

株の分離法のアイデアは生きており、他の遺伝子で検討したいと考えている。

ポルβは、ES細胞から作製し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わせた結果、ホモ変異の胎児は発生するが、出生直後に肺呼吸は開始せず全て死亡することがわかった。したがって、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、今のところ不明である。ポルβはDNA修復ないし組換えに働く酵素にもかかわらず、なぜ個体では上の形質を示すのか、興味深い問題である。一方、ホモ変異胎児からポルβ欠損細胞を樹立したので、その細胞レベルでの機能を解析する格好の材料となるだろう。

近年、X線高感受性株を相補する遺伝子のクローニングが相次いで報告されている。われわれが解析してきたマウスX線高感受性変異株SX10は、遺伝子組換え能の低下したscid様の性質を示す。そこで、DNA-PK活性の測定や相補性テストなどから、SX10は新規の相補性群に入る変異株であると一応結論した。そこで、この変異を相補するヒト遺伝子のクローニングに向けて、まずヒト染色体マッピングを試みた。そのため、ヒト2倍体細胞と融合してX線抵抗性を示すの雑種株を分離し、その長期継代によるX線感受性々とヒト染色体の解析から、ヒト17番染色体が相補できるとの結果を得た。今後、この結果を確実にするとともに、相補性遺伝子の同定を行いたい。

E. 結論

ジーンターゲティングにより作製したマウスES細胞のトポIIα遺伝子のヘテロ変異株に、トポIIαのcDNAの新たな発現ベクターを作製して導入したが、導入細胞が得られなかった。一方、ES細胞からターゲティングにより作成したポルβのヘテロ変異株からヘテロ変異マウスを作製をした。しかし、ホモ変異マウス胎児は生存出来るが、出生直後に死にいたることがわかり、その原因を追求した。ホモ変異マウス胎児を培養し、ポルβ欠損線維芽細胞を樹立した。

マウスFM3A由来のX線感受性株SX10は新規の相補性群に入る変異株であり、ヒト2倍体細胞と融合して作製した雑種細胞の解析からヒト17番染色体がX線感受性を相補する可能性を示した。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Nakayama, C., Adachi, N., and Koyama, H.: Bleomycin enhances random integration of transfected DNA into a human genome. *Mutation Res.*, 409: 1-10 (1998).
2. Kobayashi, M., Adachi, N., and Koyama, H.: Characterization of the 3' untranslated region of mouse DNA topoisomerase II mRNA. *GENE*, 215: 329-337 (1998).
3. Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Suzuki, K., Kura, F., and Maeda, M.: Severe impairment in

early host defence against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infection and Immunity*, 67: 1828-1836 (1999).

2) 著書. 総説

1. 小山秀機：非ES細胞のジーンターゲティング. *生研時報* 第44号 81-85、1998.
2. 小山秀機：変異株の分離、黒木登志夫・許南浩・千田和広編「新培養細胞実験法」、バイオマニュアルシリーズ、羊土社、pp. 276、1999.

3) 学会報告

1. Tsunoda, H., Hayakawa, T., Sakuragawa, N., and Koyama, H. :Studies of site-specific integration of AAV plasmid vectors in HeLa cells . 日本遺伝子治療学会第4回大会 (東京) 1998年7月、講演要旨集、48、1998.
2. 足立典隆、小山秀機：DNAトポイソメラーゼ II α の発現制御機構の解析. 第57回日本癌学会総会 (横浜)、1998年9月. 講演要旨集、332、1998.
3. 菅生紀之、荒谷康昭、長嶋洋治、窪田吉信、小山秀機：DNA polymeras β 欠損マウス出生直後に致死となる. 第21回日本分子生物学会 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集、187、1998.
4. 角田弘之、早川朋子、桜川宜男、小山秀機：リポフェクションによるAAVプラスミドベクターの部位特異的挿入の解析. 第21回日本分子生物学会 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集、315、1998.
5. 細入剛彦、荒谷康昭、小山秀機：ヒト染色体へ挿入された外来DNAの連続部位に観察されるインサートDNAの解析. 第21回日本分子生物学会 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集、369、1998.
6. 細入剛彦、荒谷康昭、小山秀機：トポイソメラーゼ II 阻害剤処理と未処理で得られた外来DNA挿入のクローンにおける染色体DNAと外来DNAの連続部位の解析. 第21回日本分子生物学会 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集、369、1998.
7. 菅生紀之、荒谷康昭、長嶋洋治、窪田吉信、小山秀機：DNA polymeras β 欠損マウス出生直後に致死となる. 第21回日本分子生物学会 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集、378、1998.
8. 足立典隆、野本実、小山秀機：DNAトポイソメラーゼ II α の発現制御機構の解析. 第21回日本分子生物学会 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集407、1998.
9. 荒谷康昭、小山秀機、乳井誠一郎、鈴木和男、倉文明、Nobue Maeda ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスは感染防御能が低下する. 第21回日本分子生物学会 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集690、1998.
10. 小山秀機、細入剛彦、藤巻克通、中山慈子、足立典隆、荒谷康昭：動物細胞における導入遺伝子の染色体挿入機構. 第13回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」 (横浜)、1998年12月. 講演要旨集、27、1998.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究）

分担研究報告書

ヒト各種がん細胞株の維持育成に関する研究

分担研究者 京泉 誠之 放射線影響研究所 放射線生物学部 免疫学研究室室長

研究要旨

HS 財団細胞バンクへ2種類の細胞株を新たに登録した。1つは SCID マウスに移植したヒト肺癌組織より樹立した肺腺癌細胞株であり、他の1つはヒト T リンパ性白血病細胞株よりセルソーターを用いて分離した T-cell receptor β 遺伝子欠損突然変異細胞株である。また、新たな癌細胞株を数株樹立し、来年度の細胞バンクへの寄託の準備を行なっている。

A. 研究目的

発癌の分子機構の解明や癌の遺伝子治療の研究には癌細胞株は必須の研究材料である。当研究は新しい癌細胞株の樹立を行うと共に、それらの品質管理や育成維持を行ない、国内外の癌研究の発展に貢献することを目的とする。新しい癌細胞株の樹立作業の中には既存の、癌細胞株から特定の遺伝子の突然変異株を分離する作業も含まれ、これは遺伝子機能を解析する上で重要な作業である。本年度は特に表面抗原分子欠損突然変異体を簡便に分離する方法を確立する目的で、ヒト T リンパ性白血病細胞株 Jurkat より T-cell receptor C β (TCR β) 遺伝子の欠損株をセルソーターにより分離した。

B. 研究方法

1) 細胞株の品質管理

既に瀬山が報告した方法（平成9年度、10年度本研究班報告書）により、マイコプラズマや染色体の検査を行なった。

2) セルソーターによる表面抗原分子欠損

突然変異株の分離

今回はモデルとしてヒト T リンパ性白血病細胞株 Jurkat 細胞より TCR/CD3 の膜発現を欠損する突然変異体の分離を試みた。Jurkat を FITC 標識抗 CD45 抗体と PE 標識抗 CD3 抗体で2重染色し CD3 $^{+}$ 45 $^{+}$ 分画の細胞をソーティングした。分離後すぐにフィーダー細胞（50Gy X 線照射 Jurkat 細胞）と共に 96 well plate に 1 cell/well で播種しクローニングを行なった。なお、CD3 $^{+}$ 45 $^{+}$ 細胞は $1 \sim 2 \times 10^{-4}$ の頻度で検出された。

3) ヒト癌細胞株の樹立

手術材料より得られた癌組織をコラゲネースあるいはトリプシン-EDTA 処理し、RPMI1640 (+10%FCS) によりプライマリアフラスコを用いて長期培養を行なった。その過程で繊維芽細胞をトリプシンにより短時間頻回処理することにより除いた。

C. 研究結果

1) 肺癌細胞株の新規寄託

手術材料より得られたヒト肺腺癌組織を SCID マウスに移植し、増殖した癌組織より細胞株 RERF-LC-KJ を樹立した(昨年度報告)。本年度、再度マイコプラズマの非感染を確認し、細胞バンクへ寄託した。

2) TCR β 遺伝子欠損突然変異細胞株の分離

セルソーターにより分離された CD3⁺ Jurkat 細胞のクローニング効率は非常に低い(1%以下)が、数 10 個のクローンが得られた。その約半数のクローンでは TCR β 鎖遺伝子の一方の対立遺伝子が完全に欠失していることが Southern blot によりわかった。TCR β 鎖遺伝子は対立遺伝子排除機構が働いているので、欠損したのは発現活性のある対立遺伝子と考えられた。細胞バンクへは C β 欠失変異クローンのうち 1 つを寄託した。

3) 細胞バンク登録のための新たな細胞株の樹立

当研究室においてヒト肺扁平上皮癌患者の胸水より樹立された細胞株 RERF-LC-AI を細胞バンクに寄託するために、マイコプラズマ検査などの準備作業を進めている。本年度ヒト肺腺癌患者手術組織より RERF-LC-TK および胃癌患者手術組織より RERF-GC-FJ を樹立し、現在種々の検査を実施中である。また、p53 欠損ホモ接合(-/-)、ヘテロ接合(+/-) および野生型(+/+)マウスの胎児より繊維芽細胞株を樹立する作業を行なっている。

D. 考察

細胞バンクに寄託を行なった RERF-LC-KJ は SCID マウスに皮下に移植後、マ

ウスのリンパ節と肺への転移を解析した。この細胞株はリンパ節への転移能はあるが肺へはほとんど転移しなかった。一方、来年度寄託予定の RERF-LC-AI は肺への転移能が高かった。しかしながら、ヒト正常肺組織を同時に SCID に移植しておく、両細胞株ともヒト肺へ高い転移能を示した。これらの知見は両肺癌細胞株がヒト癌細胞の転移研究に有用であることを示していると同時に、ヒト癌細胞の転移研究にマウスモデルを使うことの限界を示唆している。

今回分離した TCR β 欠損 Jurkat 変異株は TCR からのシグナル伝達機構などの解析の際、親株とともにコントロール細胞として用いることが可能である。親株の Jurkat 細胞は免疫学の分野では最も有名で使用頻度の高い細胞株であり、その突然変異株も需要が多いと考えられる。実際我々は、Jurkat の TCR/CD3 を介するアポトーシスや、TCR 遺伝子のメチル化における p53 遺伝子の機能の解析などの際、この突然変異細胞株をコントロール細胞として用いている(研究発表論文 1 参照)。なお、特定遺伝子を欠損する突然変異株の樹立は様々の方法があるが、今回示した方法は対立遺伝子の排除の働く表面タンパク質の欠損型突然変異体の分離には極めて有効である。セルソーターは 10^{-5} ~ 10^{-6} の低頻度で存在する変異体を効率よく分離することができる。我々はこの方法を用いて HLA 遺伝子の突然変異細胞の分離にも成功している。

E. 結論

本年度細胞バンクに寄託済あるいは手続

中のヒト肺癌細胞株及びTCR β 突然変異T細胞株は、それぞれ癌転移の研究やTCR機能解析に有用である。

F. 研究発表
発表論文

- 1) Iwamoto, K.S., Mizuno, T., Kyoizumi, S., Seyama, T. Mutant p53 is an epigenetic mutator of the T-cell receptor via methylation. *Molecular Carcinogenesis* (in press)
- 2) Kyoizumi, S., Kusunoki, Y., Seyama, T., Hatamochi, A., Goto, M. In vivo somatic mutations in Werner's syndrome. *Human Genetics* 103:405-410, 1998.
- 3) Umeki, S., Kusunoki, Y., Cologne, J.B., Iwamoto, K.S., Hirai, Y., Seyama, T., Ohama, K., Kyoizumi, S. Lifespan of human memory T-cells in the absence of T-cell receptor expression. *Immunology Letters* 62:99-104, 1998.
- 4) Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Hirai, Y., Suzuki, T., Nakashima, E., Kodama, K., Seyama, T. Flow-cytometric measurement of T, B, and NK cells in peripheral blood lymphocytes of atomic bomb survivors. *Radiation Research* 150:227-236, 1998.
- 5) Kyoizumi, S., Suzuki, T., Teraoka, S., Seyama, T. Radiation sensitivity of human hair follicles in SCID-hu mice. *Radiation Research* 149:11-18, 1998.
- によるヒト小腸の放射線誘発アポトーシスの解析
第57回癌学会（横浜、1998）
- 2) 林奉権、京泉誠之ら、ヒト造血幹細胞の放射線誘発アポトーシスに関する研究
第57回癌学会（横浜、1998）
- 3) Kyoizumi, S. and Umeki, S., et al. Lifespan of human memory T-cells in the absence of T-cell receptor expression, The Third EFIS Immunology Conference (Tatra Mountain, Slovakia 1998)
- 4) Hayashi, T. and Kyoizumi, S., et al., Mechanism of suppression on radiation-induced apoptosis in a bcl-2-transfected human T-cell leukemia line, International Conference on Programmed Cell Death at the Third National Meeting of The Swiss Tissue Culture Society (Fribourg, Switzerland, 1998)
- 5) 京泉誠之、林奉権ら、ヒトリンパ球におけるミスマッチ修復遺伝子の発現
第28回免疫学会（神戸、1998）
- 6) 楠洋一郎、京泉誠之ら、MHCクラスIアクル欠失細胞発生の生体内抑制機構に関する研究
第28回免疫学会（神戸、1998）
- 7) 林奉権、京泉誠之ら、bcl-2 遺伝子導入によるヒト T 細胞型白血病細胞の放射線誘発アポトーシスの抑制機構
第28回免疫学会（神戸、1998）

学会発表

- 1) 京泉誠之、林奉権ら、SCID-hu マウス

がん細胞遺伝子の検出

分担研究者 石岡千加史 東北大学加齢医学研究所・助教授

研究要旨

ヒト細胞のがん細胞遺伝子、特になん抑制遺伝子や DNA 修復遺伝子の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ている。本年度は、昨年度までに開発しているストップコドンアッセイ (SC assay) をさらに発展させ、がん抑制遺伝子 *PTEN* の変異スクリーニングに用いたほか、最近、井川ら (東北大・加齢研) がクローニングした *p53* 遺伝子のホモログ *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* の変異の有無が既に明らかなる培養細胞から得られた *p51* 変異の機能解析を行った。さらに本年度は、新たに DNA ミスマッチ修復遺伝子 *hMLH1* のスクリーニング法を開発し、遺伝性非腺腫症性大腸癌由来のミスセンス変異の機能評価を行った。

分担研究者 石岡千加史・東北大学加齢医学研究所・助教授

ミスマッチ修復遺伝子 *hMLH1* のスクリーニング法を開発した。この系は *hMLH1* 発現ベクターと、酵母のミスマッチ修復能を評価を可能にするリポータープラスミドから構成される。これら出芽酵母を用いるアッセイ系は、ヒト細胞から RNA を抽出、cDNA を合成後、PCR にて目的遺伝子 cDNA の翻訳領域を増幅し、これを各遺伝子専用のギャップベクターと共に酵母に導入・発現し、その機能を調べる方法である。

A. 研究目的

各種ヒト細胞のがん細胞遺伝子、特になん抑制遺伝子の変異の有無を系統的に明らかにし、がん化機構の解明や遺伝子診断に役立つほか、データベース化して利用者に情報を提供する。

B. 研究方法

PTEN がん抑制遺伝子 cDNA 内のナンセンスまたはフレームシフト変異を特異的に検出する出芽酵母を用いるストップコドンアッセイを作成した。*p51* 遺伝子の転写活性を指標とする機能診断系を開発した。この系は、*p51* 遺伝子発現ベクターと *p53* によって転写制御を受ける既知の遺伝子プロモーターのリポータープラスミドから構成される。DNA

C. 研究結果

PTEN がん抑制遺伝子のストップコドンアッセイは、米国マサチューセッツ総合病院との共同研究で若年発症乳癌患者における *PTEN* 遺伝子の関与を調べる目的に使用され、*PTEN* は若年発症乳癌にほとんど関与しないとの結論が得られた。ヒト培養細胞株や腫瘍組織から検出された *p51* 遺伝子ミスセンス変

異について塩基配列特異的転写活性化能を調べたところ、一部の変異は転写能が障害されていた(病的変異)が、正常 p51 と同様に転写能を保持しているもの(遺伝子多型)も見つかった。遺伝性非腺腫症性大腸癌家系に報告されている hMLH1 遺伝子のミスセンス変異 25 種類について、PCR 法と酵母内遺伝子組み換え法を用いて部位特異的変異導入を行った。これらの変異 hMLH1 cDNA を酵母に発現し、酵母のミスマッチ修復能をモニターできるリポータープラスミドで機能評価した。その結果、遺伝子多型によるアミノ酸置換と病的ミスセンス変異とを区別することが可能であった。

D. 考察

既報告のストップコドンアッセイと p53 遺伝子の機能診断系は、他の遺伝子変異の検出やその機能評価に有用であった。とくに本年度の研究では、green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をマーカーにすることにより、従来のマーカー遺伝子(大腸菌の LacZ や HIS3, URA3 などの出芽酵母の栄養要求性マーカー遺伝子)と比較して、アッセイ系の迅速・簡便化に有用であった。hMLH1 遺伝子の機能診断系は遺伝性非腺腫症性大腸癌の胚細胞変異の評価に有用であり、特に当該家系の遺伝子診断に重要な情報を提供するものと考えられる。これまでにデータベースに登録されている hMLH1 遺伝子のミスセンス変異の大部分を機能評価している。現在、ヒト細胞株のミスマッチ修復能を *in vivo* でモニターできるリポータープラスミドを開発中である。

E. 結論

出芽酵母を用いる癌関連遺伝子の機能診断系を開発し、既知の変異の機能評価や変異の検出に応用している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki, T., Ishioka, C., Kato, S., Mitachi, Y., Shimodaira, H., Sakayori, M., Shimada, A., Mitsuo, A., and Kanamaru, R. Detection of APC mutations by a yeast-based protein truncation test (YPTT). *Genes Chromosomes & Cancer*, 21: 290-297, 1998.

2) FitzGerald, M. G., Marsh, D. J., Wahrer, D., Daphne, B., Caron, S., Shannon, K. E., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Garber, J. E., Eng, C., and Haber, D. A. Germline mutations in PTEN are an infrequent cause of genetic predisposition to breast cancer. *Oncogene*, 17: 727-732, 1998.

3) Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M., and Ikawa, S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nature Med.*, 4: 839-843, 1998.

4) Shimodaira, H., Filosi, N., Shibata, H., Suzuki, T., Radice, P., Kanamaru, R., Friend, S. H., Kolodner, R. D., and Ishioka, C. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genet.*, 19: 384-389, 1998.