

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

国内樹立ヒト細胞系の状況調査と収集に関する研究

分担研究者 竹内昌男 ヒューマンサイエンス研究資源バンク 所長

研究要旨

わが国で樹立された細胞株の状況を調査し、生命科学研究に必須な細胞株を収集する。収集した細胞に関する品質管理を実施しJCRB細胞として登録する。今年度は26種を収集したほか、発酵研究所より管理を移管された細胞196種を受け入れた。

A. 研究目的

わが国で樹立された細胞株の状況を調査し、生命科学研究に必須な細胞株を収集し、品質管理を行った上で、細胞バンクを通して研究者に分与する。

stock を作製し、長期保存する。樹立者は細胞株の原株の保存の責任を持つ。

- 3) 寄託された細胞株はヒューマンサイエンス研究資源バンクを通して、公共研究資源として一般に有償で分譲する。

B. 研究方法

わが国において細胞株樹立及び細胞株の遺伝子発現変異研究に関わっている次の研究者が共同研究者として本研究に参加した。分担研究者はそれぞれの研究室において樹立された細胞株を収集し、品質管理し、細胞バンクに保存する。

品質管理法：

- 1) 細菌感染については細胞培養の過程を観察することにより、マイコプラズマ感染については、染色法およびPCR法によって検出する。
- 2) 由来動物種についてはアイソザイム検査によって確認する。
- 3) ヒト細胞株の混入については、DNAプロファイリング、染色体核型によって確認する。
- 4) さらに遺伝子増幅をCGH(Comparative genomic hybridization)によって検索する。
- 5) 遺伝子(ras)およびがん抑制遺伝子(p53, PTEN, APC, BRCA-1, 2)の変異をPCR法および酵母を用いたアッセイ法によって検索する。

細胞株樹立共同研究者：

永森静志（杏林大・医・薬理；ヒト肝胆道系がん）
平川弘聖（大阪市大・医・外科；ヒト消化器がん、乳がん）
野沢志朗（慶応大・医・婦人科；ヒト子宮がん、卵巣がん）
井口東郎（九州がんセンター臨床研究部；ヒト膵がん）
柳原五吉（国立がんセンター実験動物；ヒトがん、マウス腫瘍）
嶋田 裕（京大・医・外科；ヒト食道がん）
京泉誠之（放射線影響研究所・免疫；ヒトがん、マウスがん）
執印太郎（高知医大・泌尿器；ヒト腎がん）
許 南浩（岡山大学・分子細胞医学研；ヒト肝がん）

品質管理共同研究者：

石岡千加史（東北大・加齢研；がん関連遺伝子変異検定）
稲澤 謙治（東京医歯大・難治研；染色体増幅、転座）

細胞収集法：

- 1) 上記細胞株樹立者から提供を受けた細胞は、次に示す品質管理を行い、検査に合格した細胞株を細胞バンクに保存する。
- 2) 細胞バンクは寄託された細胞のseed stock を作製し、品質管理を施し、distribution

C. 研究結果

1) 品質管理

本年度、9医療機関から26株収集した（表1）。そのうち、マイコプラズマに汚染していた細胞株、4種類と他の細胞のクロスコンタミネーションの可能性のある2株、すでに保存している細胞株などを除き17株を保存した。ヒト組織由来が12株、マウス2株、ラット3株である。KON細胞はマイコプラズマに汚染しているので除去作業をする必要があり、RERF-GC-1B, KMLS-1, KMRC-5細胞にはマイコプラズマ汚染検査を、RERF-GC-1B, OCUG-1, OCUM-1, KMLS-1,

KMRC-5 細胞には由来動物腫の検査と他細胞のクロスコンタミネーションを検査する必要がある。それらの結果によっては、品質管理試験を通り、保存の価値のある細胞株はさらに少なくなるかも知れない。

同時に IFO から収集した 196 種類の細胞株を受け入れ、分譲の条件等を記載したカタログを作製した（別紙カタログ、List of Culture）。これらはすでに品質管理が終えてあるので、研究者に分譲を行っている。

2) 遺伝子解析

IFO 番号の付いたヒト細胞、90 株について TP53 がん抑制遺伝子（以下 p53）の変異とイントロン 7 の SNP を調査した。その結果、13 細胞株に p53 の翻訳領域内に 1 塩基置換（6 ミスセンス変異）または、1-3 塩基欠失・挿入変異を認めた。1 細胞にエクソン・イントロン境界の 1 塩基置換を認めた。さらに、細胞では各種 PCR 条件下で p53 遺伝子の PCR 断片は得られず、大きな欠失が強く疑われた。すなわち、p53 変異または欠失の検出頻度は、解析を終了した 75 細胞中 18 細胞（24%）と低かった。その理由として、(1) 今回解析した細胞は、正常組織由来の細胞、肉腫、造血器由来細胞、子宮頸がんなど、p53 変異がない、または頻度が低い腫瘍が多いこと、(2) p53 変異データベースによると、エクソン 5-8 の解析では約 85% の変異を検出できるが約 15% の変異はそれ以外の領域にあること、が考えられる。残り 11 細胞株の分析データを加えさらに解析する必要がある。

3) 染色体分析

昨年分譲を受けた胃癌に由来する GC 細胞株等 25 株の染色体分析を行い、これらの細胞株には 15q26 での遺伝子増幅がみられ、11p13 領域のコピー数増加や、CD44、PDX1 の発現亢進がみられた。上皮系の固形腫瘍樹立細胞株の腫瘍に特異的な染色体変化を見いだすことは困難であった。しかし、これらの染色体分析の結果得られたパターンはそれぞれ異なっていたことから、細胞間のクロスコンタミネーションの可能性は低いことを認めた。なお、脳腫瘍 23 株とメラノーマ 3 株の計 26 株の染色体分析が現在進行中である。

D. 考察

1) 質管理をして行く過程で判ったことは、大学等

研究機関で研究に使われている細胞株にはまだまだ微生物や他細胞の汚染があることである。以前から多くの機会ですべてられていることであるが、細胞を樹立したらできるだけ早く細胞バンクに寄託し、そこで検査を通過した高品質の細胞株をまた大学等研究機関で研究に使用するべきである。

2) 高品質の細胞株を用いて得られたデータなので、信頼性の高い結果が得られたと思われる。

E. 結論

平成 13 年度にヒト、マウス、ラット等 213 種の細胞株を収集し、196 株はすでに分譲を初めており、残りの 17 株については品質管理を続ける。190 株のがん抑制遺伝子を解析中であり、26 株については染色体分析を実施中なので、次年度中には結果を報告できるであろう。

F. 発表

各協力研究者の業績を除き、分担研究者による発表はない。

G. 添付資料:

List of Cultures」HSRRB Cell Line Received from IFO in 2001

(表 1) 平成 13 年度収集した培養細胞の品質管理作業状況

細胞株名	由来組織	樹立者	登録番号 JCRB	寄託日	アンプル 作成数	汚染検査 マイクロアッセイ	由来動物種	他細胞	汚染除去
ヒト由来細胞株									
1 KP-2	隣管細胞腫	井口東郎	0181	H13.10.22	29	-	ヒト	-	-
2 KP-4	隣管細胞腫	井口東郎	0182	H13.10.22	24	+	ヒト	-	→7
3 QGP-1	隣島細胞腫	井口東郎	0183	H13.10.22	28	-	ヒト	-	-
4 HCC-50	大陽がん	柳原五吉	0184	H13.10.26	29	-	ヒト	HCC-48 と類似	-
5 HCC-48	大陽がん	柳原五吉	0185	H13.10.26	30	-	ヒト	HCC-50 と類似	-
6 KYSE-30	食道扁平上皮がん	嶋田 裕	0188	H13.10.22	28	-	ヒト	-	-
7 KYSE-50	食道扁平上皮がん	嶋田 裕	0189	H13.10.22	58	-	ヒト	-	-
8 KYSE-70	食道扁平上皮がん	嶋田 裕	0190	H13.10.22	56	-	ヒト	-	-
9 OCUG-1	胃癌	平川弘聖	0191	H13.11.7	53	+	---	-	→8
10 OCUM-1	胆嚢がん	平川弘聖	0192	H13.11.7	59	+	---	-	→9
11 KON	口腔扁平上皮がん	京泉誠之	0194	H13.11.27	58	+	ヒト	-	要処理
12 RERF-GC-1B	口腔扁平上皮がん	京泉誠之	未	H13.11.27	未作製	未	未	-	処理済み
13 KP-4	隣管細胞腫	嶋田 裕	0182	16→	59	-	ヒト	-	処理済み
14 OCUG-1	胃癌	平川弘聖	0191	17→	57	-	未	未	処理済み
15 OCUM-1	胆嚢癌	平川弘聖	0192	18→	57	-	未	未	処理済み
16 huH-1	肝がん	舩 南浩	0199	H14.1.11	55	-	ヒト	-	-
17 KMLS-1		執印太郎	0200	H14.1.17	25	未	未	-	-
18 KMRC-5		執印太郎	未	H14.3.5	未作製	未	未	-	-
19 SKG-111a	子宮頸がん	野澤志朗	=		=				
20 SKG-111b	子宮頸がん	野澤志朗	=		=				
21 SNG-M	子宮体部がん	野澤志朗	=		=				
22 SNG-11	子宮体部がん	野澤志朗	=		=				
23 RMG-11	卵巣がん	野澤志朗	=		=				
24 RMG-1	卵巣がん	野澤志朗	=		=				
マウス由来									
25 OV3121-ras4	卵巣腫瘍	柳原五吉	0186	H13.10.26	25	-	マウス	-	-
26 OV3121-ras7	卵巣腫瘍	柳原五吉	0187	H13.10.26	59	-	マウス	-	-
27 WB-F344	肝上皮	京泉誠之	0193	H13.11.27	59	未	ラット	-	-
ラット由来									
28 MS-653-A	MC 誘発繊維肉腫	柳原五吉	1001.1	H14.1.23	未作製	未	ラット	-	-
29 MS-653-G	MC 誘発繊維肉腫	柳原五吉	1001.2	H14.1.23	未作製	未	ラット	-	-
品質管理の終了した細胞									
213 196 種類	発酵研究所から移管		IFO #	H13.4.2	作製済み	-	分譲可能		
(未: 未検査	+: 汚染がある	-: 非汚染		=: 実施の予定なし)					

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療研究事業）
分担研究報告書

ヒトの疾病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

分担研究者 田中憲穂（財）食品薬品安全センター秦野研究所 細胞毒性学研究室長

研究要旨

ヒト及び実験動物のがんや遺伝性疾患に由来する培養細胞株は、それらの疾病のモデル実験系として極めて有用である。また、近年トランスジェニックマウスやノックアウトマウス等の遺伝子改変実験動物に由来する培養細胞株も利用されるようになってきた。本研究は、研究資源としての培養細胞株の充実を目的とし、これまでにヒトや遺伝子改変動物に由来する細胞株の作製及び収集を行ってきた。本年度は、化学物質等による発がん過程の解明や、安全性試験に有用な細胞株の作製を目的とし、λ EG10 配列を有する色素性乾皮症（相補群 A 及び G）モデルマウスや、短期発癌実験に有用な c-Ha-ras 変異モデルマウスより、培養細胞株の作製を試みた。このようにして得られた除去修復機能を欠損する色素性乾皮症モデルマウスの細胞株では、従来の染色体異常試験に常用されている CHL/1U 細胞に比べて、UV や化学物質に高感度であることが示唆された。また、これまでに収集した単一ヒト染色体雑種ライブラリー細胞に加え、保持されているヒト染色体の親起源が明らかになっている株の分譲を受け、配布準備を開始した。

A. 研究目的

ヒトまたは疾病モデルの実験動物に由来する細胞は、病因の解明に不可欠である。しかしながら、一般の研究者では材料組織の入手や、樹立した細胞株の維持が困難である場合が多く、研究資源として有効に活用されていないのが現状である。また近年、遺伝子導入、ノックアウト、ノックインなどの遺伝子操作により、多くの実験動物が作出され主として遺伝子機能の解明に使われている。一方で、これらの動物から得られた細胞株は、医薬品や化学物質などの高感度な安全性試験の利用に極めて有望である。そこで、JCRB細胞バンクから、研究資源として広く研究者に頒布することを目的とし、それらの細胞株の収集、作製、品質管理を行う。

B. 研究方法

1) 色素性乾皮症モデル培養細胞の作製

使用したマウスは、田中亀代次博士（大阪大学 細胞生体工学センター）が作製した色素性乾皮症相補群 A 遺伝子ノックアウトマウス及び色素性乾皮症相補群 G 遺伝子ノックアウトマウスに、能美健彦博士（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部）らによって λ EG10 トランスジェニックマウスを 10 世代バッククロスされたものである（それぞれ、XPA 及び XPG と略す）。

約 8 週齢の XPA マウス 4 個体の肺組織をトリプシン分散し、10% ウシ胎児血清を含む DME/F12

で継代培養した。また、XPG マウス 4 個体（約 1 週齢）のホールボディをトリプシン分散し、同じ培地で継代培養した。いずれも、1 個体から 1 ラインの培養を行った。

また、比較用にバッククロスに用いたのと同じ系統の λ EG10 トランスジェニックマウス（約 8 週齢）4 個体の肺由来細胞の継代培養を行った。

2) c-Ha-ras 変異モデル培養細胞の作製

使用したマウスは、勝木元也博士（東京大学 医科学研究所）が作製した、変異 c-Ha-ras トランスジェニックマウスである。わが国で開発されたこのトランスジェニックマウスは、短期発がん試験を意図して作出されている多くの遺伝子改変動物の中で、International Validation study による発がん試験（HLS1）で、高感受性のマウスである事が評価されている。

2 個体（約 6 週齢）の肺組織をトリプシン分散し、10% ウシ胎児血清を含む DME/F12 で継代培養した。また、比較用に同じ遺伝的バックグラウンドを持つ 2 個体（約 6 週齢）の肺由来細胞を単離し、同じ培地で継代培養した。いずれも、1 個体から 1 ラインの培養を行った。

（倫理面への配慮）

動物を用いた実験は、分担研究者の所属する、（財）食品薬品安全センター秦野研究所動物実験倫理委員会により、当該研究計画が、動物実験

倫理上適切であることを確認した。

ヒト由来細胞株については、「ヒト組織を用いた研究開発の在り方専門委員会」（厚生省・専門委員会、1998年）および「非医療分野におけるヒト組織・細胞の取り扱いについて」（日本組織培養学会倫理問題委員会報告書、1999年2月）に準じた取り扱いを行った。

C. 研究結果および考察

1) 色素性乾皮症モデル培養細胞の作製

本研究に用いたXPA及びXPGノックアウトマウスは、ホモ個体が致死であるため、ヘテロの状態ですべて系統維持されていることから、培養初期にXPA及びXPG遺伝子のノックアウト状態をPCRにて確認したところ、XPAではノックアウトホモ1ライン及びワイルドホモ3ライン、XPGではノックアウトホモ1ライン、ヘミ2ライン及びワイルドホモ1ラインが得られていた。作製した凍結アンブルロットの一覧を表1に示した。

これらのラインは、15～30PDLに達するまで継代培養し、不死化していることを確認した（マウス繊維芽細胞の細胞分裂限界は5～10PDLとされている）。

色素性乾皮症患者の病因は、ヌクレオチド除去修復異常であり、相補群A遺伝子は損傷部位への結合、相補群G遺伝子は異常ヌクレオチド部位の切り出しに関与していることが明らかにされている。ヌクレオチド除去修復の異常のため、紫外線や変異原に高感受性を示すことが知られているので、現在、B領域紫外線及びシスプラチンの感受性を、細胞毒性及び染色体構造異常誘発性の2点から検討している。これまでにXPGノックアウト株（1-1-XPG）とその対照株（1-3-XPG）に加えて、化学物質の染色体異常試験に広く用いられているチャイニーズハムスター肺由来のCHL/IU株の3株の染色体異常試験を実施した（表2）。

UVBを用いた試験では、ノックアウト株・対照株のいずれもCHL/IUより高い感受性を示したが、同じ照射線量ではノックアウト株においてより高い頻度で染色体異常が誘発された。一方、シスプラチンを用いた試験では、ノックアウト株・対照株のいずれもCHL/IUより高い感受性を示したが、ノックアウト株と対照株の間の差異は明確でなかった。今後、確認実験やクロニング株での感受性の検討を行う。

これらの培養細胞株は、色素性乾皮症病態の*in vitro*実験や、ヌクレオチド除去修復機構の

基礎的研究への応用が期待される他、紫外線や変異原の高感受性な実験系にも有用と考えられる。とりわけ、 λ EG10トランスジーンのパラクアッセイ（Ecogtp及びSpiアッセイ）が可能であることから、新しい*in vitro*突然変異検出系としての応用が期待される。

2) c-Ha-ras 変異モデル培養細胞の作製

現在、自然不死化のための継代培養を実施している。c-Ha-rasは、ヒトのがんで高頻度に変異していることが知られており、特にイニシエーションの段階に深く関与していると考えられている。このことから、発がん初期の状態のモデル細胞として、がん形成メカニズムの研究に有用と考えられる。rasH2マウスは、ヒト由来のc-Ha-ras遺伝子が複数コピータンデムに導入されており、腫瘍発生の成因としては導入c-Ha-ras遺伝子の変異のほか、遺伝子の過剰発現が腫瘍組織でみられる事が分っており、この動物から得られた細胞株の*in vitro*発がん（形質転換）の可能性が注目される。

また、当細胞バンクの佐々木らによって開発されたBALB/3T3細胞にc-Ha-rasをトランスフェクトして樹立したBhas細胞は、短期トランスフォーメーションアッセイやプロモータアッセイに有用であることが示されていることから、本細胞でも同様に、*in vitro*の形質転換試験による短期アッセイ系への応用が期待される。

3) 起源が明らかなヒト単一染色体雑種細胞の収集

ヒト単一染色体雑種細胞を、押村光雄教授（鳥取大学細胞工学教室）より分与を受けた。本年度は、単一のヒト6、11、15、19番染色体を有する雑種細胞株について、細胞増殖および細菌・マイコプラズマ等の汚染の有無や、ヒト染色体保持率などの品質管理を開始した。

これらの細胞株に含まれるヒト染色体は、由来する個体のゲノムインプリンティング状態を保持していることが明らかになっており、インプリンティングを受けて親起源により発現状態が変化する遺伝子群の機能解析に有用である。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagawa, Y., Takigawa, Y., Tanaka, N., The rapid screening of photo-genotoxic compounds using photo plasmid-relaxation assay, *Environ. Mutagen Res.*, 2001, 23, 107-118.

表1. 色素性乾皮症モデルマウスより作製した凍結アンプルロットの一覧

Origin	Line Name	Stock Date	Passage	Lot	PDL*
gpt x deltaXPA/N5 -> WT	1-XPA+	09/07/01	4	010907	2.8
		11/23/01	19	011123	15.8
	2-XPA+	09/07/01	3	010907	3.2
		11/23/01	20	011123	21.5
	3-XPA+	09/10/01	3	010910	1.7
		11/23/01	18	011123	18.3
4-XPA-	09/17/01	3	010917	2.3	
	11/16/01	13	011116	19.7	
gpt/XPG (-/-)	1-1-XPG-	09/11/01	3	010911	0.7
		11/23/01	18	011123	23.6
gpt/XPG (+/-)	1-2-XPG+-	09/07/01	2	010907	1.1
		11/17/01	17	011117	29.9
	1-4-XPG+-	09/14/01	3	010914	4.1
		11/16/01	15	011116	23.4
gpt/XPG (+/+)	1-5-XPG+	09/15/01	2	010915	2
		09/14/01	2	010914	5.5
	1-3-XPG+	11/16/01	15	011116	24
gpt/B6 B&	6-gpt	09/14/01	3	010914	2.1
	7-gpt	09/14/01	4	010914	1.9
	8-gpt	09/17/01	3	010917	1.2
	8-gpt	11/16/01	12	011116	15

*: Population doubling time

表2. XPGノックアウト株 (1-1-XPG)、対照株 (1-3-XPG)、CHL/IU株を用いた染色体異常試験

a. UVB (0.8 mW/cm², ~158sec treatment and 24h recover)

Cell line	Irradiance (mJ/cm ²)	Observed cells	No. of cells						
			No. of structural aberrations				with aberrations		
			ctg	ctb	cte	mul	TAG	TA	TA(%)
1-1	0	100	0	1	1	0	2	2	2.0
	0.3	100	0	4	1	0	5	5	5.0
	0.94	100	0	11	1	0	12	12	12.0
	3	100	0	16	12	0	19	19	19.0
1-3	0	100	0	1	1	0	2	2	2.0
	0.3	100	0	1	0	0	1	1	1.0
	0.94	100	0	5	2	0	7	7	7.0
	3	100	0	7	6	0	11	11	11.0
CHL/IU	0	100	0	0	0	0	0	0	0.0
	0.3	100	0	0	0	0	0	0	0.0
	0.94	100	0	1	0	0	1	1	1.0
	3	100	0	0	1	0	1	1	1.0

b. Cisplatin (24h continuous treatment)

Cell line	Concentration (μg/mL)	Observed cells	No. of cells						
			No. of structural aberrations				with aberrations		
			ctg	ctb	cte	mul	TAG	TA	TA(%)
1-1	0	100	0	1	0	0	1	1	1.0
	0.079	100	0	21	28	1	32	32	32.0
	0.25	46	0	26	33	2	26	26	56.5
1-3	0	100	0	1	0	0	1	1	1.0
	0.079	100	0	20	6	0	23	23	23.0
	0.25	73	0	26	36	0	31	31	42.5
CHL/IU	0	100	0	0	0	0	0	0	0.0
	0.079	100	0	1	0	0	1	1	1.0
	0.25	100	0	2	6	0	7	7	7.0
	0.79	100	0	24	72	0	61	61	61.0

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; TAG, total no. of cells with aberrations including gap; TA, total no. of cells with aberrations except gap.