

3株はp 53がん抑制遺伝子ノックアウトマウスから分離した皮膚線維芽細胞株である。p 53遺伝子について、ホモ (-/-)、ヘテロ (+/-)、野生型 (+/+) がそろっているため、p 53 遺伝子の機能を調べる上での実験上の価値が高い。

細胞株が生命科学における主要な研究材料になった今日、細胞株の品質が改めて問われている。もし、細胞株がマイコプラズマによって感染していたり、細胞株間で混入がある時には、実験そのものが無駄になり、信頼できないデータを蓄積することになる。実際、最近の報告によれば、米国で乳がん細胞株として広く使われている細胞株のうち3株が、もっとも有名な乳がん細胞株MCF-7の混入によるものであった。本研究では、収集細胞株の品質管理を済ませた後、細胞バンクに登録することになっている。

さらに、これらの細胞株の遺伝子変異の解析にも力を入れている。すなわち、がん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異のスクリーニングに加えて、今回から遺伝子増幅をCGH法で調べることにした。これらのデータは、それ自身でも非常に価値があるが、細胞バンクの利用者にとって有用な情報となるであろう。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度

わが国で樹立された日本人由来細胞株を収集するという目的にしたがって、本年度は28株を収集することができた。また、マウス細胞株として、p 53 がん抑制遺伝子欠損 (-/-) およびその対照としてのヘテロ (+/-) と野生型 (+/+) 細胞株を加えることができた。これらの細胞株はp 53 遺伝子の機能を調べる上で有用な研究材料である。

##### 2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義

本年度に収集した細胞株は今後の医学研究、特にがん研究にとって非常に有用な研究資源となるであろう。その学術的価値は高い。また、収集したヒトがん細胞はすべて、日本人由来である。将来日本人のゲノム解析を行う場合にも有用な研究材料となるであろう。その意味で国際的価値がある。

本細胞バンクの細胞株が広く利用されることにより、医学生物学的研究を促進し、社会的に貢献するであろう。

##### 3) 今後の展望について

ヒトがん細胞株の収集は今後も一貫して続ける

方針である。3年間で100株を越える日本人由来がん細胞株を収集するのを目標としている。初年度野瀬移籍から考えて、これは達成可能と考えられる。

近い将来には日本人の正常細胞株、たとえば株化B細胞株を系統的に収集し、日本人ゲノム・遺伝子解析のための標準試料を提供できるようにしたい。

いずれの場合においてもヒトゲノム・遺伝子解析研究の倫理指針が遵守されねばならないことは言を待たない。

#### 5. 結論

平成12年度には、日本人由来ヒトがん細胞株を28株、およびマウス腫瘍株4株を収集した。それらの細胞株について、細菌、マイコプラズマ感染、細胞株由来動物種の同定、核型同定、遺伝子変異、遺伝子増幅の検索を遂時行う。

#### 5. 研究発表

(分担研究者黒木登志夫分のみ。2000年-2001年2月まで、印刷中を含む。)

##### 1) 国内

口頭発表; 13件  
原著論文による発表; 0件  
それ以外(レビュー等); 3件

そのうちの主なもの

論文発表(レビュー);

1. 黒木登志夫:『遺伝子でガンを攻める』日経サイエンス、2000
2. 黒木登志夫:『がん研究とゲノムの分かちがたい関係』サイアス2000年12月号、19-24、朝日新聞社

学会発表;

1. 黒木登志夫『21世紀のがん研究とがん対策-癌学会総会の討論から』第38回日本癌治療学会総会招請講演、2000年10月22日、仙台市

##### 2) 海外

口頭発表; 6件  
原著論文による発表; 10件  
それ以外(レビュー等); 1件

そのうちの主なもの

論文発表

1. Kashiwagi, M., Ohba, M., Watanabe, H., Ishino, K., Kasahara, K., Sanai, Y., Taya, Y. and Kuroki, T.: PKC $\beta$  associates with cyclin E/cdk2/p21 complex, phosphorylates p21 and inhibits cdk2 kinase in keratinocytes. *Oncogene*. 19, 6334-6341, 2000.
2. Cabodi, S., Calautti, E., Stein, P.L., Kuroki, T. and Dotto, G.P.: A PKC- $\beta$ /Fyn dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation. *Molecular Cell*, 6, 1121-1129, 2000.

学会発表

1. Toshio Kuroki, *Molecular and Cellular Mecha-*

nisms of Skin Carcinogenesis, MEPSA Symposium 2000 "Is cancer a preventable environmental disease", Mt Buller, Australia, December 7-10, 2000.

2. Kashiwagi, M., Ohba, M. & Kuroki, T., PKC $\beta$  associates to cyclin E/cdk2/p21 complex, phosphorylates p21 and inhibits cdk2 kinase in keratinocytes. Japanese-German Workshop 2000, 17-20 November, 2000, Wurzburg, Germany.

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定も含む)

共同研究者・永森静志は培養肝細胞を用いた人工肝装置について国内特許申請中である。

平成12年度厚生科学研究成果として細胞バンクに寄託する培養細胞

ヒトがん細胞株

| 細胞株名         | 由来組織        | 特性              | 樹立者  | 論文   |
|--------------|-------------|-----------------|------|--|
| KYSE-30      | 食道扁平上皮がん    | 遺伝子変異記載         | 嶋田 裕 | Shimada et al.: <i>Cancer</i> , 69, 277, 1992.             |
| KYSE-50      | 食道扁平上皮がん    | 遺伝子変異記載         | 嶋田 裕 | Shimada et al.: <i>Cancer</i> , 69, 277, 1992.             |
| KYSE-70      | 食道扁平上皮がん    | 遺伝子変異記載         | 嶋田 裕 | Shimada et al.: <i>Cancer</i> , 69, 277, 1992.             |
| KP1N         | 膵がん         | 肝転移能あり          | 井口東郎 | Ikeda, et al.: <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 81, 987, 1990. |
| KP1N-L       | 膵がん         | 高肝転移能           | 井口東郎 | Ikeda, et al.: <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 81, 987, 1990. |
| KP3          | 膵がん         | 肝転移能            | 井口東郎 | Ikeda, et al.: <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 81, 987, 1990. |
| KP3-L        | 膵がん         | 高肝転移能           | 井口東郎 | Ikeda, et al.: <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 81, 987, 1990. |
| RERF-LC-TK   | 肺腺がん        | 原発巣より樹立         | 京泉誠之 | -  |
| RERF-G C-FJB | 胃腺がん        | 転移巣より樹立         | 京泉誠之 | -  |
| HNOS         | 口腔内扁平上皮がん   | 高肝転移能           | 柳原五吉 | <i>Intl. J. Oncology</i> , 16, 119, 2000.                  |
| SAT          | 口腔内扁平上皮がん   | 非転移性            | 柳原五吉 | <i>Intl. J. Oncology</i> , 16, 119, 2000.                  |
| HEC-46       | 食道扁平上皮がん    | 非転移性            | 柳原五吉 | <i>Cancer Res.</i> , 53, 5815, 1993.                       |
| FLC-4        | 肝がん         | アルブミン AFP 産出    | 永森静志 | <i>Jikeikai Med. J.</i> 32, 289, 1985.                     |
| NOZ          | 胆のうがん       |                 | 永森静志 | <i>細胞</i> , 15, 195, 1983.                                 |
| KNOCH        | 肝がん、胆管がんの混在 | 胆管がんの特性         | 永森静志 | <i>肝臓</i> , 24, 1358, 1983.                                |
| OCUM-2M      | 胃がん         | リンパ節転移能         | 平川弘聖 | Yasho et al.: <i>Bri. J. Cancer</i> , 72, 1200, 1995.      |
| OCUC-LM2     | 大腸がん        | 肝転移能            | 平川弘聖 | 山田ほか: <i>日本大腸肛門会誌</i> , 47, 40, 1994.                      |
| OCUCh-LM1    | 胆管がん        | 肝転移能            | 平川弘聖 | Yamada et al.: <i>Bri. J. Cancer</i> , 71, 543, 1995.      |
| OCUB-1       | 乳がん         | 転移能なし           | 平川弘聖 | Sawada et al.: <i>Human Cell</i> , 7, 138, 1994.           |
| SKG-IIIa     | 子宮頸がん       |                 | 野沢志朗 | Nozawa et al.: <i>Cancer Res.</i> , 43, 1784, 1983.        |
| SKG-IIIb     | 子宮頸がん       |                 | 野沢志朗 | Nozawa et al.: <i>Cancer Res.</i> , 43, 1784, 1983.        |
| SNG-M        | 子宮体部がん      |                 | 野沢志朗 | Nozawa et al.: <i>Cancer Res.</i> , 37, 1777, 1977.        |
| SNG-II       | 子宮体部がん      |                 | 野沢志朗 | Nozawa et al.: <i>Am. J. Obs. Gyne.</i> , 161, 1079, 1989. |
| RMG-II       | 卵巣がん        |                 | 野沢志朗 | Nozawa et al.: <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 82, 854, 1991. |
| KMRC-1       | 腎がん         | VHL 変異          | 執印太郎 | -  |
| KMRC-2       | 腎がん         | VHL methylation | 執印太郎 | -  |
| KMRC-3       | 腎がん         | VHL 変異          | 執印太郎 | -  |
| KMRC-4       | 腎がん         | VHL 変異          | 執印太郎 | -  |

マウス由来細胞株

| 細胞株名         | 由来組織                   | 特性           | 樹立者  | 論文   |
|--------------|------------------------|--------------|------|--|
| OV3121       | 放射線誘発卵巣腫瘍              | estradiol 産生 | 柳原五吉 | <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 86, 347, 1995.      |
| MSFp53 (-/-) | p53 (-/-) マウス由来皮膚線維芽細胞 | p53 欠損       | 京泉誠之 | Tsukada et al.: <i>Oncogene</i> , 8, 3313, 1993. |
| MSFp53 (+/-) | p54 (+/-) マウス由来皮膚線維芽細胞 | p53 ヘテロ      | 京泉誠之 | Tsukada et al.: <i>Oncogene</i> , 8, 3313, 1993. |
| MSFp53 (-/-) | p55 (+/+) マウス由来皮膚線維芽細胞 | p53 野生型      | 京泉誠之 | Tsukada et al.: <i>Oncogene</i> , 8, 3313, 1993. |

研究課題：ヒトの疾患モデル細胞の研究資源化と細胞バンクの危機管理システムの構築に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

分担研究者：所属施設（財）食品薬品安全センター 秦野研究所

氏名 田中憲穂

## 1. 遺伝子導入および染色体導入細胞株の収集と開発

H12年度収集および樹立した13細胞株(別紙リスト)について、JCRBに登録作業を進める。

①細胞工学的手法で作製されたヒト21番染色体を保有するES細胞(5細胞株)

TT2F、TT2F(#21-7)、TT2F(#21-10)、TT2F(#21-11)、TT2F(#21-5)

これらの細胞株は、鳥取大・細胞工学研究室(押村光雄博士)により開発されたマウスES細胞にヒトの21番染色体を導入して作成されたES細胞株で、ダウン症発症に関する遺伝的な機構解明に極めて有用な細胞である(BBRC, 273, 219-224, 2000)。

②細胞工学的手法で作製されたヒト単一染色体導入DT40細胞(5細胞株)

DT40(neo2)、DT40(neo3)、DT40(neo3p+)、DT40(neo5)、DT40(neo6)

DT40細胞は、相同組替え頻度の極めて高いニワトリB cell由来の細胞である。上記、押村研ではこの細胞にmicrocell-mediated chromosome transfer(MMCT)の技術を用いて、選択的薬剤マーカーを有するヒト単一染色体を導入して染色体ライブラリーを作製している。これらのハイブリッド細胞では導入されたヒトの染色体においても高頻度に相同組換えが起こることから、相同遺伝子配列の導入による染色体切断など、様々な研究に応用する事ができる。

③遺伝子導入など変異マウスより得られた3細胞株

秦野研・遺伝学研究室(渋谷徹博士)の保有する変異マウスより細胞株の樹立を試みた。

主に、化学物質や放射線による突然変異の機構解明に有用な細胞系である。

### 1) gpt delta/ p53 マウス

国立衛生研究所変異遺伝部の能美健彦博士が樹立したgpt deltaマウスは、生体内で点突然変異と染色体上の小欠失を同時に検出することを意図して作製されたtransgenic mouseある。最近、gpt deltaマウスに変異原処理によって誘導されることが知られているによるapoptosisに関与するp53遺伝子を欠損させたgpt delta/ p53ノックアウトマウスが理化学研究所筑波研究所とオリエンタル酵母工業㈱の共同研究により開発された。このマウスの胎児からp53遺伝子が正常なもの(+ / +)およびホモに欠損したもの(- / -)について細胞株を樹立した。この細胞株は、gpt遺伝子の遺伝子突然変異については、変異原で細胞を処理した後、6-Thioguanine(6TG)によってgpt欠損細胞を選択することが出来る。さらに、p53遺伝子の有無が突然変異誘発頻度に及ぼす影響については、正常およびホモ欠損株での頻度を比較することにより、突然変異生成過程におけるp53遺伝子の関与についての検討が可能となる。また、これらの細胞を混合して使用することにより、マウス生体では生じない細胞キメラ状態についての解析も可能となる。

### 2) S1 マウス由来繊維芽細胞

S1マウスはWマウスとともに古くから知られている突然変異で細胞の増殖に関与し、生殖細胞、血液系の細胞および色素細胞の増殖低下をもたらす。ホモ個体では重度の貧血、不妊および致死をもたらす。しかし、特定のアレル間の組み合わせでは致死を回避出来る。これらの遺伝子は相補的に働くことが知られていたが、近年W遺伝子はレセプター型チロシンキナーゼc-Kitを、S1遺伝子はそのリガンド(S1因子)をそれぞれコードしていることがわかった。

S1因子は増殖因子としての効果を持っているので、S1-/-マウスの胎児細胞繊維芽細胞を培養系として確立した。培養S1-/-細胞をフィーダー細胞として用い、単独では増殖が不可能な初代培養細胞を培養し、それに細胞増殖因子を添加するこ

とにより、その細胞に増殖能を与えることが出来、またその細胞が必要とする増殖因子の同定やバイオアッセイが可能となり、種々の細胞における増殖因子の検索に有用な試験系となる可能性がある。

### 3) p 遺伝子変異マウス由来細胞株

マウス p 遺伝子は、メラニンの産生を規定する遺伝子であり、体毛や色素網膜細胞などの色を規定するために、古くから多くの突然変異遺伝子が分離されている。その中でも、pun (p unstable)

遺伝子は、P 遺伝子の主要なエクソンが重複したもので、トランスポゾン様の構造をもっている。そのため、遺伝子内で組換えを容易に起こし、野生型遺伝子 (P 遺伝子) に復帰することが知られている。遺伝子内組換えは、自然復帰突然変異がおき易いが、種々の変異原を処理することによってその頻度は上昇する。この突然変異によって細胞がメラニン産生を開始するため、顕微鏡下で容

易に観察することが出来る。また、培養細胞系であるので、変異した細胞を増殖させて、その突然変異を分子レベルで解析する可能である。

そこで、pun マウス網膜細胞を培養系に移し変異原による遺伝子内組換えの検出系としての利用を試みた。

2. H11 年度、に樹立した遺伝子導入細胞株、6 株を JCRB に登録寄託する。

これらは大阪大学寄託動物より樹立したものである (別紙リスト)

3. 秦野研細胞バンク保有 FDSC 株の JCRB への寄託・登録

秦野研で保有している 19 種の FDSC 細胞株を JCRB に登録寄託する (別紙リスト)。

論文: 中川ゆづき、田中憲穂: 細胞株の有用性と品質管理. アニテックス 12, 257-261, 2000

#### 平成 12 年度寄託細胞一覧

|    | 細胞番号     | 細胞名                 | コメント                                   |
|----|----------|---------------------|--|
| 1  | FDSC0006 | NEC14               | MC210 処理したもの。子ロットの 072691 は蛍光法で陰性であった。 |
| 2  | FDSC0010 | MKN7                | MC210 処理。処理後の検査では、蛍光法で陰性。              |
| 3  | FDSC0024 | RCN-9               |  |
| 4  | FDSC0026 | SKG-IIIb            |  |
| 5  | FDSC0027 | RMG-I               | 4-C-7 に 3 本。                           |
| 6  | FDSC0028 | RMG-II              |  |
| 7  | FDSC0029 | SNG-II              |  |
| 8  | FDSC0030 | SNG-M               | MC210 処理したもの。親ロット不明。                   |
| 9  | FDSC0031 | SKN                 | MC210 処理したもの。親ロット不明。                   |
| 10 | FDSC0033 | RKN                 | MC210 処理したもの。親ロット不明。                   |
| 11 | FDSC0038 | Lu-134-B            | MC210 処理したもの。親ロット不明。後日の蛍光法の検査では陰性。     |
| 12 | FDSC0039 | Lu-135              | 親ロットはマイコ陽性の 122089。除染したかどうか不明。要検査。     |
| 13 | FDSC0042 | HTC/C3              | 同じ物が 4-B-1 に 6 本。                      |
| 14 | FDSC0048 | HMC-1-8             | マイコ陽性のデポジット (020690) を除染したもの。          |
| 15 | FDSC0049 | STC1                | マイコ陽性デポジット (032590) を除染したもの。           |
| 16 | FDSC0050 | OSC-19              | 所在不明。おそらく液相タンク。                        |
| 17 | FDSC0051 | OSC-20              |  |
| 18 | FDSC0052 | NCC-IT-A3           | 要マイコ検査。                                |
| 19 | FDSC0053 | L5178Y TK+/- 3.7.2c |  |

20000393

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

**【再生医学と生命科学】 生体工学技術 細胞と組織の凍結保存と解凍  
操作(解説/特集/抄録あり)**

増井徹, 水沢博

蛋白質・核酸・酵素(0039-9450)45 巻 13 号 Page2195-2201(2000.09)

**培養細胞系でのマイコプラズマの PCR 検出法(原著論文/抄録あり)**

高田容子, 増井徹, 田辺秀之, 原澤亮, 水澤博

組織培養研究(0912-3636)19 巻 3 号 Page131-138(2000.09)

**厚生省細胞バンクにおけるヒト組織・細胞取り扱い倫理問題への取り組み(解説)**

増井徹, 祖父尼敏雄, 石井美智子, 今西由紀夫, 安井英明, 高田容子,  
林真, 水沢博

組織培養研究(0912-3636)19 巻 1 号 Page1-15(2000.03)

