

平成11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』

総括研究報告書

ならびに

平成9年度～11年度

総合研究報告書

研究代表者

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所

黒木登志夫

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）
総括研究報告書（平成11年度）

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肺腺がん細胞 RERF-LC-KJ を登録した。またストップコドン法によるがん抑制遺伝子のスクリーニング系を開発した。ヒト胎児由来肝細胞に肝特異的転写因子を導入し、肝に特異的な機能の高発現を確認した。
- 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。本年度は小型化したラジアルフロー型バイオリアクターを用いて、3次元で高密度にヒト肝細胞を培養するシステムを開発した。

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、2000年中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診断、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(京泉誠之)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ー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；京泉誠之（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 RERF-LC-KJ がマイコプラズマに感染していないことを確認し、バンクに寄託した。また、肺腺がん細胞株、胃がん細胞株を新たに樹立した。

さらに、SCID マウスに移植したヒト甲状腺組織に発生した腫瘍から血液幹細胞の表面形質をもつ細胞を培養した。（放影研・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 (OUMS 9-29) 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。さらに肝細胞に特異的な転写因子 HNF4a (hepatocyte nuclear factor 4a) を導入したところ肝特異的な遺伝子の発現が亢進していることを確認した。これらの細胞株と技術は、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) 変異株の作成：

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。さらに X 線高度感受性変異株の原因遺伝子をヒト線維芽細胞との雑種細胞株を用いた相補性解析から、17 番染色体に感受性座があることを明らかにし、ligase IV を同定した。ニワトリ DT40 から ligase I V 欠損株を作成した。

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）。これまでに8種のCキナーゼ分子種とそれらの dominant-negative 変異体のアデノウイルスベクターを作成し、世界各国の研究者に分与した。これらのウイルスはCキナーゼの標準的なアデノウイルスベクターになりつつある。

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。ストップコドンアッセイ(SC assay)により、PTEN, BRCA1, BRCA2, ATM, RAD52, RAD51, APC 等のがん抑制遺伝子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。さらに、遺伝性非ポリポーシス大腸がんの原因遺伝子、MLH1 の機能診断系を開発した。これらのデータのうち p53 に関するデータは細胞バンクのインターネット上で公表した（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）：

現在広く用いられているES細胞株は129系統マウス由来である。研究に広く応用する目的で近郊系C57BL/6系統さらに日本産および韓国産野生マウス由来近交系マウスから数種類の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：

ヒト肝がん由来FLC細胞株を用いて、ラジアルフロー型バイオリアクターにより高密度3次元培養を行った。高密度3次元培養することにより、肝機能（アルブミン、薬物代謝酵素、尿素サイクル等）は飛躍的に向上した。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。さらにこの条件下でC型肝炎ウイルスの感染系を樹立した。この研究は人工肝臓補助装置の開発につながるだけでなく創薬における有効性、安全性の評価、ヒト型生理活性物質の大量生産、環境汚染物質の代謝シミュレーション等への応用性が広い（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-cdk 2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。このときeta分子種と結合するためにはアダプター蛋白の存在が必要であること、cdk2の活性低下は160番スレオニンのだつリン酸化によることが解明された（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。

今後は積極的に培養細胞株を収集し、細胞バンクをバックアップする用にする必要がある。なかでも今後重要となるのは、遺伝子を破壊した細胞である。ノックアウト動物から細胞株を樹立することに加えて、ES細胞から様々な能力を持った細胞を樹立する方法も確立する必要がある。

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. 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.

2. Kuroki, T. and Rajewsky, M.: Sixth Japanese-German Workshop on molecular and cellular aspects of carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, **76**: 169-175, 1998.
3. 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.
4. 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.
5. Kuroki, T.: Cancer as a disease of genes and a disease due to environmental factors. *Reviews in Toxicology*, **2**: 113-118, 1998.
6. 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 _ and _ isoforms of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 5199-5207, 1998.
7. 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.
8. Chida, K., Nakada, T., Otsuka, H.,

- Kuroki, T. and Satoh, H.: Assignment of protein kinase C_(PKC_ to mouse chromosome band 12C3-D2 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **82**: 30-31, 1998.
9. 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.
10. 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.
11. 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 α and β isoforms of protein kinase C. *Jap. J. Cancer Res.*, **89**: 1129-1133, 1998.
12. 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.
13. Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Utsunomiya, J., Kuroki, T. and Mori, T.: Higher frequency of *Smad4* gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene*, **18**: 3098-3103, 1999.
14. Kuroki, T.: Protein kinase C-mediated signal transduction and its implication in skin carcinogenesis. In Dyall-Smith, D., and Marks, R. (eds.), *Proc. of 19th World Congress of Dermatology*, pp.4-10, The Parthenon Publishing Group, London, 1999.
15. Miyaki, M., Iijima, T., Kimura, J., Yasuno, M., Mori, T., Hayashi, Y., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T. and Kuroki, T.: Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.*, **59**: 4506-4509, 1999.
16. 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.*, **55**: 297-302, 1999.
17. Kuroki, T., Kashiwagi, M., Ishino, K., Huh, N. and Ohba, M.: Adenovirus-mediated gene transfer to keratinocytes. – A Review - *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**: 153-157, 1999.
18. Kuroki, T.: Tumor promoters. In Creighton, T.E. (ed.), *Encyclopedia of Molecular Biology*, pp.2694-2696, John Wiley & Sons, Inc., N.Y., 1999.
19. Braiman, L., Alt, A., Kuroki, T., Ohba, M., Bak, A., Tennenbaum, T. and Sampson, S.R. Protein kinase Cdelta mediates insulin-induced glucose transport

in primary cultures of rat skeletal muscle. *Molecular Endocrinology*, **13**: 2002-2012, 1999.

20. Fujii, T., Garcia-Bermejo, M.L., Bernabo, J.L., Caarmano, J., Ohba, M., Kuroki, T., Li, L., Yuspa, S.H., and Kazanietz, M.G.: Involvement of PKC δ in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKC δ , *J. Biol. Chem.*, **275**: 7574-7582, 2000.
21. Braiman, L., Alt, A., Kuroki, T., Ohba, M., Bak, A., Tennenbaum, T. and Sampson, S.R.: Insulin induces selective association of PKC δ with GLUT4-containing vesicles and subsequent Co-translocation to the plasma membrane in rat skeletal muscle. *Molecular Endocrinology*, (in press).
22. Kuroki, T., Ikuta, T., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Ohba, M., Huh, N., Mizuno, K., Ohno, S., Yamada E. and Chida K. Cholesterol sulfate, an activator of protein kinase C mediating squamous differentiation - a review - : *Mutation Res.* (in press).
23. Shlomzion Shen, S., Alt, A., Wertheimer, E., Gartsbein, M., Kuroki, T., Ohba, M., Braiman, L., Sampson, S.R. and Tennenbaum, T. : PKC δ activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1 induced proliferation of skin keratinocytes: Diabetes (in press)

分担研究報告書

ヒト肝細胞株(OUMS-29)の肝細胞特異機能の発現誘導

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(OUMS-29 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。この肝細胞にさらに多くの肝特異機能を発現させるために、肝細胞で作用する転写因子(HNF4a2)をこの肝細胞に導入した。その結果、この肝細胞では、apolipoprotein AI, CII, CIII, blood coagulation factor X, α 1-antitrypsin, HNF1 α などの発現がみられるようになった。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

ヒト肝細胞株 OUMS29 の樹立に関しては、平成10年度の報告書に記した。今回はこのヒト肝細胞に、肝細胞で比較的特異的に働く転写因子 HNF4 α の遺伝子を Lipofectamine を使用して、導入し、200 μ g/ml zeocin で選別し、遺伝子の導入されたクローンを得た。

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。

Apolipoprotein AI, CII, CIII, blood

coagulation factor X, α 1-antitrypsin, HNF1 α の発現はノザンプロットで調べた。

C. 研究結果

OUMS-29 細胞は上皮性の形態を示し、無血清培地で増殖する。そして、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する。また、CYP 1A1, 1A2 などの酵素活性の発現は芳香族炭化水素で濃度依存的、時間依存的に誘導される。また、多くの薬剤代謝に関係する CYP 3A は、3A7 の胎児型を示した。

Apolipoprotein AI, CII, CIII, blood coagulation factor X, α 1-antitrypsin, HNF1 α などの肝細胞特異機能の発現はノザンプロットで確認した。

D. 考察

我々は芳香族炭化水素で発現誘導される薬剤代謝酵素 P450 をもつヒト肝細胞株を樹立することができた。この細胞は無血清

の培養条件下で株化されたために、比較的多くの肝細胞特異機能を保持することができたと考えられる。

しかし、その P450 酵素活性は生体中の肝臓細胞に比べ低く、その活性を生体の肝臓細胞レベルに近づけたいと考えた。そこで、肝細胞で比較的特異的に働く転写因子 HNF4 α 2 を導入し、この肝細胞の P450 活性がさらに上昇するかどうかを調べたが、この酵素活性は上昇しなかった。P450 活性を上昇させるためには、さらに別の戦略が必要と考えられる。

しかし、apolipoprotein AI, CII, CIII, blood coagulation factor X, α 1-antitrypsin, HNF1 α などの肝細胞特異機能の発現の上昇はみられた。

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。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。この細胞は比較的多くの肝細胞特異機能をもつが、さらに多くの肝細胞機能を発現させるために肝細胞で比較的特異的に働く転写因子 HNF4 α を導入した。その結果、この細胞株には、apolipoprotein AI, CII, CIII, blood coagulation factor X, α 1-antitrypsin, HNF1 α などの肝細胞特異機能の発現がみられるようになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi, N., Miyazaki, M., Fukaya, K., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Uemura, T., Noguchi, H., Kondo, A., Tanaka, N. and Namba, M.: Transplantation of highly differentiated immortalized human

hepatocytes to treat acute liver failure. Transplantation 69, 202-207, 2000

2. 学会発表

- 1) 小林直哉, 宮崎正博, 井上裕介, 阪口政清, 近藤麻美, 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化胎児肝細胞 OUMS-29 の脾臓内移植の効果. 第 99 回日本外科学会, 福岡, 1999 年 3 月
- 2) 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化ヒト胎児肝細胞 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 4 月
- 3) 井上裕介, 宮崎正博, 難波正義: 培養ヒト細胞の機能. 第 6 回 HAB 協議会学術年会 (シンポジウム), 東京, 1999 年 5 月
- 4) Kobayashi, N., Miyazaki, M., Tanaka, N. and Namba, M.: Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. 25th Annual Scientific Meeting of The American Society of Transplant Surgeons, Chicago, USA, May, 1999
- 5) Kobayashi, N., Tanaka, N. and Namba, M.: Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. 9th Congress of The European Society for Organ Transplantation. Oslo, Norway, June, 1999
- 6) 小林直哉, 宮崎正博, 野口洋文, 田中紀章, 難波正義: ヒト不死化肝細胞(OUMS-29)のラット急性肝不全モデルにおける移植効果. 第 17 回日本ヒト細胞学会, 鹿児島, 1999 年 8 月
- 7) 井上裕介, 宮崎正博, 辻 俊也, 難波正義: Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4)導入によるヒト不死化肝細胞株(OUMS-29)の肝特異的遺伝子の発現. 第 22 回日本分子生物学会, 福岡, 1999 年 12 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マウスES細胞から作製したDNAポリメラーゼ (ポル) β のホモ変異マウス胎児は発生するが、出生直後に呼吸不全で致死となること、その原因は胎児脳組織における異常な神経細胞死によることを示した。また、胎児組織から樹立したポル β 欠損細胞は、DNAアルキル化剤に高感受性を示した。マウスFM3A細胞由来のX線高感受性株SX10がヒト13番染色体で相補されること、SX10株のDNA ligase IV (LigIV) にナンセンス変異が存在すること、マウスLigIVの発現ベクターがX線高感受性を相補することから、原因遺伝子がLigIVであることが証明された。さらに、ニワトリB細胞由来DT40株を親株としてジーンターゲットングでLigIV欠損株を分離し、X線とブレオマイシンに高感受性を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

保有している細胞株の育成、維持、供給を行なう。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線感受性変異株SX10、ニワトリB細胞由来DT40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、染色体移入、FISH解析などを用いた。

C. 研究結果

1. ポル β 欠損個体および細胞の解析

ポル β は、DNA修復・組換えに関与するとされてきたが、細胞ないし個体における機能は十分に明らかではない。我々は、すでにマウスES細胞のポル β 遺伝子をターゲットし、動物に移植してヘテロ変異マウスを作製している。この変異マ

ウスを掛け合わせ継時的に胎児を取りだし遺伝子型を調べると、ホモ変異胎児は発生できるが出生直後に呼吸不全で致死となることがわかった。しかし、肺の組織と機能の解析を行なったが、その不全を見い出すことができなかった。さらに、胎児脳の組織学的解析を行なった結果、ホモ変異胎児脳で発生分化していく神経細胞死が顕著に増加していた。また、14日目の正常およびホモ変異マウス胎児から培養を開始し、それぞれ線維芽細胞株を樹立した。この細胞株の増殖に及ぼすDNAアルキル化剤メチルメタンサルフォン酸やニトロソグアニジンの効果を調べると、ホモ変異細胞株は高感受性を示すことが分かった。

2. X線感受性株の原因遺伝子の同定

これまで、SX10のX線高感受性を相補する遺伝子のクローニングを目指してきた。そこで、ヒト正2倍体TIG-1と融合して得た雑種のヒト染色体構成とX線感受性の解析から、ヒト13番染色体が相補すると予想された。13番染色体にはDNA修復に関与するLigIVとBRCT1遺伝子が座乗している。そこで、上の雑種細胞およびHeLa細胞の染色体を導入して得たX線耐性の導入体をPCR分析した結果、LigIVが相補遺伝子であることがほぼ確かとなった。そこで、親株とSX10株のゲノムDNAを用いてLigIV遺伝子をPCRで増幅し塩基配列を決定すると、SX10細胞のLigIV遺伝子の1413番目のGがAに置換するナンセンス変異が存在することが分かった。さらに、マウスLigIV発現ベクターを導入した細胞は、X線感受性がほぼ野生株のレベルまで回復していた。

3. DT40細胞を用いた変異株の作製

培養動物細胞株の中でターゲット効率の高いニワトリB細胞由来DT40株を用いて、導入遺伝子が染色体DNAに挿入される組換え反応に関与する遺伝子の同定を進めている。そこで、その候補遺伝子として、DNA end-joining に関するLigIVの欠損株の分離と機能解析を計画した。まず、ヒトおよびマウスLigIV遺伝子の既知配列を利用してニワトリLigIV遺伝子をクローニングし、ネオマイシンおよびハイグロマイシン耐性遺伝子を組込んだ2種のベクターを構築した。その1つをDT40に導入して耐性クローンを得、ついで第2のベクターを導入して耐性株を得、サザンブロット分析で2コピーのLigIV遺伝子座がターゲットされたクローンを確認した。このLigIV欠損株はX線とブレマイシンに高感受性を示し、DNA 2重鎖切断の修復能が顕著に低下していた。

D. 考察

以前、ポルβ遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死と報告されている。しかし、われわれが作製したホモ変異マウス胎児は死に至らず発生したが、出生直後に肺呼吸が開始せず全て死滅した。昨年、肺の組織と機能の解析を行なったが、明らかな不全を見い出すことができなかった。次に、呼吸中枢の不全を予想して胎児脳組織の発生を詳細に調べた結果、神経細胞に異常な細胞死の増加を見出し、これが呼吸不全の原因になることが示唆される。ごく最近、DNAの2重鎖切断の修復に関与するXRCCIV遺伝子およびLigIV遺伝子のノックアウトマウスが同様

の細胞死を起こすことが報告され、神経細胞の発生におけるDNA修復の重要性が明らかになりつつある。

近年、X線感受性を相補する遺伝子の同定が相つぎ、XRCC1～9の遺伝子群が報告されている。我々が解析してきたSX10株は、さまざまな実験からこれらと異なる相補性群に入ると結論された。そこで、ヒト正2倍体細胞との雑種細胞の解析から13番染色体が相補すると予想され、染色体導入実験から13番染色体に座乗するLigIVが相補遺伝子であることがほぼ確かとなった。そして、変異株のLigIV遺伝子構造を解析し、確かにナンセンスが変異1個が存在することが分かった。さらに決定的な証明は、マウスLigIV発現ベクターを導入すると、X線感受性が完全に相補されたことである。残念なことに、すでにLigIV遺伝子はクローニングされており、新規遺伝子ではなかった。しかし、この変異株SX10はLigIVの細胞機能を解析するうえで貴重な材料となると考える。

ニワトリB細胞由来DT40株は、現存する動物組織由来の培養細胞株の中で、唯一高いターゲット効率をもつ株である。したがって、この株を利用すればさまざまな変異株が比較的容易に樹立でき、細胞レベルでの遺伝子機能の解析が可能になる。我々は、細胞に導入したDNAが染色体に挿入される相同ないし非同相組換え反応を解析するため、候補遺伝子としてLigIV欠損株の分離をまず計画した。そこで、ニワトリLigIV遺伝子をクローニングして2種類のターゲットベクターを構築し、DT40細胞に順次導入してターゲットされた欠損株を得た。予

想されたように、この欠損株はDNAの2重鎖切断を起こすX線とブレオマイシンに高感受性を示した。なお、この変異株の作製は、上のSX10株の原因遺伝子を同定する以前に開始した。したがって、偶然マウスとニワトリ細胞から2種類のLigIV変異株が得られたことになり、現在その比較を行なっている。さらに、組換えに関与することが予想されるLigase III遺伝子の欠損株の作製を進めている。

E. 結論

ジーンターゲットングでマウスES細胞からポルβのヘテロ変異マウスを作製した。その掛け合わせ実験から、ホモ変異マウス胎児は生存できるが出生直後に呼吸不全で致死となること、その原因は胎児脳における神経細胞死の異常な増加によることを示唆した。また、胎児組織から樹立したポルβ欠損細胞は、DNAアルキル化剤に高感受性であることを示した。マウスFM3A細胞由来のX線高感受性変異株SX10をヒト13番染色体が相補することが細胞雑種の解析から予想され、変異株のLigIV遺伝子にナンセンス変異を見出した。さらに、マウスLigIVの発現ベクターが高感受性を相補することから、SX10の原因遺伝子はLigIVであることが証明された。一方、ニワトリB細胞由来DT40株を親株としてジーンターゲットングによりLigIV欠損株を分離し、X線やブレオマイシンに高感受性であることを明らかにした。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Tsunoda, H., Hayakawa, T., Sakuragawa, N., and Koyama, H.: Site-specific integration of adeno-associated virus-based plasmid vectors in lipofected HeLa cells. *Virology*, 268: 391-401 (2000).
2. Adachi, N., Nemoto, M., Kohno, K., Koyama, H.: Cell cycle regulation of the DNA topoisomerase II α is mediated by proximal CCAAT boxes: possible involvement of acetylation. *Gene*, 245: 49-57 (2000).
3. Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y., and Koyama, H. Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase β . *EMBO J.*, 19: 1397-1404 (2000).

2) 著書. 総説

- 1、小山秀機：変異株の分離. 黒木登志夫・許南浩・千田和弘（編）新培養細胞実験法. バイオマニュアルシリーズ、羊土社、東京、pp. 276、1999.
- 2、小山秀機編：細胞培養ラボマニュアル、シュプリンガー・フェアラーク社、東京、1999.

3) 学会報告

- 1、石野貴之、足立典隆、小山秀機：ニワトリ ligase IV 遺伝子の解析. 第22回日本分子生物学会（福岡）、1999年12月. 講演要旨集、320、1999.
- 2、佐渡克行、鮎沢大、菅沼勉、榎本敦、押村光雄、佐藤弘毅、小山秀機：マウス FM3A 細胞由来 X 線感受性変異株 SX10 の原因遺伝子の同定. 第22回日本分子生物学会（福岡）、1999年12月. 講演要旨集、320、1999.
- 3、鶴淵哲人、荒谷康昭、Nobuyo Maeda、小山秀機：ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球の細胞死の遅延. 第22回日本分子生物学会（福岡）、1999年12月. 講演要旨集、441、1999.

- 4、荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの微生物感染防御能. 第22回日本分子生物学会（福岡）、1999年12月. 講演要旨集、441、1999.
- 5、菅生紀之、荒谷康昭、長嶋洋治、小山秀機：DNA polymerase β 欠損マウスにおける神経細胞死. 第22回日本分子生物学会（福岡）、1999年12月. 講演要旨集、378、1999.
- 6、Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Susuki, K., Kura, F., and Maeda, N.: Severe impairment in early host defence against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Gordon Research Conferences (USA)*, 1999年6月.
- 7、Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y., and Koyama, H.: Targeted disruption of the mouse DNA polymerase β gene leads to lethality associated with abnormal neurogenesis. *DNA Repair and Mutagenesis Conference (USA)*, 1999年11月.
- 8、菅生紀之、荒谷康昭、長嶋洋治、窪田吉信、小山秀機：DNA polymerase β 欠損マウスにおける神経発生異常. 第16回よこはま21世紀フォーラム（横浜）、1999年11月.
- 9、荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスが易感染を示す真菌および細菌の検索. 2000年度日本農芸化学会、2000年3月（発表予定9）.
- 10、足立典隆、石野貴之、山城章代、松崎靖生、小山秀機：DT40細胞を用いたDNAライゲースの機能解析、2000年日本薬学会年会（岐阜）、2000年3月.

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

SCID マウスに自然発生した血液細胞腫瘍より血液幹細胞マーカーを発現する細胞株を樹立した。また、p53 欠損マウスより繊維芽細胞株を作成するとともに、新たなヒト癌細胞株を数株樹立し、細胞バンクへの寄託の準備を行なった。

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。当研究は新しいヒト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。また、ヒト癌細胞に加えて、遺伝子変異マウスからの細胞株の樹立も重要な作業である。本年度は新しいヒト癌細胞株の樹立を試みるとともに、SCID マウスに発生した血液腫瘍や p53 欠損マウスより繊維芽細胞株を樹立した。

B. 研究方法

1) 細胞株の品質管理

既に報告した方法により、マイコプラズマや染色体の検査を行なった。

2) SCID マウス由来血液細胞株の樹立

SCID マウスに発生した血液腫瘍を採取し、細胞懸濁液を作成し、RPMI1640（牛胎児血清 10%添加）により継代培養した

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

ナーゼあるいはトリプシン-EDTA 処理し、RPMI1640（牛胎児血清 10U 添加）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。

4) p53 欠損マウス由来繊維芽細胞株の樹立

p53 欠損マウスは相沢慎一博士より供与された。p53 欠損ホモ接合(-/-)、ヘテロ接合(+/-)および野生型(+/+)マウスの胎児組織片をトリプシン処理し、細胞懸濁液を作成した。これを MEM（牛胎児血清 10%添加）により継代培養した。

C. 研究結果

1) SCID マウス由来 CD34⁺/c-kit⁺血液細胞株の樹立

SCID マウスに移植したヒト甲状腺組織に発生した腫瘍から、細胞懸濁液を作成し、培養を行なった。2 週間後、増加時間約 20 時間で増殖する細胞株を得た。この細胞株はヒトのマーカーを有してお

らずマウス汎白血球マーカーCD45⁺、幹細胞マーカーCD34⁺/c-kit⁺であるが、他の分化マーカー(B220, CD3, CD4, CD11, CD13, TER119 等)を発現しておらず、血液幹細胞の表面形質を持つことが判明した。

2) p53 欠損マウス由来繊維芽細胞の樹立
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し、数代継代後液体チックス素に凍結保存した。

3) 新たなヒト癌細胞株の樹立

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を行い陰性であることが確認された。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、種々の検査を実施した。

D. 考察

本年度、SCID マウス由来の CD34⁺/c-kit⁺ 細胞株を樹立した。ヒトでは類似の幹細胞様細胞株は報告されているが(HL60, KG-1 など)、マウスではほとんど報告がない。また、SCID マウス由来の細胞株は繊維芽細胞株以外にあまり報告がなく、SCID 遺伝子の機能解析にも応用可能であろう。さらに、この細胞株は白血病治療、特に graft vs leukemia 反応(GVL)のマウスモデルに応用できるだろう。現在の GVL モデルはマウスリンパ腫細胞を用いており、myeloid 系のマウス白血病細胞を用いたモデルが待望されている。この細胞株を同系マウス(SCID または BALB/C マウス)に移植後、

さらに allogeneic あるいは minor

MHC が異なるマウス(例 DBA/2)の骨髄を移植し、骨髄由来の CD8 細胞などのこの細胞株に対する反応性を解析することができるだろう。さらに、この細胞株の 5-アザシチジンやレチノイン酸添加による血液細胞への分化とそれに伴う脱腫瘍性などを分子細胞生物学的に解析することも可能であろう。

また、p53 欠損マウス由来の繊維芽細胞株については、海外にも報告があるが、我々の細胞株は国内で確立された p53 欠損マウス由来で、異なる遺伝的背景を持っている。アポトーシス細胞周期コントロールなど p53 遺伝子関連機能の解析に用いることができるだろう。

E. 結論

本年度遺伝子変異マウス由来の細胞株が樹立され、SCID や p53 遺伝子の機能の解析に有用と考えられた。

F. 研究発表

発表論文

- 1) Mizuno, T., Iwamoto, K.S., Kyoizumi, S., Nagamura, H., Shinohara, T., Koyama, K., Seyama, T., Hamatani, K. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene* 19:438-443, 2000
- 2) Ogawa, T., Hayashi, T., Kyoizumi, S., Ito, T., Trosko, J.E., Yorioka, N. Up-regulation of gap junctional intercellular communication by hexamethylene bisacetamide in

cultured human peritoneal mesothelial cells. Laboratory Investigation 79(12):1511-1520, 1999

- 3) Iwamoto, K.S., Mizuno, T., Seyama, T., Kyoizumi, S. Mutant p53: epigenetic mutator of the T-cell receptor via induction of methylation. Mol Carcinog 25: 113-121, 1999
- 4) Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Yamaoka, M., Kasagi, F., Kodama, K., Seyama, T. Decreased proportion of CD4 T cells in the blood of atomic bomb survivors with myocardial infarction. Radiat Res 152(5): 539-543, 1999

学会発表

- 1) Hayashi, T. and Kyoizumi, S., et al., A Dose-dependent increase of plasma IL-6 level in atomic-bomb survivors, 11th International Congress of Radiation Research (Dublin, Ireland 1999)
- 2) Hayashi, T. and Kyoizumi, S., et al., Reactive oxygen and Bcl-2 in radiation-induced apoptosis, International Conference of Free Radical Processes: Ecological, Pharmacological and Clinical Aspects (St. Petersburg, Russia 1999)
- 3) Kyoizumi, S. and Koyama, K., et al., Uncoupling of DNA synthesis and mitosis in human intestinal crypt

stem cells following radiation exposure, EMBO Workshop: Stems Cells, Growth Factor and Cancer, (Torino, Italy 1999)

- 4) 京泉誠之、小山和章ら、ヒト小腸上皮細胞における放射線誘発アポトーシスと細胞周期変化、第 42 回放射線影響学会 (広島、1999)
- 5) 林 奉権、京泉誠之ら、サイトカイン及びグロブリン産生に及ぼす原爆放射線の後影響、第 42 回放射線影響学会 (広島、1999)
- 6) 楠 洋一郎、京泉誠之ら、原爆放射線による免疫偏向の誘導とその疾患発生との関連性に関する仮説、第 42 回放射線影響学会 (広島、1999)
- 7) 楠 洋一郎、京泉誠之ら、放射線による生体内 MHC クラス I アリル欠失突然変異細胞の発生とその NK 細胞による抑制、第 58 回癌学会 (広島、1999)
- 8) 京泉誠之、楠 洋一郎ら、心筋梗塞を有する原子爆弾被爆者の末梢血 CD4T 細胞比率の低下、第 29 回免疫学会 (京都、1999)
- 9) 林 奉権、京泉誠之ら、放射線誘発アポトーシスにおける Caspase 及び活性酸素の役割、第 29 回免疫学会 (京都、1999)
- 10) 楠 洋一郎、京泉誠之ら、MHC クラス I 分子の発現を失った突然変異リンパ球の NK による除去、第 29 回免疫学会 (京都、1999)

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

腫瘍関連遺伝子 *hMLH1*、*PTEN*、*p63/p51* 各遺伝子の変異機能解析により、以下の点を明らかにした。(1) 遺伝性非腺腫症性大腸癌(HNPCC)家系由来の *hMLH1* ミスセンス変異の大部分をカバーする 58 種類の変異の多くは正常 *hMLH1* 機能を障害していた。(2) *PTEN* ミスセンス変異 42 種類の変異の大部分は正常 *PTEN* 機能を障害していた。(3) ヒト悪性グリオーマの一部では *PTEN* にミスセンス変異が見られ、この場合、機能を障害する変異アレルと欠失により *PTEN* 機能が失われることが判明した。(4) *p53* ホモログである *p63/p51* 遺伝子の機能について出芽酵母ならびにヒト細胞で解析した結果、転写活性化能について *p63/p51* と *p53* との間に類似性と相違点があることが判明した。(5) ヒト腫瘍由来の *p63/p51* ミスセンス変異は稀であるが、*p53* の場合と同様に *p63/p51* の転写活性化能を障害していた。

分担研究者 石岡千加史・東北大学加齢医学研究所・助教授

hMLH1 機能を障害していた。この系で正常 *hMLH1* と判別できない変異のうち約半分は遺伝子多型であることが判明した。

A. 研究目的

がん抑制遺伝子や DNA ミスマッチ修復遺伝子などの腫瘍関連遺伝子の変異（とくにミスセンス変異）の機能評価法を開発、応用することにより既知の変異の機能評価をデータベース化し、遺伝子診断のための情報を提供する。

(2) *PTEN* ミスセンス変異 42 種類の変異を大腸菌発現ベクター上に導入、発現・精製し、*PTEN* 機能を *in vitro* の phosphoinositide phosphatase 活性を指標に機能解析した。大部分（約 90%）の変異は正常 *PTEN* 機能を障害しており、がん抑制に重要な *PTEN* の機能は phosphoinositide phosphatase 活性であることが明らかにされた。

B. 研究方法と結果

(1) HNPCC 由来の *hMLH1* ミスセンス変異 58 種類の変異を出芽酵母発現ベクター上の *hMLH1* cDNA に導入し、独自に開発した出芽酵母の機能診断系に導入・発現した。正常 *hMLH1* が酵母のミスマッチ修復系を障害するのに対して大部分（75%）の変異は正常

(3) ヒト脳腫瘍（主にグリオーマ）66 例について *PTEN* と *p53* 遺伝子の変異をそれぞれ phosphoinositide phosphatase 活性と塩基配列特異的転写活性化能を機能指標に解析した結果、*p53* のミスセンス変異と同様に検出された *PTEN* ミスセンス変異はすべて上記 2. の機能を障害していた。第 10 染色体長腕の LOH

解析を併せて行った結果、悪性グリオーマにおける PTEN の不活性化は機能を障害する変異アレルと欠失アレルによっておこることが明らかになった。

(4) p53 ホモログである p63/p51 遺伝子の機能について、出芽酵母ならびにヒト細胞を用いて MDM2, BAX, WAF1 および 14-3-3sigma 遺伝子プロモーター領域の p53 結合塩基配列を導入したりポーターアッセイにより転写活性化能を解析した。その結果、p63/p51 は p53 と類似の転写活性化能を有するが、その転写活性化能は p53 との間で相違があることが判明した。

(5) これまでヒト腫瘍由来の p63/p51 ミスセンス変異は僅か 4 種類しか発見されていない。これら全てについて p63/p51 の転写活性化能に与える影響に付いて出芽酵母を用いて評価した。その結果、DNA 結合部位上のミスセンス変異は全て (3 種類) 機能を障害していたが、N 末側近傍の 1 変異は正常同様転写活性化能を有していたことから、この変異は遺伝子多型であることが示唆された。

C. 考察

hMLH1 変異のうち原行の出芽酵母アッセイ系ではモニターできない変異が存在している可能性が示唆され、酵母ミスマッチ修復系のヒト化などにより機能相補による新たなアッセイ系の開発が必要である。*PTEN* 変異の解析から、試験管内で行う phosphoinositide phosphatase 活性ではモニターできない *PTEN* 機能がある可能性が示唆された。p63/p51 の転写機能は p53 と類似性と相違点を明らかに

し、p63/p51 下流で転写制御を受ける遺伝子が p53 とは異なるものが存在する可能性が示唆された。p63/p51 の活性化機構は p53 のそれとは異なる可能性が他の研究者により示されており p63/p51 の生物学的機能を考える上で興味深い。今後は、全翻訳領域上にすべてのミスセンス変異を構築し、機能への影響について系統的に解析する手法、データベースの構築に挑戦したい。

D. 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。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimada, A., Kato, S., Enjo, K., Osada, M., Ikawa, Y., Kohno, K., Obinata, M., Kanamaru, R., Ikawa, S., and Ishioka, C. The transcriptional activities of p53 and its homologue p51/p63: similarities and. *Cancer Res*, 59: 2781-6, 1999.
- 2) Kato, S., Shimada, A., Osada, M., Ikawa, S., Obinata, M., Nakagawara, A., Kanamaru, R., and Ishioka, C. Effects of p51/p63 missense mutations on transcriptional activities of p53 downstream gene promoters. *Cancer Res*, 59: 5908-11, 1999.
- 3) Sunahara, M., Shishikura, T., Takahashi, M., Todo, S., Yamamoto, N., Kimura, H., Kato, S., Ishioka, C., Ikawa, S., Ikawa, Y., and Nakagawara, A. Mutational analysis of p51A/TAp63gamma, a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene*, 18: 3761-5, 1999.
- 4) Osada, M., Ishioka, C., Ichinohasama, R.,