

图 3

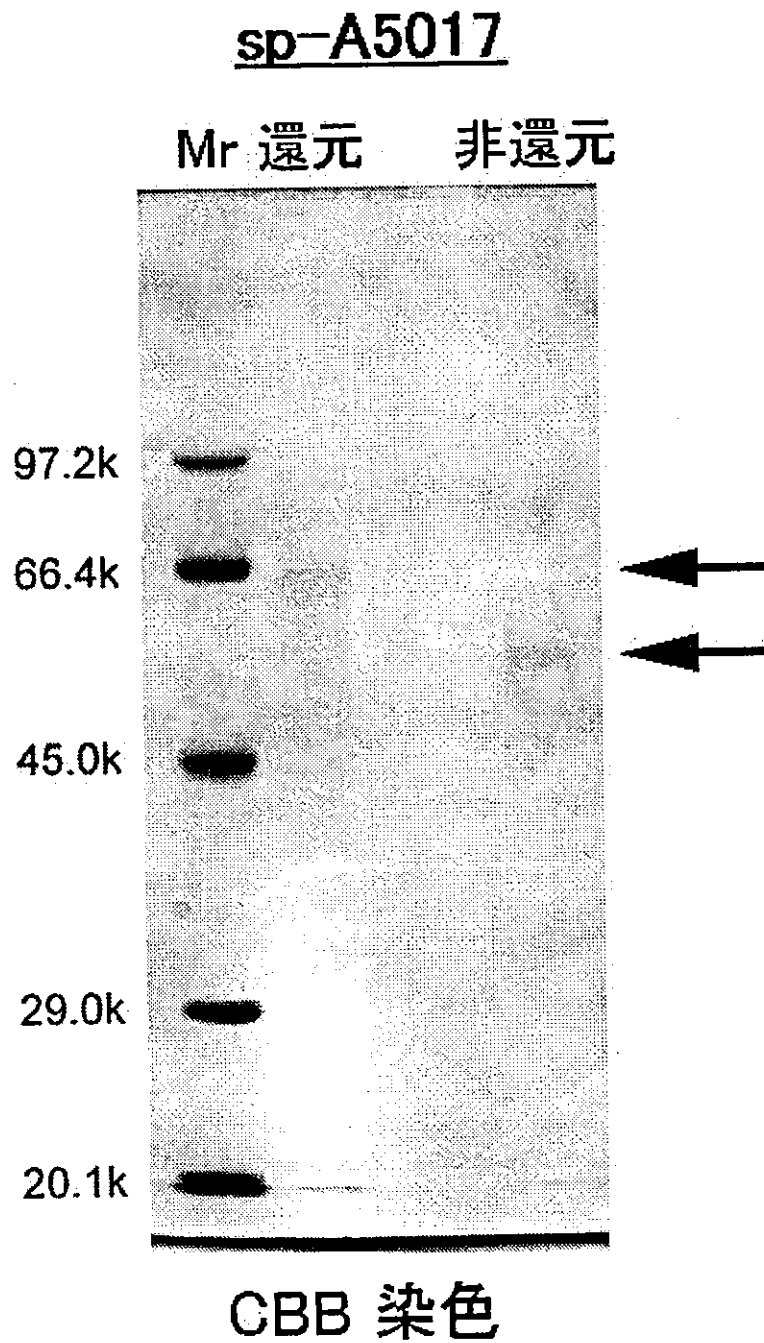


图 4

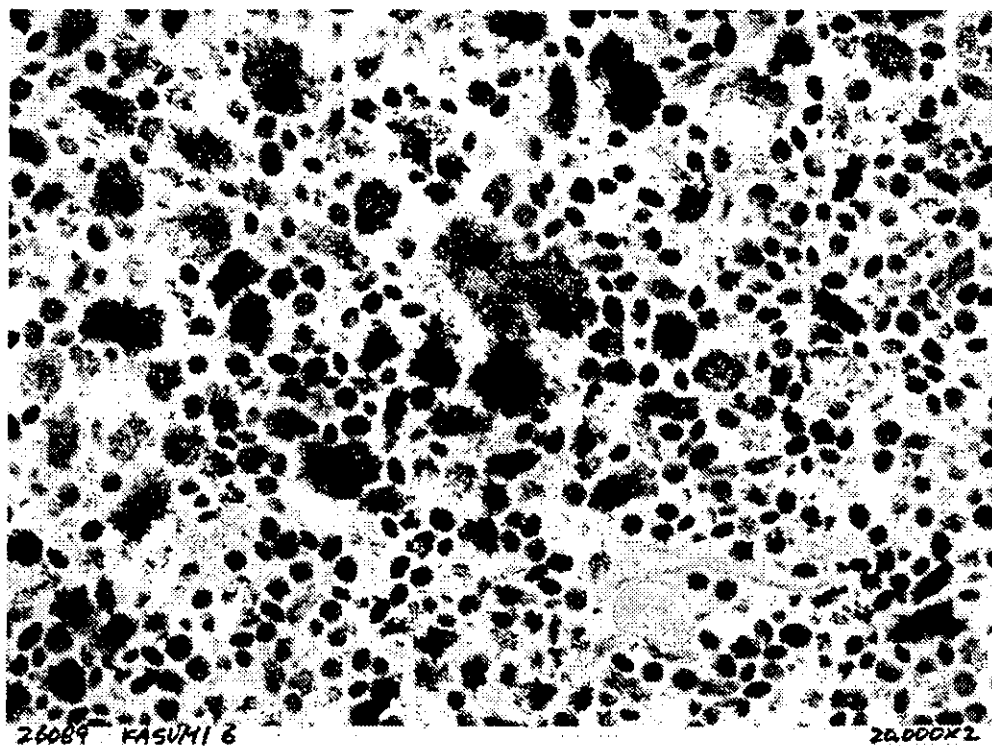


图 5

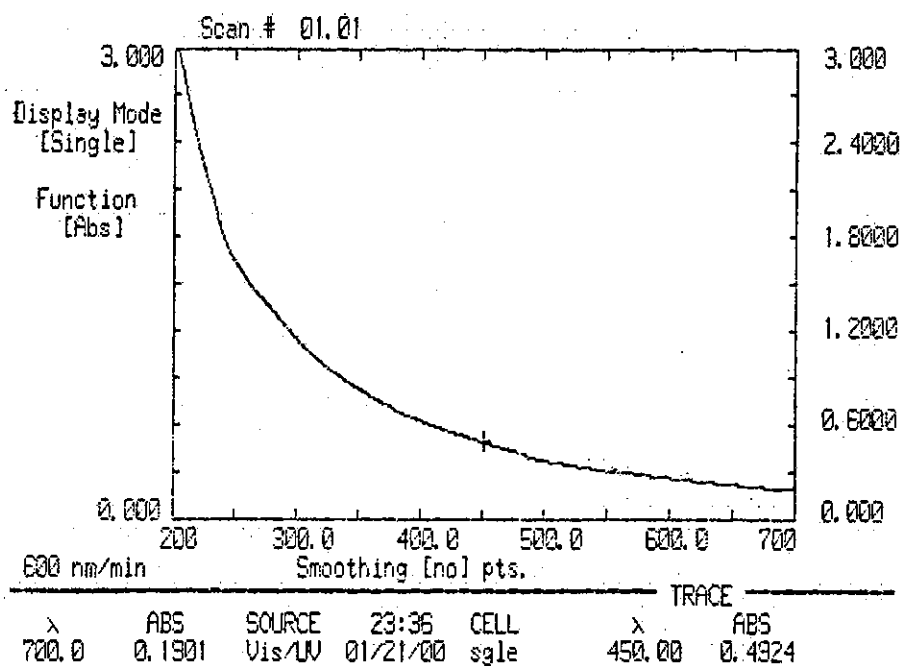
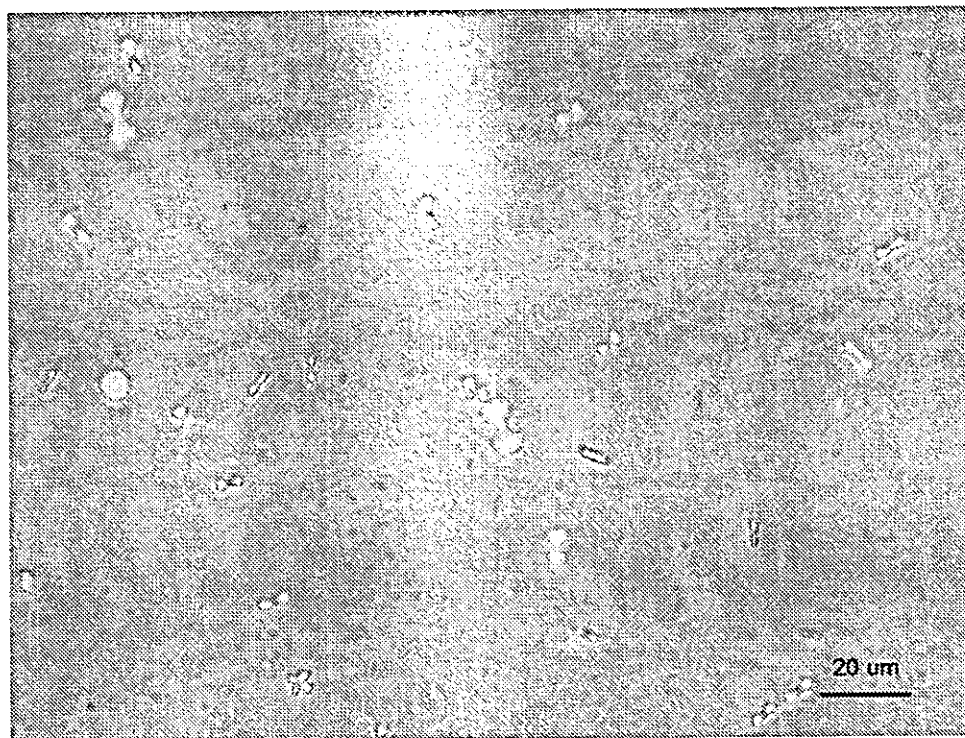


图 6



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色素性乾皮症及びコケイン症候群患者由来細胞に hTERT 遺伝子を導入し、不死化細胞を得ることに成功した。また、常染色体優性の遺伝様式を示す高発癌性遺伝病である網膜芽細胞腫患者由来細胞の不死化も行った。これらの細胞株では、初代培養細胞と同様の性質を示し、しかも染色体数の変動が非常に少ないため、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。今年度はこれまでに hTERT 遺伝子導入による不死化を試みたものの、不死化細胞が得られなかった細胞について再度不死化を試みた。その結果、色素性乾皮症、コケイン症候群、及び網膜芽細胞腫細胞について hTERT 不死化細胞株の樹立に成功した。

B. 研究方法

hTERT 遺伝子を持つレトロウイルスベクターを、各種疾患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、紫外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、紫外線に対して高感受性を示す色素性乾皮症 (XP) 及びコケイン症候群 (CS) 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。

XP350S (JCRB0304) 細胞は、XP 患者由来初代線維芽細胞株であるが、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。このため、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、XP350S 細胞に hTERT 遺伝子を導入した後、長期培養を行い、ほぼ不死化したと考えられる細胞を得て、これを XP350S TERT と名付けた。他に、XP2Y0 細胞は XP の相補性群 F 群に属する患者由来細胞であり、JCRB にはこの細胞に SV40 を感染させて不死化した細胞株 XP2Y0 (SV) を既に登録している (JCRB0302)。

また、コケイン症候群患者由来 CS20S (JCRB309) 細胞も紫外線に高い感受性を示す。hTERT 遺伝子を導入したところ、PDL が 50 にまで到達した細胞が得られ、CS20S TERT と名付けた。

これらの細胞について紫外線照射後の生存率

を検討したところ、初代細胞株と同様非常に高い感受性を示した。従って、XP 細胞や CS 細胞が示す紫外線高感受性という性質は保持していることが確認された。染色体数について検討したところ、いずれの細胞株においても大部分の細胞で、ほぼ 46 本の染色体が保持されていた。

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存在す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。このような疾患の 1 例として網膜芽細胞腫患者由来細胞の不死化を行なった。既に JCRB バンクに登録している初代線維芽細胞 RB24KY (JCRB0312) 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 RB24KY TERT を得た。RB24KY TERT 細胞の染色体数はほぼ 46 であった。

今回樹立した細胞株はいずれも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 DNA 修復研究や細胞周期研究に極めて重要な材料であり、ひいては癌研究等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。

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、或いは細胞周期制御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。

今回不死化した細胞はいずれも高発がん性遺伝病として非常に著名な疾患由来の細胞であり、ヒト発がんの重要なモデルとされている疾患であり、多くの研究者が高い関心を示している。しかしながら、これらの細胞は、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、それぞれの疾患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 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出来る。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。

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。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。今後さらに、研究に有用な細胞株の樹立と不死化を行なうよう努めていきたい。

E. 結論

ヒト高発癌性遺伝病である色素性乾皮症、コケイン症候群、網膜芽細胞腫患者由来初代線維芽細胞に hTERT 遺伝子を導入して、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紫外線高感受性などの元の初代培養細胞の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。今回樹立された不死化細胞株は、ヒトゲノム研究に貴重な材料であり、その進展に大きく寄与するものと考えられる。さらに、DNA の複製や修復の研究及び細胞周期研究、ひいては癌研究にも大きな貢献をすることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishizaki, K., Hayashi, Y., Nakamura, H., Yasui, Y., Komatsu, K., and Tachibana, A. (2004) No induction of p53

phosphorylation and few focus formation of phosphorylated H2AX suggest efficient repair of DNA damage during chronic low-dose-rate irradiation in human cells. *Journal of Radiation Research*, 45 (4), 521-525.

2. Tachibana, A. (2004) Genetic and physiological regulation of non-homologous end-joining in mammalian cells. *Advances in Biophysics*, Vol. 38, pp. 21-44.
3. Iida, A., Tachibana, A., Hamada, S., Hori, H., and Koga, A. (2004) Low transposition frequency of the medaka fish Tol2 element may be due to extranuclear localization of its transposase. *Genes and Genetic Systems*, 79(2), 119-124.
4. Sasaki, M. S., Takata, M., Sonoda, E., Tachibana, A., and Takeda, S. (2004) Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA interstrand crosslinks. *Cytogenetic and Genome Research*, 104, 28 - 34.
5. 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 (3) 2030 - 2037

2. 学会発表

1. 立花 章、中村久美、佐々木正夫：マウスHprt 遺伝子座での放射線誘発突然変異体に見られる遺伝子発現抑制の例。ワークショップ「DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2005」、2005年1月、京都市。
2. 立花 章、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突然変異体の遺伝子解析。第47回日本放射線影響学会大会、2004年11月、長崎市。

3. 中村英亮、林 裕子、安井善宏、立花 章、小松賢志、石崎寛治：低線量率放射線のAT細胞株への影響研究。第47回日本放射線影響学会大会、2004年11月、長崎市。
4. 高取和弘、張 秋梅、張 博文、立花 章、高尾 雅、小林久美子、安井 明、米井脩治：ヒト培養細胞でのhOGG1過剰発現による γ 線感受性の変動。第47回日本放射線影響学会大会、2004年11月、長崎市。
5. 張 博文、張 秋梅、高取和弘、立花 章、米井脩治：大腸菌における過剰の塩基除去修復による低LET放射線感受性の増大。第47回日本放射線影響学会大会、2004年11月、長崎市。
6. 松本英樹、林 幸子、畑下昌範、大西武雄、立花 章：放射線誘発適応応答へのNOラジカルを介したバイスタンダー効果の寄与。第47回日本放射線影響学会大会、2004年11月、長崎市。
7. 石崎寛治、中村英亮、林 裕子、安井善宏、立花 章：hTERT遺伝子導入ヒト細胞に対する低線量率放射線の影響。第47回日本放射線影響学会大会、2004年11月、長崎市。
8. 石崎寛治、中村英亮、林 裕子、安井善宏、立花 章：ヒト細胞における低線量率放射によるDNA損傷と修復。第63回日本癌学会総会、2004年9月、福岡市。
9. 中村英亮、林 裕子、立花 章、石崎寛治：低線量率放射線のAT細胞に対する遺伝的影響。第63回日本癌学会総会、2004年9月、福岡市。
10. A. Tachibana, Y. Ohtani, K. Nakamura and M. S. Sasaki : Rejoining of double-strand breaks and spectrum of mutations induced by ionizing radiation in cells of radioadaptive response. Gordon Research Conference: Mutagenesis, September 12-17, 2004, Oxford, UK

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究課題名：生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の収集・保存・供給システムの整備に関する研究（H16-ゲム-002）

分担研究項目：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：本年度は幼児、青年由来皮膚線維芽細胞の 3 セルライン、胎児肺線維芽細胞の 1 セルラインを樹立し、新規登録した。また、供給用細胞 2 セルライン合計 64 アンプルを作成し H S 財団細胞バンクに、バックアップ用凍結アンプル 2 セルライン 6 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。さらに、3 研究グループに対して合計 7 セルラインを直接送付した。

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により初代培養細胞を樹立した。
- 2) 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、H S 財団細胞バンクに送付した。
- 3) 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。
- 4) 登録済細胞の供給：H S 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。

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

＜幼児および青年皮膚線維芽細胞＞

幼児および青年の皮膚片から這い出し法により細胞を採取し、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を確認した。初代細胞がコンフルエントに到達するまでの分裂回数を補正していないが、その後の PD は記録されている。また、細胞の分裂寿命は未測定である。今回樹立した皮膚線維芽細胞（TIG-115、TIG-116、TIG-117 細胞）の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-115（ヒト皮膚線維芽細胞）

由来動物、組織： ヒト、皮膚
性： M
年齢： 1.5 歳

性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： 未検査
染色体： 未検査
マイコプラズマ： マイナス
細菌： マイナス

由来動物、組織： ヒト、 肺
性： F
年齢： 胎児
性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： 未検査
染色体： 2n=46 XX 型
マイコプラズマ： マイナス
細菌： マイナス

(ii) TIG-116 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織： ヒト、 皮膚
性： F
年齢： 1.5 歳
性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： 未検査
染色体： 未検査
マイコプラズマ： マイナス
細菌： マイナス

2) 供給細胞の凍結アンプル作製

平成 15 年度に樹立・性格づけをして新規登録した胎児皮膚線維芽細胞の TIG-3S と成人皮膚線維芽細胞の TIG-110 細胞 (33Y, F) の供給のための凍結アンプルを作製し、H S 財団に送付した。

(iii) TIG-117 (ヒト皮膚線維芽細胞)

由来動物、組織： ヒト、 皮膚
性： F
年齢： 16 歳
性状： 線維芽細胞様
分裂寿命： 未検査
染色体： 未検査
マイコプラズマ： マイナス
細菌： マイナス

TIG-3S 細胞 (JCRB0544)、Lot. No. R331、30 アンプル

TIG-110 細胞 (JCRB0543)、Lot. No. R101、34 アンプル

3) バックアップ用凍結アンプルの作成

平成 15 年度に新規樹立した下記の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。

<胎児肺線維芽細胞>

胎児肺組織からトリプシン法で細胞を採取した。細胞数を測定して培養し、初代培養を樹立した。マイコプラズマ・細菌の混入のないことを確認しているが、分裂寿命は未測定である。この細胞は若い PD で凍結保存されている。G バンド法検査により、正常 2 倍体細胞であることを確認している。

TIG-3S 細胞 (JCRB0544)、Lot. No. R331、3 アンプル

TIG-110 細胞 (JCRB0543)、Lot. No. R101、3 アンプル

なお、これらの細胞の樹立は 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。

4) 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

依頼のあった 3 研究グループに対して以下の細胞を直接送付した。

(i) TIG-5 (ヒト胎児肺線維芽細胞)

(1) TIG-1-40 (JCRB0503)、TIG-1-60

(JCRB0505) 細胞の各 1 アンプル

(2) TIG-1-40 (JCRB0503), TIG-1-60
(JCRB0505) 細胞の各 1 アンプル

(3) TIG-101 (JCRB0526), TIG-105
(JCRB0530), TIG-106
(JCRB0531) 細胞の各 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(インビトロ細胞老化)。がん研究等において対照群として利用される正常細胞ではあるが、がん細胞に無いこのような性質のため、扱い難いと感じている研究者は少なくないと思われる。実際、正常細胞の樹立、維持を行う作業には通常とは異なる特別の注意と配慮が必要であることは確かである。細胞バンクの重要な役割の一つは、こうした不便を解消し研究者が気軽に扱える正常細胞を提供することにある。本分担研究では、細胞の供与者年齢を広くカバーするとともに分裂寿命と分裂回数を明示するなど、研究者の研究目的に応じた細胞の提供を心掛けているつもりである。また、マイコプラズマ・細菌の混入のチェックは勿論、凍結アンプル解凍後の生存率が高いなど、細かな配慮がなされている。今後、線維芽細胞以外の細胞種を増やすなどの重要課題が山積しているが、地道に取り揃えていくほかに妙案は無いであろう。

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、更に充実さ

せる必要がある。平成 16 年度は幼児、青年由来皮膚線維芽細胞の 3 セルラインを樹立し、新規登録した。また、胎児肺線維芽細胞の 1 セルラインを樹立して、新規登録した。

他方、供給用細胞を今年度は 2 セルライン合計 64 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 2 セルライン 6 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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 木村成道、島田信子: NDP キナーゼ、GTP/GDP、AlF₄⁻ 生物薬科学実験講座(石橋、市川編)、「情報伝達物質—GTP 結合タンパク質と膜酵素活性」(石橋、市川編)、廣川書店、印刷中

2) Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N., and Maruyama, N.: Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, In press.

2. 学会発表

1) 秋山翹一、島田信子、木村成道、大森彬、戸田年総: プロテオーム解析法によるリン酸化タンパク質の同定 第 55 回日本電気泳動学会総会、2004 年 11 月 12-13 日、東京

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

研究要旨

ヒト正常上皮細胞由来の不死化細胞株の樹立と細胞特性の解析同定に関する研究を実施した。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。本年度においては昨年度までに分離済の各種ヒト正常組織（皮膚、食道、膵臓、肺、胎児性付属器）由来の不死化細胞系の内すでに登録済みの細胞株の品質管理の過程でヒト正常細胞由来の不死化細胞株は多くのがん細胞由来細胞株と区別して使用すべき注意点や特異な細胞特性のあることが明らかになってきた。

A. 研究目的

本分担研究で分離してきた不死化細胞株はその殆どがヒト正常組織由来の上皮系細胞である。ヒトがんの発生起源細胞と細胞のがん化機構の解析を目的とした研究ではヒト正常上皮細胞の不死化プロセスは重要な研究対象となる。またヒトがんの大半が上皮系細胞であることもその不死化細胞株の分離の動機付けになる。しかしながら、これらの不死化細胞株の有用性についてはその使用方法も含めて未知なところが多い。本年度は現在までに分離できている不死化細胞株の細胞特性の分析結果などから、研究資源としてのヒト上皮不死化細胞株の位置付けを計る。

材料と方法

1. 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、または肺気道をディスプレイ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。

2. 臍帯上皮及び羊膜上皮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。

B. 研究結果

寄託登録済の不死化細胞株の細胞特性と

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が明らかになった。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る。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案され、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

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4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。

3. 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。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な問題の解消。

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。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。

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係する問題点は多い。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、必要に応じて作製し供給に対応することも可能である。

④ 細胞株の品質管理と細胞生物学

寄託済みの細胞株の品質管理検査が思わぬ基礎細胞生物学上の興味ある問題提起をする例がある。当分担者が寄託済みの一連のヒト子宮頸部正常上皮細胞の不死化細胞株のクロスコンタミネーションが指摘された。ファイibroプラストの混入が認められたのであるが、新規樹立細胞株の起源、特性、バンキング、配布、など細胞バンクのみならず、樹立者にとっても改めて考えるべき問題点を突き付けられることがある。以下に本報告書作成直前に発生した其の顛末の一部を記す。

JCRB HP で公開済の以下の 4 細胞株に起こったできごとである。

JCRB1093 PSVK1

JCRB1090 NCE16IIA

JCRB1091 NCE SVIIA3

JCRB1092 NCE SVIA6

これらは全てヒト子宮頸部正常上皮細胞由来の不死化細胞であるが、以下細胞バンク検査担当者からの報告

1) PSVK1 (JCRB1093)

培養細胞中に繊維芽細胞用の細胞が見られるため、透析血清を 0.5% 添加して培養した場合を検討した。MCDB153 完全無血清の培養では繊維芽細胞は顕著な増殖を示さないが、透析血清を添加すると明らかに繊維芽細胞が増殖した。

また通常の FCS を添加した培養で細胞の形態は変化しなかった。

2) NCE16 IIA (JCRB1090)

培養条件中の EGF 濃度が 10ng/ml では細胞の形態に変化を起こす。

培養条件の組成で培養をはじめたところ異形の細胞が多数見られました。

このような細胞の変化は EGF 濃度依存的で正常ヒト表皮角化細胞においては割合よく見られる現象なので、EGF 濃度を 1/10 (1ng/ml) にしたところ

明らかに異形の細胞の出現率が低下した。

3) NCE16 SVIIA3 (JCRB1091)

PSVK1 と同じく繊維芽細胞の形態変化がある。

4) NCE16 SVIA6 (JCRB1092)

PSVK1 と同じく繊維芽細胞の形態変化がある。

細胞バンク検査担当者の対応

- 1) 線維芽細胞の混入があるらしいこと
- 2) その線維芽細胞の実体は確定していないこと
- 3) 血清を 0.5% 程度添加しただけで線維芽細胞が増殖してくること
- 4) 現在寄託者と対処について相談中であり、まだ対処法については決定していないこと

を知らせた上で利用者が了解された場合にのみ分譲する予定

以上のことから通常考えられる対応策として

①細胞の純化 (再クローニング)

②混入細胞の特定

③分譲の取り消し

であるが、まず、細胞バンク側の②の分析結果は以下ようになった。

ケラチン染色(広範なサイトケラチンを認識するポリクロ)の結果は、線維芽細胞様細胞もケラチンを発現しているものが多い。しかしケラチンの発現はかなりヘテロであり、上皮・線維芽細胞様の細胞に関わらず、強弱、あるいは蛍光顕微鏡レベルで確認できない細胞もある。

STR-PCR 分析の結果

JCRB1093 PSVK1 について

MCDB153 with supplement (角化細胞) と MCDB153 with supplement, 透析血清 10% (繊維芽様細胞) で同じパターンを示した。

また JCRB1092 NCE16 SVIA6 を Trypsin 処理の時間を変えたものを DMEM10%FCS (先に剥がれてきたもの、繊維芽様細胞を期待した) や MCDB153 with supplement 又は MCDB153 with supplement&10%FCS (後から剥がれたものも全て同じパターンになった。

以上のいくつかの検査結果はファイibroプラストの混入ではないことを示唆しているが、これで完全にファイibroプラストの混入が否定されたわけではない。理由は、細胞の調製法にある。その手順は通常次の二通りある。①子宮頸部より上皮層だけ分離して培養したものから樹立する場合と、②真皮層も含んだ組織片のエクスプラント培養から回収した上皮細胞から樹立する場合であるが、目的によってその両方を使い分ける。

後者のものがファイibroプラスト含んでいる場合があることは初代培養から培養

初期に観察されることがある。しかし、無血清 MCDB153 培地 (実際は透析血清 0.5%含む) 中では通常ファイibroプラストの増殖は優位にならないので、結果的に上皮細胞が選択的に増殖優位になり 40-50 PDL (M1) を限度としてクライシスを迎える。SV40-LT や HPV16 (E6,E7) が導入されている場合はいわゆる M1 期を超え M2 期から通常テロメレーズの活性化を伴いファイibroプラストより優位に不死化系になるはずである。むしろ今回のファイibroプラスト混入疑惑はその後の分析から細胞生物学上の興味ある現象 (EMT) と結びついている可能性を強く示唆するものであった。

結論

これらの細胞特性の解析から分離された多くの不死化細胞株は、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細胞生物学的研究資源としての価値も低くない。

以下、昨年度から引き続き、新規樹立された寄託予定細胞株であるが、順次細胞の特性解析を進めている。

Human pancreatic ductal epithelial cell lines

PTTIIa Sv40T + hTERT

PTTIIIa Sv40T + hTERT

Human amniotic epithelial cell lines

HAT Sv40T

HATT Sv40T + hTERT

Human umbilical cord epithelial cell lines

HABT Sv40

HABTT Sv40 + hTERT

Bovine oviduct epithelial cell lines

BOT Sv40T

BOTT Sv40T + hTERT

4. 研究発表

(上記寄託予定細胞株に関連する昨年度の発表も含めた)

1. 論文発表

1. Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M, Yasumoto S.

Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase.

J. Oral Pathol. Med. 33:417-423. 2004.

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

Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto S

2. The neurotrophin receptor p75NTR characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro

Oncogene 22: 4017-4026, 2003

5. 学会発表

1. Shigeru Yasumoto. Stem cell lineage of human regenerative epithelia such as skin, esophagus and uterine cervix. 2004 Congress on in vitro Biology (San Francisco, USA), 2004 May

2. 腭管上皮不死化細胞株の樹立と腭発癌過程の研究。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

3. ヒト正常上皮細胞のテロメラーゼ活性と不死化。安本茂、竹内誠亮、越後谷朋子。第62回日本癌学会 2003

4. 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

5. ヒト腭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

6. 牛卵管上皮細胞における不死化細胞株の樹立。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

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 憲徳 (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

ヒト正常細胞は、細胞老化のモデルとして広く用いられている。ヒト細胞はげっ歯類の細胞と異なり、継代培養によって自然不死化や形質転換を生じにくく、正常な老化モデルとして適しているが、主要なヒト正常細胞株には樹立された年代が古いものが多く、すでに継代によって老化が進行している物も少なくない。そこで、細胞老化研究の材料として適した材料として、老化研究でよく用いられているヒト正常線維芽細胞株について継代数が少ないロットを収集した。また、個体の老化を細胞レベルで調べることを目的として、同一の供与者より 11 年間隔で継時的に採取された一連の線維芽細胞株の分与を受けた。

A. 研究目的

細胞バンクへの細胞株登録を目的とし、細胞老化モデルとして広く用いられているヒト正常線維芽細胞株について、継代数の少ないロットを中心に加治和彦教授(静岡県立大学)より、提供を受け、培養・品質管理作業を開始した。また、同一の供与者より 11 年間隔で樹立された3株のヒト正常線維芽細胞株についても、寄託を受けた。これらの細胞株は、細胞レベルや遺伝子レベルでの老化研究に有用であり、また個体レベルの老化が反映された細胞株として特に有用と考えられる。

B. 研究方法

1) TIG-1

日本人5ヶ月令胎児(♀)肺由来の線維芽

細胞株であり、加治和彦教授(静岡県立大学)らによって東京都老人総合研究所で樹立された。分裂寿命は 67 ± 5 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは、分裂回数が少ない5-10PDL のものと20-30PDL のものの2ロットである。

2) TIG-3

日本人10週令胎児(♂)肺由来の線維芽細胞株であり、加治和彦教授(静岡県立大学)らによって東京都老人総合研究所で樹立された(Ploidy of human embryonic fibroblasts during in vitro aging, Matsuno, M. et. al., J. of Gerontology, vol. 37, no. 1, 33-37, 1982)。分裂寿命は84回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは、分裂回数が少ない5-10PDL のものと20-30PDL のものの2ロッ

トである。

3) TIG-7

日本人 11 週令胎児(♂)肺由来の線維芽細胞株であり、加治和彦教授(静岡県立大学)らによって東京都老人総合研究所で樹立された(A new human male diploid cell strain, TIG-7: Its age-related changes and comparison with a matched female TIG-1 cell strain, Yamamoto, K. et. al., Experimental Gerontology, vol. 26, 525-540, 1991)。分裂寿命は 73 ± 7 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは、分裂回数が少ない 5-10PDL のものと 20-30PDL のものの2ロットである。

4) MRC-5

本細胞株は、細胞老化研究のみならず、代表的なヒト正常繊維芽細胞として広く用いられている。コーカシアン 14 週令胎児(♂)肺由来であり、Jacobsらによって Natioanl Institute for Medical Research (UK) で樹立された(Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5, Jacobs, J. et. al., Natuer, vol. 227, 168-170, 1970)。分裂寿命は 63 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは 15-20PDL のものである。本品は、ウイスター研究所の Hayflick より加治和彦教授(静岡県立大学)に分与されたロットに由来するものである。

5) WI-38

本細胞株は、細胞老化研究のみならず、代表的なヒト正常繊維芽細胞として広く用いられている。コーカシアン 3ヶ月令胎児(♀)肺由来であり、Hayflickらによってウイスター研究所で樹立された(The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, Hayflick, L., Exp. Cell Res., vol. 37, 614-636, 1965)。分裂寿命は 55 ± 10 回であることが確認されており、今

回分与を受けたロットは 15-20PDL のものである。本品は、Hayflick より加治和彦教授(静岡県立大学)に分与されたロットに由来するものである。

6) IMR-90

本細胞株は、細胞老化研究のみならず、代表的なヒト正常繊維芽細胞として広く用いられているコーカシアン 16 週令胎児(♀)肺由来であり、Nicholsらによって樹立された(Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90, Science, vol. 186, 60-63, 1977)。分裂寿命は 58-71 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは 20-30PDL のものである。本品は、ウイスター研究所の Cristofalo より加治和彦教授(静岡県立大学)に分与されたロットに由来するものである。

7) ASF-4-1

本細胞株は、個体の老化が反映されたヒト正常細胞株を作製することを目的として、同一供与者より 11 年間隔で樹立された一連の線維芽細胞株のうち、36.2 才時に作製されたものである(同一組織供与者から 11 年隔てて得られたヒト皮膚由来線維芽細胞の増殖および老化の比較, 加治和彦、神田尚俊, 基礎老化研究, 132-133, vol 16, no. 2, 1992)。日本人(♂)上腕内側部皮膚由来であり、加治和彦教授(静岡県立大学)によって樹立された。分裂寿命は 66.5 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは 15-20PDL のものである。

8) ASF-4-2

本細胞株は、個体の老化が反映されたヒト正常細胞株を作製することを目的として、同一供与者より 11 年間隔で樹立された一連の線維芽細胞株のうち、47.5 才時に作製されたも

のである(同一組織供与者から 11 年隔てて得られたヒト皮膚由来線維芽細胞の増殖および老化の比較, 加治和彦、神田尚俊, 基礎老化研究, 132-133, vol 16, no. 2, 1992)。日本人(♂)上腕内側部皮膚由来であり、加治和彦教授(静岡県立大学)によって樹立された。分裂寿命は 62.1 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは 5-10PDL のものである。

9) ASF-4-3R

本細胞株は、個体の老化が反映されたヒト正常細胞株を作製することを目的として、同一供与者より 11 年間隔で樹立された一連の線維芽細胞株のうち、56.9 才時に作製されたものである(細胞老化研究, 加治和彦, 基礎老化研究, vol 25, no. 1, 3-4, 2001)。日本人(♂)上腕内側部皮膚由来であり、加治和彦教授(静岡県立大学)によって樹立された。分裂寿命は 46.5 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは分裂回数が少ない 5-10PDL のものと 10-20PDL のものの 2ロットである。

10) ASF-4-3R

本細胞株は、個体の老化が反映されたヒト正常細胞株を作製することを目的として、同一供与者より 11 年間隔で樹立された一連の線維芽細胞株のうち、56.9 才時に作製されたものである(細胞老化研究, 加治和彦, 基礎老化研究, vol 25, no. 1, 3-4, 2001)。日本人(♂)上腕内側部皮膚由来であり、加治和彦教授(静岡県立大学)によって樹立された。分裂寿命は 52.2 回であることが確認されており、今回分与を受けたロットは分裂回数が少ない 5-10PDL のものと 10-20PDL のものの 2ロットである。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞を用いた実験は、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倫理委員会(準備中により仮称)により、当該研究計画がヒト組織を用いた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

Hayflick によって、*in vitro* におけるヒト培養細胞の分裂回数には限界があることが報告されて以来、培養細胞を用いて細胞の老化について様々な研究がなされてきた。また、がん研究の見地からも、がん細胞の特性の一つである細胞不死化のメカニズムを明らかにすることは、がんの克服に重要な役割を果たすと考えられて、近年では細胞の寿命を司るテロメアが注目されるようになった。

これらの研究において、培養細胞は重要な研究資源として活用されてきた。マウス・ラット等の実験動物由来の培養細胞の場合、個体の寿命を反映して分裂余命が少なく、*in vitro* で容易に自然不死化や自然形質転換が生じるため、ヒト正常細胞が主として用いられてきた。その反面、ヒト細胞は分裂回数が限られることから、継代培養には限界があり、実験材料として量が限られるという問題点があり、また、広く一般に用いられている株は樹立年代が古く、すでに継代を重ねているため、分裂回数が少ないロットを入手することが困難である問題もある。

そこで、本年度は細胞老化研究の第一人者である加治和彦教授(静岡県立大学)より、細胞老化研究の研究資材として、有用な細胞の分与を得た。TIG-1、3、7 株は、東京都老人総合研究所で樹立されたヒト胎児由来の正常線維芽細胞株であり、すでにヒューマンサイエ

ンス研究資源バンクより分譲されているが、今回、PDLが5-10回と、樹立後の早い段階に凍結保存されたロットと、一般に用いられているPDLが20-30回のロットの分与を受けた。樹立後の早い時期のロットを用いることにより、in vitro における細胞老化過程を長期間追跡することが可能になり、また、老化の各段階で多量の細胞数を必要とする実験にも対応が可能となる。

同時に、細胞老化研究のみならず、各方面の in vitro 実験で標準株的に用いられてきたMRC-5、WI-38、IMR-90についても、15-30PDL程度の比較的若いロットの分与を受けた。これらの細胞株についても、すでにヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されているが、分裂余命がはっきりしていることから、細胞老化研究の材料、あるいはそのコントロールとしてより適切であると考えられる。

また、同一の供与者より11年間隔で22年間にわたって樹立された一連のヒト皮膚由来線維芽細胞株についても分与を受けた。これらの株は、それぞれの樹立時における供与者の個体レベルにおける老化を反映していると考えられ、分裂余命の実験によつて0才時の分裂余命(80.5回)から、個体年齢が一年増えるにつれて細胞レベルでは0.4PDLを消費することが示されている(細胞老化研究, 加治和彦, 基礎老化研究, vol 25, no. 1, 3-4, 2001)。このことから、細胞の老化と個体の老化の橋渡しをする研究材料として、細胞老化機構と老化形質を調べる研究材料として有用であると考えられる。このような老化の見地から22年間もの長期にわたって樹立された例は類を見ず、非常に貴重な細胞株である。

D. 研究発表

1. 論文発表

Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Noriho Tanaka and Makoto Umeda: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, Mutation Res., 557, 191-202(2004)

田中憲穂: 医療用具の製品化を目的とした前臨床試験、バイオマテリアル-生体材料- 22:320-327(2004)

田中憲穂: 照射食品の遺伝的安全性試験、食品照射 39:13-27(2004)

田中憲穂: 照射食品の生物学的安全性、Food and Food ingredients Journal of Japan 209 (2004)

Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten, Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials, Journal of Biomedical Materials Research, in press (2005)

Ryo Kurihara, Fujio Shiraiishi, Noriho tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastals Japanese waters, Environmental Toxicology and Chemistry, in press (2005)

Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, Noriho Tanaka, Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells), Mutation Res., 投稿中

2. 学会発表

田中憲穂: 生殖細胞および培養細胞を用いた遺伝毒性試験法の開発と国際標準化への貢献 (学会賞講演)、日本環境変異原学会、2004年11月、長崎
浅田晋、佐々木澄志、山陰康次、田中憲穂、梅田誠: Bhas42細胞を用いた抗形質転換作用検出系の確立とその応用、