

200711013A

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業)

細胞研究資源の資源化ならびに  
品質評価法・特性解析法開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

課題番号：H19-生物資源-指定-002

主任研究者 増井 徹

独立行政法人医薬基盤研究所  
生物資源研究部 細胞資源研究室  
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8  
電話：072-641-9819  
FAX：072-641-9851  
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成20年 4月10日

## 目 次

### I. 総括研究報告

細胞研究資源の資源化ならびに品質評価法・特性解析法開発に関する研究 ----- 1

増井 徹

### II. 分担研究報告

1. 細胞資源の資源化・研究利用に関する研究 ----- 8

増井 徹

2. 細胞の研究資源化に関する包括的研究 ----- 16

水澤 博

3. 生物資源の遺伝発現プロファイル ----- 30

鈴木 治

4. 細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究 ----- 34

小原 有弘

5. 生物種の遺伝的プロファイル法の開発 ----- 53

内尾こずえ

6. マルチプレックスPCR法を用いたヒトウィルスゲノム検出に関する研究 ----- 58

清水 則夫

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 64

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

## 細胞研究資源の資源化ならびに品質評価法・ 特性解析法開発に関する研究

主任研究者：増井 徹 医薬基盤研究所生物資源研究部

### 研究要旨

本研究を実施している『医薬基盤研究所・生物資源研究部・細胞資源研究室』は、総合科学技術会議答申(第 5 号)により提言されている「生物研究資源基盤の整備」の実施を目的に研究を実施している。我々が取組んでいる研究資源基盤とは①培養細胞(研究資源・材料)の収集、②収集した培養細胞の増殖(複製)、③増殖した培養細胞の評価(品質管理)と培養細胞の標準化、④評価した研究資源の適切な保存管理(資産管理)、⑤保存している研究資源の研究者への提供システム(分譲)の構築であり、我々は収集した研究資源を国家資産として適切に保管し国内外の生命科学研究の支援に有効に活用する責務を負っている。一方、培養細胞は典型的培養生物で様々な問題が起こりうる研究材料であり、厳密な監視を必須とする研究材料である。従って本研究班の目的はこのような培養細胞についての適切な監視体制を確立し国の生命科学研究のレベルを向上させることにある。

細胞培養技術は、無菌技術の開発により確立された便利な道具である反面、未だに様々な誤りが生じやすい。培養細胞と共存する微生物や同種細胞は汚染物とは認識し難い(マイコプラズマ、ウイルス、異種細胞、同種細胞)。誤認された細胞や汚染された細胞を使った研究は、捏造と誤解されかねない危険を含んでいると同時に、創薬研究においては正しい細胞の利用やウイルスが混入していないことを証明した材料の提供が必須である。さらに、税金の適正執行が以前にも増して強く求められるようになってきている現在、正しい細胞の提供がより重視されることは当然である。

しかし、細胞を監視し調査研究を推進するには細胞の集積を必要とするうえに多くの労力や研究費が必要となる地道な作業であるにも拘わらず、学問的には「細胞の正誤」という単純な結果しか得られないと理解する研究者が多く、敬遠されがちな課題である。従って、多数の細胞を収集する細胞バンクこそ、このような課題への積極的な関与が求められているのである。

そこで我々は、こうした課題に積極的に取組み、培養細胞へのウイルス混入に関する精密な調査研究の持続的実施や、培養細胞の遺伝的な背景に関する調査研究を通じて培養細胞の品質評価法の開発を実施した。また、結論が得られたものについては速やかに細胞バンクの運営(分譲業務の実務)に取り入れて、ホームページを通じた利用者への情報公開を積極的に推進している。

### 分担研究者

水澤 博： 医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室 研究リーダー  
鈴木 治： 医薬基盤研究所生物資源研究部実験動物開発研究室 主任研究員  
小原有弘： 医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室 研究員  
内尾こずえ： 医薬基盤研究所生物資源研究部実験動物開発研究室 研究員  
清水則夫： 東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス学 教授

## 研究の目的

『医薬基盤研究所・生物資源研究部・細胞資源研究室』は、総合科学技術会議答申(第5号)に基づいて厚生労働省として創薬研究(医学研究を含む)の研究基盤を整備する目的で、ヒトを中心とした生物系研究資源の収集と品質の高度化を目指した研究を実施するものである。医薬基盤研究所細胞バンクは、かかる目的で各種疾病に由来するヒト培養細胞ならびに正常ヒト培養細胞を積極的に収集し、国の研究資産として保存管理している。その業務はおよそ次の5点に集約される。①培養細胞(研究資源・材料)の収集、②収集した培養細胞の増殖(複製)、③増殖した培養細胞の評価(品質管理)と培養細胞の標準化、④評価した研究資源の適切な保存管理(資産管理)、⑤保存している研究資源の研究者への提供(分譲)である。

当該業務を通じて収集した培養細胞は年間約3300アンプルが研究者に提供され、数多くの生命科学研究に利用されている。医薬基盤研究所細胞バンクはこのように国内外の生命科学研究を支援しており、研究の活性化に貢献している。それ故誤りのある細胞を分譲することは許されないことである。ところが培養細胞とは本来ヒトの体の中に存在している組織や細胞を体外に取り出して人工的に培養しているため、利用しやすい反面様々な誤謬を生じ易い研究材料であることがはっきりしてきた。過去の研究を洗い出してみると、数多くの研究が

誤った細胞を利用して進められてしまっていたという事実が明らかになると共に、汚染微生物の混入に気が付かないまま研究を進めていたという事実も明らかになってきた。特に20世紀末までの分子生物学研究は遺伝子の物質的な基礎に関する知見を集積し、様々な分析技術を開発してきた。こうした技術はそれまで不可能であった同種であるヒトに由来する細胞を相互に識別したり微量の混入微生物を高感度で検出することを可能にし、培養細胞をより厳密に管理手することが可能になった。

また、細胞を汚染する微生物としてはマイコプラズマや一部のウイルスが細胞と共存してしまうことがあることから、汚染が発生しても通常の培養によっては存在が認識されずに汚染した細胞を研究に利用している例も多発している。これもPCR法が開発されて以来分析技術の改良が進められて、微量混入微生物の高精度な検出が可能になったことによって明らかにされてきた。

本研究班は、こうした新しい遺伝子解析技術を積極的に導入して収集した培養細胞を継続的に調査することによって細胞の相互混入(クロスコンタミネーション)の有無を確認してきた。また、PCR法をさらに改良したリアルタイムPCR法によって培養細胞を汚染する可能性のあるウイルスの検出を試みてきた。特に、企業研究者が国内の細胞バンクから提供されている細胞を利用できないと考えていた大きな理由がウイルス検査を実施していないという理由であっ

たことから、この検査法の導入が急がれていた。幸い、近年の技術開発によりリアルタイム PCR 法が確立し、そのプライマーセットが分担研究者の清水らによって開発されたことから、その技術を積極的に導入してウイルス検査体制を確立することとした。検査結果の詳細は分担研究者の報告にゆだねるが、概観すると想定外のウイルスが検出されたケースはごく一部に限られ、各細胞について原報どおりの結果であった。この結果により、細胞バンクとして、ウイルスが検出されなかった旨証明書を発行することが可能になったことから、多くの研究者への貢献を果たすことが可能になった。

HeLa 細胞が樹立されてヒト培養細胞の長期継代技術が確立したが、これは同時に HeLa コンタミネーションと呼ばれる細胞誤認をもたらし、初代培養細胞だと信じられて樹立された多数のヒト細胞が実は HeLa 細胞であったという結末をもたらした(1978年)。しかし、この当時はアイソザイムと核型分析による方法しかなかったため一応の結論を得たとしても、当時は確定的な結論とするにはまだ不安が残ったために HeLa 細胞の兆候が見られるという注意書きを細胞に添付するにとどまっていた(ATCC のカタログによる)。そして、その後英国の Jeffreys の研究により始まった DNA フィンガープリント法はヒト細胞の識別を遺伝的に可能にすることから注目を浴びたが、実験として再現性に難点があったためその後さらに改良が進められた。その結果、

PCR 法を利用した STR 分析法へとより汎用性が高い方法に発展することになり、我々を含めて世界の細胞バンク関係者によって注目されてヒト細胞の識別に積極的に取り入れられることになった。この結果、HeLa 細胞の混入について確定診断をすることが可能になり、現在では ATCC も明確に HeLa コンタミであると記述するようになった。

我々もこの方法を 1999 年から導入してヒト細胞のクロスコンタミネーション調査を開始し JCRB 細胞バンクが収集したヒト細胞の約 6% に誤りがあったことを明らかにし、ホームページを通じてその情報を公開した。しかし、重要な点はこの問題の深刻さを研究者自信に十分に認識してもらわなければならない点で、細胞バンクにおける研究はそこまで責任を持たなければならない。そのため、クロスコンタミネーションを起こしている細胞の一覧表を雑誌に投稿して注意を促し、ホームページを通じてクロスコンタミネーションを実際に検出できるよう確認してもらおうようにすることなどが重要であると考えている。

その一環として昨年度からクロスコンタミネーションの分析を受託する検査を開始したが、同時に利用者が解析した結果を細胞バンクの STR データと比較して自らの細胞がユニークであるか否かを確認することが出来るホームページを作成して公開した。これにより各自が使っている細胞を細胞バンクのデータと比較してクロスコンタミが無いことを確認してから研究に取り掛

かれるようになるので、今後積極的に利用を促したいと考えている。

以上、紹介したように、当研究班は数多くの培養細胞を研究資源化する過程で不可欠な培養細胞の品質を評価する方法を検討すると同時に、目途がついた方法については収集した細胞を評価するために日常的な業務の中に組み込んでいく作業も実施している。それにより利用者である研究者に対して高度な品質を持った細胞を提供する基盤を確立することが可能になるものである。実際、細胞バンクが大阪に移転後品質管理体制を強化してきており、それと呼応するように分譲数も増加しつつある。品質管理体制の強化と分譲数の増加は無関係では無いものと信じている。

#### 研究方法

<新たな細胞資源の品質管理法・資源化法の開発>

・染色体詳細解析による品質評価方法に関する研究

染色体の基本的な分析手法であるDAPI染色法、G-バンド法、FISH法、アレイCGH法などを用いてH19年度は細胞バンクに新たに受け入れた細胞株と再測定した細胞株63種類について染色体数を測定し、それらの分布を調べた。

・遺伝子導入によるヒト由来細胞の資源化

ヒトテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) の遺伝子導入のためレンチウイルスベクターを作成した。

<汚染の無い高品質細胞資源供給基盤の構築>

・細胞資源同士の混入・入れ替わりの排除

プロメガ社製PowerPlex1.2を用いてSTR-PCR解析による細胞個別識別検査を行った。

・微生物汚染の排除

①ウイルス検査

培養細胞からAmersham社製 GenomicPrepもしくは、QIAGEN社製 AllPrepを用いてゲノムDNAを抽出し、東京医科歯科大学清水らの方法で14種類のウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた検査用プレートを検査に使用した

②マイコプラズマ汚染検査

検査試料となる培養上清を用意し、MycoAlert Reagent, MycoAlert Substrateを溶解させた。室温で15分間静置し、検査試料 (100  $\mu$ L) にMycoAlert Reagent (100  $\mu$ L) を加えて、室温で5分間静置した。ルミノメーターで測定 (測定値A) 後、MycoAlert Substrate (100  $\mu$ L) を加え室温で10分間静置し、ルミノメーターで測定 (測定値B) した。判定は測定値BとAの比率を求め (B/A)、比率が1以上の時をマイコプラズマ陽性と判定した。

<ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析による標準化された細胞の構築>

・新たな生物資源プロファイル法の開発

モルモット下垂体よりmiRNAの分離とその分子群のシーケンスを求めた。

1) モルモット下垂体:

RNA Later (Qiagen) で保存されたハートレー成熟雄の下垂体組織をフナコシより購入した。

#### 2) RNA 抽出 :

miRNAeasy Mini kit (Qiagen) と FlashPAGE (Ambion) により 40nt 以下の RNA を抽出した。

#### 3) サブクローニング :

Small RNA Cloning Kit (Takara Bio) により miRNA 由来 cDNA を増幅した。得られた 20-40nt 程度の cDNA でコンカテマー (3-5 個連結したもの) を作成し、pUC118 ベクターに結合した。大腸菌 DH10B 株へベクターを導入後、得られたコロニーをピックアップし、インサートの配列をシーケンスした。

#### 4) シーケンス解析 :

得られたシーケンス群について

miRBase

(<http://microrna.sanger.ac.uk/>) に登録されている miRNA 配列データと照合、比較した。

#### 結果及び考察

＜新たな細胞資源の品質管理法・資源化法の開発＞

ヒトテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) の遺伝子導入のためレンチウイルスベクターを作成し、ヒト細胞の不死化法に関する技術開発を行った。これにより間葉系幹細胞の不死化技術を確立することで、様々な生体機能を有した細胞の構築が可能となり、創薬への応用が期待できる。今後実際の細

胞の不死化を行い、有用細胞の構築を目指す。また、染色体詳細解析を実施することにより、細胞の設計図ともいえるゲノムの変化を鋭敏に捉えられる技術開発を行った。本方法の応用により、より詳細なゲノム解析が可能となり、細胞バンクで保有する細胞の標準化を行い、研究者への情報提供を行うことを目的として、今後更なる検討を加える予定である。

＜汚染の無い高品質細胞資源供給基盤の構築＞

細胞資源のウイルス検査法を実施し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保するとともに、細胞資源のウイルス汚染状況の確認を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に 446 検体を検査し、48 検体でウイルス検査陽性の結果を得ることが出来、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。また、細胞のマイコプラズマ汚染検査に関する全国調査を実施し、1500 検体におよぶ検査を実施した結果、26% 程度の細胞においてマイコプラズマ汚染が認められる結果が得られた。今後、研究者への情報提供を行うとともに、更なる検査項目の追加を行い、世界最高水準の細胞資源を保有する細胞バンクを目指す。＜ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析による標準化された細胞資源の構築＞

細胞のキャラクタライズ情報として細胞の染色体情報の付加ならびに細胞の増殖過程を撮影した動画情報の付加を行い、

細胞を研究利用する研究者への情報提供を行った。また、生物資源のプロファイル法としてmiRNAの集団構成分析による種・系統の識別法を開発するため、モルモット下垂体のmiRNAをサブクローニングしたところ、モルモット独自の配列を有するmiRNAが見られ、種差を示すマーカーとしてのmiRNAの有用性が示唆された。さらに他の動物種のmiRNA集団との比較により種差マーカーとしての可能性を検討したい。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

(独) 医薬基盤研究所・細胞資源研究室はJCRB細胞バンクとして50種の新規細胞の収集、3400アンプルの分譲を行い、本研究を通じて新たな品質管理法開発による、細胞資源の品質高度化に取り組んだ。その結果ウイルス汚染検査実施は世界の細胞バンクに先駆けて我々の細胞バンクで確立することができた。今後、創薬・再生医療研究など多岐にわたる研究に供される細胞資源は、ますます高品質であることが要求されると考えられる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々は、本研究を通じて多くの研究者によって樹立された培養細胞の品質を高度化し、誤った細胞や汚染された細胞を排除するシステムを確立し運用している。さらに、誤謬や汚染を含む細胞を研究に利用することの問題点をホームページに掲載し、

正しい細胞を利用するよう積極的な啓蒙活動も行っている。これにより多くの研究者が誤謬や汚染を避ける必要性を強く認識するようになってきている。誤謬や汚染を含む研究材料を使った研究がどれほど研究費を浪費するかを考えれば、こうした細胞バンクの活動やそれを整備するための研究には極めて大きな社会的また学術的意味が強くある。

##### 3) 今後の展望について

JCRB細胞バンクが分譲した細胞数は本年度3400アンプルにも登り、年々増加傾向にある。これは培養細胞を用いた研究が広く普及したことと、保有する細胞資源の数が増加しているのに比例していると考えるのが妥当である。しかし、細胞を用いた研究にはトレンドのようなものがあり、現在は再生医療・細胞治療の実現に向けた研究への応用技術開発に力が注がれており、細胞バンクからも分化能を有する細胞の分譲が増加した。これにあわせて品質管理に注目する研究者が増え、将来ヒトへの適用を視野に入れ、細胞の汚染特にウイルス汚染に非常に関心がもたれているのが現状である。世界に先駆けて全保有細胞のウイルス検査情報提供を確立することにより、より品質の高い細胞を提供する細胞バンクとの認知度を上げ、他の細胞バンクとの差別化につながることを期待している。また、研究者のニーズに合わせた細胞の供給を実現するため、不死化細胞の樹立開発、ヒトES細胞をはじめとする分化能を有す



る細胞の供給体制を確立し、厚生労働省の細胞資源バンクとして確固たる地位を築きあげることが目標としたい。

## 5. 結論

細胞資源のウイルス検査の実施ならびに新たなる品質評価法の開発を実施し、細胞資源の高度化を行った。細胞資源バンクが果たすべき役割を担うことで、研究者が安心して利用できる細胞資源の確立に努めた。

今後、日本の厚生労働省の細胞資源バンクとして国家の生命科学研究の推進に貢献する研究基盤の構築を目指すものである。

## 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告書

### 細胞資源の資源化・研究利用に関する研究

分担研究者 増井 徹 (独)医薬基盤研究所・生物資源研究部 研究員  
協力研究員 竹内 昌男 (独)医薬基盤研究所・生物資源研究部 技術補助員  
協力研究員 竹内 喜久子 (独)医薬基盤研究所・生物資源研究部 技術補助員

#### 研究要旨

我々厚生労働省の細胞バンクである JCRB 細胞バンクでは 1000 株にもおよぶ細胞資源を保有しており、年間 3400 アンプルを提供している。細胞のキャラクタライズ情報として細胞の染色体情報の付加ならびに細胞の増殖過程を撮影した動画情報の付加を行い、細胞を研究利用する研究者への情報提供を行った。今後、更なる検査項目の追加を行い、世界最高水準の細胞資源を保有する細胞バンクを目指す。

#### A. 研究目的

生体組織幹細胞 (Tissue-specific stem cells) は損傷組織の再生や組織の恒常性 (homeostasis) 維持には無くてはならない細胞である。特に、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell) は自己複製能だけでなく、親細胞と異なる表原型をもつ細胞になりうる多分化能の細胞であるので、再生医療では大きな期待が寄せられている。しかし、これらの細胞を移植して疾患の治療に利用するには、まだかなり高いハードルを越えなければならない。その一つは、幹細胞の増幅である。生体から単離した幹細胞の治療に必要かつ十分な量を確保するためには細胞を増やさなければならない。細胞には寿命があるので、当然増幅にも限界が伴う。そこを越える 1 つのモデルとして、本研究ではヒト臍帯血、骨髄由来の間

葉系幹細胞にヒト telomerase reverse transcriptase (hTERT) やヒトがん遺伝子 HPV16E6/E7 や Bmi-1 遺伝子を導入することにより無限増殖を獲得した細胞株を用いて増幅による染色体の変化を解析し、再生医療への適用の可能性と問題点を検討した。また、細胞のキャラクタライズ情報として重要な細胞増殖過程の動画撮影を行い、公開を行った。

#### B. 研究方法

##### 1) 細胞培養

ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞 2 種類、UCBTERT-21 (JCRB1107) と UCB408E6E7 TERT-33 (JCRB1110)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 2 種類、UE6E7T-3 (JCRB1136) と UBE6T-6 (JCRB1140) は当 JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) で seed stock として保存さ

れた標品を使用した。臍帯血由来間葉系幹細胞株、UCBTERT-21 は hTERT 遺伝子のみで、UCB408E6E7TERT-33 は hTERT と HPV16E6/E7 の組み合わせ遺伝子により不死化したものであり、Plusoid M (Med-Shirotori Co. Japan) 培地で培養した。また骨髄由来間葉系幹細胞株、UE6E7T-3 は hTERT と HPV16E6/E7 遺伝子で、UBE6T-6 は hTERT, HPV16E6 そして Bm-1 遺伝子の組み合わせ導入により不死化したものであり、Poweredby 10 培地 (Med-Shirotori Co. Japan) で培養した。培養開始の細胞密度は 2000 cells/cm<sup>2</sup> で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。PDLs の計算は次の式に従った： $PDLs = \log(\text{cell output}/\text{cell input})/\log 2$ 。本実験で培養を開始したときの PDLs は、UCBTERT-21, UCB408E6E7TERT-33, UE6E7-3 と UBE6T-6 それぞれ 42, 67, 40 と 56 であった。これらの細胞の取扱いについては、すべて当研究所の倫理委員会の承認を得ている。

## 2) 染色体解析

細胞は直径 100mm のプラスチックディッシュで培養し、継代後約 2 日目にコルセミドを加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、トリプシンで剥離し、ディッシュから回収した。次に 0.075M・KCl 低張処理後、カルノア液で固定した。染色体数の測定には metaphase spread chromosome を DAPI 染色し、Axioplan II imaging microscope (Carl Zeiss, GmbH) で観察し、プログラムソフト LeicaQFISH を用いて画像の取得と解析をした。pFISH 解析には 13 番染色体、

17 番染色体に特異的なプローブ (XCP13 - kit - FITC, XCP17 - kit - Texas Red) (MetaSystems, GmbH) を、mFISH の解析にはマルチカラープローブ (24Xcyte-MetaSystems' 24color kit) を用いた。方法は MetaSystems 社のプロトコールに従った。FISH 像は Zeiss Axio imaging microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH) で観察し、プログラムソフト mBAND/mFISH (MetaSystems, GmbH) で解析した。

## 3) CGH アレイ解析

サンプル DNAs は約 106 の細胞から isolation kit (Amersham BioSciences, UK) と Spin Column (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。標準 DNAs (Promega Co. USA) と試験 DNA はそれぞれ Cy3 または Cy5 (BioPrimer DNA Labeling System, Invitrogen Co., Japan) で標識し、Cot-1 DNA とエタノールで共沈殿し、ハイブリダイゼーションキット (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2xSSC, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH7) に溶かした。75°C 10 分処理で DNA を変性したのち、BAC Array (MAC Array<sup>TM</sup> Karyo 4000 Component, Macrogen Co., USA) で 42 °C、48-72 時間ハイブリダイゼーションした。50% formamide - 2x SSC (pH 7.0) で 50°C、15 分間、2x SSC - 0.1% SDS で 50 °C、15 分間洗浄し、100 mM sodium phosphate buffer (0.1% Nonidet P-40 (pH 8) を含む) で洗浄したのち各スポットの蛍光量を GenePix4000A (Axon Instruments, USA) で

測定し、MacViewer (Macrogen Instruments, USA) を用いてデータを解析した。

### C. 研究結果

〈細胞株の品質管理のための染色体解析と細胞増殖過程の動画取得〉

染色体の基本的な分析手法である DAPI 染色法、G-バンド法、FISH 法、アレイ CGH 法など、染色体解析に必用な実験プロトコールを前年度まで設定した。これらの手法を必要に応じて改良し、H19 年度は細胞バンクに新たに受け入れた細胞株と再測定した細胞株 63 種類について染色体数を測定し (表 1)、それらの分布を調べた。測定結果はすでに報告されている細胞株のデータとほぼ矛盾がなかった。6 種類の細胞株の Gバンド染色法によるカリオタイプを測定した。

すでに報告されている細胞株の染色体数においては、それらとほぼ同じ結果を得たが、1 種の細胞株に違いが見出された。JCRB 1201: 細胞名 GCH-nu-YS 株は hydatid mole から樹立され、雌雄は female として寄託されたが、Y 染色体に対する painting FISH 法での解析から male であることを確定した (STR-PCR の結果とも符号する)。これらの全てのデータを HP より公表した。

動画撮影は培養容器底面に付着性の細胞株、13 株を撮影し、1~3 日間での細胞の動態、増殖状態の画像を納め、ウェブサイトから公開した。

〈長期培養による染色体構成の不安定性

(中心体の関与の可能性) 〉

骨髄由来や臍帯血由来のヒト間葉系幹細胞株を長期培養すると、染色体の構成が変化することを報告した (1~3)。その中で、UE6E7T-3 細胞は特徴ある変化を示した。樹立直後 diploid ( $2n$ , 染色体数モード 46) を示していたが、PDL86 頃から染色体数 43~45 の near-diploid が出現した。これには常に 13 番染色体 2 本のうち 1 本の消失を伴っていた。PDL147 においては near-diploid と染色体数 76~86 本の near-tetraploid の二つの細胞集団になった。Near-tetraploid では 13 番染色体が 2 本であり、4 本ではなかった (図 1)。正常分裂では中心体が細胞当たり 1~2 個あるが (図 2A)、UE6E7T-3 細胞では near-diploid 出現時期の少し前に細胞当たり 3 個以上の中心体をもつ細胞が増加しはじめ、near-diploid の細胞集団の増大と並行した (図 2B-G)。染色体数の異常への中心体関与をさらに確かめるために同バンク保存の間葉系幹細胞株 8 種類について調べた (図 3)。これらの細胞群は 2 つのグループに分けられ、1 つはプライマリー細胞 3 種 (UCB302MS, Yub622, PL-502) と hTERT で不死化された臍帯血由来間葉系幹細胞である UCBTERT-21 で染色体数  $2n$  の 46 本持っている細胞が集団の 90%以上占めていた (青棒)。それらの個々の細胞が中心体数 3 個以上を持つものは集団の 4%以下であった (赤棒)。他の 1 つのグループはがん遺伝子を導入した細胞群の 4 種で、各染色体数モードとモードが占める比率はそれぞれ、UBE6T-6

はモード 44 本、比率 44%、UE6E7T-11 はモード 46 本、比率 36%、UCB408E6E7TERT-33 ではモード 88 で比率 28%、そして UE6E7T-3 ではモード 44 で比率 26%であった。それらの細胞株の中心体数も異常で、細胞当たり 3 個以上もつ細胞が 16~36%と高い値を示した。

#### D. 考察

<長期培養による染色体構成の不安定性 (中心体の関与の可能性)>

UE6E7T-3 細胞は樹立直後 diploid (2n, 染色体数モード 46) を示していたが、PDL86 頃から染色体数 43~45 の near-diploid が出現し、常に 13 番染色体 2 本のうち 1 本の消失を伴っていた。PDL147 では near-diploid と染色体数 76~86 本の near-tetraploid の細胞集団 2 つになった。Near-tetraploid では 13 番染色体が 2 本であり、4 本ではなかった (図 1)。この結果は、near-tetraploid 形成が near-diploid の細胞分裂時の細胞質不分離に由来することを示唆している。培養細胞の染色体数変化には、がん細胞で提出されているようないくつかの機構が考えられるが、その一つに紡錘体形成に関わる中心体の関与がある。正常分裂では中心体が細胞当たり 1~2 個あるが (図 2A)、UE6E7T-3 細胞では near-diploid 出現時期の少し前に細胞当たり 3 個以上の中心体をもつ細胞が増加しはじめ、near-diploid の細胞集団の増大と並行する (図 2B-G)。この結果は細胞周期と中心体周期の同期が崩れ、過剰の中心体が

染色体二極分配を乱していることを示唆している。染色体数の異常への中心体関与をさらに確かめるために同バンク保存の間葉系幹細胞株 8 種類について調べた (図 3)。これらの細胞群は 2 つのグループに分けられ、1 つはプライマリー細胞 3 種 (UCB302MS, Yub622, PL-502) と hTERT で不死化された臍帯血由来間葉系幹細胞、UCBTERT-21 で染色体数 2n の 46 本持っている細胞が集団の 90%以上占めていた (青棒)。それらの個々の細胞が中心体数 3 個以上を持つものは集団の 4%以下であった (赤棒)。他の 1 つのグループはがん遺伝子を導入した細胞群の 4 種で、各染色体数モードとモードが占める比率はそれぞれ、UBE6T-6 はモード 44 本、比率 44%、UE6E7T-11 はモード 46 本、比率 36%、UCB408E6E7TERT-33 ではモード 88 で比率 28%、そして UE6E7T-3 ではモード 44 で比率 26%であった。それらの細胞株の中心体数も異常で、細胞当たり 3 個以上もつ細胞が 16~36%と高い値を示した。これらの結果から過剰の中心体をもつ細胞では過剰の極から染色体の異常の分配を起こし、染色体異数性を形成する可能性が示唆された。がん遺伝子による細胞の不老化がその細胞の中心体を過剰形成させる原因になるのかは今後の課題である。

#### F. 研究発表

学会発表

- (1) Masui, T., Kohara, A., Mizusawa, H. Revisited informed consent: how we can support blanket consent. 66 th Annual Meeting of the

Japanese Cancer Association. Oct., 2007.

- (2) 増井徹、小原有弘、水澤博 包括同意を支える施策について. 第18回日本疫学会学術総会 Jan., 2008.
- (3) 増井徹、小原有弘、水澤博ヒト研究資源の規制状況:包括同意の問題. 第80回日本組織培養学会大会 May. 2007.
- (4) 小原有弘 マイコプラズマ迅速検査法の紹介とその実践 第80回日本組織培養学会大会 May. 2007.
- (5) Arihiro Kohara High-Resolution Genomic Analysis of Immortalized Human Cells and Human Tumor Cells Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations. Oct. 2007.
- (6) 水澤博 厚生労働省 創薬医学研究用研究資源 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 Dec. 2007.
- (7) 小原有弘 培養細胞におけるゲノム・染色体解析の重要性 第29回日本バイオマテリアル学会大会 Nov. 2007.
- (8) Arihiro Kohara High-resolution genomic analysis of immortalized human cells and human tumor cells using array-based comparative genomic hybridization. 47th ASCB Annual Meeting Dec. 2007.

誌上発表

- (1) 小原有弘、水澤博、JCRB細胞バンク: 厚生労働省、細胞工学 2007;26(10):1177-8.
- (2) 水澤博、小原有弘、増井徹、我国におけるヒト研究資源の現状と将来、医学のあゆ

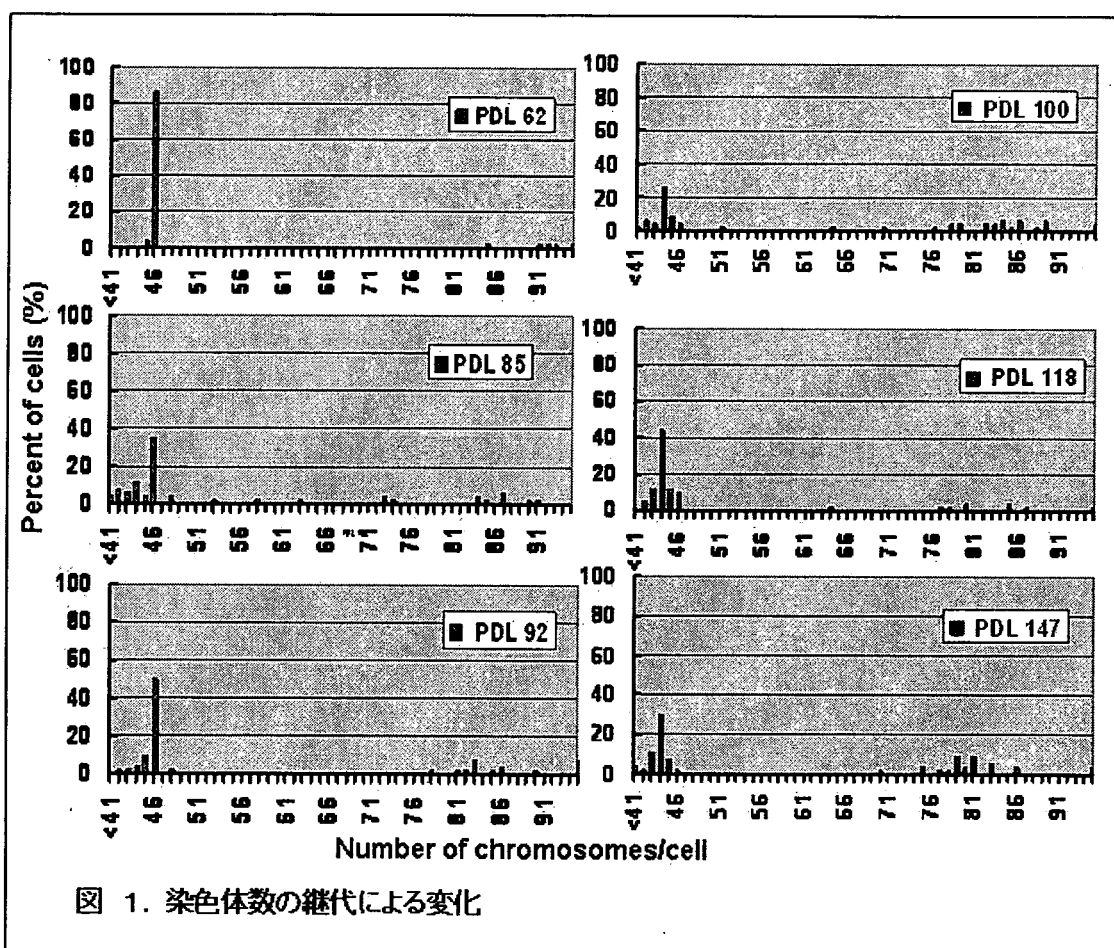
み 2007;222(2):113.

- (3) Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007 May 21;.
- (4) Ono K., Satoh M., Yoshida T., Ozawa Y., Kohara A., Takeuchi M., Mizusawa H., Sawada H., Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA, *In Vitro Cell.Dev.Biol. Anim.* 2007 43:168-175 (2007)
- (5) 小原有弘、大谷梓、小澤裕、塩田節子、増井徹、水澤博 培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査、*Tiss.Cult.Res.Commun.*26: 159-163(2007)
- (6) 水澤博、増井徹、竹内昌男、小原有弘 -190C気相式液体窒素保存システム、*Tiss.Cult.Res.Commun.*26: 155-170(2007)
- (7) 水澤博、小原有弘、増井徹 単行本: バイオ研究の舞台裏—細胞バンクと研究倫理— (ポピュラーサイエンス 282) 裳華房 (2007)
- (8) 水澤博、小澤裕、小原有弘、増井徹、佐藤元信、岩瀬秀、深海薫、西條薫、中村幸夫 培養細胞で頻発するクロスコンタミネーションへの警戒、*実験医学*、印刷中 (2008)
- (9) 竹内昌男 (独) 医薬基盤研究所。生物資源研究部  
ヒト幹細胞の染色体異常、*医学のあゆみ* (2007) 222 : 951

知的所有権の取得状況 なし

表 1 染色体測定および動画撮影の年間実績数

年	染色体測定した細胞数			動画撮影細胞数
	測定 総数	ウェブサ イト掲載	Gバンド染色法によ るカリオタイプ測定	
2005.4~2005.12	38	34	-	31
2006.1~2005.12	87	57	-	22
2007.1~2007.12	63	57	6	13



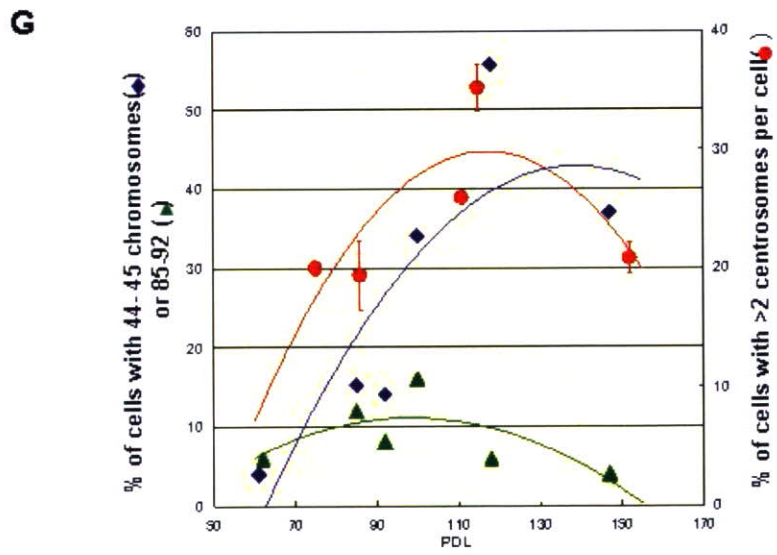
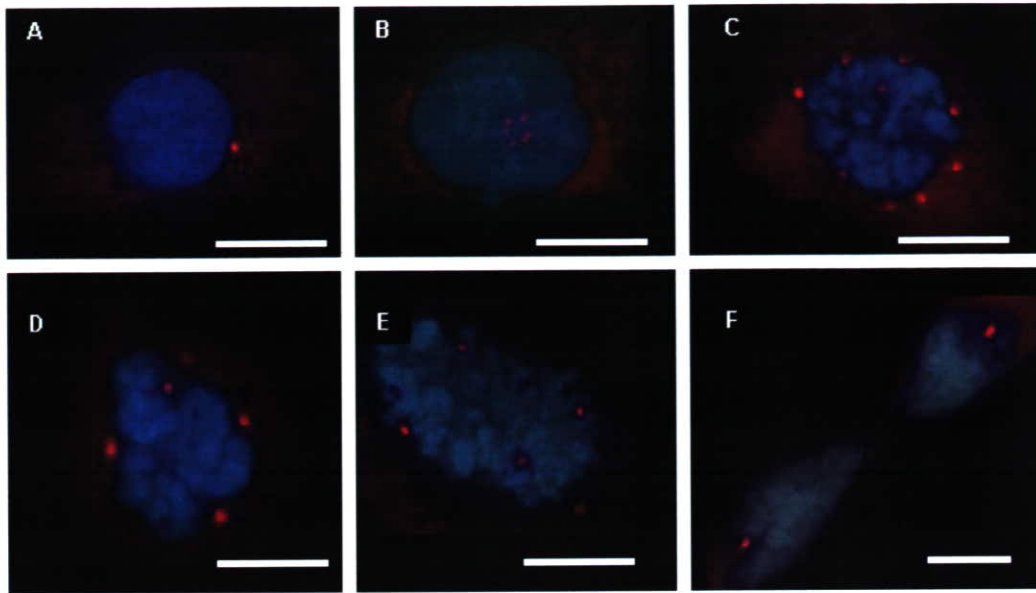
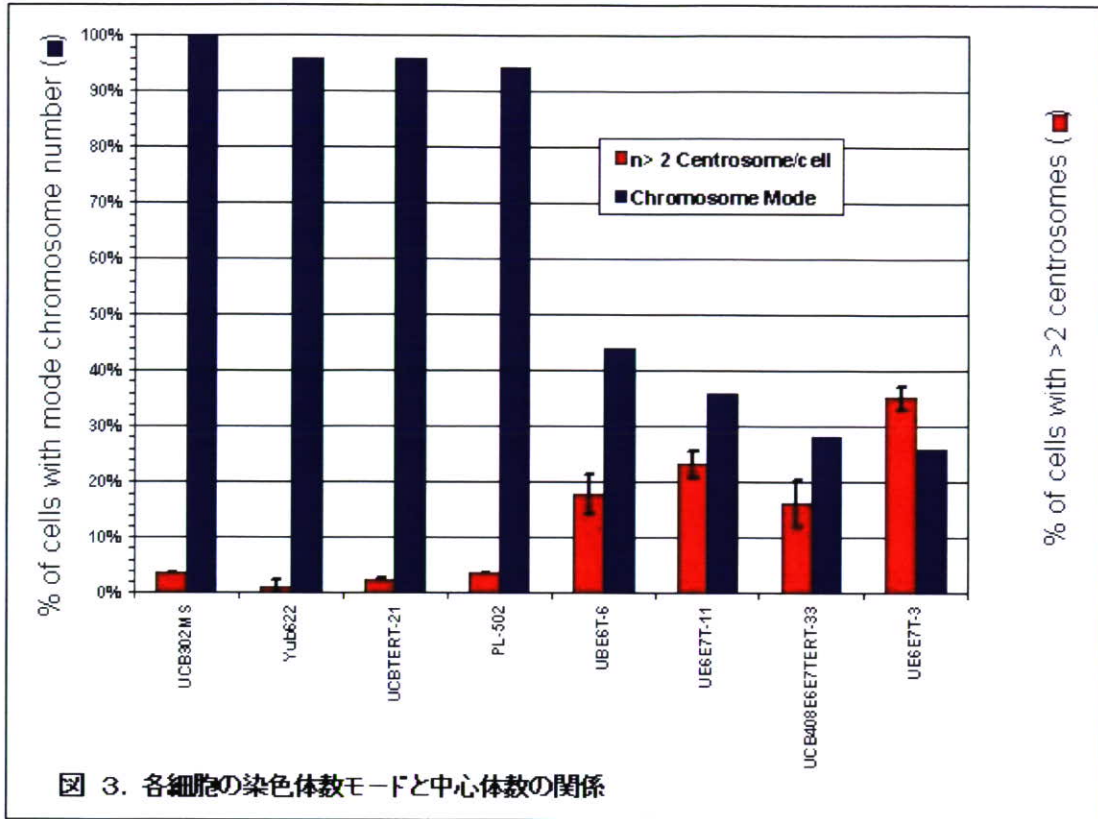


図 2. 中心体数と染色体モードの関係





## 細胞の研究資源化に関する包括的研究

分担研究者：水澤 博 医薬基盤研究所生物資源研究部 研究リーダー

細胞バンクは日常的に培養細胞を収集し品質管理を実施している。この一環としてクロスコンタミネーションの有無を確認する目的で STR 分析を実施してデータベース(STR profile database)を構築してきた(1999 年以来継続)。その結果多くのヒト細胞にクロスコンタミネーションのあることを明らかにしてきたが国際的にも大きな問題になりつつある。問題の解決には研究者の意識の向上が必用であるという米国の Nardone らの提言を受けて、個々の研究者が細胞バンクのデータを利用して細胞の比較確認を行うシステム(Matching analysis)を WEB 上に作成し公開した。これにより個々の研究者が直接クロスコンタミネーションの有無を確認できるようになるので、そうした意識の高まりが期待できる。

### A. 研究目的

培養細胞のクロスコンタミネーションを防止するには、研究者の意識の変革が必須である。そのために誤った細胞に関する情報を積極的に提供すると同時に、各研究者が自ら進んで培養ヒト細胞の STR 分析を実施してクロスコンタミネーションの無いことを確認するよう促すことが重要である。しかしこれを有効に機能させるには多数の細胞に関する STR プロファイルデータベースを提供して一般研究者が自由に利用できる研究基盤を構築する必要がある。このようなシステムの構築は細胞バンクに課せられた基盤整備の一環であると考えられる。そこで我々は個々の研究者のデータを JCRB 細胞バンクの STR プロファイルデータベースで検索して比較するシステム (Matching analysis) を作成

して公開することにした。これにより、個々の研究者はそれぞれが使用している細胞が正しいかどうかについて迅速に確認出来るようにした。こうしたシステムを公開することを通じて、細胞のクロスコンタミネーションを排除することの重要性の認識が研究社会で高まることを期待している。

### B. 研究方法

培養ヒト細胞の STR 分析はプロメガ社から提供されているプライマーセット、PowerPlex1.2 が世界の細胞バンクで利用されており、JCRB 細胞バンクにおいても当初からこのシステムを採用してきた。このシステムでは 9 箇所遺伝子座を調べて STR 領域の繰返し数と性染色体の組合せ (XX 又は XY) を検出するものである(表 1)。

表 1

ヒト培養細胞の個別識別に利用する 8 箇所の STR 領域と性別判定用の標的遺伝子

STR 領域	分布染色体	遺伝子定義	反復単位配列
D16S539	16q24-qter	非遺伝子領域	AGAT
D7S820	7q11. 21-q11. 22	非遺伝子領域	AGAT
D13S317	13q22-q31	非遺伝子領域	AGAT
D5S818	5q21-q31	非遺伝子領域	AGAT
CSF1PO	5q33. 3-q34	c-fms proto-oncogene	AGAT
TPOX	2pter-2p23	HUMTPOX	AATG
TH01	11p15. 5	HUMTH01	AATG
vWA	12pter-p12	HUMVWA31	AGAT
AmelogeninX	p22. 1-22. 3	HUMAMEL	非反復配列
Y	p11. 2	Y Amelogenin-like	非反復配列

プロメガ株式会社、Power Plex 1.2 System

表 1 に示したように各ローカスを検出するプライマーは PowerPlex1.2 によって提供されているものを利用し、ローカスの長さから各ローカスの短鎖繰り返し回数を測定した。現在、この PowerPlex1.2 が世界の細胞バンクで共通に利用されており検査が標準化されている。この測定から各遺伝子座の反復配列の繰り返し数を計算しそれをデータベースに登録した(表 2)。表 2 にデータベースの一部 (20 レコード) を例示したが、このデータベースには現在 830 レコードが記録されておりそのうち約 100 レコードが 2007 年度

に登録したふんである。このデータベースには JCRB 細胞バンクで収集した全てのヒト培養細胞の STR データが収録されており、これを STR プロファイルデータベースと呼んでいる (STR profile database)。また、新しくヒト培養細胞が寄託されるたびに STR 分析実験を行いそのデータを登録している。毎年新規寄託細胞が数十種類ずつ増えており、そのうちヒト細胞について STR プロファイルデータを登録している。その結果約 100 レコードが毎年新規データとして登録される。

表 2

細胞番号	細胞名	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
1	CCL 2.2	HeLa S3	11,12	13,3	8,12	9,10	16,18	7	X	8,12 9,10
2	CCL-171	MRC-5	11,12	11,14	10,11	9,11	15	8	X,Y	8 11,12
3	CCL-225	HCT-15	13	8,11	10,12	12,13	18,19	7,9,3	X,Y	8,11 12
4	CCL-23	HEp-2	11,12	12,13,3	8,12	9,10	16,18	7	X	8,12 9,10
5	CCL-243	K-562	11,12	8	9,11	11,12	16	9,3	X	8,9 9,10
6	CCL-87	Jiyoye	12	12	8,10	10,11	15,19	7,9	X,Y	6,8 10,11
26	IFO50025	IM-9	13	9,11	11,12	9,13	14,17	6,9,3	X	11 10,11
27	IFO50026	CCRF-SB	11,12	10,12	11,12	13	18	9,10	X,Y	8 10,12
28	IFO50028	EB-3	8,13	11,12	8,10	10,12	15,17	6,7	X,Y	8,11 12
29	IFO50037	RPMI 1788	12,13	11,13	10,12	10,13	18,19	6,9,3	X	8,9 10
124	JCRB0006	HL60RG	12	8,11	11,12	11	16	8	X	8,11 13,14
125	JCRB0006	HL60RG	12	8,11	11,12	11	16	8	X	8,11 13,14
126	JCRB0006	HL60RG	12	8,11	11,12	11	16	8	X	8,11 13,14
127	JCRB0019	K-562	11,12	8	9,11	11,12	16	9,3	X	8,9 9,10

128	JCRB0024	IM-9	13	9,11	11,12	9,13	14,17	6,10	X	11	10,11
129	JCRB0031	CCRF-HSB2	11,12	10,12	11,12	9,13	18,19	9,10	X,Y	8	10,12
130	JCRB0032	CCRF-SB	11,12	10,12	11,12	13	18	9,10	X,Y	8	10,12
131	JCRB0033	CCRF-CEM	12,13	11,12	9,12	10,13	17,19	6,7	X	8	11
132	JCRB0034	RPMI8226	11,13	11	9,10	9	16,18	8	X,Y	8,11	12
133	JCRB0041	HLCL-1	11,13	10,12	8,12	11	16,17	9	X,Y	9,11	11,12

注：細胞番号の項目にある CCL、IFO、JCRB は各細胞に添付された固有の番号で、CCL で始まるものは ATCC が管理している細胞、IFO は旧発酵研究所細胞バンクが収集した細胞、JCRB は当厚生労働省細胞バンクが収集した細胞である。このデータベースに主に記載されている細胞は JCRB の細胞でおよそ 650 レコード、IFO の細胞がおよそ 190 レコードである。CCL は数種のみである。

このデータを利用して、細胞間の相互比較  
を行いくロスコンタミネーションの有無を  
調査し、現在までに以下の細胞が誤って同定

されていたことを明らかにしてきた。この結  
果は既に過去の報告書に記載したが重要な  
ので再録する(表3)。

表3

登録番号	誤謬細胞名	誤った記述	正しい細胞株名	正しい細胞の由来	
1	IF050004	WISH	羊膜	HeLa	子宮頸がん
2	IF050039	NC-37	リンパ芽球(男)	Raji	パーキットリンフォーマ(男)
3	IF050079	Flow7000	正常皮膚上皮(男)	HeLa	微量 HeLa 混入
4	IF050290	Marcus	アストロサイトーマ(女)	RERF-LC-OK	肺がん
5	IF050315	RMG-11	卵巣中腎腫	RMG-1	卵巣中腎腫
6	IF050318	RTSG	卵巣未分化腺がん	SNG-11	子宮内膜腫瘍
7	IF050319	RMUG-L	卵巣嚢胞腺がん	SNG-11	子宮内膜腫瘍
8	IF050344	SK-MG-1	星状細胞腫	RERF-LC-OK	肺がん(女)
9	IF050360	KNS-89	グリオブラストーマ(男)	U-251MG	アストロサイトーマ
10	JCRB0067	Flow2000	正常皮膚上皮(男)	不明	他所の Flow2000 と一致せず
11	JCRB0073	J-111	単球性白血病細胞(男)	HeLa	子宮頸がん
12	JCRB0092	P39/TSU	骨髄芽球性白血病(男)	HL-60	単核球性白血病(女)
13	JCRB0122	K051	骨髄芽球性白血病(男)	K562	骨髄性白血病
14	JCRB0127	KOSC-3	歯肉扁平上皮がん(女)	Ca9-22	歯肉がん(女)
15	JCRB0128	TK-1	グリオブラストーマ(女)	U-251 MG	星状細胞腫(男)
16	JCRB0171	SKG-11	子宮内膜腫瘍	SNG-11	子宮内膜腫瘍
17	JCRB0224	WiDr	直腸がん(女)	HT-29	直腸がん
18	JCRB0253	MKN28	胃癌(女)	MKN-74	胃癌(男)
19	JCRB0604	PSV811	ウェルナー	WI-38	胎児肺正常細胞(女)
20	JCRB0710	EJ-1	膀胱がん(男)	T24	膀胱がん(女)
21	JCRB0744	ECV304	臍帯血上皮(女)	T24	膀胱がん(女)
22	JCRB0811	RERF-LC-OK	肺がん(女)	Marcus	星状細胞腫
23	JCRB1013	KA-S1	腎盂がん	mouse	マウス
24	JCRB1047	OVSAYO	卵巣癌	相互	OV 細胞相互の同定ミス
25	JCRB1049	OVMIU	卵巣癌	相互	OV 細胞相互の同定ミス
26	JCRB1050	OVMIU-11	卵巣癌	相互	OV 細胞相互の同定ミス
27	JCRB1070	HSG c-C5	唾液腺(男)	HeLa	子宮頸がん
28	JCRB1078	TMH-1	甲状腺がん(女)	IHH-1	甲状腺がん(男)
29	JCRB1127	HEC-155		HEC-180	
30	JCRB9016	FL	羊膜由来正常細胞	HeLa	子宮頸がん
31	JCRB9027	KB	口腔上皮がん	HeLa	子宮頸がん
32	JCRB9062	HS-sultan	形質細胞腫(男)	Jiyoye	男性、パーキットリンフォーマ
33	JCRB9066	Chang Liver	肝臓がん	HeLa	子宮頸がん
34	JCRB9094	DLD-1	大腸がん	HCT-15	大腸がん