体標本を作成して正常核型を持つ細胞が多数を占めることを確認したのちに、キメラ形成能の検定を行った。C57BL/6系統ES細胞株については、比較的継代数の少ない段階のES細胞を使用して、ICR系統の8細胞期胚と集合させることによるキメラ作成を試みたところ、寄与率の高いキメラマウスを多数得ることができた。これらを交配することにより生殖系列キメラが含まれるかを検定したところ、ES細胞由来の産仔が高率で生まれたので、生殖系列への寄与能力が高いES細胞株であることを確認できた。一方、MSM系統から樹立したES細胞株についても同様にICR系統の8細胞期胚と集合させることによりキメラマウスは生まれたが、キメラ寄与率は高くなかった。これらのキメラマウスの交配検定を行ったが生殖系列への寄与は確認できなかった。

D. 考察

C57BL/6 系統のES細胞株については、少なくとも継代数が少ない時点では高い生殖系列キメラ形成能を持つことを確認できた。この細胞株を遺伝子ターゲティング実験などを使用するためには培養継代数をふやした後でも生殖系列キメラ形成能が保持されるかどうかを検定する必要がある。また遺伝子導入を行って細胞コロニーを選別した後でのキメラ形成能についても検定する必要がある。一方、MSM 系統のES細胞株については引き続き細胞株樹立を行ってキメラ形成能が高い細胞株の樹立を目指す、キメラ胚作成時の宿主側系統の選択やキメラ胚作成方法の検討も行う必要がある。

E. 結論

2種類のマウス系統からの新たなES細胞株の樹立に成功し、キメラマウス形成能をもつことを確認した。また片方の系統については生殖系列キメラ形成能が高いことも確認できた。これらが遺伝子治療や細胞移植医療に関する基礎的研究のために用いる細胞株として意義が大きく利用価値の高いものであることを今後示したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P. A., Hamada, H. and Yokoyama, T.: Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature*, 395, 177-181 (1998).

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K.,

Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. and Katsuki, M. *Rac1* is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427-3433 (1998).

Ono, K., Nagata, I., Hama, T. and Nakatsuji, N.: Perpendicular contact guidance of CNS neurons: is it operative in brain cortex development? "Neural Development" (Eds., Uyemura, K., Kawamura, K., Yazaki, T.), Keio Univ. Symp. for Life Science and Medicine, vol.2, pp50-56 (1999).

中辻憲夫：ヒトES細胞株樹立が意味するもの。蛋白質核酸酵素 44, 291-294 (1999).

2. 学会発表

Shirayoshi, Y., Suzuki, T. and Nakatsuji, N.: Expression and function of Notch-4/int-3 in vasculogenesis and angiogenesis. Cold Spring Harbor Meeting on Mouse Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York, USA, 9月.

Saito, T., Anderson, D. J., Mikoshiba, K. and Nakatsuji, N.: Novel homeobox genes involved in neuronal differentiation. 28th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Los Angeles, California, USA, 11月

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

ヒト肝由来細胞を用いたバイオ人工肝臓

分担研究者 永森 静志 東京慈恵会医科大学助教授

要旨

ヒト肝由来細胞を用いたバイオ人工肝臓を作成するために、ラジアルフロー型バイオリアクターの小型化を行った。ヒト肝由来細胞株を用い上記リアクターで3次元培養し、高機能長期培養が可能であることを証明し、肝特異蛋白のアルブミンなどの高産生性を確認した。

A. 研究目的

本研究グループは、臨床肝臓学的見地から肝細胞の機能と形態に関する研究をIN VITROレベルから見た肝全体の生理的または病態学的研究を主体としてきた。肝臓内の構成細胞の機能に関する研究として、培養ヒト肝細胞の長期間の機能保持についての研究に支点を置いている。そのため、3次元培養がもっとも肝細胞の機能発現に重要であるとの見解で、ラジアルフロー型バイオリアクター(RAD)の小型化開発を行った。この装置を用いて、研究室で樹立したヒト肝細胞癌由来細胞株を利用して、RADで培養して、より適切な条件を設定し、長期にわたる肝細胞の持つ高機能発現を目的とした。

肝機能のもっとも重要なアルブミンの高産生性を確認。肝細胞保有の各種酵素・蛋白の産生能の確認を目的とした。

B. 研究方法

1. ヒト由来肝細胞株

当施設で樹立したFLC細胞株数種を用いた。これらはヒト肝由来蛋白の産生能に優れるなど、正常肝細胞の機能の多くを維持している。無血清培地での培養が可能だが、本研究ではバイオリアクター担体への付着を良くするため、2%FBSを添加して培養。

2. ラジアルフロー型バイオリアクター

(RAD)によるFLC細胞の培養法

フラスコにてFLC細胞を継代増殖させた後、トリプシン処理し単離細胞にする。十分に増殖した単離細胞をRAD培地制御槽に播種する。細胞は、培養液の流れと共にRAD内の3次元担体表面や内部に接着し、増殖を開始する。

培地制御槽には、新鮮な培地の供給に加え、pHや温度、酸素濃度がコンピュータ制御により自動的にコントロールされる。培養液中の酸素やグルコース消費量により、細胞の細胞数や活動性が確認可能である。

3. 培養細胞機能の検討

3. 1 グルコース濃度の測定

回収された培養液中のグルコース濃度は、20 μ lの培養液をグルコース測定キットを使用し、分光光度計で比色定量した。リアクター前後のグルコース濃度差に、培地供給速度をかけて1日の消費量を算出した。

3. 2 酸素濃度の測定

培養液の酸素濃度を酸素電極で測定する。測定するポイントはグルコースと同様にリアクターの前後で測定。

3. 3 アミノ酸定量分析法

培養中の培養液を分取し除蛋白後、アミ

ノ酸アナライザーにてアミノ酸含量を測定。

3. 4 アルブミンと α -フェトプロテイン (AFP) の測定法

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法にて測定した。

C. 研究結果

1. 酸素、グルコースの消費量

FLC 細胞を 2% FBS を添加した ASF104 培地を用いて 200ml 容量 RAD 内で 3 次元培養した。40 日以上細胞の活動性は上昇を続けた。40 日後の総細胞数はグルコース消費量から計算すると、 2.99×10^{11} 個/200ml リアクターに達しグルコース消費量は 17g/day に達した。酸素消費もグルコース消費量に平行して増加した。

40 日以上長期培養中、細胞の詰まりなどによる循環不全は生じず、上記細胞数に達してからは、ほぼ定常状態に移行した。

2. FLC 細胞のアミノ酸代謝

FLC 細胞を 2%FBS 添加 ASF104 培養液を用いて培養し、循環培養中のアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、オルニチンの各濃度をアミノ酸分析機で測定した。これらの変動は各々、酸素およびグルコース消費量に関連しながら変化した。

3. FLC-4 の長期培養時のアルブミン、AFP 産生

400ml リアクターを用いて FLC-4 細胞を 40 日間長期培養を試みた。培養開始後の急激な細胞増殖に伴い、培養開始後数日でアルブミンや AFP 産生の著明な増加を認めた。急激な細胞増加は、これらの蛋白産生量上昇と相関している。細胞活動性が安定期に入ると共に、蛋白産生量も安定化した。この時期のアルブミン産生量は 14g/day と正常ヒト肝臓の一日産生量と同等の値を示した。総細胞量はおよそ 100g と正常ヒト肝臓の 1/12 の量であった。

また、AFP 産生量は 400 分の 1 の 1mg/day 程度に低下し、FLC 細胞を 3 次元培養することにより、より正常肝臓に類似の機能を示すことが確認された。

4. FLC-7 三次元培養と単層培養におけるアルブミンと AFP 産生量

単層培養では 1 日当たりの産生量は、9 日間の培養期間を通して常に AFP 優位であったが、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた三次元培養では、培養期間を通してアルブミン優位へと変化している。生体内に近似した条件の良い当システムでの培養にて、正常肝細胞と類似の機能が発現されたと考えられる。

D. 考察

従来の研究より FLC 細胞はアルブミン、AFP 等の肝特異蛋白の産生、アンモニアより尿素の生成など肝臓固有の肝機能の一部を保有していることが明らかになっている。形態的には単層培養では、polygonal な細胞が扁平に伸張し、細胞内小器官の極性は明確ではなかった。しかしラジアルフロー型バイオリアクターによる 3 次元培養下では、細胞は球形を呈し、それぞれの細胞は互いにルーズに細胞間結合装置を介して接着した、細胞内小器官の配列は極性を有し、より正常肝細胞に類似の形態を示す事が確認された。

このようにリアクター内で増殖した細胞は、 2×10^8 /ml の高密度に達し、従来の浮遊培養型、平面培養型、フォローファイバー型バイオリアクターの、10 倍から 100 倍の高密度培養が可能であった。また培養期間も 40 日以上安定に培養可能で、肝由来細胞培養の、極めて高機能な培養装置であることが証明された。

このリアクターで培養されるヒト肝由来細胞の機能的評価では、単位細胞数あたりアルブミン産生量は、単層培養下に比べ、3 次元培養では約 6~7 倍に増加し、1 日総アルブミン産生量は 200ml バイオリアク

ターで、十数グラムに達した。ヒト肝の1日産生量に匹敵し、効率的なアルブミン産生能を示した。

一方アルブミン産生と、 α -フェトプロテインの産生量の比は、RADでの3次元培養下では、単層培養環境に比べ著明に増加し、より正常肝に近似の性質を示すようになった。肝細胞の形態と機能発現に関連した示唆に富む知見が得られた。ヒト肝由来肝細胞と、RADによる3次元培養法は、肝特異機能発現に関し、細胞の遺伝子レベルから、細胞、そして立体構築された細胞の関連、すなわち臓器としての肝レベルまで、一貫した肝臓研究のモデルとして期待できる、有意義なシステムである。

また将来の臨床応用可能な人工肝として発展させていく。

E. 結論

ラジアルフロー型バイオリアクタで肝由来細胞株を培養し、肝特異蛋白の良好な産生を認めた。ヒト肝由来肝細胞を用いたバイオ人工肝開発に一步進展した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 1 川田雅昭, 永森静志, 相崎英樹, 松浦知和, 蓮村 哲, 清水英佑
人工肝補助装置を用いた肝解毒機能の検討
肝臓 39 : 507-508.1998.

1. 2 M.Kawada, S.Nagamori, H.Aizaki, K.Fukaya, M.Niiya, T.Matsuura, H.Sujino, S.Hasumura, H.Yoshida, S.Mizutani, and H.Ikenaga.
Massive Culture of Human Liver Cancer Cells in a Newly Developed Radial Flow Bioreactor System: Ultrafine Structure of Functionally Enhanced Hepatocarcinoma Cell Lines
In Vitro Cell. Dev.Biol. 34:109-115.1998.

1. 3 T.Matsuura, S.Hasumura, S.Nagamori, T.Obata, M.Yamaguchi, Y.Hataba, H.Tanaka, H.Shimizu, Y.Unemura, K.Nonaka, T.Iwaki, S.Kojima, H.Aizaki, S.Mizutani, and H.Ikenaga.

High density culture of immortalized liver

endothelial cells in the radial-flow bioreactor in the development of an artificial liver.

The International Journal of Artificial Organs 21: (4):229-234,1998

1. 4 H.Aizaki, Y.Aoki, T.Harada, K.Ishii, T.Suzuki, S.Nagamori, G.Toda, Y.Matsuura and T.Miyamura.

Full-Length Complementary DNA of Hepatitis C Virus Genome From an Infectious Blood Sample.
Hepatology 27(2):621-627.1998.

1. 5 永森静志、深谷憲一
新培養細胞実験法(バイオマニュアル UP シリーズ) 初代培養、ヒト肝細胞
黒木登志夫他編 1999,p97-108, 羊土社

2. 学会発表

2. 1 川田雅昭, 清水英佑, 松浦知和, 蓮村哲, 永森静志.

不死化類洞内皮細胞株の樹立とその高密度大量培養 —ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて—

1998年日本消化器関連学会週間,1998.

2. 2 T.Matsuura, M.Kawada, H.Sujino, S.Hasumura, S.Nagamori, and H.Shiizu.

Vitamin A Metabolism of Immortalized Hepatic Stellate Cells in the Bioreactor.

9th ISCHS, New Zealand, 1998.9.27-10.1

2. 3 永森静志

(司会) ワークショップ: 肝臓移植の基礎と応用

第24回日本急性肝不全研究会,金沢,1998.10.15.

G. 知的所有権等の取得状況

1. 特許取得

発明の名称: 新規なヒト肝細胞癌由来細胞株 (FLC-4) および該細胞株を培養して有用な高分子を生産する方法 (HUMAN HEPATOMA-DERIVED CELL LINE FLC-4 AND METHOD FOR PRODUCING USEFUL POLYMERS BY CULTURING THE CELL LINE)

Patent Number: 5,804,441

Date of Patent: Sep.8.1998

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）
（分担）研究報告書

造血幹細胞の増殖と分化に関する研究

分担研究者 原 宏 兵庫医科大学 医学部教授
研究協力者 甲斐俊朗 兵庫医科大学輸血部助教授
三澤 真人 兵庫医科大学輸血部講師

研究要旨

ヒト臍帯血細胞を移植に用いるには臍帯血を処理し、HLA等の検査を終えて凍結保存する臍帯血バンクを設置することが重要である。近畿地区の6医療機関が集まり、近畿臍帯血バンクを設け、移植に必要な臍帯血を集め、既に、(?)名の患者に供給してきた。しかし、臍帯血はその量に限りがあり、これを多くの成人に移植するには、生体外で増殖し(ex vivo expansion)、造血幹細胞等の細胞を増殖する必要がある。これをヒトに移植するには造血幹細胞の自己維持能および造血能を維持しているか否かをin vivoで確認することが特に重要である。そこで臍帯血の各種細胞分画をNOD/SCIDマウスに移植して、ヒト細胞由来の自己維持能・造血能を確認しうる事を明らかにした。

A 研究目的

最近、臍帯血に由来する造血幹細胞用いる臍帯血移植が白血病、先天性および後天性の造血障害の患者の治療に骨髄移植と同等あるいはそれ以上に有用なことが明らかにされている。そこで、我々は近畿地区の6医療施設(表1)と協力して近畿臍帯血バンクを設け、既に、20例の患者に臍帯血を供給し、救命に役立てている(表2)。厚生省の臍帯血移植検討会では凍結保存前 2×10^7 /kg患者体重以上の臍帯血標本を移植に用い得る。この基準からすると保存している臍帯血の約10%のみが成人の移植に使用しうる臍帯血標本である。そこで細胞数を増加させるためには、体外にて培養により臍帯血の細胞を増殖した細胞の自己維持能・造血能をin vivoで確認する事が重要である。in vivoの確認にNOD/SCIDマウスに移植したヒト臍帯血細胞による造血を確認しようとした。

B、研究方法

1、臍帯血について：妊婦から同意を得て採取された臍帯血の中で主として臍帯血の量が不足したあるいは有核細胞数が足りなくて、兵庫臍帯血バンクに登録できなかった臍帯血を用いた。比重遠沈法に

て得た単核球分画より、シリカ処理にて貪食細胞を除去して貪食細胞除去単核球分画を得た。これに、CP-1+ヒトアルブミンを α 培地に加えて、冷凍保存した。急速解凍後、lineage markerを単クローン抗体(MoAb)(CD2, 3, 4, 8, 10, 19, 33, 38, GlyA-FITC)を用いて陽性細胞を除去した。このようにしてLin(-)にした細胞をCD34PE-Cy5のMoAbで標識後、flow cytometerによりCD34(-)Lin(-)及びCD34(+)Lin(-)の細胞分画を得た。

ヒト細胞のマウスへの投与：8週令のNOD/SCIDマウスに前処置としてX線照射(300cGy)を行い、抗Asialo-GM1 MoAb、および15 GyのX線照射した末梢血単核細胞 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ をday0に投与し、上記細胞を $1 \sim 500 \times 10^4$ を尾静脈より投与した。生着と造血能の確認：胎児細胞静注後8週目にマウスの大腿骨、頸骨、上腕骨より骨髓を取り出し、ヒトCD45, 34, 10, 19, 33 MoAbを用いてflow cytometerを用いて解析した。残りの細胞よりDNAを抽出しヒト特異的な17 α satellite geneをPCR法にて検出した。

C、研究成果

禁忌し値血バンクでは1999年2月末迄に総計の臍帯血を保存し、合計20症例の患者に臍帯血を供給した。一方、NOD/SCIDマウスを用いたCD34(+)Lin(-)の分画には自己維持能・造血能を有する細胞を3/8匹認めた。即ち、マウスの骨髓有核細胞の6.4~50%のヒトCD45陽性細胞を検出できた。そのCD45陽性細胞中にはCD34, CD19, CD10, CD33 陽性の細胞を含んでいたがCD3, CD4, CD8等のT cell系やGlyA陽性細胞は検出できなかった。CD34(-)Lin(-)の分画細胞の移植ではヒト由来細胞は検出出来なかった。

D、考察

本年度の研究ではCD34(-)lin(-)の分画よりは自己維持能・造血能は検出できなかった。その原因としてCD34(-)細胞分画からCD34(+)細胞になるにはヒトサイトカインが必要なかもしれない。最近の報告ではCD34(+)細胞ではNOD/SCIDマウスでは自己維持能・造血能は確認できた。第2の原因としてCD34(-)細胞分画に含まれる造血幹細胞の頻度が低い可能性がある。これらの点を考えるとストローマ細胞に幾つかのサイトカインを加えたex vivo expansionを必要としている可能性もあり、今後の検討課題であるかもしれない。

E、結論

臍帯血は移植に用いる造血幹細胞の最適の供給源の一つであり、多くの患者日糧に利用できるようになるには臍帯血バンクの急速な充実、即ち保存する臍帯血を増やすことが求められる。更に、成人への移植を考慮するとex vivo expansionは眼前の課題と言えよう。その為には、in vivoにおける造血幹細胞の増殖の確認が必要である。

F、研究業績

1、論文発表

- 1) 甲斐俊朗、原 宏；臍帯血移植の展開、日本内科学会雑誌、Vol 87,1516-1521,1998.
- 2) 原 宏、甲斐俊朗；臍帯血移植の現状と将来—臍帯血バンク元年をむかえたわが国の現状—、Biotherapy 12,370- 376, 1998.
- 3) 甲斐俊朗；臍帯血バンクの現状、血液・腫瘍科, Vol 37,121-126,1998.

4) 甲斐俊朗、原 宏；臍帯血幹細胞移植、Bio Clinica Vol 13,57-60,1998.

5) 原 宏、甲斐俊朗；臍帯血移植はなぜ進まないか。総合臨床、47：2672-2674、1998。

6) 原 宏、甲斐俊朗；臍帯血幹細胞移植・・・どのように展開するのか・・・。Medical Practice,15：478-479,1998.

2、学会発表

1) 甲斐俊朗、原 宏；臍帯血バンクの現状と未来像、シンポジウム「臍帯血移植の実現と成功を目指して・・・基礎から非血縁者間移植まで・・・」第46回日本輸血学会総会1998年5月(京都)

表1 近畿臍帯血バンクの構成と保存臍帯血数

名称	代表者(所属施設)	保存臍帯血数
大阪大学臍帯血バンク	小川啓恭 (大阪大学医学部第3内科助教授)	15
関西医科大学臍帯血バンク	緒方 肇 (関西医科大学小児科講師)	28
京都府立医科大学臍帯血 バンク	藺田精昭 (京都府立医科大学衛生学助教授)	4
京都府赤十字血液センター 臍帯血バンク	横山繁樹 (京都府赤十字血液センター所長)	50
奈良医科大学臍帯血バンク	藤村吉博 (奈良県立医科大学輸血部教授)	138
兵庫臍帯血バンク	甲斐俊朗 (兵庫医科大学輸血部助教授)	186
		総計 421

(1999年2月末現在)

表2 近畿臍帯血バンクが提供した臍帯血移植患者

症例	症例	年齢	体重 (Kg)	疾患、病期	移植日
1	Y.S.	8	17.2	FEL、2寛解	97.09.04
2	K.M.	0.7	6.0	ALL,1再発	98.02.0.2
3	Y.K.	1	8.6	FEL, 2再発	98.03.12
4	S.T.	19	60	T-ALL/lymphoma	98.03.17
5	H.T.	8	29	AMEG-THROMB	98.06.01
6	T.Y.	5	17	→AA 生着不全→再移植	07.21
				AA	98.0 6.29
				再移植	98.11.25
7	I.D.	13	45	ALL	98.07.22
8	A.Y.	9	21	CML	98.08.21
9	H.T.	8	22	慢性肉芽腫	98.08.31
10	O.S.	0.7	6	免疫不全	98.09.02
11	U.J.	6	24	D-B 貧血	98.09.25
12	O.Y.	8	27	AML	98.09.25
13	H.K.	2	12	ALL	98.09.29
14	M.M.	0.4	6	ALL	98.11.06
15	M.Y.	14	28	ALL	98.11.21
16	N.E.	10	29	AML	98.11.27
17	N.K.	9	25	AML	98.12.03
18	M.N.	3	18	T-ALL	98.12.22
19	N.K.	0.8	10	免疫不全	99.11.22
20	N.Y.	1.0	7	AML	99.01.27

FEL : Familiar erythro-phagocytic lymphohistiocytosis

All : acute lymphocytic leukemia AML : Acute myelogenous leukemia

CML : chronic myelogenous leukemia AA : Aplastic anemia

D-B貧血 : Diamond-Blackfan 貧血

AMEG-Thromb : Amegakaryocytic thrombocytopenia

分担研究報告書

ヒト肝細胞株(OUMS-29)の維持育成

分担研究者 難波 正義 岡山大学医学部教授

研究要旨 我々はヒト胎児より得た肝臓細胞にSV40 LT抗原を移入し、不死化したヒト肝細胞株を得た。この肝細胞は無血清培地で培養され、アルブミン、 α フェトプロテイン、トランスフェリンをはじめ多くの蛋白質を培地中に産生し、UDP-glucuronyltransferase活性を示す。また、癌原性芳香族炭化水素で誘導されるCYP 1A1, 1A2や、チエチールニトロサミンの代謝に関係するCYP 2E1, 多くの薬剤の代謝に関係するCYP 3Aなどのチトクローム酵素の活性をもつ。このようなヒト肝細胞は、今後、薬剤の毒性判定や、人工肝臓の作成などに役立つことが期待される。

A. 研究目的

肝細胞としての特異機能をもつヒト肝細胞株を樹立することを研究の目的とした。

B. 研究方法

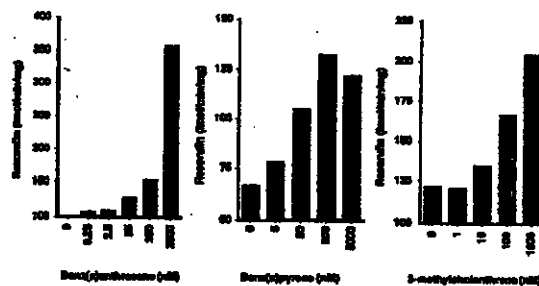
21週齢のヒト胎児より得た肝臓をコラゲナーゼ処理し、分散した肝細胞を得た。10%ウシ胎児血清を含むWilliams' E培地に細胞をまき、24時間後、SV40 LTneo遺伝子をリポフェクションで導入した。さらに、24時間後、培地を無血清培地 (ASF104 + 20 ng/ml EGF, 10 μ g/ml トランスフェリン, 10 μ g/ml インシュリン)に替えた。翌日、トリプシンで1枚のシャーレから3枚のシャーレに継代し、2日後から2日間、100 μ g/mlのG418で処理した。4週間後増殖してきた13個のコロニーをクローニングし、肝細胞としての特異機能を調べるために細胞を増殖させた。細胞の継代は0.2%トリプシン(Difco, 1:250)を用いた。

調べた特異機能として、肝細胞の産生する蛋白質は2次元電気泳動で、CYP 1A1と1A2の酵素活性の誘導は、Benz(a)anthracene (BA), Benz(a)pyrene (BP), 3-methylcholanthrene (MC)を使用した。CYP 1A1と1A2の酵素活性は7-ethoxyresorufinの代謝で調べた。UDP-glucuronyltransferase活性は、1-naphtholを基質として測定した。

C. 研究結果

13クローンは総て上皮性の形態を示し、無血清培地で増殖し株化した。これらの内、1クローン、OUMS-29, は多くの肝細胞の特異機能を持つことが分かった。すなわち、アルブミン、 α フェトプロテイン、トランスフェリンをはじめ、多くの蛋白質を産生していた。CYP 1A1の酵素活性は図1に示したように、BA, BP, MCの濃度依存性に誘導された。

Induction of 7-ethoxyresorufin deethylase activity



また、この細胞のUDP-glucuronyltransferase活性は表に示すようにヒト正常肝細胞の約1/4で、BA処理により酵素活性は1.5倍に上昇した。

CYP 2E1, 3Aについては、reverse PCRによって、この細胞での発現を確認している。酵素活性については現在確認中である。

UDP-glucuronyltransferase activities

Liver cell lines	UDP-glucuronyltransferase* (pmol/min/mg protein)
Hep G2	289±166 (n=6)
HEL	not detected
HuH-7	not detected
OUMS-29	196±95 (n=6)
Human adult hepatocyte	772±136 (n=4)

*UDP-glucuronyltransferase activities were measured in cell homogenates prepared in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.6). Glucuronidation was assessed using 1-naphthol.

D. 考察

薬剤代謝酵素のP450活性をもつヒト肝細胞株を樹立することができた。しかし、その酵素活性は生体中の肝臓に比べ、低く、今後、3次元培養や培養基質を考えることにより、その活性を生体の肝臓レベルに近づけたいと考えている。

従来、培養肝細胞は培養条件下で急速に肝細胞の特異機能を失う。株化後はアルブミンなどの一部の肝細胞の機能は残るが、p450などの肝細胞としての重要な機能を発現する株化されたヒト肝細胞はない。我々の今回樹立したヒト肝細胞株がp450の分化機能を比較的よく保持していたことは、培養第1日目に血清を含む培地を使用したのみで、以後、無血清の培地で培養したことによるのかもしれない。

現在、種々のP450を導入した培養細胞が作成されているが、この場合は、薬剤によるP450活性の誘導がかからなく、発現は常に起こっていて、自然の動物体内の肝臓の場合と異なる。OUMS-29の場合は、薬剤によるP450の発現誘導が起こるので、薬剤の毒性判定や薬剤の代謝の研究に、この細胞は役立つと考えられる。

2千万個のOUMS-29細胞を90%肝切除したラットの脾臓に注入すると、血中のアンモニア値の上昇が抑えられ、約50%の動

物が生存する (Transplantationへの投稿論文作成中)。しかし、細胞を移植していない動物は全部死亡する。このことは、OUMS-29細胞は人工肝臓の作成に使用できる可能性を示している。

E. 要約

我々は種々のP450活性をもつヒト肝細胞株、OUMS-29、を樹立した。この細胞は無血清の培養条件下で株化された。この細胞株は今後薬剤の毒性の検定や、人工肝臓の作成に役立つと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue, Y., Miyazaki, M., Ohashi, R., Tsuji, T., Fukaya, K., Kouchi, H., Uemura, T., Mihara, K. and Namba, M.: Ubiquitous presence of cellular proteins that specifically bind to the 3' terminal region of hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 198-203, 1998
- 2) Miyazaki, M., Gohda, E., Kaji, K. and Namba, M.: Increased hepatocyte growth factor production by aging human fibroblasts mainly due to autocrine stimulation by interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 255-260, 1998
- 3) Miyazaki, M., Mars, W.M., Michalopoulos, G.K. and Namba, M.: Dose-dependent biphasical effects of phenobarbital on growth and differentiation of primary culture rat hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13(Suppl.), S78-82, 1998

2. 学会発表

- 1) 小林直哉, 宮崎正博, 田中紀章, 難波正義: ラット急性肝不全モデルにおける不死亡ヒト胎児肝細胞OUMS-29の脾臓内移植の効果. 第6回細胞療法研究会, 東京, 1999年3月

分担研究報告書

がん細胞および変異細胞株の維持育成に関する研究

分担研究者 小山秀機 横浜市立大学木原生物学研究所所長

研究要旨

ジーンターゲットングで作製したマウスES細胞のトポイソメラーゼ (トポ) II α 遺伝子のヘテロ変異株に、新しく作製したトポII α cDNA発現ベクターの導入を試みたが、導入細胞が得られなかった。一方、ES細胞から作成したDNAポリメラーゼ (ポル) β ヘテロ変異細胞からヘテロ変異マウスを作製した。その掛け合わせ実験から、ホモ変異マウスの胎児は生存できるが、出生直後に呼吸不全で死にいたることを見出した。また、その胎児組織を長期継代培養してポル β 欠損株を樹立した。マウスFM3A細胞のX線高感受性株SX10が新規の相補性群に入ること、ヒト2倍体細胞と融合して雑種細胞を作製し、その解析から17番染色体がX線感受性を相補する可能性を示した。

A. 研究目的

保有している細胞株の育成、維持、供給を行う。また、変異株を主に新たな細胞株の開発・収集を行なう。すでに分離された変異株を解析し、細胞機能を明らかにする。

B. 研究方法

マウスES細胞、FM3A細胞由来のSR1およびX線感受性SX10株は通常の方法で培養し、また凍結保存した。

通常の遺伝子操作法により、導入プラスミドベクターを作製し、またCsCl₂超遠心法で精製した。細胞株から染色体DNAないし全

RNAを調製し、サザンおよびノザンプロットで解析した。遺伝子導入は、エレクトロポレーション法ないしリポフェクション法で行なった。X線感受性株の解析には、PEGによる細胞融合法、FISH法などを用いた。

C. 研究結果

1. 新たな細胞株の開発と収集

a. マウストポII α の温度感受性 (ts) 変異株の作製

トポIIはDNAのトポロジイを変換する酵素で、複製、修復、組換え、転写などのDNA代謝に関与すると考えられているが、その詳細は明

らかではない。そこで、トポII α のts変異株を作製するとともに、ハウスキーピング遺伝子のts株を作製する一般的方法の開発を検討している。すでにES細胞にトポII α のターゲティングベクターを導入し、1コピーの遺伝子を破壊したヘテロ変異株を得、その性状を報告した。また、高濃度G418で培養したがホモ変異細胞が生じず、トポII α は生存に必須と思われる。今回、G2/M特異的発現をもたらすトポII自身のプロモーターにもったトポII α cDNA発現ベクターを作製しヘテロ株へ導入したが、導入株が得られなかった。

b. ポル β 欠損細胞の作製

ポル β は、DNA修復・組換えに関与するとされてきたが、細胞ないし個体での機能は十分に明らかでない。昨年、すでにES細胞のポル β 遺伝子をターゲティングで得たヘテロ変異株から、ヘテロ変異マウスを作製した。この変異マウスの掛け合ると、ホモ変異胎児は発生するが約30%小さく、また出生直後に肺呼吸が起こらず全て死に至ることがわかった。そこで、肺の機能不全ないし呼吸中枢の欠陥が原因として考えて組織学的解析を行ったが、顕著な変化は認められなかった。一方、14日目のホモ変異胎児から初代培養を初代培養し、長期継代を行ってポル β 欠損の線維芽細胞を樹立した。

2. X線感受性株の解析

FM3A細胞由来のX線感受性株SX10を相補する遺伝子のクローニングを目指している。この株の特徴は、導入遺伝子の染色体挿入頻

度が野生株の4/1に低下していることである。これまで、この変異株は他の変異株との相補性テストやDNAPK活性の測定などから、新規の相補性群に入ることを明らかにした。そこで、まずX線感受性を相補するヒト染色体を同定するため、ヒト2倍体TIG-1細胞と融合して3種のX線耐性になった雑種クローンを分離した。この雑種を継代しつつ、X線感受性とヒト染色体の分離を各染色体マーカーを用いて解析した結果、ヒト染色体17番が相補する可能性が見い出された。また、ヒト染色体を導入したトランスフォーマントを得た。

D. 考察

一般に、動物細胞から変異株を得ることは容易でないし、特にハウスキーピング遺伝子の場合には条件致死株として分離する必要がある。本研究では、すでにES細胞のトポII α 遺伝子をターゲティングしてヘテロ変異株を作製している。また、マウストポII α cDNAを酵母で発現させ、ts遺伝子を作製している。ここで、トポIIのts変異株の樹立には、上のts遺伝子を発現ベクターとしてヘテロ変異株に導入した後、もう一方の染色体遺伝子を破壊する必要がある。そこで、2年間かけてトポII cDNAの導入条件を検討したが、導入体を得られなかった。その理由は明らかでないが、今までトポII発現ベクターを導入した報告はないところをみると、トポII遺伝子の導入が細胞増殖を抑制する可能性がある。しかし、この戦略によるハウスキーピング遺伝子のts