

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

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

細胞の老化研究、癌発生機構の解明に関する研究においては様々な癌組織由来の細胞に加えて不死化細胞株が必須であることは明らかであり、ヒト骨髄間葉系から不死化細胞系を樹立する試みを行なった。この過程で不死化の過程で発現が変動する7個の未知の遺伝子をクローニングした。そのうち、Reicは、不死化した細胞で発現が低下していたが、他の多くのヒト腫瘍においても発現の低下がみられ発癌に関与していることが示唆された。また、この発現の低下はプロモータ部位のメチル化によることを明らかにした。

A. 研究目的

多分化能をもつヒト骨髄間葉系幹細胞の研究資源化に関する研究を行う。同時に、その他のヒト組織の採集と培養化も行う。さらに、すでに培養化されているヒト細胞に種々の遺伝子を導入し、特殊の機能を発現する細胞系を作成する。

B. 研究方法

使用した培地は、Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), Dulbecco's MEM, RPMI-1640などに10%の胎児牛血清を添加したものである。採集した骨髄細胞は、PBSで洗浄後、Human Mesenchymal Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies Inc)で処理し、培養に移した。胎盤細胞は、帝王切開で出産した胎児のものを使用した。また、遺伝子導入は、電気パルスカリポフェクション法を用いた。

採取した骨髄細胞は、Human Mesenchymal Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies Inc)で処理し、骨髄間葉系幹細胞を集め培養した。

不死化の機構の研究は、正常細胞とその不死化した細胞のcDNAライブラリーを作成し、不死化で発現の低下あるいは消失する遺伝子の検索を行った。また、正常細胞と不死化細胞が発現する蛋白質を、2次元電気泳動で解析し、不死化で発現の低下する蛋白質を探した。

C. 研究結果

本年度は、胎盤細胞を中心に研究資源化した細胞を寄託した。また、正常ヒト肺線維芽細胞(OUMS-36, ICR-2, OUS-11), テロメラゼ遺伝子導入不死化ヒト線維芽細胞(OUMS-36/T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8), 変異P53遺伝子導入不死化ヒト細胞(OUMS-24F/P6X), 6-thioguanine耐性化ヒト卵巣癌細胞(PA-1/6TGr)などを寄託した。また、現在、CYP2E1を発現するヒト肝癌細胞株(HLE/2E1), Tyrosinaseを発現するヒト線維芽細胞株(パーキンソン治療の目的)を作成し終え、寄託準備中である。ヒト細胞の細胞生物学的研究、特にヒト細胞の不死化に関する研究については、この3年間で以下のような進展を得た。

- 1) ヒト細胞の培養化に関する倫理的な課題においては、「ヒト組織・細胞の収集、保存、培養」という課題名で、岡山大学医学部倫理委員会に提出し、平成13年12月20日に承認された。
- 2) これに基づいて、ヒト骨髄間葉系幹細胞、正常ヒト線維芽細胞、テロメラゼ導入不死化ヒト線維芽細胞、胎盤細胞、放射線照射不死化ヒト線維芽細胞、変異P53導入不死化ヒト線維芽細胞、家族性大腸ポリポーシス由来大腸癌細胞など、これまでに樹立した細胞系を寄託した。

3) 不死化機構の解明に関する研究

cDNA ライブラリーより、不死化で発現の低下あるいは消失する7個の未知の遺伝子をクローニングした。そのうちのひとつである Reic (Reduced Expression in Immortalized Cells から命名)の機能をさらに詳しく解析した。

この遺伝子は、不死化した細胞で発現が低下するのみならず、多くのヒトの腫瘍でも発現の低下がみられ、その発現の低下は、プロモータ部位のメチル化によることを明らかにした。また、この遺伝子を発現するベクターをつくり、腫瘍細胞に入れてやると、その増殖が停止することをみいだした。その後、人体に生じたほとんどの癌で、この遺伝子の発現が低下していることをみいだした。

また、正常細胞と不死化細胞とが発現する蛋白質を、2次元電気泳動で解析し、不死化で発現の低下するS100C蛋白質をみいだした。この蛋白質は、増殖期のヒト正常線維芽細胞では細胞質に存在するが、その細胞がコンフルエントなりDNA合成が停止した状態では核内に移行している。不死化細胞では、発現の低下に加え、細胞がコンフルエントになってもその蛋白質は核内へ移行しないこと明らかにした。また、この蛋白質の核内への移行にはリン酸化が必要なこと、そして、リン酸化に伴い、この蛋白質は核内移行シグナルをもつ蛋白質と結合することをみいだした。さらに、この蛋白質が核内で発現するようにしたベクターを腫瘍細胞に導入すると、DNA合成が停止した。

以上の我々の結果は、ヒト細胞の不死化には複数の遺伝子が関与していること、そして、それらの遺伝子は、正常細胞では細胞の増殖を抑制するように働き、これらの遺伝子の発現の低下・消失は細胞の増殖抑制を解除すると考えられる。このような点から、我々のみいだした遺伝子は、癌細胞の増殖を制御できる可能性をもったものとして、今後の臨床への応用が期待される(これらの遺伝子については特許を申請した)。

D. 考察

細胞治療、再生医療、人工臓器の開発のために、多分化能をもつヒト細胞の開発が望まれる。この多分化能をもつヒト細胞として、ヒト胚性幹細胞が第1にあげられる。また、その他の細胞として、骨髄間葉系幹細胞、脳内に存在する幹細胞、骨盤細

胞などが多分化能をもつことが予想される。

我々は、平成13年11月にヒト細胞の培養化に関する倫理規定の承認を岡山大学医学部で受けた後に、骨髄間葉系幹細胞や骨盤細胞を培養化することを試みてきた。今回は、この試みのなかで、当面した問題点について述べる。今後これらの問題点に関しての解決がなされなければ、将来の研究のスムーズな進展はむずかしいと考えられる。

1) インフォームドコンセントの得難さ

二つの原因がある。第1の原因は、患者さんの承諾が得難いこと。第2の原因は、インフォームドコンセントを得るために担当医が努力してくれないこと。その理由は、医師が忙し過ぎることと、自分の研究業績にはなりにくいことなどがある。この問題の解決には、医師に細胞バンクの趣旨とヒト細胞の研究資源の大切さをよく理解して貰うよう我々が普段より努力する必要がある。

また、実際に臨床サイドで、細胞治療や組織再生治療が進められれば、細胞資源の重要性を理解してくれる医師が増えるであろう。そのような医師は、インフォームドコンセントを得ることに協力的であろう。したがって、細胞治療や再生治療の研究の活性化と臨床応用への素早い取り組みが望まれる。日本の現状ではこの点の取り組みが遅いように思える。

2) 基礎的培養条件の検討の困難性。

十分な材料を得難いことによる。上記の1)の問題にも大いに関係するが、また、日本の現状では脳死臓器移植があまり進まないことにもよる。国外では、脳死臓器移植で、使用されない組織の細胞が細胞バンクに提供されている。今後、臓器提供者に、臓器だけでなく移植に使用されなかった組織細胞の提供の同意を得ることはできないのであろうか。

現在、提供された組織の細胞は、とりあえず現在一般的に使用されている培地で培養されている。すなわち、Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), Dulbecco's MEM (DMEM), RPMI-1640, F12/DMEM (1:1)などに、牛血清を10%添加したものなどである。また、培養容器は培養用ペトリディッシュであり、培養は5%炭酸ガス95%大気条件のフラン器である。

ヒトの種々の組織に由来する細胞には、上に記したような培地で、それほど容易に増殖するとは思

えない。それぞれ組織に由来する細胞に最適の培地、培養容器(基質)、ガス条件が必要だと思われる。

このような基礎的研究へ科学研究費を申請しても、現在の日本の研究環境では研究費獲得はきわめてむずかしい。本研究班がこのような基礎的研究を支えていることには大いに意義があると思う。

3年間の研究期間の中で、最初の1年間のほとんどの時間を倫理問題のために費やした。当研究機関の倫理委員会の承認を得なければ、ヒト組織の収集、培養の仕事が始められないからである。現在、我が国でヒト胚性幹細胞の研究が進められようとしているが、各研究機関で倫理問題などで案外時間をとられているのではないかと思われる。この種の研究は、もちろん慎重に進められるべきではあるが、しかし、我が国の現状の進み方はいかにも遅い。

ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養には様々な困難が伴った。まず、培養化できる新鮮な細胞の入手は困難である。入手できる骨髄細胞には脂肪細胞などの混入が多く、間葉系幹細胞の培養の妨げとなった。また、材料入手の困難性から、至適培養条件の検討を十分に行なうことが困難となった。

ヒト細胞の不死化機構の研究は、そのミラーイメージと解釈されるヒト細胞の老化機構の研究、さらに、ヒト細胞の癌化のメカニズムの解明にも役立つと考えられる。

老化現象を示すヒト正常細胞と不死化ヒト細胞とを融合すると、その融合細胞は老化現象を示すことより、細胞の老化形質は優性で、不死化形質は劣性であることがわかる。したがって、細胞の不死化には老化で働く遺伝子の発現の低下、あるいは、消失が予想される。この予想のもとに、正常細胞と不死化細胞とのcDNAライブラリーより、不死化細胞で発現の低下する遺伝子を99個クローニングし、そのDNA配列を調べたところ、すでに老化細胞で発現の上昇することが報告されているp21や細胞マトリックス関係の既知の遺伝子が多かった。そして、わずかに7個の遺伝子が未知のものであった。現在、このうちのひとつであるReicの機能については、かなり解析を進めることができたが、残りのものについては、解析が進んでいない。このような現象の解析には、最終的にはマンパワーが重要であることを痛感した。

E. 結論

動物実験の結果、骨髄間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、腱、骨格筋、心筋、神経系などのさまざまな種類の細胞に分化することが示されている。もし、ヒトの骨髄間葉系幹細胞が、動物の細胞と同じように種々の組織の細胞に分化することができれば、将来の再生医療に役立つであろう。我々は骨髄間葉系幹細胞を培養化して、寄託することを試みた。この際、培養化できる骨髄間葉系幹細胞を得ることは、かなりむずかしいという問題に出合った。すなわち、培養化できる生きのいい骨髄細胞が十分得られないこと、それにとまなう骨髄間葉系幹細胞の培養化の基礎的条件が十分検討できないことなどの問題である。とりあえず、現在一般的に使用されている培地で増殖する細胞を寄託した。そして、この骨髄間葉系幹細胞の培養の困難性の問題を回避するために、骨盤細胞を培養化し寄託した。その理由は、骨盤細胞もいろいろの種類に分化する可能性があると考えられるからである。骨盤細胞なら、培養化可能な細胞は比較的容易に入手できるので、骨盤細胞の再生医療への利用の研究の進展を期待したい。

「ヒト組織・細胞の収集、保存、培養」の倫理規定をつくり、岡山大学医学部の倫理委員会で承認された。その結果を受けて、ヒト細胞の培養化を始め、ヒト骨髄間葉系幹細胞、正常ヒト線維芽細胞、テロメラーゼ導入不死化ヒト線維芽細胞、胎盤細胞、放射線照射不死化ヒト線維芽細胞、変異P53導入不死化ヒト線維芽細胞、家族性大腸ポリポーシス大腸癌細胞などを寄託した。また、ヒト細胞の細胞生物学的研究として、ヒト細胞の不死化に関与する遺伝子の研究を行い、新しい遺伝子ReicとS100C蛋白質の不死化細胞における発現低下を見出した。これらの遺伝子の発現を不死化細胞で高めると、その増殖が抑制されることを明らかにした。また、S100Cは細胞の不死化に伴い、核内への移行が出来ないことをみいだした。そして、正常細胞のコンタクトインヒビションとS100C蛋白質の核内移行との関連について明らかにした。

F. 論文発表

欧文

1. Furumatsu, T., Yamaguchi, N., Nishida, K.,

- Kawai, A., Kunisada, T., Namba, M., Inoue, H. and Ninomiya, Y.: Endostatin inhibits adhesion of endothelial cells to collagen I via $\alpha 2\beta 1$ integrin, a possible cause of prevention of chondrosarcoma growth. *J. Biochem.* 131, 619-626, 2002.
2. Shibakura, M., Niiya, K., Kiguchi, T., Shinagawa, K., Ishimaru, F., Ikeda, K., Namba, M., Nakata, Y., Harada, M. and Tanimoto, M.: Simultaneous induction of matrix metalloproteinase-9 and interleukin 8 by all-trans retinoic acid in human PL-21 and NB4 myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 118, 419-425, 2002.
 3. Takahashi, S., Takahashi, T., Mizobuchi, S., Matsumi, M., Morita, K., Miyazaki, M., Namba, M., Akagi, R. and Hirakawa, M.: Increased cytotoxicity of carbon tetrachloride in a human hepatoma cell line overexpressing cytochrome P450 2E1. *J. Int. Med. Res.* 30, 400-405, 2002.
 4. Kobayashi, K., Ouchida, M., Tsuji, T., Hanafusa, H., Miyazaki, M., Namba, M., Shimizu, N. and Shimizu, K.: Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells. *Gene* 282, 151-158, 2002.
 5. Kondo, A., Sakaguchi, M., Makino, E., Namba, M., Okada, S. and Huh, N.: Localization of S100C immunoreactivity in various human tissues. *Acata Med. Okayama* 56, 31-34, 2002.
 6. Furumatsu, T., Nishida, K., Kawai, A., Namba, M., Inoue, H. and Ninomiya, Y.: Human chondrosarcoma secretes vascular endothelial growth factor to induce tumor angiogenesis and stores basic fibroblast growth factor for regulation of its own growth. *Int. J. Cancer* 97, 313-322, 2002.

日本語

1. 尾山祐次郎, 中川美典, 堀 均, 難波正義: GcMAF は単球の Fc レセプター介在性ロゼット形成能を顕著に増強させるが, スーパーオキシド産生能にはほとんど影響を及ぼさない. *Biotherapy* 16, 79-85, 2002.
2. 難波正義: ヒト細胞培養の臨床への応用の問題点

. 環境と健康 15, 116-122, 2002.

口頭発表

欧文

1. Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Takaishi, M., Namba, M. and Huh, N.: S100C is a key mediator of Ca^{++} -induced growth inhibition of human keratinocytes. The 5th International Skin Carcinogenesis Conference (ISC2002), October, 2002, Gifu.
2. Namba, M., Sakaguchi, M. and Huh, N.: Growth inhibitory effects of S100C on normal and immortalized human cells. Keynote speech at Human Cell Culture 2002, September 2002, Oxford.

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

リアルタイムPCR法を用いたペスチウイルス検出系の開発

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

ヒト細胞の培養に使用される牛血清から比較的頻繁に検出されるウイルスには、牛ウイルス性下痢症ウイルス、ブルータングウイルス、牛アデノウイルス、牛パルボウイルス、牛ポリオーマウイルス、牛RSウイルス等が知られている。このうち、牛ウイルス性下痢症ウイルスは培養細胞から頻繁に検出される直径約50 nmでRNAをゲノムとするフラビウイルス科ペスチウイルス属に分類される。これを定量的にモニターすることを目的に、本研究ではリアルタイムPCR法について検討した。

A 研究目的

動物起源の細胞培養の多くは、培養液中に動物の血清を10-20%の割合で添加する必要があるが、このため血清中に感染性因子が含まれる場合には、それにより汚染することになる。一般に細胞培養には仔牛もしくは牛胎児の血清が好んで使われる。したがって、換言すれば動物細胞培養は培地中の血清を介して牛由来の微生物等に汚染する可能性を常に秘めていると言える。牛血清中から検出されるウイルスに限っても、牛ウイルス性下痢症ウイルス、ブルータングウイルス、牛アデノウイルス、牛パルボウイルス、牛ポリオーマウイルス、牛RSウイルス等が知られている。このうち、最も頻繁に検出される牛ウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)は直径約50 nmのRNAウイルスで、分類学的にはフラビウイルス科ペスチウイルス属に置かれる。本ウイルスは妊娠牛の胎盤を通過して牛胎児へ垂直伝播するため牛胎児血清を汚染することになる。細胞培養におけるペスチウイルスによる汚染の検査は、本ウイルスが細胞変性効果を起こさないことから、特異抗体による蛍光抗体法や酵素抗体法などの免疫学的手法によることが多かったが、近年はゲノム上の特異配列を標的とする核酸プローブ法やPCR法が活用されて、検出が一層容易に行なえるようになった。そこで、今年度は、細胞培養中のペスチウイルスを定量的に観察するこ

とができるリアルタイムPCR法を実用化するための検討を行った。リアルタイムPCR法では増幅産物の生成過程を文字どおりリアルタイムで観察し、解析することが可能である。しかも、増幅産物を電気泳動により分画することなく、増幅産物の量を比較することができるという特長をもつ。多数の細胞培養や培地・血清をサンプルとしてその中のペスチウイルスを検出するためには、リアルタイムPCR法のような、迅速性と定量性を兼ね備えた手法が適しており、そのための条件検討を行い、最適なプロトコルを確立することを目的とした。

B 研究方法

本研究では1本のチューブ内で逆転写反応とPCRを行わせるように実験条件を設計した。PCRはペスチウイルスゲノムの5'端非翻訳領域を標的とするようにプライマー2種類を用意して行った。これは前年度に使用したものと同一の配列からなる。逆転写は下流のプライマーを用いてAMV由来逆転写酵素により50℃、10-30分間行った後、95℃30秒間の加温により同酵素を失活させた。その後、PCRは2種類のプライマーとSYBR Green I、およびTaqポリメラーゼを用いて94℃5-30秒、40-65℃5-30秒、72℃15-90秒の条件で30-45サイクル行い、反応終了後、増幅曲線および熱融解曲線を確認して最適な反応条件を選定した。この条件検討のために、初めに

ウイルス量の判明している牛ウイルス性下痢症ウイルス No. 12 株の培養液 (10,000 TCID₅₀/ml) から RNA を抽出し、その 2 倍階段希釈列をつくり、検出感度を調べた。また、確立した条件に基づいて、昨年度通常の RT-PCR 法により調査した細胞培養サンプルについて、今回はリアルタイム PCR 法を適用して、両者を比較した。

C 研究結果

(1) 反応条件

逆転写反応については 50°C 10 分間で良好な結果が得られた。また、PCR は 94°C 30 秒、55

°C 30 秒、72°C 30 秒で 45 サイクル行うのが確実であることが判明した。この反応条件で、牛ウイルス性下痢症ウイルス No. 12 株由来 RNA を用いて、検出限界を調べたところ、ひとつの PCR の反応液中に少なくとも 100-200 TCID₅₀ 相当のウイルス量の RNA が存在すれば、検出可能であることが判明した (図 1)。この濃度のウイルス量があれば、20 サイクル目あたりから増幅曲線は立ち上がり、30 サイクルまでに最大となり、以後プラトーの状態を維持する。SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR においては陰性コントロールの場合にも非特異的な蛍光強度の増加がみられるため、増幅産物の熱融解曲線を調べて、その吸収曲線が特異

図 1

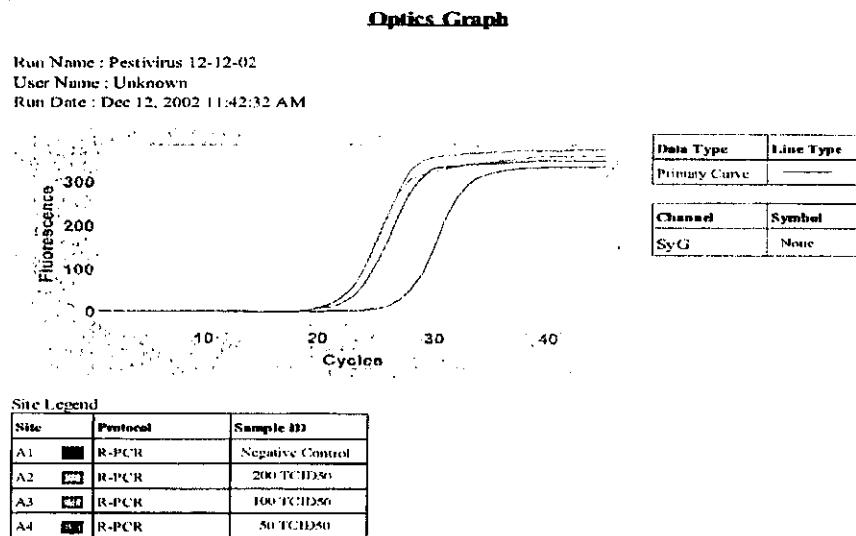
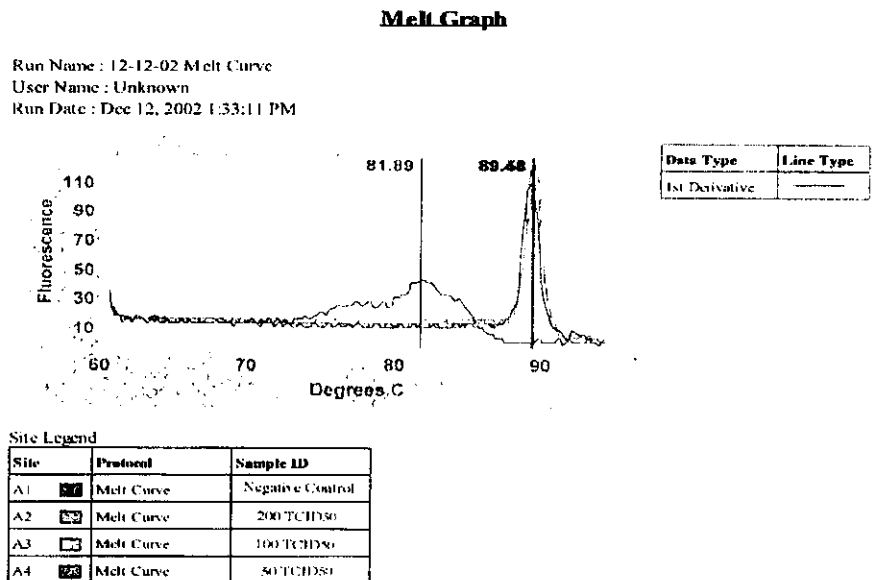


図 2



的なものか否かを確認する必要がある。そのため、PCR終了後、60℃から95℃まで0.2℃/秒の割合で直線的に昇温させ、熱融解曲線を描かせ、PCR産物の熱融解温度を調べた(図2)。牛ウイルス性下痢症ウイルスの場合の熱融解温度は89.5℃前後であることが判明した。また、陰性コントロールではプライマーどうしによる二量体の形成に伴う非特異的な反応物の熱融解温度は81.89℃を示しており、特異的なものとは明瞭に区別された。

(2) 細胞培養への応用

昨年度に通常のRT-PCR法により調査した71個の細胞系について、ここで確立したリアルタイムPCRを実施したところ、全く同一の成績が得られた。

D 考察

細胞培養を汚染するウイルスの多くは血清を介して感染した牛由来のものであるが、ときにはその細胞が由来した動物起源のウイルスがそのまま細胞培養に波及する場合もある。たとえば、豚起源の細胞培養での豚コレラウイルス汚染、羊や山羊の細胞培養ではボーダー病ウイルスが汚染していることがある。豚コレラウイルスもボーダー病ウイルスもいずれも牛ウイルス性下痢症ウイルスと同じペスチウイルス属のウイルス種であるので、本研究において用いたプライマーにより検出が可能である。しかし、すでに述べたように牛血清にはペスチウイルス以外のウイルスが混入することが知られており、汚染した血清を細胞培養に用いた場合には、ときに重大な事故につながる危険がある。牛血清中に含まれていたウイルスが微量であっても、培養細胞に感染して増殖することにより大量のウイルスになるからである。したがって、牛血清や細胞培養の微生物学的モニタリングを定期的実施し、疑わしいものを用いないようにすることが、安全管理上極めて大切である。

E 結論

リアルタイムPCR法は、反応をリアルタイムで確認でき、反応後の判定に増幅産物を電気泳動により分画する必要がない点で極めて簡便かつ迅速

な手法であり、従って、今年度の成果として得られたプロトコルは細胞バンクのような機関において、多数のサンプルのペスチウイルス汚染を検査する場合には極めて有用であると考えられた。

F 発表

(1) 論文発表

(欧文)

1. Harasawa, M., Kawahara, M., and Rikihisa, Y. (2002) Characteristics of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma haemomuris*, previously classified as '*Haemobartonella muris*', J. Vet. Med. Sci. 64: 1161-1164.
2. Robertson, J.A., Stemke, G. W., Davis, J. W. Jr., Harasawa, R., Thirkell, D., Kong, F., Shepard, M., C., Ford, D. K. (2002) Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 587-597.

(和文)

1. 原澤 亮 (2003) マイコプラズマの分類 臨床と微生物 30巻358頁

(2) 口頭発表

1. Harasawa, R., and Giangaspero, M.: Bovine viral diarrhea virus 2: Genotyping based on palindromic nucleotide substitutions. 12th International Congress of Virology (Paris, France) July 2002.

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)
分担研究報告書

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 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)

研究要旨

1985年の対がん10カ年総合戦略開始の際に研究資源部門として設立されたJCRB細胞バンク(厚生労働省)は、対がん10カ年総合戦略終了後も継続されることが1995年に決定された。この際、細胞の収集を積極的に支援することを目的に黒木班が設置されたが、その後国の財政事情の悪化も手伝って2000年には研究費の節約を考慮することとなり、細胞バンク基盤整備を実施している厚生科学研究班(水澤班)と合同することとなった。この際、黒木が岐阜大学学長として転出したので、細胞バンク事業に関しては長い経験のある竹内がそのとりまとめを引き受けることとなった。そこで、水澤班においては、ヒト正常細胞、遺伝性疾患細胞、幹細胞を中心に収集する目標を立てているのに対して、本分担研究においてはがん細胞等、株化されたヒト由来細胞を中心に収集した。我々は、新規細胞の樹立と同時に、過去に我が国では数多くの細胞が樹立されてきたが、研究者の高齢化も手伝って培養ヒト細胞が散逸・遺失してしまうことを防止することも重視している。また、品質管理も水澤らと協力して実施した。

A. 研究目的

わが国で樹立された細胞株の保存状況を調査し、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ことを本研究班の主要な目的とする。

B. 研究方法

わが国において細胞株の樹立ならびに各種細胞株における遺伝子発現変異研究に携わっている次の研究者が協力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協力研究者らが各自の研究室において樹立した細胞株を提供してもらい、それをHSRRBで再培養、凍結アンプルの作成、品質管理を実施した後に種細胞をJCRB細胞バンクに保存した。保存した細胞については、同時に分譲用アンプルを作成してHSRRB研究資源バンクより有償で分譲する体制を確立した。

(1) 役割分担

当該分担研究者は表1に示した協力研究者の協力を得て細胞収集と細胞の品質管理を実施した。

細胞株樹立協力研究者：(所属；担当腫瘍組織)

永森静志(杏林大・医・総合医療学；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)

品質管理に関する協力研究者：

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

(2) 細胞収集法

- 1) 上記細胞株樹立共同研究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についてJCRB細胞バンクに寄託して長期保存を確立すると共に、分譲用アンプルを作成してHSRB細胞バンクに保存する。
- 2) JCRB/HSRB細胞バンクは共に協力しながら寄託された細胞のseed stock、distribution

stock を作製し、品質管理を施し、凍結状態で長期保存する。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、公的な研究資源として一般研究者に有償で分譲する。

(3) 品質管理法

- 1) 細菌による汚染については細胞培養の過程を観察することにより可能である。マイコプラズマ汚染については、ヘキスト染料による間接染色法および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法によって確認する。
- 3) 同一由来腫であるヒト細胞株の混入については、DNAプロファイリング、染色体核型等によって確認する。さらに、染色体の変異を測定するにはCGH(Comparative genomic hybridization)法を用いて遺伝子増幅を検索する。
- 4) 癌関連遺伝子の変異を検索するには、ゲノムDNAを抽出し、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法で増幅しCEQ2000EX (Beckman Coulter 社)を用いてDNAシーケンスしたデータから検討する。

これらの品質管理方法に関する研究は、水澤らの研究結果も参照のこと。

C. 研究結果

(1) 収集

9研究室から3年間で食道扁平上皮がん由来細胞(KYSE-30, -50, -70)など68細胞株を収集した(表1)。約90%がヒト由来の細胞株である。残りはマウス由来である。収集した細胞株は大量に培養し、約20から50本の凍結アンプル(4 x 10⁵ ~ 2 x 10⁶個の細胞数/アンプル)を作成した。

(2) 品質管理

3年間で収集した68細胞株を。そのうち、マイコプラズマに汚染していた細胞株が9種類あり、同一動物種で他の細胞のクロスコンタミネーシヨ

ンの可能性のある2株、他由来動物種の汚染している細胞株が3株あった(表2)。マイコプラズマに汚染している細胞株は(表2)9株あり、MC-210又はBM-cyclinで処理することにより全ての細胞株についてマイコプラズマの除去に成功した。他の細胞の汚染が考えられた5株の細胞(HCC-50, HCC-48, 等)については研究資源としての価値が低いため廃棄した。

マイコプラズマ汚染を除去した細胞株については、それぞれの寄託者に細胞株を送り、品質の確認をした。品質上問題が見つかり、廃棄した5株を除き、汚染マイコプラズマを除去できた9株を加え、総数63細胞株が研究者へ提供可能になった。

収集した細胞を含め、HSRRBに保存している細胞(表3)を東北大と東京医科歯科大に送付し、それぞれがん関連遺伝子変異検定と染色体増幅・転座の測定を行った。

(3) 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

表 1 3年間で収集した細胞株数

年度	収集した細胞	廃棄した細胞(品質上)	マイコプラズマ除去処理した細胞	分譲可能な細胞
平成12	14	3	2	11
平成13	28	2	4	26
平成14	26	0	3	26
合計	68	5	9	63

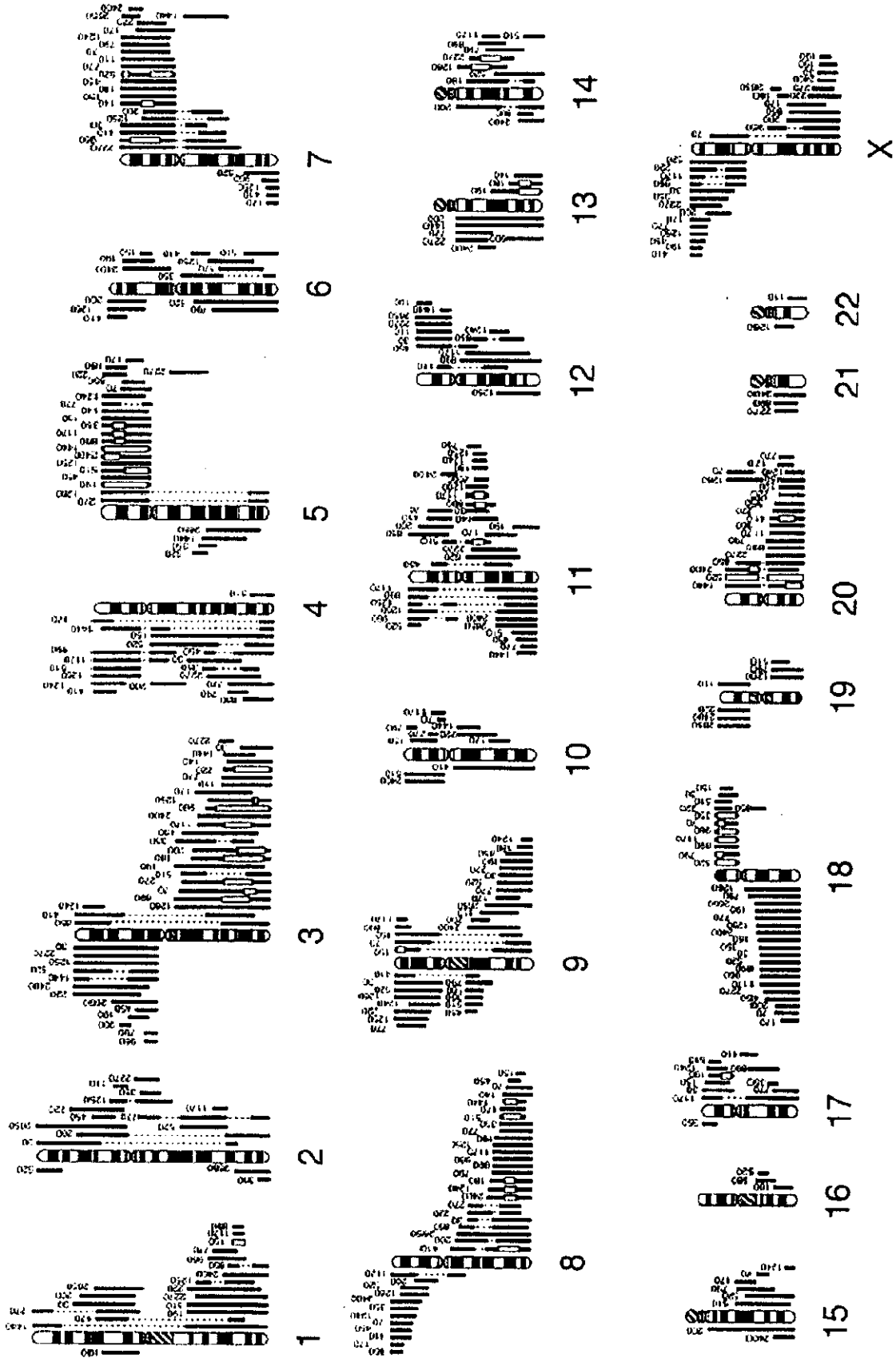
表 2 品質検査の結果

年度	マイコプラズマ汚染	他細胞の汚染の可能性あり	計
平成12	2	3	5
平成13	4	2	6
平成14	3	0	3
合計	9	5	14

表 3 遺伝子解析に使用した細胞数

年度	がん関連遺伝子変異の測定に使用した細胞株の種類数	染色体増幅・転座の測定に使用した細胞株の種類数	細胞株に汚染していたマイコプラズマを除去した細胞の性質を検査
平成12	0	0	0
平成13	9	51	6
平成14	20	46	3
合計	110	97	9

図 1



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。

平成14年度は、20種類の細胞株のTP53遺伝子についてエクソン4と5-9を増幅、エクソンとエクソン・イントロン境界をシーケンシングした。20細胞のうち、8細胞にp53の翻訳領域内に1塩基置換(5ミスセンス変異)または欠失・挿入変異を認めた。各細胞のイントロン7内のSNP2ヶ所(IVS+72C/TおよびIVS+92T/G)についてgenotypeを明らかにした。同時に、codon 72の多

型(Pro/Pro, Pro/Arg, Arg/Arg)についてあきらかにした。

P53変異または欠失の検出頻度は、解析を終了した20細胞株中8細胞株(40%)と昨年の24%より高頻度であった。その理由として、エクソン4、9を含めて今回解析した解析範囲を広げたことが考えられる。いままで解析した110種類の細胞のTP53遺伝子の変異・多型情報は、データベースとして公表予定である。

(4) 染色分析

平成13年度は胃癌に由来する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

表4

Minimal overlapping regions of common DNA copy number changes in ESC cell lines

DNA Copy Number	Chromosome Regions	Frequency	Putative Target Genes
Gains	8q21-24	86.2% (25/29)	MYC PIK3CA
	3q26	82.8% (24/29)	
	5p14-15	69.0% (20/29)	GAC1 CCND1, BCL1, INT2
	20q12-13	65.5% (19/29)	
	7p14-15	62.1% (18/29)	
	1q32	48.3% (14/29)	
	11q13	44.8% (13/29)	
	Xq	44.8% (13/29)	ABL
	18p	37.9% (11/29)	
	9q34	37.9% (11/29)	
	14q	27.6% (8/29)	
	2q	27.6% (8/29)	
	High Level Gains (Amplifications)	3q26	31.0% (9/29)
8q23-24		20.7% (6/29)	MYC
5p14-15		20.7% (6/29)	YES1
18p11.2-11.3		20.7% (6/29)	
3q27-28		17.2% (5/29)	CCND1, BCL1, INT2
5p13		10.3% (3/29)	
20q12-13		10.3% (3/29)	
7p14-15		10.3% (3/29)	
11q13		10.3% (3/29)	
14q21		6.9% (2/29)	GAC1
20p11.2		6.9% (2/29)	
13q32		6.9% (2/29)	
1q32		3.4% (1/29)	
7p22		3.4% (1/29)	ABL
9p23-24		3.4% (1/29)	
9q34		3.4% (1/29)	
17p11.2		3.4% (1/29)	
20p12-13	3.4% (1/29)		
20q11.2	3.4% (1/29)		
Losses	18q22-23	65.5% (19/29)	DCC, DPC4
	18q12	51.7% (15/29)	
	Xp22.2-22.3	44.8% (13/29)	
	3p	44.8% (13/29)	
	8p22-23	37.9% (11/29)	
	11q23-25	34.5% (10/29)	
	4p15-16	27.6% (8/29)	
	4q33-34	24.1% (7/29)	

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。

平成14年度は食道扁平上皮癌細胞株KYSEシリーズ29株を保存細胞株の染色体コピー数異常(特定染色体領域のコピー数増加、減少ならびに増幅)をCGH法で解析し次の結果を得た。

1) 染色体コピー数以上変異

KYSE細胞株29種類で検出した染色体コピー数異常の結果を図1に示した。頻度の高い染色体コピー数減少領域(loss)として、18q22-23(65.5%)、18q12(51.7%)、Xp22.2-22.3(44.8%)、3p(44.8%)、8p22-23(37.9%)、11q23-25(34.5%)、4p15-16(27.6%)、4q33-34(24.1%)を検出した。一方、頻度の高い染色体コピー数増加領域(gain)として、8q21-24(86.2%)、3q26(82.8%)、5p14-15(69%)、20q12-13(65.5%)、7p14-15(62.1%)、1q32(48.3%)、11q13(44.8%)、Xq(44.8%)、18p(37.9%)、9q34(37.9%)、14q(27.6%)、2q(27.6%)を検出した。高度増幅領域は3q26(9株)、8q23-24、5p14-15、18p11.2-11.3(それぞれ6株)、3q27-28(5株)、5p13、20q12-13、7p14-15、11q13(それぞれ3株)、14q21、20p11.2、13q32(それぞれ2株)に検出した。これらコピー数異常の頻度の高い領域と予想される標的遺伝子に関して表4にまとめた。

2) ESCの新規増幅遺伝子の探索

① ESCにおける1q32増幅領域の解析

ESC細胞株の1株で1q32での高度の遺伝子増幅を検出し、共通増幅領域を限局化した。AmpliconにはATF3とCEMPFが存在し、これら両遺伝子が遺伝子増幅により活性化を受けていることを明らかにした。

② Cにおける11p13増幅領域の解析

CGH法によって検出した11q22増幅の標的遺伝子がアポトーシスインヒビターのIAPファミリーの一員であるcIAP1であることを同定し、cIAP1増幅・発現亢進のあるものでは抗癌剤耐性であることを確認した。(Imoto et al., Cancer Res 2001)さらに同じ扁平上皮癌の子宮頸癌(CSC)においても高頻度に11q22増幅を検出し、cIAP1増幅のあるCSC株は(-)増幅がないCSCと比較して放射線誘発アポトーシスに耐性であり、本遺伝子増幅がCSC

の悪性形質獲得に関与することを示した。(Imoto et al., Cancer Res 2002)一方、ESC株において新規に見出した14q12-13遺伝子増幅領域の詳細な解析を進め、標的遺伝子としてBAZ1A、SRP54、NFKBIA、MBIP、HNF3Aなどを同定した。(Yasui et al, Gene Chromosome Cancer 2001)

3) 考察

今回のESC細胞株29例のCGH解析結果では、同一患者サンプル由来と思われるものは無く、良好な保存状態で維持されていることが確認できた。また、詳細なゲノムコピー数異常のデータは、ゲノム創薬などの発展研究にこれら細胞株が使用される場合でも、ESC細胞株の基本的なゲノム異常データになる貴重な情報と考える。

4) 関連業績

- ① Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S, Inazawa J. Expression of cIAP1, a Target for 11q22 Amplification, Correlates with Resistance of Cervical Cancers to Radiotherapy. *Cancer Res.* 62:4860-4866, 2002.
- ② Janssen JWG, Imoto I, Shimada Y, Ueda M, Imamura M, Bartram CR, Inazawa J. Myeov, a novel gene, is Co-amplified with CCND1 within the 11q13 amplicon, but is inactivated by an epigenetic manner in a subset of esophageal squamous cell carcinoma. *J Hum Genet* 47:460-464, 2002.
- ③ Hashimoto Y, Zhang C, Kawauchi J, Imoto I, Adachi MT, Inazawa J, Amagasa T, Hai T, Kitajima S: An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res* 30:2398-406, 2002.
- ④ Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y: Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109:113-24, 2002.
- ⑤ Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J: Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 23:19-24, 2002.

D. 結論

3年間の研究班の活動によりヒト、マウス、ラット等68種の細胞株を収集し、品質管理を終了し

てJCRB細胞バンクでの保存を完了した。このうち23株についてはすでにHSRRB研究資源カタログに記載して、分譲を開始した。残りの40株についてもデータベースに生物情報をインプットし終えた細胞から順次に分譲可能にしていく予定である。

品質管理をして行く過程で明らかになったことは、大学等多くの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(68株の内9株)があることであった。また廃棄した5株は他の細胞の汚染が認められたことはさらに深刻な結果でもある。以前から多くの機会で述べ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として、研究に使用すべきであることが、改めて示された。我々は、マイコプラズマ汚染を確認した場合には、マイコプラズマ汚染を除去してクリーンになった細胞株として寄託した研究者へ返還して、寄託者へのアフターケアとした。

遺伝子解析と染色体解析にはそれぞれ110株と97株の高品質の細胞株について用いられたことから信頼性の高い結果が得られたと思われ、染色体解析の研究成果が多くの論文に示された。

E. 発表

1) 口頭発表

- ①竹内昌男:ヒューマンサイエンス研究資源バンクにおける展開—Cell bankから現在、未来—、日本再生医療学会雑誌, 2 Suppl. P70, 2003.
- ②竹内昌男:ヒューマンサイエンス研究資源バンクの当面の課題、第2回ヒューマンサイエンス研究資源バンク技術講習会(平成15年2月13日、泉南市)

2) 論文発表

- ①竹内昌男:ヒューマンサイエンス研究資源バンク—ヒト組織バンクと動物胚バンク—。医薬品研究, 33, 623-632, 2002.

3) 参考資料

竹内昌男 編 HSRRB研究資源カタログ、第3版(2003)

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）
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

a) 新たな細胞株の開発

近年、遺伝子レベルでのヒトの発がん過程を研究するモデルとして、がん関連遺伝子を改変したトランスジェニック動物が利用されるようになってきた。

本年度は、短期発癌実験に用いられているc-Ha-ras変異モデルマウスより作製した培養細胞株について、がんのプロモーションの過程をin vitroで調べるための資材とすることを目的とし、発がんプロモーター感受性を調べた。

その結果、代表的なプロモーターであるTPAに感受性を示すクローンが複数得られ、そのうちの1クローンについて、既知のプロモーター及びイニシエーターを含む22種類の化学物質を処理したところ、既知のプロモーターの大部分に反応性を示し、in vitroにおけるプロモーション過程の研究に有用であることが示された。

b) 細胞株の収集

1) 昨年度に引き続き、親起源が明らかになっている単一ヒト染色体を保持するライブラリー細胞の分譲を受け、配布準備を開始した。

2) in vitroでの突然変異検出に頻用されるチャイニーズ・ハムスターV79細胞より単離されたグルコース-6-ホスフェート デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損株の分譲を受け、性状解析を開始した。

A. 研究目的

a) 新たな細胞株の開発

化学物質を用いた発がん実験により、がん形成の過程はイニシエーションおよびプロモーションの2つの段階を経て進行することが古くから知られている。イニシエーションの段階は、分子生物学的手法を用いた研究により、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が実体であり、がんの発生に関わることが明らかにされている。

しかしながら、プロモーションの段階の分子生物学的機序には不明の点も多く、がんの進行のメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究と研究資源の充実が必要であると考えられる。

これまでに、in vitroにおけるプロモーション実験系として、マウス由来のBALB3T3細胞に、v-H-ras遺伝子を導入したBhas42細胞株を樹立し、プロモーター処理によるin vitro発がん実験系として有用であることを示してきた。Bhas42細胞に導入したv-Ha-ras遺伝子は、突然変異により常にGTP結合型であり活性化された状態にある。また、ウイルス由来のプロモーター配列によって本来のras

遺伝子とは異なり、常に大量の産物を産生する。

今回、Bhas42細胞よりも発がん過程の前段階にある実験系を作製することを目的とし、短期発がん性試験に用いられているrasH2マウスより培養細胞株を作製し、その有用性を検討した。rasH2マウスは、正常なヒトH-rasジェノミックDNAを導入したトランスジェニックマウスであり、正常なH-ras遺伝子を本来のプロモーター配列の制御下で、正常マウスH-ras遺伝子の数倍程度発現していることが知られている。

b) 細胞株の収集

1) 親起源が明らかになっているヒト単一染色体雑種細胞は、ゲノムプリンティングによる遺伝子発現制御の研究に有用と考えられる。

2) グルコース-6-ホスフェート デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損株は、染色によって細胞の識別が可能であることから、混合培養等の目的に有用であると考えられる。

B. 研究方法

c-Ha-ras 変異モデル培養細胞の作製

使用した rasH2 マウス (Jic:CB6F1-Tg ras H2) 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り、日本クレア株式会社より購入した。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、国際 Validation study による発がん試験 (ILSI) 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 培地で 7 日ごとに

100mm ディッシュ 1 枚あたり 1×10^5 細胞のスケールで 20P. D. L. 以上継代培養して、不死化させた後、クローニングを行った。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、不死化させた。

rasH2 マウスより作製した細胞クローンについて、代表的なプロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を 50ng/mL で 11 日間処理後にギムザ染色し、フォーカス様の細胞が出現を調べたところ、2 つの TPA 反応性クローン (Rash23、Rash24) を得た。

これらのクローンを用いて、プロモーター処理

表 1. 各種プロモーター・イニシエーター等の化学物質に対するフォーカス形成

no.	名称	CAS no.	最高濃度	Rash 24	Ehas 42*	BALB/3T3 ⁺ (イニシエーター 併用)	C3H/10 ^{1/2} * (イニシエーター 併用)
1	Phorbol 12,13-didecanoate	24928-17-4	2 ng/mL	+	+	+	
2	Mezerein	34807-41-5	2 ng/mL	+	+	+	+
3	Phorbol	17673-25-2	100 ng/mL	±	-	-	
4	17β-Estradiol	50-28-2	5 μg/mL	±	+	-	+
5	Progesterone	57-83-0	10 μg/mL	-	+		
6	Dexamethasone	50-02-2	20 μg/mL	-	+		+
7	Lithocholic acid	434-13-9	50 μg/mL	+	+	+	+
8	Hydrocortisone	50-23-7	5 μg/mL	-		-	
9	Benz[a]anthracene	56-65-3	50 μg/mL	-	+		
10	Pyrene	129-00-0	50 μg/mL	+	+		
11	Anthralin (Dithranol)	1143-38-0	2 μg/mL	+	+	+	
12	Diethylstilbestrol	56-63-1	200 ng/mL	+	±		+
13	Phenacetin	62-44-2	1 mg/mL	-		-	
14	pp'-DDT	50-29-3	10 μg/mL	+	+	+	
15	Saccharin (sodium salt)	81-07-2	5 mg/mL	-	+	-	+
16	Cathecol	120-80-9	5 μg/mL	-	+	+	
17	Arsenic trioxide	1327-53-3	200 ng/mL	+	+		
18	Sodium orthovanadate (V)	13721-39-6	20 μg/mL	+		+	
19	Nickel chloride	7718-54-9	100 μg/mL	±			
20	Okadaic acid	78111-17-8	20 ng/mL	+	+	+	
21	Insuline (Bovine)	11070-73-8	10 μg/mL	+	±	+	+
22	Methylmethanesulfonate	66-27-3	100 μg/mL	+		+	

+: フォーカス形成あり、±: フォーカス形成するが明確でない、-: フォーカス形成なし

*: 下記の文献より引用

- An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Ehas 42 cells, Ohmori et.al.
- The 2nd validation study in Japan on the modified two-stage transformation assay employing BALB/c 3T3 cells, Tsuchiya et.al.
- Use of cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumour promoters: A review, Sakai et.al.

条件の検討を行い、TPA処理によって明確にフォーカスを形成し、TPA非処理時の自然フォーカス形成が少ないDME 2%FCSを以降の実験に用いた。

Rash24株について、プロモーター感受性スペクトルを明らかにするため、既知のプロモーター及びイニシエーターを含む22種類の化学物質を11日間処理してフォーカス様細胞の出現を調べ、その有用性を検討した(表1)。

処理濃度は、他の実験系で用いられている濃度を参考にし、公比ルート10で4~6段階の濃度群を設定した。

(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。

C. 研究結果および考察

a) c-Ha-ras 変異モデル培養細胞の作製

rasH2マウスに由来するクローンと、コントロールマウスに由来する不死化細胞にTPA処理を行ったところ、rasH2マウスに由来するRash23では細胞密度の上昇、Rash24では細胞密度およびフォーカス形成が認められた。

rasH2マウスに由来する他のクローンは、TPAに反応しないもの(Rash11, 12, 13, 16, 22)とTPA未処理でトランスフォーム細胞の形態を示すもの(Rash21)があった。コントロールマウスに由来する細胞およびコントロール細胞のBALB3T3ではTPAに対する反応性は認められなかった。このことから、正常H-rasの過剰発現はTPA反応性の十分条件ではなく、TPA反応性を得るには、他に何らかの変異が必要であると考えられた。

Rash24の化学物質に対する反応性を調べた結果、既知のプロモーターであるPhorbol 12, 13-didecanoate、Mezerein、Lithocholic acidなどの大部分でフォーカス形成が認められ、*in vitro*におけるプロモーション過程の研究資材として有用であることが示された。

他の*in vitro*試験系と明確に不一致な結果が得られたのは、Progesterone、Dexamethasone、Catecholの3種類のみであった。ProgesteroneおよびDexamethasoneはステロイドである点が一致するが、Catecholはこれらと構造的な共通点は無

く、Rash24のプロモーター検出特性を明らかにするためには、類似の構造を持つ化学物質を用いた比較試験が必要と考えられた。

また、代表的なイニシエーターであるMMS処理によってもフォーカスが形成されたことから、イニシエーターの短期検出系としても有用である可能性もあり、今後、検討を進めたい。

b) 細胞株の収集

1) これまでに収集した、ヒト単一染色雑種細胞に加えて、親起源が明らかなヒト単一染色体雑種細胞の分与を受けた、ヒト6、11、15、19番染色体を有する雑種細胞株に加え2、4、5、6、7番染色体を有する株の分譲を受け、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。

2) *in vitro*での突然変異検出に頻用されるV79細胞のグルコース-6-ホスフェート デヒドロゲナーゼ(G6PD、EC1.1.1.49)欠損株は、MNNG処理後、約1週間の突然変異発現期間の後、通常の薬剤耐性では選抜できないため、sib selectionを行うことにより得られたものである。欠損株の出現頻度はおよそ104細胞に1個の割合で得られ、成長速度に親株との差は認められない。G6PDはHPRT遺伝子と同様、X染色体に位置しており、また、染色法により欠損コロニーを検出可能なので、復帰変異の検索など、体細胞遺伝学分野の研究に有用と思われる。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

rasH2マウスに由来する培養細胞による*in vitro*短期プロモーター検出法の開発：中川 ゆづき、梅田 誠、田中 憲徳、第31回日本環境変異原学会(2002)