

0.03-0.1mM低Ca²⁺濃度のケラチノサイト増殖用培地で2-3週間増殖させ、トリプシンで分散回収した細胞から細胞膜表面に存在する各種レセプター、上皮細胞増殖因子レセプター(EGFR)、低親和性神経細胞成長因子レセプター(NGFR)、接着分子レセプター(Integrins)を指標として磁気ビーズ法で細胞サブセットを分別した(方法の詳細は文献3参照)。

C. 研究結果

1. 不死化頻度の測定

結果をまとめたものを表に示した。(表1)これらの数値は実験ごとに多少変動する要因があるため一応の目安と考えるべきである。

多数分離した成長型コロニーからクローニング後300世代以上増殖し続けるものはHPV16とSV40のゲノムDNAを導入したクローンだけであることがわかる。E7とE6はともにHPV16のがん遺伝子であるがそれぞれ単独で導入したものからは300世代数以上増殖できるクローンは現われなかった。しかし、細胞の分裂回数を増やす活性は明らかにE7には存在し、E6のその活性は極めて弱いことが解かる。

E6とE7を同時に導入したものからは300世代数以上増殖するクローンが得られるためこれらのがん遺伝子は共同作用するものであることが解かる。

同様の実験をBalb/cマウス(生後2-3日)の皮膚ケラチン細胞で実施した結果も合わせて示したが、意外なことに遺伝子を導入しない細胞も例外なく300世代数以上増殖し続けた(表1)。明確な理由は明らかになっていないが、マウスのテロメア短縮の過程がヒト細胞と同じように起らないことも関係している可能性がある。

2. 不死化細胞の特性

不死化細胞株の分離に成功しているヒト上皮細胞には乳線、気管支上皮、肺末梢気道上皮、血管内皮、歯牙エナメル上皮、子宮頸部上皮などがある。不死化細胞は、もちろん培養細胞という特殊な環境下ではあるが、本来の正常な細胞の分化誘導現象を比較的良好に再現できる点で癌細胞由来の細胞株と違って、細胞の生理機能などの機構解析の研究にも十分応用可能であろう。表2にヒト不死化表皮ケラチノサイトのいくつかの性状を示した。この表から読み取れることは、細胞が不死化することによって比較的大きな変化を示すのは培養液に含まれる正常ケラチノサイトが必要とする血清成分や脳下垂体抽出成分に依存しなくなることである。これらの成分が何であるのか不明なことが多いが、ある種の増殖因子やホルモンなどサイトカイン類と考えられる。それ以外の例えば、TGF- β や高濃度

のCa²⁺など増殖に負に作用する因子にに対する感受性は大きな変動を示していない。しかし、細胞がより培養条件下に適応するとこれらの負の因子に抵抗性を示すようになる。また、不死化によって、足場非依存性増殖の傾向を示し始めるが、最近の研究では細胞がトランスフォームすることに伴う局所的接着(Focal adhesion)の低下やそれに付随する分子機構が解り始めている。しかし、これらの変化とヌードマウスに腫瘍を形成する能力とは直接結びついていない。これらの点を考慮すると不死化ケラチノサイトは正常細胞に極めて近い性状を保持しているものと考えられた。

3. ヒト上皮細胞の不死化過程

ヒト細胞は少なくとも明瞭な二段階の過程を経て不死化状態に達することが明らかになってきた。一つは細胞周期の調節機構の脱制御であり、次に、それに続いてテロメア配列の短縮を防ぐ機構が作動した場合である。勿論それぞれの段階は複数の遺伝子レベルの複雑な分子機構を含んでいる。細胞周期の調節機構に関しては多くのすぐれた解説があるのでそれらを参照されたいが、細胞を不死化する活性を持つSV40やHPV16のがん遺伝子の知られている機能はp53とpRBを不活化することである。その結果、G1期制御がかからなくなり細胞増殖が継続し続けることになる。条件によっては細胞固有の分化誘導因子やアポトーシスに対しても抵抗性を示すようになる傾向も報告されている。これらの現象の説明は、継続した細胞増殖にゲノムの不安定性が伴って新たな変異を獲得する結果、与えられた環境での増殖優位性を持つ細胞が選択されるというものであるが、ヒト細胞は細胞周期の制御機構が異常になるだけでは細胞は無制限に増殖できない真核細胞の宿命を備えている。その理由の一つはヒトの正常体細胞(二倍体)には分裂寿命に限界(50PDL:M1期)があり(いわゆるHayflick Limit)、この限界点は単に細胞増殖の刺激を与えるだけでは乗り越えられないとする経験則が存在する。この限界点はSV40やHPV16-E6/E7の機能によって乗り越えることができる。先にE6/E7の導入で分裂寿命の延長が見られることを示したが、その寿命の延長は細胞集団の平均の分裂回数として100PDLを超えることは稀でこれが第二のバリアである(M2期)。不死化はこのM2期バリアを乗り越えることにより成立すると考えられている。主として培養細胞の観察から得られたこれらの現象は経験則としてよく知られているが、原理的にはヒト細胞の有限分裂寿命は染色体末端部分のテロメア反復配列(TTAGGG)_nの複製の問題と深く関わっていることが明らかになってきた。

4. 分離した表皮ケラチノサイトによる培養皮膚作成への応用例

図1Aに分離された表皮ケラチノサイトの高密度培養の例を示した。培養法の詳細は省くが、 $2.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 程の細胞密度から1週間足らずで約10倍の細胞密度を持つ培養表皮シートが作れる。単純計算で、 3×10^6 個の初代培養ケラチノサイトからほぼ1週間で13cm x 13cmサイズになり、細胞3層からなる高密度($2 \times 10^5 / \text{cm}^2$)ケラチノサイトの培養表皮のシートができる。一方通常の増殖型ケラチノサイトの選択的培地として採用される低Ca²⁺濃度培地では高密度培養培地に比べ細胞は重層することなく細胞密度もそれほど高くなり1/4程度止りである(図1B)。Ca²⁺濃度を高くすると細胞密度を比較的大きくすることが出来るがそれだけでは重層する培養シートとしては不完全である(図1C)。

5. 分離された幹細胞候補サブセット

p75NGFRは生理的な機能がまだ十分解明されていないが、細胞の生存と深く関わっていることが指摘されており、多くの上皮細胞でその発現が確認されているものである。分別の結果、各種上皮基底層にはレセプター分子の発現の組み合わせから少なくとも6種類の細胞サブセットが同定できることが明らかになった(図2A)。これらの内、p75NGFRを強発現している細胞(サブセットE)は炎症などが伴っていない正常な表皮、子宮頸部重層扁平上皮、食道上皮などに少数存在し、組織の免疫染色の結果からもその局在はインテグリンやEGFRに較べ際立った違いを示した。この細胞の明らかになった特性は以下のような点である。1) 正常ヒト上皮組織の基底層にパッチ状の細胞集団として極在し、2) 全上皮構成細胞集団の数%以下を占める少数細胞サブセットであった、3) *in vivo*で増殖は不活発でおそらくG0期に止まっている(Ki-67陰性)、4) 移植片培養による増殖刺激に伴って不等分裂が起る可能性が示唆された、5) 抗分化、抗アポトーシス因子であるbcl-2の高い発現があり、6) 細胞接着レセプター分子、インテグリンb1の発現が全く無いか極めて低い値であるが、7) 基底膜上への基質接着分子としてインテグリンb4の発現がある。8) この細胞サブセットは培養条件下で分裂できるが同じ表現形質を備えた集団としては増幅しない(図2B)。

6. 分離された上皮幹細胞による移植用培養上皮シートの作成例

通常分離される上皮幹細胞は上皮細胞集団の1-5%程度であるが、それらの分離されたわずかの幹細胞を高密度で培養することにより、極めて高い増殖活性

を維持した培養シートを2-4週間程度で作製することができ、さらに長期にわたって培養を継続することが可能であった(図3、b1-/N+)。幹細胞をあらかじめ除去した対照となるケラチノサイトとの増殖能力の差は7週間でほぼ5倍以上にもなり、それ以後は対照での細胞数が急速な分化細胞の蓄積と共に次第に減少するため見かけの増殖能力の差はさらに大きくなることから(図3、N-/b1+)、ヒト上皮初代培養細胞を供給するためには幹細胞の分離培養が優れていることが明らかになった。UFは分画しないケラチノサイトを培養、b1+/N+は幹細胞と幹細胞以外の細胞を再構成したものを培養。

D. 考察

1. ヒト表皮細胞の不死化細胞株の分離

ヒト表皮細胞の特性は培養条件下で解析することで多くのことを明らかにすることが出来る。しかしながら、研究材料として量的な制限や、同一の条件を設定することの困難さ、さらに倫理的問題点など、おおよそ解析的研究を進める上で不利な点が多い。それを乗り越える一つの方法は、わずかの出発材料から繰り返し使用可能な細胞集団を得ることである。いうまでもなく細胞を不死化することである。勿論、ヒト細胞株は別に珍しいものではなく実に膨大な数のがん細胞由来の細胞株が樹立されており、それぞれにおいてその有用性はいうまでもない。しかしながら、正常細胞からの不死化細胞とがん細胞からの不死化細胞の区別について正しく理解されていない場合が多い。勿論、細胞の不死化過程の詳細が明らかになってきたのが最近であることが最大の理由であるが、ヒト正常細胞の不死化頻度が極めて低いため限られたグループで得られたわずかの細胞系の解析に制限されていたことにもよるだろう。

細胞の不死化は正常な細胞から実験的に作りだせる細胞の性質であり、その点多くの染色体異常が蓄積している癌細胞から樹立された細胞株とはその性格が明らかに異なる。ヒトの細胞を再現性をもって不死化させることは今のところここで見た腫瘍ウイルスやがん遺伝子など細胞にとって異物であるものを導入する以外に良い方法がない。そのために実験に使用する遺伝子の機能を無視して不死化の機構を考えるわけにはいかない。SV40-Ltag及びE6、E7の細胞内標的タンパク(p53及びRb)とその相互作用の様式が一部明らかにされているので、不死化細胞取得の目的にはこれら二種類のウイルスの機能を利用するのが最適であろう。どちらを選ぶかとなると実験目的によるが、SV40-Ltagのほうが細胞種を問わず成功するチャンスはやや高いが、E6/E7のほうが作用点を絞れる点で都合がよ

い場合がある。また、得られた不死化細胞の形態的特徴やその他の表現形質に明らかな違いがある点も注意しておく必要がある。

得られる不死化細胞のすべてのものがその後の使用に耐えるものかどうかはそれぞれの実験者の目的意識を持った判断にかかっている。しかし細胞の不死化の分子的機構そのものが現在ホットな研究テーマになっていることを思えば、それだけでもこのような細胞の研究資源としての重要性は自ずと推し計れるだろう。

細胞の不死化の分子機構が細胞周期の脱制御とテロメラーゼ (Telomerase) の活性化によって一部説明出来るようになったのはここしばらくの大きな進歩である。

ここでは、ヒト表皮ケラチノサイトを代表例として報告したが、不死化実験が試みられて成功しているヒト細胞には、繊維芽細胞はもちろん、乳線、気管支上皮、肺末梢気道上皮、血管内皮、歯牙エナメル上皮、子宮頸部上皮など、従来十分な細胞がとれないために解析的研究が遅れているさまざまな上皮系細胞の不死化株が分離されている。

不死化細胞は、もちろん培養細胞という特殊な環境下ではあるが、本来の正常な細胞の分化誘導現象を比較的良好に再現できる点で癌細胞由来の細胞株と違って、細胞の生理機能などの機構解析の研究にも十分応用可能であろう。

2. 不死化細胞の臨床応用

不死化細胞が直接臨床的に利用される場合を想定することは難しいが、技術的に不可能であるという意味ではない。多くの不死化細胞は正常細胞に近い形質を発現し、ある程度の形態形成能力も持っているため、不死化細胞の増殖や分化をコントロールして正常細胞の代替として用いる可能性はあながち荒唐無稽な考えではない。しかし、これらの不死化細胞は培養条件下で変異を蓄積する可能性があるためその結果としての比較的高い悪性化のリスクをどのように消し去るかの課題は大きい。むしろ、不死化細胞は様々のヒトの遺伝的疾患を解析したり、遺伝子治療のためのモデル系としての利用価値を考えると実験動物の操作から得られる知見と相補出来る有用性がある。実際、遺伝的疾患の患者さんの治療時に得られる歯肉や皮膚の一部から得られるケラチノサイトを培養して不死化細胞を得ることが出来る。これらの細胞株を遺伝子導入の宿主として遺伝子治療の基礎研究のために利用可能であろう。

しかし、ヒト上皮細胞の遺伝子治療や細胞移植治療などの臨床応用に関しては次に述べる幹細胞 (stem cell) がより多くの潜在的可能性を秘めており積極的に検討されるべきかもしれない。

3. 分離された幹細胞の位置付け

表皮構成細胞のケラチノサイトがどのようなサブセットを含むかその同定を試みた例がある。培養条件下での増殖活性の違いを指標にして3種類の細胞種に区別したものである。これは、表皮には少なくとも異なった増殖特性を示すケラチノサイトが存在することを示した古典的な観察である。ケラチノサイトの増殖、分化、老化を細胞を単位として考える場合の基本とされてきたものである。これらの細胞サブセットはホロクローン (活発に増殖する細胞種)、メロクローン (中程度の増殖活性を持つ細胞種) 及びパラクローン (増殖能の低い分化細胞) と区別されている。この内、ホロクローンに相当する細胞群を幹細胞とする研究結果が報告されている。この一連の研究は細胞接着分子であるインテグリンb1に着目し、表皮基底層細胞の中でインテグリンb1を強く発現している細胞群を分離し、その増殖活性の強さからそれらを幹細胞あるいはそれを含む細胞サブセットと考えたものである。これらの細胞はコラーゲンIV型などの基質への接着能力の違いによって分別出来る。培養条件下で最も高い増殖活性 (マクロコロニー形成能力) を持っている。その分布は表皮基底層に様ではなく、特定の領域に局限して存在しており、表皮構成細胞のほぼ20%程度を占める細胞サブセットであることを明らかにしている。また、この細胞サブセットは表皮の形態形成能力の一部を発現出来る。これらの結果は幹細胞に期待される上記Millerらの特性の一部 (組織の特定のところに局在、高い増殖能力、組織再構成能力) を満たすようにみえるが、実際のところはこれらの特性は移行期の細胞にも当てはまるという難しい点がある。また、インテグリンb1の発現は上皮基底層細胞のみならず傍基底層細胞にも発現しており、発現の強弱によって本来少数であるはずの幹細胞を同定することは極めて困難である。基底層細胞に局限して発現する接着分子としてはインテグリンb4の方がよりその局在性は明瞭である。インテグリンb1強発現細胞も実は基質 (マトリックス) との接着が無くなると容易に分化する性質があるため、一般に信じられている分化やアポトーシスに抵抗する特性を幹細胞の長寿 (longevity) の条件とする考え方からは支持されない性質である。高い増殖活性と結びつくインテグリンb1が幹細胞の特性を説明する分子マーカーとして適当であるかさらに検討すべき課題である。培養条件下での細胞の挙動、特に増殖活性の強さを主な幹細胞の指標とするのは表皮細胞の増殖から分化、老化までの細胞系譜を考慮にいれると困難が生じる例である。特に、培養条件下で通常幹細胞と移行期細胞とを増殖活性で区別することは難しい。増殖活性が高いことが必ずしも長寿であることと直接繋が

らないからである。実際、活発に増殖するホロクローンに相当する細胞集団は平均20回程程度で分裂の限界をむかえ、また条件によっては極めて容易に分化する。少なくともこのような細胞の特性は幹細胞のものとするよりむしろ分化、老化の決定を受けた移行期細胞のものとしたほうが妥当であるように見える。

最近、別のアプローチによる表皮幹細胞の同定と分離を試みた例が報告されている。細胞の長期生存と増殖能力に関するもので、いずれの能力も極めて高い細胞サブセットはインテグリンa6を強く発現するもので、同時に増殖活性（潜在的増殖能力と区別）の低さを示す分子マーカーを発現しているものである。インテグリンa6は通常インテグリンb4と複合体を形成するもので、このサブセットはインテグリンb1強発現細胞と区別されるものである。しかし増殖能力は極めて高く数千個の細胞から数十億個までの細胞集団にできることが確認されている。しかし、この増幅の程度はそれほど桁外れに大きい訳ではない。論点は、分離された細胞は元々増殖が負に制御されているものであるが培養条件下で細胞集団を増幅させる強い能力を持つものであったというところにある。

我々の分離した幹細胞はその増殖特性や分子指標などの点からこの後者のカテゴリーに入るものであろうと位置付けている。

勿論、このようなin vitroでの解析に伴う、増殖活性、増殖能力、長期生存、などの指標は培養条件、特に培養液成分に完全に依存するものであるから、このような試みの結果を幹細胞の意味論から議論することはあまり実り多いものでなく、むしろ分離された細胞の有用性に着目することが研究資源と言う観点からは重要である。

4. 今後の課題

不死化細胞株の作製技術と供給体制はほぼ整ったと考える。一方、正常ヒト上皮初代培養細胞に関しては技術的にはほぼ確立されたと考えるが、人体組織の入手に関して倫理的な側面や実際上のシステムチックな調製体制は一研究部門の限られた人員によって対応できる問題でなくなっている。特に幹細胞の分離を含めた供給体制はコストと担当スタッフに関するファイナンシャルサポートが不可欠である。また遺伝子治療用の上皮標的細胞、表皮移植用の培養皮膚、あるいは角膜移植などの臨床応用に向けて幹細胞の増殖特性の以下のような生物学的検討事項が課題として残されている。

- 1) 自己再生能力を持っているか?
- 2) 自己再生のための機構や分裂の様式があるか?

- 3) 組織構成細胞をクローナルに作り出せるか?
- 4) 分裂刺激因子類は何か?
- 5) 培養上皮に寿命はあるか?

E. 結論

1. ヒト正常上皮細胞の不死化細胞株の分離法を確立し、がん細胞由来の細胞株と異なり多くの点で正常細胞の形質を保持する有用な細胞株の研究資源化の技術体制を整えた。
2. 生化学的、分子生物学的解析が可能なレベルに達する正常上皮培養細胞の供給が一部可能となった。
3. 上皮幹細胞の分離法を確立し、条件付きで一部供給が可能となった。

F. 研究発表

発表論文

1. Ohta, Y., Tsutsumi, K., Kikuchi, K. and Yasumoto, S., Two distinct human uterine cervical epithelial cell lines that were established after transfecting human papilloma virus 16 DNA. *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 644-651, 1997.
2. Kikuchi, K., Tsutsumi, K., Ohta, Y. and Yasumoto, S., Time correlation of commitment to calcium-induced terminal differentiation in human ectocervical keratinocytes in suspension culture. *Cell Growth & Differ.* 8: 571-579, 1997
3. Kunimura, C., Kikuchi, K., Ahmed, N., Shimizu, A. and Yasumoto, S., Telomerase activity in a specific cell subset co-expressing integrin b1/EGFR but not p75NGFR/bcl2/integrin b4 in normal human epithelial cells. *Oncogene* 17: 187-197, 1998
4. Harada, H., Mitsuyasu, T., Seta, Y., Maruoka, Y., Toyoshima, K. and Yasumoto, S., Overexpression of bcl-2 protein inhibits terminal differentiation of oral keratinocytes in vitro. *J. Oral. Pathol. Med.* 27: 11-17, 1998
5. 安本 茂, 腫瘍マーカーとしてのテロメラーズの活性評価の研究, *臨床成人病* 28: 1258-1260, 1998
6. 安本 茂, 細胞の不死化と表皮幹細胞, *Monthly Book Derm.* 14: 61-71, 1998
7. 安本 茂, ヒト再生上皮幹細胞の老化, *医学のあゆみ* 188: 41-47, 1999
8. 安本 茂, 表皮幹細胞と培養皮膚, *組織培養工学* 25: 100-105, 1999

表1 SV40とHPV16によるケラチン細胞の不死化頻度

細胞の種類	導入したDNA	増殖型コロニーの出現頻度	分離したコロニー数	世代数		
				(20<PDL<100)	(100<PDL<300)	(PDL>300)
Human keratino-cytes	pMHPV16d	4.7×10^{-4}	20	2	2	2
	pDE7	5.5×10^{-4}	40	4	2	—
	pDE6	3.9×10^{-4}	50	0	—	—
	pSV40ori-	9.0×10^{-4}	5	5	5	4
	pcD2	0.5×10^{-4}	50	0	—	—
PDE71 ^a	pDE6	ND	NT	NT	NT	1
Mouse keratino-cytes	pMHPV16d	ND	6	6	6	6
	pDE7	ND	6	6	6	6
	pDE6	ND	6	6	6	6
	pcD2	ND	6	6	6	6
	no DNA	—	—	—	—	—

a: PDE71はE7遺伝子を導入して100世代の寿命が延びた細胞。この細胞にさらにE6遺伝子をトランスフェクションした。

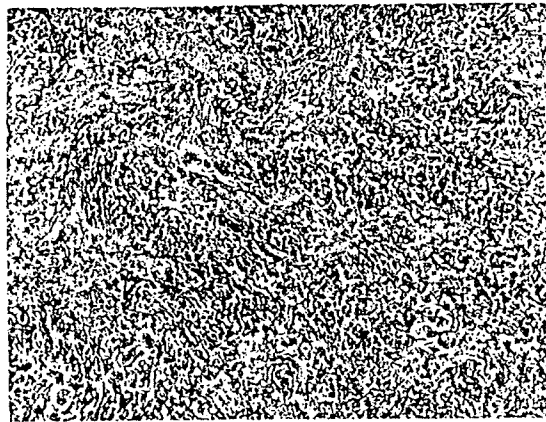
b: DNAを導入してない細胞が300世代以上継代できるようになったため不死化したと判定した。ND:計測不能であった。NT:計測しなかった。PDL:世代数

表 2 Phenotypic variations of human keratinocyte cell lines

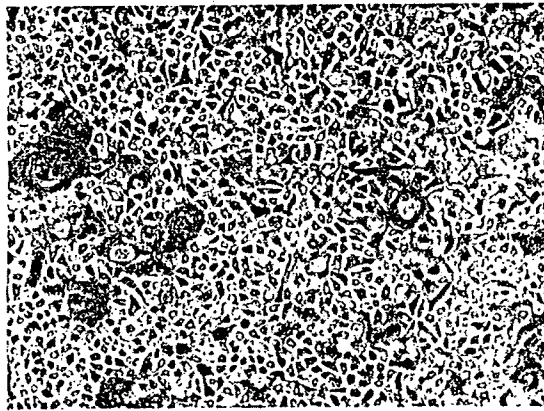
Cell lines	Phenotypes ^a							Karyotypes ^b	
	Limited life span (PDL)	Growth inhibition by			Dependence of growth factors		Growth in soft agar	Tumorigenicity	(% of polyploids)
		TGF- β (50 pg)	Serum (10%)	Ca ²⁺ (1.0 mM)	EGF (5 ng)	BPE (100 μ g)			
NHK	40-50	+	+	+	+	+	-	-	<0.1
PHK16-0b	>1200	+	-	+-	+-	-	+-	-	5
PHK16- I	>800	+	-	+-	+-	-	+-	-	25
PHK16- II	>800	+-	-	+-	+-	-	+-	-	98
PDE71	100	+	+	+	+	+	-	-	20
PDE72	100	+	+	+	+	+	-	-	30
PDE75	300	+	+	+	+	-	-	-	20
PDE76	300	+	+	+-	+	-	-	-	15
PDE71/6	>800	+-	-	+-	-	-	+-	-	ND
PHK16ISA1	>500	+-	-	-	-	-	+	-	ND
PHK16ISA2	>500	+-	-	-	-	-	+	-	ND
PHK16IIISA1	>500	+-	-	-	-	-	+	-	ND
PHK16IIISA2	>500	-	-	-	-	-	+	-	ND
PHK16IIISA3	>500	-	-	-	-	-	+	-	ND
PSV1	>300	ND	-	-	-	-	+	-	ND
SiHa	immortal	-	-	-	-	-	+	+	ND

^a, All these phenotypes were evaluated by either cumulative growth or colony forming ability (see details in the text). Tumorigenicity was evaluated during 150 days after injecting 1×10^7 cells subcutaneously in *nu/nu* mice. ^b, At least, 100 metaphases were counted.

A. 高密度培養 (培地成分省略)



B. 0.03mM Ca²⁺



C. 2.3mM Ca²⁺

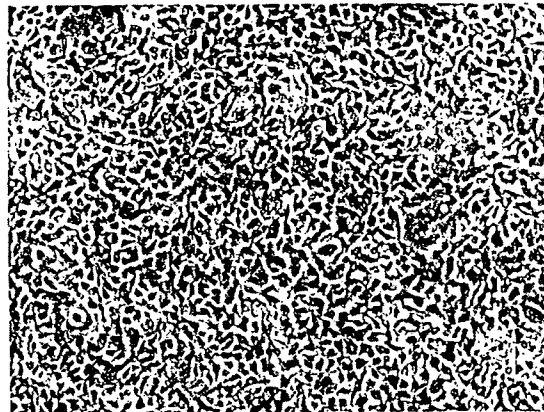


図2 培養表皮シートの形成
(基本培地:MCDB153)

(A)

receptors	cell subsets					
	A	B	C	D	E	F
integrin β 1	++	+	-	-	-	-
EGFR	+	+	+	+	-	-
p75NGFR	-	-	-	+	++	-
integrin β 4	+	?	?	+	+	?

(B)

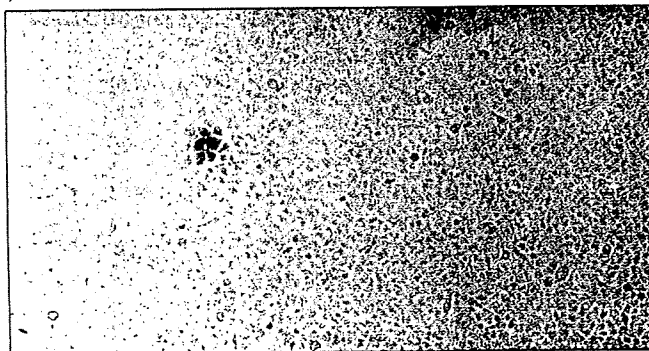
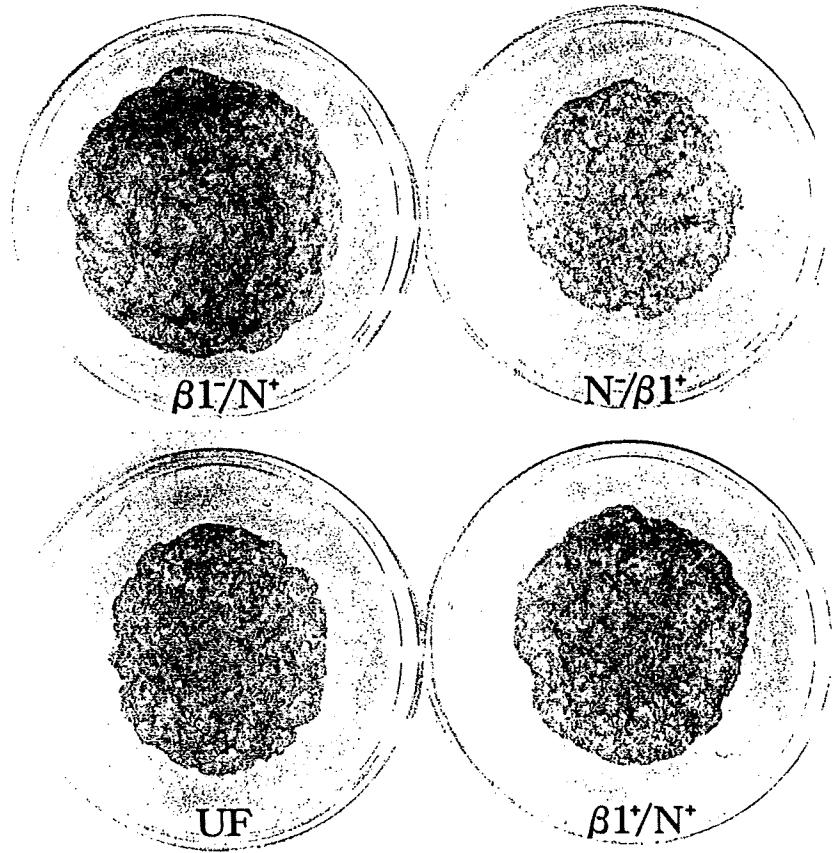


図2 再生上皮細胞サブセットの分別と幹細胞

Reproductive potentials of p75NGFR-subset



正常二倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化および
蛋白質の二次元展開を利用した細胞の同定手法の研究

分担研究者 木村成道 (財)東京都老人総合研究所遺伝子情報部門 部長

研究要旨: 蛋白質の二次元展開を利用した細胞の同定手法の研究において、研究対象細胞の拡大を図るとともに、画像解析後の「データベース化」と「情報開示」のための基盤整備を目的とする専用サーバーの立ち上げ、CellBank-2DPAGEホームページの制作を試みた。ヒト成人皮膚線維芽細胞の供給用凍結アンプルおよびバックアップ用凍結アンプルを作成し、HS財団と国立医薬品食品研究所マスターバンクにそれぞれ送付した。また、新生児および児童由来皮膚線維芽細胞を樹立した。さらに、TIG-7細胞の異形性15番染色体(15p+)の特性について、各種分染法によるバンド解析、Flow karyotyping、FISH等により解析を試み、結論を得た。

1 蛋白質二次元電気泳動・データベース化とその応用としての細胞株の品質管理

A. 研究目的

本研究は、プロテオーム解析技法を培養細胞研究資源の品質管理に応用し、培養細胞を用いた研究の基盤を蛋白質レベルで整備することを目的とするものである。

B. 研究方法

本年度は研究対象細胞の拡大を図るとともに、特に、「データベース化」と「情報開示」を具体的な実施に移すための基盤を整備するために専用のサーバーを立ち上げるとともに、CellBank-2DPAGEホームページの制作を試みた。

C. 研究結果

昨年度は、ヒト二倍体線維芽細胞6系統(IMR-90, MRC-5, TIG-1, TIG-1R, TIG-3, TIG-7)の蛋白質を二次元電気泳動で分離し、系統(Strain)ごとの特徴をマッピングする試みを行った。その結果蛋白質のパターンに違いが見られることがわかり、本法は細胞資源の品質管理に有用であることがわかった。今年度はさらに、EBウイルス転換ヒト末梢血Bリンパ芽球の不死化に伴う蛋白質の変化を解析し、その成果を生化学会に発表している。

そもそもプロテオーム解析は、(1)二次元電気泳動による蛋白質の分離、(2)画像解析法によるパターンの比較、(3)質量分析法やマイクロシーケンシング法による構造解析、(4)結果のデータベース化と情報公開、という一連の流れで行われるものであり、上

記の研究において見いだされた複数の標的蛋白質に対して、現在、構造の解析と同定の作業を行っているところである。東京都老人総合研究所では、正常二倍体線維芽細胞TIG-3のin vitro agingにともなう蛋白質の変化をデータベース化し、ドメイン名www.tmig.or.jpのウェブサーバー(SUN Sparc station 5)上で公開しているが、現サーバーは基本的には研究所の広報委員会の管理下にあり、Cell Bankの細胞品質管理を目的とするCellBank-2DPAGEデータベースを置くには適さない。そこで今年度は、最近話題を集めているLinuxをOSとするウェブサーバーをパーソナルコンピュータ上に立ち上げ、そこに新たなホームページを開設することを考えた。予算の関係上、大規模なサーバーの構築は困難であるため、試みとして、Power Macintosh 6100/60にMkLinux(マイクロカーネルリナックス)OSをインストールし、ウェブサーバーソフトとしてはMkLinuxに標準で装備されているApatchを利用することとした。このようにして作られたCellBank-2DPAGEデータベースは、現在試験的にURL <http://proteome.tmig.or.jp/cellbank/>で稼働を開始しているが、まだ未完成の段階であるので一般公開は行っていない。

D. 考察

今回利用したMkLinux版Apatchの場合には、従来のUNIX版のNCSA httpdと異なり、サーバーサイドのcgiによるimagemapが利用できないという問

題が生じたが、クライアントサイドの usermap を利用することで対処した。このためクライアント側に、Netscape 2.0 以降のバージョンあるいはこれと同等の usermap 機能をサポートするブラウザが必要であるが、今日では多くの市販のブラウザが概ねこのレベルにあるので、大きな問題はないものと判断した。

E. 結論

今年度試験的に立ち上がった CellBank-2DPAGE ホームページをベースにして 情報量を徐々に充実させ、将来は培養細胞研究資源の高度化と品質管理に役立つプロテオームデータベースに仕上げる事が可能である。

II ヒト正常二倍体細胞の樹立と供給

A. 研究目的

老化研究および癌研究に資するため、ヒト正常二倍体細胞の新規樹立と供給を目的とする。

B. 研究方法

供給用凍結アンプルおよびバックアップ用凍結アンプルを作成し、HS財団と国立医薬品食品研究所マスターバンクにそれぞれ送付した。新生児および児童の皮膚片から這い出し法により細胞を採取し、細胞数測定を行いながら培養することで正確な細胞集団倍加数(PD)の記録を持つ初代培養細胞を樹立した。

C. 研究結果

1. 供給細胞の凍結アンプル作成=今年度は、昨年度樹立・性格づけをしてHS財団に登録した成人皮膚線維芽細胞のTIG-112細胞(40Y、F)(JCRB0533)とTIG-114細胞(36Y、M)(JCRB0534)の供給のための凍結アンプル(それぞれ22アンプルと28アンプル)と、バックアップのための凍結アンプル(3アンプルずつ)を作成し、HS財団と国立医薬品食品研究所マスターバンクに送付した。

2. 未成人皮膚線維芽細胞の新規樹立=皮膚片から這い出し法により細胞を採取し、細胞数測定を行いながら培養することで正確な細胞集団倍加数(PD)の記録を持つ初代培養細胞を樹立した。これらの細胞像は、線維芽細胞様である。マイコプラズマ・細菌の混入のないこと、正常な染色体構成(G-バンド法により)を持つことを確認した。さらに、長期間培養し、正常細胞の特徴である分裂寿命を持つことを調べた。新生児由来皮膚線維芽細胞はTIG-121、児童由来皮膚線維芽細胞はTIG-118とし、以下の記載のとおりである。

(1) TIG-118 ヒト皮膚線維芽細胞

由来動物組織:	ヒト、皮膚
性:	F
年齢:	12歳
性状:	線維芽細胞様
分裂寿命:	PD66
染色体:	正常2倍体 (2N=46, XX)
マイコプラズマ:	マイナス
細菌:	マイナス
供給時のPD:	PD15-20

(2) TIG-121

由来動物、組織:	ヒト、皮膚
性:	M
年齢:	8月
性状:	線維芽細胞様
分裂寿命:	PD53
染色体:	正常2倍体 (2N=46, XY)
マイコプラズマ:	マイナス
細菌:	マイナス
供給時のPD:	PD15-20

D. 考察

ヒト正常細胞は分裂寿命を持ち、かつ分裂寿命が過ぎる間に性格が変化する(これをインビトロ細胞老化という)ため、正確な分裂回数の記録を持つ細胞として維持することが必要なことから、当分の間は、HS財団供給の老人研由来ヒト正常二倍体細胞の凍結アンプル作成および種細胞の維持・保管は、老人研で行う予定になっている。なお、これらの細胞は、凍結アンプル解凍後の生存率が高いことや、醗酵研究所の協力のもとに、マイコプラズマ・細菌の混入がないことなどを確認し、供給に適した状態であることを確認してある。

E. 結論

今まで、老人、成人の正常皮膚線維芽細胞を樹立し、HS財団細胞バンクに登録してきたが、今年度は新生児と児童由来の皮膚線維芽細胞を樹立し、性状確認を行ったことにより、新規登録が可能な段階に至った。

III ヒト2倍体細胞、TIG-7、の異形性 15 番染色体 (15p+) の解明

A. 研究目的

TIG-7 細胞は、15 番染色体が異形対となっており、継代培養を通して安定して維持されている。そこで、異形性を生じた部位 (15p+) の特性について解析を試みる。

B. 研究方法

TIG-7 細胞から染色体を調整し、G-banding、C-banding、Q-banding、Ag-NOR-staining、及び Chromomycin A3 (CMA)-staining を行った。また、染色体を propidium iodide (PI) で染色後、Laser-Scan Cytometer (LSC) を用い、Laser-Scan karyotyping を行った。分裂中期細胞から Young ら (1981) の方法に従い、染色体を分離し、Hoechst 33258 及び CMA で染色後、Flow Cytometer を用い、Flow karyotyping を行った。FISH 解析は、標的染色体マーカーとしての DNA プローブを用いて行った。

C. 研究結果

TIG-7 細胞の平均染色体数は継代培養を通して高い確率 (>95%) で 46 であった。G-banding 解析の結果、異形性 15 番染色体 (15p+) を認めるが、それ以外は正常であった。この変異染色体は、GC 塩基対に富む DNA 構成をしており、rDNA の増幅によって形成されているが、大部分は転写活性をもたない不活性な状態で維持されていた。FISH を併用した Laser-

Scan karyotyping の結果から、正常 15 番染色体の 1.45 倍の DNA を有することが明らかとなった。この変異部位は Ag-NORs negative であるため、非転写 rDNA 領域の細胞周期における動態を解析する上で、よきモデルとなり得る。

D. 考察

LSC による細胞核の情報 (相対 DNA、面積、クロマチン凝集度) と、rDNA プローブによる FISH の結果から、標的 rDNA 領域は、細胞周期を通して cluster を形成しているのに対し、他の染色体由来の rDNA 領域は、G1 期から late S 期にかけて比較的拡散して存在すること、G2 期には凝集して点在する傾向にあることが判明した。この現象は、周期核における rDNA の転写と特定染色体上への分配を反映するものと考えられる。

E. 結論

TIG-7 細胞の異形性 15 番染色体 (15p+) は、GC 塩基対に富む DNA 構成をしており、巨大な ribosomal DNA (rDNA) gene cluster を形成していた。しかし、その大部分は、転写活性をもたない不活性な状態で維持されており、Ag-NORs negative であるため、非転写 rDNA 領域の細胞周期における動態を解析する上で、よきモデルとなり得る。

F 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura, N., Tomizawa, S., Nakata, K. and Kimura, N. Chronic treatment with estrogen up-regulates expression of sst2 messenger ribonucleic acid (mRNA) but down-regulates expression of sst5 mRNA in rat pituitaries. *Endocrinology* 139, 1573-1580, 1998

2. Ishijima, Y., Shimada, N., Fukuda, M., Miyazaki, H., Orlov, N. Ya., Orlova, T. G., Yamada, T. and Kimura, N. Overexpression of nucleoside diphosphate kinases induces neurite outgrowth and their substitution to inactive forms leads to suppression of nerve growth factor- and dibutyryl cyclic AMP-induced effects in PC12D cells. *FEBS Lett.* 445, 155-159, 1999

3. 戸田年総、木村成道、データベース・ホームページ活用ガイド -- 二次元電気泳動・プロテオームデータベース --- 、実験医学 Vol. 16, No. 13 (9月号)、1998.

4. 木村成道、癌の転移、図説分子病態学 (一瀬、鈴木編)、pp. 224-228、中外医学社、1998

2. 学会発表

1. 戸田年総、木村成道、老化研究におけるプロテオーム解析と異常蛋白質のデータベース化、日本基礎老化学会、第21回大会、東京、1998年6月17-19日

2. 戸田年総、鈴木貴久、岡田雅子、菅原佳保里、杉本正信、古市泰宏、木村成道、EBウイルス転換ヒトBリンパ芽球の不死化過程における蛋白質の変動：二次元電気泳動による分析、第71回日本生化学会大会、名古屋、1998年10月14-17日

3. Kimura, N. Recent trend in molecular biochemical research on aging. The 1st Mini Symposium on Recent Advancement of Aging Mechanism, Taegu, Korea, 11.10. 1998

ヒト変異遺伝細胞の研究資源化に関する研究

分担研究者 佐々木 正夫 京都大学放射線生物研究センター・教授

研究要旨: ヒト変異遺伝病細胞の研究資源開発のため、遺伝素因が多様性を示す小児再生不良性貧血患者を中心に細胞を収集し、細胞の染色体構成、姉妹染色分体交換頻度、マイトマイシンC感受性、X線感受性から疾患の診断をするとともに、残された細胞から細胞株を樹立した。そのうち、ファンコニ貧血症と確定した患者についてFANCA遺伝子、FANCC遺伝子の突然変異を調べ、15例のうち13例にFANCA遺伝子の突然変異が観察された。アタキシア・テランジェクタシア患者10例でATM遺伝子の突然変異を調べ、10例中9例に突然変異を認めた。さらに3例のブルーム症候群患者についてBLM遺伝子の突然変異を調べ、前例に突然変異を認めた。何れの場合にも観察された突然変異は日本人特有のものであり、我が国における研究資源化に当たって日本人患者の細胞の重要性が示された。再生不良性貧血患者の中に見出された姉妹染色分体交換の高い患者5例についてBLM遺伝子、FANCA遺伝子の突然変異を調べたところ、1例にBLM遺伝子の突然変異が観察されたが、他の患者では何れの遺伝子にも突然変異は観察されず、新しい型の疾患と考えられる。以上の結果は、遺伝病細胞の資源化に当たっては、臨床診断を補完する細胞学的補足診断が欠かせないことを物語っている。

A. 研究目的

ヒトの疾病の診断・治療・制御・予防における遺伝子情報の重要性はますます高まってきた。ヒト集団における変異遺伝子は、単に継代的遺伝病の原因遺伝子としてだけでなく、その体細胞突然変異は非遺伝性の類似疾患の原因突然変異としても認められ、広くヒトの疾患の原因として関わっている。また劣性型の突然変異遺伝子は、それ自身は直接遺伝病の発症にはつながらないものの、一般集団の中にパーセントのオーダーで広く分布しており、それが広くヒトの疾病の発症の誘因となり、また疾患の多様性の原因となっている。従って、ヒトの疾病の診断・治療・制御・予防には、関係する遺伝子の機能と発症に関わる遺伝子変異を解明することが先決である。遺伝子情報は先端医療の学術的基盤であり、疾病関連の遺伝子とその機能および遺伝子変異と疾患の関係を解き明かすことが強く求められている。そのため、ヒトゲノム・遺伝子を対象とする研究を推進するためには研究資源の整備が急務となっている。

米国には、早くから遺伝子資源の重要性を認識し、米国学士院、保健省の支援の下にヒト遺伝病の細胞バンクが設立されており、ヒト変異遺伝子研究に大きな貢献をしてきているが、我が国ではいまだに議論のみが先行し、政府においても具体的な対応策がなされていない。1984年に始まった対がん10ヶ年総合戦略の一環として厚生省細胞バンク事業が始まり、我々はその細胞バンク一部としてヒト遺伝病細胞株33株

を登録し、小規模ながら研究支援を行ってきた。そして、対がん10ヶ年総合戦略最終後もヒト遺伝病細胞株の充実に努めてきた。遺伝病患者は数万人～数十万人に1人という極めて希な存在であり、1人の研究者あるいは1つの研究室が独自に患者から細胞を収集して研究を進めることは極めて困難である。研究資源としての細胞バンクの果たす役割は計り知れない。一般的には、外国の細胞株を利用することも可能であるが、疾患に関係する遺伝子の突然変異の多くは、世代から世代へと受け継がれたものであり、従って病的遺伝子変異は人種に固有のものとなっていることが考えられる。疾病の頻度が突然変異の集団頻度と関係し、疾病の表現度が突然変異の種類に左右されることを考えると、我が国における先端医療の推進を考えた場合、我が国固有の遺伝子資源と遺伝子情報の確立は極めて重要であることは明白である。

この研究は、以上のような学術的背景と緊急性から、我が国における遺伝子資源と遺伝子情報の充実に目的として日本人変異遺伝病細胞、特に発がん関連の遺伝病患者の細胞、の収集とその遺伝子特性の確認による研究支援体制の確立を目指すとともに、細胞バンクに登録された細胞株については、研究者の要求に応じて細胞株を供給してきた。

B. 研究方法

1. 遺伝病細胞の収集

全国の臨床医に協力を依頼し、高発がん性として知

られる遺伝性あるいは先天性疾患の患者およびその家族の血液および皮膚組織の提供を受け、細胞を培養し、細胞株として樹立した。遺伝病と考えられる患者では、その治療に先だつて的確な診断が重要であり、多くの場合、組織の提供は細胞・染色体・遺伝子レベルでの確定診断のために臨床医から依頼されたものであり、その組織の一部を細胞株として樹立した。1995年から特に小児の再生不良性貧血を中心に調査し、本年度は13家系について調査を行った。このプロジェクトによる全調査件数は69家系となる。小児再生不良性貧血の原因は多様と考えられ、遺伝性素因が推定されながら、中にはファンconi貧血症(FA)(常染色体性劣性遺伝病)も含まれるが、その実態は明らかでない。これらの家系について染色体構成、姉妹染色体分体交換(SCE)、染色体のマイトマイシン(MMC)やX線に対する感受性を調べ、結果を臨床医に報告するとともに、細胞株を樹立した。

2. 遺伝病細胞の遺伝子解析

我が国における遺伝病の原因遺伝子の突然変異特性を明らかにする目的で、MMC高感受性からFAと診断できた患者についてFANCA遺伝子、FANCC遺伝子のcDNAおよびゲノムDNAについてシーケンス法により突然変異を解析した。また、高頻度のSCEが見られる患者8例、うち3例は臨床的にもブルーム症候群(BS)と診断された患者、5例は臨床的にはFAが疑われた患者、についてFANCA遺伝子、BLM遺伝子の突然変異について同様に調べた。また、アタキシア・テランジエクタシア(AT)の患者10例についてATM遺伝子の突然変異についてSCP-direct sequence法によって調べた。

3. 細胞株の特性解析と研究支援

新規に診断が確定した患者の細胞について、細胞を大量に培養し、染色体構成、MMC感受性、SCE等の特性を調べ、凍結保存をし、細胞株として登録できる状態とした。また、従来より細胞バンクに登録されている細胞株については、研究者の依頼に従って供給してきた。

C. 研究結果

1. 小児再生不良性貧血の遺伝的特性

本年度に調査した13家系を含め、このシリーズで調査した家系は69家系となる。皮膚組織が入手できた家系については皮膚線維芽細胞株として、また血液のみが入手可能であったものについてはEBウイルスでBリンパ球を不死化させ、リンパ芽球様細胞株として

凍結保存をした。69家系のうちMMCに対する感受性からFAと診断された患者は24家系28例となった。従来の調査と併せて45家系50例となる。また、再生不良性貧血であるが、MMCに対する感受性は高くなく、リンパ球のSCEがBSを想像させるほど高頻度に見られる患者が4例見つかった。従来の調査において見つかった2例と合わせて6例となる。臨床的にはBSに相当する特徴が見られないことから、未知の疾患と考えられる。また、独立した2例の患者では11番染色体のq23-qter領域の欠失が観察され、先天性の染色体異常であることから再生不良性貧血の発症に関係した遺伝子がこの領域にあることが示唆される。これらの結果は、小児再生不良性貧血には多くの遺伝要因が関係していることを示している。

2. 遺伝病細胞株の遺伝子解析

MMCに対する染色体感受性からFAと診断された患者のうち独立家系に属する15例について相補性群A群の原因遺伝子であるFANCA遺伝子について突然変異を調べた結果、15例中13例(87%)に9種類の突然変異が検出された。FANCA遺伝子に突然変異が認められなかった3例についてはC群の原因遺伝子であるFANCC遺伝子について調べたが、突然変異は認められなかった。さらに、これらの患者とは別の22例の患者についてFANCC遺伝子を調べたが、3例に多型性変異が認められたのみで疾患に係る突然変異は認められなかった。このことから日本人患者では、その多くがA群患者であることが推定される。FANCA遺伝子に見出された突然変異は何れもこれまで欧米の患者では見られない新規の突然変異であり、相補性群の分布および突然変異の種類は、日本人固有のものであることが考えられる。FAには現在A~Hの8群の相補性群が知られており、その世界での分布は国によって大きく異なっている。日本ではA群が多いと言える。A群およびC群が否定された患者の遺伝子が何であるかということは今後に残された課題である。

SCE頻度の高い再生不良性貧血患者の原因遺伝子が何にあるか?BLM遺伝子の特殊な突然変異あるいはFA遺伝子の特殊な突然変異の可能性を考えて、BLM遺伝子、FANCA遺伝子、FANCC遺伝子について検討を開始した。検討に当たって、臨床的にBSと診断された3例のBS患者(何れも新規患者で、1例はJCRB0317BS2CHの姉)についてBLM遺伝子の突然変異を調べた。BS患者では何れもBLM遺伝子に突然変異が認められ、その突然変異は日本人患者特有のものであった。高SCEの再生不良性貧血患者では、1例にBS患者に見られる突然変異

が1個ヘテロ接合性の形で認められたが、他の4例では突然変異は認められなかった。また、これらの患者でFANCA遺伝子について調べたが、突然変異は認められなかった。FANCC遺伝子については現在調査中である。1例にBLM遺伝子の突然変異が認められたことから、BS関連の疾患である可能性が考えられる。これまで、BSには相補性群が1つしか知られていないが、別の相補性群が存在する可能性も否定できない。今後は、FANCC遺伝子について調査するとともに、BSとの相補性の試験をする必要もある。

AT患者10例についてATM遺伝子の突然変異を解析した結果、9例に突然変異が認められた。突然変異は多様性に富み、9例の患者で10種類の突然変異が観察された。何れも欧米の患者では報告されていない新規の突然変異であり、この疾患に関しても日本人固有の突然変異が背景にあることを示している。

3. 登録細胞株の配布による研究支援

細胞バンクに登録されている33株について研究者からの要求に応じて細胞を供給した。本年度の供給件数は23件であった(登録株の両親の細胞など未登録のものを加えると32件となる)。供給に当たっては、細胞を解凍し、一旦培養系に移してから細胞増殖が旺盛であることを確認し、フラスコ培養の状態で宅急便により発送した。

D. 考察

1. 細胞の収集と疾患特性

遺伝病細胞が疾患の解明・診断・治療・予防の研究に重要な資材となることは明白であるが、疾患の中には診断が確定し難いものが多い。臨床診断のみでは遺伝子研究の資材としては不十分であり、しばしば誤った結果を招く恐れが懸念される。研究資材としての遺伝病細胞の資源化に当たっては、臨床診断に加えて、細胞・染色体・遺伝子・蛋白等のレベルでの確定診断あるいは補足診断を欠かすことが出来ない。例えば、臨床的にATと診断された患者でATM遺伝子の突然変異を調べた結果では約半数の患者に突然変異が認められると言う結果となっているのに対して、細胞の放射線感受性でATの特性を確認した患者では殆どの患者で突然変異が認められるという結果となっている。疾患特性が確認されないまま寄託された細胞を用いて、別の観点から研究を進める場合には問題はさらに重大なものとなる。ファンconi貧血症が疑われた患者でもMMC感受性からFAが否定される患者も少なくない。その意味でも、遺伝病細胞の研究資源化には細心の注意が必要であると言える。我々は、資源化に当たり、それぞれの疾患について細胞・遺伝子レベルから疾患特

性を確認する作業を進めてきた。これにより、真にその疾患に関する研究が推進できるものと考えられる。

疾患特性の中には、各種の細胞学的特性があるが、最終的には遺伝子が同定されている疾患については遺伝子レベルで確認されていることが望ましい。FANCA遺伝子、FANCC遺伝子、ATM遺伝子、BLM遺伝子について関係する遺伝病でその突然変異を調べたが、突然変異は何れも日本人固有のものであることが分かった。このことは、我が国における遺伝子を対象とした先端医療の研究資源としては日本人患者由来の遺伝病細胞バンクの確立が極めて重要であることを意味している。

本研究では、特に再生不良性貧血症を中心に研究資源化を目指してきたが、再生不良性貧血は病因の面からも極めて異質性の高い疾患である。白血病などの先行病変となる確率が高く、その病因解析に期待されるころは大きい。また、その中でFAは最低8種類の遺伝子によって制御されていることが分かっており、そのうち遺伝子が同定されているものはA群(FANCA)、C群(FANCC)、G群(XRCC9)のみである。しかも、これらの遺伝子は既知の他のどの遺伝子とも相同性がなく、また相互にも類似性がないオアフアン遺伝子である。その機能もよく分かっておらず、未知の情報伝達系を構成している可能性も指摘されており、医学的にも生命科学の上からも注目されている。研究戦略上からもこれらの細胞株の有用性は高いと考えられる。さらに、研究の中から、新しい遺伝疾患を示唆する患者も見出されてきた。

2. 細胞供給による研究支援

JCRB細胞バンクの細胞供給事業がHS財団への移行に際し、遺伝病細胞を含めたヒト2倍体細胞株は、その管理の難しさから、管理・供給が従来通り提携機関に残された。そして提携機関では、管理・供給とともに資源開発も同時に行ってきた。しかし、以前は年間約100件の利用があったものが最近では年間20数件である。この利用件数の減少は、従来JCRBニューズレターが発行され、特に文部省科学研究費特定領域研究「がん」の研究者に配布されていたものが、ホームページに変わったことにより、研究者の目に止まりにくくなったことが理由として考えられる。有効な活用のためにも、より積極的なバンク情報が期待される。

3. インフォームド・コンセント

ヒト細胞を研究用に使用するに当たって、提供者のインフォームド・コンセントは重要な問題である。しかし、実際面への導入に当たっては、さらに検討を重

ねなければならない問題が多い。現在、以下のような観点から検討を行っている。

- (1) 現在では、細胞の収集の多くは、単純な研究用ではなく、疾患の診断のために依頼された組織の残りから細胞株が樹立されており、供給細胞株には患者の個人情報に含まれていないこと、また用途は純粋に研究のみであり、そのため無償であること。
- (2) 網膜芽細胞腫患者を調査してきた過程で、診断に使った細胞の残りを、疾患の病因解明と治療・予防法の開発の基礎的研究に使用することを条件に患者の両親からインフォームド・コンセントを担当医に取ってもらうことにしたが、必要性に関しては担当医でも意見の分かれるところであり、また遺伝の問題が表面化し、患者の家庭に問題が起こるなど、不測の難しい問題があることが分かった。
- (3) 再生不良性貧血患者の場合にも、担当医にインフォームド・コンセントを要求すると、診断検査に余分な時間がかかり、細胞の入手が極めて制限されることになる。研究資源としてのニーズと患者を担当する臨床医のニーズとの間に認識のずれがある。
- (4) 単純な研究目的でなく、診断に使用した細胞の一部を研究に利用することの可否については議論のあるところであるが、現在は利用目的が、純粋に研究目的であり、しかもその疾患の解明、診断、治療、予防の研究に関するものである限り、個人情報が伴わない範囲という前提の下にインフォームド・コンセント取っていない。
- (5) しかし、ヒト細胞バンクを事業として確立するためには、インフォームド・コンセントは必要と考えられ、京都大学医学部倫理委員会遺伝委員会での検討を予定している。

E. 結論

高度先端医療の基盤としてヒト変異遺伝病細胞の研究資源化は重要である。この研究では、ヒトの高発がん性遺伝病を中心として患者の細胞を株化し、その中から代表的な疾患に関して細胞バンクに登録し、研究者の要望に従って細胞を供給してきた。それと同時に、新しい細胞株の開発に努め、小児再生不良性貧血を対象に、その中から遺伝性の細胞特性を示すものを同定

した。69家系について調べ、24家系で28名のFA患者が確認され、5家系でBSの臨床症状とは異なる高SCE患者が見出された。FA患者でFANCA遺伝子、FANCC遺伝子の突然変異を調べたところ、15例中13例の患者でFANCA遺伝子の突然変異が確認された。FANCC遺伝子の突然変異は調べた限り検出されなかった。また、AT患者10例でATM遺伝子の突然変異を調べ、10例中9例の患者で突然変異が検出された。BS患者3例でBLM遺伝子の突然変異を調べ、何れの患者でもBLM遺伝子に突然変異が観察された。これらFANCA遺伝子、ATM遺伝子、BLM遺伝子に観察された突然変異は、いずれも欧米患者で報告されている突然変異とは異なる新規の突然変異であり、日本人固有のものであった。このことも、我が国における遺伝子関連医学の推進のための遺伝病細胞の研究資源化には日本人患者の細胞による細胞バンクの確立の重要性和必要性を裏付けるものである。ヒト細胞の研究資源化にはインフォームド・コンセントが重要であるが、現在、その問題点等を念頭に検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sonoda, E., Sasaki, M. S., Buerstedde, J., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y. and Takeda, S.: Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.*, 17:598-608, 1998.
2. Sasaki, M. S., Takatsuji, T. and Ejima, Y.: The F value cannot be ruled out as a chromosomal fingerprint of radiation quality. *Radiation Res.*, 150:253-258, 1998.
3. Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. and Takeda, S.: Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.*, 17:5497-5508, 1998.
4. Ejima, Y. and Sasaki, M. S.: Mutations of the ATM gene detected in Japanese ataxia-telangiectasia patients: possible preponderance of the two founder mutations 4612del165 and 7883del15. *Human Genet.*, 102:403-408, 1998.
5. Nakamura, N., Tucker, J. D., Bauchinger, M., Littlefield, L. G., Lloyd, D. C., Preston, R. J., Sasaki, M. S., Awa, A. A. and Wolff,

S.: F values as cytogenetic fingerprints of prior exposure to different radiation qualities: Prediction, reality and future. *Radiation Res.*, 150:492-494, 1998.

6. Kanoe, H., Nakayama, T., Murakami, H., Hosaka, T., Yamamoto, H., Nakashima, Y., Tsuboyama, T., Nakamura, T., Sasaki, M. S. and Toguchida, J.: Amplification of the CDK4 gene in sarcomas: Tumor specificity and relationship with the RB gene mutation. *Anticancer Res.*, 18:2317-2322, 1998.
7. Tawa, R., Kimura, Y., Komura, J.-I., Miyamura, Y., Kurishita, A., Sasaki, M. S., Sakurai, H. And Ono, T.: Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues. *J. Rad. Res.*, 39:271-278, 1998.
8. Kanoe, H., Nakayama, T., Hosaka, T., Murakami, H., Yamamoto, H., Nakashima, Y., Tsuboyama, T., Nakamura, T., Ron, D., Sasaki, M. S. and Toguchida, J.: Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of translin and topoisomerase II in the process of translocation. *Oncogene*, 18: 721-729, 1999.
9. 佐々木正夫:放射線感受性の解析—A TM遺伝子を中心に。癌の臨床, 45:96-99, 1999.

2. 学会発表

1. Sasaki, M. S., Shimizu, T., Kato, T. Jr., Tachibana, A. And Ejima, Y.: Signaling mechanism and gene regulation of cellular adaptive response to low doses of ionizing radiation. The 4th AACR-JCA Joint Conference, February 18-21, 1998, Hawaii.

2. Sasaki, M. S.: Experimental evidence for the F-value as a chromosomal fingerprint of the quality of radiation. RERF Mini Workshop on the F-value., February 24, 1998, Hiroshima.

3. Sasaki, M. S., Tachibana, A., Kato, T., Ejima, Y., Shimizu, T. and Yamada, T.: Chromosome instability and mutations of FA genes in Japanese Fanconi anemia. The 4th Radiation Biology Center International Symposium, October, 1998, Kyoto.

4. 佐々木正夫:放射線感受性の解析: A TM遺伝子を中心に。第57回日本癌学会 総会、1998年9-10月、横浜市。

5. Sasaki, M. S.: The F-value as a chromosomal fingerprint for the quality of radiation. The 4th Hiroshima International Symposium on the Biological Effects of High LET radiation. October, 1998, Hiroshima.

6. 佐々木正夫:放射線発がん突然変異遺伝子プール。日本放射線影響学会第41回大会、1998年12月、長崎市。

7. 楊力春・立花章・江島洋介・佐々木正夫:マウス培養細胞におけるX線誘発トランスフォーメーションとp53遺伝子の可逆的発現抑制。日本放射線影響学会第41回大会、1998年12月、長崎市。

8. Sasaki, M. S.: Perspectives in the use of microbeam in radiobiology. 日本放射線影響学会第41回大会、1998年12月、長崎市。

G. 知的所有権の取得状況

該当無し。

正常2倍体細胞特にヒト血管内皮細胞の新たな培養法の開発に関する研究

分担研究者 加治 和彦 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科・老化制御研究室 教授

研究要旨: ヒト臍帯血管内皮細胞は、ゼラチンをコートした培養皿に、MCDB-104を基礎培養液に10%胎児ウシ血清、ECGF(50~100ng/ml)、EGF(10ng/ml)さらにヘパリン(10~100ug/ml)を添加した培養液で培養すると、著しい細胞増殖が得られる。この細胞はECGF飢餓でアポトーシスが誘導される。ECGF飢餓が起らないようにECGFを十分供給し、細胞集団がコンフルエントになる前に継代培養を続けると、この細胞の最長寿命と思われる55~125PDL(細胞集団倍加数)を引き出すことができる。この培養条件は、ヒトの臍帯以外の組織の大血管の内皮細胞にも適用できる。TNFやIL-1がヒト内皮細胞の細胞寿命に影響を及ぼす。

A. 研究目的

血管内皮細胞は、個体を維持するうえで極めて重要な役割を担っている。老化に伴い血管系が関与する疾病が増加する。ヒト血管内皮細胞は培養が難しく、また高価な成長因子をその培養維持に加えなくてはならない。そこで容易で安価な培養法の確立を試みた。

B. 研究方法

ヒト臍帯を血管の組織材料に用いた。基礎培養液、培養皿は市販品を使用し、内皮細胞成長因子(ECGF)は仔ウシ脳から調製した(後述)。

C. 研究結果

1. ヒト臍帯静脈内皮細胞の初代培養

臍帯はヒトの血管内皮細胞を単離する上で便利であり、また材料を得やすい。この器官は、2本の動脈と1本の静脈が長軸に走っており、静脈が特に太いので内皮細胞を単離するのに適している。また、他の組織の場合と異なってこの血管は枝分かれをしていない。トリプシン-EDTA溶液を臍帯静脈に注ぎ込み、両端を注射筒に接続する(図1)。静脈の内壁の内皮細胞は、この消化酵素の働きで剥がれてくる。この細胞を回収して培養する。約2時間の操作で簡単にヒトの臍帯静脈内皮細胞を単離し培養することができる。

内皮細胞は他の多くの細胞とは異なり、培養皿の上で多層にはならず、一層になって増えてくる。ヒトの内皮細胞はウシやラットのそれとは異なり、典型的な敷石状の集合模様を呈さない。しかし血液凝固第8関連因子で間接蛍光染色すると、染色された分泌顆粒がたくさん細胞中に見られるので内皮細胞であると確認

できる。このようにしてほぼ100%が内皮細胞からなる細胞集団を得た。

2. ヒト内皮細胞の培養条件

ヒト以外の動物の内皮細胞は比較的簡単に増殖させることができる。ウシやブタの内皮細胞は、MEMに10%の胎児ウシ血清(FBS)を加えた培養液で簡単に増える。ヒトの内皮細胞は、この条件では全く増殖しない。細胞の培養条件を決めるために、基礎培養液、増殖因子、それに培養基の検討を試みた。種々の培養条件で細胞を培養皿に蒔き、コロニーの形成を観察した。その結果、我々は図2に示す培養条件を確立した。基礎培養液に、F-12から導かれたMCDB-104を選び、10%FBSを加えさらに、増殖因子としてECGFを含むカクテルを添加した。培養皿をゼラチンでコートする。この条件でHUVECは約20時間ごとに分裂し、継代培養も容易で、55から125の細胞集団倍加(PDL)を行なった。培養の鍵はECGFで、これは我々が新生ウシ脳から部分精製した。酸性FGF(aFGF)と塩基性FGF(bFGF)の混合物である。

3. 内皮細胞成長因子(ECGF)の部分精製

凍結仔ウシ脳を出発材料とする。5個の脳(1kg)をホモジナイズし、硫酸アンモニウム存在下pH4.5でECGFを抽出する(図3)。これを硫酸分画し、得られたECGFフラクションをCM-セファデクスにかける。0.1Mリン酸緩衝液で吸着させた後、ECGFを0.5MNaClで溶出する。これを粗ECGFとして用いることも可能である。次にヘパリンカラムにより分画する。Pharmaciaのheparin-Sepharose CL-6Bを15ml内容積のカラムに10ml詰める。粗ECGF分画を通すことにより、

ECGFはヘパリンに吸着される。NaCl 2MでECGFを溶出する。この分画は2種のECGF(aFGF, bFGF)とその他の未知の蛋白質をふくむ。これを蛋白低吸着性のフィルターでフィルター滅菌し、ポリプロピレン性の容器に分注し、凍結乾燥する。凍結乾燥したECGFは-20°Cで1年以上安定である。全行程に要する時間は10日以内である。このECGFは、市販のECGFよりヒト内皮細胞の増殖を促進した。

4.細胞の継代培養と細胞寿命

コンフルエントに増殖した細胞集団派直ちに継代培養する必要がある。ヒト内皮細胞はコンフルエントのまま維持すると、細胞は数日以内に培養液中に浮き上がり、新たな細胞分裂による補給も不十分で培養系全体が一見不健康になる。これはECGF飢餓によるプログラム細胞死(アポトーシス;後述)による。

ヒトの線維芽細胞や平滑筋細胞と同様に、内皮細胞も細胞集団倍加数が有限である。すなわち細胞集団は有限回の分裂の後、分裂能力を失う。その最終細胞集団倍加数(PDL)は、50から120PDLであった(表1)。この値はヒト線維芽細胞のそれと同様のレベルであった。内皮細胞は老化するにつれて大きくなり、細胞同士の配向性が崩れてくる。表1の各ヒト内皮細胞の細胞老化のパターンを図4に示す。ここに見るように、細胞は加齢の途中で増殖能を回復しているようにみえることがしばしばある。このときは細胞はいずれも小さく、若返っているようにみえる。しかし最終的には老化する。このように細胞集団ごとに増殖能が加齢に伴い変化することは、線維芽細胞では観察されていない。この現象の解析は、今後に残された問題である。ヒト臍帯静脈内皮細胞は、核の2倍性の安定性が悪く、細胞寿命が50%程進行したところで細胞の大部分が多倍数性になるとの報告もあり、加齢パターンの不安定性と関連しているのかも知れない。腫瘍壊死因子(TNF)は内皮細胞の増殖を阻害するとともに、細胞寿命を濃度依存的に短縮した。TNFによって内皮細胞のIL-1産生が高まったので、TNFによる寿命短縮はIL-1を介している可能性がある。

5.ヒト内皮細胞のプログラム死(アポトーシス)

ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖にはECGFが必須であった。ECGFの存在のもとで増殖している内皮細胞の培養系からECGFを除くと、細胞は数時間後には培養皿の底面から浮かび上がり始め、次第に小さな破片に分かれて死んでしまう。2~4日たつと、細胞の90%以上は培養系から消失する。しかしECGFを除くと同時にシクロヘキシミドを加えると、この細胞死が著しく阻止された。これは、ECGF(-)による細胞死には、蛋白合成

が必要であることを示している。ECGF除去によって浮かび上がった直後の細胞の核のDNAは、ヌクレオソーム単位の断片化が確認され、細胞にアポトーシスが誘導されたことが分かった。したがって、内皮細胞にアポトーシスを誘導させることなく、最終寿命まで培養するか為には、ECGF飢餓を如何に防ぐかが重要である。表1の実験では、細胞を 1×10^3 cells/cm²の低細胞密度でまきこみ、毎週継代している。継代時点で細胞はコンフルエントになったばかりか、あるいは対数増殖期の後半であった。

D. 考察

ヒト血管内皮細胞の容易で安価な培養法を確立した。この課程で幾つかの問題点が浮かび上がってきた。

ヒト血管の組織材料として臍帯を選んだ。この組織は入手が比較的容易であり、その血管も例外的に枝分かれしていないのでその特性を利用して、内皮細胞のみからなる細胞集団を単離することが可能であった。この細胞の生存維持さらに増殖条件を検討し、ヒト大血管系の内皮細胞の培養法の基本的問題を解決した。臍帯は発生過程に必要な特殊な組織であり、果たして大動脈や肺動脈、冠状動脈などの内皮細胞とどのような差異があるか、今後検討の必要がある。しかし肺動脈や冠状動脈の内皮細胞もその増殖にECGFが必須であることが予備実験から示されているので、臍帯静脈内皮細胞はこれらの細胞のモデル細胞として使用可能であろう。成体の血管は、枝分かれしているので内皮細胞の純培養にはそのための特殊な工夫が必要であろう。特に後述するように、血管平滑筋細胞の混在が問題である。

ヒト内皮細胞の生存と増殖にECGFが必要である。今回ECGFは、仔ウシ脳から単離調製された。内皮細胞の成長因子がなぜ脳に存在するのかは現在不明である。胎児ウシ血清はヒト内皮細胞の増殖能を示さないので、ECGF脳から血液中に移行することはない。ヒトの成体において、ECGFを内皮細胞に供給する組織あるいは細胞は何であろうか?血管を構成する細胞のうち、内皮細胞に近隣する平滑筋細胞がECGFの供給細胞である可能性が高い。このことから、内皮細胞の性質を検討する上で、平滑筋細胞の混在を回避しなければならない。これに関しては他の可能性もある。ウシの内皮細胞はECGFがなくても増殖する。ウシの内皮細胞を培養した馴化培養液は、ヒトの内皮細胞を増殖させた。この増殖因子の本体はbFGFであった。すなわち、ウシの内皮細胞はみずからbFGFを産生し、それによりオートクリン的に増殖刺激を受け増殖する。なぜヒト内皮細胞はbFGFを分泌できないのであろうか?今回の培養法を改善することにより、ヒト内皮細胞みずからECGFを産