

Kadowaki, I., Murakawa, Y., Watanabe, M., Kanamaru, R., and Ikawa, S. Influence of p53 mutation on pathological grade, but not prognosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Drug Des*, 14: 107-114, 1999.

5) Yamashita, Y., Sagawa, T., Fujimoto, T., Sugawara, T., Yamada, H., Hoshi, N., Sakuragi, N., Ishioka, C. and Fujimoto, S. BRCA1 mutation testing for Japanese patients with ovarian cancer in breast cancer screening. *Breast Cancer Res. Tr.*, 58: 11-17, 1999.

6) Bell, D. W., Wahrer, D. C., Kang, D. H., MacMahon, M. S., FitzGerald, M. G., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Krainer, M., and Haber, D. A. Common nonsense mutations in RAD52. *Cancer Res*, 59: 3883-8, 1999.

7) Shafman, T. D., Levitz, S., Nixon, A. J., Gibans, L. A., Nichols, K. E., Bell, D. W., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Gelman, R., Garber, J., Harris, J. R., and Haber, D. A. Prevalence of germline truncating mutations in ATM in women with a second breast cancer after radiation therapy for a contralateral tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 27: 124-129, 2000.

8) Nichols, K. E., Levitz, S., Shannon, K. E., Wahrer, D. C., Bell, D. W., Chang, G., Hegde, S., Neuberg, D., Shafman, T., Tarbell, N. J., Mauch, P., Ishioka, C., Haber, D. A., and Diller, L. Heterozygous Germline ATM Mutations Do Not Contribute to Radiation- Associated Malignancies After Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol*, 17: 1259-1266, 1999.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

（分担）研究報告書

胎児性幹細胞株の樹立

（分担）研究者 中辻 憲夫

国立遺伝学研究所系統生物研究センター
教授

研究要旨 3種類のマウス系統から新たな胚幹細胞株（ES細胞株）の樹立を行ない、生殖系列キメラ形成能をもつ細胞株であることを確認した。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

ES細胞株を樹立するマウス系統としては、広く使われている129系統に比較して脳機能などが優れているC57BL/6系統と日本産鼠から遺伝研において近交化されたMSM系統を用いた。MSM系統は通常のマウス系統に比較して野生鼠がもつ正常な性質を保有しており、脳機能解析や遺伝子マッピングに有用である。また新たに、動物行動テストによっ

て極めて優れた成績を示すことが明らかになった韓国産野生鼠由来の近交系統SWNについてもES細胞株樹立を行なった。細胞株樹立条件の細部を検討してES細胞株を樹立し、正常核型を持つものを選別したのちに、キメラ形成能について検定した。作られたキメラマウスについては、交配実験を行なって生殖系列キメラとなっているかを検定した。また、ES細胞を凝集させて胚様体を作ることなどにより、様々な体細胞系列への分化を引き起こさせる方法を検討した。

C. 研究結果

C57BL/6系統とMSM系統から樹立した数種類のES細胞株について、これらの細胞株が正常核型を持つことを確認したのちに、キメラ形成能の検定を行った。C57BL/6系統ES細胞株については、まず比較的継代数の少ない段階のES細胞を

使用して、ICR 系統 8 細胞期胚と集合させることによるキメラ作成を試みたところ、寄与率の高いキメラマウスを得ることができ、これらを交配することにより生殖系列への寄与能力が高い ES 細胞株であることを確認できた。一方、MSM 系統から樹立した ES 細胞株についても多数の細胞株についてキメラ形成能を検定してそのうち少数の株ではキメラマウスの作成に成功した。これらを交配したところ、生殖系列キメラが存在しており、生殖系列への寄与能力を持つ MSM 系統由来の ES 細胞株を得ることができた。

また、数種類の動物行動試験の結果から、他のマウス系統に比較して極めて高い脳機能を持つと判断された韓国産鼠由来近交系統 SWN から樹立した数種類 ES 細胞株を用いてキメラマウスを作成したところ、極めて高い寄与率のキメラマウスが得られた。

D. 考察

これら新たに樹立して生殖系列への寄与能を確認した ES 細胞株は、今後これまでに使用されている 129 系統由来 ES 細胞などと異なる有用性を持つと考えられる。一方、ES 細胞を用いて細胞凝集塊を作り、胚様体を分化させることによる機能細胞の分化実験を行なったところ、博動する

心筋細胞や、血島・血管系と血球細胞の集団を分化させることができた。

E. 結論

3 種類のマウス系統から新たな ES 細胞株を樹立して、生殖系列キメラ形成能を持つことを確認できた。現在広く使われている 129 系統に比較して、脳機能などの研究に有用であると思われる。特に動物行動テストにおいて極めて高い成績を示す韓国産鼠由来の近交系統 SWN を用いて ES 細胞株の樹立に成功しキメラ形成能を確認したことは、今後有用な研究材料を提供すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanno, Y., Tamura, M., Chuma, S., Sakurai, T., Machida, T. and Nakatsui, N. A cystatin-related gene, *testatin/cresp*, shows male-specific expression in germ and somatic cells from the initial stage of murine gonadal sex-differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 777-784 (1999).

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

中辻憲夫. ヒト ES 細胞株の樹立とその意義. 最新医学 54, 2755-2763 (1999).

分担研究報告書

ヒト肝細胞の培養と人工臓器への応用

分担研究者 永森静志 東京慈恵会医科大学 助教授

研究要旨

ヒト肝由来細胞株がヒト肝に代わる人工臓器として、応用可能であるか肝特異蛋白産生、薬物代謝能の面より検討した。バイオリアクターとしては従来のリアクターの欠点を克服し高密度、大量培養が可能で、3次元配列培養が可能なラジアルフロー型バイオリアクターを使用した。このシステムでは単位細胞数あたり産生されるアルブミン量は単層培養法の約3倍となった。アルブミンと、AFPの産生量の比率は、両細胞株ともバイオリアクターでの培養では、アルブミン/ AFP比は増加し、正常肝に類似の性格を示すようになった。薬物代謝能はチトクローム P450 活性とカルボキシエステラーゼ活性を有している本システムは多岐にわたり肝の本来の機能を発現し、人工肝としての応用が可能と考えられる

A. 研究目的：

肝臓は生体内で最も大きな臓器であり、その機能は蛋白代謝、脂質代謝、糖代謝、薬物代謝、さらには微量な生理活性物質の産生など、生体内工場としてきわめて重要な働きをしている。これらの機能を補助あるいは代替可能な人工臓器を開発するには、肝本来の性質を維持する優秀な細胞の開発と、細胞の機能を十分に発揮させることが可能なバイオリアクターが必要である。今回の研究では、従来より報告者らが維持している、肝特異蛋白産生能を有するヒト肝由来細胞株 (FLC) を用いて、ラジアルフロー型バイオリアクターで培養した際の、肝特異蛋白産生量や各蛋白の産生量の比の変化を算出し、代用人工肝としてのこのシステムの機能を評価する。さらに人工肝補助装置の機能として重要な意義を有する、薬物代謝能についても検討し、人工肝への応用の可能性を検討する。

B. 研究方法：

1. 使用する細胞株 報告者らが肝癌患者より株化樹立した、FLC-4、FLC-7株を使用する。両細胞株ともに肝特異蛋白である、アルブミン AFPの産生能を有している。

2. 培養法

a. 単層培養法

プラスチックシャーレに FLC細胞を播種し 2%FCS 添加 ASF104 (培養液) で培養する。

b. ラジアルフロー型バイオリアクターによる3次元培養

あらかじめ 175cm² のフラスコを用いて 1x10⁸ 個まで FLC細胞を増殖させる。2%EDTA 添加のトリプシンで細胞をはが

し、200ml 容量のラジアルフロー型バイオリアクター内に播種する。培養液は 2%FCS 添加 ASF104 を使用する。細胞は培養液の流れとともに3次元単体の内部や表面に接着し増殖を開始する。培養液中の酸素やグルコース濃度で細胞の増殖の程度を知ることができる。培地の供給、酸素やアルカリの添加はコンピューター制御され、pH・酸素濃度は自動制御される。

3. 測定法 (アルブミン AFP)

アルブミン、AFP はヒト血清由来アルブミン、AFP をスタンダードとして ELISA 法により定量した。

4. antipyrine の測定

ラジアルフロー型バイオリアクターで7日間培養した FLC4細胞の環流中培養液に最終濃度 8mg/ml となるように antipyrine を添加する。時間毎に分注したサンプルに diethylether, dichloroethane, isopropanol (60 : 40 : 1) を加え攪拌。1500回転で15分間遠心する。上清は吸引し、残りを乾燥させ mobile buffer に可溶化後、reverse phase column (Superiorex ODS) に apply し溶出させた。溶出 pattern は UV detector で 254nm の波長の吸光度の変化でとらえた。吸光度のピークから 0 から 8mg/ml の antipyrine を定量した。

5. Nafamostat mesilate の測定

HCl を加えて酸性にした培養液を Sep-Pak C18 カートリッジに apply する。これを HCl で洗浄後、formic acid を含んだエタノールで抽出し乾燥する。このサンプルを formic acid を含んだメタノールで可溶化し Milex-HA filter unit で不溶成分を除去する。

抽出調整した試料は HPLC (島津) で測定した。使用したカラムは Shim-pack CLC ODS column で 0.03M sodium 1-hexanesulphonate, 0.1M acetic acid を含んだ acetonitrile で分離し fluorescence detector で測定した。

C. 研究結果 :

1. アルブミン 産生量 : 単層培養 (subconfluent) における FLC-4, 7 株の産生するアルブミン量はそれぞれ $450 \mu\text{g/day}/10^6\text{cells}$, $2.7 \mu\text{g/day}/10^6\text{cells}$ であった。一方ラジアルフロー型バイオリアクターでの 3 次元培養では FLC-4, 7 株それぞれで $1314 \mu\text{g/day}/10^6\text{cells}$, $6.2 \mu\text{g/day}/10^6\text{cells}$ であった。

2. AFP 産生量 : 単層培養 (subconfluent) における FLC-4, 7 株の産生する AFP 量はそれぞれ $190\text{ng/day}/10^6\text{cells}$, $6 \mu\text{g/day}/10^6\text{cells}$ であった。一方ラジアルフロー型バイオリアクターでの 3 次元培養では FLC-4, 7 株それぞれで $0.12\text{ng/day}/10^6\text{cells}$, $2 \mu\text{g/day}/10^6\text{cells}$ であった。

3. 単層培養下と、ラジアルフロー型バイオリアクター培養下とのアルブミン産生量 / AFP 産生量比の変動について : FLC-4 細胞のラジアルフロー型バイオリアクターでのアルブミン産生量は単層培養の約 3 倍となり、AFP 産生量は 1/1000 以下となった。FLC-7 ではアルブミンは 2.5 倍、AFP は 1/3 となった。

4. ラジアルフロー型バイオリアクターで培養の安定性 : ラジアルフロー型バイオリアクターでの培養は、培養開始より 15 日頃より酸素消費量が増加し、急速な増殖が始まり、30 日前後まで持続した。以後酸素消費はプラトーに達し 40 数日まで培養可能であることを確認した。

5. アンチピリンの代謝

薬物代謝実験のため、FLC4細胞を50mlバイオリアクターで培養した。細胞増殖が安定した、培養14日目に、アンチピリンを培地中へ8.0 mg/mlの濃度で添加した。72 hr後に、濃度は5.9 mg/mlへ減少した。アンチピリンはチトクロームP450により代謝され、FLC4細胞は、CYP 活性をもつことが確認された。

6. Nafamostat mesilate (FUT) 代謝

FUTは透析などの体外循環療法時に使われる抗凝固剤である。FLC4を50mlリアクターで培養し、FUT代謝実験をおこなった。FLC4

により、FUT濃度が減り、代謝産物のPGBA(p-guanidinobenzoic acid)とAN(amidinonaphthol)の増加を認めた。FUTはカルボキシルエステラーゼで代謝されることが明らかになっており、FLC4細胞はカルボキシルエステラーゼを有することが証明された。

D. 考察 : ラジアルフロー型バイオリアクターでの肝由来細胞の培養は 40 日以上施行しても、培養上の問題点はなくさらに長期の培養も可能である。細胞の増殖も酸素消費量がプラトーになることより、contact inhibition がかかると思われる。この性質はシステムの最大機能を長期に発揮できることであり、人工肝として有用な性質である。さらに蛋白産生面からは、アルブミン産生能はヒト肝の産生量に匹敵し、代用肝としての一部の機能を十分に有していた。今後その他の機能についても検討予定である。さらにラジアルフロー型バイオリアクターの有する重要な性質は、細胞本来の機能を発現する事である。実際アルブミン / AFP 産生比につき検討すると、アルブミン産生比が増加し正常肝に近似の機能を示すようになった。

アンチピリンはFLC4により代謝され、培地中の濃度の減少を認めた。これによりFLC4は、CYP活性を備えることがわかった。アンチピリンは主に、CYP1A, 2B6, 2C9, 3Aなどで代謝される事がわかっているが、今後FLC細胞の有するCYP分子種についてはさらに研究が必要である。カルボキシルエステラーゼに関しては、ナファモスタットの代謝活性も認め、カルボキシルエステラーゼの存在が確認された。カルボキシルエステラーゼは、ester, amide, thioesterなどの結合を分解する。そのため、多くの環境化学物質、医薬品、殺虫剤などを代謝する重要な酵素である。また、総マイクロソーム蛋白量の10%を占める重量な蛋白である。このようにこのシステムで薬物代謝に重要な役割を担う酵素を発現している事が確認されたことは、人工肝の開発に大きな可能性を示している。

E. 結論 : ヒト肝由来細胞株をラジアルフロー型バイオリアクターで培養し、肝の機能として重要な意義を有する肝特異蛋白産生能と、薬物代謝能を有している事が示された。本システムがヒト肝を補助あるいは代替可能な人工肝として開発可能な装置であることを確認した。

F.研究発表

1.論文発表

1. M.Kawada, S.Nagamori, H.Aizaki, K.Fukaya, M.Niiya, T.Matsuura, H.Sujino, S.Hasumura, H.Yoshida, S.Mizutani, H.Ikenaga. Massive Culture of Human liver Cancer Cells in a Newly Developed Radial Flow Bioreactor System: Ultrafine Structure of Functionally-Enhanced Hapatocarcinoma Cell Lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 34 (2) :109-115,1998.
2. T.Matsuura, M.Kawada, S.Hasumura, H.Sujino, S.Nagamori, T.Obata, M.Yamaguchi, Y.Hatoba, H.Tanaka, Y.Suzuki, H.Shimizu, Y.Unemura, S.Kojima, H.Aizaki, S.Mizutani, H.Ikenaga. High Density Culture of Immortalized Liver Endothelial Cells in the Radial-Flow Bioreactor for Development of an Artificial Liver. *Int. J. Artif Organs*. 21 (4) : 229-234, 1998.
3. H.Aizaki, Y.Aoki, T.Harada, K.Ishii, T.Suzuki, S. Nagamori, G Toda, Y. Matsuura, T.Miyamura. Full-length complementary DNA of Hepatitis C virus genome from an infectious blood sample. *Hepatology* 27 (2) : 621-627, 1998
4. Matsuura T., Hasumura S., Nagamori S., and Murakami K. :Retinol Esterification Activity Contributes to Retinol Transport in Stellate Cells. *CELL STRUCTURE AND FUNCTION* ,24:111-116,1999.
5. S.Nagamori , S. Hasumura, T. Matsuura, H. Aizaki, M. Kawada. Developments in Bioartificial Liver Research: Concept, Functionality and Application. *J Gastroenterology* (in press)
6. 松浦知和 人工肝に利用する細胞－肝実質細胞と非実質細胞. *組織培養工学* 23:288-291,1997.
7. 川田雅昭, 相崎英樹, 松浦知和, 蓮村哲, 永森静志, 清水英佑. 肝臓の代謝機能検定利用－In Vivo に代わって－. *組織培養工学* 23:307-309,1997.
8. 川田雅昭, 永森静志, 松浦知和, 蓮村哲, 相崎英樹. ラジアルフロー型バイオリアクターシステムによる人工肝補助装置. 肝臓病の最前線 1997(8.人工肝の現状と問題点－将来の展開), 中外医学社 :314-318,1997.
9. 蓮村哲, 松浦知和, 相崎英樹, 川田雅昭, 清水英佑, 水谷 悟, 永森静志. ヒト由来肝癌細胞を用いたラジアルフロー型バ

イオリアクターによるアルブミン大量産生. *人工血液* 5:33-37,1997.

10. 川田雅昭, 永森静志. 新しい長期三次元高密度大量培養法による人工肝補助装置－ラジアルフロー型バイオリアクターの機能評価 人工肝の現状と問題点－(将来の展開－). *肝臓* 38:268-282,1997.
 11. 永森静志. 特集に寄せて (特集 人工肝臓への道－肝細胞とバイオリアクターの進歩). *組織培養工学* 23:280-283,1997.
 12. 永森静志, 川田雅昭, 松浦知和, 蓮村 哲: 人工臓器 (人工肝臓) (渡辺明治編, 臨床アルブミン学, iv 治療, 検査への応用), メディカルレビュー社, :265-272,1999.
 13. 細川正清, 篠原洋子, 塚田英子, 田中陽子, 川田雅昭, 松浦知和, 蓮村 哲, 永森静志, 千葉 寛: 薬物代謝研究におけるヒト肝由来細胞の有用性. *Tiss.Cult.Res.Commun.* 18:245-252,1999.
 14. 村上孝司, 山田雄次, 済木育夫, 松浦知和, 蓮村 哲, 永森静志: 株化肝細胞の遺伝子発現 *Tiss.Cult.Res.Commun.* 18:221-228,1999.
 15. 相崎英樹, 永森静志, 青木陽一郎, 石井孝司, 鈴木哲朗, 松浦善治: C型肝炎ウイルス研究におけるヒト肝由来細胞の応用; 効率的なC型肝炎ウイルス増殖系の構築. *Tiss.Cult.Res.Commun.* 18:265-278,1999.
 16. 松浦知和, 川田雅昭, 蓮村 哲, 永森静志: 人工肝へのステムセルの応用. *組織培養工学* ,25 (2):30(78)-33(81),1999.
- ### 2.学会発表

1. 川田雅昭, 永森静志, 相崎英樹, 松浦知和, 蓮村哲, 清水英佑. 人工肝補助装置を用いた肝解毒機能の検討. 第1回肝臓学会大会 (盛岡市) 1997
2. 川田雅昭, 相崎英樹, 松浦知和, 蓮村哲, 永森静志, 鈴木勇司, 清水英佑. ヒト肝細胞を用いた人工肝補助装置における薬物代謝の検討－ラジアルフロー型バイオリアクターシステムでの培養－日本肝臓学会総会 (名古屋市) 1997
3. S.Nagamori, M.Kawada, H.Aizaki, K.Fukaya, M.Niiya, T.Matsuura, H.Sujino, S.Hasumura, S.Mizutani, H.Ikanaga. A New Liver Support System Composed of Functional Human Liver Cells and Radial Flow Bioreactor. *Internal Congress on Hepatocytes-Applications in Cell Biology Toxicology and Medicine.* (Tuebingen) September 1997
4. 篠原洋子, 千葉寛, 清水英佑, 松浦知和, 永森静志. 新規ヒト由来肝細胞を用いた薬物代謝酵素誘導の評価. 第118回日

本薬学会（京都市）1997

5. 川田雅昭、清水英佑、松浦知和、蓮村哲、永森静志 不死化類洞内皮細胞の樹立とその高密度大量培養—ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて— 1998 日本消化器関連学会週間、1998

6. T.Matsuura, M.Kawadda, H.Sujino, S.Hasumura, S.Nagamori, H.Shimizu. VitamineA metabolism of immortalized hepatic stellate cells in the bioreactor. 9th ISCHS, New zealand.1998.

分担研究報告書

研究課題；臍帯血移植と造血幹細胞に関する研究

分担研究者	原 宏	(兵庫医科大学 輸血学 教授)
研究協力者	甲斐 俊朗	(兵庫医科大学 輸血部助教授)
	三澤 真人	(兵庫医科大学 輸血部)
	五熊 丈義	(兵庫医科大学 輸血部)
	水沢 博	(国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部第三室)

研究要旨 近畿臍帯血バンクにおける臍帯血の収集状況と臍帯血を供給した状況を報告する。さらに、臍帯血造血幹細胞の *in vivo* 測定法の改良を試みた。即ち、bone morphogenic proteins(BMP)を骨由来の不溶性コラーゲンと混合して、BMP カクテルを作り、このカクテルへ臍帯血由来の Lin(-)細胞を付着させた後、SCID マウスの筋膜下に挿入し、4・6・8週後に回収した。この回収した組織をトリプシン処理し、メチルセルロース培養にて造血細胞のコロニー形成を行い多数の造血細胞から成るコロニーを認めた。現在、これらのコロニー中にヒト細胞由来のコロニーをPCR法にて確認中である。

1、近畿臍帯血バンクの現状とホームページへの掲載

1995年に近畿地区の5医療機関（関西医科大学、京都府立医科大学、京都府赤十字血液センター、奈良県立医科大学、兵庫医科大学）が協力して近畿臍帯血バンクは作られた。しかし、1999年四月より厚生省の補助を受けるに当たり査察を受けた結果、兵庫医科大学のみ補助を受けることになり、現在は、兵庫臍帯血バンクとして活動を続けている。平成12年2月現在、512標本が凍結保存され提供可能標本は224標本、出産6ヶ月後の出生児の健康調査表が回収されていない仮登録標本が288標本ある。1997年5月より、移植のための臍帯血の供給開始を公にした結果、13の移植施設に29（27患者：2回の臍帯血移植をした患者2名）の臍帯血標本を供給し、移植された1）。

猶、登録された臍帯血は水沢博先生が作られたホームページ（<http://cellbank.nihs.go.jp/cblbank/>）に掲載され、臍帯血移植施設等で移植用臍帯血の検索に利用されている。

2、兵庫臍帯血バンクの現状

1995年の臍帯血バンク設立より2000年1月末までに各採取医療機関（表1参照）において採取され搬送された臍帯血は780標本であり、凍結保存可能であった臍帯血は375標本である。採取された臍帯血780の中で439標本は量不足（臍帯血量50ml未満は凍結保存していない）、書類の不備、羊水混濁、家族歴に問題、出産後24時間以上経過等の理由で凍結保存されず、研究用に利用された。その中で165標本が正式に登録され、14標本が既に移植に提供され、利用された。141標本が仮登録中であり、出生児の6ヶ月の健康調査に問題のない児の臍帯血は正式に登録される。35標本が廃棄されているがその理由は表2に示したように母体血のHbc抗体陽性、HLA判定不能が多い。

3、ヒト造血幹細胞の *In Vivo* 測定法の改良

A. 研究目的：当初、骨形成因子として発見され

A. 研究目的：当初、骨形成因子として発見された bone morphogenetic proteins(BMP)はTGF- β ファミリーに分類され、胎生期における体軸形成、初期胚からの中胚葉への誘導等、様々な器官形成に関わっている事が報告されている。従来、ヒト造血幹細胞の *in vivo* 測定には少量の放射線照射したSCIDマウスに相当数の造血幹細胞を静脈内に投与し、その後のヒト血液細胞の存在をPCR等で僅かに存在するヒト細胞の有無を確認していた。この様な方法では、ヒト臍帯血を *Ev vivo expansion* した細胞分画中の造血幹細胞を定量的に把握することは困難であり、新しい測定法の開発を試みた。

B. 研究方法

(1) ヒト Lin(-)細胞：上記の臍帯血採取施設において採取・搬送された臍帯血で採取料不足の標本より比重遠心により単核球分画を得た。この単核球分画を移植用臍帯血と同様にして別の液体窒素タンクに、凍結保存した標本を利用した。解凍後、磁気ビーズ法により標識された単クローン抗体を用いて、CD2,3(T),19,24(B),16,56(NK),14,66b(N),Gly A 陽性細胞を除去し、残りの細胞を Lin(-)細胞分画として用いた。

(2) BMP カクテルの作成と細胞付着：ヒト臍帯血から分離した Lin(-)細胞 4×10^3 を BMP カクテル(BMP130 μ g を牛骨から抽出した不溶性コラーゲン(IBC)40mg に吸着)に加えて37 $^{\circ}$ C、2時間、静置した。(2) BMP カクテルの作成と細胞付着：ヒト臍帯血から分離した Lin(-)細胞 4×10^3 を BMP カクテル(BMP130 μ g を牛骨から抽出した不溶性コラーゲン(IBC)40mg に吸着)に加えて37 $^{\circ}$ C、2時間、静置した。

(3) ヒト造血細胞の確認：ヒト Lin(-)cells を付着させた BMP カクテルを SCID マウスの筋膜下に埋没させ、4、6、8 週間後に筋膜下から、

形成された骨を外科的に摘出、これをトリプシン処理し、単細胞浮遊液にして、 1×10^3 をメチルセルロース培養して、造血細胞からなる細胞集団であるコロニーを測定した。

C. 研究結果：SCID マウスより得られた単細胞浮遊液の細胞よりメチルセルロース培養により培養14日目にはそれぞれ100~200ヶの造血細胞のコロニー形成を確認した。

D. 考察：このようにして造血幹細胞の測定を試みている。残された最大の問題は、1) これらのコロニーがヒト細胞由来か否かを確認する必要がある。2) 更に、SCID マウスを用いて、3世代以上のヒト細胞が造血を続けることを確認することが重要である。まず第1の課題にたいしては、個々にコロニー取り出し、その由来をヒト特異的なプライマーを使い PCR 法等にて現在確認中である。

研究発表

1、論文発表

- 1) 甲斐俊朗(1999)成人の臍帯血移植.臨床病理,臨時増刊(110),48-53.
- 2) 谷脇清助,原 宏(1999)供血者および骨髄、臍帯血提供者の前検査.臨床病理,臨時増刊(110),113-123.
- 3) 原 宏(1999)おわりに-遺伝子治療を含めた未来への展開.臨床病理,臨時増刊(110),134-138.
- 4) 甲斐俊朗,原 宏(1999)わが国の臍帯血移植の現状と展望.医学のあゆみ,190(5),536-539.
- 5) 王 紅心, 西岡啓介, 五熊丈義, 山口雅生, 三澤真人, 甲斐俊朗, 原 宏(1999)造血幹細胞におけるテロメラーゼ活性の検討.兵庫医科大学医学会雑誌,24(1),43-48.
- 6) 甲斐俊朗,原 宏(1999)臍帯血バンクの現状と未来像.日本輸血学会雑誌,45(4),549-552.

2、学会発表

- 1) 西岡 啓介,五熊丈義,三澤真人,甲斐俊朗,原宏,辻野吉昭(1999)臍帯血よりの CD34+Lin-と CD34-Lin-中の SRC(SCID repopulating cells) の検討.第 61 回日本血液学会総会
- 2) 甲斐俊朗,原 宏,河 敬世(1999) HLA-2 抗原不一致非血縁臍帯血移植の臨床成績.第 61 回日本血液学会総会
- 3) 幸道秀樹,浅野茂隆,甲斐俊朗,原 宏,高梨美乃子(1999) 臍帯血バンクのネットワークの試み.第 61 回日本血液学会総会
- 4) Hara, H., Kai, S., Fujibayashi Y., Takaki N., Misawa, M., Ogata, H., Ogawa, H., Sonoda, Y., Fujimura, H., Yokoyama, S.(1999) Cord Blood Bank in Japan. 10th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion Western Pacific Region.
- 5) 藤林由佳,高木齊子,国分寺 晃,前田和宏,郡谷哲男,谷脇清助,甲斐俊朗,原 宏 (1999) 近畿臍帯血バンク・サブセンターとしての兵庫臍帯血バンク. 第 43 回日本輸血学会近畿支部総会
- 6) 迫 正廣,河 敬世,原 宏.(1999) 近畿臍帯血バンクを介して行った臍帯血幹細胞移植の成績.第 61 回日本血液学会総会
- 7) 甲斐俊朗(1999) 臍帯血移植における合併症:特に生着不全と感染症の合併に関して.第 41 回日本臨床血液学会総会
- 8) 甲斐俊朗 (1999) 臍帯血幹細胞の今後の臨床応用. 第 43 回日本輸血学会近畿支部総会

表1 臍帯血採取医療機関（2000年2月末日現在）

- | | |
|-----------------------|-------------------|
| (1) 岡レディースクリニック | (2) 西宮市立中央病院 産婦人科 |
| (3) 尼崎医療生協病院 産婦人科 | (4) 兵庫医科大学 分娩新生児部 |
| (5) 西神戸医療センター 産科医 | (6) 千船病院 産婦人科 |
| (7) 医療法人社団 吉徳会 あさぎり病院 | (8) 医療法人 パルモア病院院長 |
| (9) 兵庫県立西宮病院 産婦人科 | (10) 山田病院 産婦人科 |
| (11) 市立川西病院 産婦人科 | |

表2 臍帯血の廃棄理由

- | | |
|-----------------------|----|
| (1) 仮登録前廃棄 | 31 |
| 母体血のHBc抗体陽性 | 15 |
| HLA判定不能 | 7 |
| 出生児の奇形 | 2 |
| CMV IgM 抗体陽性 | 1 |
| 母体血の梅毒血清反応（±） | 1 |
| 細菌培養陽性 | 1 |
| (2) 仮登録後廃棄 | 4 |
| 出生児の健康状況調査（6ヶ月後）に問題あり | |
| 出生児に問題あり | 3 |
| 母親の問題あり | 1 |

図1 造血幹細胞のIn vitro 測定の改良

臍帯血より単核球を分離：比重遠心法 (Lymphoprep)



ヒトLin(-)細胞分画：磁気ビーズ法によりCD2,3(T),19,24(B),16,56(NK),
14,66b(N),Gly A 陽性細胞を除去



BMPカクテルの作成：BMP130 μ g を牛骨から抽出した不溶性コラーゲン40Mg
に吸着)



ヒトLin(-)細胞のBMPカクテルへの付着：ヒト臍帯血から分離したLin(-)細胞4 $\times 10^3$ を
BMPカクテル40mgに加えて37℃、2時間、静置。



SCIDマウスの筋膜下にBMPカクテルを挿入



BMPカクテルの回収→トリプシン処理



メチルセルロス法による造血細胞コロニー形成



ヒト細胞のPCRによる確認

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）
総合研究報告書（平成9～11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解析と遺伝子治療のための研究基盤として研究に必要な細胞資源を整備し、高度化する目的で次の2テーマのもとに設定された。

①ヒトがん細胞を中心とする細胞株の開発、収集、供給：本事業は1984年以來行われてきた厚生省細胞バンク事業(JCRB)を支援すべく設定された。細胞株を保存あるいは新たに開発し、品質管理を行い、ヒューマンサイエンス(HS)財団細胞バンクへ供給する。

②幹細胞(stem cell)の開発と応用：胎児性幹細胞(ES細胞)の樹立、ヒト肝細胞による人工肝の開発、臍帯血幹細胞の骨髄移植への応用、上皮系幹細胞の同定を進める。細胞移植、遺伝子治療、人工臓器開発など再生医学への波及効果が期待できる。

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・
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

一マのもとに設定された。

①ヒトがん細胞を中心とする細胞株の開発、収集、供給：本事業は1984年以來行われてきた厚生省細胞バンク事業(JCRB)を支援すべく設定された。ヒトがん細胞株を中心に、細胞株を保存あるいは新たに開発し、品質管理を行い、ヒューマンサイエンス(HS)財団細胞バンクへ供給する。さらにこれらの細胞株の遺伝子変異を系統的に検索し、データベースとして提供する。

②幹細胞(stem cell)の開発と応用：幹細胞の開発は、基礎研究にとって重要であるだけでなく、細胞移植、遺伝子治療、人工臓器開発など再生医学への応用面が広い。胎児性幹細胞(ES細胞)の樹立、ヒト肝細胞による人工肝の開発、臍帯血幹細胞の骨髄移植への応用、上皮系幹細胞の同定を進める。

A. 研究目的

本研究はヒトゲノム解析と遺伝子治療のための研究基盤として研究に必要な細胞資源を整備し、高度化する目的で次の2テ

B. 研究方法

1) 細胞株の親ストックの維持と開発：本研究班のうち細胞株担当 4 研究施設は厚生省/HS 財団細胞バンクをバックアップする。さらに、新たな細胞系を樹立しバンクへ供給する。

2) 細胞株の品質管理と特性解析：マイコプラズマ汚染の検出と除染を行った。細胞株を同定し、混入を検出した。

3) 収集細胞株の遺伝子変異スクリーニング：出芽酵母の発現系を利用しヒトがん培養細胞株の p53 がん抑制遺伝子変異を系統的に検出した。

4) 幹細胞の開発：幹細胞の培養系の樹立を行った。人工肝臓の開発のためにラジアルフロー型バイオリアクターを用いた。

(倫理面への配慮)

基本的に厚生科学審議会答申「ヒト組織の研究開発のあり方」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、患者から Informed consent を得た後に研究に使用する。分担研究者の所属する機関にはそれぞれ IRB が設置されており、細胞の採取、研究に当たっては、IRB の同意を得る。

C. 研究結果及び考察

1) 細胞バンク支援：

本研究組織は、厚生省 JCRB および HS 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。担当する細胞株総数は 155 株、細胞バンク事業の 25% にあたる。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。さらに新規細胞株として、ヒト肺腺がん細胞株、ヒト T 細胞白血病変異株、ヒト肝細胞株、DNA 合成に関する変異株等を樹立、特性分析、品質管理の後、バンクに供給した。

2) ヒトがん由来細胞株の遺伝子変異：出芽酵母機能アッセイ法を用い、p53 がん

抑制遺伝子の変異を系統的に検索し、ヒトがん細胞 144 株のデータを論文および細胞バンクデータベースとしてインターネット上で発表した。さらにストップコドンアッセイ(SC assay)法を開発し、BRCA1, BRCA2, PTEN, APC 等のがん抑制遺伝子の変異検出を可能にした。

3) 幹細胞の開発と応用：

ES 細胞、末梢血および臍帯血幹細胞、ヒト肝細胞、ヒト上皮細胞の幹細胞について研究を行った。

①ES 細胞：近交系 C57BL/6 系統および日本産野生マウス由来近交系 MSM 系統から数種類の ES 細胞株を樹立した。

②ヒト肝細胞：人工肝臓の開発を目的として、ラジアルフロー型バイオリアクターの小型化を行い、ヒト肝由来細胞株 (FLC-4 細胞) を機能を保った状態で長期間にわたって 3 次元培養することに成功した。

③ヒト臍帯造血幹細胞の培養：臍帯血バンクを設立し、275 標本を保存した。生体外で造血幹細胞を増殖させる ex vivo expansion を開発した。

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 3 次元培養系を用い、幹細胞の同定を進めた。ケラチノサイトへ効率的に遺伝子を導入するためアデノウイルスベクターを作製した。

D. 評価

1) 達成度について：

厚生省/HS 財団の細胞バンク事業のバックアップとしての役割は十分に達成した。ヒトがん細胞株 144 株について系統的に p53 がん抑制遺伝子の変異を検出し、データベースとしてインターネット上で公開出来た。研究面では、特に幹細胞を中心に成果があった。遺伝的解析の進んでいる C57BL マウスからも ES 細胞を分離した。ヒト肝細胞を用いて人工肝臓の開発を行

い、実用化に一步近づけた。さらに出芽酵母を用いた新しい遺伝子機能アッセイ法を開拓した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：

本細胞バンク事業はヒトゲノム・遺伝子治療のバックアップのために設定され、実際その目的に従って運用され、生命科学を支えてきた。幹細胞は将来再生医学研究の中心として大きなポテンシャルをもっている。いずれの研究も学術的・国際的・社会的意義を十分に備えている。

3) 今後の展望について：

それ自身が生き物である細胞を取り扱う細胞バンク事業には、細胞を維持管理するバックアップ研究機関が必要である。本班は厚生省/HS 財団細胞バンク事業のおよそ 25%を担当しており、細胞バンクが続く限り支援していく予定である。幹細胞研究は遺伝子治療、人工臓器など、再生医学への応用範囲が広く、今後ますます必要性が高まるものと思われる。

E. 結論

①本研究班は厚生省/HS 財団の細胞バンク事業のバックアップし、ヒトがん細胞株を中心とする 155 株の親株を維持し、品質管理と特性分析を行ってきた。②ヒトがん細胞のがん抑制遺伝子変異を系統的に検索し、インターネット上で公開した。③ES 細胞の樹立、ヒト肝細胞を用いた人工臓器、ヒト臍帯造血幹細胞バンク樹立、上皮系の幹細胞の同定等の幹細胞研究に成果をあげた。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表；251 件

原著論文による発表；37 件

それ以外（レビュー等）の発表；41 件

そのうちの主なもの論文発表学会発表；省略

2) 海外

口頭発表；57 件

原著論文による発表；103 件

それ以外（レビュー等）の発表；8 件

そのうちの主なもの

論文発表；

1. Ohba, M., Ishino, K., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., Huh, N. and Kuroki, T.: Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the η and δ isoforms of protein kinase C. *Mol. Cell Biol.*, **18**: 5199-5207, 1998.
2. 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, M.K., Kanamaru, R. and Kuroki, T.: Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. *Mol. Carcinog.*, **19**: 243-253, 1997.
3. 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.
4. Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, Sakaguchi M, Uemura T, Kondo A, Tanaka N and Namba M: Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. *Transplantation*, 1999 (in press).
5. 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.*, in press.
6. Ishioka, C., Suzuki, T., FitzGerald, M., Krainer, M., Shimodaira, H., Shimada, A., Nomizu, T., Isselbacher, K. J., Haber, D., and Kanamaru, R.: Detection of heterozygous truncating mutations in the BRCA1 and APC genes by using a rapid

screening assay in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **94**: 2449-53, 1997.

7. Krainer, M., Silva-Arrieta, S., FitzGerald, M. G., Shimada, A., Ishioka, C., Kanamaru, R., MacDonald, D. J., Unsal, H., Finkelstein, D. M., Bowcock, A., Isselbacher, K. J., and Haber, D. A. Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. *New England Journal of Medicine*, **336**: 1416-21, 1997.
8. Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. and Katsuki, M. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427-3433, 1998.
9. Nagamori, S. Development of practical artificial liver system: Concept and applications. *J.Gastroenterology* - Review article. (in press)
10. Mizuno T., Kyoizumi S., Suzuki T., Iwamoto K.S. and Seyama T.: Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. *Oncogene* **15**:1455-1460, 1997.

学会発表

1. Namba, M., Asahi, S., Miyazaki, H. and Fukaya, K.: Establishment of a new human hepatocyte cell line expressing various forms of p450. 1998 Congress on In Vitro Biology, May 30-June 3, 1998, Las Vegas
2. Hara, H., Kai, S., Fujibayashi, Y., Takaki, N., Misawa, M., Ogata, H., Ogawa, H., Sonoda, S., Fujimura, H., Yokoyama, S.: Cord Blood Bank in Japan. 10th Meeting of ISBT Regional Congress, Western Pacific Region, Taipei, Taiwan, Nov. 10-12, 1999.

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定も含む)

- ①新規なヒト肝細胞癌由来細胞株 (FLC-4) および当該細胞を培養して有用な高分子を生産する方法 (永森静志) ②肝炎ウイルスの増殖法および装置 (永森静志) ③ミエロペルオキシダーゼ遺伝子機能が欠損しているマウス (小山秀機)。そのほか申請予定 2 件。