

ついでに理論的・実践的対応を目指している。

このような積み残された問題の一つに、「将来どのように研究利用されるか未定である」という形でヒト試料を研究に提供していただく際に、公的バンクとして避けることのできない問題がある。さらに、提供者・研究参加者にはどのようなことを理解して頂くことが重要であるのか、そのような理解を促進するために、どのような方策が可能であるのかという問題がある。現状では、インフォームド・コンセント・プロセスでの説明に工夫が必要であることが言われているが、根本的検討は行なわれていない。今回、JCRB細胞バンクでは、この説明を補助する目的で、広い分野で使えるような説明補助ビデオプログラムをNHKエデュケーショナルと共に作成した。また、基本的説明文書を作成し、ビデオと共に国立医薬品食品衛生研究所、研究倫理審査委員会において審査を受け、一定の評価を受けることができた。

しかし、この公的研究資源バンクへの提供の問題は、予想していたよりも広範囲の社会的対応が必要であることが明らかとなってきた。英国では、大規模なヒト資料バンクであるUK Biobankの立上げと平行した形で、ゲノム、病歴、ヒト組織などの研究利用に関する検討が広範に行なわれている。医療体制としても日本に近いイギリスの事例を調査研究することは、日本における問題を解決する際の大きな助けとなるのではないかと考えている。

ヒト研究資源の問題を社会の理解の元に研究基盤として育てていくためには、実務的問題への対応と共に、社会の理解を得る努力とそれを支える理論的研究が重要な場面もあると考えている。

D. 考察

1985年に細胞バンクが設立されて以後、1995年の対がん10ヵ年総合戦略の終了に伴って、同事業は事業費を伴う国の事業として承認された。これに伴い、細胞の分譲については総務庁より有償化する必要がある旨勧告を得て、分譲事業をヒューマンサイエンス研究資源バンクに移管することとなった。分譲用細胞の移管作業に数年を要し、新規細胞を積極的に収集することが出来なかったが、2000年度までには作業完了の目処がついたので、今期の研究班からは、年間50種の細胞を収集するという目標を立てて積極的な細胞の収集を再開した。結果は、研究結果で述べたとおりほぼ当初の目標を達成した。

細胞の研究資源化には各細胞の培養と品質管理に関する様々な実験が必須で、一人の作業者が担当できる細胞の数はおのずと限りがある。作業者の能力を超えて多くの細胞を同時に培養することを強要すれば、クロスコンタミネーションや汚染の発生が懸念される。安定したシステムとするには一人の作業者が担当する細胞の種類を一人1ヶ月あたり3種類にしている。力のある作業者の場合は、これ以上の細胞を培養できるが担当者の自主的判断に任せることにしている。現在、培養を担当している職員は4名であるが、品質管理実験も分担しているので、当バンクが1ヶ月あたりに培養できる細胞は最大6種類程度である。マイコプラズマ汚染が検出された場合は、すぐに除染とその後の検査培養が追加されるので、その場合は3ヶ月ほどは他の細胞の培養が中断されることとなる。これは内部感染を防止するために必要な措置となる。

我々はわが国に初めて設立された研究用培養細胞研究資源を収集して提供する任務を持った公的細胞バンクである。公的細胞バンクとして重要な点は、細胞の標準化であると語られることが多いが、その内容は細胞を汚染する微生物を排除することと、他の細胞との誤謬を排除することが最低限の業務であることを意味している。その上で、原著で報告された各細胞の性状を確認することが重要である。

このような課題を遂行するには、微生物の検出や細胞識別法を確立することが重要であるが、その研究手法は日進月歩で進歩している。我々は、そうした状況の中で、より精密な実験を求めて新しい実験手法を取入れ開発することが求められている。

1970年代後期に遺伝子配列を決定する実験手法が確立されて以後、遺伝子関連の研究が著しい進展を見せ、遺伝子断片分析法、PCR法などが相次いで確立された。その結果、現在では、微量の混入微生物を検出する手法としてPCR法の地位が確立することとなった。同時に、同種内における遺伝子DNAの配列に関する種内多様性が明らかとなった。これとPCR法を組み合わせることによって細胞の個別識別法が確立した。世界各国の細胞バンクは、この方法を採用して、ヒト細胞間のクロスコンタミネーションを明らかにしつつある。我々も2002年までに、収集したヒト細胞を系統的に調査し、約4-5%程度の細胞が誤っていることを明らかにした。

20世紀が終了し21世紀に入った現在、ヒトの全遺伝子配列が解明され、これからの研究はこれを元に、より精密な研究が求められる時代に突入するであろう。

そうした精密な実験・研究は研究者自身の厳密な洞察力に加えて、材料の正確さが求められることを意味している。そのような時期に、遺伝子を元にした新しい実験手法がさらに厳密に細胞の正確さを決める手法として確立されたことは大変重要である。今後収集する培養細胞においては、このような実験手法をふだんに活用して誤りが無い細胞を分譲する研究基盤をさらに発展させなければならない。

しかし、このような実験手法は現在のところヒトに由来する細胞にしか適応できないが、同様のクロスコンタミネーションは他の動物に由来する細胞にも発生している可能性は否定できない。そこで、他の動物でのDNAフィンガープリント法の手法を確立することも重要であろう。

しかし、細胞バンクにおけるこのような研究の問題点は次のようなものであると考えられる。つまり、我々は、細胞の真偽や汚染の有無に関して様々な疑問を持っているので、そうした疑問を解決するための実験手法の開発を地道に行う必要があるが、それは可能である。しかし、細胞バンクという実務的課題を抱えている我々は、確立した実験手法を日常的な細胞バンク運営の一環として実用化するとともにさらに日常的な細胞バンクの運営の中に取り入れてゆかなければならないという宿命を持つ。しかし、いかに細胞バンクが重要であるとしても、そこに投入される人的資源には限界があり無尽蔵に職員を増やせるわけではない。そこで新しい実験手法を確立した場合に、それらを全て実用化して取り入れていくのは不可能であろう。過去に採用していた実験手法を廃棄し、新しい実験手法を取り入れるという決断をいずれ行わなければならない時が来ると思われる。

しかし、ここ10年ほどの間に登場してきた新しい細胞品質管理のための実験手法のほとんどはPCR法をその中核的技術としている点に特徴がある。マイコプラズマを検出する場合は、マイコプラズマ検出用のプライマーによるネステッドPCR法を使用する。細胞のクロスコンタミネーションを検出する場合は、ターゲットとする遺伝子領域に適した各種プライマーによるPCR法を利用している。

このことは、検査対象とする遺伝子領域の近傍に位置するプライマーを変えるだけで実験手法には大きな共通性が見られるので品質管理実験の簡素化統一化が図れるかもしれない。今後は、実験手法の統一化も視野に入れた簡素化迅速化なども重要な課題になるのではないかと考えている。

また、細胞の品質管理が厳密さを要求される中で、さらに詳細に細胞の遺伝的性状を明らかにすることが今後求められるようになると思われる。そうした将来への対応に備えて、染色体分析のための新しい技術の導入が必須である。そのため、我々はFISH法を利用した2次元ならびに3次元の染色体分析法を積極的に導入してヒト細胞を中心に核DNAの構造や立体配置に関する検討も始めている。

細胞バンクにおける品質管理の意味は大変に大きく、上で考察したようにその実験手法は日々改善され発展してゆくものである。そこで細胞バンクの運営には大きな問題が発生することとなる。つまり、改良された実験によって生み出される新しい情報をどのように記録し、利用者に提供してゆかかという課題である。

そのために我々は、コンピュータを採用し、様々なデータを電子ファイル化して記録して保管するシステムを開発してきたが、可能な限り小さなシステムで我々自身が扱える汎用プログラム言語を採用してきた。その結果、プログラムの開発は簡素化されており、品質管理実験の変更に伴うプログラムの改善を直ちに実施できるようになっている。大掛かりな変更が必要な場合はコーディングに時間がかかるので、民間にコーディングを依頼するが、簡単な修正の場合はその場で担当者が修正を加えている。このシステムは、細胞バンクのフレキシブルな運営に必須であると考えられるので、今後も踏襲しようと考えている。

コンピュータシステムは1980年代以降、小型化・汎用化の流れが定着して我々でも自由に扱える環境が整備されてきた。そうした流れの中で、データ記憶容量は増大し処理速度も増加してきた。そうした流れの中で1900年代中ごろから培養の課程で生じるさまざまな画像情報を利用者に提供するためのシステムの構築を試み、ほぼ完成した。現在ではコンピュータ環境はさらに発展し、ネットワーク環境が非常な勢いで整備されつつある。そうした利点を生かして、今期から細胞が分裂して増殖してゆく様子を撮影した動画を利用者に提供する試みを開始することとし、培養中の細胞を撮影するシステムの検討を実施すると共に、撮影後の動画作成システムの検討、動画ファイルのデータベース化やそれを細胞とともに管理するシステムの構築についての検討も開始した。

E. 結論

生命科学研究基盤としての細胞バンク業務に関連する研究課題について検討を加え、様々な改善

を模索するのが本研究の課題であり、実行している。

F. 健康危機管理情報

特に無い。

G. 論文発表

欧文誌への発表

1. Masui, T., Sofuni, T., Ishii, M., Imanishi, Y., Yasui, H., Takada, Y., Hayashi, M., and Mizusawa, H. Ethical issues in use of human materials, a practical approach by JCRB Cell Bank. *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 19: 1-15, 2000.
 2. Tanabe, H., Nakagawa, Y., Minegishi, D., Hshimoto, K., Tanaka, N., Oshimura, M., Sofuni, T., and Mizusawa, H. Human monochromosome hybrid cell panel characterized by FISH in the JCRB/HSRRB. *Chromosome Res.*, 8: 319-334, 2000.
 3. Osamu Imamura, Kumiko Fujita, Akira Shimamoto, Hideyuki Tanabe, Shunichi Takeda, Yasuhiro Furuichi, Takehisa Matsumoto: Bloom helicase is involved in DNA surveillance in early S phase in vertebrate cells. *Oncogene* 20 : 1143-1151 (2001).
 4. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, Toji LH, Ohno T, Tanabe H, Arlett CF, Kelland LR, Harrison M, Virmani A, Ward TH, Ayres KL, Debenham PG: Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 8012-8017 (2001).
 5. Hideyuki Tanabe, Stefan Muller, Michaela Neusser, Johann von Hase, Enzo Calcagno, Marion Cremer, Christoph Cremer, Thomas Cremer: Evolutionary conserved 3D positioning of orthologous chromosomes and chromosome segments in primate lymphoblastoid cell nuclei. *Annales de Genetique* 44 : s120 (2001).
- ##### 国内誌への発表
1. 増井徹、水沢博 細胞と組織の凍結保存と解凍操作、*蛋核酵*、45、2195 - 2201 (2000).
 2. 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、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、*Tiss. cult. Res. Commun.* 19, 1-15 (2000).
 3. 高田容子、増井徹、田辺秀之、原沢亮、水沢博、培養細胞系でのマイコプラズマのPCR検出法、*Tiss. cult. Res. Commun.* 19, 131-138(2000).
 4. 増井 徹, 林 真, 田辺秀之, 水澤 博: ヒト資料の研究利用に関する政府等ガイドラインの現状 国立医薬品食品衛生研究所報告 119 : 40-46 (2001).
 5. 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・細胞の取り扱いと法・倫理、*ジュリスト*、1993、2-35、2001.
 6. 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.
 7. 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).
 8. 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 : 1601-1608 (2001).
 9. 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).
- ##### 学会発表
- ##### 海外発表
1. Mizusawa, H. Quality control of cell lines in Japan, Congress on In vitro Biology, 2000 San Diego.

2. H. Tanabe, R. Iizuka, M. Hojo, M. Kurematsu, Y. Takada, T. Masui and H. Mizusawa: Identification System for Cross-Contamination in Cultured Cell Lines by Combined Methods with STR-PCR and Molecular Cytogenetics in JCRB. World Congress on In Vitro Biology 2002 (2002.6)
- 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 (2001.8.30-9.1)

国内発表

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
6. 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 (2001.8.30-9.1)
7. 高田容子、飯塚了太、峯岸大輔、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 (2001.8.30-9.1)
8. 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、日本人類遺伝学会第46回大会 (2001.10)
9. 飯塚了太、田辺秀之、高田容子、北條麻紀、樽松美治*, 増井 徹、水沢 博:STRプロファイルの長期継代培養における安定性:HeLa関連4細胞株を用いた解析、日本組織培養学会第75回大会 (2002.5)
10. 田辺秀之、Marion Cremer*, Thomas Cremer*, 北條麻紀、林 真、水沢 博:3D-FISH法によるヒト18番および19番染色体のトポロジー:間期核における染色体テリトリーの解析、第55回日本細胞生物学会・第35回日本発生生物学会・合同大会 (2002.5)
11. 田辺秀之、Felix A. Habermann1、Stefan Muller、Marion Cremer、Johann von Hase、Christoph Cremer、Thomas Cremer、北條麻紀、林 真、水沢 博:染色体テリトリーの核内配置:ヒト18番および19番染色体ホモログの核内配置はニワトリ、霊長類細胞において進化的に保存されている、日本進化学会第4回大会 (2002.8)
12. 田辺秀之、石田誠一1、篠崎陽一1、北條麻紀、首藤紘一2、井上和秀1、林 真、水沢 博:HL60関連3細胞株の核型分析とレチノイン酸による分化誘導、日本人類遺伝学会第47回大会 (2002.11)

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

研究要旨

前年度に引き続き hTERT 遺伝子を持つレトロウイルスベクター導入による、ヒト遺伝病患者由来初代培養線維芽細胞の不死化を行い、その細胞特性の検討を行った。常染色体優性の遺伝様式を示す高発癌性遺伝病患者由来細胞からも、hTERT 導入後 population doubling level (PDL) が 50 を過ぎても増殖し続ける不死化細胞を得ることに成功した。これら hTERT 遺伝子導入による不死化細胞株のうちごく一部には染色体の数的異常や形態異常が見いだされるものの、その多くは、染色体数の変動が非常に少なく、極めて正常に近い性質をもつと考えられた。そのため、このような細胞株は、培養細胞研究資源として極めて利用価値が高いと思われる。今回作成した細胞株については、JCRB 細胞バンクに登録した。

A. 研究目的

ヒトゲノムの全塩基配列が決定され、21世紀における生命科学の重要研究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であるのみならず、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。そのため、昨年度より 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、さらにその細胞特性の解析を行った。昨年度に樹立した4疾患に関しては染色体が安定に保たれ、しかも元の細胞の性質が保持されていた。今年度はさらに多くの細

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、ファンコニ貧血症患者由来細胞についてはマイトマイシン C (MMC) 感受性について、それぞれコロニー形成法を用いて検討した。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。また、G-バンド法により、核型分析を行った。

(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い行っている。

C. 研究結果

昨年に続き、常染色体劣性様式の高発癌性遺伝病で、DNA 修復に関連する遺伝子異常による疾患群である色素性乾皮症及びファンコニ貧血症の患者由来細胞株各々 1 種類ずつに、hTERT 遺伝子を導入して、不死化細胞株を樹立することを試みた。

色素性乾皮症は、紫外線に高感受性を示し、皮膚癌を高頻度で発症する。多くの患者では DNA にできた損傷の除去修復に欠損があるが、相補性 V 群に属する患者は DNA 合成酵素に欠損があることが最近明らかにされた。今回は、既に JCRB バンクに登録している初代線維芽細胞 XP2SA (JCRB0305、相補性群 V) 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 XP2SA TERT が得られた。紫外線感受性は親株と同程度に高感受性であり、また染色体数については平均値は 46.0、中央値は 46 であった (表 1)。

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 FA18JTO (JCRB0315) 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 FA18JTO TERT を得た。FA18JTO TERT 細胞は親株同様 MMC に高い感受性を持っており、DNA 架橋の損傷修復に欠損があることを示していた。染色体数の平均値は 46.9、中央値は 46 であった (表 1)。

高発癌性遺伝病には、DNA 修復に関連する遺伝子異常による疾患群だけでなく、細胞増殖に関連する遺伝子異常による疾患群もあることが知られている。その多くは細胞分裂を制限ないし抑制する癌抑制遺伝子が原因遺伝子であり、その欠失並びに変異、すなわち機能が失われることによって発がんに至る。これまでは DNA 修復に関連する遺伝子異常による疾患群の細胞について不死化を行ってきたが、今年度はさらに細胞増殖に関連する遺伝子異常による疾患細胞の不死化を試みた。

網膜芽細胞種は、主に小児の時期に発症する眼にできる腫瘍であり、常染色体優性の遺伝様式を

示す疾患である。その原因遺伝子は RB1 遺伝子であり、細胞周期を制御する機能を有している。既に JCRB バンクに登録している初代線維芽細胞 RB16KY (JCRB0311) 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 RB16KY TERT を得た。RB16KY TERT 細胞の染色体数は平均値は 47.1、中央値は 47 であった (表 1)。

この他同様に常染色体優性遺伝様式の高発癌性遺伝病細胞の不死化を行った。家族性大腸腺腫症は原因遺伝子が APC 遺伝子或いは DCC 遺伝子であり、その初代線維芽細胞 FPC5JTO (JCRB0318) 及び FPC15JTO (JCRB0319) から、それぞれ不死化細胞 FPC5JTO TERT 及び FPC15JTO TERT 細胞を得た。ともに染色体数はほぼ 46 本であった (表 1)。PTCH 遺伝子の変異を原因とする基底細胞母斑症候群細胞 BCNS1KO (JCRB0324) から BCNS1KO TERT、serine threonine kinase である STK11 を原因遺伝子とする Peutz-Jeghers 症候群細胞 PJS5JTO (JCRB0321) から PJS5JTO TERT を得た。いずれも染色体数は平均値、中央値とも 46-47 であり、安定していた。

以上の細胞はすべて染色体数がほぼ 46-47 本と安定していたが、色素性乾皮症患者細胞 XP2YO (相補性群 F) の hTERT による不死化を行い、XP2YO TERT を得た。この細胞の染色体数を調べたところ、(表 1) のように 4 倍体の細胞が細胞集団の約 10% を占めていた。近 2 倍体の細胞でも染色体が 1 本増加しているものが全体の約 25% あった。核型分析の結果、増加している染色体は 7 番染色体が多かったが、他の染色体が増加している場合もあった。核型分析の結果、転座も多いことが判明し、特に 6 番染色体と 12 番染色体との間の転座が全体の約 25% に見られた。このような異常が生じた原因としては、元々の初代培養細胞集団中に含まれていた異常染色体を持つ細胞が不死化し、これらが増殖速度が速いなどの増殖に有利な性質を持っていたために長期培養の間に細胞集団中で大きな比率を持つようになったこと、或いは hTERT 導入の際または導入後の培養の間に染色体が不安定となり異常が生じたこと、いずれか或いは両方が考えられる。正常核型細胞を単離し、長期培養後の染色体の安定性を検討することが必要であると思われる。

(表) hTERT 導入細胞株染色体数分布表

JCRB細胞番号	細胞名	染色体数														Average	Median
		41	42	44	45	46	47	48	49	81	91	92	94	95			
JCRB0305	XP2SA TERT				6	91	3									46.0	46
JCRB0311	RB16KY TERT				2	38	57	2					1			47.1	47
JCRB0315	FA18JTO TERT				5	90	3					1	1			46.9	46
JCRB0318	FPC5JTO TERT			3	8	88	1									45.9	46
JCRB0319	FPC15JTO TERT		2	6	15	74	3									45.7	46
JCRB0321	PJSJTO TERT			2	4	62	31	1								46.3	46
JCRB0324	BCNS1KO TERT	1			2	6	89	1	1							46.9	47
未登録	XP2YO TERT			1	3	61	24		1	1		4	4	1		50.8	46

各細胞株 100 細胞についての分析結果

D. 考察

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6種類の疾患について、それぞれ1株あるいは2株、合計7株の不活化細胞を得た。当初目標は5株の樹立であり、所期の目標を達成した。得られた不活化細胞は、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。特に本年度はこれまでの常染色体劣性高発癌性遺伝病に加えて常染色体優性遺伝病の患者細胞をhTERT遺伝子を用いることにより、不活化を行った。これらの細胞株の染色体数はほぼ正常であり、これらの細胞の利用価値は非常に高い。

今回樹立した不活化細胞株は、これまでの常染色体劣性遺伝病に加えて常染色体優性遺伝病患者に由来するものである。これらは細胞の増殖に関与する癌抑制遺伝子に異常が生じたことによるものであり、細胞分裂を制限ないし抑制する機能が失われることによって発がんに至ることが知られ

ている。これらの遺伝子の機能の解明は、細胞増殖の機構を明らかにする上で必須のものである。特に、hTERT導入による不活化は細胞の増殖速度に殆ど影響を及ぼさない。さらに詳細に検討する必要があるが、hTERTによる不活化では、細胞分裂の制御機構に何らかの変更を加えることなく不活化している可能性が高い。その場合には細胞周期の研究などに非常に有用な研究材料であるといえることができる。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非常に大きく、また、これら疾患に対する診断及び治療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遺伝子による不活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り、今回樹立した7株の細胞はいずれも、世界的に非常に貴重な細胞である。

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り、今後このような細胞株の数を増加させることが必要である。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、その点でも今後の疾患特性の解明に非常に有用であると考えられる。しかし、今回一部の細胞株には染色体の数的及び形態的な異常が見られたことは、hTERTによる不死化であっても必ずしも染色体が安定に保持されるとは限らないことを示しており、細胞特性の解析には慎重でなければならないと考えられる。

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、7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、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。今年度不死化した細胞の多くは細胞増殖制御に異常があると考えられる疾患に由来するものであるが、hTERTによる不死化では細胞増殖の制御機構は修飾されていない可能性があるため、細胞周期制御機構の研究の進展に大きく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し、診断や治療の進歩に多大の貢献をすることが期待される。

F. 研究発表

論文発表

(欧文)

1. Tachibana A. and Sasaki, M. S. (2002)
Characteristics of the end-joining of DNA double-strand breaks by the ataxia-telangiectasia nuclear extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297: 275-281.
2. Takahashi, A., Asakawa, I., Yuki, K., Matsumoto, T., Kumamoto, M., Kondo, N., Ohnishi, K., Tachibana, A. and Ohnishi, T. (2002) Radiation-induced apoptosis in the scid mouse spleen after low dose-rate irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 78 : 689-693.

3. Sasaki, M. S., Ejima, Y., Tachibana, A., Yamada, T., Ishizaki, K., Shimizu, T. and Nomura, T. (2002) DNA damage response pathway in radioadaptive response. *Mutation Research*, 504 : 101-118.

口頭発表

(日本語発表)

1. 立花 章、大谷寧子、佐々木正夫：放射線適応応答でのDNA末端結合反応の解析とp53タンパク質の関与の検討。第25回日本分子生物学会年会、2002年12月、横浜市。
2. 飯田敦夫、堀 寛、立花 章、古賀章彦：メダカのトランスポゾンTo12の核移行シグナル。第25回日本分子生物学会年会、2002年12月、横浜市。
3. 神谷 恵、林 僚子、堀 寛、立花 章、古賀章彦：メダカのトランスポゾンTo12の哺乳動物培養細胞での転移。第25回日本分子生物学会年会、2002年12月、横浜市。
5. 立花 章、大谷寧子、佐々木正夫：放射線適応応答におけるDNA2本鎖切断末端結合反応の検討。(財)環境科学技術研究所国際シンポジウム、2002年10月、青森県上北郡六ヶ所村。
6. 中村英亮、深見博子、林 裕子、立花 章、中津川重一、浜口道成、石崎寛治：hTERT遺伝子導入による不死化線維芽細胞を用いた低線量放射線の影響研究。第61回日本癌学会総会、2002年10月、東京都。
7. 松本英樹、林 幸子、金 朝暉、畑下昌範、立花 章、大西武雄、加納永一：低線量率ガンマ線前照射によるNOラジカルを介したバイスタンダー効果の修飾。日本放射線影響学会第45回大会、2002年9月、仙台市。
8. 中村英亮、深見博子、林 裕子、山根由裕、立花 章、中津川重一、浜口道成、石崎寛治：hTERT遺伝子導入による不死化線維芽細胞を用いた低線量率放射線の影響研究。日本放射線影響学会第45回大会、2002年9月、仙台市。
9. 立花 章、大谷寧子、山田俊子：放射線照射した

細胞での DNA 末端結合反応。日本放射線影響学会第 45 回大会、2002 年 9 月、仙台市。

10. 佐々木正夫、遠藤 暁、星 正治、高田 純、高辻俊宏、三枝 新、江島洋介、立花 章：京都大学放射線生物研究センターの特性 X 線発生装置による超軟 X 線の生物学的効果。日本放射線影響学会第 45 回大会、2002 年 9 月、仙台市。
11. 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、立花 章、松本武久、渡邊正己：WRN エキソヌクレース欠損細胞における放射線感受性。日本放射線影響学会第 45 回大会、2002 年 9 月、仙台市。
12. 高橋昭久、大西 健、立花 章、樺田尚樹、法村俊之、大西武雄：低線量率放射線被曝経験による放射線誘発突然変異の抑制。日本放射線影響学会第 45 回大会、2002 年 9 月、仙台市。

2002年度厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

正常2倍体線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

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

東京都老人総合研究所では、過去多数のヒト正常2倍体細胞の培養化試み成果を挙げてきた。ライフサイエンス研究においては、不死化された細胞と同時に正常細胞を比較することは極めて重要であり、一般的には培養が困難な正常2倍体細胞を、利用しやすい形に研究資源化して研究者に提供するシステムを確立することを目指し、一部はSV40遺伝子の導入を用いて不死化細胞の樹立も試みた。また、正常2倍体細胞の性質を検討する過程で確立した、プロテオームプロファイリングシステムは次世代の細胞品質管理手法として重要な意味を持つと考えられるので、細胞バンク事業支援のための技術開発と位置付けて研究を進めた。

I 正常2倍体細胞の研究資源化

A. 研究目的

老化研究および癌研究に資するため、供与者年齢の異なるヒト正常二倍体細胞の研究資源化と供給を目的とする。

B. 研究方法

- a. 細胞の樹立＝異なる供与者年齢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。
- b. 細胞の収集＝HS財団細胞バンクにない細胞を収集する。
- c. 供給用アンプルの作製＝供給用凍結細胞アンプルを作製し、HS財団細胞バンクに送付した。
- d. バックアップ用凍結細胞アンプルの作製＝バックアップ用凍結細胞アンプルを作成し、国立医薬品食品研究所マスターバンクに送付した。
- e. ストックが少ない登録細胞の供給＝HS財団細胞バンクおよび国立医薬品食品研究所マスターバンクの要請により、ストックが少ない登録細胞のため東京都老人総合研究所で保管しているものより供給する。

B. 研究結果

- a. 異なる供与者年齢の皮膚線維芽細胞の新規樹立
幼児、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。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。12年度は、成人由来皮膚線維芽細胞のTIG-108、TIG-109を新規樹立した。13年度は、幼児由来皮膚線維芽細胞のTIG-119と成人皮膚線維芽細胞のTIG-113を新規樹立した。平成14年度は、幼児由来皮膚線維芽細胞のTIG-120、成人由来皮膚線維芽細胞のTIG-111を新規樹立した。詳細は以下の記載のとおりである。

なお、これらの細胞の樹立のための初代培養は2000年以前に行われたので、供与者のインフォームド・コンセントは十分であったとはいえない。そのため、今後新たに採取する組織については、2000年度に公布された3省合同倫理ガイドラインを遵守し、十分な説明を行なうことを前提に提供者の同意を得て、かつ所内倫理委員会等の審査を得て実施する所存である。

平成12年度

(1) TIG-108（ヒト皮膚線維芽細胞）

由来動物、組織： ヒト、皮膚
性： F

年齢： 40歳
性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： PD42
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： PD15-20

(2) TIG-109 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織： ヒト、皮膚
性： F
年齢： 39歳
性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： PD45
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： PD15-20

平成13年度

(1) 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歳
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 ~ PD20

(2) 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 ~ PD20

平成14年度

(1) TIG-120 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織： ヒト、皮膚
性： F

年齢： 6歳
性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： PD40
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 ~ PD20

(2) TIG-111 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織： ヒト、皮膚
性： F
年齢： 34歳
性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： PD38
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 ~ PD20

b. 細胞の収集：SVtS-8 (ヒト胎児肺線維芽細胞の不死化細胞)

SVtS-8細胞は、東京都老人総合研究所で樹立した正常細胞のTIG-3細胞を、広島大学の井出利憲らがSV40 early gene で不死化させ樹立した細胞である。当細胞のバンクへの寄託の許可を受けている。SVtS-8細胞の性格：SV40 early gene をTIG-3細胞 (ヒト胎児肺線維芽細胞、男性) に導入し不死化した細胞で、熱感受性が組み合わされているため、高温で培養すると分裂寿命が引き起こされて、分裂を停止する。細胞老化研究、細胞の不死化・癌化研究に用いられる。すでにH S財団から供給されている正常細胞のTIG-3細胞と対で使うことができる。

c. 供給細胞の凍結アンプル作製

平成12年度は、当年度樹立・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)、TIG-109細胞 (39Y, F) の供給のための凍結アンプル (それぞれ30アンプル) を作製した。また、TIG-2M-30細胞 (JCRB0525) の供給のための凍結アンプルそれぞれ30アンプルずつ、合計90アンプルを作製した。平成13年度は、IMR-90-40 (JCRB0519) 32アンプル、TIG-112細胞 (JCRB0533) 35アンプル、TIG-114細胞 (JCRB0534) 35アンプルの合計102アンプルを作成した。14年度は、昨年度樹立・性格づけをして新規登録し

た成人・幼児皮膚線維芽細胞のTIG-113細胞(21Y, F)とTIG-119細胞(6Y, M)の凍結アンプルそれぞれ30アンプルずつ、合計60アンプルを作成した。これらの作成アンプルの詳細は下記の通りで、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。

平成12年度作成(平成13年度に送付)

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

平成13年度に作成・送付

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

平成14年度に作成・送付

TIG-113細胞(JCRB0539), Lot. No. R331, 30アンプル
TIG-119細胞(JCRB0540), Lot. No. R391, 30アンプル

d. 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。

平成12作成(13年度送付)

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), 種細胞, 2アンプル

平成14年度

新規樹立細胞

TIG-113細胞(JCRB0539), Lot. No. R081, 3アンプル
TIG-119細胞(JCRB0540), Lot. No. R091, 3アンプル

e. ストックが少ない登録細胞のため東京都老人総合研究所で保管しているものより供給した凍結アンプル

平成13年度

1. TIG-1-40、TIG-1-60細胞の各1アンプル: 群馬

大学遺伝子施設

平成14年度

1. TIG-1-60細胞の1アンプル: 東京大学医科学研究所
2. MRC-5-40細胞、TIG-101細胞の各1アンプル: 国立がんセンター研究所

C. 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。

D. 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最初の事例として、以後供与者年齢の異なる(老人、成人、幼児の)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。平成12年度は成人由来の皮膚線維芽細胞2セルラインを、平成13年度は幼児および成人由来皮膚線維芽細胞を各1セルライン、14年度は幼児、成人由来皮膚線維芽細胞各1セルラインを樹立し、性状を確認後、新規登録した。新規収集細胞として1細胞株に登録した。また、供給用細胞として、平成12年度は3セルライン合計90アンプルを、平成13年度は3セルライン合計102アンプルを、平成14年度は2セルライン合計60アンプルを作成し、HS財団細胞バンクに送付した。さらに、バックアップ用凍結アンプルを5セルライン10アンプルを作成し、国立医薬品食品研究所マスターバンクへ送付した。

II プロテオーム解析法を利用した研究資源細胞の性状解析

A. 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技術を確立し、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、利用者に資する。

B. 研究方法

東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究グループで確立したプロテオーム解析法を用い、まず最初に、老人研で樹立された「ヒト正常二倍体線維芽細胞 TIG-3」の加齢に伴う発現タンパク質の変化を解析し、データベース化した。

次に、ヒト末梢血由来 B リンパ芽球系細胞を EB ウイルスで形質転換し、芽球化した後に「完全不死化」する過程のプロテオームの変化を解析し、データベース化した。

さらに、ヒトドパミン神経系細胞株 SH-SY5Y および臍帯静脈内皮細胞 HUVEC のプロテオームプロファイリングを行い、酸化ストレス負荷時の変化を解析してデータベース化した。

(倫理面へ配慮)

個人情報に関わるデータは扱わないようにした。

C. 研究結果および考察

正常二倍体細胞は有限の分裂寿命を有し、加齢に伴い発現タンパク質のプロファイルが変化するので、正確な品質管理を行うには、各 PDL ごとにデータが必要であることが明らかとなった。また、同じ線維芽細胞でも胎児肺由来と皮膚由来ではプロテオームプロファイルが異なることも明らかとなった。

ヒト末梢血由来 B リンパ芽球系細胞の不死化に伴い変動するタンパク質を見だし、論文として報告した。

ヒトドパミン神経系細胞株 SH-SY5Y および臍帯静脈内皮細胞 HUVEC については、主要な発現タンパク質の同定を行うと共に、酸化ストレスを加えることにより幾つかのタンパク質に有意な変化が認められたので、データベース化を行い、現在、論

文発表準備中である。

これらのデータベースは、一部、試験的にインターネット上で公開を行っている。(未発表のデータについては、アクセス時にパスワードが必要)

URL は、<http://www.proteome.jp/2D/>

D. 結論

近年、様々なヒト由来機能性細胞が基礎医学・臨床医学領域で多用されるようになってきている。正常二倍体細胞のプロテオーム解析とそのデータベース化は、こうした最近の動向に応え、関係研究者に必須となる研究材料の品質に関する基盤的情報を提供することを目的とするが、世界的にも整備が遅れているのが現状である。今後、ヒト細胞のプロテオームデータベースの国際情報センター的機能の構築を目指して、細胞の種類を増やし、データを整備することが求められている。

III 研究発表

論文発表

(欧文)

1. Kondo, H. and Yonezawa, Y. (2000) Human fetal skin fibroblast migration stimulated by an autocrine growth factor bFGF is mediated by phospholipase A2 via arachidonic acid without pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 272, 648-652, 2000.
2. Kondo, H., Yonezawa, Y. and Ito, H. (2000) Inhibitory effects of human serum on human fetal skin fibroblast migration: Migration-inhibitory activity and substances in serum, and its age-related changes. *In Vitro Cell. Develop. Biol. - Animal* 36, 256-261, 2000.
3. Tsugita, A., Kawakami, T., Uchida, T., Sakai, T., Kamo, M., Toda, T. (2000) Proteome analysis of mouse brain: two-dimensional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging. *Electrophoresis*, 21 (9), 1853-1871.

4. Toda, T., Sugimoto, M., Omori, A., Matsuzaki, T., Furuichi, Y., Kimura, N. (2000) Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization. *Electrophoresis*, 21 (9), 1814-1822.
 5. Toda, T. (2000) Current status and perspectives of proteomics in aging research. *Exp. Gerontol.*, 35 (6-7), 803-810.
 6. Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H. and Mimura, A. (2001) Senescence and Cytoskeleton: Overproduction of vimentin induces senescence-like morphology in human fibroblasts. *Histochemistry and Cell Biology*, 116, 321-327.
 7. Kaneko, T., Tahara, S., Taguchi, T. and Kondo, H. (2001) 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.
 8. Toda, T. (2001) Proteome and proteomics for the research on protein alterations in aging. *Annals New York Acad. Sci.*, 928, 71-78.
- (和文)
1. 戸田年総 (1999) 最新電気泳動実験法 (日本電気泳動学会編), pp. 265-274, 医歯薬出版, 「プロテオームデータベース」
 2. 戸田年総 (1999) 最新電気泳動実験法 (日本電気泳動学会編), pp. 434-438, 医歯薬出版, 「発生・老化研究法 —— 細胞老化 ——」
 3. 戸田年総 (2000) 遺伝子医学、第4巻、第4号、595-600. 「老化のプロテオーム解析」
 4. 戸田年総 (2000) 実験医学、第18巻、第18号、2490-2496. 「プロテオームを利用した老化のプロファイリング」
 5. 戸田年総 (2000) 生物物理化学、第44巻、第3号、181-184. 「プロテオームデータベースの構築と活用」
 6. 戸田年総 (2000) *The Lung Perspectives*, 8(3), 294-297. 「肺のプロテオーム解析」
 7. 戸田年総 (2000) 二次元電気流動データベース (伊藤隆司/谷口寿章編), pp. 208-216, プロテオミクス, 中山書店. 「プロテオーム解析とインフォマテックス」
 8. 戸田年総 (2001) 実験医学、第19巻、第11号、1443-1447. 「プロテオーム解析と疾患解析」
 9. 戸田年総 (2002) 日本老年医学会雑誌、第39巻第1号、8-13. 「プロテオーム科学の展望」
 10. 戸田年総 (2002) 医学のあゆみ、第202巻、第5号、353-357. 「老化の仕組みとプロテオミクス」
- 学会発表
(欧文)
1. Toda, T.: Quantitative Aspect of Two-dimensional Gel Electrophoresis and Protein Database for Research on Molecular Mechanisms of Aging. *Electrophoresis '99, The international conference of ICES*, 1999年5月、大宮.
 2. Ishijima, Y., Shimada, N., Fukuda, M., Miyazaki, H., Toda, T., Ishikawa, N., Orlov, N.Ya., Orlova, T.G., Yamada, T. and Kimura, N.: Role of nucleoside diphosphate kinases in differentiation of PC12D cells. *Electrophoresis '99, The international conference of ICES*, 1999年5月、大宮.
 3. Toda, T., Sugimoto, M., Omori, A., Matsuzaki, T., Furuichi, Y., and Kimura, N.: Proteomic analysis of immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines., *IPPC '99 International Proteome and Proteomics Confer-*

- ence, 1999年8月、木更津.
4. Toda, T.: Current status and perspectives of proteomics in ageing research., EuroConference on Molecular, Cellular and Tissue Gerontology, 2000年5月, Spa, Belgium.
 5. Fujinoki, M., Kawamura, T., Toda, T., Ishimoda-Takagi, T., Ohtake, H., Yamaoka, S., Shimizu, N., Okuno, M.: Proteome analysis for phosphoproteins associated with the motility of hamster sperm. 9th International Symposium on Spermatology. 2002年10月, Capetown, South Africa.
 6. Toda, T.: Conversion of TMIG proteome database to the XML format. First Asia Oceania Human Proteome XML Workshop, 2002年12月, Tsukuba.
- (和文)
1. 戸田年総: プロテオーム解析のための二次元電気泳動. 第26回BMSコンファレンス, 1999年7月, 蓼科
 2. 森澤拓, 戸田年総, 水野正一: 医療系ホームページの意義と運用 (ホームページ上アンケート, Webmaster宛メールの検討から). 第19回医療情報連合大会, 1999年11月, 横浜.
 3. 近藤 昊, 米沢由美子, ヒト胎児皮膚線維芽細胞の遊走の加齢変化と遊走調節因子: 遊走メディエーターとしてのアラキドン酸. 日本基礎老化学会第23回大会, 2000年6月28-30日, 大府.
 4. 田口隆彦, 近藤 昊, 丹野宗彦, 田原正一, 金子孝夫: 培養細胞の老化とDNA酸化傷害除去修復. 日本基礎老化学会第23回大会, 2000年6月28-30日, 大府.
 5. 戸田年総: 細胞の老化に伴うヒストンの翻訳後修飾の分析を目的とした二次元電気泳動の最適化. 第73回日本生化学会大会, 2000年10月, 横浜.
 6. 戸田年総, 野村晃司, 盛政忠臣, 木村成道: プロテオーム・ファイリングによって見いだされたC57BL/6マウス脳の加齢変化, 日本基礎老化学会第23回大会, 2000年6月, 大府.
 7. 田口隆彦, 近藤 昊, 丹野宗彦, 田原正一, 金子孝夫: 若, 老培養細胞へのリニアック照射によるDNA polymerase β , γ の誘導. 日本基礎老化学会第24回大会, 2001年6月13-15日, 大阪.
 8. 中村 愛, 近藤 昊, 嶋田有紀子, Waheed, A. A., 岩下淑子: 細胞老化に伴う膜コレステロールの変化, 日本基礎老化学会第24回大会, 2001年6月13-15日, 大阪.
 9. 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.
 10. 戸田年総: プロテオームデータベースの構築と公開, 第75回日本生化学会大会, 2002年10月, 京都.
 11. 荒木令江, 川野克己, 戸田年総, 荒木朋洋, 次田 皓, 吉良潤一, 佐谷秀行: 脳神経系疾患のプロテオミクスによる病態解析, 第75回日本生化学会大会, 2002年10月, 京都.
 12. 秋山翹一, 平塚正治, 戸田年総, 石嶋康史, 石川 直, 木村成道: NDPキナーゼの調節下にある蛋白質群のプロテオーム解析, 第75回日本生化学会大会, 2002年10月, 京都.
 13. 野村晃司, 戸田年総, 内藤康秀: ペプチド内複数メチオニン残基の過酸化水素による酸化の反応様式 -- 第2報 --, 第75回日本生化学会大会, 2002年10月, 京都.
 14. 藤ノ木政勝, 川村猛, 戸田年総, 高城忠, 大竹英樹, 山岡貞夫, 清水信義, 奥野誠: ハムスター精子鞭毛運動を調節するセリンリン酸化タンパク質の同定, 第75回日本生化学会大会, 2002年10月, 京都.

-
15. 川野克己、戸田年総、堀内 泉、越智博文、荒木朋洋、佐谷秀行、吉良潤一、荒木令江：ヒト脳プロテオームマップの作成と自己免疫疾患性神経疾患の自己抗原検索への応用、第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都。
 16. 秋田朗子、川崎博史、福田宏之、大海 忍、戸田年総、大野茂男、平野 久、新井賢一：PKCを介する細胞骨格蛋白質のリン酸化制御と形態変化、第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都。
 17. 藤ノ木政勝、大竹英樹、高城忠、戸田年総、奥野誠：サイクリック AMP 依存的にリン酸化する36k-Da タンパク質は pyruvate dehydrogenase であった、日本細胞生物学会第55回大会、2002年5月、横浜。
 18. 藤ノ木政勝、戸田年総、川村猛、大竹英樹、山岡貞夫、清水信義、奥野誠：精子鞭毛運動調節に関与する58k-Da タンパク質のリン酸化と局在について、日本アンドロロジー学会第21回学術大会、2002年7月、高槻。
 19. 藤ノ木政勝、大竹英樹、川村猛、清水信義、戸田年総、高城忠、奥野誠、山岡貞夫：ハムスター精子鞭毛運動調節に関与する58K セリンリン酸化蛋白質について、日本動物学会第73回大会、2002年9月、金沢。
 20. 戸田年総、木村成道、平塚正治、山本清隆、鳩崎拓也、新海正、廣田三佳子、大澤多加子、野村晃司、加治和彦：ヒト培養細胞のプロテオームデータベース、第1回ヒトプロテオーム学会、2003.2.13-14. つくば。

2002年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム、再生医療等研究事業）

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 第二研究科長

研究要旨

ヒト組織から複数の不死化細胞株を分離した。これらの不死化細胞株の特性は、従来汎用されてきた癌細胞由来の樹立細胞株とは多くの点で異なっていた。今回分離した不死化培養細胞株は細胞老化、癌化、あるいはヒト組織型幹細胞の基礎的、開発的研究から副次的に得られたものであるが、幹細胞の性質を持っていることから、今後の幹細胞に関する基礎的な研究に利用する価値は高いものと思われる。我々が行なっている研究は、このような細胞の具体的な利用事例ともなるので、情報を広く公開したいと考えている。このような細胞株は、従来的一般培養細胞株に比べて培養方法が難しいが、そこを乗り越えることが出来れば、応用研究のみならず基礎的な研究に対する研究資源としての価値は高いであろう。

A. 研究目的

①ヒト組織型幹細胞の実体の解明と分離培養法の確立。②ヒト難治性癌研究の為の不死化細胞株の作製。③ヒト胎児性付属器（臍帯、羊膜等）上皮細胞の分離培養法の確立と再生医療。の3点を大きな目標として研究を実施した。本研究を通じて樹立された細胞は、将来、臨床応用を目指す基礎的な研究を支援するための重要な研究資源となることが予測される。

B. 研究方法

1. ヒト上皮細胞の分離培養：A) Explant - Outgrowth 法による組織片からの均一な上皮細胞の培養と回収。B) ディ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 遺伝子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の検討。

C. 研究結果

上記実施計画のプロジェクトは今年度も引き続き進行中であり、各々について以下の成果を得た。

上皮を構成する組織には 1-5% の幹細胞が存在することを同定し、そこから幹細胞を分離する技術を確立した。分離した幹細胞の増殖能力は極めて強いことを明らかにし、さらに分化能力も正常に保有していることが明らかになった。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

の高密度培養を行なうことによって、極めて高い増殖活性が維持されることを確認した。現在では、ここから得られる培養シートを、2-4週間とい短期間で作製することができるようになった。さらに長期にわたって(10週以上)増殖能力を低下させずに培養を継続することも明らかにした。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、本幹細胞の分離培養法を利用することが有効であると考えられる。今後も医学、医療用の再生可能な組織の幹細胞の同定分離技術をさらに発展させることが重要であると考えられるが、その幾つかは既に当研究室で取り扱うことが可能になっている(子宮頸部上皮幹細胞、食道上皮幹細胞、皮膚上皮幹細胞、筋幹細胞それぞれの上皮の初代培養細胞)。

論文発表:Development 2002; Oral Pathol. 2003; Oncogene 2003
特許出願中, 2003, 1件

難治性癌発生の代表的な臓器である膵臓及び肺気管の上皮細胞の不死化細胞株の分離を進め、現在までに、膵管上皮細胞5系列、気管上皮細胞1系列の計5系列を分離した。これらの細胞株は不死化細胞ではあるが明らかに癌細胞とは異なった特性を持つことが示され、発癌初期の分子機構を解析するために特に有用になる事が期待される。今後、細胞特性についてさらに解析を進めて、研究資源として供給体制を確立する計画である。

特許出願中, 2003, 1件

胎児性付属器(臍帯、羊膜など)から上皮細胞を研究資源化する検討を進めた。これらの組織は、出産に伴って廃棄されるものであるため、研究利用への同意も比較的得やすいものと考えられる。これらの細胞は、原則として健常組織由来であり、免疫寛容性などの特性を持つものであることから様々な研究に利用されることが考えられるので、我々はこれらの胎児性付属器から効率良く培養可能な細胞を回収する方法を確立した。現在までにこれらの細胞が持つ分化・増殖能力は他の細胞に比べて相対的に高いことを明らかにしており、不死化細胞株の分離にも成功している。これは、近い将来再生医療の研究等に供給できる有用

な細胞となると考えている。

7系列分離(不死化臍帯上皮細胞4系列、不死化羊膜上皮細胞3系列)

特許申請中, 2002, 1件(国内、米国、欧州)

D. 考察

本分担研究の主な目的は、今後需要が増加すると予想されるヒト細胞の研究資源に資する成果を生み出すことであるが、着眼点は研究目的の項にも述べたように次の3点である。

- ① 分離可能な組織型幹細胞が研究資源として供給可能になるかどうかの検討を加えること。
- ② がん研究の中でも特に難治性癌の積極的な解析的研究が可能な培養細胞系を作成し供給を目指すこと。
- ③ ヒト細胞、特に正常細胞の研究資源化に避けられない細胞の供給源の確保と倫理的な問題の解決。

本研究から明らかになった問題点は、幹細胞の培養は通常の細胞の扱いに比べて格段に困難であるということと、必ずしも量的に十分な細胞を得ることが困難であるという点である。したがって、副次的な要素ではあるが、このような細胞を利用する研究者ならびに研究施設では高度な培養技術と知識を事前に得て、十分な受け入れ態勢を確立しておかなければならないということであろう。これらの幹細胞は、基本的には初代培養細胞に準ずる扱いになるが、分離される細胞数は初代培養細胞中に1-5%、場合によってはそれ以下しか含んでいないという少数細胞サブセットであることを考慮する必要がある、その扱いは常識的な培養細胞株の扱いにくらべて格段に困難であることは予め十分認識されていなければならない。現在までに明らかになったところでは、幹細胞だけを純粋に培養して研究資源化することはまだ困難であるということである。

この点を考慮した上で、本分担研究では重層扁平上皮細胞(ケラチノサイト)に分化する上皮幹細胞の研究を推進し、その分離法の確立とその幹細胞の特性などを検討してきた。一連の本研究で明らかになったことは、皮膚や食道などの組織に

存在する幹細胞の増殖、分化の様式は臓器によらず普遍的なホメオスタシスの元にあることである。この幹細胞は培養皮膚の作製に用いることが可能で、皮膚移植等の臨床応用の実現に最も近い幹細胞の一つである。これらの幹細胞の詳細な研究が臨床応用の観点から今後とも一層重要になることは明らかである。

予後の悪い難治性癌は早期発見早期治療の必要性が特に求められる癌で、膵癌や肺癌がその代表例である。このような癌の発生初期の分子機構を解析的に研究する為には有用なヒト細胞系が必要である。一般に、癌由来の細胞株では、癌の発生や進展に関して詳細な解析をすることは自ずと制限されてしまう。しかし、癌細胞株と多くの点で区別される不死化細胞系は、正常細胞からの癌細胞の発生と進展までを実験的に再現出来る点で癌細胞由来細胞株と区別されるものである。本分担研究では、そうした点に着目して不死化細胞株の作製を試みてきた。我々が確立した不死化細胞株は、正常な膵組織および肺組織の特定領域から再現性をもって随時作製可能であることが明らかになった。結果として得られた不死化細胞株は細胞の癌化の引き金に附随する様々な分子カスケードを癌細胞由来の細胞株と合わせ解析するために有用な実験系を構築できることから研究資源としての利用価値は高いと思われる。

ヒト正常細胞の供給は再生医療も含めた基礎医学研究あるいは創薬研究等に不可欠であるが、その供給源となる組織や臓器に関する問題点は多い。本分担研究で取り組んだ課題は、出産時の胎児性付属器を正常なヒト細胞の供給源として再利用することであった。多くの基礎的検討を加えた結果、臍帯ワルトン鞘上皮及び羊膜上皮から細胞を回収し培養するシステムを確立した。臍帯上皮細胞は三次元培養法によって重層扁平上皮を構築することを明らかにした。今後この細胞は移植用培養皮膚作製技術として不可欠になることが期待される。一方、羊膜上皮細胞は再生医療あるいは組織移植医療領域で様々な用途に利用可能であることが示されてきており今後需要が大きくなる可能性を持っている。これらの細胞の不死化細胞株もそれぞれ4株、3株分離済みである。これらの胎児性付属器の上皮細胞は相対的に不死化が容易であることが明らかになったため、必要に応じて研究資源として供給に対応することも可能であ

る。

E. 結論

新規の不死化細胞株が複数個分離されており、これらの細胞特性の解析から従来汎用されてきた癌細胞由来細胞株とは多くの点で明確に区別された。新規分離されたこれらの不死化培養細胞株は細胞老化、癌化、あるいはヒト組織型幹細胞の基礎的、開発的研究から副次的に得られるものであるが、研究目的に沿って分離された細胞や細胞株の特性が利用者にとっての具体的な利用方法を例示することにもなり、応用研究のみならず基礎的研究資源としての価値は高い。

F. 発表

学会発表

1. 臍帯細胞を用いた培養皮膚作製の試み：竹内誠亮、安本 茂，第一回日本再生医療学会，2002.
2. p75NTR陽性上皮組織型幹細胞の上皮構成細胞サブセット再構築能：奥村知之、嶋田 裕、菊地慶司、今村正之、安本 茂，日本再生医療学会，2002.
3. 帯由来ヒト細胞の再生医学、医療への応用：竹内誠亮、越後谷朋子、堀 裕雅、安本 茂，第75回日本組織培養学会，2002.
4. ウシ卵管上皮細胞の分裂老化とテロメア長の変動：村田 健、川崎美紀子、渡辺誠喜、安本 茂，第75回日本組織培養学会，2002.
5. 上皮幹細胞をがん細胞発生源とする仮説の検証：安本茂、奥村知之、西村和真、菊池慶司、森村茂、木口一成、今村正之、嶋田 裕，第61回日本癌学会，2002.
6. 遺伝子C13Lのヒト大腸癌および膵臓癌細胞株における発現：森村茂、安本茂，第61回日本癌学会，2002.
7. p75NTR陽性上皮組織型幹細胞の上皮構成細胞サブセット再構築能と自己複製能：奥村知之、嶋田裕、菊地慶司、今村正之、安本 茂，第61回日本癌学会，2002.
8. ヒト膵癌で発現上昇がみられた新規遺伝子の解析：森村 茂、安本 茂，第25回日本分子生物学会，2002.

論文発表

1. Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N., Generation of different fates from multipotent muscle stem cells., Development 129: 2987-2995, 2002

知的所有権の出願、取得状況（予定を含む）

1. 出願番号 特願 2003-41843
整理番号 2003P1533
発明者 森村 茂、安本 茂
発明の名称 膵癌検出用マーカー
2. 出願番号 2003.3 出願中
整理番号 P03-002
発明者 安本 茂
発明の名称 老化上皮幹細胞の取得方法