

図3. HuH-6 Clone 5, AH601.P3, HSC2, HSC3細胞に検出された汚染マイコプラズマと *M. orale* の16S-23S rRNA 遺伝子間スペース領域の比較

		10	20	30	40	50
<i>M. orale</i>	1	AAGTCGGTT	CTTAACCTCG	GAGGCGACTG	CTTAAGGTAG	CACTGGTGAAC
HuH-6 Clone	1	AAGTCGGTT	CTTAACCTCG	GAGGCGACTG	CCTAAGGTAG	CACTGGTGAAC
AH601.P3 (JT)	1	AAGTCGGTT	CTTAACCTCG	GAGGCGACTG	CCTAAGGTAG	CACTGGTGAAC
HSC-2 (07019)	1	AAGTCGGTT	CTTAACCTCG	GAGGCGACTG	CCTAAGGTAG	CACTGGTGAAC
HSC-3 (12129)	1	AAGTCGGTT	CTTAACCTCG	GAGGCGACTG	CCTAAGGTAG	CACTGGTGAAC
		60	70	80	90	100
<i>M. orale</i>	51	TGGGCTGAAG	TGTAACAAG	GTATCCCTAC	GAAGACGTGG	CGATGGATTA
HuH-6 Clone	51	TGGGCTGAAG	TGTAACAAG	GTATCCCTAC	GAAGACGTGG	CGATGGATTA
AH601.P3 (JT)	51	TGGGCTGAAG	TGTAACAAG	GTATCCCTAC	GAAGACGTGG	CGATGGATTA
HSC-2 (07019)	51	TGGGCTGAAG	TGTAACAAG	GTATCCCTAC	GAAGACGTGG	CGATGGATTA
HSC-3 (12129)	51	TGGGCTGAAG	TGTAACAAG	GTATCCCTAC	GAAGACGTGG	CGATGGATTA
		110	120	130	140	150
<i>M. orale</i>	101	CGTCCTTCT	ACGGAGTACA	ATTGAAGTTA	TCCATACTTC	GTAAATAGTT
HuH-6 Clone	101	CGTCCTTCT	ACGGAGTACA	ATTGAAGTTA	TCCATACTTC	GTAAATAGTT
AH601.P3 (JT)	101	CGTCCTTCT	ACGGAGTACA	ATTGAAGTTA	TCCATACTTC	GTAAATAGTT
HSC-2 (07019)	101	CGTCCTTCT	ACGGAGTACA	ATTGAAGTTA	TCCATACTTC	GTAAATAGTT
HSC-3 (12129)	101	CGTCCTTCT	ACGGAGTACA	ATTGAAGTTA	TCCATACTTC	GTAAATAGTT
		160	170	180	190	200
<i>M. orale</i>	151	AATGGCCCAA	TATTCGTATC	CAGTTTGTAG	AGAAGTATCG	CTCATTTATT
HuH-6 Clone	151	AATGGCCCAA	TATTCGTATC	CAGTTTGTAG	AGAAGTATCG	CTCATTTATT
AH601.P3 (JT)	151	AATGGCCCAA	TATTCGTATC	CAGTTTGTAG	AGAAGTATCG	CTCATTTATT
HSC-2 (07019)	151	AATGGCCCAA	TATTCGTATC	CAGTTTGTAG	AGAAGTATCG	CTCATTTATT
HSC-3 (12129)	151	AATGGCCCAA	TATTCGTATC	CAGTTTGTAG	AGAAGTATCG	CTCATTTATT
		210	220	230	240	250
<i>M. orale</i>	201	CTTGA AAAAC	TEAATTAGAC	ATTGAAAATT	AAAAATTAA	TATTCAAAAA
HuH-6 Clone	201	CTTGA AAAAC	TEAATTAGAC	ATTGAAAATT	AAAAATTAA	TATTCAAAAA
AH601.P3 (JT)	201	CTTGA AAAAC	TEAATTAGAC	ATTGAAAATT	AAAAATTAA	TATTCAAAAA
HSC-2 (07019)	201	CTTGA AAAAC	TEAATTAGAC	ATTGAAAATT	AAAAATTAA	TATTCAAAAA
HSC-3 (12129)	201	CTTGA AAAAC	TEAATTAGAC	ATTGAAAATT	AAAAATTAA	TATTCAAAAA
		260	270	280	290	300
<i>M. orale</i>	251	TATAGATCAA	CCATAGAAAT	ATTCAAAAAT	ATAGAGACAA	ATACAAAAAC
HuH-6 Clone	251	TATAGATCAA	CCATAGAAAT	ATTCAAAAAT	ATAGAGACAA	ATACAAAAAC
AH601.P3 (JT)	251	TATAGATCAA	CCATAGAAAT	ATTCAAAAAT	ATAGAGACAA	ATACAAAAAC
HSC-2 (07019)	251	TATAGATCAA	CCATAGAAAT	ATTCAAAAAT	ATAGAGACAA	ATACAAAAAC
HSC-3 (12129)	251	TATAGATCAA	CCATAGAAAT	ATTCAAAAAT	ATAGAGACAA	ATACAAAAAC
		310	320	330	340	350
<i>M. orale</i>	301	AAAACAATAG	GTCAAAAATA	CTTATACGTA	ATTAAAAAT	ATAACTATTA
HuH-6 Clone	301	AAAACAATAG	GTCAAAAATA	CTTATACGTA	ATTAAAAAT	ATAACTATTA
AH601.P3 (JT)	301	AAAACAATAG	GTCAAAAATA	CTTATACGTA	ATTAAAAAT	ATAACTATTA
HSC-2 (07019)	301	AAAACAATAG	GTCAAAAATA	CTTATACGTA	ATTAAAAAT	ATAACTATTA
HSC-3 (12129)	301	AAAACAATAG	GTCAAAAATA	CTTATACGTA	ATTAAAAAT	ATAACTATTA
		360	370	380	390	400
<i>M. orale</i>	351	AATAAGCAAG	AGTTTTTGG
HuH-6 Clone	351	AATAAGCAAG	AGTTTTTGG
AH601.P3 (JT)	351	AATAAGCAAG	AGTTTTTGG
HSC-2 (07019)	351	AATAAGCAAG	AGTTTTTGG
HSC-3 (12129)	351	AATAAGCAAG	AGTTTTTGG

D. 考察

HeLa細胞におけるマイコプラズマ汚染が発見された(Robinson et al., 1956)のが、細胞系におけるマイコプラズマ汚染認識の嚆矢といえる。それはマイコプラズマという微生物が発見されてから60年後のことであった。わが国で維持されている細胞系におけるマイコプラズマ汚染については、これまでにいくつかの調査結果が公表されている。それによれば、汚染の頻度は87% (Ogata & Koshimizu, 1967; Yamanaka et al., 1974) という高率であった。その後、細胞培養におけるマイコプラズマ汚染については、広く啓蒙されたこともあり、研究者の間でも次第に注意を払う気風が生まれてきた。今回の調査では8.2%の汚染率であり、これは四半世紀前の汚染頻度に比べて半減している。汚染マイコプラズマの菌種は当時とさしたる違いはなく、*Mycoplasma orale*が同様に最優先頻度で検出された。細胞バンクに保存されている細胞系における検査結果がそのまま現在の実状を反映するものとはわかに断定できないものの、21世紀初頭の調査結果として参考に値する資料になるであろう。

E. 結論

わが国を代表する細胞バンクに保存されている細胞系73株についてPCR法によりマイコプラズマ汚染を検査した。その結果つぎの6株、すなわちKATOIII (JCRB0611)が*Mycoplasma hominis*に、MKN45 (JCRB0254)が*Mycoplasma fermentans*に、またHuH-6 Clone 5 (JCRB0401), AH601.P3 (JTC27) (NIHS0211), HSC-2 (JCRB0622), およびHSC-3 (JCRB0623)が*Mycoplasma orale*にそれぞれ汚染していることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 原澤 亮、マイコプラズマの分類、臨床と微生物 30, 3-8 (2003).

2. 学会発表

該当なし。

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

主任研究者コメント

ここで指摘されたマイコプラズマの汚染についてはマスターバンクにおいても検出したが、マスターバンクにおいてはマイコプラズマ種まで特定するには至っていない。また、汚染が確認された細胞については、MC210等により除染に成功している。また、除染後の再出現の可能性については継続して調査を続行中である。

マイコプラズマ種によって除染しやすいものし難いものが存在する可能性を否定することは出来ない。種の特定期まで実施しているが、本結果により汚染マイコプラズマ種は限定されており、全てMC210で除染可能であった。今後とも調査を続行する必要がある。

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 遺伝子導入により、ヒト遺伝病患者由来初代培養線維芽細胞から不死化細胞株を樹立し、その細胞特性の検討を行った。常染色体劣性の遺伝様式を示す高発癌性遺伝病である毛細血管拡張性運動失調症（アタキシア・テランジェクタシア）患者由来細胞にhTERT 遺伝子を導入し、培養を続けて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は元の初代線維芽細胞株と同様の高い電離放射線感受性を示した。不死化細胞株では、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、研究資源として極めて利用価値が高い。

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、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ている。これまでの研究結果によれば、hTERT 遺伝子導入による不死化では、

染色体が安定に保たれ、しかも元の細胞の性質が非常に良く保持されていた。今年度は常染色体劣性高発癌性遺伝病である毛細血管拡張性運動失調症（アタキシア・テランジェクタシア、A-T）のhTERT 不死化細胞株の樹立を行った。

B. 研究方法

hTERT 遺伝子を持つレトロウイルスベクターを、A-T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、国立長寿県本山 昇室長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、電離放射線に対する感受性を、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っている。

C. 研究結果

常染色体劣性様式の高発癌性遺伝病で、電離放射線に対して高感受性を示すA-T患者由来細胞株に、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。

A-T患者細胞は、電離放射線高感受性であることから、DNA損傷修復過程に欠損があると考えられている。また、細胞周期チェックポイントに異常があることも知られており、多くの研究者が高い関心を示している。JCRBバンクにはAT10S (JCRB0308)

とAT2KY (JCRB0316) の2種類の初代線維芽細胞株を登録しており、分譲依頼も多い。しかし、ヒト初代線維芽細胞は培養が一般的に困難であり、しかも細胞寿命が有限であるため、しばらく培養を続けると急速に増殖速度が低下するなどの問題がある。殊にA-T細胞ではこれらの問題が顕著に現れるため、長期間に及ぶ実験が不可能であるなど、研究上の大きなネックとなっていた。そこで不死化細胞の樹立を目指して8人のA-T患者由来細胞にhTERT遺伝子を導入し、長期培養を行って、6人の患者(AT1KY、AT2KY、AT4KY、AT5KY、AT6KY、AT10S)由来の線維芽細胞でPDLが50を越えるまで培養することができ、一部についてはPDLが100を越えてなお増殖しているものもある。従って、これらの細胞株は不死化に成功したものと判断し、それぞれAT1KY/TERT、AT2KY/TERT、AT4KY/TERT、AT5KY/TERT、AT6KY/TERT、AT10S/TERTと名付けた。

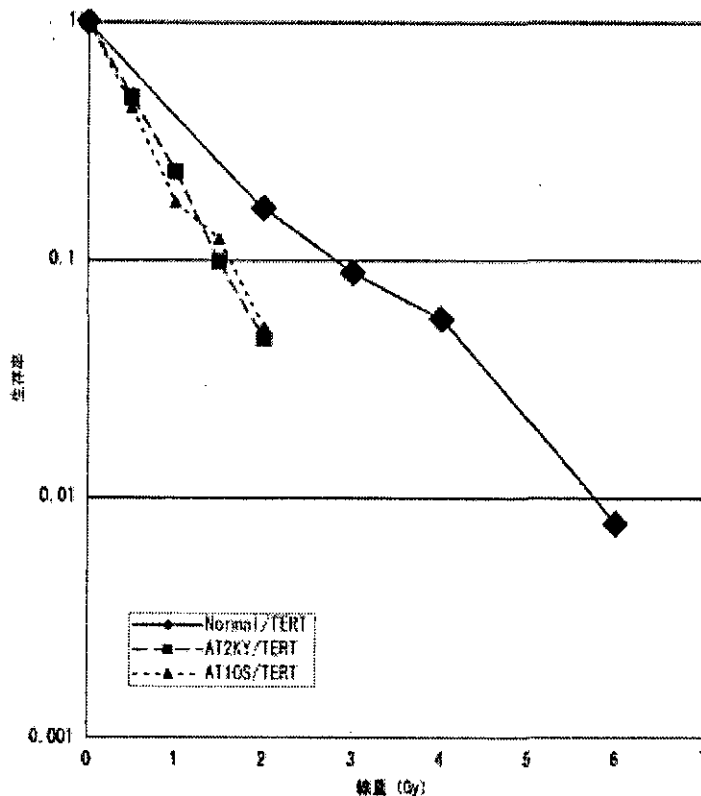


図1 AT/TERT細胞のガンマ線生存曲線

上述のように、A-T患者初代細胞は電離放射線に高感受性を示すことから、まずこれらの不死化細胞で電離放射線に対する感受性が維持されているかを検討するため、ガンマ線照射後のコロニー形成能により生存率を解析した(図1)。図にはA-T/TERT細胞2株の結果のみを示しているが、樹立された6株全てがほぼ同程度の生存率であった。明らかに正常細胞株に比べてこれらのA-T/TERT細胞は電離放射線に対して高感受性を示した。

さらにこれらのA-T/TERT細胞株の染色体数と形態について検討した。表1に示すように、いずれの細胞株においても集団の大部分の細胞が45乃至46本の染色体数を示し、倍加したと考えられる細胞

はごく一部のみであった。また、染色体の形態も不死化前の初代培養細胞と殆ど同一であった。図2にAT5KY患者の初代細胞とhTERT不死化細胞の染色体像を示す。AT5KYでは初代培養細胞に染色体の転座が見られるが、hTERT不死化細胞でも同じ形態のものが観察され、染色体の形態も非常に良く保持されていることがわかる。

細胞増殖の速度に関しても、初代培養細胞に比べて殆ど差は見られない。これらのことから、今回得られたAT/TERT細胞は、初代細胞の性質をほぼ維持したまま不死化していると考えられる。この細胞は今後癌研究を始めさまざまな方面の研究の推進に寄与することが期待される。

細胞名	染色体数																		
	37	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	50	65	80	89	90	91	92	
AT1KY/TERT							10	68	17	1	1				1		1	1	
AT4KY/TERT	1	1	1	2	2		5	13	67	5					1	1		1	
AT5KY/TERT	1			1	4	1	7	14	62	8		1	1						
AT6KY/TERT					3	2	4	12	61	16	1			1					

各細胞株100細胞について分析

表1 A-T/TERT細胞の染色体数

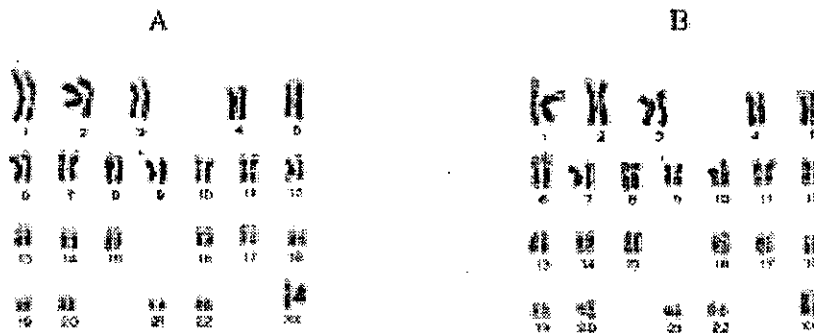


図2 AT5KY初代培養細胞(A)とAT5KY/TERT不死化細胞(B)の染色体像

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。今年度はこれらの疾患のうち、毛細血管拡張性運動失調症(アタキシア・テランジェクタシア、A-T)患者6人の初代線維芽細胞から合計6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、いずれもA-T患者細胞に特有の性質を有していたことから、今後A-Tでの欠損の解明や発癌機構解明の研究などに大きく寄与するものと思われる。特に、これらの細胞株の染色体数はほぼ正常であり、利用価値は非常に高い。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本年度は、毛細血管拡張性運動失調症(A-T)患者由来初代線維芽細胞から不死化細胞株を樹立した。A-T患者は、特にリンパ腫を好発することが知られており、しかも通常人よりも低い線量の電離放射線によって、高い反応を示す。A-T患者細胞も電離放射線による致死効果に高い感受性を示す。さらにA-T患者細胞では染色体異常が多く見られ、しかも電離放射線を照射されると染色体異常の頻度が大きく上昇することが知られている。このため、A-Tは染色体不安定性症候群の一つに数えられている。これらのことから、A-TではDNA損傷修復過程に欠損があり、そのために染色体不安定性などの遺伝的不安定性を示すものと考えられている。また、細胞周期チェックポイントに異常があることも知られており、多くの研究者が高い関心を示している。しかしながら、A-T細胞はこれらの欠損により、増殖速度が非常に遅い上に、培養を継続すると早期に増殖能が急速に減少する。このため、A-T線維芽細胞は、培養が非常に困難であり、上記諸研究を行う際の大きな障害となっていた。今回樹立した不死化細胞株は、A-T細胞としての性質を保持したまま不死化したと考えられるもので、今後電離放射線によるDNA損傷修復機構や細胞周期制御機構の研究などに非常に有用な研究材料であると

いうことができる。さらに、これらの基礎研究から、A-Tの診断及び治療方法の大きな進展が期待され、それ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り、今回樹立したA-T細胞株はいずれも、世界的に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。

E. 結論

ヒト高発癌性遺伝病である毛細血管拡張性運動失調症(A-T)患者由来初代線維芽細胞にhTERT遺伝子を導入して、6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電離放射線高感受性という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非常によく保持していると考えられる。A-T患者細胞は、電離放射線高感受性であることから、DNA損傷修復過程に欠損があると考えられている。また、細胞周期チェックポイントに異常があることも知られており、多くの研究者が高い関心を示している。今回樹立された不死化細胞株は、これらの研究の進展に大きな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. Naka, K., Tachibana, A., Ikeda, K., and Motoyama, N. (2004) Stress induced premature

- senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 2030 - 2037.
2. Koga, A., Iida, A., Kamiya, M., Hayashi, R., Hori, H., Ishikawa, Y., Tachibana, A. (2003) The medaka fish Tol2 transposable element can undergo excision in human and mouse cells. *Journal of Human Genetics*, 48: 231-235.
 8. 中村英亮、林 裕子、立花 章、小松賢志、中津川重一、浜口道成、石崎寛治：G1期のAT細胞は低線量率放射線に対しても高感受性を示す。日本放射線影響学会第46回大会、2003年10月、京都市。
 9. 内海博司、田野恵三、徳野 治、立花 章：線量率効果におけるNHEJの役割。日本放射線影響学会第46回大会、2003年10月、京都市。
 10. 高橋昭久、大西 健、立花 章、大西武雄：低線量・低線量率事前照射による放射線感受性の低減。日本放射線影響学会第46回大会、2003年10月、京都市。

口頭発表

(日本語発表)

1. A. Ida, H. Hori, A. Tachibana, and A. Koga: Nuclear transportation signals in the medaka fish Tol2 transposable element. 第26回日本分子生物学会年会、2003年12月、神戸市。
2. 立花 章、大谷寧子、中村久美、佐々木正夫：マウスHprt遺伝子座での放射線適応応答誘発突然変異スペクトルの解析。第26回日本分子生物学会年会、2003年12月、神戸市。
3. P. Chang, Q.-M. Zhang, K. Takatori, A. Tachibana, and S. Yonei: Excessive base excision repair of clustered DNA damage by *E. coli* MutM and human Ogg1 causes enhanced sensitivity to low-LET radiation in *E. coli*. 第26回日本分子生物学会年会、2003年12月、神戸市。
4. 張 博文、張 秋梅、立花 章、高取和弘、米井脩治：クラスターダメージに対する塩基除去修復の過剰修復による大腸菌の低LET放射線感受性の増大。日本放射線影響学会第46回大会、2003年10月、京都市。
5. 松本英樹、林 幸子、金 朝暉、畑下昌範、立花 章、大西武雄：低線量率カンマ線照射による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46回大会、2003年10月、京都市。
6. 立花 章、大谷寧子、中村久美、佐々木正夫：放射線適応応答によって誘発されたマウスHprt遺伝子突然変異スペクトル。日本放射線影響学会第46回大会、2003年10月、京都市。
7. 高取和弘、張 博文、張 秋梅、立花 章、高尾 雅、安井 明、米井脩治：ヒト培養細胞でのhOGG1過剰発現によるγ線感受性の増大。日本放射線影響学会第46回大会、2003年10月、京都市。
11. 石崎寛治、林 裕子、中村英亮、立花 章：低線量率放射線に対するヒト細胞のレスポンス。第62回日本癌学会総会、2003年9月、名古屋市。
12. 中村英亮、林 裕子、立花 章、中津川重一、浜口道成、石崎寛治：ヒト不死化線維芽細胞の低線量率放射線による変異誘発。第62回日本癌学会総会、2003年9月、名古屋市。
13. 立花 章、佐々木正夫：放射線適応応答での突然変異スペクトルとDNA2本鎖切断修復。第62回日本癌学会総会、2003年9月、名古屋市。
14. 立花 章、大谷寧子、佐々木正夫：放射線適応応答でのDNA切断修復及び突然変異の特性。ワークショップ「DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2003」、2003年2月、兵庫県津名郡東浦町

(英文発表)

1. H. Utsumi, and A. Tachibana: Non homologous end-rejoining pathway plays an important role in low dose-rate effects. The 12th International Congress of Radiation Research. Brisbane, Australia, August 17-22, 2003.
2. P.-W. Chang, K. Takatori, A. Tachibana, Q.-M. Zhang and S. Yonei: The increase of radiosensitivity by overexpression of DNA glycosylases in *E. coli* Nth: correlation with the formation of clustered DNA damage. The 12th International Congress of Radiation Research. Brisbane, Australia, August 17-22, 2003.
3. A. Takahashi, K. Ohnishi, I Asakawa, T. Tamamoto, J. Yasumoto, K. Yuki, A. Tachibana, and T. Ohnishi: Pre-irradiation at a low dose-rate blunted p53 response. The 12th Interna-

-
- tional Congress of Radiation Research. Brisbane, Australia, August 17-22, 2003.
4. A. Tachibana, Y. Ohtani, K. Nakamura, and M. S. Sasaki: Characteristics of double-strand break rejoining in cells of radioadaptive response. The 12th International Congress of Radiation Research. Brisbane, Australia, August 17-22, 2003.
5. H. Matsumoto, S. Hayashi, Z.-H. Jin, E. Kano, M. Hatashita, A. Tachibana, and T. Ohnishi: Modulation of nitric oxide-mediated bystander effects by chronic irradiation with γ -rays. The 12th International Congress of Radiation Research. Brisbane, Australia, August 17-22, 2003.
-

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

正常2倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化と分譲に関する研究

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 参事研究員

研究要旨

ヒト正常二倍体細胞の新規樹立と供給を主な目的として活動した。新規正常細胞株2種を樹立した。供給用正常細胞株4種126アンプル、がん細胞株1種3アンプルをHS財団細胞バンクへ送付した。バックアップ用正常細胞株2種およびがん細胞株1種合計9アンプルをマスターバンクへ送付した。細胞バンクの依頼により、登録済細胞の凍結アンプルを利用者に直接送付した。

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新規樹立と供給を主な目的とする。

B. 研究方法

1) 細胞の樹立

異なる供与者年齢の皮膚片から違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。

2) 細胞の収集

HS財団細胞バンクにない細胞を収集する。

3) 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。

4) 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。

5) 登録済細胞の供給

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、登録済細胞の中でストックが少ないものについては、東京都老人総合研究所から供給する。

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。このようにして得られた胎児由来皮膚線維芽細胞TIG-3S、成人由来線維芽細胞TIG-110の特性は以下のとおりである。

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・コンセントは口頭で得られている。

(i) TIG-3S (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織:	ヒト、皮膚
性:	M
年齢:	胎児
性状:	線維芽細胞様
分裂寿命:	PD69
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:	PD25-30

(ii) TIG-110 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織:	ヒト、皮膚
性:	F
年齢:	33歳

C. 研究結果

1) 異なる供与者年齢の皮膚線維芽細胞の新規樹立

胎児、成人の皮膚片から違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

性状：	線維芽細胞様	Culture Medium
分裂寿命：	PD35	Ham's F12:EMEM (EBSS) (1:1) + 2mM
染色体：	正常2倍体(2N=46, XX)	Glutamine + 1% Non Essential Amino Acids
マイコプラズマ：	マイナス	(NEAA) + 15% Foetal Bovine Serum (FBS).
細菌：	マイナス	Karyotype Not Specified
供給時のPD：	PD15-20	Depositor Dr PFT Vaughan, Institute for Cardiovascular Research

2) 細胞の収集

ヒト神経芽腫由来SH-SY5Y細胞株を、HS財団細胞バンクに3アンプル寄託した(国立医薬品食品研究所マスターバンクにバックアップ用として別途3アンプル送付)。本細胞株の特性は、ECACC(The European Collection of Cell Cultures)により以下のように記載されている。

ECACC No. 94030304

Cell Line Name SH-SY5Y

Keywords Human neuroblastoma

Cell Line Description

SH-SY5Y is a thrice-cloned sub-line of bone marrow biopsy-derived line SK-N-SH (ECACC No. 86012802). SH-SY-5Y has dopamine-beta-hydroxylase activity and can convert glutamate to the neurotransmitter GABA. Will form tumours in nude mice in approximately 3-4 weeks. The loss of neuronal characteristics has been described with increasing passage numbers. Therefore it is recommended not to be used after passage 20 or to verify specific characteristics such as noradrenalin uptake or neuronal markers routinely.

Species Human

Tissue neural

Morphology Neuroblast

Passage Number 12

Sub Culture Routine

Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:10 to 1:100 i.e. seeding at 1x1,000-1x10,000 cells/cm²; using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA, 5% CO₂; 37 °C. Cells may reattach slowly and may remain in suspension for several days. NB: do not use after passage 20.

Originator No

Country UK

References

Cancer Res 1978;38:3751; J Nat Cancer Institute 1983;71:741

Additional Literature Report Not Available

Additional Bibliography Not Available

Research Council Deposit No

Release Conditions No

DNA Available from Stock No

The ECACC collections represent deposits of cell cultures from world-wide sources. While every effort is made to ensure details distributed by ECACC are accurate, ECACC cannot be held responsible for any inaccuracies in the data supplied. References where quoted are mainly attributed to the establishment of the cell culture and not for any specific property of the cell line, therefore further references should be obtained regarding cell culture characteristics. Passage numbers where given act only as a guide and ECACC does not guarantee the passage number stated will be the passage number received by the customer.

3) 供給細胞の凍結アンプル作製

平成14年度に樹立・性格づけをして新規登録した幼児皮膚繊維芽細胞TIG-120と成人皮膚線維芽細胞TIG-111(34Y, F)の供給用凍結アンプルを作製した。また、TIG-1-20細胞(JCRB0501)とTIG-3-2細胞(JCRB0506)の供給用凍結アンプルを作製した。これらはHS財団細胞バンクに送付した。

TIG-111 (JCRB0541)、Lot. No. R311、30アンプル

TIG-120 (JCRB0542)、Lot. No. R401、30アンプル

TIG-1-20 (JCRB0501)、Lot. No. R015、33 アンプル
TIG-3-20 (JCRB0506)、Lot. No. R034、33 アンプル

4) 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。

(i) 平成14年度規樹立細胞

TIG-111 (JCRB0541)、Lot. No. R311、3 アンプル
TIG-120 (JCRB0542)、Lot. No. R401、3 アンプル

(ii) 新規収集細胞

SH-SY5Y 細胞、3 アンプル

5) 登録済細胞の中でストックが少ないため東京都老人総合研究所から供給した凍結アンプル

- (1) TIG-1-40、TIG-1-60 細胞各 1 アンプル
- (2) TIG-3-30 細胞 1 アンプル
- (3) TIG-1-60、TIG-7-60 細胞各 1 アンプル
- (4) TIG-101 細胞 1 アンプル
- (5) TIG-1-50、TIG-3-50 細胞各 1 アンプル
- (6) TIG-101 細胞 1 アンプル

D. 考察

ヒト正常細胞は分裂寿命を持ち、かつ分裂寿命がつき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）ため、正確な分裂回数の記録を持つ細胞として維持・供給することが極めて重要となる。このため当分の間は、HS財団に供給する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、東京都老人総合研究所で行う予定になっている。なお、これらの細胞は、凍結アンプル解凍後の生存率が高いことや、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を確認済みである。

E. 結論

ヒト正常二倍体の細胞を得るため、ヒト胎児肺ならびに供与者年齢の異なる（老人、成人、幼児の）正常皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、HS財団細胞バンクに登録してきた。供与者年齢の異なる細胞の登録数は少ないので、今後更に充実するため

の計画が進行中である。平成15年度は胎児および成人由来皮膚線維芽細胞を各1ラインずつ樹立し、性状を確認した後、新規登録した。また、供給用として4細胞株、合計126アンプルをHS財団細胞バンクに、バックアップ用として新規樹立した正常細胞2細胞株、各3アンプルおよび1がん細胞株、3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。登録済細胞の中で細胞バンクにストックの無いものについては、東京都老人総合研究所から利用者に直接凍結細胞（合計9アンプル）を送付した。今年度の新しい活動として、がん細胞1細胞株を収集・寄託した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Megumi Nakamura, Hiroshi Kondo, Yukiko Shimada, Abdul A. Waheed and Yoshiko Ohno-Iwashita: Cellular aging-dependent decrease in cholesterol in Membrane microdomains of human diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 290 (No. 2), 381-390, 2003.
2. Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., Kimura, N., Shirayoshi, Y., Kamitani, H., Watanabe, T., Ohama, E., Tahimic, C.G.T., Kurimasa, A. and Oshimura, M.: Proteomics-based identification of differentially-expressed genes in gliomas: down regulation of SIRT2 gene in human gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 558-566, 2003
3. Toda, T., and Sugimoto, M.: Proteome analysis of Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblasts and the proteome database". *J Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 787, 197-206, 2003

2. 学会発表

1. Ishijima, Y, Ishikawa, N, Shimada, N, Fukuda, M, Akiyama, K, Kimura, N, Kimura, N.: The Role of NDPK in the NGF Signaling Cascade of PC12D Cells. 第76日本生化学会、2003年10月15-18日、横浜

2. Takubo, K, Nakamura, K, Izumiyama, N, Ishii, A and Kimura, N: Telomere Shortening in Aging and Cancer. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Nov. 24-28, 2003, Tokyo
3. Toda, T.: Proteomic analysis of brain aging in quantitative and qualitative protein alterations. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Nov. 24-28, 2003, Tokyo

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

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

ヒト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、がん研究、創薬、薬効試験、毒性検査などに不可欠になるヒト組織型幹細胞及びそれらの不死化細胞系の研究資源化のために必須のものとなる。これにより昨年度までのものに加え、皮膚、食道、膵臓、肺、胎児性付属器（臍帯、羊膜）などのヒト上皮組織由来の幹細胞特性を示す複数の上皮細胞系を確立するなどの成果があった。

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予後成績の悪い癌の代表として膵癌と肺癌の発生機構を取上げこれらの発生母地である各々膵管及び肺胞の不死化上皮細胞株を作成する。③ヒト胎児性付属器（臍帯、羊膜等）から潜在的な多分化能を保持する上皮幹細胞の分離培養法を確立し、それらの細胞の不死化細胞系を分離し、再生医療等の基盤となる研究資源化を計る。

B. 研究方法

1. 悪性腫瘍などの外科的手術で摘出された組織の病変を伴わない部域からDispase処理によって上皮層だけを回収し基底層細胞の初代培養細胞を増殖させた。幹細胞はIntegrin β 1, β 4, p75NTRなどに対する抗体の反応性によってフローサイトメーター及び磁気ビーズ法などのすでに報告済みの手法で分離した。
2. 膵管および肺胞上皮細胞の分離培養と不死化細胞の分離：膵癌又は肺癌症例で摘出された検体組織の浸潤などの病変を伴わないと判断される組織領域の膵管、または肺気道をデイスパーゼ処理によって膵管上皮細胞あるいは肺気道上皮細胞を回収し初代培養を調整した。不死化細胞系はSV40-

large T 及びhTERTのトランスフェクションによって分離した。

3. 臍帯上皮及び羊膜上皮細胞幹細胞の分離培養と不死化細胞の分離：インフォームドコンセントが得られた正常分娩後の臍帯及び胎盤から羊膜上皮を剥離しトリプシン-EDTA処理によって回収された細胞から初代培養を調整した。不死化細胞系はSV40-large T 及びhTERTのトランスフェクションによって分離した。

C. 研究結果

a. 上皮幹細胞の分離と細胞特性

ヒト食道正常上皮構成細胞中1-5%の頻度で回収される幹細胞の同定分離技術を確立した。分離された幹細胞は生体内で観察されるのと同様にSlow-cyclingの特性を示したが継続した培養条件下では細胞集団の再生能力が極めて強いこと、自己再生及び自己増幅する細胞であることを明らかにした。また、不等分裂も観察され分化した細胞を生産する能力も正常であることが明らかになっていく。幹細胞の分裂寿命の解析から長期わたって(10週以上)分化細胞生産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。今後とも医学、医療用の再生可能な組織の幹細胞の同定分離をさらに発展させることが懸念され、その幾つかは当研究室で取り扱うことが可能になっている。(例、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)

b. 難治性癌研究用細胞株

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系列分離済みである。これらの細胞株は発細胞発生過程の分子機構を解析するために特に有用な不死化細胞株ある。細胞特性の解析が進み次第供給可能である。

c. 胎児性付属器由来上皮幹細胞

臍帯、羊膜などの上皮幹細胞の分離法の確立とそれら細胞株の資源化を進めた。これらの細胞は①出産に伴って無制限に供給可能②倫理的バリアが低い③健常組織由来④免疫寛容性などの特性を持つものである。これらの胎児性付属器から高率に初代培養細胞を調整する方法を確立した。これらの細胞の遺伝子発現様式をRT-PCR及び免疫染色などにより検討し、肝、膵、神経などの複数の細胞型の遺伝子発現様式を示す細胞が存在することを確認した。さらにSV40largeTを導入し、初代培養細胞と同様に肝、膵、神経に分化できる可能性のある遺伝子発現様式を示す複数の不死化細胞株を樹立した。

D. 考察

本分担研究の主目的は、今後需要が増加すると予想されるヒト細胞の研究資源化に資する成果を生み出すことであるが、着眼点は以下の3点である。これは研究目的にもあるように、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に常につきまとう細胞の供給源と倫理的問題の解消。

① 問題点の一つとして実際に分離した幹細胞をどのような研究者に供給すべきかという副次的要素はあるが、受け入れ体制が整っていれば可能と考えられる。基本的には、初代培養細胞に準ずる扱いになるが、分離される細胞数が初代培養細胞中1-5%、場合によってはそれ以下という少数細胞サブセットであることを考慮すると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十分認識しなければならない。

そのことを考慮した上で、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解明してきた。一連の本研究で明らかになったことは皮膚、食道、子宮頸部などの上皮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必要になることは明らかである。

② 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癌の発生や進展の詳細な解析できることは自ずと制限される。癌細胞株と多くの点で区別されるべき不死化細胞系は、正常細胞から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細胞株である。本分担研究では、それらの細胞株の作製を試み再現性をもって正常な膵組織および肺組織の特定領域から随時作製可能であることを明らかにした。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価値は高い。

③ 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ている。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学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。これらの細胞の不活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活化が容易であることが明らかになったため、必要に応じて作製し供給に対応することも可能である。

E. 結論

新規の不活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る。新規分離されたこれらの不活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も低くない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto R, Kamata N, Taki M, Yokoyama K, Tomonari M, Nagayama M, Yasumoto S. Gene expression of telomerase related proteins in human normal oral and ectocervical epithelial cells, *Oral Oncol.* 39:445-452, 2003.
2. Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto, S. The neurotrophin receptor p75NTR characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro *Oncogene* 22: 4017-4026, 2003.

2. 学会発表

1. 膣管上皮不活化細胞株の樹立と隣発癌過程の研究、政木隆博、安本茂、森村茂、菊地慶司、宮川薫、玉井拙夫、杉政征夫、亀田陽一、大川伸一、第62回日本癌学会、2003.
2. ヒト正常上皮細胞のテロメラーゼ活性と不活化、安本茂、竹内誠亮、越後谷朋子、第62回日本癌学会、2003.
3. 神経成長因子受容体p75NTRの発現に伴う遺伝子発現の変動、菊地慶司、安本茂、第62回日本癌学会、2003.
4. ヒト隣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62回日本癌学会、2003.
5. 牛卵管上皮細胞における不活化細胞株の樹立、村田健、小泉さゆり、半澤恵、安本茂、第76回日本組織培養学会2003.

H. 知的財産権の出願登録状況

なし

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

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薬野研究所 細胞毒性学研究室長

研究要旨

a) 細胞株の収集

- 1) 染色体工学的手法で作製された、ヒト21番染色体DCR領域とマウス染色体の転座染色体を保持する単一染色体雑種細胞の分譲を受けた。この転座染色体は、微小核融合法を用いてマウスES細胞に導入することにより、ダウン症モデルマウスの作製が可能である。
- 2) ヒト口腔組織に由来する培養細胞株の分譲を受けた。本細胞株は、ヒト口腔内の歯肉上皮由来のケラチノサイト、歯根膜および歯肉結合組織に由来する不死性の上皮細胞および繊維芽細胞株で、歯科用薬剤、歯科材料等の安全性試験や、飲食物、タバコなどの暴露を恒常的に受ける口腔組織の発がんメカニズムの解明等に有用である。
- 3) 骨形成に関わる転写因子Cbfalを過剰発現するトランスジェニックマウスおよび、ターゲティングによりヘテロに保持するノックアウトマウスの分譲を受けた。これらの遺伝子改変マウスに由来する間胚葉系幹細胞は、骨形成のメカニズムと、関連するヒト遺伝性疾患の解明に有用であると考えられる。

b) 新たな細胞株の開発

簡便かつ短期間で発がんプロモーターを検出することを目的として、昨年度にrasH2トランスジェニックマウスより作製したRash23、24細胞について、実験系の改良を目的として、新たにRash232株を作製し、プロモーター反応性の確認と実験条件の設定を行った。

A. 研究目的

a) 細胞株の収集

細胞バンクへの新規細胞株登録を目的とし、国内の研究機関より細胞株を収集し広く研究資源として公開する。

b) 新たな細胞株の開発

昨年度に、新たな発がんプロモーター検出系の開発を目的とし、rasH2トランスジェニックマウスより単離・不死化し、プロモーター感受性を指標にスクリーニングしたRash細胞株について、より定量的なプロモーターの評価を可能にする改良を加えることを目的とし、サブクローニング及びプロモーター感受性の確認、至的な培養条件の検討を行った。

a) 収集細胞株

本年度は下記5種の細胞を収集した。これらに関する最終的な品質管理はマスターバンクである国立医薬品食品衛生研究所のJCRB細胞バンクが実施するが、その支援のために予備アンプルを十分量作成し、基本的な品質管理項目である、マイコプラズマ汚染検査、一般細菌・真菌の汚染検査、ならびにアイソザイム検査による動物種の確認を実施した。本検査を通じて日本薬局方で定められたマイコプラズマ検査と細胞バンクで定められたマイコプラズマ検査を比較検討した。その結果、日本薬局方で定められた検査結果は若干確定しにくかったため、国立医薬品食品衛生研究所の協力を得てさらに検討をする計画である。下記、5細胞株に関する汚染検査ならびにアイソザイム検査結果は良好であった。

B. 研究方法

収集細胞株リスト (2003年度)

番号	樹立者	所属	細胞株名	関連論文
1	筒井健機	日本歯科大	NDUSD	1)
2	筒井健機	日本歯科大	Pelt	2)
3	筒井健機	日本歯科大	Ayt	2)
4		大阪大学	Cbfal-OE	3)
5		大阪大学	Cbfal-NO	4)

関連文献

1) NDUSD-1

Igarashu, F., Uchida, M. and Tsutsui, T., Establishment and characterization of cultured human gingival keratinocytes immortalized by transfection of Origin(-) SV40 DNA and c-fos gene, SHUGAKU (ODONTOLOGY) vol.86, No.1, pp37-47, 1998

2) Pelt, Ayt

Inoue, K., Kumakura, S., Uchida, M. and Tsutsui, T., Effect of eight antibacterial agents on cell survival and expression of epithelial-cell- or cell-adhesion-related genes in human gingival epithelial cells, J Periodont Res., vol.39, pp50-58, 2004

3) Cbfal 過剰発現マウス由来細胞

Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A. and Komori, T., Overexpression of Cbfal in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures, J Cell Biol., vol.155, No.1, pp175-166, 2001

4) Cbfal ヘテロノックアウトマウス由来細胞

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimazu, Y., Bonson, R. T., Gao, Y.-H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T., Cell, vol. 89, pp755-764, 1997

b) 新たな細胞株の開発

使用した ras H2 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。

昨年度に、約6週齢の雄個体の肺組織から、細胞を単離し、10% ウシ胎児血清を含む DME/F12 培地で 20P. D. L. 以上継代培養して、不死化させ、クローニングして 12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 反応性を指標にスクリーニングした Rash23、Rash24 細胞を用いた。培養には、スポンティニアスのフォーカス形成が少ない MEM 5%FCS、プロモーターを処理する試験では DME 2%FCS の培地を用いた。サブクローニングには、100 mm ディッシュに 50 細胞播種するコロニー形成法を用いた。コロニーはクローニングシリンダーを用いてピックアップし、以降の培養は親株と同じ条件を用いた。

プロモーターの処理条件は、親株と同様に 6well プレートに 4×10^4 細胞播種し、3日後から 14~17 日間処理を行った。処理終了後、メタノール固定、ギムザ染色を行った。

(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。

C. 研究結果および考察

a) 細胞株の収集

1. ダウン症モデル染色体を保持するマウス ES 細胞株
 押村光雄教授 (鳥取大学医学部) より、染色体導入法により作製されたダウン症モデル染色体を保持する細胞株の提供を受けた。

本細胞株は、薬剤耐性遺伝子を導入したヒト 21 番染色体を保持する CHO 細胞より微小核を作製し、マウス ES 細胞に導入して得られたものであり、現在、本細胞を用いてダウン症のモデルとなるキメ

ラマウスの作製が行われている。

ヒト染色体は、あらかじめニフトリ DT40 細胞中で Down syndrome critical region (DCR) のテロメア側の遺伝子をテロメアトランケートにより削除し、また、DCR のセントロメア側へ loxP 配列を挿入しており、一度 CHO 細胞に染色体導入後、さらにマウス ES 細胞に染色体導入して、Cre-loxP システムを用いて ES 細胞のマウス 10 番染色体末端部に挿入しておいた loxP 配列との間で転座させたものである。

本細胞株に保持されているヒト染色体断片は、ダウン症で共通して重複される部位のみをマウス染色体と転座させたものであるため、キメラマウス作製後、安定して子孫に伝播されることが期待され、個体レベルでの病態と分子生物学的なレベルでのダウン症の原因解明に役立つものと考えられる。

2. ヒト口腔組織由来の不死化細胞株

筒井健機教授 (日本歯科大学) より、ヒト口腔組織に由来する 3 株の不死化細胞株の提供を受けた。

NDUSD-1 細胞は、ヒト成人歯肉上皮に由来する上皮細胞に Origin(-) SV40 遺伝子を発現するベクターと、ヒト c-fos 遺伝子を過剰発現するベクターを導入し、不死化したものである。遺伝子導入後、200 代以上の継代が可能であったことから、不死化しているものと判断される。ケラチノサイトの特徴であるケラチン産生が認められることと、 1×10^7 細胞のヌードマウスへの移植でも腫瘍を形成しないことから、がんの初期変化である不死化能を持つ、口腔組織の上皮性がん細胞のモデルとして利用できると思われる。

Pelt 細胞および Ayt 細胞は、それぞれ、ヒト成人歯根膜およびヒト成人歯肉結合組織に由来する繊維芽細胞 (Ay および Pel) に、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) を導入して不死化したものである。いずれの細胞株も、p16INK4a の発現低下と pRb の過リン酸化が認められ、導入した hTERT によるテロメア伸長に加えて、ALT パスウェイ (alternative lengthening of telomerase pathway) の活性化が生じていることが示されている。

ヒト口腔内組織由来細胞については、これまで株化された細胞が殆どないことから、歯科領域で

の歯科用薬剤や医療用具の安全性試験の研究材料として有用である。また、口腔組織は飲食物の摂取や喫煙、医薬品や医療用放射性同位元素の適用や放射線治療など、様々ながん誘発因子に日常的に暴露されていることから、ヒト口腔由来の株化細胞は種々のがん誘発因子のリスク評価や、口腔がんの発生メカニズムの *in vitro* における実験に用いることができることから、極めて有用な細胞株と考えられる。

3. 骨形成に関わる Cbfa1 遺伝子過剰発現マウス及びヘテロ欠損マウスに由来する細胞株

小守壽文教授 (大阪大学) より、骨形成に関わる遺伝子である Cbfa1 (core binding factor $\alpha 1$, Runx2) を改変したトランスジェニックマウスの分譲を受けた。Cbfa1 は、骨芽細胞の分化と骨形成に関わる転写因子であり、pro- $\alpha 1(I)$ コラーゲンプロモーター下流に Cnfa1 cDNA を挿入したトランスジェニックマウスでは骨組織に特異的に発現し、骨芽細胞への分化を阻害するよって骨形成異常を誘発する。また、ES 細胞中で Cbfa1 遺伝子のエクソン 1 配列をターゲットングして作製されたノックアウトマウスは、ホモでは完全に骨化が欠如して出生直後に致死、ヘテロではヒトの遺伝性疾患である鎖骨頭頸蓋骨異形成症と同等の病態を示す。

これらの遺伝子改変マウスに由来する間胚葉系幹細胞は、骨形成のメカニズムと、関連するヒト遺伝性疾患の解明に有用であると考えられる。

b) c-Ha-ras 変異モデル培養細胞の作製

昨年度に rash2 マウス線維芽細胞より作製した Rash24 細胞は、既知のプロモーターを処理することにより、効率よくフォーカスを形成することから、長い試験期間とリソースを要する従来の *in vitro* 形質転換試験の代替実験系に有用であることが示された。

しかしながら、フォーカス形状が不定形で、過度にフォーカスが形成された場合に全体が網目状になるなど、定量的な結果の評価が難しい欠点があった。

そこで、Rash24 細胞および、同じ個体に由来する別クローンであり、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) に対して比較的均一

な増殖昂進を示したRash23細胞をサブクロニングし、細胞密度の増加を指標としたプロモーター検出系の開発を試みた。

サブクロニングはコロニー形成法で行い、Rash23細胞については4クローン(Rash 231~234)、Rash24細胞については6クローン(Rash241~246)を得た。これらのクローンについて、Rash24で用いたのと同様の方法でTPA(6.25~100 μ g/ml)を処理して反応性を調べた。その結果、増殖昂進を示したのは、Rash232とRash234の2クローンのみであり、他のクローンは、全てTPAに反応しなかった(図1)。このことから、親株のRash23および24は、均質な細胞集団がプロモーターに反応して、一定の頻度でフォーカス形成や増殖昂進を示すのではなく、プロモーター反応性細胞と非反応性細胞が混在し、ras遺伝子過剰発現に加えて、それぞれクローニング後のイベントによってプロモーター反応性を獲得したものと考えられた。

得られたサブクローンのうち、Rash232は比較的一様な増殖昂進、Rash234は小型のフォーカスを形成を示したことから、より定量的な指標が得られると考えられるRash232について、代表的なプロ

モーターであるインシュリンおよびオカダ酸に対する反応性を調べた(図2)。その結果、インシュリンは均一な増殖昂進を示したのに対し、オカダ酸はフォーカスを形成した。オカダ酸は、従来のin vitro形質転換試験でも細胞毒性を示す濃度範囲でフォーカスを形成することが知られており、今回、オカダ酸で処理したRash242細胞の非フォーカス部位の顕微鏡観察でも、毒性兆候が認められたことから、細胞毒性作用のばらつきにより、フォーカス状の増殖昂進を示した可能性も考えられる。この点については、オカダ酸と同様に細胞毒性を伴う濃度でフォーカスを形成するpp'-DDTなどを用いて検証を行う。

また、Rash232細胞について、TPAを用いて培地や血清の最適条件の設定を試み、無血清のASF培地(味の素)を用いることにより、プロモーター非添加条件ではほとんど細胞が増殖しないのに対し、TPA添加によって大幅な増殖昂進を示すことが明らかになったので(図3)、この培養条件を用いて、昨年度にRash24細胞で行った各種プロモーターのスクリーニングと同様の試験を行い、有用性の検証を進めることとした。

図1. Rash細胞株サブクローンのTPA反応性(代表例)

Rash23およびRash24より単離したサブクローンのTPA反応性について、代表例を示した。TPAの濃度は、左から0、6.25、12.5、25、50、100 ng/mL。Rash23は親株、Rash231は反応しなかったサブクローンの例である。

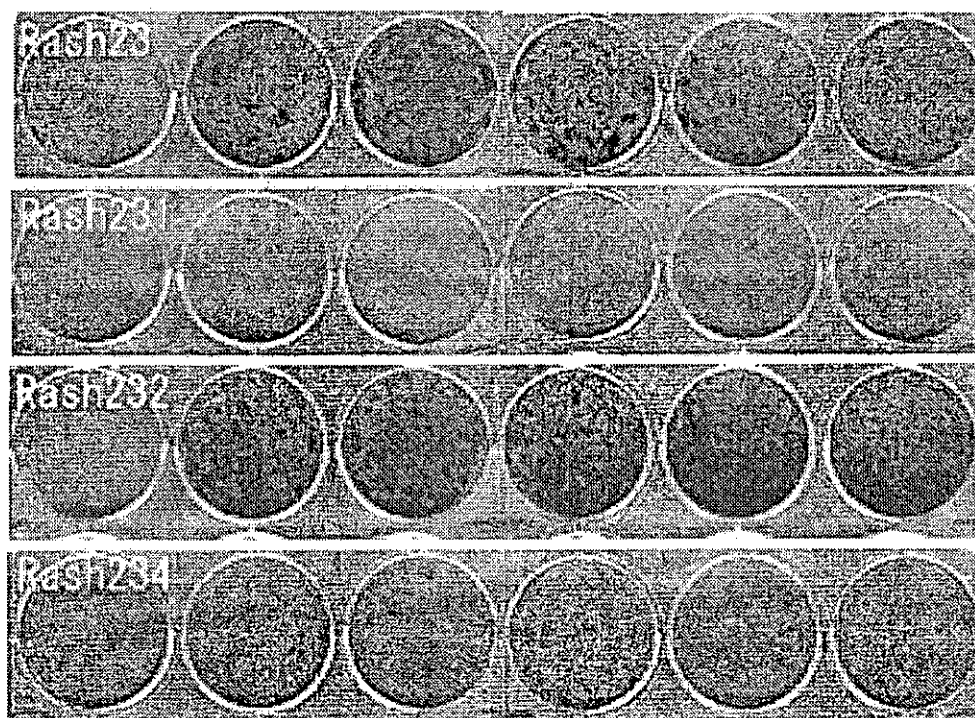


図2. Rash232 細胞のインシュリン及びオカダ酸に対する反応性

上段はインシュリン、下段はオカダ酸である。インシュリン処理により、用量依存的な増殖昂進が認められる。オカダ酸の10ng/mL処理群では、フォーカスを形成するとともにバックグラウンドの染色度が薄くなっており、細胞毒性が生じていることがわかる。

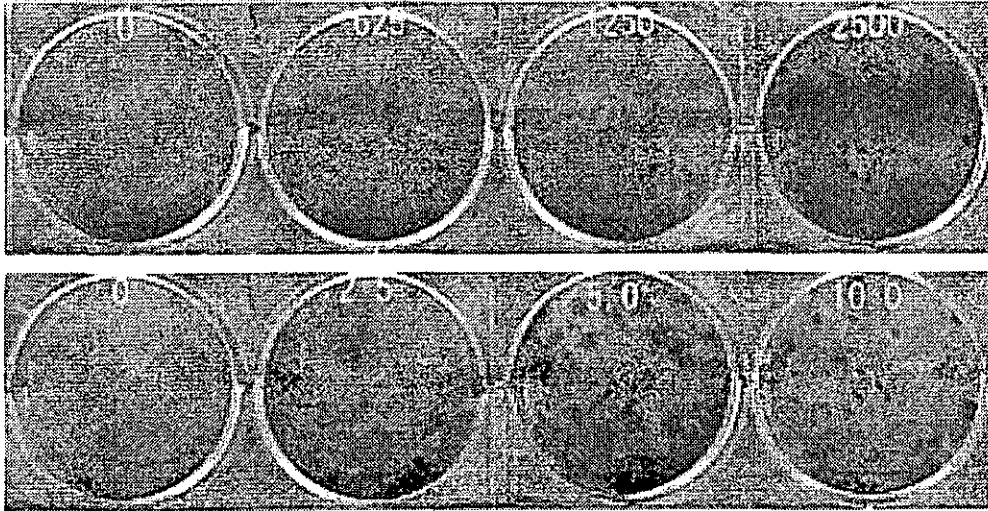


図3. ASF 培地中での Rash232 細胞の TPA 反応性

a, b, cはDME 2%FCS、d, e, fはASF培地を使用し、溶媒対照 (a, b)、TPA 5 ng/mL (b, e)、TPA 50 ng/mL (c, f)を処理した。Rash232 細胞は、DME 2%FCS 中では良好な増殖を示すが (a)、ASF培地中ではほとんど増殖しない (b)。代表的なプロモータを加えた場合には、いずれの培地でも増殖昂進が誘発され、細胞密度が非常に高くなる (b, c及びe, f)。

