

総括研究報告書

遺伝子工学的手法による病態モデル培養細胞系の作出とその
標準化に関する研究

主任研究者 田中憲穂 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所 変異・遺伝部 室長

研究要旨

我々は、ヒトゲノム解析や遺伝性疾患の病因解明のための研究資材として、遺伝子工学的手法を用いた病態モデル培養細胞系の作出と標準化に取り組んできた。

(1) これまでに、単一ヒト染色体ヒト染色体導入雑種クローンを行ってきたが、さらに解析の資材として有用な、げっ歯類単一染色体雑種細胞の作成方法の検討を行い、新たにマウス染色体導入チャイニーズハムスター雑種細胞クローンの作成を行った。(2) トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス等の遺伝子改変動物に由来する細胞の研究資源化を目的として、細胞系の作成・収集を開始し、コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスからの細胞系作成と性状解析を行った。(3) ニワトリ DT40 細胞中で遺伝子相同組み替えを利用したヒト染色体改変(Chromosome surgery)の基礎的な技術の検討を行った。この手法により、現在の分子生物学的な方法では扱うことができない巨大 DNA 配列を、塩基レベルの精度で操作可能にする利点がある。(4) これまでに PCR 法、FISH 法を用いた細胞株の遺伝的性状解析手法の開発・改良を行ってきたが、本年度は貴重な細胞株や、胚など分析に多数の細胞を得られない場合を想定した分析手法の検討を行い、ごく少数の細胞や胚で遺伝的性状を明らかにする方法を開発した

分担研究者

久郷 裕之 鳥取大学医学部 助手
加藤 秀樹 浜松医科大学医学部 附属動物
実験施設

染色体を有するマウス細胞株の作成及び品質管理を行い、HSRRB(JCRB)細胞バンクを通じて、一般の研究者への配布を行ってきた。昨年度より、新たにげっ歯類単一染色体ライブラリーの作成を開始した。げっ歯類単一染色体を用いることにより、染色体導入後、目的とするヒトの癌や疾患関連遺伝子のマッピングが容易であるという利点があるが、これまでその樹立に関しては殆ど報告が無い。本研究は、げっ歯類の単一染色体雑種細胞を樹立し、性状解析および標準化を行い、研究資源として利用することを目的とした。

A. 研究目的

1) 薬剤耐性マーカー遺伝子で標識された外来染色体を有する雑種細胞株は、劣性遺伝病の原因遺伝子や、癌遺伝子のマッピングや染色体特異的 DNA マーカーの作製等に利用されており、ヒトゲノム解析の資材として極めて重要である。我々は、これまでに、Y 染色体を除く全てのヒト単一染

2)ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株は、疾患関連遺伝子等の細胞レベルでの機能解析に非常に有用である。本年度より、新たに遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の開発、収集を開始した。その一環として、コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスより繊維芽細胞を単離し、その性状解析を行った。

3) ニワトリ Pre-B 細胞株 DT40 は極めて高頻度に相同組み換えを起こすことが知られている。したがってこの DT40 細胞中でヒト染色体を改変することが可能である。本研究の目的は A9 細胞からヒト単一染色体を DT40 細胞に再導入し、単一ヒト染色体を含む DT40 細胞ライブラリーを作製することにより、遺伝子マッピングや機能解析、さらには染色体高次構造解析の資材とする

4) 株化細胞や、ミュータント系統、トランスジェニックおよびノックアウト系統などの胚の凍結保存バンクは、貴重な遺伝資源を保存する上で重要な役割を果たしている。しかしながら、運用の際に混入や取り違え事故などが予想され、未然に防ぐ方法を講じる必要がある。これまでに、PCR 法や FISH を用いて細胞の遺伝的性状を明らかにする手法を開発してきたが、本年度は、貴重な細胞株や、特に胚などで検査に十分な細胞数が得られない事態を想定し、少量の細胞を対象とした検査手法と、最小必要細胞数の検討を行った。

B. 研究方法

1.げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作製

染色体供与細胞には、マウス BALB/c 系統と C57 BL/6 系統を交配して得た雑種胎仔を用い、15日齢胎仔2腹から合計15個体分、繊維芽細胞を初代培養した。薬剤耐性遺伝子である neo 遺伝子と蛍光タンパク質である GFP(Green Fluorescent Protein)遺伝子の融合遺伝子を発現する pQBI-pgk を、リン酸カルシウム法およびリポフェクション法を用いて薬剤耐性遺伝子を持つ発

現ベクターを導入し、染色体供与細胞とした。本年度は、チャイニーズハムスター CHO-K1 細胞および、インドホエジカ FM7 細胞を受容細胞として用いた。また、融合法の見直しを行い、条件設定を行った。本年度は、薬剤耐性マーカーを導入したマウス初代繊維芽細胞を直接コロセミド処理することにより、微小核融合法を行った。得られたクローンは、IAP1 (5'-TCCTGAGATGTAAG-CAATA-3')プライマーを用いたマウス反復配列間 PCR を行いマウス染色体の保持率を調べた。また、キナクリン分染法によって導入マウス染色体の同定を試みた。また、マウス Cot-1 DNA プローブおよびマウスゲノム DNA を超音波処理して作製した全マウスプローブを用いた蛍光 in situ hybridization 法(FISH)によって、マウス単一染色体雑種クローンの導入マウス染色体の検出を試みた。

2.コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

コネクシン 43 遺伝子(Cx 43)を片アリルおよび両アリルをノックアウトしたマウス胎児より DNA を抽出し、Cx43 内に設定したプライマを用いた PCR により、欠損を確認した。欠損が確認された胎児を細切後、トリプシン処理しメッシュを通した細胞をディッシュに播種した。1ないし 3×10^5 細胞を3日おきに 6cm ディッシュに継代することにより、細胞系を樹立した。また、コントロールとして、野生型のマウス胎児より、同じ手法で細胞系を作成した。これらの細胞株について、Cx43 遺伝子の発現量と、ギャップ結合コミュニケーション(GJIC)の相関、細胞の増殖性の相関を検討した。

3.ニワトリ DT40 細胞を宿主としたヒト単一染色体ライブラリー細胞の作製

ポリ-L-リジンでコーティングした6穴プレートに、 1×10^7 cells/well の DT40 細胞を播いた。この DT40 細胞をプレート底部に張り付けるためにプレ

ートを 1,200rpm, 3 分間遠心を行った。2 時間、37°Cのインキュベータ内で静置後、血清を含まない DMEM で 2 回洗浄した。上清の DMEM を静かに除去し、フィトヘムアグルチニン (PHA, 50 μ g/ml) を含む無血清培養液 2ml に、通常の方法でヒト染色体を含むマウス A9 細胞より調製した微小核細胞の懸濁液を加え、1,200 rpm, 3 分間の遠心を行った。上清を除去し、47% ポリエチレングリコール (PEG) 溶液 3ml を加え、1 分間静置した。PEG 溶液を吸い取り、無血清培地で 4-5 回洗浄し、その後、血清を含む培地で 1 日間培養する。ピペティングにより細胞を分散し、24 穴プレートに播種し、選択培地に交換し、約 3 週間後に耐性クローンを分離した。得られた細胞クローンは、Alu-PCR banding pattern および染色体解析により導入染色体の状態を確認した。

4. 培養細胞株の種および系統の同定と識別

培養細胞株のモデルとして、マウスの顎下リンパ節より採取したリンパ球を用いた。また、マウス胚については CB6F1 マウスの精子および卵子を MWM 培地内で体外受精したものを用いた。

DNA 調製法の検討は4種類の調整法、すなわち、標準法(プロテナーゼ K/フェノール/クロロホルム抽出法)、A 社キット、B 社キットおよび核 DNA 簡易抽出法についてリンパ球を使って行った。核 DNA 簡易抽出法は我々が考案したもので、プロトコールは下記の通りである。リンパ球細胞を 1×10^4 個/ml に調整後 各サンプルが規定細胞数 (5~640 個/ml) になるように調整した。次にこれら細胞に Proteinase K (10mg/ml) を含む Lysis buffer (50mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH8.4), 0.1% Triton X) を加えて 20 分間細胞融解を行い、PCR の template とした。

昨年度までの研究結果で有効性が確認されたマイクロサテライトマーカーを用いて常法に従い PCR を行った。PCR プロダクトはアガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を

行って検出した。

C. 研究結果

1. げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作製

昨年度は、得られた 32 個のクローンについては、導入マウス染色体の断片化、脱落が認められた。そのため、本年度は染色体脱落の原因究明と解決を主要な目的とし、受容細胞として実績のある CHO-K1 細胞と、染色体数が少なく導入染色体の同定が容易なインドホエジカ ($2n=6$) に由来する FM7 細胞を用い、それぞれ微小核調製と細胞融合の至適条件を検討した。

また、染色体供与細胞からの微小核調製法と、融合法の見直しを行った初代マウス繊維芽細胞をコルセミド処理することによって、微小核を形成させる方法を用いた。この手法を用いることにより、従来、3ヶ月以上を要していた微小核融合クローンの作成期間を大幅に短縮し、約1ヶ月半で単離が可能になった。

これらの新しい手法を用いて、現在までに、CHO-K1 細胞を受容細胞に用いたクローンが 67 クローン得られ、反復配列間 PCR、核型分析、染色体 in situ hybridization を用いて、導入された染色体の同定が進行中である。また、FM7 細胞を受容細胞に用いたクローンも現在作成中である

2. コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

Cx43 欠損個体より作成した細胞株では、ダイトランスファー法によって GJIC の消失が認められ、同遺伝子が GJIC 形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。継代開始より約 30 日頃より細胞増殖が回復し始め、約 50 日頃から安定した増殖が得られたので、集団倍加時間を算出したところ、欠損、ヘテロ、野生型の順に細胞増殖が遅くなり、Cx43 と細胞増殖の関連性が示唆された。そこで、低血清および TPA、EGF 添加による細胞増殖への影響を調べた結果、3 種類の細胞系ともに

高濃度血清および EGF 添加により細胞増殖の亢進が認められたが、野生型において比較的強い増殖亢進が認められた。

2. ニワトリ DT 細胞を宿主としたヒト単一染色体ライブラリー細胞の作製

本研究に用いた DT40 細胞は suspension type の細胞であることから、従来の標準的な微小核細胞融合法に加えて、ポリ-L-リジンでコーティングした 6 穴プレートに DT 細胞を播き、遠心によって細胞をはりつけた後に微小核融合を行う方法を昨年度までに確立した。本年度は、さらに PHA 処理、ポリエチレングリコールによる細胞融合条件に改良を加え、DT40 細胞にヒト単一染色体を安定に効率よく導入する条件を確認できた。それらの手法を用いて、新たに完全長のヒト 5 番、6 番、7 番、14 番、21 番、22 番染色体を保持する雑種細胞クローンを作製し、前年度と合わせ 9 種類の染色体を各々保持する DT40 細胞が得られた。

3. 培養細胞株の種および系統の同定と識別

昨年度までに、PCR 法や FISH を用いた、培養細胞株の遺伝的性状の検査手法開発と、その標準化を行ってきたが、本年度は、貴重な細胞株や胚などから、少数の細胞で遺伝的性状を検査する手法を検討した。新たに開発した DNA 抽出方法と、これまで検討してきたマイクロサテライトマーカーの PCR 法を組み合わせ、リンパ球をモデルとした培養細胞株の条件検討では、1 個のマイクロサテライトマーカーにつき、40 細胞で検出可能なことが示された。また、胚については発生ステージにもよるが、1 個から 10 個程度の胚で検出できることが示された

D. 考察

1. げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作製

外来の単一染色体や、その一部を保持する雑種細胞クローンは、劣性遺伝病原因遺伝子やがん

関連遺伝子のマッピングやクローニングのための重要な資材となる。現在までに、ヒト単一染色体については、Y 染色体を除く全ての染色体をカバーするライブラリーの作成を完了したが、ヒト疾患関連遺伝子のクローニングを目的とする場合、ヒト以外の動物の由来する染色体を導入することにより、導入された染色体領域を容易に同定することが可能になる。中でも、遺伝的性状がよく研究されているげっ歯類を材料とした単一染色体雑種ライブラリーは研究資材として、劣性遺伝病原因遺伝子やがん関連遺伝子の研究に非常に役立つものと考えられる

しかしながら、ヒト以外の単一染色体ライブラリー細胞は、少数の株が作製されているにすぎず、その作製技法も確立されていない。そこで、本年度は、昨年度に引き続き、げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作製を行った。昨年度得られた雑種細胞クローンについては、導入染色体の脱落、断片化が高頻度に認められたが、これは、おそらく受容細胞の細胞周期との同期が不完全であるためと考えられる。そのため、受容細胞の再検討と、なるべく短期間で雑種細胞クローンを作製して脱落・断片化を防ぐ方法を検討した。

受容細胞については、核型分析の効率化が期待されるインドホエジカ FM7 細胞を入手し、微小核の形成条件、単離法を確立した。また、染色体供与細胞より、直接微小核を調製する手法を検討し、効率的な単一染色体ライブラリー細胞の作成を可能にした。これらの技術を用いて、マウス系統間雑種より得た初代繊維芽細胞を材料として単一染色体ライブラリー細胞の作製技術の検討を行い、新たに 67 株のクローンを得ることができた。

2. コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

コネクシンはギャップ結合コミュニケーション (GJIC) を担うタンパク質ファミリーであり、多くのがん細胞での GJIC 能の低下、TPA 等のプロモータ

による GJIC の阻害、Cx 遺伝子の導入によるがん細胞の細胞増殖抑制等の結果より、発がん過程において重要な役割を果たしていると考えられている。Cx43 は主に心臓および繊維芽細胞で発現しており、近年、この遺伝子のノックアウトマウスが作製された。そこで、同ノックアウトマウスに由来する培養細胞系は、がんの発現機構の研究に有用と考え、初代繊維芽細胞株を作製した。作製された細胞株の性状解析を行った結果、これまでのコネクシン遺伝子研究で得られている知見や、分子レベルの解析より、期待されたのと同様の挙動を示し、コネクシンの細胞生物学的研究や発がん過程の研究に有用なものであることが示唆された。

3. ニワトリ DT 細胞を宿主としたヒト単一染色体ライブラリー細胞の作製

本年度においては、DT40 細胞にヒト単一染色体を安定に効率よく導入する条件を確認できたと考えられる。さらに、前年度と合わせ 9 種類の染色体を各々保持する DT40 細胞を作製した。これらの細胞クローンは、DT40 細胞の高頻度相同組み換え能を利用し、ヒト染色体の改変の場を提供するものであり、ヒト人工染色体の作製やヒト染色体に欠失や転座を誘発させ、その機能解析を行うことにより疾病原因遺伝子をマッピングするための有用な資材になると考えられる。今後は、さらに他の染色体の導入を試み、単一染色体ライブラリーの完成を目指す。

4. 培養細胞株の種および系統の同定と識別

リンパ球および胚からの DNA 調製に最も適した方法をマウスリンパ球を用い検討した結果、我々が開発した核 DNA 簡易抽出法が他の方法よりも少ない細胞数で PCR プロダクトのバンドを認めることができた。

核 DNA 簡易抽出法により 1 個の桑実期胚から少なくとも 1 種類のマイクロサテライトマーカーの検出に十分なテンプレート DNA 量を得ることが出

来た。実際に、簡易法で調製した DNA template を材料にして、クリティカルサブセット(5 種類のマイクロサテライトマーカー)を用いた胚の遺伝的モニタリングを行うことができた。動物種の鑑別に必要なリボソーム DNA や性別判定に必要なマーカーについても高感度の染色法も組み合わせることによって検出できる可能性が示された。

桑実期胚ではプライマーの種類により検出可能な胚の数が異なっていたことからプライマーにより検出感度が異なることが示唆され、今後、モニタリングに適したプライマーを選択していくことによって、効率的に遺伝的モニタリングを実施できることが示唆された。

E. 結論

1. げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作成

昨年度に引き続き、親起源が明らかなげっ歯類単一染色体ライブラリーの作製を行った。昨年度に得られたクローンには導入染色体の断片化や脱落が生じていたため、受容細胞の検討、融合法の改良を行い、67 株の候補クローンを得ることができた。

2. コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

これまでの研究によって、発がんや細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられるコネクシン 43 遺伝子をノックアウトしたマウスより、初代繊維芽細胞株を作製した。作製された細胞株の性状解析を行った結果、コネクシンの細胞生物学的研究や発がん課程の研究に有用なものであることが示唆された。

3. ニワトリ DT 細胞を宿主としたヒト単一染色体ライブラリー細胞の作製

DT40 細胞にヒト単一染色体を安定に効率よく導入する条件を確立した。ヒト 5 番、6 番、7 番、14 番、21 番、22 番染色体を各々を完全に保持する

DT40 細胞を樹立した。

4. 培養細胞株の種および系統の同定と識別

リンパ球をモデルとした培養細胞株の条件検討では、我々が開発した核 DNA 簡易抽出法がもつとも少ない細胞数でマイクロサテライトマーカーを検出でき、1 個のマーカーにつき、40 細胞で検出可能なことが示された。また、胚については発生ステージにもよるが、1 個から 10 個程度の胚で検出できることが示された。今後、さらに最適なプライマーを用いることにより、効率的に少数細胞による遺伝的モニタリングを実施できることが示唆された。

F. 引用文献

Atchley, W. and Fitch, W., Gene trees and the origin of inbred strains of mice., *Science*, Vol. 555, 554-558, 1991.

Kugoh, H., Hashiba, H., Shimizu, M. and Oshimura, M., Suggestive evidence for functionally distinct, tumor suppressor genes on chromosomes 1 and 11 for a human fibrosarcoma cell line, HT1080, *Oncogene*, Vol. 5, 1637-1644, 1990.

Wood, W. and Hamm, D., Survey of genomic repeat sequence-PCRs that detect differences between inbred mouse strains., *Genet. Res. Comb.*, Vol. 65, 151-155, 1995.

Lee, J., Koi, M., Stanbridge, E., Oshimura, M., Kumamoto, A., Feinberg, A., Simple purification of human chromosomes to homogeneity using muntjac hybrid cells., *Nature genet.*, Vol. 7, 29-33, 1994.

Meguro, M., Mitsuya, K., Sui, H., Shigenami, K.,

Kugoh, H., Nakao, M., Oshimura, M., Evidence for uniparental, paternal expression of the human GABAA receptor subunit genes, using microcell-mediated chromosome transfer., *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 6, 2127-2133, 1997.

Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M., Ishida, I., Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice, *Nature Genet.*, Vol. 16, 133-143, 1997

Katoh, H., Muguruma, K., Watanabe, Y., Ishikawa, S., Ebukuro, M., Nomura, T., Nakagawa, Y., Tanaka, N Genetic quality testing of cell lines derived from laboratory rats by polymerase chain reaction., *Transplant Proceedings*, Vol. 29, 1709-1712, 1997.

G. 研究発表

論文発表

Katoh, M., Katoh, M., Kameyama, M., Kugoh, H., Shimizu, M. and Oshimura, M. A repressor function for telomerase activity in telomerase-negative immortal cells. *Mol. Carcinog.*, 21: 17-25, 1998

Uejima H, Shinohara T, Nakayama Y, Kugoh H., Oshimura M. Mapping a novel cellular-senescence gene to human chromosome 2q37 by irradiation microcell-mediated chromosome transfer. *Mol Carcinog*, 22: 34-45, 1998

Mitsuya, K., Meguro, M., Sui, H., Schulz, T. C., Kugoh, H., Hamada, H. and Oshimura, M. Epigenetic reprogramming of the human H19 gene

in mouse embryonic cells does not erase the primary parental imprint. *Genes Cells*, 3: 245-255, 1998

Tanaka, H., Shimizu, M., Horikawa, I., Kugoh, H., Yokota, J., Barrett, J. C. and Oshimura, M. Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 23: 123-133, 1998

Nihei, N., Ohta, S., Kuramochi, H., Kugoh, H., Oshimura, M., Barrett, J. C., Isaacs, J. T., Igarashi, T., Ito, T., Masai, M., Ichikawa, Y. and Ichikawa, T. Metastasis suppressor gene(s) for rat prostate cancer on the long arm of human chromosome 7. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 24: 1-8, 1998

加藤秀樹: マウス、ラットの遺伝子地図、*アニテック* 10(2):67-74, 1998.

2. 学会発表

山影康次、大森泰文、Marie-Pierre Cros、田中憲穂、山崎洋、マウス皮膚発がんのプロモーション課程におけるコネキシン43の役割について、日本環境変異原学会第27回大会、1998

分担研究報告書

ヒト染色体ライブラリーの品質検査と細胞系の確立

分担研究者 田中 憲穂 食品薬品安全センター 細胞毒性学研究室長

研究要旨

我々は、これまでにヒト単一染色体ライブラリー細胞の作成に取り組み、Y染色体を除く全てのヒト単一染色体を有するマウス細胞株を作成し、HSRRB(JCRB)細胞バンクを通じて、一般の研究者への配布を行ってきた。今年度は、昨年度までに確立した手法を用いて、研究資材として有用性の高いマウス単一染色体ライブラリー細胞の作成を行い、新たに67個のクローンを得た。また、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株は、疾患関連遺伝子等の細胞レベルでの機能解析に非常に有用である。本年度より、新たに遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の開発、収集を開始した。その一環として、コネクシン43遺伝子ノックアウトマウスより繊維芽細胞を単離し、その性状解析を行った。

A. 研究目的

薬剤耐性マーカー遺伝子で標識された外来染色体を有する雑種細胞株は、劣性遺伝病の原因遺伝子や、癌遺伝子のマッピングや染色体特異的DNAマーカーの作製等に利用されており、ヒトゲノム解析の資材として極めて重要である。特に、これらの細胞を用いた微小核融合法によって、数千万塩基～数億塩基対の巨大なDNA断片を操作することが可能であるが、現在用いられている他の分子生物学的技法では、そのような大きなDNA断片を扱うことは物理的に不可能であることから、その意義は大きい。我々は、これまでにヒト単一染色体ライブラリー細胞の作成に取り組み、Y染色体を除く全てのヒト単一染色体を有するマウス細胞株の作成及び品質管理を行い、HSRRB(JCRB)細胞バンクを通じて、一般の研究者への配布を行ってきた。昨年度より、新たにげっ歯類単一染色体ライブラリーの作成を開始した。げっ歯類単一染色体を用いることにより、染色体導入後、目的と

するヒトの癌や疾患関連遺伝子のマッピングが容易であるという利点があるが、これまでその樹立に関しては殆ど報告が無い。本研究は、げっ歯類の単一染色体雑種細胞を樹立し、性状解析および標準化を行い、研究資源として利用することを目的とした。

また、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株は、疾患関連遺伝子等の細胞レベルでの機能解析に非常に有用である。本年度より、新たに遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の開発、収集を開始した。その一環として、コネクシン43遺伝子ノックアウトマウスより繊維芽細胞を単離し、その性状解析を行った。

B. 研究方法

1. げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作成

1) 染色体供与細胞

染色体供与細胞には、マウス系統間雑種胎仔より得た繊維芽細胞を用いた。系統間雑種細胞を用いたのは、単離したマウス単一染色体の親起源を、多型マーカーを用いて調べるためである。そのため、マウス系統の中でも、比較的遺伝的距離が離れていることが報告されている¹⁾、BALB/c 系統と C57 BL/6 系統を交配して雑種胎仔を得た。雑種胎仔は、15 日齢で摘出し、胎仔ごとにトリプシン処理によって細胞を分散した。分散した細胞をディッシュに植え込み、得られた繊維芽細胞を初代培養して染色体供与細胞とした。これを 2 腹から合計 15 個体分作成した。

2) マウス染色体の薬剤耐性標識

マウス繊維芽細胞に、リン酸カルシウム法およびリポフェクション法を用いて薬剤耐性遺伝子を持つ発現ベクターを導入した。本年度は、トランスフェクタントの効率良い分離を目的とし、薬剤耐性遺伝子である neo 遺伝子と、オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質である GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子の融合遺伝子を発現する pQBI-pgk をマーカーに用いた。融合遺伝子は、マウス由来のフォスフォグリセロキナーゼ遺伝子プロモータによって発現調節されており、マウス ES 細胞等に染色体を導入する場合にも、高率に発現することが期待できる。

3) 受容細胞

昨年度はチャイニーズハムスター V79 細胞を受容細胞に用いたが、導入した染色体の脱落が激しく、安定性を欠くことから受容細胞としては不適切であることが分かった。そこで、本年度は、再度予備実験を行い、受容細胞として優れた性質を持つと認められたチャイニーズハムスター CHO-K1 細胞および、インドホエジカ FM7 細胞を受容細胞

として用いた。

4) 微小核融合法による染色体導入

3) の項と同じ理由で、融合法の見直しを行い、条件設定を行った。本年度は、薬剤耐性マーカーを導入したマウス初代繊維芽細胞を直接コルセミド処理することにより、微小核を調製し、微小核融合法²⁾を行った。

5) 反復配列間 PCR によるマウス染色体の検出

マウス反復配列間 PCR により、マウス DNA 配列の検出を行い、マウス染色体の保持率を調べた。プライマー、反応条件は、昨年度までに設定した条件、すなわち、プライマーには、IAP1 (5'-TCCTGAGATGTAAGCAATA-3')³⁾、反応条件は 94 °C 1 分、55 °C 1 分、72 °C 4 分を 32 サイクルの条件を用いた。反応後、0.8% TBE ゲルで泳動し、産物の有無を確認した。

6) 染色体解析による導入染色体の同定

マウス単一染色体雑種細胞の候補クローンと雑種細胞について、キナクリン分染法によって導入したマウス染色体の同定を試みた。また、マウス Cot-1 DNA プローブおよびマウスゲノム DNA を、超音波処理して作製した全マウスプローブを用いた蛍光 in situ hybridization 法 (FISH) によって、マウス単一染色体雑種クローンを導入したマウス染色体の検出を試みた。

2. コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

コネクシン 43 遺伝子 (Cx 43) を片アリルおよび両アリルをノックアウトしたマウス胎児より DNA を抽出し、Cx43 内に設定したプライマを用いた PCR により、欠損を確認した。欠損が確認された胎児を細切後、トリプシン処理しメッシュを通した細胞をディッシュに播種した。1 ないし 3×10^5 細胞を 3 日おきに 6cm ディッシュに継代することにより、細胞系を

樹立した。また、コントロールとして、野生型のマウス胎児より、同じ手法で細胞系を作成した。これらの細胞株について、Cx43 遺伝子の発現量と、ギャップ結合コミュニケーション(GJIC)の相関、細胞の増殖性の相関を検討した。

C. 研究結果

1. げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作成

昨年度は、チャイニーズハムスター V79 細胞をホストに用いて、32 個のクローンを得ることができた。しかしながら、分染法による核型解析、マウス全ゲノム DNA をプローブとした染色体蛍光 in situ hybridization、マウス特異的反復配列間 PCR によって、導入マウス染色体の断片化、脱落が認められた。そのため、本年度は染色体脱落の原因究明と方法の改良を行い、新たなクローンを作成する事を主要な目的とした。まず、受容細胞として、V79 と同じチャイニーズハムスター由来で、ヒト単一染色体受容細胞として実績のある CHO-K1 細胞を受容細胞として用いた。また、外来染色体の同定は、受容細胞の染色体数が少ない方が容易であり、チャイニーズハムスターもその点優れているが(2n=22)、さらに染色体数の少ないインドホエジカ(2n=6)に由来する細胞を受容細胞として用いて、スクリーニングの効率を向上することを目的として、押村光雄教授(鳥取大学)よりインドホエジカ由来の FM7 細胞株⁴⁾を入手し、微小核調製条件の検討およびマウス染色体保持クローンの単離を試みた。しかしながら、FM7 細胞は、ヒト細胞等と同様に、コルセミドの毒性に対する耐性が低く、マウス由来細胞と同様の条件を用いることはできなかった。そこで、様々な条件を検討したところ、コルセミド濃度 0.02ug/mL、播種密度 8.5×10^5 細胞、血清濃度 30%の条件によって、微小核が形成されることが明らかになった。

また、融合法の見直しを行った。微小核はコルセミド等の紡錘体形成阻害剤によって形成されるが、ヒト細胞などの場合、コルセミドの毒性のため、

微小核を形成させることが難しい。そのため、コルセミド耐性の高いマウス細胞と融合後、微小核を調製する必要があった。本研究で染色体供与細胞として用いているマウス繊維芽細胞は、予備的な実験の結果、コルセミド濃度(0.05ug/mL)、播種密度の変更(3.5×10^5 /Flusk)によって、効率良く微小核を形成することが明らかになった。そこで、本年度は、薬剤耐性遺伝子を導入した初代マウス繊維芽細胞をコルセミド処理することによって、微小核を形成させる方法を用いた。この手法を用いることにより、従来、3ヶ月以上を要していた微小核融合クローンの作成期間を大幅に短縮し、約1ヶ月半で単離が可能になった。

これらの新しい手法を用いて、現在までに、CHO-K1 細胞を受容細胞に用いたクローンが 67 クローン得られ、反復配列間 PCR、核型分析、染色体 in situ hybridization を用いて、導入された染色体の同定が進行中である。また、FM7 細胞を受容細胞に用いたクローンも現在作成中である。

2. コネクション 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

Cx43 欠損個体より作成した細胞株では、ダイトランスファー法によって GJIC の消失が認められ、同遺伝子が GJIC 形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。継代開始より約 30 日頃より細胞増殖が回復し始め、約 50 日頃から安定した増殖が得られたので、集団倍加時間を算出したところ、欠損、ヘテロ、野生型の順に細胞増殖が遅くなり、Cx43 と細胞増殖の関連性が示唆された。そこで、低血清および TPA、EGF 添加による細胞増殖への影響を調べた結果、3 種類の細胞系ともに高濃度血清および EGF 添加により細胞増殖の亢進が認められたが、野生型において比較的強い増殖亢進が認められた。

D. 考察

外来の単一染色体や、その一部を保持する雑

種細胞クローンは、劣性遺伝病原因遺伝子やがん関連遺伝子のマッピングやクローニングのための重要な資材となる。現在までに、ヒト単一染色体については、Y 染色体を除く全ての染色体をカバーするライブラリーの作成を完了したが、ヒト疾患関連遺伝子のクローニングを目的とする場合、ヒト以外の動物の由来する染色体を導入することにより、導入された染色体領域を容易に同定することが可能になる。中でも、遺伝的性状がよく研究されているげっ歯類を材料とした単一染色体雑種ライブラリーは研究資材として、劣性遺伝病原因遺伝子やがん関連遺伝子の研究に非常に役立つものと考えられる。また、近年、ゲノムインプリンティングが遺伝性疾患の原因として注目を集めているが、単一染色体雑種クローンでもインプリンティングが保持されていることが明らかになっており⁵⁾、ゲノムインプリンティング研究の資材としても有用である。マウス染色体を単一染色体ライブラリーの資材とすることにより、微小核融合法による染色体トランスジェニックマウス作成法⁶⁾と組み合わせて、個体レベルでのゲノムインプリンティング異常の病態を観察することも可能であると期待され、その利用価値は大きいといえる。

しかしながら、ヒト以外の単一染色体ライブラリー細胞は、少数の株が作製されているにすぎず、その作製技法も確立されていない。そこで、本年度は、昨年度に引き続き、げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞作製を行った。昨年度得られた雑種細胞クローンについては、導入染色体の脱落、断片化が高頻度に認められたが、これは、おそらく受容細胞の細胞周期との同期が不完全であるためと考えられる。そのため、受容細胞の再検討と、なるべく短期間で雑種細胞クローンを作製して脱落・断片化を防ぐ方法を検討した。

受容細胞については、核型分析の効率化が期待されるインドホエジカ FM7 細胞を入手し、微小核の形成条件、単離法を確立した。また、染色体供与細胞より、直接微小核を調製する手法を検討

し、効率的な単一染色体ライブラリー細胞の作成を可能にした。

これらの技術を用いて、マウス系統間雑種より得た初代繊維芽細胞を材料として単一染色体ライブラリー細胞の作製技術の検討を行い、新たに 67 株のクローンを得ることができた。

2. コネクション 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

コネクションはギャップ結合コミュニケーション (GJIC) を担うタンパク質ファミリーであり、多くのがん細胞での GJIC 能の低下、TPA 等のプロモータによる GJIC の阻害、Cx 遺伝子の導入によるがん細胞の細胞増殖抑制等の結果より、発がん過程において重要な役割を果たしていると考えられている。Cx43 は主に心臓および繊維芽細胞で発現しており、近年、この遺伝子のノックアウトマウスが作製された。そこで、同ノックアウトマウスに由来する培養細胞系は、がんの発現機構の研究に有用と考え、初代繊維芽細胞株を作製した。作製された細胞株の性状解析を行った結果、これまでのコネクション遺伝子研究で得られている知見や、分子レベルの解析より、期待されたのと同様の挙動を示し、コネクションの細胞生物学的研究や発がん過程の研究に有用なものであることが示唆された。

E. 結論

1. げっ歯類単一染色体ライブラリー細胞の作成

昨年度に引き続き、親起源が明らかでないげっ歯類単一染色体ライブラリーの作製を行った。昨年度に得られたクローンには導入染色体の断片化や脱落が生じていたため、受容細胞の検討、融合法の改良を行い、67 株の候補クローンを得ることができた。

2. コネクション 43 遺伝子ノックアウトマウスからの株細胞作成と性状解析

これまでの研究によって、発がんや細胞増殖に重

要な役割を果たしていると考えられるコネクシン43遺伝子をノックアウトしたマウスより、初代繊維芽細胞株を作製した。作製された細胞株の性状解析を行った結果、コネクシンの細胞生物学的研究や発がん課程の研究に有用なものであることが示唆された。

F. 引用文献

- 1) Atchley, W. and Fitch, W., Gene trees and the origin of inbred strains of mice., *Science*, Vol. 555, 554-558, 1991.
- 2) Kugoh, H., Hashiba, H., Shimizu, M. and Oshimura, M., Suggestive evidence for functionally distinct, tumor suppressor genes on chromosomes 1 and 11 for a human fibrosarcoma cell line, HT1080, *Oncogene*, Vol. 5, 1637-1644, 1990.
- 3) Wood, W. and Hamm, D., Survey of genomic repeat sequence-PCRs that detect differences between inbred mouse strains., *Genet. Res. Comb.*, Vol. 65, 151-155, 1995.
- 4) Lee, J., Koi, M., Stanbridge, E., Oshimura, M., Kumamoto, A., Feinberg, A., Simple purification of human chromosomes to homogeneity using muntjac hybrid cells., *Nature genet.*, Vol. 7, 29-33, 1994.
- 5) Meguro, M., Mitsuya, K., Sui, H., Shigenami, K., Kugoh, H., Nakao, M., Oshimura, M., Evidence for uniparental, paternal expression of the human GABAA receptor subunit genes, using microcell-mediated chromosome transfer., *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 6, 2127-2133, 1997.
- 6) Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M., Ishida, I., Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice, *Nature Genet.*, Vol. 16, 133-143, 1997

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山影康次、大森泰文、Marie-Pierre Cros、田中憲穂、山崎洋、マウス皮膚発がんのプロモーション課程におけるコネクシン43の役割について、日本環境変異原学会第27回大会、1998

実験動物由来細胞株の性状確認および同定法の確立

分担研究者 加藤秀樹 浜松医科大学医学部附属動物実験施設

研究要旨

実験動物由来の細胞株は様々な分野の研究に利用されているが、由来系統、性別が不確かなものも少なくなく、また、実験室で長期にわたり使用されている間に、他の細胞株が混入したり、細胞の性質を決める遺伝的な特性に変化を生じる、といった例も報告されている。そこで、精度の高い実験を行う上で、実験動物由来の細胞株の遺伝的特性を検査する手法は非常に重要である。また、近年、系統保存を目的とした胚保存技術が発展したが、ここでも取り違えによる事故を未然に防ぐ意味で、遺伝的特性の確認は重要である。我々は、これまで分子生物学的手法を用いた検査方法として、PCR 法、FISH を用いた遺伝的検査法の開発を行ってきた。しかしながら貴重な細胞株や、特に胚では検査に十分な細胞数が得られない場合もあることから、少量の細胞を対象とした検査手法と、最小必要細胞数の検討を行った。

A. 研究目的

薬剤耐性マーカー遺伝子で標識された外来染色体実験動物の細胞(胚、卵子及び精子を含む)の凍結は、株化細胞、ミュータント系統やトランスジェニックおよびノックアウト系統など、貴重な遺伝資源の保存法として実用化の段階に入っており、技術的にはごく一般的なものになりつつある。その一方、細胞、胚バンクの運用では常に取り違え事故などが予想され、未然に防ぐ方法を講じる必要がある。具体的には、少量の細胞数で検査が出来るようにすることなど、効率の良い細胞の鑑別方法の確立が望まれる。今年度、我々は少数の細胞からの DNA 抽出法についてマウスの末梢血リンパ球と胚を用い、rDNA やマイクロサテライト DNA 等の PCR 法で検出されるマーカーを使った遺伝検査に必要な最少細胞数の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 細胞

培養細胞株のモデルとしてマウスリンパ球を用いた。リンパ球については、マウスの顎下リンパ節を取出し、RPMI1640 メディウム中でシングルセルにした。1ml 中の細胞数を血球計算盤でカウントした後、段階希釈法により目的の細胞数に調整した。また、マウス胚については CB6F1 マウスの精子および卵子を MWM 培地内で体外受精し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。培養 23、54 および 71 時間後にそれぞれ 2 細胞期胚、8 細胞期胚および桑実期胚を採取した。各期の胚をそれぞれ 1、5、10 個に分け、サンプルチューブに入れ、-80°Cフリーザーに保存した。

2. DNA 調製

DNA 調製法の検討は4種類の調整法、すなわち、標準法(プロテナーゼ K/フェノール/クロロホルム抽出法)、A 社キット、B 社キットおよび核

DNA簡易抽出法について、リンパ球を用いて行った。核DNA簡易抽出法は我々が考案したもので、プロトコールは下記の通りである。リンパ球細胞を 1×10^4 個/ml に調整後 各サンプルが規定細胞数(5~640 個/ml)になるように調整した。次にこれらの細胞に Proteinase K(10mg/ml)を含む Lysis buffer (50mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH8.4), 0.1% Triton X)を加えて 20 分間細胞融解を行い、PCR の template とした。

3. マイクロサテライトマーカーおよび PCR 法

系統識別に必要なマイクロサテライトマーカーを選択し、Research Genetics 社より購入したプライマーを用いて常法に従い PCR を行った。PCR プロダクトはアガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行って検出した。

C. 研究結果

1. リンパ球について

少数の細胞からの DNA 調製に適した方法を検討するため、マウスリンパ球を用い、マイクロサテライトマーカーである D6Mit15 の検出を指標にして4種類の DNA 調製方法を比較検討した。その結果、標準法、A社キットおよびB社キットではいずれのリンパ球数でもバンドを検出できなかった。しかし、核DNA簡易抽出法ではリンパ球40個からバンドが検出された。

2. 胚について

胚の核DNA抽出にはリンパ球でDNAが得られた簡易抽出法を用いた。2細胞期胚、8細胞期胚および桑実期胚から抽出した核DNAを肉眼等で直接的に確認することが出来ないため、実際にPCRを行い、そのプロダクトの有無によって評価を行った。

結果として、5種類のマイクロサテライトマーカーのうち4種類については5個の桑実期胚でバンドが検出された。残りの1種類、D3 Mit54について

は桑実期胚1個でもPCRプロダクトが検出された。一方、このマーカーについては、2細胞期胚の場合は10個、また、8細胞期胚の場合は5個を必要とした。

D. 考察

リンパ球および胚からのDNA調製に最も適した方法をマウスリンパ球を用い検討した結果、我々が開発した核DNA簡易抽出法が他の方法よりも少ない細胞数でPCRプロダクトのバンドを認めることができた。

核DNA簡易抽出法により1個の桑実期胚から少なくとも1種類のマイクロサテライトマーカーの検出に十分なテンプレートDNA量を得ることが出来た。実際に、簡易法で調製したDNA templateを材料にして、クリティカルサブセット(5種類のマイクロサテライトマーカー)を用いた胚の遺伝的モニタリングを行うことができた。動物種の鑑別に必要なリボソームDNAや性別判定に必要なマーカーについても高感度の染色法も組み合わせることによって検出できる可能性が示された。

桑実期胚ではプライマーの種類により検出可能な胚の数が異なっていたことからプライマーにより検出感度が異なることが示唆され、今後、モニタリングに適したプライマーを選択していくことによって、効率的に遺伝的モニタリングを実施できることが示唆された。

E. 結論

リンパ球をモデルとした培養細胞株の条件検討では、我々が開発した核DNA簡易抽出法がもつとも少ない細胞数でマイクロサテライトマーカーを検出でき、1個のマーカーにつき、40細胞で検出可能なことが示された。また、胚については発生ステージにもよるが、1個から10個程度の胚で検出できることが示された。今後、さらに適したプライマーを用いることにより、効率的に少数細胞による遺伝的モニタリングを実施できることが示唆された。

F. 引用文献

- 1) Katoh, H., Muguruma, K., Watanabe, Y.,
Ishikawa, S., Ebukuro, M. Nomura, T.,
Nakagawa., Y, Tanaka, N Genetic quality
testing of cell lines derived from laboratory rats
by polymerase chain reaction., Transplant
Proceedings, Vol. 29, 1709-1712, 1997.

G. 研究発表

1. 論文発表

加藤秀樹:マウス、ラットの遺伝子地図、アニテ
ックス 10(2):67-74、1998.

2. 学会発表

なし

ヒト染色体ライブラリーの作製とDNA および染色体解析

分担研究者 久郷 裕之 鳥取大学医学部・助手

研究要旨

外来遺伝子と相同組み替えが高頻度に生じるニワトリ Pre-B 細胞株 DT40 細胞に単一ヒト染色体を高頻度に導入する手法の改良技術を確立した。この手法を用い、前年度に作製したヒト 2 番, 3 番, 11 番染色体を保持する DT 細胞に加え、本年度においてはヒト 5 番, 6 番, 7 番, 14 番, 21 番, 22 番染色体を各々保持する細胞クローンを作製した。

A. 研究目的

ニワトリ Pre-B 細胞株 DT は極めて高頻度に相同組み換えを起こすことが知られている。したがってこの DT40 細胞中でヒト染色体を改変することが可能である。本研究の目的は A9 細胞からヒト単一染色体を DT 細胞にマウスに再導入し、単一ヒト染色体を含む DT40 細胞ライブラリーを作製することにより、遺伝子マッピングや機能解析、さらには染色体高次構造解析の資材とする。

B. 研究方法

一般的に、染色体導入に用いる微小核細胞融合法は、細胞の種類により多少異なるが、suspension type は、adherent type に比べて染色体の導入効率は下がる。特に、受容細胞に用いる DT40 細胞は、これまでの研究により染色体導入効率が極めて低いことが知られている。従って、本研究においては、導入効率を上げるための条件検討を行いつつ、ヒト染色体ライブラリーの作製を進めた。

1. 微小核細胞の作製

ヒト染色体を含むマウス A9 細胞を遠心用フラスコ (25cm²) に播種し、5% 炭酸ガス気相、37°C 条件下で培養を行った。細胞密度が 70~80% に達した後、培

養液をコルセミド含有培地 (20% FBS, DMEM, 0.05µg/ml colcemid) に変換し、2 日間培養を行った。2 日後、サイトカラシン B (10 µg/ml) 処理し、34°C、8000rpm で1時間の遠心分離を行った。遠心終了後、サイトカラシン B 溶液を除去し、微小核を無血清培地 12 ml に懸濁し回収する。この微小核懸濁液を 8µm、5µm、3µm のフィルターの順に通し、微小核を精製した。

2. 微小核細胞融合

ポリ-L-リジンでコーティングした 6 穴プレートに、1 × 10⁷ cells/well の DT 細胞を播いた。この DT40 細胞をプレート底部に張り付けるためにプレートを 1,200rpm、3 分間遠心を行った。2 時間、37°C のインキュベータ内で静置後、血清を含まない DMEM で 2 回洗浄した。上清の DMEM を静かに除去し、フィトヘムアグルチニン (PHA, 50µg/ml) を含む無血清培養液 2ml に懸濁した微小核細胞の懸濁液を加え、1,200 rpm、3 分間の遠心を行った。上清を除去し、47% ポリエチレングリコール (PEG) 溶液 3ml を加え、1 分間静置した。PEG 溶液を吸い取り、無血清培地で 4-5 回洗浄し、その後、血清を含む培地で 1 日間培養する。ピペッティングにより細胞を分散し、24 穴プレートに播種し、選択培地に交換し、約 3 週間後

に耐性クローンを分離した。得られた細胞クローンは、Alu-PCR banding pattern および染色体解析により導入染色体の状態を確認した。

C. 研究結果

微小核細胞融合法による DT40 細胞へのヒト染色体導入を上げるため、以下の改良を試みた(図 1)。

1) PHA-P 処理は、サスペンションでなく遠心によって行った。

2) PHA-P の細胞毒性を考え、処理時間を従来(15 分間)の 1/5 (3 分間)にした。

3) PEG における融合率を上げるため PEG-1000 から分子量の高い PEG-1500 に検討した。

4) PEG1500 による処理時間を従来(90 秒)の 3分の 2 にした(60 秒)。

5) PEG 処理後、細胞へのストレスを軽減するため遠心処理を行わずに 1 日静置した。

6) 選択培養における細胞密度を従来(2×10^5 cells/ml)の約 4 倍(8×10^5 cells/ml)にした。

7) 培地交換における遠心分離ストレスを最小限にするため、従来(2~3 日に 1 回の培地交換を 6~7 日に 1 回と減らした)。

以上の改良の結果、DT40 細胞へのヒト染色体導入は、通常 48 から 60 フラスコ分の微小核細胞が必要であったのに対し、12 フラスコから精製した微小核細胞で、薬剤耐性クローンが得られ、効率良く DT40 細胞へヒト染色体を導入できる至適条件を確立した。

得られた薬剤耐性クローン中に存在するヒト染色体の状態を Alu-PCR banding pattern および染色体解析を用いて検討した結果、現在までヒト 5 番、6 番、7 番、14 番、21 番、22 番染色体を各々を完全に保持する細胞クローンを同定した。

D. 考察

本年度においては、DT40 細胞にヒト単一染色体を安定に効率よく導入する条件を確認できたと考えられる。さらに、前年度と合わせ 9 種類の染色体を各々保持する DT40 細胞を作製した。これらの細胞

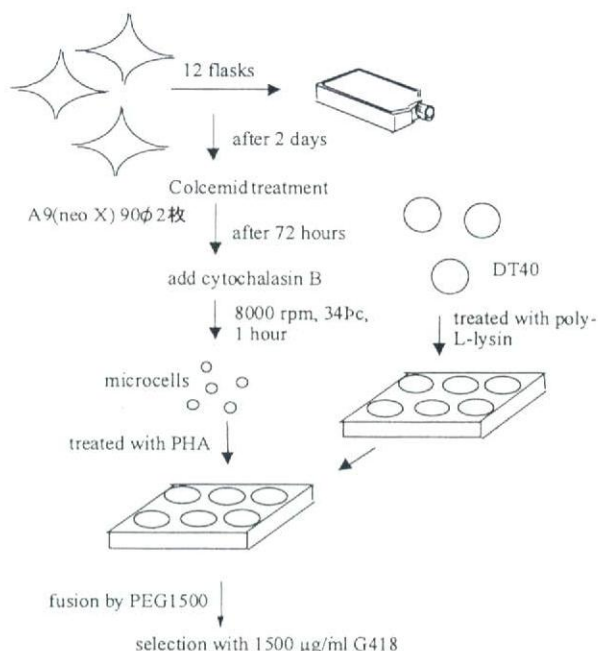


図1. 微小核細胞融合法による DT40 細胞へのヒト染色体導入

クローンは、DT40 細胞の高頻度相同組み換え能を利用し、ヒト染色体の改変の場を提供するものであり、ヒト人工染色体の作製やヒト染色体に欠失や転座を誘発させ、その機能解析を行うことにより疾病原因遺伝子をマッピングするための有用な資材になると考えられる。

今後は、さらに他の染色体の導入を試み、単一染色体ライブラリーの完成を目指す。

なお、これらの単一染色体ライブラリーを用い、具体的に以下に示すような研究分野での利用を進めている。

1) 3 番染色体上のテロメラーゼ活性抑制遺伝子の同定

腎細胞がん細胞株 RCC23 あるいは KC12 への 3 番染色体移入によりテロメラーゼ活性の抑制が認められ、テロメアの短縮を伴う正常な老化プログラムを再開した。このことから 3 番染色体上にテロメラーゼ活性を抑制する遺伝子の存在が示唆され、これまでに 3p14.2-p21.1 領域にその遺伝子の存在が明らかにされた。さらに、共同研究によって得られた 3 番染色体を保持する DT40 細胞を用いて候補領域中に存在する複数の STS マーカーを標的にし、複数の改

変染色体を作製した。現在これらの改変染色体の機能解析から、より詳細な遺伝子マッピングを試みている。

2) ヒト抗体を産生するマウスの作成

完全なヒト抗体を産生するマウスを作製するためには、ヒト2番および22番染色体に存在する抗体の軽鎖と14番染色体上に存在する重鎖の各々がマウス細胞中に存在することが必要である。しかし、次世代伝達率は、導入染色体の大きさに依存している。従って、その効率を上げるためには、目的領域のみを含むミニ染色体の作製が必須になる。現在、DT40細胞中で染色体改変を行いミニ染色体を作製中である。

3) MHC 遺伝子領域を保持するマウスの作製

ヒト型組織適合抗原系を導入した遺伝子改変動物を作製することを通じて、ヒト各種の臓器に由来する様々の可移植性腫瘍組織や、さらにはヒト正常組織の移植の可能な実験動物の開発を期待されている。現在、ヒト6番染色体に存在する主要組織適合抗原(MHC)発現マウスの系統樹立を試みている。しかし、抗体産生マウスと同様に導入染色体のサイズが次世代伝達率に大きな影響を示す。従って、DT40細胞中でMHC領域のみを含む改変染色体の作製が必要であり、ヒト6番染色体を保持するDT40細胞は、これらの研究を進めていく上で必要不可欠な資材として利用されている。

4) マウス染色体にダウン領域を転座させたマウスの作製

トリソミー症候群などの遺伝子量の増幅により発症する疾患等においては、ヒト染色体を保持するキメラマウスは、疾患のモデル動物として有用な資材になると考えられる。現在、ヒト21番染色体を保持するキメラマウスの作製を試みている。しかし、完全なヒト21番染色体の導入では、子孫へ伝達されないという欠点があった。従って、生殖系列にヒト21番染色体を伝達させるため、DT40細胞内で、ヒト21番染色体上のダウン領域をCre/loxPシステムによって断片化し、ES細胞のマウス染色体末端に転座させ、マウス個体内で安定に保持される系の開発を進めている。

5) ゲノムのインプリンティングセンター(GIC)の同定

これまで雑種細胞の研究から、それぞれのヒト染色体上にはその親起源が記憶されていると考えられる。従って、親起源が記憶されているGICを同定することを目的に、DT40細胞中でヒト11番染色体を改変し、様々な領域をもつヒト染色体断片を有する細胞のライブラリー作製を行っている。このライブラリーにおいて、インプリント遺伝子であるH19の発現パターンに異常が認められるクローンを同定することにより、GICの存在する染色体領域の特定を行っている。

E. 結論

- 1) DT40細胞にヒト単一染色体を安定に効率よく導入する条件を確立した。
- 2) ヒト5番、6番、7番、14番、21番、22番染色体を各々を完全に保持するDT40細胞を樹立した。

F. 引用文献

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katoh, M., Katoh, M., Kameyama, M., Kugoh, H., Shimizu, M. and Oshimura, M. A repressor function for telomerase activity in telomerase-negative immortal cells. *Mol. Carcinogen.*, 21: 17-25, 1998
2. Uejima H, Shinohara T, Nakayama Y, Kugoh H., Oshimura M. Mapping a novel cellular-senescence gene to human chromosome 2q37 by irradiation microcell-mediated chromosome transfer. *Mol Carcinog*, 22: 34-45, 1998
3. Mitsuya, K., Meguro, M., Sui, H., Schulz, T. C., Kugoh, H., Hamada, H. and Oshimura, M. Epigenetic reprogramming of the human H19 gene in mouse embryonic cells does not erase the primary parental imprint. *Genes Cells*, 3: 245-255, 1998

4. Tanaka, H., Shimizu, M., Horikawa, I., Kugoh, H., Yokota, J., Barrett, J. C. and Oshimura, M. Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 23: 123-133, 1998

5. Nihei, N., Ohta, S., Kuramochi, H., Kugoh, H., Oshimura, M., Barrett, J. C., Isaacs, J. T., Igarashi, T., Ito, T., Masai, M., Ichikawa, Y. and Ichikawa, T. Metastasis suppressor gene(s) for rat prostate cancer on the long arm of human chromosome 7. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 24: 1-8, 1998