

抜についての具体的検討もしなければならぬと考えている。いずれにせよ、長期的な視野で考えてゆかなければならぬ問題であろう。

E. 結論

1. 当研究班では、生命科学研究の推進に不可欠な培養細胞研究資源の維持管理を目的として設立された厚生労働省細胞バンクの基盤整備の一環としての研究を実施している。今期は特にヒトに由来する培養細胞のクロスコンタミネーションを防止するためにSTR-PCR法を導入して、日常的なバンク業務のプロセスに組み込むことを検討している。現在までに、当バンクで収集したヒト由来の培養細胞株約300種についてこの方法で検討した結果、約5%に相当する16種の細胞がクロスコンタミネーションを起こしていることを明らかにした。その結果は、実験データを添えてホームページ上に公開し、利用者たる研究者に対して注意を呼びかけている。
2. 培養細胞のマイコプラズマ汚染はこれまでに引き続いて深刻な問題である。現在までに、PCR法ならびに指標細胞を用いた蛍光染色法によって汚染の有無を確認し、汚染を確認した場合にはキノロン系抗生物質MC210によって除染作業を実施している。その結果、細胞バンクとして公開し分譲している細胞はマイコプラズマ陰性となっている。
また、血清より混入すると思われるBVDVについては、PCR法の導入により検出感度が高まり昨年より検査会社に委託して検査を開始した。感度の上昇により検出が不安定となる可能性があるため、原澤によってクロスチェックを実施した。その結果、良く一致する結果を得たので、今後、細胞バンクにおける品質管理として実施する体制を確立することを検討する。
3. 今年度は、新たに49種の細胞を登録した。その多くはヒトに由来する細胞株で、日本人に由来するものが大半を占めた。また、上記1、2で示したように、クロスコンタミネーションが無いこと、また、マイコプラズマ汚染が無いものを品質管理として実施し公開した。
4. 細胞バンク管理のためのコンピュータシステムの整備を進めた。細胞の培養、品質管理に伴って発生する各種情報、画像データをデータベースに記録し、データの整備を進めた。また、これらのデータを更新すると同時に利用者に公開しているホームページのデータも更新し、リアルタイムで情報が提供できるように努めている。

F. 健康危険情報

細胞の培養に用いられる牛血清からPCR法によって頻繁にウシ下痢症ウイルス(BVDV)が検出されている。BVDVの宿主域は狭く、PCR法という高感度な検出法で始めて検出されるようになったことやウシ由来の細胞でしか増殖しないようなので、ヒトに対して大きな問題を引き起こすことは無いと考えられるが、検出されない製品のほうがより良いと考えられ、注意だけはしておいたほうが良い問題であると感じる。今後培養細胞が治療用に頻繁に利用されるようになると思われるので、培養用のウシ血清の品質管理を業者に対してどのように要求するかについて検討する必要があるかもしれない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 増井徹 ガイドライン 第8回組織移植医療研究会、2001(印刷中)。
松村外志張、増井徹、宇都木伸、ヒト細胞・組織の取扱に関する倫理的諸問題、in「バイオ医薬品の品質・安全性評価」、LIC、2001(印刷中)
2. 宇都木伸、迫田朋子、恒松由記子、野本亀久雄、唄孝一、増井徹、松村外志張、ヒト組織・細胞の取扱いと法・倫理、ジュリスト、1993、2-35、2001。
3. 水沢 博、血清中のウイルス試験、バイオ医薬品の品質・安全評価、LIC、第2章、第4節、pp170-177、2001。
4. 水沢博、増井徹、田辺秀之、ヒト培養細胞：科学と倫理のジレンマ
科学、71(12)、1601-1608(2001)。
5. 増井徹、ヒト由来資料の研究・開発利用と倫理
ファルマシア、38、39-43(2002)。

2. 学会発表

1. 増井徹、高田容子、林 真、水沢 博：正常上皮細胞の密度依存性増殖停止(topoinhibition)で誘導されるヒトEti-1とマウスEti-1の比較
日本組織培養学会第74回大会・第15回日本実験動物代替法学会・合同学術大会
2001年8月30日-9月1日、つくば国際会議場。
2. 田辺秀之、飯塚了太、北條麻紀、高田容子、川原善浩、樽松美治、増井徹、水沢博、STR-PCR法によるHeLa細胞とその亜株についての解析と染色体の性状
日本組織培養学会第74回大会・第15回日本実験

動物代替法学会・合同学術大会

2001年8月30日-9月1日、つくば国際会議場。

3. 高田容子、飯塚了太、峰岸大輔、樽松美治、川原善浩、田辺秀之、増井徹、水沢博、STR-PCR法によるヒト細胞株の品質管理データの標準化に関する検討

日本組織培養学会第74回大会・第15回日本実験動物代替法学会・合同学術大会

2001年8月30日-9月1日、つくば国際会議場。

4. 水沢 博、培養細胞研究資源データベースの構築(シンポジウム)

平成13年度 日本生物工学会大会、2001年9月27日、山梨大学(甲府)

5. 田辺秀之、Thomas Cremer、林 真、水沢 博、3D-FISH法による interphase cytogenetics: 染色体テリトリーの3次元解析

日本人類学会第46回大会、2001年10月3日-10月5日、大宮

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

ヒト遺伝性疾患細胞の研究資源化と分譲システムに関する研究

分担研究者 立花 章 京都大学放射線生物研究センター 助教授

研究要旨

hTERT 遺伝子を持つレトロウイルスベクターを、ヒト遺伝病患者由来初代培養線維芽細胞に導入することによる細胞の不死化を行い、かかる細胞を研究資源として安定に供給できる体制の確立を試みた。その結果、hTERT 導入後 population doubling level (PDL) が 50 を過ぎても増殖しつづける不死化細胞を得ることに成功した。これらの hTERT 遺伝子導入による不死化細胞は、染色体数において変動が無く、極めて正常に近い性質を持つと考えられ、研究資源として極めて利用価値が高いと思われる。

A. 研究目的

ヒトゲノムの全塩基配列が決定され、21世紀における重要課題はヒト遺伝子の多様性とその機能の解明であると言われている。ヒト遺伝病の細胞はポスト・ゲノム研究戦略の重要な研究資源となる。ヒトの遺伝子の構造と機能は長い進化の上に成り立っているものであり、その遺伝的多様性と機能のダイナミズムは生物種固有のみならず、人種固有のものがある。従って、我が国におけるポスト・ゲノム研究戦略には日本人に基づく研究資源が要求される。本研究の目的は、日本人遺伝病患者細胞の遺伝的特性を明らかにし、新しいゲノム科学のニーズに応える研究資源として保存し、研究支援を行うことにある。特に、今後ヒト遺伝病細胞に対する研究者の要望はなお一層増加することが想定されるため、取扱が容易である不死化細胞株を樹立することにより、ゲノム研究の推進を支援することを目的としている。従来登録していた初代線維芽細胞株は増殖速度が遅いため培養が難しく、しかも継代数を重ねると細胞が増殖を停止する等、供給と利用の両面で困難があった。そこで、増殖能の良い細胞株を得るため、昨年度より DNA 複製開始点の配列を欠損した SV40 DNA を細胞に導入し不死化細胞の樹立を開始した。しかし、SV40 により不死化した細胞では染色体数がほぼ倍加するなどの変化が生じていた。本年度は新たに hTERT 遺伝子を導入することにより不死化した細胞株を樹立することを試みた。

B. 研究方法

hTERT 遺伝子を持つレトロウイルスベクターを、ヒト遺伝病患者由来初代培養線維芽細胞に導入することにより、細胞の不死化を行った。これは、広島大学井出利憲教授、田原栄俊助教授との共同研究である。hTERT 導入後培養を続け、population doubling level (PDL) が 50 を過ぎても増殖しつづける細胞を得た。これをもって不死化したものと判断した。初代培養細胞では PDL が 30~40 になると成長が著しく遅くなり、増殖が停止する。平板効率を検討したうえで、色素性乾皮症及びコケイン症候群患者由来細胞については紫外線感受性を、ファンconi貧血症患者由来細胞についてはマイトマイシン C (MMC) 感受性を、コロニー形成法を用いて検討した。ブルーム症候群患者由来細胞については常法に従って姉妹染色分体交換 (SCE) の頻度を解析した。染色体数については標本を検鏡し、各々の細胞株について 100 個の分裂像の染色体数をカウントした。

(倫理面への配慮)

最近の患者については、診断とは別に細胞培養による疾患の解明と治療法の開発という合意事項で、細胞をヒトゲノム研究に使用することと細胞バンクへの提供についての同意を得ている。三省共同の告示「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を受けて、京都大学においても「京都大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究管理規定」を策定した。本研究は、これら倫理指針および管理規定に従っている。

C. 研究結果

色素性乾皮症、コケイン症候群、ファンコニ貧血症、ブルーム症候群の患者由来細胞から、hTERT 遺伝子導入により、不死化細胞株を樹立することを試みた。いずれの細胞も常染色体劣性の遺伝様式を示す高発癌性遺伝病の日本人患者に由来する細胞であり、DNA 損傷の修復や DNA 複製に欠損があることが知られている。

色素性乾皮症は、紫外線に高感受性を示し、皮膚癌を高発する。DNA にできた損傷の除去修復に欠損があることが知られている。既に JCRB バンクには数株を登録しているが、今回そのうちの初代線維芽細胞 XP390S (JCRB0326、相補性群 A) と XP400S (JCRB0327、相補性群 C) に hTERT 遺伝子を導入して不死化することを試みた。その結果、PDL が 50 にまで到達した細胞が得られ、それぞれ XP390S TERT、XP400S TERT と名付けた。これらの細胞について紫外線照射後の生存率を検討したところ、初代細胞株と同様非常に高い感受性を示した (図)。従って、色素性乾皮症細胞が示す紫外線高感受性という性質は保持していることが確認された。染色体数について検討したところ、XP390S TERT では平均値は 46.03、中央値は 46 であり、XP400S TERT では平均値は 47.02、中央値は 46 であった。いずれの細胞株においても大部分の細胞で、ほぼ 46 本の染色体が保持されており、SV40 DNA によって不死化した細胞で見られる染色体数の変化が殆ど見られない。

コケイン症候群も紫外線に高い感受性を示す。JCRB バンクに登録している初代培養細胞 CS2AW (JCRB0310) に hTERT を導入して不死化したと考えられる CS2AW TERT 細胞を得た。紫外線感受性を調べたところ、元の細胞と同様高感受性を示した。染色体数の平均値は 45.86、中央値は 46 であり、やはり非常に安定している。

ファンコニ貧血症は MMC などの DNA 架橋剤に高い感受性を示し、また白血病の発生率が高い。既に JCRB バンクに登録している初代線維芽細胞 FA9JTO (JCRB0314) 細胞に hTERT 遺伝子を導入して、不死化したと考えられる細胞株 FA9JTO TERT を得た。FA9JTO TERT 細胞は MMC に非常に感受性であり、DNA 架橋の損傷修復に欠損があることを示している。染色体数は平均値、中央値ともに 46 であった。

ブルーム症候群は、DNA ヘリケースに異常があり、DNA の複製や組換えに欠損がある。SCE 頻度が高く、本疾患の診断基準となっている。

JCRB バンクに登録している初代培養細胞 BS2CH (JCRB0317) に hTERT を導入して不死化したと考えられる BS2CH TERT 細胞を得た。SCE 頻度 (SCE/染色体) を調べたところ、平均値は 1.44 であった。これは正常細胞の平均値 0.16 に比べてきわめて高く、ブルーム症候群細胞の特徴を保持していることを確認した。染色体数は平均値は 46.55、中央値は 46 であった。昨年 EB ウイルス感染により樹立したリンパ芽球様細胞株 BSL2KA について検討し、染色体数がほぼ倍加していることを報告した。今回調べた BS2CH TERT 細胞では、染色体数は正常であり、非常に安定していることを示しており、このことから hTERT 遺伝子導入による不死化が、SV40 や EB などのウイルス DNA による不死化よりも正常形質に近い性質を維持していることを示している。

D. 考察

1) 達成度について

ヒト遺伝病の中でも特に高発がん性の遺伝病について細胞の収集を行ってきた。これらの細胞は DNA の複製や損傷の修復機構に欠損があることが知られており、これら欠損により発癌頻度が高いものと考えられる。ヒトにおける発癌機構解明などにはこれら遺伝病患者の細胞は極めて貴重な研究資源である。今年度は 4 種類の疾患について、それぞれ 1 株あるいは 2 株、合計 5 株の不死化細胞を得た。当初目標は 5 株の樹立であり、所期の目標を達成した。得られた不死化細胞は、それぞれ元の疾患細胞に特有の性質を有していたことから、今後それぞれの疾患での欠損の解明や治療法開発の研究などに大きく寄与するものと思われる。特に本年度は hTERT 遺伝子を用いることにより、染色体数が正常の細胞株を樹立することができた。これらの細胞の利用価値は非常に高い。

2) 研究の学術的・国際的・社会的意義について

今回樹立した不死化細胞株は、いずれもヒト高発癌性劣性遺伝病患者に由来するものである。これらの疾患の原因遺伝子はほぼ明らかにされつつあるが、遺伝子の機能の解明は今後の大きな課題である。特にこれらの遺伝子は DNA の複製や修復などの基本的な生命過程に直接関与する遺伝子群であり、その機能の解明の生物学的重要性は非常に高い。しかも遺伝的多様性は、遺伝子機能やひいては疾患特性にも影響を及ぼすことが考えられ、日本人の遺伝的特性を明らかにすることの意義は大きい。また、これら疾

患に対する診断及び治療方法の進展がもたらす社会的貢献はきわめて大きい。近年 hTERT 遺伝子による不死化細胞の報告は増加しつつあるが、その数は世界的に見ても未だにごく少数である。今回樹立した5株の細胞はいずれも、世界的にも非常に貴重な細胞である。

3) 今後の展望について

ヒトの遺伝病細胞は研究資源として極めて重要な位置を占める。特に、ヒトゲノムの塩基配列が明らかにされたことにより、今後のポストゲノム時代には、その重要性はますます増大する。しかし、一般にヒト細胞、ことに遺伝病細胞では培養が困難である。従って、わが国におけるポストゲノム研究を推進する上で、多くの研究者にとって利用しやすい形の細胞を樹立することは極めて重要な意義がある。今後このような細胞株の数を増加させる必要がある。特に、今回樹立した細胞株はいずれも染色体数が正常であり、一方、今回樹立した細胞では、細胞の性質そのものは保持しているものの、染色体数に大きな変化が生じている。今後は染色体数が安定した細胞株の樹立を目指す必要がある。

E. 結論

ヒト高発癌性遺伝病患者由来初代線維芽細胞にhTERT 遺伝子を導入して、5株の不死化細胞株を樹立し、その細胞特性を明らかにした。いずれの細胞も、不死化後においてもそれぞれの疾患に特異的な性質を保持していた。また、染色

体数も正常であり、これまでのウイルス DNA による不死化に比べて、初代培養細胞の形質をよりよく保持していると考えられる。これらの細胞により、従来よりも幅広い研究者の研究に利用され、疾患の診断や治療の進展に寄与することが期待される。特に全て日本人患者由来であるため、日本人集団での特色を明らかにする上で、研究資源として利用されることに大きな意義がある。

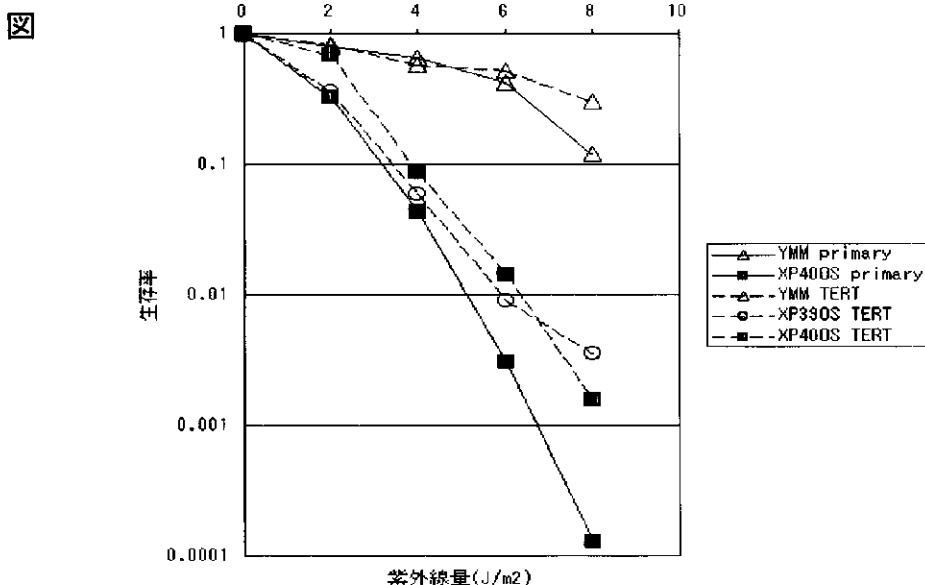
F. 研究発表

論文発表

1. Tachibana, A., Tatsumi, K., Furuno-Fukushi, I. and Sasaki, M. S. (2001), High frequency of deletions at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus in an ataxia-telangiectasia lymphoblastoid cell line irradiated with gamma-rays. *Japanese Journal of Cancer Research* 92: 1190-1198.
2. Takahashi, A., Ohnishi, K., Asakawa, I., Kondo, N., Nakagawa, H., Yonezawa, M., Tachibana, A., Matsumoto, H. and Ohnishi, T. (2001), Radiation response of apoptosis in C57BL/6N mouse spleen after whole-body irradiation. *International Journal of Radiation Biology* 77: 939-945.

G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

正常2倍体繊維芽細胞の研究資源化と分譲及び品質管理に関する研究

分担研究者 木村成道（財）東京都高齢者研究・福祉振興財団、東京都老人総合研究所

研究要旨

正常2倍体繊維芽細胞の研究資源化を目的に、既存の新生児ならびに成人由来細胞の培養条件の検討ならびに品質管理実験を実施し、分譲業務の一部を担当した。また、ヒトドーパミン産生系神経細胞の研究モデルとして、SHSY-5Y細胞のプロテオームプロファイリングを解析し、プロテオームデータベースを作成し、インターネット上に公開した (<http://prot.come.tmig.or.jp/2D/>)。

A. ヒト正常二倍体細胞の樹立と供給に関する研究

1. 研究目的

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

2. 研究方法

供給用アンプルの作製： 供給用凍結細胞アンプルおよびバックアップ用凍結細胞アンプルを作製し、HS財団ヒューマンサイエンス研究資源バンクと国立医薬品食品衛生研究所マスターバンクにそれぞれ送付した。

細胞の樹立： 新生児および成人の皮膚片から、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。

3. 研究結果

i. 供給細胞の凍結アンプル作製：

今年度は、昨年度樹立・性格づけをして新規登録した成人皮膚線維芽細胞のTIG-108細胞（40Y, F）とTIG-109細胞（39Y, F）、新規収集したTIG-3細胞のSV40 early geneで不死化したSVts-8細胞（JCRB0506.1）、および未送付のTIG-2M-30細胞（JCRB0525）の凍結アンプルをHS財団ヒューマンサイエンス研究資源バンクに送付した。

分譲用に新たに作成した細胞種と数量：

<新規分>

TIG-108細胞（JCRB0537）、Lot. No. R081、30アンプル

TIG-109細胞（JCRB0538）、Lot. No. R091、30アンプル
SVts-8細胞（JCRB0506.1）、2アンプル、種細胞

TIG-2M-30細胞（JCRB0525）、Lot. No. R021、30アンプル

<追加補給分>

供給用の凍結アンプルの在庫が少なくなってきた以下の3種類のセルラインの凍結アンプルを作成し、それらの凍結細胞の融解再培養後の生存率を確認の上、HS財団ヒューマンサイエンス研究資源バンクに送付した。

IMR-90-40（JCRB0519）、Lot. No. R902、32アンプル

TIG-112細胞（JCRB0533）、Lot. No. R122、35アンプル

TIG-114細胞（JCRB0534）、Lot. No. R142、35アンプル

ii. バックアップ用凍結アンプルの作成：

下記の新規樹立細胞と新規収集細胞のバックアップ用凍結アンプルを、国立医薬品食品研究所マスターバンクへ送付した。

<新規樹立細胞>

TIG-108細胞（JCRB0537）、Lot. No. R081、3アンプル

TIG-109細胞（JCRB0538）、Lot. No. R091、3アンプル

<新規収集細胞>

SVts-8細胞（JCRB0506.1）、2アンプル、種細胞

iii. 新生児、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-

119、成人由来皮膚線維芽細胞はTIG-113とした。それらの性状は以下の記載のとおりである。

(a) TIG-119 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織： ヒト、皮膚
 性： M
 年齢： 6ヶ月
 性状： 線維芽細胞様
 分裂寿命： PD48
 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 ミ PD20

(b) TIG-113 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織： ヒト、皮膚
 性： F
 年齢： 21歳
 性状： 線維芽細胞様
 分裂寿命： PD53
 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 ミ PD20

IV. 東京都老人総合研究所から直接供給した細胞：

TIG-1-40 細胞 1アンプル：供給先 北條麻紀(群馬大学遺伝子施設)
 TIG-1-60 細胞 1アンプル：供給先 北條麻紀(群馬大学遺伝子施設)

4. 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)ことが知られている。そのため、細胞を供給する側には正確な分裂回数の記録を持つ細胞を維持・提供することが求められ、その信頼の上に立って、利用者である研究者は正常細胞を実験に使用することが可能になっている。正常細胞の取扱いにはこのような特殊性があるため、当分、HS財団へ供給する老人研由来ヒト正常二倍体細胞の凍結アンプル作製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、正常細胞の供給にあたっては、凍結アンプル解凍後の生存率が高いこと、また、財団法人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事前に確認しており、利用者に不都合を来すことの無いように万全を期している。

5. 結論

ヒト正常二倍体の細胞を得るため、ヒト胎児肺線維芽細胞を出発点として、供与者年齢の異なる(老人、成人、幼児)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。また、登録されている細胞の数が少ないので、更に充実するための計画が進行中である。今年度は、新生児と成人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、新規登録が可能となった。

B. プロテオーム解析技術の細胞品質管理への応用

1. 研究目的

研究資源ヒト細胞の品質管理、および品質評価の一手段として、プロテオームプロファイリングを活用するために、ヒト細胞のプロテオーム解析の基礎的な技術を確立とともに、得られた情報をもとにヒト細胞のプロテオームデータベースを作成し、インターネット上で情報公開することを目的としている。

2. 研究方法

平成14年度は、ヒトドーパミン産生系神経細胞の研究モデルとして広く利用されているSHSY-5Y細胞のプロテオームプロファイリングとプロテオームデータベースの作成、およびインターネット上での公開を行った。

(倫理面へ配慮)

個人識別に関与する情報については扱わないこととした。

3. 研究結果

プロテオーム研究関連機器及び解析技術を有する日本バイオラッドプロテオームプロファイリングの協力を得て、バイオラッドのシステムによる二次元電気泳動、画像解析、スポットのカッティングを実施。さらに質量分析機器とその操作技術を持っているジャスコインターナショナルの協力を得て、ペプチドマスフィンガープリンティング(トリプシンで消化して得られたペプチド断片の分子質量を質量分析計で測定し、そのパターンをもとにデータベース検索を行ってタンパク質を同定する方法)を行った。その結果、主要なタンパク質については同定ができたので、その結果をもとにデータベースを作成し、東京都老人総合研究所プロテオームデータベースの一部として、試験的に公開を開始した。

4. 考察

1) 達成度について

年度当初の予定したところまでは達成できたと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

本研究の成果は、今後このようなヒト細胞を用いた神経変性疾患の原因解明研究等で、広く利用されるものと考えられ、学術的・国際的・社会的意義は高いものと考えている。なお、国際的な利用を考慮し、データベースは英語を使用した。

5. 結論

プロテオーム解析技術は、細胞の品質管理に有用な手段であるとの結論を得つつある。

6. 研究発表

論文発表

1. K Nishio, A Inoue, S Qiao, H Kondo and A Mimura, Senescence and Cytoskeleton: Overproduction of vimentin induces senescence-like morphology in human fibroblasts. *Histochemistry and Cell Biology*, 116, 321-327, 2001.
2. T Kaneko, S Tahara, T Taguchi and H Kondo, Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultured human skin fibroblasts. *Mutat. Res.*, 487, 19-30, 2001.
3. Toda, T. : Proteome and proteomics for the research on protein alterations in aging. *Ann. New York Acad. Sci.*, 928, 71-78, 2001.
4. 戸田年総：ゲノム情報とプロテオーム情報の統合によってもたらされる生命情報科学の新展開. *生物物理化学*, 45(2), 139-142, 2001
5. 戸田年総：プロテオーム解析と疾患解析. *実験医学*, 19(11), 1443-1448, 2001

学会発表

1. H. Kondo and Y. Yonezawa, Age-related changes in human fetal skin fibroblast migration and signal transduction. The XVIIth International Congress of Gerontol-

ogy, 2001, 1-6 July, Vancouver.

2. Toda, T. : Proteomic approaches for discussing mechanisms of cellular aging. *International Proteomics Conference 2001*, Canberra, 2001.10.
 3. 金子孝夫、田原正一、田口隆彦、近藤 昊、培養老化細胞における酸化傷害防御酵素活性とDNA酸化傷害の蓄積. 日本基礎老化学会第24回大会、2001年6月13-15日、大阪.
 4. 戸田年総、木村成道：酸化ストレスによる蛋白質の翻訳後修飾のプロテオーム解析（第1報）ー質量分析法による翻訳後修飾ペプチド検出の試みー 日本基礎老化学会第24回大会 大阪 2001.6.13-15.
 5. 戸田年総：ProteomeWorks Systemを用いたヒトドパミン産生SH-SY5Yのプロテオームプロファイリングとデータベースの作成、第74回日本生化学会、京都、2001年10月
 6. 戸田年総：Proteome Works Systemを用いたハイスループットプロテオーム解析の最適化. 第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001年12月
- #### 7. 知的所有権の出願・取得状況
- 無し

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療研究事業）
分担研究報告

細胞バンクに保管されている細胞系における牛ウイルス性
下痢ウイルス（BVDV）による汚染状況に関する研究

分担研究者 原澤 亮 東京大学大学院医学系研究科附属動物実験施設 助教授

研究要旨

細胞バンクで保存されている培養細胞株約100種について、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）による汚染の有無をPCR法を用いて詳細な検査を実施し、汚染しているウイルスの型を調査した。今回62株がBVDVにより汚染されていることが判明したのでBVDV-1についての型別による分類を試みた。その結果、BVDV-1aが32.3%、BVDV-1bが64.5%、その他これまで知られていない型が2株（3.226%）含まれることが判明した。新しく検出した型をBVDV-1eと提案する。

A. 研究目的

牛ウイルス性下痢ウイルスは妊娠牛が感染すると胎盤を容易に通過するので、牛の胎仔組織や血清も本ウイルスに侵されることになる。このため市販牛胎仔血清の10～75%が本ウイルスにより汚染していると言われる。したがって、牛胎仔血清を添加した細胞培養中に、牛ウイルス性下痢ウイルスが存在する可能性は極めて大きい。しかも牛ウイルス性下痢ウイルスの多くは細胞培養中で細胞変性効果を見さないため、その汚染は通常の継代作業においても看過されている。そこで、細胞バンクに登録保管されている細胞培養について、本ウイルスによる汚染状況をRT-PCRにより調査した。

B. 研究方法

牛ウイルス性下痢ウイルスの5'非翻訳領域の塩基配列は属内でよく保存されている。そこで、初めに細胞培養の上清（200マイクロリットル）からRNAを抽出し、これを鋳型として5'非翻訳領域に相補的なcDNAを逆転写酵素を用いて作製し、これをPCRのサンプルとした。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により分画し、ゲルから抽出した核酸の塩基配列をダイデオキシ法により決定を行い、さらに得られた塩基配列から想定される二次構造に基づいてウイルス株の型別を行った。

C. 研究結果

付表に示すとおり、細胞バンクから譲渡を受けた100株の細胞培養サンプルのうち、異なる71種類の細胞系について牛ウイルス性下痢

ウイルスRNAの検出を行ったところ、68株（95.77%）が陽性であった。牛ウイルス性下痢ウイルスは分類学的に牛ウイルス性下痢ウイルス1（BVDV-1）と牛ウイルス性下痢ウイルス2（BVDV-2）に分けられている。68株のうちBVDV-1と同定されたものは62株（91.18%）で、BVDV-2と同定されたものは6株（8.82%）であった。BVDV-1はウイルスRNAの5'非翻訳領域の塩基配列の違いに基づいてさらにBVDV-1a～BVDV-1dの4型に型別されることが知られている。そこで、今回検出された62株のBVDV-1について型別を試みた。その結果、BVDV-1aが20株（32.258%）、BVDV-1bが40株（64.516%）、その他これまで知られていない型が2株（3.226%）含まれることが判明した。そこで、新しく出現した型をBVDV-1eと提案することにした。

D. 考察および結論

牛ウイルス性下痢ウイルス感染動物から該ウイルスを分離するためには、偶蹄類由来細胞を用いて行われている。他の動物由来細胞では本ウイルスの増殖が期待できないからである。今回の成績では偶蹄類以外の動物由来細胞系からも牛ウイルス性下痢ウイルスRNAが検出されており、それらが感染性ウイルスの存在を反映するものなのか、また、それらの細胞系でも本ウイルスが増殖可能であるのかは、今後の検討課題であろう。

細胞培養の中には生物製剤の製造に用いられるものもある。海外では過去に牛ウイルス性下痢ウイルスにより汚染していた細胞培養を用い

で製造した動物用生ウイルスワクチンに牛ウイルス性下痢ウイルスが迷入していたために、ワクチン接種を受けた動物に牛ウイルス性下痢ウイルスによる感染が起きたことがある。これは製造用細胞培養に用いた牛胎仔血清に含まれていた牛ウイルス性下痢ウイルスが汚染源と考えられている。ヒトが牛ウイルス性下痢ウイルス感染を受けた場合の病態は知られていないが、幼児の胃腸炎や小頭症との関連を示唆する文献もある。また、牛ウイルス性下痢ウイルスに対する血中抗体は人間集団の約30%に認められるといわれていることから、ヒトが本ウイルスによる何らかの感作を受けていることが想像される。しかも、牛ウイルス性下痢ウイルスは宿主細胞のRNAをゲノム内に取り込む性質があるので、本ウイルスによる細胞系の汚染は別の問題を提起することになる。細胞系を人体用の生物製剤の製造に用いることはWHO研究班により承認されていることなので、人体用生物製剤における本ウイルスによる汚染も注意を要するといえよう。人体用生物製剤における汚染の危険を回避するするためにも、細胞培養における牛ウイルス性下痢ウイルス汚染を駆逐することはきわめて重要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Ano, H., Makimura, S., and Harasawa, R. (2001) Detection of Babesia species from infected dog blood by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 111-113.
2. Ano, H., Makimura, S., and Harasawa, R. (2001) Comparison of partial ribosomal DNA sequences of Babesia gibsoni occurring in Miyazaki prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 561-562.
3. Giangaspero, M., Vacirca, G., Harasawa, R., Buttner, M., Panuccio, A., De Giuli Morghen, C., Zanetti, A., Belloli, A., and Verhulst, A. (2001) Genotypes of pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 723-733.
4. Giangaspero, M., Harasawa, R., Zecconi, A., and Luzzago, C. (2001) Genotypic characteristics of Bovine viral diarrhea virus 2 strains isolated in northern Italy. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 1045-1049.

2. 口頭発表

1. Harasawa, R.: The 16S-23S intergenic spacer regions of mycoplasmas. 5th Congress of the Chinese Association of Mycoplasmaology. Xiamen, October 2001

付表 検出したBVDVの型識別

No. JCRB 番号	細胞名	Lot 番号	BVDV タイプ	No. JCRB 番号	細胞名	Lot 番号	BVDV タイプ		
1	JCRB9068	293	012287	BVDV-1a	26	JCRB9050	IMR-32	120386	BVDV-1b
2	JCRB0085	HL60	031395	BVDV-1b	27	NIHS0086	HL60	081588	Not tested
3	JCRB0403	HuH-7	021296	BVDV-1b	28	JCRB0405	HLF	122795	BVDV-1 (New)
4	JCRB9021	U937	082285	BVDV-1a	29	JCRB9111	BeWo	062687	BVDV-1a
5	JCRB0611	KATO III	061985	BVDV-1b	30	JCRB0611	KATO III	082995	Not tested
6	JCRB0254	MKN45	061985	BVDV-1b	31	JCRB0254	MKN45	020996	Not tested
7	JCRB0112.1	THP-1	082687	BVDV-1a	32	JCRB0112	THP-1	082687	Not tested
8	FDSC0011	MKN28	021990	BVDV-1b	33	JCRB0253	MKN28	111798	Not tested
9	JCRB0062	HEL	112585	BVDV-1a	34	JCRB0228	A-172	030796	BVDV-1b
10	JCRB9004	HeLa	051299	BVDV-1b	35	NIHS0038	HeLa P75	101487	Not tested
11	JCRB9113	HT-1080	080587	BVDV-1b	36	JCRB0404	HLE	122486	BVDV-1b
12	JCRB0076	A549	011386	BVDV-1b	37	JCRB0076	A549	120498	Not tested
13	NIHS0232	NM-1	11102000	BVDV-1a	38	JCRB0155	NM-1	12112000	Not tested
14	JCRB0058	LU99C	091697	BVDV-1a	39	JCRB0058	LU99C	101185	Not tested
15	JCRB0435	JHH-4	061897	Not tested	40	NIHS0057	JHH-4	042788	Not tested
16	JCRB0649	HeLa. P3	111197	Not tested	41	NIHS0211	AH601 (JTC27)	111698	BVDV-1 (New)
17	JCRB0401	HuH-6 Clone 5	053096	BVDV-1b	42	JCRB0401	HuH-6 Clone 5	11202000	Not tested
18	JCRB0625	Ca9-22	060885	BVDV-1b	43	JCRB0625	Ca9-22	090798	Not tested
19	JCRB0099	HH	070488	BVDV-1a	44	JCRB0073	J-111	120985	BVDV-1a
20	JCRB9028	MDBK (NBL-1)	091786	Not tested	45	JCRB9027	KB	120398	BVDV-1b
21	JCRB9025	CPA	022287	BVDV-2	46	JCRB0070	MIA PaCa-2	110498	BVDV-1b
22	JCRB9022	CPAE	041693	BVDV-2	47	JCRB9022	CPAE	082485	BVDV-2
23	JCRB9038	EBTr (NBL-4)	101786	BVDV-2	48	JCRB0621	NB-1	120595	BVDV-1b
24	JCRB9129	BCE C/D-1b	080197	BVDV-1a	49	JCRB0135	MT-4	031699	BVDV-1b
25	JCRB0155	NM-1	11212000	Not tested	50	JCRB0155	NM-1	12182000	Not tested

No. JCRB 番号	細胞名	Lot 番号	BVDV タイプ	No. JCRB 番号	細胞名	Lot 番号	BVDV タイプ		
51	JCRB0019	K-562	020190	BVDV-1b	76	JCRB0208	CCK-81	062298	Negative
52	JCRB0006	HL60RG	052092	BVDV-1b	77	JCRB0213	HeLa AG	070188	Not tested
53	JCRB9041	T98G	120492	BVDV-1b	78	JCRB0225	COL0320 DM	022290	BVDV-1b
54	JCRB0406	PLC/PRF/5	122095	BVDV-1b	79	JCRB0236	KG-1-C	030390	BVDV-1b
55	JCRB0226	COL0201	071498	BVDV-1b	80	JCRB0252	MKN1	032996	BVDV-1b
56	JCRB0744	ECV304	011499	BVDV-1a	81	JCRB0255	MKN74	022496	BVDV-1b
57	JCRB0224	WiDr	051598	BVDV-1b	82	JCRB0155	NM-1	01232001	Not tested
58	JCRB9094	DLD-1	051587	BVDV-1a	83	JCRB0622	HSC-2	070196	BVDV-1b
59	JCRB0228	A-172	061589	Not tested	84	JCRB0623	HSC-3	121296	BVDV-1b
60	JCRB0213	HeLa AG	042899	Not tested	85	JCRB9008	MRC-5	042287	BVDV-1b
61	JCRB9012	RAJ1	062885	BVDV-1b	86	JCRB9054	IMR-90	121186	BVDV-1b
62	JCRB9083	LoVo	032687	BVDV-1b	87	JCRB9071	Daudi	020387	BVDV-1b
63	JCRB0155	NM-1	12272000	Not tested	88	JCRB9110	PC-3	062587	BVDV-1a
64	JCRB0122	K051	062497	BVDV-1a	89	JCRB0155	NM-1	01302001	Not tested
65	JCRB0123	K052	081397	BVDV-1b	90	JCRB0711	T24	071186	Not tested
66	JCRB0141	PHK16-0b	092499	BVDV-1b	91	JCRB0124	Takigawa	070397	BVDV-1a
67	JCRB0711	T24	101596	BVDV-1a	92	JCRB0139	TASK1	090339	BVDV-1a
68	JCRB0156	KHYG-1	01092001	BVDV-2	93	JCRB0140	NCE16	091799	BVDV-1a
69	JCRB0073	J-111	100698	Not tested	94	JCRB0147	JKT-beta-del	04052000	BVDV-1a
70	JCRB9027	KB	112186	Not tested	95	JCRB0159	SLVL	02082001	Negative
71	JCRB0070	MIA PaCa-2	092493	Not tested	96	JCRB0818	SBC-3	032996	BVDV-1a
72	JCRB0134	MCF-7	022699	BVDV-2	97	JCRB0833	NH-12	073097	BVDV-1b
73	JCRB0834	NUGC-4	031097	Negative	98	JCRB0622	HSC-2	122198	BVDV-1b
74	JCRB0146	MLMA	02102000	BVDV-1b	99	JCRB0623	HSC-3	102198	BVDV-1b
75	JCRB0155	NM-1	01092001	Not tested	100	JCRB0155	NM-1	02082001	Not tested

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

組織臓器再生機能を保有する幹細胞の研究資源化に関する研究

分担研究者 安本 茂 神奈川県立がんセンター臨床研究所 研究課長

研究要旨

皮膚、食道、膵臓、胎児性付属器(臍帯、羊膜)などの常に増殖再生が伴う上皮組織から幹細胞を分離同定するための様々な操作に関する研究を行う。こうした技術開発は、再生医療に必須な幹細胞を研究資源化するために必須なものとなる。これにより複数の上皮系幹細胞の培養系を確立することなどの成果があった。

A. 研究目的

ヒトの健康維持あるいは各種疾病の克服にはヒト細胞の理解が不可欠である。現在の我々が持つ基礎医学的知識の多くは研究モデル動物細胞を用いて得られた研究成果を基にしているが、悪性新生物(がん)やその他多くの病気は遺伝的素因(遺伝子の機能)が基になる事が明らかになり始めている。各種実験動物(例えばマウスなど)とヒトでは殆どの遺伝子組成は相同であることも明らかになってきたが、実験動物細胞での知識が直ちにヒトの病気に直結するかどうかに関しては不明な点も多い。特に再生医療領域の主要な部分を占める機能細胞や組織あるいは臓器の移植に関しては実験動物細胞がヒト細胞の代替になることは殆ど無いといっても差し支えない。その為には移植対象となる適正なヒト細胞の供給が不可欠となるが、そのヒト細胞の特性に関する知識は不十分であり、それ以上にヒト細胞の供給が技術的にも倫理的にも極めて制限されているのが現実である。本研究課題はそれぞれらの点を克服することを目指したものである。以下の具体的な研究課題はその目的を達成するために設定された。

- 1 正常ヒト各種上皮培養細胞の研究資源化
- 2 研究資源としてのヒト上皮不死化細胞株の分離
- 3 不死化細胞の機能発現に関する研究
- 4 上皮幹細胞の分離同定と潜在的分化能力の検証
- 5 遺伝子発現プロファイルを基にした幹細胞、老化細胞及び不死化細胞の細胞特性の解析
- 6 臨床応用(細胞移植、遺伝子治療の標的細胞、再構成上皮組織の移植)に向けての幹細胞の再

生能力の検証

これらの具体的な課題のうち、各組織の幹細胞を同定分離し、操作可能な技術として確立する事は再生医療領域で最も期待されている研究目標であるため、衆知のように現在のバイオテクノロジー(生物操作技術)関連の研究の中でも国内外共最も競争の激しい研究の一つになっている。本研究分担者は本研究班の活動の中で皮膚、食道、膵臓、胎児性付属器(臍帯、羊膜)など、常に増殖再生が伴う上皮組織の幹細胞の同定分離と操作に関し世界的にも稀な成功をおさめている。

また、本年度において研究に着手した胎児性付属器の上皮細胞は細胞の持つ能力(分化、増殖)が相対的に高いことが明らかになり、近い将来再生医療等に活用できる有用な細胞として研究資源化することが可能であると考えている。

このような細胞は、出産と共に廃棄処分の対象になるが、提供者は出産という幸福な気持ちが強いため、その提供についての抵抗感が低く比較的入手しやすいものである。この点は他の正常ヒト細胞の研究が抱える問題点と際立って異なっている

B. 研究方法

- 1) ヒト上皮細胞の分離培養 : A) Explant -Out-growth 法による組織片からの均一な上皮細胞の培養と回収。B) デイスパーゼによる上皮層の選択的剥離法及びトリプシンによる部分消化、コラーゲン IV コート培養皿による基底層細胞集団の選別的培養。

- 2) 不死化法：SV40, HPV16-E6/E7, hTERT の導入による各種上皮細胞の不死化
- 3) 幹細胞の分離法：増殖因子受容体、接着因子、ケモカイン類受容体の特異抗体を用いた細胞選別（フローサイトメーター、Dynabeads 法、細胞間接着法）。
- 4) レトロウイルス及びアデノウイルス発現ベクターによる細胞標識を用いた幹細胞の分裂様式及び再生能力の検証。
- 5) 幹細胞の培養条件の検討：液滴培養法（Droplet culture）の考案、適正培地の工夫による少数細胞（1-1000個）の培養法を用いた幹細胞（上皮構成細胞の1-5%）の再生能力の解析
- 6) DNA-array, Differential RNA display 法による幹細胞分子マーカーの検索。
- 7) マトリックス培養法による幹細胞の組織再構築

(倫理面への配慮)

ヒト検体からの細胞の採取及び医学研究利用に関しては、外部識者二名を含めた神奈川県立がんセンター治験審査委員会及び生命倫理委員会において審査を受け、主治医及び手術担当医師による被検者（患者）への文書及び口頭により十分に説明したうえで提供を受けた（インフォームドコンセント）。また、被検者本人が特定できないような検体資料として処理した（非連結化）。

C. 研究結果

a. 上皮細胞の分離と初代培養細胞の調製

現在のところ、明確な病変が伴わないヒト上皮組織は子宮筋腫等による子宮全摘出の場合の子宮頸部からのものが大半を占める。子宮頸部からは外頸部の扁平上皮細胞（ケラチノサイト）と内頸部から円柱上皮細胞（ムチン産生細胞）が回収される。共に回収率は良好で、外頸部一検体から未培養ケラチノサイトは1-5 x 10⁷程度回収される。2週間の培養でほぼ10倍程度の初代培養細胞が調製される。これらは10⁶/ml/アンプル以上の細胞密度で凍結保存する。内頸部からの円柱上皮細胞は組織片培養から回収されるが、ほぼ同程度の初代培養細胞として回収される。凍結保存は一検体から各々、平均10アンプル程となる。継代培養2代目の細胞ではその10倍の凍結保存細胞が調製できる。したがって、供給本数を考慮すると培養2代目以降が適当と判断される。

その他、需要があれば臍帯からの血管内皮、筋原細胞（サテライト細胞）の回収も可能（検証済）で供給可能な正常細胞として検討項目としている。

b. 不死化細胞株

子宮頸部上皮からの不死化細胞株は基礎的な研究目的で必要とする場合に依じて作製したものが20系列程凍結保存済である。本年度は、新たにGFP導入子宮頸部不死化細胞株を樹立した。これらは論文として未発表のものが含まれているが、細胞の特性が一部（主としてテロメア/テロメラーゼ）確認されたものは論文発表が済み次第順次供給する予定である。これらの不死化細胞は蛍光を発するGFPタンパク発現するもようにより一部改変されたもので、移植細胞が然るべき移植部位で機能するものかの検証に不可欠である。

不死化細胞株の作製（SV40, HPVを用いる）は現在では労力と費用を別にすれば比較的容易になってきているため、供給できる新たな不死化細胞株に限度は無いが、需要次第だと考えている。

さらに本年度において新たに、ヒト臍帯上皮の不死化細胞株、牛卵管上皮細胞、睪管上皮不死化細胞株の作製に成功しており、その特性の論文等の発表（一部特許申請予定内容を含む）が済み次第、順次供給することを検討している。

これらの不死化細胞株は多くの場合、正常細胞から癌化予備細胞となった細胞系列と考えられることが明らかになったため（論文投稿中）、基礎的にはヒト細胞を用いた癌の進展と悪性化の機構をあきらかにする研究や化学物質の毒性検定などには不可欠のものになると考えている。また変異抑制と組み合わせることによって、再生医学への応用を目指した細胞のさらなる改変も可能である。

c. 上皮幹細胞の分離培養

上皮構成細胞中1-5%の幹細胞の同定分離技術を確認し、幹細胞の増殖能力が極めて強いことを明らかにし、さらに分化能力も正常であることが明らかになっている。分離されたわずかの幹細胞を10マイクロリッター単位で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（10週以上）増殖能力が低下せず培養を継続できることを明らかにした。このことからヒト上皮初代

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と考えられた(特許申請公開中)。

d. 上皮幹細胞系列の発現遺伝子変動プロファイル

不死化細胞株及び幹細胞系列の検討すべき細胞特性の一つとして発現遺伝子群の変動プロファイルを得る目的でDNA-array法を実施し、以下のことが明らかになった。

- ・ 上皮細胞は老化に伴って発現が昂進する遺伝子群が著しく増加した。
- ・ 不死化細胞株の遺伝子発現プロファイルは老化幹細胞型であり、逆に活発な増殖期にある幼若ケラチノサイトのプロファイルを示さなかった。

このことは、多くの不死化細胞株は幹細胞系列上の老化細胞が不死化し、不死化細胞は老化幹細胞の形質を維持すると考えられる興味ある結果を示している。

e. 臨床応用

幹細胞移植などの臨床応用に向けて上皮組織の再構築を実施し、ラット皮膚への移植実験によって検討を加えている。

D. 考察

1) 達成度

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及び幹細胞の同定分離に関しても技術的にはほぼ確立され、臨床応用のための試験研究を実施する体勢が整ったと考える。分離された幹細胞の研究資源としての供給は実際上の制約が残っているが原理的に可能となった。

2) 成果の学術的、国際的、社会的意義

正常ヒト上皮培養細胞は技術的な側面や倫理的なコンセンサスの上からも幾つかの制約があるものの、医学創薬学的にその研究資源化の重要性は大きい。しかしながら、それらの特性の多くに関して正確に理解されている訳でなく、本研究ではその一部が明らかにされたと考える。特に欧米の現状に較べ細胞の不死化研究と不死化細胞株の利用に関し大きく立ち後れている。再生上皮の幹細胞の実体の解明と分離培養法の確立は幹細胞の生物学的基礎のみならず細胞移植による組織、臓器の再生や遺伝子治療の標的となる細胞を供給するなど臨床応用へ向けての潜在的な重要性を持った研究資源を提供する

3) 今後の展望

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マ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。医学、医療用の再生可能な組織(筋肉、脳神経、肝臓、軟骨、骨など)の幹細胞の同定分離をさらに発展させることが懸案され、その幾つかは当研究分担者が取り扱うことが可能になっている。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してのファイナンスサポートが不可欠であるため本研究班の存在意義は大きい。臨床応用に向けての幹細胞の特性に関する幾つかの細胞学および分子生物学的検討課題が残されているが、前年度までの課題であった、『1) 自己再生能力を持っているか?』については、ある程度の自己再生が可能であることが明らかになってきている。『5) 幹細胞に寿命はあるか?』に関しては、現在までの解析で、一般に信じられている以上の増殖及び生存能力を持つことが判明したが、細胞集団の再生能力が次第に低下することが避けられないため幹細胞事体の老化も進行すると考えられた。テロメア短縮がその一つの理由と考えられるがその詳細は検討中である。幹細胞に関する残りの課題『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) 特異的分裂刺激因子類は何か?』に関してはさらに解析の継続が必要である。

E. 結論

- ・ ヒト正常上皮細胞の不死化細胞株の分離法を確立し、不死化細胞株の研究資源化に向けた技術体制を整えた。未登録の昨年度分と合わせて早急に6-7株送付する予定でいる
- ・ 不死化細胞株は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と考えられる。しかし不死化細胞で発現変動遺伝子プロファイルの解析からは多くの不死化細胞株は老化幹細胞型であると考えられる興味ある結果が得られた。
- ・ 上皮細胞の長期増殖維持の培養条件を確立した。
- ・ 生化学的、分子生物学的解析が可能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。
- ・ 上皮幹細胞の分離法は確立したと考えるが、現在の所直ちに供給できる体勢ではない。

F. 研究発表

論文発表

1. Wada, M. R., Inagawa-Ogashima, M., Shimizu,

- S., Yasumoto, S., and Hashimoto, N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 2002, in press
2. Ishiwata H, Tokieda Y1, Iguchi M1, Ishiwata C1, Kiguchi K2, Sato K3, Yasumoto S4, Tachibana H5, Ishikawa H5. New approach of establishment of mouse early embryonic stem cells and induction of their differentiation. *Human Cell*, 2002. in press
3. Yasumoto, S., Nishimura, K., Okumura, T., Kikuchi, K., Bestilny, L. J., Morimura, S., Kiguchi, K., Imamura, M., Shimada, Y., and Higashinakagawa, T. Human keratinocyte stem cells responsible for superior regenerative potency, longevity and neoplastic transformation. Submitted
4. Okumura, T., Yasumoto, S., Shimada, Y., and Imamura, M. The neurotrophin receptor p75NTR characterizes keratinocyte stem cells that fully reconstitute human squamous epithelial cell subsets in vitro. Submitted.
5. 老化のメカニズムを探る (医学のあゆみ) 2001
石川冬木編

分類 G01N 33/50、

公開 平成12年2月29日

発明者：安本茂、国村忠司

発明の名称：長期生存細胞の同定方法およびその単離方法

- ・ 整理番号 10-046、特開 2000-60542, 国際特許分類 C12N 5/08

公開 平成12年2月29日

発明者：安本茂、国村忠司

発明の名称：高密度細胞培養法

- ・ 特許出願中

出願 平成13年12月

発明者：安本茂、竹内亮誠

発明の名称：臍帯細胞を用いた培養皮膚とその製造方法

学会発表

1. Shigeru Yasumoto. Crossways in replicative aging and immortalization of human epithelial stem cells 2001 Congress on in vitro Biology (St. Louis, USA), 2001, June
2. Leslie J Bestilny and Shigeru Yasumoto. Gene expression profile during replicative aging of human regenerative epithelial stem cells. International congress of Developmental Biology. Kyoto (Japan), 2001, July
3. 安本茂, Leslie J Bestilny, ヒト正常上皮細胞の分裂老化と不死化の接点, 第74回日本組織培養学会 (筑波) 2001、7月
4. 奥村知之、嶋田裕、菊地慶司、今村正之、安本茂, 正常食道上皮培養細胞の長期生存に於ける p75NTR 発現細胞の動態, 第74回日本組織培養学会 (筑波) 2001、7月

G. 知的所有権の出願、取得状況

- ・ 整理番号 A3676、特開 2000-4900, 国際特許

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）
分担研究報告

多分化能をもつヒト骨髄性細胞の研究資源化に関する研究

分担研究者 難波正義 岡山大学医学部 客員研究員

研究要旨

ヒト細胞の収集とその培養化の研究に関して、岡山大学医学部倫理委員会の承認を得た。本年度は13株のヒト細胞を寄託した。その内訳は、正常ヒト線維芽細胞（OUMS-36, KMS-6）、この線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞（8株、OUMS-36/T シリーズ）、ヒト正常細胞にコバルト60ガンマー線照射し不死化させた細胞（KMST-6）、さらに、KMST-6細胞が培養内で自然に腫瘍化した細胞（KMST-6T）、および、家族性大腸ポリポーシス由来大腸癌細胞（OUMS-23）である。考察として、研究資源としてのヒト細胞の収集・培養化についての今後の問題点について述べた。

A. 研究目的

多分化能をもつヒト骨髄性細胞の研究資源化に関する研究を行う。同時に、その他のヒト組織・細胞の採集、培養化も行う。同時に、培養化された細胞の細胞学的研究を進める。

B. 研究方法

多分化能をもつヒト骨髄間葉細胞の培養

採集した骨髄細胞をPBSで洗浄後、Human Mesenchymal Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies Inc)で20分間処理し、その後、フィコールで遠心分離し、多分化能をもつ骨髄間葉性細胞を濃縮した。濃縮された細胞を、10 ug/ml インシュリン、10 ug/ml トランスフェリン、10%胎児牛血清を含むDMEMで培養すると、1-2週間後に細胞質のやや広くひろがったやや大型の細胞が増殖してきた。形態的には、一般にみられる紡錘形の線維芽細胞とは異なる。増殖はそれほど早くなかった。現在、細胞を増殖させている。細胞が十分増えれば寄託予定である。

このヒト骨髄間葉細胞の培養は、倫理委員会の承認後に開始したもので、現在、僅かに2例しか試みていない。今後、培養例数を増やして、ヒト骨髄間葉性細胞の至適培養条件、ならびに、その分化機能を検討する予定である。現在の培養条件は、それほど十分でないと考えられ、種々のサイトカイン等の使用を視野に入れている。

(倫理面への配慮)

1) ヒト細胞の培養化に関する倫理問題

平成13年11月6日に岡山大学医学部倫理委員会に、受付番号91、課題名「ヒト組織・細胞の収集、保存、培養」で申請した。審議の結果、申請課題について平成13年12月20日の同委員会で承認された。

この申請課題の概要は、「細胞治療、再生医療、人工臓器の開発、新規の薬物開発や毒性検定の基礎的研究を行うことを目的として、手術その他で摘出されたヒト組織・細胞の収集、保存、培養を行う」である。

2) 組織・細胞を提供する個人の人権擁護

手術で摘出される組織・細胞については、個人の特定につながる情報および個人のプライバシーにかかわる情報については、これを公表しない。

手術で摘出される組織・細胞を提供される患者には、この組織・細胞の研究利用の目的を十分説明し、文書で同意の得られた患者のみを対象とする。さらに同意後でも同意を撤回できること、撤回した場合でも診療上の不利益が生じないことを同意書に明記し、これを遵守する。

3) 組織・細胞を提供する者から理解と同意を得る方法

主治医により患者に、提供される組織・細胞を用いた研究目的を、説明書に基づいて説明し、患者の十分な理解を得た上で、同意を得る。そして、別紙同意書に署名を得る。

4) 研究等によって生じる個人への不利益並びに危険性及び医学上の貢献の予測

本研究の目的は、手術で摘出され本来捨てられる組織・細胞を用いるものであり、患者への

不利益や危険性はない。

医学上の貢献に関しては、今後の細胞治療、組織再生医療、人工臓器などの基礎研究の材料を提供することで、これらの多くの研究に役立つ。

現在、ヒト肝細胞の手術材料を11の外科系の教室に依頼している。培養化材料としては、手術材料で得られる、腫瘍組織、その周辺の正常組織、および、骨の手術時に摘出される骨髄細胞を使用予定である。

C. 研究結果

1. 細胞寄託状況

2002年度に寄託した13種の細胞株(表1)とその特徴について述べる。

表1. 2002年度に寄託した細胞株

寄託細胞株名	細胞の性質
1 OUMS-36/T1	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
2 OUMS-36/T2	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
3 OUMS-36/T3	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
4 OUMS-36/T4	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
5 OUMS-36/T5	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
6 OUMS-36/T6	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
7 OUMS-36/T7	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
8 OUMS-36/T8	ヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞
9 OUMS-36	ヒト正常線維芽細胞, 有寿命性
10 KMST-6	ヒト正常線維芽細胞を放射線で不死化したもの, 腫瘍性はない
11 KMS-6	KMST-6の母細胞, ヒト正常線維芽細胞, 有寿命性
12 KMST-6T	KMST-6が培養内で自然に腫瘍性を獲得し, ノードマウスに造腫瘍性を示す。
13 OUMS-23	家族性ポリポーシス大腸癌

with the hTERT gene - OUMS-36T cell line series- *Tiss. Cult. Res. Commun.* 19, 203-204, 2000 である。

3. KMST-6

胎児由来正常ヒト線維芽細胞をコバルト-60ガンマー線を照射して不死化したものである。染色体数は3n-4nに分布し、異数性である。p53遺伝子のexon 5, codon 179に変異がある。すなわち、CAT(histidine)からAAT(asparagine)への変異がおこっている。蛋白質レベルでのP53の発現は、正常なp53のタンパク質の発現はみ

2. 表1、1-8のテロメラーゼ遺伝子導入細胞(OUMS-36/Tシリーズ)

2001年、当細胞バンクに寄託した時点ではPopulation Doubling Level (PDL)が、100代以内のものであった。したがって、それらの細胞が不死化したものか老化するものか、その時点では不明であった。今回、これらの細胞を1:8継代比で培養を続け、200代を越えたので、不死化した細胞として寄託した。また、テロメラーゼ遺伝子を導入していない元のヒト正常線維芽細胞(OUMS-36)も寄託した。これらの細胞系は、ヒト細胞の老化の機構、および、癌化のキープポイントとなる細胞の不死化の機構を解析するのに役立つであろう。この細胞系に樹立に関する文献は、Kouchi, H. and Namba, M., Normal human fibroblast cell lines transfected

られず、変異P53蛋白質のみを発現する。同時に、このp53遺伝子の発現に関連するp21やmdm2の発現も著しく低下している。一方、cdk2, cdk4, cyclin Aなどのcell cycleに関連する遺伝子の発現は、上昇している。Rb遺伝子に関しては異常を認めない。これらの遺伝子解析に関する文献は、Ijima, M., et al., Mutation in p53 and deregulation of p53-related gene expression in three human cell lines immortalized with 4-nitroquinoline 1-oxide or Co-60 gamma rays *Int. J. Cancer Res.*, 66, 698-702, 1996に詳しく報告した。ノードマ

ウスへの移植では腫瘍性はない。

この不死化 KMST-6 細胞株の樹立の経過については、文献は、Namba, M., et al., Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with Co-60 gamma rays. *Int. J. Cancer* 35, 275-280, 1985 にのべた。この KMST-6 の元の正常細胞が、KMS-6 である。

また、不死化した KMST-6 を継代して、自然に培養内で腫瘍化したものが、KMST-6T である。腫瘍の病理組織像は、線維芽肉腫である。文献は、Mikara, K. et al., Malignant transformation of human fibroblasts previously immortalized with Co-60 gamma rays. *Int. J. Cancer*, 50, 639-643, 1992 である。

ヒト正常細胞は一定の分裂回数を重ねた後、分裂を停止し老化する。ヒト正常細胞とヒト不死化細胞を細胞融合すると、その細胞は、分裂を停止し、老化現象を示す。したがって、老化形質は優性に働き、不死化形質は劣性であることが分かる。これらの事実より、我々は、正常ヒト細胞 KMS-6 で発現し、不死化 KMST-6 細胞で発現が低下する遺伝子の検索を行った。この研究を行った理由は、ヒト細胞の発癌過程で、細胞の老化、不死化の段階が律速段階であり、この段階の機構の解析がきわめて重要であるからである。そして、現在までに以下の 2 つの遺伝子について詳しく解析した。

その 1 つは、Reic と名付けた遺伝子である。正常細胞 KMS-6 と不死化細胞 KMST-6 とから cDNA ライブラリを作成し、デファレンシャルハイブリダイゼーションにより、正常細胞で発現するが、不死化細胞で著しく発現が低下するか、あるいは、発現がみられなくなった遺伝子を 99 個クローニングして、そのシーケンスを調べた。その結果、8 個の遺伝子は未知のものであった（これらの遺伝子については、特許を取得した）。そのうちの 1 つが Reic (Tsuji, T., et al., A reic gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *BBRC*, 268, 20-24, 2000) である。この遺伝子のヒト染色体の位置は、11P15 にあり、膀胱癌、肺癌、食道癌、肝癌、卵巣癌、胃癌、脳腫瘍、子宮癌、乳癌など多数の癌で、異常が報告されている位置に一致する。Reic 遺伝子の発現の低下は、不死化細胞のみならず多くの培養化されているヒト腫瘍でも証明した。さらに、生体に生じた肺癌でも低

下していることを報告した (Nozaki, I, et al., Reduced expression of reic/dkk-3 gene in non-small cell lung cancer, *Int. J. Oncology*, 19, 117-121, 2001)。また、この遺伝子を発現させると細胞の増殖が停止することも報告した (Tsuji et al., Antiproliferative activity of reic/dkk-3 and its significant down-regulation in non-small cell lung carcinomas. *BBRC* 289, 257-263, 2001)。さらに、この遺伝子が多くのヒト腫瘍で発現しない理由として、この遺伝子のプロモーター領域のメチル化関係することをみだした (Gene, in press)。現在、この遺伝子蛋白の機能として、転写因子の一種であると我々は考えている。

もう 1 つの遺伝子は、S100C である。この遺伝子は、ヒト正常細胞 KMS-6 とその不死化細胞 KMST-6 とからタンパク質を抽出し、2次元電気泳動で検索し、不死化細胞で著しく発現が低下している蛋白質のスッポトをとり、そのアミノ酸配列を調べ、カルシウム結合蛋白質である S100C 遺伝子を同定した (Sakaguchi, M., Relationship between contact inhibition and intranuclear S100C of normal human fibroblasts, *J. Cell Biol.*, 149, 1193-1206, 2000)。

このタンパク質は、正常ヒト線維芽細胞が semiconfluent で増殖状態にあるときは、細胞質に存在するが、細胞が confluent になりコンタクトインヒビションの状態になると、細胞の核内に移行する。一方、不死化細胞にも僅かにこのタンパク質は発現しているが、不死化細胞では confluent になっても、核内に移行しない。この蛋白質の核内への移行は、N 端 10 番目のスレオニンのリン酸化が必要であることを証明した。また、この蛋白質を核内で発現させると DNA 合成が止まること、そして、同時に p16, p21 などの腫瘍抑制遺伝子のカテゴリーに入る遺伝子の発現が上昇することを報告した (Sakaguchi, M., et al., Loss of nuclear localization of the S100C protein in immortalized human fibroblasts, *Rad. Res.*, 155, 208-214, 2001)。この蛋白質自身は核移行シグナルをもたない。この蛋白質が上に述べたようにリン酸化して、その後、核移行シグナルをもつ蛋白質と結合して、核内に移行する。現在、その核移行シグナルをもつタンパク質の研究を進めている。同時に、不死化細胞で S100C 蛋白質が核内に移行しない機構についても研究を進めている。

以上、同一個体に由来する正常細胞と不死化細胞を利用しての研究結果を述べたが、ここで、我々が強調したいことは、同一個体に由来する正常、不死化、癌細胞を利用することにより、個人差に基づく遺伝的差異を考慮することなく、細胞の不死化、癌化への変化に伴う、遺伝子の変異を調べることができることである。

我々の確立した正常-不死化細胞系の利用によって、さらに、興味ある遺伝子が見いだされることが期待される。

4. OUMS-23

家族性ポリポシス由来の大腸癌である。この細胞の性格は、CEAを培地に産生し、耐熱性アルカリフォスファターゼを発現する。染色体数は3nから4n領域にブロードに分散する。APC遺伝子の発現は、正常細胞に比べ半減している。ヌードマウスに造腫瘍性を示し、その組織臓は分化型腺癌である。しかし、H-ras/N-rasのcodon12, 61には変異はみられなかった。文献は、Miyazaki, M., et al., Establishment and characterization of a human colon cancer cell line, OUMS-23, from a patient with familial adenomatous polyposis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 122, 95-101, 1996 である。

D. 考察

- 1) 本年度は倫理委員会の承認を得るための用意に時間がかかり、新しくヒトから採取された細胞を培養化する時間があまりなかった。今後は、新しく採集するヒト細胞の培養化に仕事を集中したい。
- 2) ヒト細胞の培養化には、従来の動物細胞の培養化に比べ、解決しなければならない多くの問題がある。たとえば、培地の組成の問題、使用するサイトカインの種類、培養基質などである。また、将来的に、培養化された細胞が臨床的に用いられるとすれば、現在使用中の動物由来のものが混在する培地、たとえば、胎児牛血清などの使用には、安全性の面で問題が生じる可能性がある。今後、動物材料に由来するものを含まない合成培地などの開発も進める必要がある。
- 3) テロメラーゼ導入不死化ヒト細胞は、比較的核型も安定で(2nを維持し)、形態も正常なという報告がある。我々は、現在継代数200を越えた8

例のヒト不死化細胞を得て、その内3例の染色体を調べてたが、いずれも、染色体はヘテロプロイドに変化している。テロメラーゼ導入ヒト細胞の染色体が正常に保たれるとする報告は、ある一定の期間以内は正常に保たれると考えるほうがよいと結論される。

細胞の不死化の段階では、一般にクライシスという現象がみられ、この時期、細胞の増殖が低下する。今回、PDI.34代の正常ヒト線維芽細胞(OUMS-36)にテロメラーゼ遺伝子を導入し、8個のクローンを選別し、各クローンをほぼ毎週、1:8の分割比で継代し、すべてのクローンの細胞を不死化することができた。我々のテロメラーゼ遺伝子を導入した細胞には、上に述べたクライシス現象は認められず、細胞はコンスタントに増殖を続け不死化した。このクライシスが認められなかった理由として、①クローンを拾った段階でクライシスを通り越したのか、②この実験系ではクライシスが存在しなかった、などが考えられる。

従来、我々が放射線や化学発癌剤の処理で不死化したヒト細胞には、すべてに於いて、p53遺伝子の変異がみられた。また、変異p53遺伝子を正常ヒト細胞に導入してヒト細胞の不死化に成功している。これらの事実は、ヒト細胞の不死化の場合には、p53遺伝子の変異が密接に関与していることを示している。したがって、今回テロメラーゼ遺伝子導入で不死化した細胞系のp53遺伝子がどのようになっているかの検討は、興味ある研究対象である。

- 4) 現在、HeLa細胞を始め、多くのヒト癌細胞が培養化され、保存されている。しかし、その癌が由来した個体の正常細胞が培養化され、保存されているものはきわめて少ない。同一の個体に由来する正常細胞と癌細胞とがベアーで存在すれば、SNP解析を始め、非常に多くの研究に役立つであろう。

たとえば、大腸癌を培養した場合、癌細胞と同時に線維芽細胞も増殖してくるであろう。理想は、癌細胞と正常大腸粘膜細胞とをともに増殖させることが望ましいが、正常の上皮細胞を増殖させることは、現在の培養条件下ではそれほど容易ではない。したがって、次善の策であるが、線維芽細胞でもかまわないであろう。このようなベアーの細胞株の収集・保存は今後重要な研究課題であると思う。

そして、その間、腸粘膜上皮とか肺胞上皮など

のヒト正常組織の培養条件の検討を早急に進める必要がある。

E. 発表

1. Sakaguchi, M., Yamada, H., Tsuji, T., Inoue, Y., Miyazaki, M., Tanaka, T. and Namba, M.: Loss of nuclear localization of the S100C protein in immortalized human fibroblasts. *Radiat. Res.* 155, 208-214, 2001
2. Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Kondo, T., Tsuji, T., Kouchi, H. and Namba, M.: Identification of a phosphoprotein that is downregulated in immortalized human fibroblasts. *Electrophoresis* 22, 155-160, 2001
3. Pu, H., Sakaguchi, M., Kondo, T., Kondo, A., Kawabata, T. and Namba, M.: Effects of oxygen concentrations on human fibroblasts treated with Fe³⁺-NTA. *Int. J. Mol. Med.* 7: 295-300, 2001
4. Gao, C., Miyazaki, M., Kondo, T., Tsuji, T., Sakaguchi, M. and Namba, M.: Overexpression of platelet-derived growth factor B and downregulation of PDGF-receptor ? in human immortalized fibroblasts. *Int. J. Oncol.* 18, 871-875, 2001
5. Kondo, T., Sakaguchi, M. and Namba, M.: Two-dimensional gel electrophoretic studies on the cellular aging: accumulation of alpha-2-macroglobulin in human fibroblasts with aging. *Exp. Gerontol.* 365, 487-495, 2001
6. Furusako, S., Takahashi, T., Mori, S., Takahashi, Y., Tsuda, T., Namba, M. and Mochizuki, H.: Protection of mice from LPS-induced shock by CD14 antisense oligonucleotide. *Acta Med. Okayama* 55, 105-115, 2001
7. Jiang, H.-X., Pu, H., Huh, N.-H., Yokota, K., Oguma, K. and Namba, M.: Helicobacter pylori induces pepsinogen secretion by rat gastric cells in culture via a cAMP signal pathway. *Int. J. Mol. Med.* 7, 625-629, 2001
8. Nozaki, I., Ohashi, R., Matsubara, N., Hirai, R., Andou, A., Miyazaki, M., Shimizu, N. and Namba, M.: Microsatellite instability correlates with normal expression of cyclin E in hepatocellular carcinomas. *Int. J. Oncol.* 18, 1265-1269, 2001
9. Oh, S.-H., Miyazaki, M. and Namba, M.: Development of a serum-free medium for a human immortalized fibroblast cell line (KMST-6/TNF) producing tumor necrosis factor- α (TNF- α) and growth inhibitory effects of its conditioned medium on malignant cells in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 37, 169-171, 2001
10. 野崎 功, 難波正義: Human cytochrome P450 2E1 導入ヒト肝癌細胞株 (HLE/2E1) の樹立とその性状. *Tiss. Cult. Res. Commun.* 20, 1-3, 2001
11. Nozaki, I., Tsuji, T., Iijima, O., Ohmura, Y., Andou, A., Miyazaki, M., Shimizu, N. and Namba, M.: Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 19, 117-121, 2001
12. Ohashi, R., Gao, C., Miyazaki, M., Hamazaki, K., Tsuji, T., Inoue, Y., Uemura, T., Hirai, R., Shimizu, N. and Namba, M.: Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res.* 21, 657-662, 2001
13. Fukaya, K., Asahi, S., Nagamori, S., Sakaguchi, M., Gao, C., Miyazaki, M. and Namba, M.: Establishment of a human hepatocyte line (OUMS-29) having CYP 1A1 and 1A2 activities from fetal liver tissue by transfection of SV40 LT. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 37, 1071-2690, 2001
14. Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Kondo, T. and Namba, M.: Up-regulation of S100C in normal human fibroblasts in the process of aging in vitro. *Exp. Gerontol.* 36, 1317-1325, 2001
15. Yoshitomi, S., Ikemoto, K., Takahashi, J., Miki, H., Namba, M. and Asahi, S.: Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol. In Vitro* 15, 245-256, 2001
16. Inoue, Y., Miyazaki, M., Tsuji, T., Sakaguchi, M., Fukaya, K., Huh, N.H., and Namba, M.: Reactivation of liver-specific gene expression in an immortalized human hepatocyte cell line by introduction of the human HNF4 α gene. *Int. J. Mol. Med.* 8(5): 481-487, 2001
17. Baelde, H.J., Cleton-Jansen, A.M., van Beerendonk, H., Namba, M., Bovee, J.V., Hogendoorn, P.C.: High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays: application to chondrosarcoma. *J. Clin. Pathol.* 54, 778-782, 2001
18. Ieda, Y., Waguri-Nagaya, Y., Iwahashi, T., Otsuka, T., Matsui, N., Namba, M., Asai, K. and Kato, T.: IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases and gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (GLS/PD-ECGF) in a chondrosarcoma cell line (OUMS-27). *Rheumatol. Int.* 21:45-52, 2001
19. Kano, Y., Hiragami, F., Kawamura, K., Takaguchi, S., Kimata, Y., Poffenberger, C.K., Iwama, M.K., Yoshimizu, A., Nishimura, S., Miyamoto, K. and Namba, M.: Establishment of a drug-hypersensitive PC12 mutant clone deficient in nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Tiss. Cult. Res. Commun.* 20: 145-153, 2001
20. Tsuji, T., Nozaki, I., Miyazaki, M., Sakaguchi, M., Pu, H., Hamazaki, Y., Iijima, O. and Namba, M.: Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289(1): 257-263, 2001