

任意の継代数で、SV40ori-DNA 及び hTERT を導入し不死化細胞株を樹立した。

3. 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。

### C. 研究結果と考察

#### a. 寄託済 JCRB 細胞株の基本特性

昨年度の細胞バンク側の STR-PCR による検査結果から、4 種類の寄託細胞株（全て上皮由来）への異種細胞の混入の可能性は否定されたが、ファイブロブラスト形態の細胞の存在がコンタミネーションであるかどうかは依然として未解決であった。混入細胞の出現頻度が血清添加培地中で顕著であったことからまず血清効果によるファイブロブラストの優先的増殖が疑われたが、樹立者による検討結果は細胞生物学的現象の一つである上皮-間葉系細胞変換（EMT）が誘発されている可能性が示唆された。

このことを確認する目的で EMT の二つの指標①細胞の遊走性の亢進、②Sneil の発現誘導を検討した結果は、両者共血清による EMT の誘発を支持するものであった。この結果は新たに樹立される不死化細胞

株は道具としての培養細胞株だけでなく、細胞生物学や癌生物学、さらに発生生物学など幅広い領域の研究資源となり得る事を示唆している。具体的な例として、これら子宮頸部上皮から樹立された不死化細胞系は癌組織から樹立された癌細胞株と多くの点で区別されるもので、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今後のがん研究に有用な細胞株を提供できるものと考えられる。

#### b. 牛卵管不死化細胞株

ヒト細胞以外の細胞株として和牛（Japanese black cattle）卵管上皮細胞系 BOEC（有限分裂寿命）と SV40 及び hTERT を導入した不死化細胞株（BO-SV 及び BO-TERT）は細胞の老化や細胞遺伝学的研究に有用である例の一つを示す。牛は（28対）+（1対の性染色体）を持っており、またヒトの平均のテロメア長の倍以上の長さをもっている。ヒト細胞との際立った特徴は常染色体は全て

アクロセントリックで、この細胞はテロメア短縮を伴いながら培養中にヒト細胞と同様のほぼ50回の細胞分裂後分裂老化を示すことを明らかにしたが、最も特徴的な点はテロメア短縮に伴って染色体融合が誘発されることであった。このような知見は細胞遺伝学的研究に有用な細胞系を提供できることを示している。またこの細胞（BOEC）の不死化細胞株は二通りのテロメア維持機構（ALT またはテロメラーゼ活性化）を持つ各々の細胞株として樹立されており、幅広い需要が期待

できる。

c. 胎児性付属器由来上皮細胞株

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保持する複数の不死化細胞株が樹立されている。

以上三つの例は新たに樹立される不死化細胞株は細胞生物学的にも注目されてよい細胞特性を備えているものがあり、このような樹立細胞株の特性を利用した色々な用途が想定される。現在引き続き詳細な解析を進めている細胞株に以下のものがある。

Human amniotic epithelial cell lines

HAT Sv40T

HATT Sv40T + hTERT

Human umbilical cord epithelial cell lines

HABT Sv40

HABTT Sv40 + hTERT

投稿及び投稿準備中の論文受理後寄託に備える予定である。

研究発表

Saiga K, Takeuchi M, Kikuchi K, Kiguchi K and Yasumoto S

Human squamous epithelial stem cells responsible for neoplastic transformation induced by oncogenic viruses

日本組織培養学会 平成16年5月 広島

## 分担研究報告書

### ヒトの疾患モデル細胞の研究資源化に関する研究

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 遺伝毒性部長

#### 研究要旨

日本人由来のヒト正常細胞は、研究資源としての重要性が極めて高いにもかかわらず、がん細胞由来の細胞に比べてそのストックは極めて少ない。東京都老人総合研究所で樹立された正常二倍体線維芽細胞株(TIG 株)は、細胞老化のモデルとして広く用いられており、すでに 11 株が JCRB 細胞バンクに収集されている。また、昨年度には新たに 4 株(TIG 株として)の分譲を受けた。本年度は、さらに 14 株の分譲を受け、培養・品質管理作業を開始した。これらの株は、樹立後の細胞分裂回数と、分裂余命が明らかにされており、細胞レベルでの老化研究に有用であると思われる。一方、研究資源の危機管理に関しては、その管理システムの強化と、地震などの大型災害を回避する手段として、細胞の分散ストックが考えられる。国内の研究資源細胞バンク間ネットワークの中で、関西圏の基盤研細胞バンクに対して秦野研細胞バンクは関東圏での 2 重ストックバンクとしての役割を果たした。

#### A. 研究目的

細胞レベルの老化研究には培養細胞が広く用いられているが、提供者の年齢により分裂余命にはばらつきがあるため、実際に分裂余命を測定後に実験を用いることになる。細胞の老化研究に関わる因子としては、細胞老化に伴う細胞機能の変化、分裂寿命や分裂停止の機構、分裂回数を決める機構、不死化のメカニズムとテロメラーゼによる制御、増殖因子による増殖の制御など、様々な研究アプローチがあり、日本人の細胞で男女、年齢、各種の組織、遺伝的背景の異なる細胞など、様々な種類の研究資源が必要となる。

わが国で開発された TIG 株は、細胞レベルの老化研究を目的として樹立されたヒト由来線維芽細胞株であり、現在の分裂数と分裂余命が管理されているため、細胞老化の研究に

有用である。本年度は、JCRB 細胞バンクに未収集であった株の分譲を受けた。

#### B. 研究方法

全ての株は、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、日本人に由来する正常二倍体線維芽細胞株である。Outgrowth 法にて樹立後、イーグル MEM 培地あるいはイーグル BME 培地に 10 vol%の牛胎児血清を加えた培養液で、一週間に一度の割合で 1:4 分割で継代培養されてきた。

##### 1) TIG-110

33 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 35.1 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、15.1 PDL のものである。

2) TIG-111

34 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 37.7 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、11.9 PDL のものである。

3) TIG-112

40 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 50.9 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、13.6 PDL のものである。

4) TIG-113

21 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 52.5 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、27.4 PDL のものである。

5) TIG-114

36 歳(♂)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 51 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、6 PDL のものである。

6) TIG-115

1.5 歳(♂)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は確認されていないが、今回分与を受けたロットは、5.0 PDL のものである。

7) TIG-116

1.5 歳(♂)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は確認されていないが、今回分与を受けたロットは、5.0 PDL のものである。

8) TIG-117

16 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は確認されていないが、今回分与を受けたロットは、540 PDL のものである。

9) TIG-118

12 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 66 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、4.0 PDL のもので

ある。

10) TIG-119

6 歳(♂)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 47.8 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、17.3 PDL のものである。

11) TIG-120

6 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 39.5 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、4.0 PDL のものである。

12) TIG-121

8 ヶ月(♂)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 53.3 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、19.9 PDL のものである。

13) ASF-2

65 歳(♀)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 58.3 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、13.4PDL のものである。

14) ASF-3

77 歳(♂)皮膚由来の線維芽細胞株である。分裂寿命は 41.4 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、14.0PDL のものである。

(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(暫定委員会)により、当該研究計画がヒト組織を用いた実験に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

正常な体細胞には固有の寿命があり、一定

回数 of 細胞分裂を繰り返すと増殖を停止して死滅する。細胞レベルの老化によって、個体の老化の全てを説明できるわけでは無いが、動物種によって異なる寿命の限界と、細胞分裂回数 of 限界が比例するなど、密接に関係していると考えられている。また、がん細胞の形質の一つとして無限増殖性があり、がん研究の観点からも細胞レベルの老化の研究には大きな意義がある。

細胞レベルの老化研究において、培養細胞は重要な研究資源として活用されてきた。一般に、個体レベルの老化研究には、扱いやすく個体寿命が短いマウス等の実験動物が用いられるため、細胞レベルの老化研究も同様に実験動物由来の正常細胞を用いる事が望ましいが、個体寿命の短さに比例して分裂寿命が少なかったり、in vitro で容易に自然不死化するなど、材料として扱いにくい面もある。その点、ヒト由来の細胞は、比較的分裂寿命が多く(80.5 PDL, 細胞老化研究, 加治和彦, 基礎老化研究, vol 25, no. 1, 3-4, 2001)、in vitro で自然に不死化することは極めて稀であるため、細胞老化研究には適している。

一般には、MRC-5 株、WI-38 株、IMR-90 株など国外で開発された初代培養ヒト線維芽細胞が用いられているが、樹立された年代が古く分裂余命が少なかったり、分裂余命が不明であるなどの問題点がある。

そこで、昨年度に引き続き、細胞老化研究の第一人者で、特に、血管系と皮膚組織を主な解析対象として、ヒト個体の老化機構の解明をしておられる加治和彦教授(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。分与を受けた株は、様々な年代の男性および女性に由来し、樹立後の PDL も 4 回から 27 回とバリエーション

に富んでいるため、幅広い目的の実験に用いることができる。また、一部を除いて分裂余命が明らかにされているため、すぐに研究に用いることができる利点もある。

このように、幅広い個体寿命や分裂余命を持つ培養細胞群を保持している機関は世界的にも例が無く、貴重な研究資源として活用が期待される。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho Tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters, Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 1984-1993 (2005)

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, Vol. 75A Issue 1, 115-122 (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., 588:7-21 (2005)

Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi

Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, ATLA 33, 619-639 (2005)

## 2. 学会発表

田中憲穂、板垣宏、若栗忍、北垣雅人、中川ゆづき: 単回投与毒性試験代替法の開発研究および皮膚モデルを用いる遺伝毒性試験法の開発研究、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

浅田晋、佐々木澄志、田中憲穂、梅田誠: Bhas 42細胞を用いるイニシエーター/プロモーターの検出、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

梅田誠、佐々木澄志、田中憲穂、: 発ガン性試験の代替法: ECVAMでPrevalidation Studyの現状、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

大森清美、梅田誠、田中憲穂、高木弘毅、吉村功、佐々木澄志、浅田晋、酒井綾子、浅倉真澄、馬場博、伏脇裕一、浜田修一、鬼頭暢子、中村哲、中村好志、大石英俊、佐々木聡、嶋田佐和子、土屋敏行、宇野芳文、鷺塚昌隆、矢嶋聡、山下康人、山村英二、八城友子: 発ガン性プロモーター検出のためのBhas 42細胞を用いた細胞形質転換試験に関する共同研究結果のついて、

日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

中川ゆづき、田中憲穂、: ラットFRSK細胞を用いたin vitro小核試験法、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

和田昌憲、本郷有克、若栗忍、石川陽一、梅田誠、田中憲穂: 培地中グルコースの消費を指標とする毒性評価法の応用、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

山影康次、高橋俊孝、浅田晋、田中憲穂: In vitro光染色体異常試験における各種照射条件とその影響、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

北垣雅人、若栗忍、田中憲穂、板垣宏: 急性毒性試験代替法の検討(3): 2施設間におけるCollagen Gel Assayを用いた急性毒性試験予測性の評価、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

若栗忍、大野泰雄、田中憲穂: 細胞毒性によるin vivo全身毒性の予測について-代謝活性化の導入および処理条件の検討-、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

Noriho Tanaka: The Activity of JSAAE -past, present and future, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005

Isao Yoshimura, Takashi Omori, Yasuo Ohno, Masatoshi Hoya, Masaki Mori, Takaaki Doi, Yuriko Fujita, Hiroshi Itagaki, Rumi Kawabata, Hajime Kojima, Seiji Hasegawa, Yuko Okamoto, Noriho Tanaka, Kouko Tanigawa and Shinobu Wakuri: Validation study on the battery system

for prediction of phototoxicity in Japan:  
The overview of the results, 5th World  
Congress on Alternatives & Animal  
Use in the Life Sciences, August,  
Berlin (Germany) 2005.

Shinobu Wakuri, Yutaka Matsumoto,  
Makoto Hayashi and Noriho Tanaka:  
Application of in vitro alternative  
methods to ecotoxicology, 5th World  
Congress on Alternatives & Animal  
Use in the Life Sciences, August,  
Berlin (Germany) 2005

Kiyomi Omori, Makoto Umeda, Noriho  
Tanaka, Hiroki Takagi, Isao  
Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Ayako  
Sakai, Harumi Araki, Masumori  
Asakura, Hiroshi Baba, Yuichi  
Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuko  
Kitou, Tetsu Nakamura Yoshiyuki  
Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi  
Sasaki, Sawako Shimada, Toshiyuki Tsuchiya,  
Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka,  
Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji

Yamamura and Tomoko Yatsushiro:  
Inter-laboratory collaborative study of cell  
transformation assay for tumour promoters  
using Bhas 42 cells by non-genotoxic  
carcinogen study group in Japan, 5th World  
Congress on Alternatives & Animal Use in  
the Life Sciences, August, Berlin (Germany)  
2005.

Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Shin Asada,  
Kiyoshi Sasaki and Kumiko Hayashi:  
Detection of non-genotoxic carcinogens  
using ras-transfected Bhas 42 cells, 5th  
World Congress on Alternatives & Animal  
Use in the Life Sciences, August, Berlin  
(Germany) 2005

Noriho Tanaka: Current activities of  
alternative research in Japan, 1st International  
Forum on Laboratory Animal Science and  
Technology, Beijing (China), November 2006

分担研究報告書

ヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜の肉腫の樹立に関する研究

分担研究者: 執印太郎 高知大学医学部腎泌尿器制御学教室 教授

研究要旨: ヒト尿路上皮腫瘍(腎腫瘍、膀胱癌)は年間に合計23,000名が発症し約8,000名の死亡があるが、手術以外の有効な治療法は数少ない。後腹膜腫瘍は発生頻度が少なく殆どが進展例である。近年ゲノムプロジェクトの進展に伴い、腫瘍マーカー、分子標的薬剤、免疫ペプチド療法などへ新規の蛋白の発見や治療法の開発が望まれる。そのため遺伝子発現解析、proteomics解析の研究材料となる腎尿路系と後腹膜悪性腫瘍細胞株の樹立は必須である。さらに新規治療候補薬剤をin vitroでヒト癌細胞に対して評価する際にも重要な研究資源となる。本研究ではこの目的で腎尿路系と後腹膜腫瘍の細胞株の確立を目指して腎細胞癌2株と尿路上皮癌3株の樹立と寄託を行った(近日中の寄託予定株も含む)。これより細胞バンクの存在と多くの細胞株の収集は今後の、診断マーカーや薬剤開発研究の基盤として不可欠であると考えられる。

A. 研究目的

ヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜の腫瘍は国内の発症数が合計23,000名、死亡者数が8,000名とされるが、手術以外に有効な治療法は確立されていない。またこれらの腫瘍で確立され研究に利用できる株細胞は少ない。ゲノムプロジェクトの進展に伴い発展すると予測されるヒトゲノム解析、proteomics研究及び、分子標的治療薬の開発、免疫ペプチド療法の標的蛋白の解析などを基盤的に支援する目的でヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜腫瘍の樹立を行った。今後はこれらの細胞株の利用により、ゲノム研究等多くの発展が期待される。

B. 研究方法

手術材料から得た腫瘍検体1cm角をD-MEM+10%FBSに入れて約20分間細切後にD-MEM+10%FBS10mlと10%コラゲナーゼ10mlを加えて37度で3時間攪拌し、攪拌後にD-MEM30mlを加え、1,500rpmで5分間遠沈した。上清を除去し細胞にD-MEM+20%FBSを加えて初代培養した。0.25%トリプシン/0.02%EDTA処

理して1:3から4希釈して継代培養し、安定して継代培養が可能な株細胞の確立を行った。検体によっては細切したものをPlastic dishに培養するexplant法も行った。

(倫理面への配慮)

我々は2004年12月の3省庁の倫理指針に基づき組織検体(細胞株)検体を匿名で患者さんより取得するため、バンク事業に寄託するための研究計画書を学内倫理委員会に提出し許可を得ている。又、患者さんより同意を取得している。

C. 研究結果

1) 樹立した細胞株とその病理的特徴  
(寄託予定を含む)

**KMRC-21**

60歳男性の腎臓全摘出術標本から樹立した腎癌細胞株である。組織型はRenal cell carcinoma clear cell type, grade3 >2でVHL遺伝子にpoint mutation (nt.262 T to A(aa88 Try → Arg))を認めた。培養細胞は類円形～多角形の細胞で増殖は遅い。

**KMRC-32**

77歳男性の右腎臓全摘出術標本から樹立



した腎癌細胞株である。組織型はRenal cell carcinoma clear cell type、grade2でVHL遺伝子にフレームシフト(nt.300 7bp deletion)を認めた。培養細胞は類円形～多角形の細胞で増殖は遅い。(Fig.1)

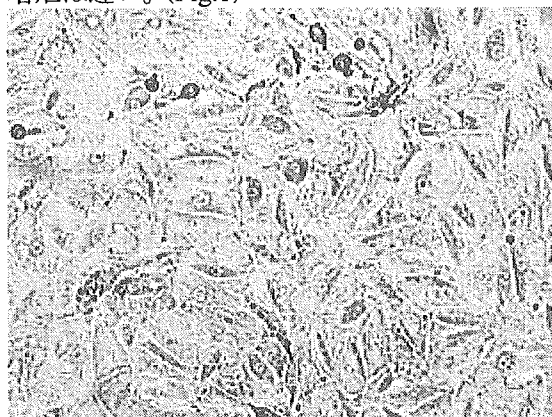


Fig.1 KMRC-32の培養細胞像(x100)

#### NS

80歳女性の膀胱癌から樹立した細胞株である。組織型はTransitional cell carcinoma(移行上皮癌)grade2でSquamous cell carcinoma(扁平上皮癌)の像も混在している。尿管にも腫瘍が見られる。培養細胞の倍加時間は約160時間でやや遅く、円形でやや大型の細胞が島状に増殖している。(Fig.2)

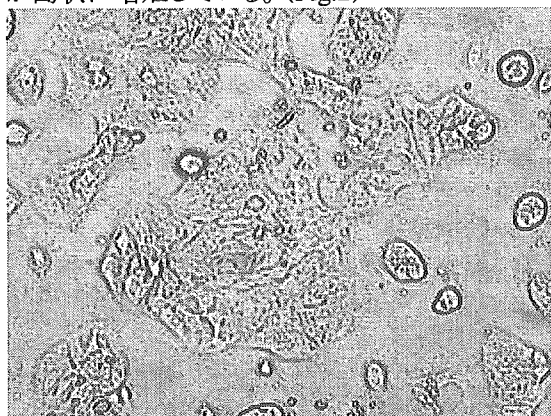


Fig.2 NSの培養細胞像(x100)

#### KMUM-1.1

67歳男性の左尿管腫瘍頸部リンパ節転移組織をヌードマウスに移植して樹立した細胞株である。組織型はTransitional cell

carcinoma(移行上皮癌)grade2>3、stageIV、頸部・後腹膜リンパ節転移、多発性転移を認める症例である。培養細胞の倍加時間は約70時間で、円形でやや小型の細胞が島状に増殖している。(Fig.3)

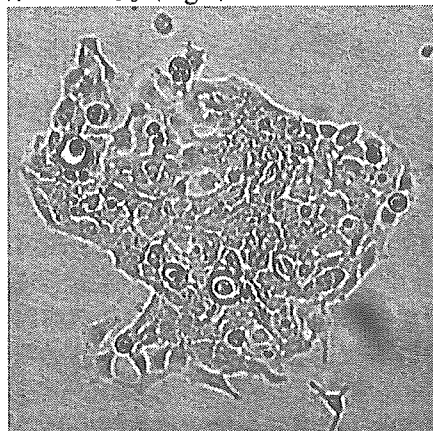


Fig.3 KMUM-1.1の培養細胞像(x100)

#### KMUC-3

70歳男性の左尿管腫瘍から樹立した細胞株である。組織型はtransitional cell carcinoma、grade 3>2である。培養細胞は類円形～多角形でやや大型の細胞が島状に増殖している。(Fig.4)

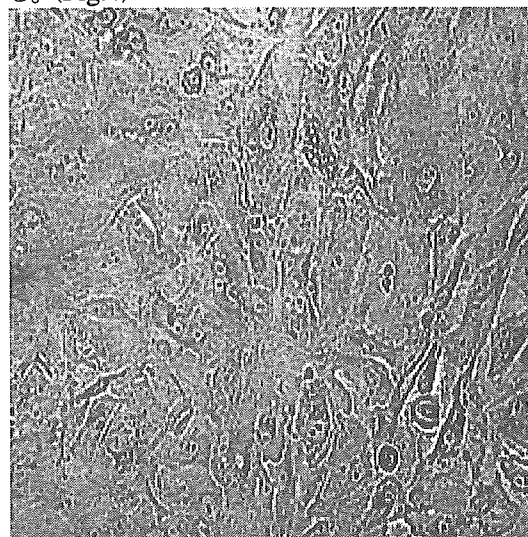


Fig.4 KMUC-3の培養細胞像(x100)

- 2) ゲノム解析研究  
ヒト癌についてはepigenetics研究が盛んに行

われ各腫瘍でメチル化遺伝子の研究がなされているが、我々はこれらの系を利用して特に腎細胞癌特異的に癌組織で30%以上にメチル化を受け、細胞株では90%でメチル化を受けているホメオボックス遺伝子HOXB13の同定をした。HOXB13は腎尿路と尾部の形成に関与するホメオボックス遺伝子で、腎癌では新規癌抑制遺伝子の候補である。HOXB13のような腎尿路発生の制御遺伝子の不活性化がヒト癌の発生に関与していることが明らかとなった(論文発表2)。また、東京大学医科学研究所との共同研究にて腎細胞癌の血清腫瘍マーカーHIG2を発見した(論文発表5)。

#### D. 考察

ヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜の腫瘍(肉腫)は国内の発症数、死亡数とも比較的多い腫瘍であるが、数少ない化学療法の種類と、サイトカイン療法、手術が行われており、これ以外に有効な治療法はない。腫瘍が細胞株として確立され細胞バンクに寄託されて研究に利用が可能となっているものは少ない。今後、ゲノム解析研究及び、それに基づく分子標的治療、免疫ペプチド療法などの革新的な研究が発展すると予測される。我々は細胞バンクでの利用という観点で細胞株を樹立しサポートする目的でヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜腫瘍の樹立を行った。

我々は倫理指針を遵守してその旨の研究計画書を本学倫理委員会に申請し、許可を得ている。結果として腎細胞癌2株と尿路上皮癌3株の樹立と寄託を行った。

von Hippel-Lindau病(VHL)遺伝子はヒト腎癌の主要な癌抑制遺伝子であるが、腎細胞癌株、KMRC-29はclear cell型の腎癌であるがVHL遺伝子変異はない。のこりの2株、KMRC-21、KMRC-32はVHL遺伝子の異常を認めた。今後腎細胞癌の発生進展の様式を見るには適した細胞株である。我々は以前にVHL遺伝子の変異(+)腎癌4株、VHL遺伝子の変異(-)腎癌株1株を寄託しておりこれらは参考に研究材料になる。

移行上皮癌5株はそれぞれ特徴を有している。今後、膀胱癌や腎盂癌は移行上皮癌が多く、現在は化学療法としてはM-VAC療法のみが使用

されているが、今後、新規の抗がん剤が国内で使用されると考えており、その際、薬剤感受性を目的としてオーダーメイド医療の研究で利用が可能な細胞株である。

KMPC-3は腎盂癌から樹立した細胞株であり一般の移行上皮癌に神経内分泌腫瘍と肉腫型癌が合併したものである。腎盂癌の中でも最も組織型が悪いものであり報告が過去5例と少ない。我々もInternational Journal of Urology誌に掲載された(論文発表4)。

これら系を使用して特に腎細胞癌では新規癌抑制遺伝子の候補でありepigeneticにメチル化を受けているホメオボックス遺伝子HOXB13を同定した。これは発生とがん化が強く関連していることを示している。また、共同研究にてヒト腎細胞癌の血液系の腫瘍マーカー候補であるHIG2を同定した。

今後も、本教室ではこれらの特徴のある細胞株を樹立し、細胞バンクに寄託してゲノム解析研究とそれに基づく分子標的治療、免疫ペプチド療法などの先端的な治療法のための基盤を支持する。

#### E. 結論

本研究では腎細胞癌2株、膀胱癌、腎盂尿管癌から3細胞株を樹立した。腎細胞癌はclear cell carcinomaでVHL遺伝子の異常を有したものである。膀胱癌は抗がん剤耐性のtransitional cell、腎盂癌はneuroendocrine small cell carcinoma(+ transitional cell carcinoma)であり興味深い。他に4株を樹立した。移行上皮がん細胞株は他にも確立されたものが少なく、今後の尿路上皮系の癌の研究に役立つと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Okuda H, Shuin T, *et al.* Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2005 Nov 7; in print (11月から*Oncogene*誌のonline上で閲覧可能)

- ② Kuroda N, Shuin T, Enzan H, *et al.*  
Frequent expression of neuroendocrine markers in mucinous tubular and spindle cell carcinoma of the kidney. *Histol Histopathol.* 2006;21(1):7-10.
- ③ Shimazaki N, Shuin T, *et al.* Combined small cell carcinoma and sarcomatoid squamous cell carcinoma in the renal pelvis: a case report, *International Journal of Urology, Int J Urol.* 2005;12(7):686-9.
- ④ Togashi A, Shuin T, Nakamura Y, *et al.* Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy *Cancer Res.* 2005;65(11):4817-26.
- ⑤ Tsuchiya MI, Okuda H, Shuin T, *et al.* Renal cell carcinoma- and pheochromocytoma-specific altered gene expression profiles in VHL mutant clones. *Oncol Rep.* 2005;13(6):1033-41.
- ⑥ Takata R, Katagiri T, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y, *et al.* Predicting response to methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for bladder cancers through genome-wide gene expression profiling. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2625-36.
- ⑦ Kudo Y, Kakinuma Y, Shuin T, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in the attenuation of experimentally induced rat glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol.* 2005;100(2):e95-103.
- ⑧ Fukata S, Inoue K, Furihata M, Shuin T, *et al.* Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005;103(5):931-42.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

## 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

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

分担研究 ヒト食道癌由来細胞株・膵癌由来細胞株の樹立に関する研究

分担研究者 嶋田 裕 京都大学医学研究科腫瘍外科学講師

研究要旨 本年も入れて過去三年間に6株の食道癌細胞株の寄託を行った。数施設よりバンクよりの配布細胞についての問い合わせがあり、一部は論文発表がなされており、有効利用されている。中国での細胞の不正使用があり、細胞の contamination が疑われた。このような使用を防ぐためにも細胞バンクによる細胞管理が必要である。

#### A. 研究目的

食道癌・膵癌は難治癌で、その治療成績の向上は急務である。その為には研究による成果の積み重ねが必要であり、研究の遂行には容易に実験系を作成できる細胞株が不可欠である。しかしながら、現在までに樹立が報告された細胞株のうち、現在でも使用可能な細胞株の絶対数が不足しており、細胞のさらなる樹立を目的とした。また正常食道上皮細胞株の樹立も行った。

#### B. 研究方法

インフォームドコンセントにより承諾の得られた食道癌・膵癌の患者さんの切除標本より、食道癌細胞株および膵癌細胞株の樹立を試みた。樹

立細胞における遺伝子解析を行い、食道癌に関与する癌遺伝子および癌抑制遺伝子の解析を行った。昨年度までの CGH 解析およびマイクロアレイによる網羅的解析に加えて、RDA 法による解析も行った。

#### C. 研究結果

##### 1. 細胞の性状確認

我々は、現在まで50株の細胞の樹立に成功した。このうち昨年までに6株、本年度3株を細胞バンクに寄託した。細胞バンクのSTR分析にて既に寄託しているKYSE110と今回寄託したKYSE200の cross contamination が疑われた。KYSE200をKYSE110の垂株として更なる解析を試みている。

OPN が食道癌において高頻度に遺伝子発現亢進が認められ、食道癌患者の予後に関与することを明らかとした。さらにリンパ節転移モデルにおいて ShRNA により食道癌の転移が抑制され、食道癌治療の分子標的となりうることを明かした (Ito T. Clin Cancer Res 2006 in press)。また OPN は分泌タンパクであり、患者血清中の OPN 値が食道癌の転移に関与し、他の腫瘍マーカーと組み合わせることにより、患者予後を良く反映することが明かとなった。(Shimada Y. Oncology 2005)

RDA 法により食道癌細胞株から食道癌の新たな免疫学的ターゲットとして LAGE を同定した。(Oncology 2006 in press)

食道癌細胞株は中国での不正使用が判明し、雑誌の Letter to the Editor 欄に投稿し、掲載されたことから、不正使用の自粛に繋がった (Shimada Y et al. Clin Cancer Res 2005)。このようなことが起こらないためにも細胞バンクによる管理供給がなされるべきである。

食道癌細胞株のみならず食道正常上皮細胞数株を樹立した。正常細胞では、タバコ成分の nicotine により癌抑制遺伝子 FHIT のメチル化が生じ、nicotine を抜くと速やかに遺伝子発現が復帰することを明らか

とした。(Soma T et al. Int J Cancer 2006 in press)。これらの細胞もまた有用な研究材料となると考えられたが、現在 BSE 問題で培養液の輸入がストップしており、寄託に至っていない。

膀胱癌細胞株については一時、培養を中止していたが、凍結より再増殖を試み 6 株の再培養に成功した。

#### D. 考察

食道癌細胞株は広範な遺伝子変化を生じているが、新鮮切除標本ならびに正常食道上皮と組み合わせて解析することにより、食道癌における役割の解析が可能であった。細胞株は癌独自の遺伝子変化の解析及び、遺伝子導入としてのターゲットであり、食道癌の細胞生物学的機構解明の強力なツールである。正常細胞の培養を可能とするために、再び培養液の入手を可能としていただきたい。膀胱癌細胞株については今後寄託準備を整えたい。

#### E. 結論

我々の樹立した細胞株は種々の遺伝子発現や遺伝子発現抑制が認められ、食道癌研究に有用な資料提供をおこなえる。今後も継続して細胞株樹立に務めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Soma T, Kaganoi J, Kawabe A, Kondo K, Tsunoda S, Imamura M, Shimada Y.

Chenodeoxycholic Acid Stimulate the progression of Human Esophageal Cancer Cells: A possible mechanism of Angiogenesis in patients with esophageal cancer. Int J Cancer 2006 ( in press)

2) Ito T, Hashimoto Y, Tanaka E, Kan T, Tsunoda S, Sato F, Higashiyama M,

Okumura T, Shimada Y. An Inducible shRNA Vector against Osteopontin Reduces Metastatic Potential of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo. Clin Cancer Res 2006 ( in press)

3) Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T, Hamaguchi M, Hayakawa T, Tominaga K, Watanabe T, Oshitani N, Shimada Y,

Arakawa T. Roles of epidermal growth factor and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 in esophageal epithelial defense against acid-induced injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006 (in press)

4) Kan T, Yamasaki S, Kondo K, Teratani N, Kawabe A, Kaganoi J, Imamura M, Shimada Y. New specific gene expressions in squamous cell carcinoma of esophagus using representational

difference analysis and cDNA microarray Oncology 2006 ( in press)

5) Kondo k, Yamasaki S, Sugie T, Teratani N, Kan T, Imamura M, Shimada Y. Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer 118:230-42, 2006

6) Ban S, Michikawa Y, Ishikawa K, Sagara M, Watanabe K, Shimada Y, Inazawa J, Imai T. Radiation sensitivities of 31 human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines. Int J Exp path 86:231-240, 2005

7) Shimada Y Researchers should have respect for the originator of the cell lines. Clin Cancer Res11:4634 Letter to the editor, 2005

8) Higashitsuji H, Higashitsuji H, Ito K, Sakurai T, Nagao T, Sumitomo H, Masuda T, Dawson S, Shimada Y, Mayer RJ, Fujita J. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2.hDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. Cancer Cell 8: 75-87, 2005

- 9) Tomita T, Masuzaki H, Noguchi M, Iwakura H, Fujikura J, Tanaka T, Ebihara K, Kawamura J, Komoto I, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Doi R, Shimada Y, Hosoda K, Imamura M, Nakao K. GPR40 gene expression in human pancreas and insulinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 338: 1788-90, 2005
- 10) Hashimoto Y, Ito T, Inoue H, Okumura T, Tanaka E, Tsunoda S, Higashiyama M, Watanabe G, Imamura M, Shimada Y. Prognostic significance of fascin overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*11: 2597-2605, 2005
- 11) Sato F, Shimada Y, Selaru F, Shibata D, Maeda M, Watanabe G, Mori Y, Stass SA, Imamura M, Meltzer SJ. Prediction of survival in esophageal cancer using artificial neural networks. *Cancer*103 : 1596-1605, 2005
- 12) Ban S , Ishikawa K, Kawai S, Saegusa K k, Ishikawa A, Shimada Y, Inazawa J, Imai T. Potential in a single cancer cell to produce heterogeneous morphology, Radiosensitivity and gene expression. *J Radioat Res* 46: 43-50, 2005
- 13) Hansel DE, Dhara S, Huang RC, Ashfaq R, Deasel M, Shimada Y, Bernstein HS, Harmon J, Brock M, Forastiere A, Washington MK, Maitra A, Montgomery E. CDC2/CDK1 Expression in Esophageal Adenocarcinoma and Precursor Lesions Serves as a Diagnostic and Cancer Progression Marker and Potential Novel Drug Target. *Am J Surg Pathol* 29:390-399, 2005
- 14) Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Okumura T, Kan T, Watanabe G, Imamura M, Inazawa J, Shimada Y. The clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma *Clin Cancer Res* 11:1827-34. 2005
- 15) Shimada Y, Watanabe G, Kawamura J, Soma T, Okabe M, Ito T, Inoue H, Kondo M, Mori Y, Tanaka E, Imamura M. Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: Comparison with common tumor markers. *Oncology* 68 : 285-292, 2005
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

「ヒト膵臓癌由来細胞株、肺癌由来細胞株の樹立に関する研究」

分担研究者 井口 東郎 国立病院機構四国がんセンター 臨床研究部長

研究要旨：

細胞のバンク事業にとっては、研究目的が明らかな細胞株を収集しておくことが依頼者側のニーズに答えることとなり、バンクの発展につながると考えられる。本研究においては、がん転移の研究に有用と思われる細胞株、特に骨転移成立に関わるサイトカインを産生する細胞株を寄託した。

A. 研究目的

膵がんは最も予後不良のがん種であり、診断が難しいことと膵がんが有する生物学的悪性度が予後不良の一因と考えられている。一方、肺がんは罹患率および死因ともに第一位であるが、その治療成績は向上しつつあるものの、未だ満足できるものではない。こういった現況より、これらがん種の治療成績向上は大きな社会的ニーズとなっており、それに向けた基礎研究ならびにその結果を踏まえた臨床応用（トランスレーショナルリサーチ）が待たれている。そのためには細胞を用いた *in vitro* および *in vivo* の実験系が有力な手段となり、その目的に応じた細胞株の樹立・収集が重要となる。また、がん治療の進歩による生存期間の延長により転移合併例が増加しており、転移対策も重要な課題となりつつあるが、転移機構の研究にも細胞を用いた実験が必要不可欠である。

本研究は、以上のようながんをとり巻く背景を鑑み、分担研究課題のような膵癌および肺癌由来の細胞株の樹立・収集とともに、がん転移研究（肺がんを中心に）に有用な細胞株の樹立・収集を目的としている。また、本

年度は3年目の最終年度となるため、この3年間の概要を以下に報告する。

B. 研究方法

骨転移成立にはがん細胞で産生されるサイトカインによる破骨細胞活性化が重要である。我々は肺がん骨転移成立にとって肺がん細胞で産生される PTHrP が破骨細胞活性化に関わっていることを 1996 年に初めて明らかにした (Iguchi H, et al. Cancer Res '96)。本研究においてはこの破骨細胞活性化に関わるサイトカインとして PTHrP、IL-6、leukemia inhibitory factor (LIF) を産生する肺がん、子宮頸がんおよびメラノーマ由来細胞株を寄託した。

C. 研究結果および考察

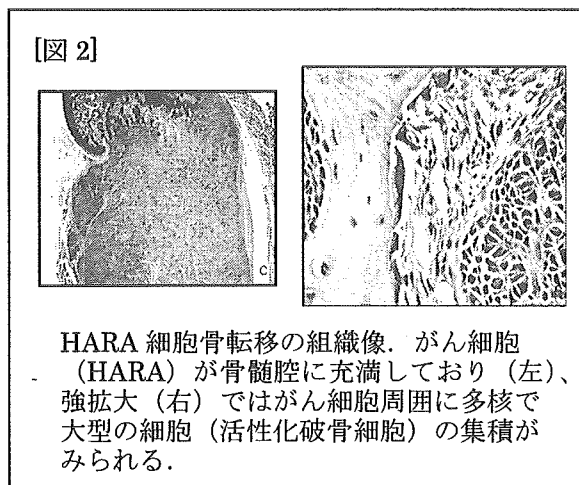
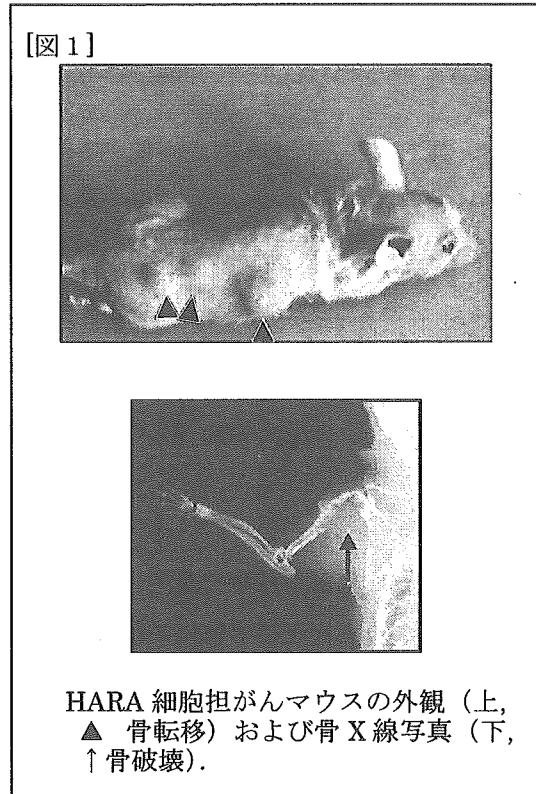
1. PTHrP 産生肺がん細胞株

(1) HARA 細胞

高カルシウム血症を合併した肺扁平上皮癌患者の胸水より細胞株を樹立し、HARA と命名した。HARA 細胞は PTHrP を強発現しており、ヌードマウス皮下接種によって高カルシウム血症が再現されるだけでなく、心腔内



に接種することで骨転移（図1,2）および脳転移が誘導される。このように、HARA細胞はPTHrPが関与する“Paraneoplastic syndrome”の病態解明に有用な手だてとなる。



## （2）HARA-B細胞

HARA細胞のヌードマウス骨転移巣より樹立した細胞株で、HARA-B（Bone）と命名した。HARA-B細胞はPTHrP発現がHARA細胞

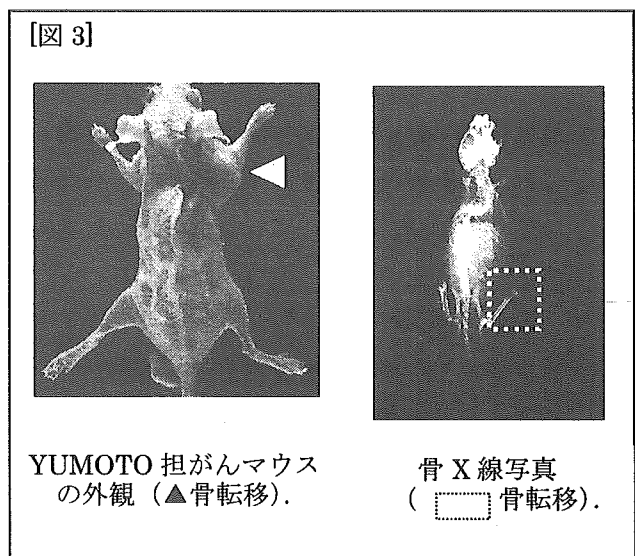
よりさらに増強しており、HARA細胞と同様、高カルシウム血症や骨転移の病態解明に有用である。また、HARA-B細胞はヌードマウス皮下接種にてがん悪液質（体重減少、脂肪組織および筋肉重量の低下、低血糖）を誘導し、本症の病態解明にも有用な手だてとなる。

## （3）MS-1-L細胞

MS-1-L細胞は、HARAあるいはHARA-B細胞とは異なり、肺小細胞がん由来の細胞株である。本細胞もPTHrPを発現するが、その発現量はHARAやHARA-Bに比較して少ない。

## 2. IL-6産生子宮頸がん細胞株（YUMOTO）

IL-6は炎症性サイトカインとして様々な作用を有しており、がん悪液質の起因物質のひとつとしても報告がなされている。IL-6は破骨細胞による骨吸収を促進するため、骨転移成立にとってもなんらかの役割を担っていることが予想されるが、それをこのYUMOTO細胞を用いた実験で明らかにした（図3,4）。このようにYUMOTO細胞はIL-6を産生するがん細胞として、IL-6に関わるがん病態の研究に有用な手だてとなる。



[図 4]

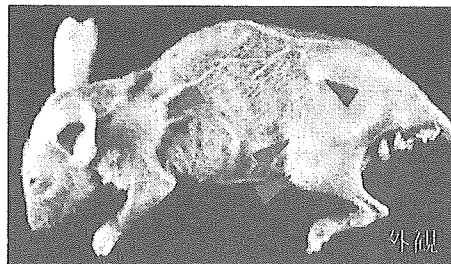


骨髄腔に形成された腫瘍胞巣周囲に赤色に染まった活性化破骨細胞の集積が見られる。

### 3. LIF 産生メラノーマ細胞株 (SEKI)

LIF も IL-6 と同様、炎症性サイトカインとして様々な作用を有しており、がん悪液質についても IL-6 と同様、起因物質のひとつとして既に報告がみられる。LIF は破骨細胞に対しても IL-6 と同様、分化・活性化を促進し、その結果骨吸収を亢進させる。SEKI 細胞をヌードマウス心腔内に接種すると骨転移がみられ、 siRNA 法で LIF 発現を抑制してやると、骨転移も抑制された (図 5, 6)。この結果は SEKI 細胞骨転移に LIF による破骨細胞活性化が重要であることを示唆している。このように SEKI 細胞は LIF を産生するがん細胞として、LIF が関わるがん病態の研究に有用な手だてとなる。

[図 5]

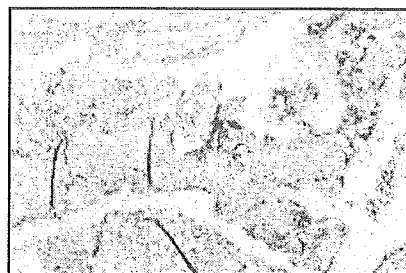


多発性骨転移 (▲) および脊椎転移の脊髓圧排による膀胱直腸障害ならびに下肢麻痺を認める。



骨 X 線写真にて骨破壊を認める (▲)。

[図 6]



骨転移した SEKI 細胞腫瘍胞巣周囲に TRAP 陽性の活性化破骨細胞が集積している。

なお、YUMOTO 細胞および SEKI 細胞は昨年度 (平成 16 年度) の報告書に既に報告済みであるが、基盤研の移転に伴う受け入れ側の事情により本年度 (平成 17 年度) に寄託した。

以上、本研究の 3 年間の概略を報告した。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
井口東郎、 船越顕博。	骨転移対策。	船越 顕博	インフォームドコンセントのための図説シリーズ 膝がん	医薬ジャーナル社	大阪	2005	74-81
井口東郎、 横田昌樹、 澄井俊彦、 船越顕博。	進行消化器癌における骨転移対策。	荒川 泰行	「消化器病学の進歩2005－モノグラフ－」 (消化器病学のニューフロンティア編)	メディカルビュー社	東京	2005	64-66

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishida, S., Funakoshi, A., Miyasaka, K., Iguchi, H., Takiguchi, S.	Sp-family of transcription factors regulates human SHIP2 gene expression.	Gene	348	135-141	2005
Aramaki, Y., Ogawa, K., Toh, Y., Ito, T., Akimitsu, N., Hamamoto, H., Shimizu, K., Matsusue, K., Kono, A., Iguchi, H., Takiguchi, S.	Direct interaction between metastasis-associated protein 1 and endophilin 3.	FEBS Lett	579	3731-3736	2005
Shimonodan, H., Nagayama, J., Nagatoshi, Y., Hatanaka, M., Takada, A., Iguchi, H., Oda, Y., Okamura, J.	Acute lymphocytic leukemia in adolescence with multiple osteolytic lesions and hypercalcemia mediated by lymphoblast-producing parathyroid hormone-related peptide : A case report and review of the literature.	Pediatr Blood Cancer	45	333-339	2005

Tannehill-Gregg, S.H., Levine, A.L., Nadella M.V.P., Iguchi, H., Rosol, T.J.	The effect of zoledronic acid and osteoprotegerin on a parathyroid hormone-related protein-secreting human lung cancer using an intratibial model of metastasis.	J Bone Miner Res	20 (Suppl 2)	56-57	2005
Iguchi, H., Kusumoto, H., Haraguchi, M., Oda, Y., Tsuneyoshi, M.	Expression of RANKL in gastric cancer presenting disseminated carcinomatosis of the bone marrow.	J Bone Miner Res	20 (Suppl 2)	70	2005
船越顕博、澄井俊彦、井口東郎	B. 膵-病態生理-6. 膵癌（膵管癌）の癌遺伝子、遺伝子変異に関するnew Concept.	胆と膵	25 (増刊)	820-822	2005
井口東郎、中村太一、澄井俊彦、船越顕博	高齢者膵癌の治療選択: 自験成績を基にして.	老年消化器病	17	27-32	2005