

2008/10/3A

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20年度 総括・分担研究報告書

課題番号：H19-生物資源-指定-002

研究代表者 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：072-641-9811  
FAX：072-641-9851  
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成21年 4月10日

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20年度 総括・分担研究報告書

課題番号：H19-生物資源-指定-002

研究代表者 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：072-641-9811  
FAX：072-641-9851  
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成21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	
水澤 博	
2. 生物資源の遺伝解析プロファイリング	----- 15
鈴木 治	
3. 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	----- 20
古江 美保	
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	----- 35
小原 有弘	
5. 生物種の遺伝的プロファイル法の開発	----- 42
内尾こずえ	
6. マルチプレックスPCR法を用いたヒトウイルス検査に関する研究	----- 47
清水 則夫	
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 53

## 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

研究代表者：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。我々が取り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、異動物種細胞、同動物種細胞)。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り組み、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。

### 研究分担者

- 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  
古江美保： 医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室 研究員  
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3500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atalog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H20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、実際の遺伝子導入を行った。現

在、不死化の確認のため継続培養を実施している。

<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

1) シリアンハムスター下垂体

Slc:Syrian系シリアンハムスターの3週齢雌2匹より下垂体を採取し、すぐさま液体窒素下で凍結保存した。

#### 2) RNA抽出

microRNA isolation kit, Mouse Ago2 (和光純薬) を用いてAgo2に結合したmiRNAを下垂体より抽出した。

#### 3) miRNAのクローニング

Small RNA Cloning Kit (Takara Bio) によりmiRNA由来cDNAを増幅した。得られた40~60nt程度のcDNA (20ntほどのアダプター配列を含むので、実質cDNA長は20~40nt) でコンカテマー (5個以上連続したもの) を作成し、pUC118ベクターのPstI認識部位に挿入した。大腸菌DH10B株をベクターで形質転換後、得られたコロニーをピックアップし、挿入部位の配列をシーケンスした。

#### 4) シーケンス解析

得られた配列情報についてmiRBASE (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) にて既報miRNA配列情報に対するホモロジー検索を行った。

### 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。実際に遺伝子導入を行い、細胞のクローンを培養し、現在不死化を確認している。今後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511検体を検査し、43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、細胞のマイクプラズマ汚染検査に関する全国調査を実施し、2000検体におよぶ検査を実施した結果、24%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、シリアンハムスター下垂体のmiRNAをサブクローニングしたところ、技術的な問題は否めないもののシリアンハムスター独自の配列を有するmiRNAが見い出され、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、3500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3500アンプルにものぼり、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・iPS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

研究分担者	増井 徹	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	主任研究員
研究分担者	水澤 博	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	部長
協力研究者	平山 知子	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究者	竹内 昌男	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究者	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 3500 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

研究に用いる培養細胞の品質管理は非常に重要であり、研究によって得られた成果に非常に大きく寄与するが、研究者が研究に用いる培養細胞の品質に関心であるのが現状である。これまでに我々は細胞のマイクプラズマ汚染ならびにクロスコンタミネーションに関して国内培養細胞資源の調査解析を実施してきた。また、細胞バンクとして分譲する細胞の付加情報を整備することも非常に重要であると考えられる。

本研究では高発がん性遺伝病患者由来細胞を染色体の詳細変化を解析し、細胞の染色体解析情報を付加した。

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

JCRB3006: FA9JTO hTERT-1, JCRB3009: BCNS1K0 hTERT, JCRB3007: FA18JTO hTERT は MEM alpha with 20% heat inactivated fetal bovine serum にて, JCRB0302: XP2Y0 (SV), JCRB0309: GS20S は Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum にて, JCRB3008: GM1526 は RPMI1640 medium with 15% fetal calf serum にて培養を行った。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、テ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。

### 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、染色体解析に必要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、H20 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。その中でも、JCRB3006: FA9JTO hTERT-1, JCRB3009: BCNS1KO hTERT, JCRB3007: FA18JTO hTERT, JCRB0302: XP2YO (SV), JCRB0309: CS20S, JCRB3008: GM1526 について詳細な解析を実施した。

JCRB3006: FA9JTO hTERT-1

Fanconi anemia 患者由来の細胞であり、ヒトテロメラーゼ遺伝子の導入による不死化細胞であるが、染色体の詳細解析の結果 4 番染色体に付加が認められた (図 1)。また、付加した染色体を同定するために m-FISH を行った結果、付加した染色体は X 染色体の一部と 20 番染色体であることがわかった。

JCRB3009: BCNS1KO hTERT

基底細胞母斑症候群患者由来の細胞であり、ヒトテロメラーゼ遺伝子の導入による不死化細胞であるが、50 細胞中 40 細胞に 7 番染色体のトリソミーが認められた。また、9 番染色体 p12-13 領域にインバージョンが認められた (図 2)。

JCRB3007: FA18JTO hTERT

Fanconi anemia 患者由来の細胞であり、ヒトテロメラーゼ遺伝子の導入による不死化細胞であるが、染色体の詳細解析の結果 14 番染色体と X 染色体に付加が認められる細胞を確認した (図 3)。55 細胞を解析した結果、X 染色体に付加 (17 細胞)、14 番染色体に付加 (14 細胞)、通常核型 (23 細胞)、46, XY, der (21)t(11;21)(?:p11) (1 細胞)

胞)であった。

JCRB0302: XP2Y0 (SV)

色素性乾皮症患者由来の細胞であり、SV40large T antigen の導入による不死化細胞であるが、染色体の異常が非常に多く、染色体数の Mode は 73-74 であった(図4)。また、Dicentric, Tricentric, Ring, Abnormal monocentric chromosome 等、Chromosome Type の異常が約半数の細胞に観察された。

JCRB0309: CS20S

Cockayne syndrome 患者由来の細胞であり、染色体解析においては正常核型を示した。

JCRB3008: GM1526

Ataxia telangiectasia 患者由来の細胞であり、24 細胞の解析において 13 細胞に 2 番染色体と 14 番染色体の相互転座が認められた(図5)。

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、ウェブサイトに公開した。

#### D. 考察

<細胞株の品質管理のための染色体解析>

高発がん性遺伝病患者由来細胞は京都大学放射線生物研究センターで長年にわたってコレクションされた細胞であり、JCRB 細胞バンクに一括寄託された。本細胞のコレクションは非常に貴重なコレクションであるが、これまで分譲に関する品質管理を実施していなかった。今後これらの細胞を用

いた研究を進展させ、遺伝病に関する新たな知見が得られるよう早急に分譲体制の整備を進める予定である。本年度はその細胞の一部に関して品質管理を実施し、細胞キヤラクタライズ情報を付加のために染色体解析を実施し非常に有益な情報を得た。得られた情報は全て細胞の付加情報としてホームページ上で公開し、研究が有用活用できるようなシステムを構築した。

#### F. 研究発表

学会発表

- (1) Masui, T., Accrual on admission: Biobank Japan, Practical Biobanking, Manchester, UK, 30 June-1 July, 2008.
- (2) Masui, T., Human Experimentation and Biobanks, in Reflections-Disciplinary and Regional Challenges in the Context of Multidisciplinary Research and Globalization. Closing Plenary Session, Governing Biobanks, Oxford, UK, 24-26 June, 2008.
- (3) Masui, T., The Regulation of Cultured Cells and Cellular Productions for Transplantation: Current View of the Japanese Regulatory Process, in Current Status of Tissue Engineered Product Regulation: A Global View of Relationship of Science and Practicality. World Congress on In Vitro Biology, Tucson Arizona, USA, 15-18 June, 2008.
- (4) Masui, T. Human Tissue and Cell Banks in Japan. The 35th Annual Meeting of the Japan Society for Low Temperature Medicine. In Tokyo, 23 November, 2008

- (5) 増井徹、小原有弘、水澤博 Comparative Study of Bioresource Management in Cancer Genome Research. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月 29 日
- (6) 増井徹 海外の大規模人試料等の共有体制について 第 19 回日本疫学会学術総会 金沢、2009 年 1 月 23 日

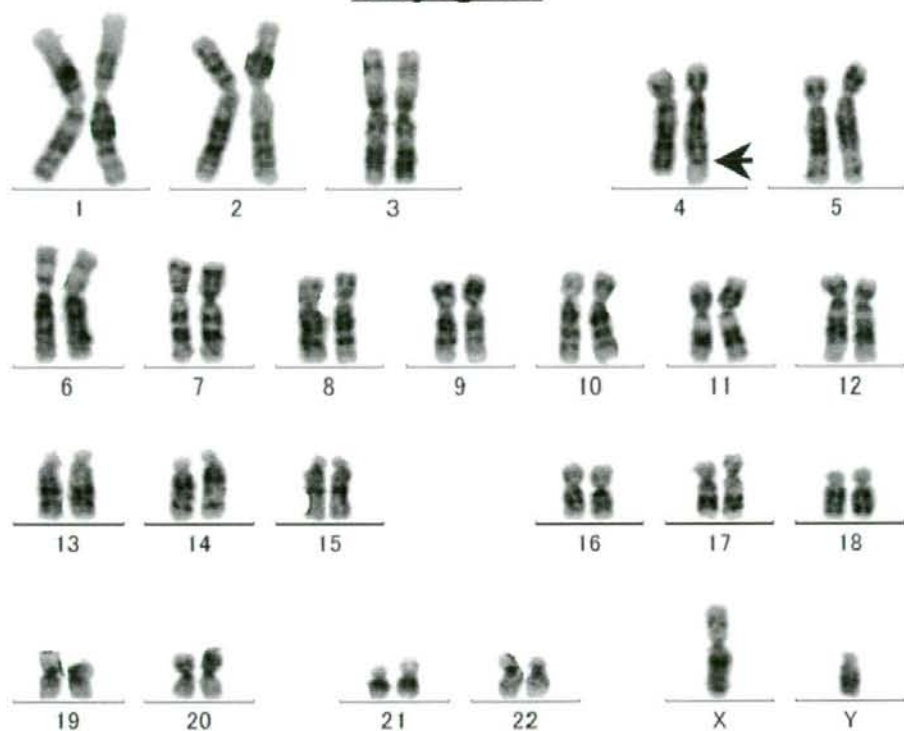
誌上発表

- (1) Masui, T., Governing UK Biobank: Mutual independency and fiduciary responsibility of EGC and of UK Biobank to society are essential. Ethics and Governance Council Work Review, 2008.
- (2) Masui, T. Trust and Creation of Biobanks: Biobanking in Japan and the UK. M. Sleeboom-Faulkner, ed. Human Genetic Biobanks in Asia: Politics of Trust and Scientific Advancement, Routledge Contemporary Asia Series, London: Routledge, pp66-91, 2008.
- (3) 増井徹. NCI 生物研究資源保管施設実務要領 (翻訳)、NCI Best Practices of Biospecimen Resources, 2007. 2009 ; 1-72.
- (4) 増井徹、1 章-6 細胞培養の倫理問題、特許、「培養細胞実験ハンドブック 改訂第 2 版 (仮題)」、羊土社、2008、pp49-54.
- (5) 岩志和一郎、甲斐克則、白井泰子、長谷川知子、増井徹共著、「生命科学と法」、尚学社、pp16-86、2008.
- (6) 増井徹「複数の『人の試料とデータのコレクション』を医学研究に利用するために」(William Lowrance, Access to collections of data and materials for health research. MRC and Wellcome Trust, March, 2006) 2008 : 1-57

知的所有権の取得状況 なし

JCRB3006:FA9JTO hTERT-1 (07242007)

Karyogram



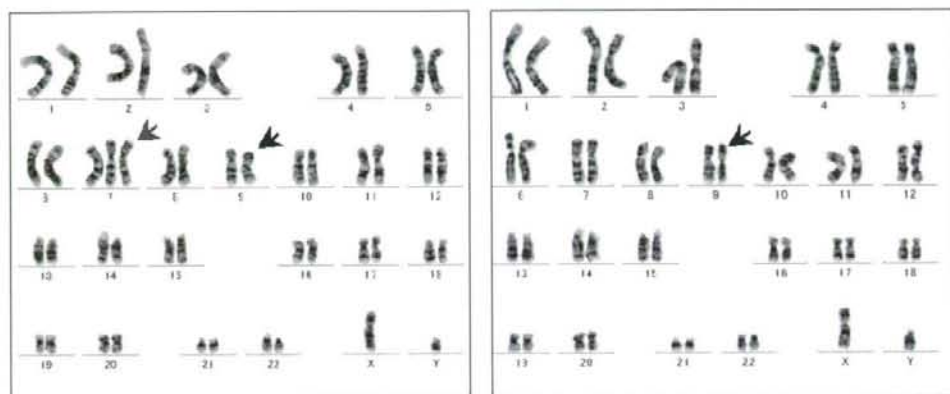
karyotype

**46,XY,der(4)add(4)(q33)del(4)(q33)**

図1 JCRB3006: FA9JTO hTERT-1 の G-band 法による染色体解析結果

## JCRB3009:BCNS1KO hTERT

### Karyogram



### Karyotype

47,XY,+7,inv(9)(p12q13)c [21] / 46,XY,inv(9)(p12q13)c [5]

(顕微鏡下で50細胞を観察した結果、+7は40細胞に認められた)

n=25

c=constitutional karyotype

図2 JCRB3009: BCNS1KO hTERT の G-band 法による染色体解析結果

## JCRB3007:FA18JTO hTERT(07282007)

### Karyogram

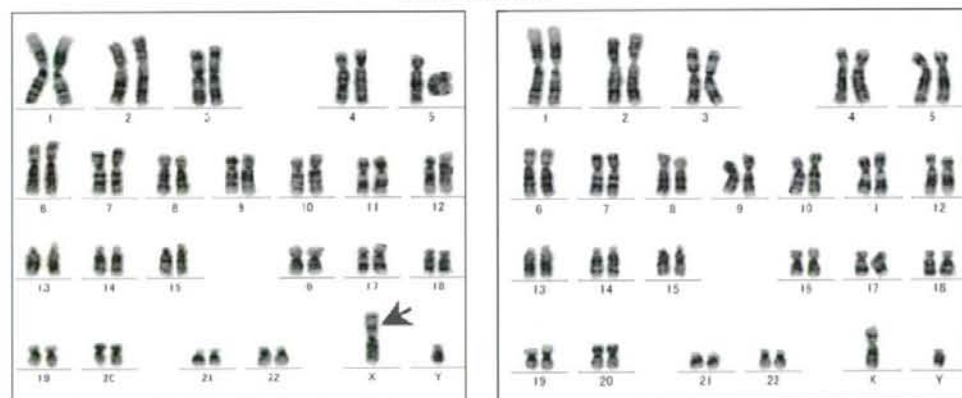


図3 JCRB3007: FA18JTO hTERT の G-band 法による染色体解析結果



**JCRB0302:XP2YO(SV) (04112008)**

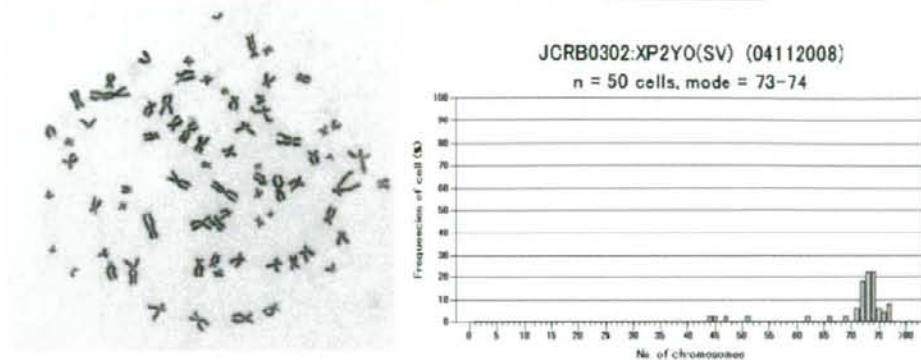


図4 JCRB0302: XP2YO (SV) 染色体のギムザ染色像と染色体数の分布

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

生物資源の遺伝解析プロファイリング

研究分担者：鈴木 治（独）医薬基盤研究所生物資源研究部 主任研究員

研究要旨

生物資源の品質管理法の一手段、特に種・系統識別法として miRNA プロファイリングの応用を検討するため、昨年度のもルモット下垂体に続き、本年度はシリアンハムスターの下垂体より miRNA のクローニングを行った。特に今回は機能的 miRNA を取得できる抗 Ago2 抗体を用いたアフィニティ精製を利用した。技術的な問題のせいか、17-28 塩基長の small RNA クローンが 7 種しか得られなかったが、他動物種の既報配列との完全一致はなかったもののホモロジーは高く、シリアンハムスター独自の miRNA 配列と考えられた。昨年度の結果と同様、動物種特異的な miRNA の分子集団構成を検出できたことから、miRNA プロファイリングが動物種識別法として活用できる可能性を改めて確認できた。

A. 研究目的

生物資源を活用した生命科学研究の推進には、ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析を基にした生物資源の品質管理法の完備が必須である。

近年 20~24 塩基の microRNA (miRNA) による様々な生命現象への関与が指摘されている。既に 500 種以上の配列が報告されている miRNA の配列自体は種間でよく保存されている。しかし、ターゲットとなる mRNA の 3'-非翻訳部位の種間の保存性は一般に翻訳部位に比べてそれほど高くない。このことから生物種により miRNA の集団構成が異なることが推測される。すなわち、miRNA 集団構成の種差・系統差の情報を、生物資源の生物種・系統を識別する新たな品質管理法の可能性を示唆している。

そこで本研究では、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。特に種差を考慮するため、豊富なデータ蓄積のあるマウス、ラットの

情報を基礎として比較的遠縁の齧歯類を使用し、下垂体を対象臓器として miRNA の単離と種類の検索を行っている。

昨年度は、長さを指標にしてもルモット下垂体より miRNA に相当する RNA を回収した。しかし、この場合はあくまでも「長さ」でしか判定しておらず、実際に細胞内で miRNA として働いているものかは確証が持てない難点があった。近年の miRNA の細胞内動態研究の進展に伴い、機能的な miRNA が細胞内では Argonaute2 (Ago2; Mouse genome informatics では Eif2c2 が正式名称) 蛋白質に結合していることが判明したことから、この Ago2 蛋白質のアフィニティ精製を利用して miRNA を回収するキットが和光純薬より発売された。本年度はこのキットにより、シリアンハムスター下垂体で Ago2 に結合して存在する miRNA のクローニングを試みた。

B. 研究方法

1) シリアンハムスター下垂体

Slc:Syrian 系シリアンハムスターの 3 週齢雌

2匹より下垂体を採取し、すぐさま液体窒素下で凍結保存した。

#### 2) RNA 抽出

microRNA isolation kit, Mouse Ago2 (和光純薬)を用いて Ago2 に結合した miRNA を下垂体より抽出した。

#### 3) miRNA のクローニング

Small RNA Cloning Kit (Takara Bio) により miRNA 由来 cDNA を増幅した。得られた 40~60nt 程度の cDNA (20nt ほどのアダプター配列を含むので、実質 cDNA 長は 20~40nt) でコンカテマー (5 個以上連結したもの) を作成し、pUC118 ベクターの PstI 認識部位に挿入した。大腸菌 DH10B 株をベクターで形質転換後、得られたコロニーをピックアップし、挿入部位の配列をシーケンスした。

#### 4) シーケンス解析

得られた配列情報について miRBASE (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) にて既報 miRNA 配列情報に対するホモロジー検索を行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、(独) 医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行った。

### C. 研究結果

シリアンハムスター下垂体 2 個 (4.6 mg) より Ago2 に結合していた miRNA 分画を抽出し、Small RNA Cloning Kit のマニュアルに従い miRNA 由来 DNA を PCR により増幅し、ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) にて産物のサイズを確認した (図 1)。60-80 nt 付近のバンドを切り出して抽出したのち、制限酵素 Sse8387I 処理によりアダプター配列中の PstI/Sse8387I 部位で切断した。PAGE 後 (図 2)、40-60 nt 付近のバンドを回収し、T4 DNA ligase によりお互いを結合させ (コンカテマー形成)、2% アガロースゲル電気泳動を行い (図 3)、100~700bp の部分から DNA を抽出した。

回収した DNA をベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して得られたコロニー 192 個からコロニーダイレクトシーケンスによりインサ

ートのシーケンスを求めたところ、137 個で配列が決定できた。しかし、コンカテマー構造を考慮して想定される small RNA 配列を決めたところ (決定例: 図 4)、6 個のコロニーから Small RNA シーケンスが合計 8 個で 7 種類しか得られなかった (図 5; 長さの範囲: 17-28nt)。miRBASE による検索では既報配列に完全に一致するものはなかったが、高いホモロジーを示す分子種が見られた (図 6)。

### D. 考察

昨年度のモルモットの場合とは異なる miRNA の抽出方法を採用したが、技術的な困難さが否めなかった。抗 Mouse Ago2 抗体を利用して Ago2 結合 RNA を回収する方法は、機能的な miRNA を回収する優れた方法と思われたが、本来マウス用の抗体のためか、収率が非常に低かった。キットの添付書類にはチャイニーズハムスターの適用例が記載されているものの、シリアンハムスターの適用例は掲載されておらず、シリアンハムスターでの結合効率が低い可能性がある。出発材料の量など、実験条件・実験手技の検討が必要である。

しかし、少ないながら small RNA のシーケンス情報が得られた。配列の類似性から 2 群に分けられた (図 5)。前者 7 種は miR-105 や miR-249 と、後者 1 種は miR-1497 や miR-548 とのホモロジーが高く (図 6)、miRNA としての機能を示唆している。技術的な問題点はあるが、昨年度に続き、本研究においても種特異的な miRNA 群が得られた。このことから miRNA の配列や集団構成には種差があり、このことは種を判別する方法として miRNA プロファイリングが活用できることを示唆している。

### E. 結論

シリアンハムスター下垂体の miRNA をサブクローニングしたところ、技術的な問題は否めないもののシリアンハムスター独自の配列を有する miRNA が見い出され、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。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

なし。

### 2) 学会発表

1. Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Differential solubility analysis of fractionated heart proteins in laboratory animals. Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA, 2008年4月
2. 鈴木 治, 揚山 直英, 寺尾 恵治, 「心筋症サルの心臓における6型コラーゲンの量的変化」, 第55回日本実験動物学会総会, 仙台, 2008年5月
3. Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Cloning of Pituitary microRNAs in the Guinea Pig. 90th Annual Meeting of The Endocrine Society, San Francisco, CA, USA, 2008年6月
4. 鈴木 治, 小浦美奈子「卵巣移植による凍

結保存卵巣由来シリアンハムスター産仔の作出」第101回日本繁殖生物学会総会, 福岡, 2008年10月

5. Suzuki O. Quantitative comparison of ovarian FSH-receptors among six mouse strains. 59th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Indianapolis, IN, USA, 2007年11月
6. Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Comparison of ovarian luteinizing hormone receptors among mouse strains. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA, 2008年12月
7. Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Successful cryopreservation of Syrian hamster ovaries by vitrification. 35th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, San Diego, CA, USA, 2009年1月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

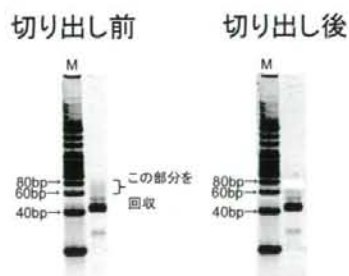


図1. シリアンハムスター下垂体 miRNA 由来 cDNA 増幅産物の泳動像とその切り出し。10%TBE ゲルによる PAGE。M: 20 bp ラダー。