

表 4: 前立腺がん移植マウスにおける腫瘍部での由来組織割合 (全て移植腫瘍部)

移植代数	組織量割合*
5 代目 1(2325)	H>M
7 代目 2(2724)	H>M
4 代目 3(2249)	H=M
5 代目 4(2255)	H>>M
3 代目 5(2250)	H=M
5 代目 6(2308)	H=M
5 代目 7(2309)	H>M
6 代目 8(2556)	H>M
6 代目 9(2555)	H>>M
4 代目 10(2248)	H=M
5 代目 11(2262)	H=M
7 代目 12(2554)	H=M
7 代目 12(2554)	H=M
6 代目 13(2307)	H=M
6 代目 14(2509)	H>M
7 代目 15(2623)	H>M
6 代目 16(2624)	H=M
6 代目 17(2260)	H>M
8 代目 18(2557)	H>M
7 代目 19(2488)	H=M
6 代目 20(2326)	H>M
7 代目 21(2612)	H=M
5 代目 22(2261)	H=M

*H; Human, M; Mouse

胃がんスキルスにおける、最後2例(表 2 3代目-20と27)は、移植2代目の腫瘍より、特別な方法で凍結し、液体窒素で保存したものを、SCIDマウスに再移植したものである。凍結保存-再移植しても、自然遠隔転移することがわかった。表4は、前立腺がん移植の例であるが、このヒト前立腺がん組織は、すべてヒト組織由来であったが、調べた限り、自然遠隔転移はみられなかった。以上の方法で、肺がん5件、膵臓がん3件、乳がん2件、食道がん2件、直腸がん1件、肝細胞がん2件についての自然遠隔転移は、胃がんスキルス同様、ヒト由来組織であることが判明した。

D. 考察

(1) SCID 移植正常ヒト甲状腺組織の自然および、放射線照射による遺伝子発現への影響

SCID 移植正常ヒト甲状腺組織の移植による自然遺伝子発現への影響については、移植前後の組織の遺伝子発現を比較することで、移植による変化が約1週間目まで現れ、その後4週間までは変化がないことがわかった。発現変化している遺伝子はほとんどの甲状腺組織に共通であり、細胞の変性、再生に関するものであった。これらのことは、発現変化は通常現象であること、また移植1週間までは、宿主であるSCIDマウスからの栄養や、酸素が不十分であるためと示唆される。

他方、放射線照射によって、遺伝子発現変化に共通する遺伝子はわずかであり、しかも高線量照射群でしかみられなかった。放射線照射による損傷は特定されるのではなく、ランダムな現象であると思われる。また、中性子線の遺伝子発現に対するRBE値(生物学的効果比)が4.2を示した。このことは、遺伝子発現変化の主因はDNAの2重鎖切断であることが示唆される。ヒト正常組織ではじめて環境の影響を直接しらべた報告であり、化学物質等の影響も検討できる系であることを示した。

(2) 移植ヒト腫瘍のマウス体内での移植部腫瘍および自然遠隔部腫瘍の種由来判定法

Super SCIDマウスでは、ヒト悪性腫瘍が自然遠隔転移する。ヒト胃がん(スキルス)、すい臓がん、前立腺がん等の移植SCIDマウス体内で、自然遠隔転移と思われる組織がみとめられた。ヒトがん組織が転移したものかをしらべるには、これまで組織標本による病理学的判別で行ってきたが、労力と時間がかかる上に微量ながん組織は見逃されやすい。迅速、かつ正確、客観的な方法の確立が必要となった。マイクロサテライト座は種特異的であるため、この性質を応用し、由来組織の判別に用いた。ヒトおよびマウスのマイクロサテライト座をPCR法により増幅し解析することで、転移とされる組織の由来が質的に判別可能となり、さらに、組織のおよその量比も、2,3日の短時間で判定できる方法が確立された。この方法は、DNA量を判定の基準としている。がん組織はしばしば染色体数の増減、LOH等がみられるので、DNA量と細胞数は正確には一致しない可能性がある。また、ヒトでは、マイクロサテライト座の長さは、個人に特異的であるため、PCRによる遺伝子増殖率が、個人で異なる可能性がある。また、標準DNAが、各個人の被検体がん組織に対する正常部位からのものが理想的である。入手困難

であるため、1個人からの正常DNAを使用したので、標準曲線が正確ではない。以上の如く、組織比に正確性を欠くが、迅速に結果が得られる利点がある。

E. 結論

ヒト甲状腺組織の移植による遺伝子発現は、移植後1週間目では約3%（4倍以上の発現変化）変化するが、その後4週間までは変化がない。放射線照射による発現異常の変化は、線量依存的に増加した。これらのことは、ヒト正常組織をSCIDマウスに移植しても、遺伝子発現の異常は1週間後からは、安定しているため研究に用いることができる。放射線照射による遺伝子発現の変化は、感度がよく、化学物質等の安全性研究に貢献できる系と示唆される。

ヒトがん移植 Super-SCID マウスでの自然遠隔転移組織が、ヒト由来組織であることを証明する迅速、かつ容易な方法を確立した。全工程は、2, 3日程度のため、迅速に、組織の由来判別が可能である。移植ヒトがんのマウス体内での遠隔移植腫瘍は、ほとんどが対応するヒトがん移植部からの転移であることが判明した。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiat. Res.* 173, 205–213, 2010.
2. Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. *Mutat Res.*, 696,107-113 2010
3. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。*Space Utiliz Res.* 26: 249-251, 2010.
4. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行

徳淳一郎、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究。*Space Utiliz Res.* 27: 107-110, 2011.

5. M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiat. Res.* 173, 205–213, 2010.
6. Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. *Mutat Res.*, 696,107-113 2010
7. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。*Space Utiliz Res.* 26: 249-251, 2010.
8. 野村大成、足立成基、梁治子、畑中英子、菊谷理絵、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二、D. K. Parida, R. I. Bersimbay。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究；放射線晩発影響の防護。*Space Utiliz Res.* 28(March), 2012.
2. 学会発表
 1. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。相模原、2010. 1. 26。
 2. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。相模原、2010. 1. 26。
 3. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究（2010年度ワーキンググループ活動報告）。相模原、2011. 1. 26。
 4. 野村大成、足立成基、梁治子、畑中英子、菊谷理絵、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行

徳淳一郎、若命浩二、D. K. Parida、R. I. Bersimbay 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究（2011年度研究グループ活動報告）。相模原、2012. 1. 23。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： 特になし

マイクロアレイを用いた継代維持ヒト組織の遺伝子発現の検索

分担研究者 梁 治子（独）医薬基盤研究所 プロジェクトサブリーダー

研究要旨：ヒト正常組織（甲状腺）は Super-SCID マウスへの移植によっても形態・機能がよく維持されている。より詳細な変化を確認するため、マイクロアレイを用い、ヒト組織の移植前後および放射線照射の影響による変化の有無を比べ、移植ヒト組織における継代・維持過程および放射線照射による影響での安全性を知る。

A. 研究目的

ヒトの正常臓器・組織は市販の SCID マウスには定着しない。野村らが改良した IgG、IgM 値が ELISA 法による値が検出限界以下の改良型 SCID マウス（Super-SCID）を用いることにより、ヒト組織・臓器の長期維持（～3 年）が可能になり、しかも、形態・機能は長期維持期間中にも保持されることがわかった（Nomura, et al, 1997）。このことから、初めてヒトの臓器・組織に対し、さまざまな物質の直接影響を調べることが可能になった。その中でも、甲状腺はヒト・動物の発達や成長に重要な内分泌器官の 1 つであり、放射線や内分泌かく乱物質に感受性が高い器官である。Super-SCID に移植した正常ヒト甲状腺の長期維持期間中（約 3 年）移植後約 1 週間目と比べ病理学的変化、マウス血清中のヒト甲状腺ホルモン（T3）量の変化はほとんどみられず、甲状腺刺激ホルモン TSH によく反応していることがわかっている（Fukuda, Nomura, et al, 1998）。より詳細な変化を検出するため、マイクロアレイを用い遺伝子発現の変化を調査する。

B. 研究方法

材料：ヒト甲状腺は、バセドウ氏病の患者（20 歳と 23 歳女性）より、美容上の理由で切除された甲状腺を共同研究者松塚博士（神戸、隈病院）より提供を受け用いた。これら患者の術前の甲状腺ホルモン値は正常範囲内であった。

ヒト甲状腺移植と放射線照射：手術により切除されたヒト甲状腺（上述）を、高濃度抗生物質を含む生食中で 5-6 mm 角に細かく切断し、Super-SCID（重度複合免疫不全）マウス（C57BL/6-*scid/scid*、または C.B17-*scid/scid*）の背中皮下に左右に 1 片ずつ移植した。ヒト甲状腺（20 歳女性）の SCID マウスへの移植前後の遺伝子発現変化を調べるために、移植後 1、2、3、4 週間目における遺伝子発現変化を調べた。

ヒト甲状腺（23 歳女性）の放射線照射は、移植マウスにガンマ線または中性子線を照射するこ

とで行った。中性子線照射は近畿大学原子力研究所原子炉（URT-KINKI）でおこなった。照射野での 1W の出力における線量率は、中性子線とガンマ線がそれぞれ約 0.2 Gy/h である。実際マウスを用いての線量測定を行い確認した。ガンマ線照射は大阪大学医学部 Gammacell 40 Exactor の ¹³⁷Cs-ray による。線量率は、1.19 Gy/min である。合計 23 片の移植甲状腺は、0.2 Gy（4 片）、0.4 Gy（4 片）と 0.6 Gy（3 片）の中性子線を、1.0 Gy（4 片）、2.0 Gy（4 片）と 3.0 Gy（3 片）のガンマ線を照射した。8 片は非照射であり、非照射の同期の control として用いた。放射線照射は SCID マウスに移植後 1 日目に行い、2 週間後移植甲状腺をマウスより摘出した。

ヒト甲状腺における遺伝子発現レベルの変化は、非照射対照群については、移植前の甲状腺の発現レベルと比較し、照射群については、同期の非対照群と比較することで行った。遺伝子発現は GeneChip（HG-Focus Array；ヒト遺伝子 8500 個、Affymetrix Inc）を用いた。

遺伝子発現の解析：SCID マウスより摘出したヒト甲状腺は、直ちに液体窒素で保存した。RNA 抽出は、液体窒素で保存したヒト甲状腺を液体窒素で凍結した金属ブロックで粉状にし（Cryopress, Microtec Co., Ltd）、Trizol（Invitrogen）中で homogenize したのち、抽出した。RNA 抽出から GeneChip 解析までは、Affymetrix 社のプロトコールに従って行った。発現解析は GeneChip operating software GCOS のより行った。（倫理面への配慮）

ヒト組織の SCID マウスへの移植に関しては、医薬基盤研究所および関連施設での研究倫理委員会の承認のもとに施行している。

手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持 SCID マウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」（代表・野村）、の課題で、倫理委員会の承認を得ている（添付）。手術時等で採取されるヒト甲状腺組織の譲渡に関しては、頭頸部（阪大耳鼻咽喉科猪原、隈病院松

塚)が医薬基盤研究所客員研究員等として参画し、厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除に関しては、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。動物実験に関しは、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、研究をおこなっている(添付)。梁(分担者)は、これらの申請課題での(代表者野村)研究者に含まれている。

C. 研究結果

SCID 移植正常ヒト甲状腺組織の自然および、放射線照射による遺伝子発現への影響

1、ヒト甲状腺の移植による遺伝子発現の自然変化:

遺伝子発現の変化は、移植前組織の発現と比較すると、4倍以上の発現変化がみられた遺伝子数は数移植後1週間目で約3%であったが、2, 3, 4週間目ではそれ以上の変化はなかった(表-1、Mutat. Res, 2008)。これら変化のあった遺伝子は34遺伝子であり、ほとんどの非照射群に共通してみられ(図-1、Mutat. Res 2010)細胞の変性、再生に関する遺伝子であった。

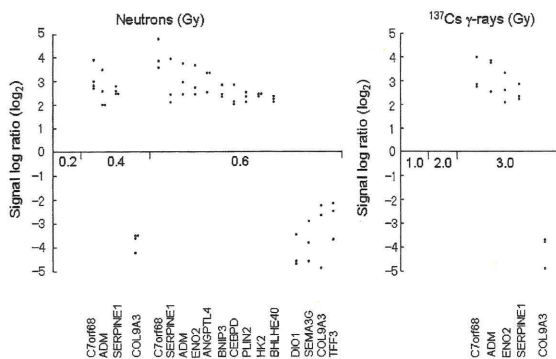
表 1

Changes in gene expression in the transplanted human thyroid tissues—comparison with surgically resected original thyroid tissue

Weeks after transplantation	No. of genes examined	Change in gene expression	
		Increase (> ×4)	Decrease (< ×(1/4))
1	8500	92	195
2	8500	88	138
3	8500	95	129
4	8500	87	127

Human thyroid tissues from a Graves' disease patient (20 years, female) were transplanted s. c. to SCID mice, and changes in gene expression (4-fold differences) were analyzed by GeneChip (Affymetrix HG Focus Array; 8500 genes).

図 1



E. 結論

ヒト甲状腺組織の移植による遺伝子発現は、移植後1週間目では約3%（4倍以上の発現変化）変化するが、その後4週間までは変化がない。放射線照射による発現異常の変化は、線量依存的に増加した。これらのことは、ヒト正常組織をSCIDマウスに移植しても、遺伝子発現の異常は1週間後からは、安定しているため研究に用いることができる。放射線照射による遺伝子発現の変化は、感度がよく、化学物質等の安全性研究に貢献できる系と示唆される。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiat. Res.* 173, 205–213, 2010.
2. Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. *Mutat Res.*, 696,107-113 2010
3. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。*Space Utiliz Res.* 26: 249-251, 2010.

2. 学会発表

1. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。相模原、2010. 1. 26。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： 特になし

マイクロアレイを用いた継代維持ヒト組織の遺伝子発現の検索

研究分担者 梁 治子（独）医薬基盤研究所 プロジェクトサブリーダー

研究要旨：ヒト正常組織およびがん組織は Super-SCID マウスへの移植によっても形態・機能に加え遺伝子発現がよく維持されていることを、マイクロアレイを用い証明してきた。本年度は、マイクロサテライト解析法を用いることにより、ヒトがんの SCID マウスでの増殖と遠隔転移を迅速、かつ容易に証明する手法を開発した。

A. 研究目的

ヒトの正常臓器・組織は市販の SCID マウスには定着しない。野村らが改良した IgG、IgM 値が ELISA 法による値が検出限界以下の改良型 SCID マウス (Super-SCID) を用いることにより、ヒト組織・臓器の長期維持（～3 年）が可能になり、しかも、形態・機能は長期維持期間中にも保持されることがわかった (Cancer Lett., 1997)。このことから、初めてヒトの臓器・組織に対し、さまざまな物質の直接影響を形態、機能の変化に加え、マイクロアレイを用い遺伝子発現の面からも感度よく、より詳細な変化を検出できることを証明した (Mutat. Res., 2010)。

癌の致死要因の最も多くを占めるのは転移である。Super SCID マウスのもう一つの特徴は、ヒト悪性腫瘍が自然遠隔転移することである。ヒトがんの SCID マウス体内での遠隔転移を迅速、客観的に証明するためのマイクロサテライト解析法を完成させ、創薬のための前臨床試験、経過観察の資する。

B. 研究方法

材料：ヒト胃がん（スキルス）およびすい臓がん、SCID マウスに移植後、遠隔転移をおこすものを用いた。

方法：

1. マイクロサテライト解析法

ヒトマイクロサテライト遺伝子座は、D21S11 と ACTBP2 を、マウスマイクロサテライト遺伝子座に D12Mit136 と pul 67 を用いた。蛍光ラベルされたプライマーを用意し (Applied Biosystems)、SCID マウス移植がんの移植腫瘍そのものおよび転移組織 DNA を template として、

4 種遺伝子座を PCR 法で、増殖する。得られた PCR 産物を、キャピラリー電気泳動にかけ (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystems) Fragment analysis ソフト (GeneMapper, Applied Biosystems) で、それぞれの遺伝子座の長さや産物量を、PCR 産物を解析することで行う。これらマイクロサテライト座のプライマー配列は、D21S11 は、GTGAGTCAATCCCAAG と GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC、ACTBP2 は、ACATCTCCCTACCGCTATA と AATCTGGCGACAAGAGTGA である。D12Mit136 は、TTAATTTGAGTGGGTTGGC と TTGCTACATGTACTGATCTCCA (tailed-Applied Biosystems)、pul67 については、未発表のため記述を避ける。PCR 反応は、マウス、ヒトそれぞれについて 2 種のプライマーを混ぜて同時に行った (duplex PCR)。Annealing 温度に関しては、マウスは 50°C、ヒトは 62°C に設定した。

2. ヒトがん移植 SCID マウスでの遠隔転移巣におけるマウス由来細胞の量的解析 (簡易 Quantitative PCR 法)

ヒトがんの SCID マウスでの遠隔転移巣では、マウス組織中でヒトがん細胞が増殖維持されるため、マウス組織中にヒトがん組織が混雑する状態になる。マウス細胞の混合比を調べるために、ヒトとマウスのマイクロサテライトをそれぞれ、ACTBP2 と pul67 の 1 種類にし、後者の Annealing 温度を 58°C にした。ヒト、マウスの正常組織から DNA (標準 DNA) を抽出し、PCR 反応のサイクル数を一定にし、template DNA (標準) の量を変えて PCR 反応を行う。それぞれの template DNA 量に対して、得られる PCR 産物量の蛍光の強さが、解析 (GeneMapper) により得られる。従って、それぞれの template DNA 量と

対する PCR 産物量とで、標準曲線を得ることができる。転移巢 DNA の template を 10ng に、サイクル数も上記と同じに設定し、得られた PCR 産物量と標準曲線から、template DNA 量中のヒトとマウスの DNA 量のおよその比を得る。

(倫理面への配慮)

ヒト組織の SCID マウスへの移植に関しては、医薬基盤研究所および関連施設での研究倫理委員会の承認のもとに施行している。

手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」(代表・野村)、の課題で、倫理委員会の承認を得ている。手術時等で採取されるヒトがん組織の譲渡に関しては、厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除に関しては、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。

動物実験に関しは、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、研究をおこなっている。梁(分担者)は、これらの申請課題(代表:野村)での研究従事者に含まれている。

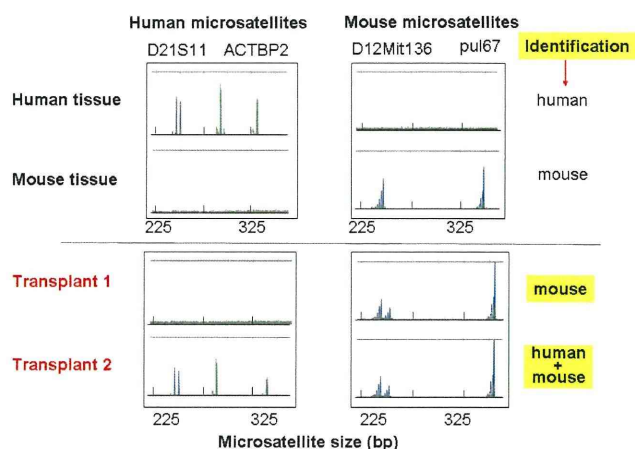
C. 研究結果

1、ヒトがん移植マウスで増殖した組織の由来の判別

ヒトがん移植マウスでは、移植したがん組織は、ほぼ増殖する。増殖組織がヒト由来であることを迅速に調べるために、マイクロサテライト解析法で調べた。マイクロサテライトはヒトゲノム上の 10,000 箇所位置しており、2~6 塩基対が約 100 コピーからなる短い配列である。短い遺伝子座であるため、PCR 法で増幅可能である。マイクロサテライトは、普通はヒト、マウスに特異的である。用いたマイクロサテライト D21S11 と ACTBP2 は、ヒト組織に、D12Mit136 と pul67 は、マウス組織に特異性を示した。従って、移植がん組織について、移植 1 は、マウス組織であり、移植 2 は、ヒトとマウスの組織が混在していることを判別した(図 1)。

図 1

Identification of human or mice tissue transplanted in SCID mice



2、ヒト胃がん(スキルス)、すい臓がん移植 SCID マウスでの自然遠隔転移。

SCID マウスでは、移植ヒトがんはよく自然遠隔転移をおこす。SCID マウス中で増殖した組織が、ヒト由来の転移がん組織なのか、単なるマウス腫瘍であるか形態学的には判別しにくい場合がある。この場合、迅速に検定する必要がある。また、ヒト組織とマウス組織の混合型の場合、それらのおよその比を得ることが望ましい。そこで、マイクロサテライトの PCR 産物の量と、PCR 反応で用いる template DNA 量との相関関係から目的とする組織中のおよそのヒト、マウス組織の「比」を求める方法を開発した。方法で記した如く、ヒトおよびマウスの組織(標準組織)からの DNA(標準組織 DNA)による PCR 産物の解析から、template DNA 量と、PCR 産物の量に直線的相関関係が得られた(図 2)。PCR 産物の量は、PCR 産物の蛍光の強度、つまり、図 1 の例では、最も高いピークの高さ(GeneMapper による解析で数値化される)で表すことができる。この曲線を標準曲線とし、遠隔転移がん組織 DNA の一定量を template としたとき、得られた PCR 産物の量を標準曲線にあてはめ、混合型組織中の、ヒト由来、マウス由来の template 量を求めた。それぞれ求めた template 量により、およその「比」を決めた。ヒト胃がん(スキルス)、すい臓がん移植 SCID マウスでの自然遠隔転移組織でのヒト由来およびマウス由来組織を、同割合(=)、ヒトがマウスより多い(>)、ほとんどヒト(>>)、で表した(表 1、2)。遠隔転移がんは、いずれも、マウス由来でなく、ヒト胃がん(スキルス)、すい臓がんの転移であったことが判明した。マウス組織へのヒトがん組織の侵入、転移であることから、当然のことながらマウス DNA の混入がいずれの

例でも認められた。混入量は、胃がんスキルスについては、ヒト組織と同程度がほとんどであり、膵臓がんの場合は、混入量は少なかった。それぞれのがんの性質を反映していると思われる。

図2

Standard curves for the amounts of PCR products vs. amounts of template in human (ACTBP2) and mouse (pul67) microsatellites.

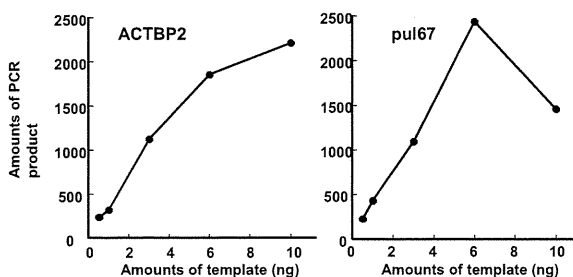


表1 ヒト胃がん（スキルス）移植マウス中の腫瘍部および転移部での由来組織の割合

移植代数	腫瘍・転移部位	組織量割合*
2代目1	腫瘍部 2228	H+, M+
2代目2	腫瘍部 2231	H+, M+
2代目3	腫瘍部 2243	H > M
2代目4	転移部腫瘍の移植 2239	H = M
2代目4	肺転移部腫瘍の移植 2245	H = M
2代目5	肺転移部腫瘍の移植 2240	H = M
4代目1	腫瘍部 2238	H = M
4代目2	腫瘍部 2241	H > M
4代目2	右腋下部転移 2246	H = M
4代目3	腫瘍部 2242	H = M
4代目3	肺門部転移 2244	H = M
5代目1	腫瘍部 2265	H = M

*H; Human, M; ; Mouse. H+, M+は量的割合を調べていない、+; 有。

表2 ヒト膵臓がん移植マウス中の腫瘍部および転移部での由来組織の割合

移植代数	腫瘍・転移部位	組織量割合*
初代1	腫瘍部-1 2235	H > M
初代1	腫瘍部-2 2236	H > M
初代1	肺門部転移 2234	H = M
初代1	腸間膜転移 2237	H > M
2代目1	腸間膜転移 2272	H >> M
2代目1	右腋下部転移2273	H > M

*H; Human, M; ; Mouse. H+, M+は量的割合を調べていない、+; 有。

D. 考察

Super SCID マウスでは、ヒト悪性腫瘍が自然遠

隔転移する。ヒト胃がん（スキルス）、すい臓がん移植 SCID マウスについても自然遠隔転移と思われる組織がみとめられた。ヒトがん組織が転移したものかをしらべるには、これまで組織標本による病理学的判別で行ってきたが、労力と時間がかかる上に微量ながん組織は見逃されやすい。迅速、かつ正確、客観的な方法の確立が必要となった。マイクロサテライト座は種特異的であるため、この性質を応用し、由来組織の判別に用いた。ヒトおよびマウスのマイクロサテライト座をPCR法により増幅し解析することで、転移とされる組織の由来が質的に判別可能となり、さらに、組織のおよその量比も、2,3日の短期間で判定できる方法が確立された。この方法は、DNA量を判定の基準としているが、がん組織はしばしば染色体数の増減、LOH等がみられるので、DNA量と細胞数は正確には一致しない可能性がある。また、量的PCR法ではないので、組織比の正確性には欠けるが、迅速に行うことが利点である。

E. 結論

ヒトがん移植 Super-SCID マウスでの自然遠隔転移組織が、ヒト由来組織であることを証明する迅速、かつ容易な方法を確立した。ヒトおよびマウス特異的のマイクロサテライト座を、PCR法で増幅し、PCR産物を質、量的に解析することで、転移組織中のマウス組織のおよその割合を判定する方法である。全工程は、2,3日程度のため、迅速に、組織の由来判別が可能である。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤 哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究。Space Utiliz Res. 27: 107-110, 2011.

2. 学会発表

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究（2010年度ワーキンググループ

活動報告)。相模原、2011.1.26。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： 特になし

マイクロアレイを用いた継代維持ヒト組織の遺伝子発現の検索

研究分担者 梁 治子（独）医薬基盤研究所 プロジェクトサブリーダー

研究要旨：ヒト正常組織およびがん組織は Super-SCID マウスへの移植によっても形態・機能に加え遺伝子発現がよく維持されていることを、マイクロアレイを用い証明してきた。本年度は、昨年度は迅速かつ正確に判定できるように開発した、マイクロサテライト解析法により、ヒトがん移植 SCID マウスでのヒトがんの遠隔転移判定に本法が極めて有効であることが、判明した

A. 研究目的

ヒトの正常臓器・組織は市販の SCID マウスには定着しない。野村らが改良した IgG、IgM 値が ELISA 法による値が検出限界以下の改良型 SCID マウス（Super-SCID）を用いることにより、ヒト組織・臓器の長期維持（～3 年）が可能になり、しかも、形態・機能は長期維持期間中にも保持されることがわかった（Cancer Lett., 1997）。このことから、初めてヒトの臓器・組織に対し、さまざまな物質の直接影響を形態、機能の変化に加え、マイクロアレイを用い遺伝子発現の面からも感度よく、より詳細な変化を検出できることを証明した（Mutat. Res., 2010）。

癌の致死要因の最も多くを占めるのは転移である。Super SCID マウスのもう一つの特徴は、ヒト悪性腫瘍が自然遠隔転移することである。昨年度は、ヒトがんの SCID マウス体内での遠隔転移を迅速、客観的に証明するためのマイクロサテライト解析法を完成させたので、実際に応用し、遠隔転移がどのぐらいおきているかを、調べた。

B. 研究方法

材料：ヒト胃がん（スキルス）および前立腺がん、すい臓がん、肺がん等で、SCID マウスに移植後、移植腫瘍そのもの、および転移性と思われる腓門部等リンパ節腫瘍、腓 各臓器の腫瘍を用い、それぞれの組織がマウス由来か、ヒト由来かを調べた。

方法：

1. マイクロサテライト解析法

ヒトマイクロサテライト遺伝子座は、ACTBP2 を、マウスマイクロサテライト遺伝子座に pul 67 を用いた。蛍光ラベルされたプライマーを用意

し（Applied Biosystems）、SCID マウス移植がんの移植腫瘍そのものおよび転移組織 DNA を template として、2 種遺伝子座をそれぞれ独立して PCR 法で、増殖する。得られた PCR 産物を、キャピラリー電気泳動にかけ（Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystems）Fragment analysis ソフト（GeneMapper, Applied Biosystems）で、それぞれの遺伝子座の長さや産物量を、PCR 産物を解析することで行う。これらマイクロサテライト座のプライマー配列は、ACTBP2 は、ACATCTCCCCTACCGCTATA と AATCTGGCGACAAGAGTGA である。pul67 については、未発表のため記述を避ける。Annealing 温度に関しては、マウスは 53°C、ヒトは 62°C に設定した。

2. ヒトがん移植 SCID マウスでの遠隔転移巢におけるマウス由来細胞の量的解析（簡易 Quantitative PCR 法）。

正常組織から DNA（標準 DNA）を抽出し、PCR 反応のサイクル数を一定にし、template DNA（標準）の量を変えて PCR 反応を行う。それぞれの template DNA 量に対して、得られる PCR 産物量の蛍光の強さが、解析（GeneMapper）により得られる。従って、それぞれの template DNA 量に対する PCR 産物量とで、標準曲線を得ることができる。ヒト DNA の template を 10ng に設定し、標準 DNA は 0.5-10ng 間で template の量を変えて、同時に PCR にかける。すると、同時に得られた PCR 産物量から、標準曲線より、検体 DNA のヒトまたはマウスの、template 量が求められる。

（倫理面への配慮）

ヒト組織の SCID マウスへの移植に関しては、

医薬基盤研究所および関連施設での研究倫理委員会の承認のもとに施行している。

手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」（代表・野村）、の課題で、倫理委員会の承認を得ている。手術時等で採取されるヒトがん組織の譲渡に関しては、厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除に関しては、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。は、本人および親権者の同意を得ている。

動物実験に関しは、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研配慮し、研究をおこなっている。梁（分担者）は、これらの申請課題（代表：野村）での研究従事者に含まれている。

C. 研究結果

1、ヒトがん移植マウスで増殖した組織の由来の判別

昨年同様、標準（正常ヒトおよびマウスの標準DNAは、昨年度より決めてある）DNAを用いて標準曲線（昨年度報告書）を得ることで、ヒトがん移植マウスで増殖した組織におけるヒトおよびマウスDNAの混合比をヒト胃がん（スキルス）と、前立腺がん等について調べた（簡易型Quantitative PCR法）。

表1：胃がん（スキルス）移植マウスにおける腫瘍部または転移部位での由来組織割合

移植代数	腫瘍/転移部位	組織量割合*
3代目-1	腫瘍部 2481	H=M
3代目-1	転移部 1 2482	H=M
3代目-1	転移部 2 2483	H=M
4代目-2	腫瘍部 2507	H>M
5代目-3	腫瘍部 2629	H<<M
6代目 4	転移部 2701	H=M
3代目-5	転移部 2505	H=M

4代目-6	腫瘍部 2583	H>M
4代目-6	転移部 2584	H>M
5代目-7	腫瘍部 2657	H>M
2代目-8	腫瘍部 2228	H+M+
2代目-39	腫瘍部 2231	H+M+
2代目-9	腫瘍部 2300	H>M
2代目-10	腫瘍部(biopsy) 2243	H>M
2代目-10	腫瘍部 2243	H>M
2代目-10	転移部 2324	H>>M
5代目-11	腫瘍部 2504	H=M
6代目-12	腫瘍部 2550	H>M
6代目-13	腫瘍部 2572	H>>M
6代目-14	腫瘍部 2585	H>>M
6代目-14	転移部 2586	H=M
6代目-15	腫瘍部 2699	H>M
5代目-16	腫瘍部 2561	H=M
7代目-17	腫瘍部 2592	H>M
7代目-17	転移部 2593	H=M
2代目-18	腫瘍部 2513	H>M
2代目-19	腫瘍部 2479	H=M
2代目-21	転移部 1より移植 2233	H+M+
2代目-22	転移部 2より移植 2239	H=M
2代目-22	転移部 3より移植 2245	H=M
2代目-23	転移部 4より移植 2240	H=M
4代目-24	腫瘍部 2295	H=M
4代目-24	転移部 2296	H=M
4代目-25	腫瘍部 2297	H=M
4代目-25	転移部 1 2298	H<M
4代目-25	転移部 2 2299	H=M
3代目-26	腫瘍部 2297	H>>M
4代目-27	腫瘍部 2242	H=M
4代目-27	転移部 2243	H=M
5代目-28	腫瘍部(biopsy) 2265	H=M
5代目-28	腫瘍部 2289	H=M
5代目-28	転移部 1 2290	H>M
5代目-28	転移部 2 2291	H>>M

5代目-28	後腹膜転移部 2292	H>M
6代目-29	腫瘍部;転移部 1より移植 2340	H>>M
6代目-29	転移部-2;転移部 1より移植 2342	H>>M
7代目-30	腫瘍部;転移部-転移部移植 2517	H>M
7代目-30	転移部;転移部-転移部移植 2518	H>M
8代目-31	腫瘍部;転移部-転移部-転移部移植 2573	H=M
6代目-32	腫瘍部 2306	H>M
5代目-33	腫瘍部 2293	H>>M
8代目-31	腫瘍部 2562	H>>M
8代目-32	転移部;転移部より移植 2567	H>>M
8代目-32	腫瘍部;転移部より移植 2568	H>>M
7代目-33	腫瘍部 2511	H>M
7代目-33	転移部 2512	H=M
8代目-34	腫瘍部 2569	H>>M
4代目-35	腫瘍部 2241	H>M
4代目-35	転移部 2246	H=M
4代目-36	腫瘍部 2238	H=M
3代目-37	腫瘍部 2627	H<M
3代目-20	腫瘍部-2代目 N2 保存より再移植 2538	H>M
3代目-20	転移部 1-2代目 N2 保存より再移植 2539	H>M
3代目-20	転移部 2-2代目 N2 保存より再移植 2540	H>M
3代目-37	腫瘍部-2代目 N2 保存より再移植 2627	H<M

*「比率」の判定は、DNA量が、H=Mは、HがMの3倍以下で1/3以上、H>Mは、HがMの3倍以上で、5倍以下、H>>Mは、HがMの5倍以上、H<Mは、HがMの1/3以下、1/5以上、H<<Mは、HがMの1/5以下、と定義した。H; Human, M; Mouse。H+, M+は量的割合を調べていない、+;有。

表2：前立腺がん移植マウスにおける腫瘍部の由来組織割合（全て移植腫瘍部）

移植代数	組織量割合*
5代目 1(2325)	H>M
7代目 2(2724)	H>M
4代目 3(2249)	H=M
5代目 4(2255)	H>>M
3代目 5(2250)	H=M
5代目 6(2308)	H=M
5代目 7(2309)	H>M
6代目 8(2556)	H>M
6代目 9(2555)	H>>M
4代目 10(2248)	H=M
5代目 11(2262)	H=M
7代目 12(2554)	H=M
6代目 13(2307)	H=M
6代目 14(2509)	H>M
7代目 15(2623)	H>M
6代目 16(2624)	H=M
6代目 17(2260)	H>M
8代目 18(2557)	H>M
7代目 19(2488)	H=M
6代目 20(2326)	H>M
7代目 21(2612)	H=M
5代目 22(2261)	H=M

*H; Human, M; Mouse

ヒト胃がん（スキルス）について、昨年より引き続き、移植世代の増したもの、移植腫瘍部および以外の部位に転移腫瘍があったものについて、ヒトか、マウス由来組織かを調べた。すべてが、ヒトDNAをマウスより多い又は同等量含んでいた。転移腫瘍15例中すべてが、ヒトの由来であった。ことから、移植部ヒト胃がん組織から遠隔転移したことが示唆された。最後2例は、移植2代目より、特別な方法で、凍結し、液体窒素で保存した移植組織を、SCIDマウスに再移植したものである。凍結保存再移植しても、自然遠隔転移することがわかった。表2は、前立腺がんの例であるが、このヒト前立腺がん組織は、調べた限り、ヒト組織由来であったが、自然遠隔転移はみられなかった。以上の方法で、肺がん5件、膵臓がん3件、乳がん2件、食道がん2件、直腸がん1件、

肝細胞がん2件の自然遠隔転移は、胃がんスキルス同様ヒト由来組織であることが判明した。

3. その他： 特になし

D. 考察

Super SCID マウスでは、ヒト悪性腫瘍が自然遠隔転移する。移植組織が、ヒト由来であるか、特に、転移腫瘍に関しては、マウスかヒト組織かの肉眼的区別が困難である。胃がん（スキルス）の例でみられたように、遠隔転移巣がヒト由来組織を含んでいたことで、これらが SCID マウス体内で移植部ヒト腫瘍から転移したヒト転移腫瘍であることが判明した。また、胃がスキルス以外の移植腫瘍も、ヒト移植腫瘍からの遠隔転移であった。量的 PCR 簡便法により迅速、かつ正確に、両種のおよその組織比の判別が可能になった。

E. 結論

ヒトがん移植 Super-SCID マウスでの自然遠隔転移組織が、ヒト由来組織であることを証明する迅速、かつ容易な方法により、遠隔転移組織の、殆どがヒト由来であることが判明した。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

野村大成、足立成基、梁 治子、畑中英子、菊谷理絵、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二、D. K. Parida、R. I. Bersimbay。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究；放射線晩発影響の防護。Space Utiliz Res. 28(March), 2012.

2. 学会発表

野村大成、足立成基、梁 治子、畑中英子、菊谷理絵、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二、D. K. Parida、R. I. Bersimbay 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究（2011 年度研究グループ活動報告）。相模原、2012. 1. 23。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし

ヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立

分担研究者 小原有弘（独）医薬基盤研究所 主任研究員

研究要旨:ヒト腫瘍細胞は in vitro において抗がん剤などの初期薬剤開発に欠かせない研究ツールとなっているが、in vivo で検証試験をするためのツールが最適化されていないのが現状である。本研究では、抗がん剤開発に欠かせない創薬モデルマウス作成のため、細胞バンクに登録されている高度に品質管理された、多種類のがん細胞の培養ならびに供給を行い、担がんマウス作成を行った。また、ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株の寄託を受け、ルシフェラーゼ発現がん細胞を移植した、担がんマウス作成し、バイオイメージング創薬のための研究ツール開発整備を行った。

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。これまでに我々は公的細胞バンクとして細胞品質管理に注力し、高品質細胞の供給を実現してきた。本研究ではヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立のため、品質管理されたがん細胞の培養ならびに供給を行うことで効率的な創薬モデルマウス作成の可能性を検討した。また、ルシフェラーゼを安定発現させたヒト由来腫瘍細胞を細胞バンクとしてコレクションし、これらを用いた、担がんモデルマウス作成を開始し、これらの評価試験系開発を行う。

B. 研究方法

1. 細胞培養

高度に品質管理された細胞の供給のため、細胞樹立時の情報を元に、細胞の培養条件を検討し、担がんマウス作成に必要な細胞量の増殖を行うとともに、微生物汚染検査、マイコプラズマ汚染検査、ウイルス汚染検査、細胞個別識別検査等の品質管理を行った細胞を準備した。

2. ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株

自治医科大学において樹立されたルシフ

ェラーゼ安定発現がん細胞株の寄託 (Table 1) を受け、その細胞情報の登録、培養条件の検討ならびに細胞資源化 (研究者へ分譲できる細胞の準備) を行った。現在 6 7 種の細胞のうち 2 4 種に関して細胞分譲準備が整い、分譲を開始している (Table 1)。

3. in vivo イメージング

ルシフェラーゼ安定発現がん細胞をスーパーSCID マウスに移植し、発光イメージング装置である IVIS (Caliper 社製) にて担癌マウスにおけるがん細胞の動態に関しての観察を行った。

C. 研究結果

本研究班において多くのがん細胞の供給を実施したが、下記のルシフェラーゼ発現がん細胞 (発光がん細胞) について、SCID マウスに移植後のがん細胞の動態観察を実施した結果、マウスを生きたまの状態で経時的にがん細胞の発光イメージングを十分な感度を持って実施することが実証できた。また、皮下移植したがん細胞のみではなく深部の標的臓器に移植したがん細胞についてもイメージングすることができた (Fig. 1)。

JCRB1379:MKN45-Luc

62 歳女性より樹立された低分化型充実型腺癌由来、CEA 高産生株であり、胃がん細胞株として、がん転移、抗がん剤スクリーニ

ングなど *in vitro* 研究ツールとして汎用されている。今回寄託された本細胞は品質管理の過程においてマイコプラズマ汚染が検出され、マイコプラズマ除去を行った。

JCRB1406:PC-3-Luc

62歳男性より樹立された前立腺がん細胞株であり、がん転移、抗がん剤スクリーニングなど *in vitro* 研究ツールとして汎用されている。今回寄託された本細胞は品質管理の過程においてマイコプラズマ汚染が検出され、通常マイコプラズマ除去作業ではマイコプラズマが除去できなかったため、プラスモシン（2剤併用薬剤）を使用してマイコプラズマ除去を行った。

担癌マウスの発光イメージングにおいては十分な感度を持って、皮下移植したがん細胞ならびに深部の標的臓器に移植したがん細胞のイメージングすることができた (Fig. 1)。

D. 考察

ヒト由来の悪性腫瘍ならびに良性腫瘍、さらには正常組織の培養・増殖法が *in vitro* において開発されているが、創薬研究においては *in vitro* のみではなく *in vivo* における開発薬剤の評価が欠かせない。また、悪性腫瘍の転移モデルマウスは抗がん剤開発においては非常に有力なツールとなる。さらにルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を担癌マウス作成に用いることで、マウスを生きたまの状態で、がんの位置や大きさを経時的に観察することが可能となる。がんの転移に関しても非常に小さな転移であっても把握することができ、このようなモデルマウスは創薬において非常に有用な研究ツールとなる。本研究においては創薬研究に必要な担がんモデルマウス作成、その腫瘍形成能、転移能評価の検討のため、胃がん、前立腺がんをはじめとするがん細胞の培養・増殖・供給を行ったが、細胞の培養方法ならびにその品質管理を規格化することにより、担がんマウス作成効率の向上と再現性の確保が期待できことが

検証できた。培養可能ながん細胞は世界中に広く普及しているが、培地や継代方法をはじめとする細胞の取扱が研究者によって様々であり、同じ細胞の名前であっても細胞の表現型に違いにあることが多い。特にがん細胞はゲノムの不安定性により、ゲノム変化が大きく、継代培養によって細胞が変化しやすい。これらの細胞を用いて担がんマウスを作成する場合には、十分な細胞ストックを同一ロットで確保し、担がんマウス作成までのプロトコールを一定にすることで、研究の再現性を向上することが可能であると考えられ、研究ツールとして細胞を確保するには公的な細胞バンクが果たす役目は大きいと考えられる。また、本研究において見られたマイコプラズマ汚染に関しても研究の再現性・信頼性にとって非常に重要なものであり、これらを除去した細胞を研究者普及させることが非常に重要であると考えられる。

本研究において細胞バンクが保有する高品質な細胞が、創薬モデルマウス作成に用いる細胞資源として有用であることを実証でき、適切なマウスと組み合わせることで更なる細胞資源の活用法開発に努めていきたい。

E. 健康危険情報

適用なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. Dirks WG, Macleod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H. *Int J Cancer*. 126:303-4 (2010)

(2) Aneuploidy in immortalized human mesenchymal stem cells with non-random loss of chromosome 13 in culture. Takeuchi M, Takeuchi K, Ozawa Y, Kohara

A, Mizusawa H. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 45:290-9 (2010)

(3) Cell line misidentification: the beginning of the end. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. *Nat Rev Cancer.* 10(6):441-8(2010)

(4) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. *Int J Cancer.* 127(1):1-8(2010).

(5) Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, Macleod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 46(9):727-32(2010).

(6) Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines. Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T. *Hum Cell.* 24(1):2-8(2011)

(7) Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. *Int J Dev Biol.* 55(2):181-7(2011)

(8) ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一規格案について. 菅三佳, 高田圭, 小原有弘, 末盛博文, 青井貴之, 中村幸夫, 古江楠田美保 再生医療 (日本再生医療学会雑

誌) vol.11(1)2-8 (2011)

2. 学会発表 国内会議

(1) T Suzuki, A Kohara, A Ramadan, Y Kikuchi, M Honma, M Hayashi. Comparative study on in vivo genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan endemic nephropathy. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) 8月 イタリア フィレンツェ

(2) A. Kohara, W. G. Dirks, H. G. Drexler, Y. Nakamura, M. Furue, M. Mizusawa Warning: The Serious Problem of Mistaken Identities of Cultured Human Cell Lines. 2009 In Vitro Biology Meeting 6月 アメリカ チャールストン

(3) 鈴木孝昌、小原有弘、ラマダン アリ、菊池 裕、本間正充、林 真 バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシンA 日本環境変異原学会第38回大会 ポスター 11月 静岡

(4) Takayoshi Suzuki, Arihiro Kohara, Mieko Kogi, Shiori Tanabe, Masamitsu Honma. CGH array analysis on variations in chromosome 8 amplifications containing c-myc in various cancer cell line. 第68回日本癌学会学術総会 ポスター 10月 横浜

(5) マイコプラズマ汚染の現状と論文投稿における国際動向、小原有弘、古江楠田美保、第83回日本組織培養学会5月(岡山)

(6) 細胞認証試験によるリスク管理の必要性と論文投稿における国際動向、小原有弘、古江楠田美保、第29回日本ヒト細胞学会学術集会8月(富山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

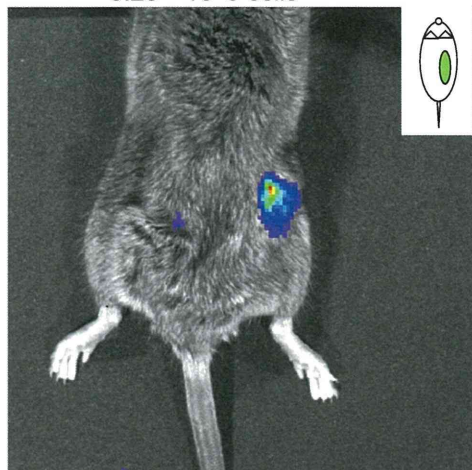
Table 1 ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株一覧

	Cell lines	Cell No.	Cell Name		Cell lines	Cell No.	Cell Name
Human	Gastric cancer				Renal cancer		
1	MKN-45	NIHS0634	MKN-45-Luc	37	786-0	NIHS0651	786-0-Luc
2	IM95	NIHS0712	IM95/CMV-Luc	38	A498	NIHS0652	A498-Luc
3	KATOⅢ	NIHS0713	KATOⅢ/CMV-Luc	39	CAKI-1	NIHS0653	Caki-1-Luc
4	MKN-1	NIHS0720	MKN-1/CMV-Luc	40	G401	NIHS0654	G-401-Luc
5	MKN-7	NIHS0721	MKN-7/CMV-Luc		Prostate cancer		
6	MKN-74	NIHS0722	MKN-74/CMV-Luc	41	DU-145	NIHS0655	DU-145-Luc
7	NUGC-3	NIHS0731	NUGC-3-Luc	42	PC-3	NIHS0656	PC-3-Luc
	Breast cancer				Leukemia		
8	MDA-MB-231	NIHS0635	MDA-MB-231-Luc	43	K-562	NIHS0657	K562-Luc
9	HS578T	NIHS0636	HS578T-Luc		Lung cancer		
10	BT-549	NIHS0637	BT-549-Luc	44	NCI-H460	NIHS0658	NCI-H460-Luc
11	MCF7	NIHS0638	MCF-7-Luc	45	A549	NIHS0659	A549-Luc
12	T-47D	NIHS0639	T-47D-Luc	46	HCC-827	NIHS0709	HCC-827-Luc
13	BT-20	NIHS0700	BT-20/CMV-Luc	47	HLC-1	NIHS0711	HLC-1-Luc
14	BT-474	NIHS0701	BT-474/CMV-Luc	48	NCI-H1650	NIHS0723	NCI-H1650-Luc
15	HCC-1419	NIHS0706	HCC-1419-Luc	49	NCI-H1975	NIHS0724	NCI-H1975-Luc
16	HCC-1937	NIHS0707	HCC-1937/CMV-Luc	50	NCI-H2009	NIHS0725	NCI-H2009-Luc
17	HCC-1954	NIHS0708	HCC-1954-Luc	51	NCI-H2228	NIHS0726	NCI-H2228-Luc
18	MDA-MB-361	NIHS0718	MDA-MB-361-Luc#1	52	NCI-H23	NIHS0727	NCI-H23-Luc
19	MDA-MB-435	NIHS0719	MDA-MB-435-Luc#1	53	NCI-H441	NIHS0728	NCI-H441/CMV-Luc
20	SK-BR-3	NIHS0735	SK-BR-3-Luc	54	NCI-H650	NIHS0729	NCI-H650-Luc
	Melanoma			55	RERF-LC-KJ	NIHS0733	RERF-LC-KJ/CMV-Luc
21	SK-MEL-2	NIHS0640	SK-MEL-2-Luc		Ovarian cancer		
22	SK-MEL-28	NIHS0641	SK-MEL-28-Luc	56	OVCAR-3	NIHS0732	OVCAR-3/CMV-Luc
23	COLO 679	NIHS0642	COLO679-Luc	57	SK-OV-3	NIHS0736	SK-OV-3/CMV-Luc
24	Mewo	NIHS0643	Mewo-Luc	58	SK-OV-3	NIHS0737	SK-OV-3-Luc
25	MM-RU	NIHS0644	MM-RU-Luc		Pancreas Cancer		
26	G361	NIHS0705	G361/CMV-Luc	59	AsPC-1	NIHS0697	AsPC-1/CMV-Luc
	CNS cancer			60	BxPC-3	NIHS0702	BxPC-3-Luc#2
27	U251MG	NIHS0645	U-251 MG-Luc	61	KP1-NL	NIHS0714	KP1-NL-Luc#2
	Colon cancer			62	KP-2	NIHS0715	KP-2/CMV-Luc
28	HT-29	NIHS0646	HT-29-Luc	63	KP-3L	NIHS0716	KP-3L-Luc#5
29	KM12	NIHS0647	KM12-Luc		Mouse		
30	SW620	NIHS0648	SW620-Luc	64	Breast Cancer		
31	HCT-116 clone #2	NIHS0649	HCT-116 clone#2-Luc		4T1-Luc	NIHS0696	4T1-Luc
32	DLD-1 clone #1	NIHS0650	DLD-1 clone#1-Luc		Melanoma		
33	COLO 205	NIHS0703	COLO 205/CMV-Luc	65	B16-F0	NIHS0698	B16-F0-Luc
34	HCT-15	NIHS0710	HCT-15-Luc#1	66	B16F10	NIHS0699	B16F10-Luc 1-#3
35	LoVo	NIHS0717	LoVo-Luc#2		Colon Cancer		
36	SW-480	NIHS0738	SW-480/CMV-Luc	67	Colon26	NIHS0704	Colon26-Luc
				68	Fetus fibroblast		
					NIH3T3/ATCC	NIHS0730	NIH3T3/ATCC/CMV-Luc

MKN45-Luc (Exp. No. 621(G))

① 背中右皮下注入

6.25×10^6 cells

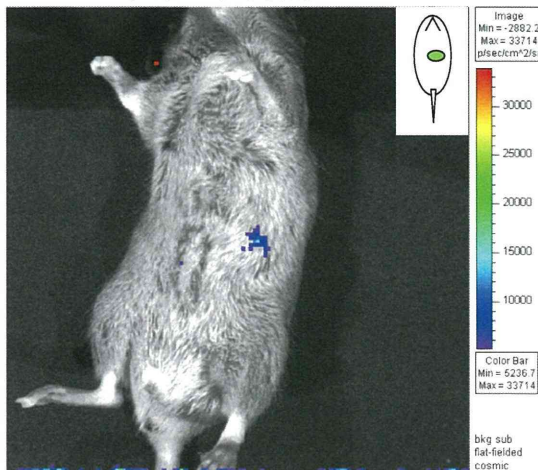


Click # KHR20110713150601
Wed, Jul 13, 2011 15:06:12
Bin HS (6), FOV7.5, f1, 3m
Filter: Open
Camera: ISO633N3985, DW434

Series: MKN45-Luc
Experiment: 1
Label:
Comment: 3min
Analysis Comment:

② 腺胃壁内注入(開腹)

6.25×10^6 cells



Click # KHR20110715103413
Fri, Jul 15, 2011 10:34:26
Bin HS (6), FOV7.5, f1, 3m
Filter: Open
Camera: ISO633N3985, DW434

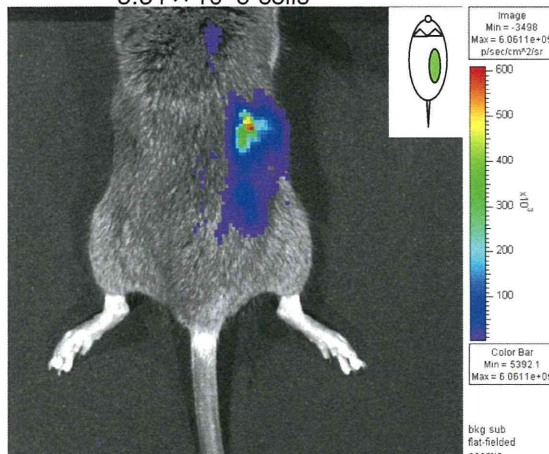
Series: MKN45-Luc-stomach
Experiment: 1
Label:
Comment: 3min
Analysis Comment:

胃壁などのマウス体内深部の発光も観察可能である

PC-3-Luc (Exp.No. 620(PC))

① 背中右皮下注入

3.31×10^6 cells

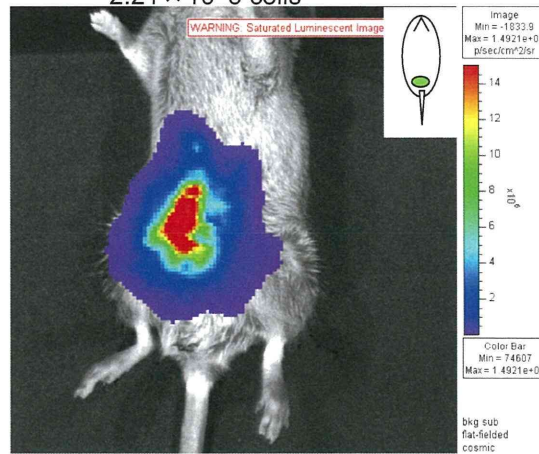


Click # KHR20110713135000
Wed, Jul 13, 2011 13:50:10
Bin HS (6), FOV7.5, f1, 3m
Filter: Open
Camera: ISO633N3985, DW434

Series: PC-3-Luc
Experiment: 1
Label:
Comment: 3min
Analysis Comment:

② 前立腺注入(開腹)

2.21×10^6 cells



Click # KHR20110715115146
Fri, Jul 15, 2011 11:51:58
Bin HS (6), FOV7.5, f1, 3m
Filter: Open
Camera: ISO633N3985, DW434

Series: PC-3-prostate
Experiment: 1
Label:
Comment: 3min
Analysis Comment:

in vitroでの酵素活性結果を反映して

PC-3-LUCの方が発光強度が高い。

Fig. 1 ルシフェラーゼ発現がん細胞を移植した SCID マウスでのイメージング結果

ヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立

分担研究者 小原有弘（独）医薬基盤研究所 研究員

研究要旨：抗がん剤開発に欠かせない創薬モデルマウス作成のため、細胞バンクに登録されている高度に品質管理された、多種類のがん細胞の培養ならびに供給を行い、担がんマウス作成を分担した。また、ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株の寄託を受け、担がんマウス作成のための細胞資源整備を行った。

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無関心であるのが現状である。これまでに我々は公的細胞バンクとして細胞品質管理に注力し、高品質細胞の供給を実現してきた。本研究ではヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立のため、品質管理されたがん細胞の培養ならびに供給を行うことで効率的な創薬モデルマウス作成の可能性を分担する。

また、本年度細胞バンクに寄託されたルシフェラーゼ安定発現がん細胞株について担がんマウス作成のための細胞資源整備を行う。

B. 研究方法

1. 細胞培養

JCRB0077: PC-3 は Eagle's minimal essential medium with 10% heat inactivated fetal bovine serum、JCRB1002:K562/ADM は RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum、JCRB0225:COLO320 DM は Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum、JCRB0134:MCF-7 は Eagle's minimal essential medium with NEAA, 1.5g/l NaHCO₃, 1mM pyruvate and 0.01mg/ml insulin with 10% fetal calf serum にて培養を行い、担がんマウス作成のため増殖させた細胞を生理食塩水に懸濁させ SCID マウスへの移植を行った。

2. ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株

自治医科大学において樹立されたルシフェラーゼ安定発現がん細胞株の寄託（Table 1）を受け、その細胞情報の登録、培養条件の検討を行った。

C. 研究結果

1. SCID マウスへ移植する培養ヒトがん細胞系の管理。下記の細胞について、細胞樹立時の情報を

元に、細胞の培養条件を検討し、担がんマウス作成に必要な細胞量の増殖を行うとともに、微生物汚染検査、マイコプラズマ汚染検査、ウイルス汚染検査、細胞個別識別検査等の品質管理を行った。

1) JCRB0077: PC-3

62 歳男性より樹立されたアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株であり、癌遺伝子である c-myc の増幅が確認されている。順調に増殖した。

2) JCRB1002:K562/ADM

53 歳女性より樹立された慢性骨髄性白血病細胞株であり、抗がん剤のアドリアマイシンに耐性をもつ細胞である。腹腔内、静脈内に注入では、増殖がみられなかった。

3) JCRB0225:COLO320 DM

55 歳女性より樹立された大腸腺癌由来細胞株であり、染色体の一部が増幅して元の染色体から脱離し、独立した小型の染色体として存在する二重微小染色体（ダブルミニユート）を有した細胞株であり、その二重微小染色体上に癌遺伝子である c-myc が増幅した状態で存在している。順調に増殖した。

4) JCRB0134:MCF-7

69 歳女性より樹立された乳がん細胞株であり、内分泌かく乱物質の検索に用いられるエストロゲン受容体発現細胞株である。マウス乳腺内移植にて、腫瘍形成がみられた。

D. 考察

ヒト由来の悪性腫瘍ならびに良性腫瘍、さらには正常組織の培養・増殖法が in vitro において開発されているが、創薬研究においては in vitro のみではなく in vivo における開発薬剤の評価が欠かせない。また、悪性腫瘍の転移モデルマウスは抗がん剤開発においては非常に有力なツールとなる。本研究においては創薬研究に必要な担がんモデルマウス作成、その腫瘍形成能、転移能評価の検討のため、前立腺がん、乳がんをはじめとするがん細胞の培養・増殖・供給を行ったが、細胞の培