

201907045A

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業)

創薬・疾患研究のための  
細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

課題番号： H25-創薬-指定-007

研究代表者 小原 有弘

独立行政法人医薬基盤研究所  
難病・疾患資源研究部 培養資源研究室  
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8  
電話：072-641-9851  
FAX：072-641-9859  
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成26年(2014年)5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究	
小原 有弘	----- 1

### II. 分担研究報告

1. 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	
小原 有弘	
佐藤 元信	----- 7
2. ハプロイド ES 細胞における遺伝子変異クローンの獲得法の確立に関する研究	
竹田 潤二	----- 1 6
3. ホモ変異体マウス ES 細胞株の樹立に関する研究	
堀江 恭二	----- 1 8
4. コンパニオン診断薬の開発を支援する高度ヒト細胞資源の充実化に関する研究	
村上 孝	----- 1 9
5. 細胞資源におけるウイルス検出法開発に関する研究	
清水 則夫	----- 2 3
6. マイコプラズマ検査法に関する研究	
原澤 亮	----- 2 8
7. 新鮮組織・細胞の供給システムの整備及びヒト新鮮組織を用いた高品質細胞調製の検討	
吉田 東歩	
小阪 拓男	----- 3 3
8. 創薬・疾患研究のためのヒト組織・不死化B細胞の資源化に関する検討、 及びヒト由来試料に関する情報データベースの構築	
高橋 一朗	
坂手 龍一	
吉田 東歩	
佐藤 元信	
小阪 拓男	----- 4 1
9. 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	
内尾こずえ	----- 4 9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 5 4
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 5 8

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

## 創薬・疾患研究のための 細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究

研究代表者：小原 有弘 医薬基盤研究所難病・疾患資源研究部

### 研究要旨

本研究を実施している『医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部』は、「生物研究資源基盤の整備」の実施を目的に研究を進めている。我々が取り組んでいる研究資源基盤とは①細胞、組織（研究資源・材料）の収集、②収集した細胞の増殖（複製）、③細胞あるいは組織の評価（品質管理）、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、細胞・組織は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細胞・組織について、質的・量的な改善開発研究を行うとともに、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。

組織培養技術は、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。生体試料と共存する微生物や他の生体試料の混入などは認識し難い（マイコプラズマ、ウイルス、異動物種細胞、同動物種細胞）。誤認された生体試料や汚染された生体試料を使った研究は、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生体試料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、正しい生体試料の提供がより重視されることは当然である。

しかし、生体試料を監視し調査研究を推進するには試料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「試料の正誤」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、多数の生体試料を収集するJCRB研究資源バンクこそ、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、細胞・組織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、細胞・組織の遺伝的な背景に関する調査研究を通じて生体試料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研究資源バンクの運営（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

竹田 潤二：大阪大学大学院医学研究科環境・生体機能学講座 教授

堀江 恭二：奈良県立医科大学生理学第二講座 教授

村上 孝：高崎健康福祉大学大学院薬学研究科腫瘍生物学研究室 教授

清水 則夫：東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス学 准教授

原澤 亮：特定非営利活動法人いわて野生生物疾病研究センター 理事長  
吉田 東歩：独立行政法人医薬基盤研究所泉南資源研究施設 研究調整専門員  
佐藤 元信：独立行政法人医薬基盤研究所泉南資源研究施設 研究調整専門員  
小阪 拓男：独立行政法人医薬基盤研究所泉南資源研究施設 研究調整専門員  
高橋 一郎：独立行政法人医薬基盤研究所難病資源研究室 主任研究員  
坂手 龍一：独立行政法人医薬基盤研究所難病資源研究室 研究員  
内尾 こずえ：独立行政法人医薬基盤研究所疾患モデル小動物研究室 主任研究員

## 研究の目的

培養細胞を含む生体試料を使った研究においては、かねてより微生物汚染された研究資源、誤認された研究資源の使用による研究費・研究労力の浪費が国際的に問題視されている。その典型的な例として、2000年に我々が実施した、培養細胞のマイコプラズマ汚染に関する調査研究において、全国の研究者が使用している培養細胞約3000検体のうち約26%がマイコプラズマ陽性のまま使用されていた事実を上げることができる。このような状況での研究の成果の発信は、国際的な信用低下を招く可能性を秘めている。

『医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部（JCRB 研究資源バンク）』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。JCRB 研究資源バンクは、かかる目的で各種疾病に由来するヒト培養細胞・組織ならびに正常ヒト培養細胞・組織を積極的に収集し、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細

胞、組織（研究資源・材料）の収集、②収集した細胞の増殖（複製）、③細胞あるいは組織の評価（品質管理）、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。

これら当該業務を通じて収集した細胞研究資源は年間約4300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。JCRB 研究資源バンクは、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。それ故誤認のある研究資源を分譲することは許されないことである。ところが生体試料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。現在でも間違った細胞を使用した研究報告は後を絶たず、研究の成果に疑問が投げかけられているのが現状

である。こうした中、研究成果の公表時に生体試料の品質チェックをしなければならぬという、論文投稿規程の改訂が主要な科学雑誌において進んでおり、これらのチェックに対応した生物資源の使用が求められるようになった。

実際に生体試料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考えられるが、汚染が発生しても通常の研究利用によっては存在が認識されずに汚染した生体試料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生物資源を継続的に調査することによって資源における誤認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 法によって生体試料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生物資源バンクから提供されている資源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おり、世界で初めて多種類のウイルスに関するウイルススクリーニング検査を実施し、生物資源の資源情報として提供してきた。この結果により、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)。現在は 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しており、我々を含めて世界の細胞バンク関係者によって共通利用されヒト由来研究資源の識別に積極的に取り入れられ、本研究班においては培養細胞のデータを蓄積し、検索できるデータベース検索サイトの構築を目指しており、そのデータベース部分の構築を実施した。

我々は上記の方法を 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ている。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、世界の細胞バンクと協力して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、wikipedia にて随時更新を行いながらリストの公開を行っている。来年度はホームページを通じてクロスコンタミネーションを

実際に検索できるよう検索サイトの設置など、情報の発信が重要であると考えている。

上記の研究活動を情報発信するため学会と協力して日本組織培養学会内に細胞品質管理等普及委員会を設置し、生物資源に関する品質管理の重要性ならびに現状に関する情報提供を開始している。

以上、紹介したように、当研究班は数多くの生物資源を研究資源化する過程で不可欠な品質評価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生物資源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生物資源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。

## 研究の方法及び結果

＜創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション整備＞

### ・ホモ変異体マウスES細胞株の樹立

機能に関する情報の乏しい遺伝子や、疾患モデルの観点から興味深いと考えられる遺伝子を選定し、25個の遺伝子についてホモ変異体ES細胞株を樹立した。また、ES細胞の未分化維持に必須のLIFの非存在下でも多能性を維持できる変異体を同定・解析し、再生医学への応用のための基礎的知見を得た。

### ・ハプロイドES細胞における遺伝子変異クローンの獲得法の確立に関する研究

ハプロイド細胞の割合が90%の細胞に

バーコード付きの遺伝子トラップベクターを導入し、遺伝子トラップベクターが1コピー、ハプロイドES細胞に導入された細胞をバーコードと薬剤選択を組み合わせで獲得する方法の開発を行った。条件検討の結果、ハプロイドES細胞に遺伝子トラップベクターを効率よく、しかも1コピー導入できる条件が判明した。

### ・コンパニオン診断薬の開発を支援する高度ヒト細胞資源の充実化

食道癌、皮膚癌（有棘細胞癌）、肝細胞癌などの細胞を使用して、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製を行った。乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する6種類のルシフェラーゼ(Luc)発現がん細胞株を樹立し、JCRB細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の細胞資源といえる。

### ・ヒト組織供給体制整備・拡充

(独)医薬基盤研究所において、新たにヒト組織バンクの構築を行い、これまでヒューマンサイエンス研究資源バンクで実施してきた事業を継承した。その中でも新鮮組織の供給においては本年度16試料の提供（滑膜組織4試料；関節リウマチ1例、変形性関節症3例、大腸組織2試料、小腸組織7試料、内臓脂肪組織3試料）を実施した。また、滑膜組織より細胞を調製し、255本の凍結保存細胞を保管した。さらに調整した細胞の情報付加のため、遺伝子発現解析を実施し、炎症性マーカー等の発現情報を

取得を行い、細胞資源情報とした。

#### <高品質研究資源の供給体制>

##### ・ マイコプラズマに関する研究

哺乳動物を宿主とするマイコプラズマの一群であるヘモプラズマに関して、その分類・同定法の開発を行った。また、日本薬局方の改訂に向けた多施設共同研究を実施し、核酸増幅法の感度、バリデーション方法の検討を行い、局方改定に向け提言のまとめを実施した。

##### ・ 生体試料同士の混入・入れ替わりの排除

国際的にも問題となっている生体試料の誤認（生体試料の混入、入れ替わり）に関して、国際共同研究の一環として誤認細胞の登録、リスト化を実施し、情報発信した。また日本国内においても、日本の研究者をサポートするため生体試料認証のためのデータベース構築に着手し、その検索サイト設置を目指し、準備を進めた。

##### ・ 微生物汚染の排除

###### ① ウイルス検査

培養細胞から抽出した核酸を検査試料として、東京医科歯科大学 清水らの方法でウイルススクリーニング検査を継続実施した。その結果、ヒト由来細胞を中心に805検体を検査し、67検体（66細胞株）でウイルス検査陽性の結果（確定検査未実施を含む）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。

###### ② マイコプラズマ汚染検査

研究資源バンクで登録した資源に対して、

MycoAlert法などを用いたマイコプラズマ汚染検査を実施した。その結果細胞バンクに新規に登録した64種の細胞のうち13種（20.3%）にマイコプラズマ汚染が認められた。汚染を検出した研究資源に関しては薬剤処理と確認試験を実施し、マイコプラズマフリーの研究資源として登録を行った。

##### ・ がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサーIonPGMを使用し、50個のがん関連遺伝子に関するリシーケンス（再配列解析）を実施し、食道がん細胞を中心に40株の解析を実施した。これらの情報はがん細胞のプロファイル情報として有益であり、これらの情報を付加することでがんの悪性度や分化度、転移能などを予測することが可能となり、これらをターゲットとした創薬への応用が期待できる細胞資源となる。今後これらの情報をデータベース化し細胞情報として付加することで研究者が資源を選択する際の有用情報となることを期待している。

#### 評価

##### 1) 達成度について

（独）医薬基盤研究所・培養資源研究室はJCRB細胞バンクとして64種の新規細胞の収集、過去最高の分譲実績となる4,277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・疾患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。特に本年度は細胞誤認排除に向けた国際活動を実施し、研究社会に向けた提言を行った。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4, 277アンプルとなり、国内外の研究者に有用な細胞資源の供給を実施することが出来た。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るが、その予測は非常に困難である。しかしながら、品質管理を徹底的に行った高品質な細胞を常に供給する体制を整備することで、細胞バンクの存在価値が高まり、必然的に細胞バンクを利用する研究者が増え、研究社会に細胞バンクが貢献できると考えている。我々JCRB研究資源バンクは、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、創薬・疾患研究を支援する研究資源の供給体制を確立し、厚生労働省の研究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。

## 結論

細胞・組織などの研究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、研究資源の高度化を行った。研究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資源の確立に努めた。

今後、日本の厚生労働省の研究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

### 細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究

研究代表者	小原 有弘	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	主任研究員
分担研究者	佐藤 元信	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	研究調整専門員
協力研究者	塩田 節子	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	小澤 みどり	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	大谷 梓	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	家村 将士	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	縦山 明日香	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	平山 知子	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	小堀 眞季	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員

#### 研究要旨

JCRB 研究資源バンクは厚生労働省が主管する研究資源バンクであり、創薬・疾患研究等を推進する目的で設置運営されている。その中でも細胞バンクは1400株にもおよぶ細胞資源を保有しており、年間4300アンプル程度を国内外の研究者に提供している。また、創薬支援の観点から発光細胞や遺伝子改変細胞の資源化を進めており、これら有用細胞資源の品質管理ならびに品質評価法開発を通じて、生命科学研究の研究基盤の構築を目指している。本研究では創薬・疾患研究等の支援のための細胞資源化を行うとともに、細胞を扱う研究者の安全を確保する目的のため、細胞品質管理としてのウイルススクリーニング検査を継続実施し、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し、細胞資源のウイルス汚染状況の調査研究を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に805検体を検査し、67検体（66細胞）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。さらに、細胞品質管理の一環として細胞の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年以來継続)。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。本年度、国際共同研究としてThe International Cell Line Authentication Committee (ICLAC)による活動を行い、クロスコンタミ細胞リストの更新公表等を行いながら、科学的根拠に基づくクロスコンタミ細胞のレビュー及び認定を実施するとともに、論文審査や研究費申請の際に審査員が使用できるCell Line Checklistを

作成し、科学雑誌編集担当者等への配布を開始した。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無関心であるのが現状である。細胞バンクとしてこれら細胞品質の保証を責務と考え、新たな品質管理法の開発ならびに品質評価法の開発を通じて、提供する細胞の高品質化を図り、これらの情報を、細胞バンクとして分譲する細胞の付加情報として整備することを目的とした。

本研究では創薬・疾患研究に有用な研究資源の拡充を行うとともに、細胞のウイルススクリーニング検査による細胞品質の高度化、細胞認証のために必要なデータベースの構築を実施した。

#### B. 研究方法

<創薬・疾患研究に有用な細胞の資源化>  
ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を導入した発光がん細胞 8 株ならびにマウスホモ変異体 ES 細胞 15 株の増殖、品質管理、保管を実施し、供給体制の確立を行った。

<細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

##### ①細胞のウイルススクリーニング検査

・細胞株からのゲノム DNA の抽出  
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 を抽出した。

##### ・検査プレートの作成

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宅配便にて受け取り、検査に使用した。用いたプライマーの種類は表 2 にまとめた。

##### ・ウイルスゲノムの増幅

2xbuffer, RT-taq, RNase-Free H<sub>2</sub>O からなる Master Mix に細胞の totalRNA を 100 ng/well となるように加え、Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン) で 50°C30 分処理後、PCR 反応：95°C15 分処理後、94°C15 秒, 60°C60 秒の反応を 45 サイクルで行った。

##### 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 μL) にMycoAlert Reagent (100 μL) 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 μL) 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。

##### ③がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサー IonPGM を使用して 50 個のがん関連遺伝子に関するリシーケンスを実施した。

#### <細胞認証に関わる国際共同研究>

クロスコンタミネーション細胞のリストを ATCC、DSMZ、など世界の細胞バンクならびに細胞生物学研究者とともに作成・更新した。また、論文審査・研究費審査の際に使用する為の Cell Line Checklist を作成し、細胞誤認排除のための活動を行った。

#### C. 研究結果

##### <創薬・疾患研究に有用な細胞の資源化>

共同研究者の高崎健康福祉大学村上先生より寄託されたホタルのルシフェラーゼ遺伝子導入がん細胞（発光がん細胞）のうち、乳がん2種、子宮内膜がん1種、食道がん（小細胞がん）1種、皮膚がん（有棘細胞がん）2種（表1）などの発光がん細胞の資源化を実施した。また、現在 JCRB 細胞バンクにおいて利用数が多く、他の細胞バンクに登録をされていない細胞16種（表2）に関して遺伝子導入による発光化を実施している。またホモ変異体マウス ES 細胞株に関しても32種の細胞の分譲体制を整備した（表3）。

##### <細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

###### ① 細胞のウイルススクリーニング検査

DNA 試料を用いたウイルス検査法によるウイルス検査を細胞バンクに登録されているヒト由来細胞で継続実施し、805細胞種の検査を終了した。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805検体を検査し、67検体（66細胞）でウイルス検査陽性の結果（確定検査未実施を含む）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。

###### ② マイコプラズマ汚染検査

本年度資源化した細胞64種のうち、13細胞種（陽性率20.3%）においてマイコプラズマ汚染が認められた。

###### ③ がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサーIonPGMを使用して50個のがん関連遺伝子に関するリシーケンスを実施し、食道がん細胞を中心に40株の解析を実施した。その結果を細胞情報として付加するためのデータベース作成に着手し、データの見せ方に関する検討を行った。

#### <細胞認証に関わる国際共同研究>

昨年度までに、国際共同研究として The International Cell Line Authentication Committee (ICLAC) を立ち上げ、ガイドライン、SOP、クロスコンタミ細胞リストの公表等を行いながら、科学的根拠に基づくクロスコンタミ細胞のレビュー及び認定を実施した。本年度はクロスコンタミ細胞のリストの更新、クロスコンタミ細胞の新規レビューのほかに Cell Line Checklist (図1) の作成を行い、論文審査及び研究費申請の際に厳正な審査を行って頂き、細胞誤認が排除できるよう活動を行った。また国内細胞バンクの連携により細胞認証に必要なデータベースの構築を実施し、検索サイトの

整備を行った（図2）。

#### D. 考察

##### <創薬・疾患研究に有用な細胞の資源化>

発光がん細胞は高崎健康福祉大学の村上先生により作製され、非常に多くの発光細胞資源が寄託されており、世界最大規模の発光細胞コレクションとなっている。発光細胞はその細胞特性によりマウスに移植した際にがん細胞を麻酔下のマウスで継時的に細胞の動態を観察できる利点があり、創薬研究には非常に有用な細胞となっている。本年度新たに乳がんや皮膚がんなどを中心に珍しいがんの種類における発光細胞の分譲体制を確立することができた。今後これらの細胞を用いた研究が発展し、創薬につながることを期待したい。また、現在肝臓がん細胞を中心に JCRB 細胞バンクにしか登録の無い細胞で非常によく利用されている細胞の発光資源化を進めており、これらの細胞ができるだけ早く分譲できるよう体制整備を進める予定である。

ホモ変異体マウス ES 細胞に関しては、奈良県立医科大学の堀江先生らによって作製され、変異した遺伝子の機能評価を行うのに非常に有用な細胞資源であると考えられる。本年度までに32種の細胞の分譲体制を整備したが、今後さらなる資源の拡充に努め、創薬・疾患研究のための資源の拡充を行う予定である。

##### <細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

#### ① 細胞のウイルススクリーニング検査

JCRB 細胞バンクで保有するヒト由来細胞株

を中心にウイルススクリーニング検査を継続実施し、DNA 試料を用いたウイルス検査は既に805細胞株の検査を行った。その検査の中で、ウイルス陽性と判定されたのは67検体（66細胞株）であり、そのほとんどが文献報告されているウイルス汚染であった。しかし、一部は文献報告のないウイルス汚染であり、非常に興味深い知見が得られたと考えられる。

#### ② マイコプラズマ汚染検査

研究に用いる細胞のマイコプラズマ汚染の状況は高い汚染率を示しており、我々が過去に行った調査研究においては約25%の細胞がマイコプラズマに汚染されていると考えられる。これらの汚染細胞を用いて行った研究の信頼性・再現性にはその研究の信憑性を疑われるケースが多く、膨大な研究費・研究労力が無駄にあることが考えられる。その意味では細胞バンクが提供する細胞の品質保証は絶対的であり、そこにこそ細胞バンクの存在意義があると考えられる。本年度資源化した細胞64種のうち、13細胞種（陽性率 20.3%）においてマイコプラズマ汚染が認められた。検出された汚染は1つの研究室内で多くの細胞に汚染が広がった例であり、細胞培養培地、試薬、培養器具の共有などにより水平に汚染拡大したと考えられる。この事象は他の多くの研究室でも日常的に起こっていることと考えられ、これらの汚染排除には1. マイコプラズマに関する知識の普及、2. 簡単に検査できる方法の普及などにより研究者への啓発活動が重要になると考えられる。こ

これらの責務も細胞バンクとして果たしていくよう、折に触れてマイコプラズマ汚染の影響、細胞の微生物汚染の影響に関する情報発信に勤めたい。また、本年度より日本薬局方改正のためのマイコプラズマ否定試験に関する共同研究を実施し、核酸増幅法による確実かつ有用なマイコプラズマ否定試験を日本薬局方に掲載するべく研究活動を実施した。

### ③ がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサーIonPGMを使用して50個のがん関連遺伝子に関するリシーケンスを実施し、食道がん細胞を中心に40株の解析を実施した。これらの情報はがん細胞のプロファイル情報として有益であり、これらの情報を付加することでがんの悪性度や分化度、転移能などを予測することが可能となり、これらをターゲットとした創薬への応用が期待できる細胞資源となる。今後これらの情報をデータベース化し細胞情報として付加することで研究者が資源を選択する際の有用情報となることを期待している。

#### <細胞認証に関わる国際共同研究>

細胞のクロスコンタミネーションは世界的にも重要な事項として問題視されている。このクロスコンタミネーションによって多くの研究報告の信憑性が疑われ、多くの研究費・研究労力の浪費に繋がっているのは間違いのない事実である。既に報告されている間違った細胞を利用した研究も後を絶たず、これらが及ぼす研究社会への影響は計り知れないものだと考えられる。本年度

実施した、Cell Line Checklist の作成・配布は論文審査ならびに研究費申請の際に審査員がしっかりとした審査を行い、細胞誤認を排除するための方策であり、これが効果を上げ実際に細胞誤認がなくなるよう今後も活動を継続する予定である。

### E. 結論

培養細胞研究資源を使用した研究の質を高めるために、細胞バンクの果たす役割は大きく、研究者が必要とする細胞資源をラインナップするとともに研究に使用する細胞の出来る限りの保証を代行することが大きな役割であると考えられる。細胞の品質評価法開発ならびに特性解析技術の開発は研究者により良い細胞資源を提供するために必須であり、これらの継続的な研究実施が不可欠なものである。研究社会において日本人研究者が良い成果を出すため、その基盤整備を怠ることは出来ない。今後、本研究班で資源化した細胞が細胞ツールとして創薬・疾患研究に貢献し、研究が進展・発展する可能性があり、そのために必要な情報を付加する技術を開発することが出来た。また、細胞バンクが永続的に細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックなどの品質管理技術の情報と研究者に必要な細胞資源の情報を提供して責務を遂行してゆくため、本研究班の継続実施が重要であると考えられる。

### F. 健康危険情報

適用なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, Drexler HG, Macleod RA, Sykes G, Kohara A, Nakamura Y, Elmore E, Nims RW, Alston-Roberts C, Barallon R, Los GV, Nardone RM, Price PJ, Steuer A, Thomson J, Masters JR, Kerrigan L. Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? *Int J Cancer*. 132(11):2510-2519 (2013)
- 2) Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. *PLoS One*. 8(1):e54122 (2013)
- 3) Capes-Davis A, Alston-Roberts C, Kerrigan L, Reid YA, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Freshney RI, Healy L, Kohara A, Korch C, Masters JR, Nakamura Y, Nims RW, Storts DR, Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. Beware imposters: MA-1, a novel MALT lymphoma cell line, is misidentified and corresponds to Pfeiffer, a diffuse large B-cell lymphoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer*. 52(10), 986-988 (2013)
- 4) 家村将士、小堀眞季、小澤みどり、平山知子、川口英子、大谷梓、樫山明日香、塩田節子、小原有弘 DNA 多型解析によって明らかとなったヒト培養細胞のクロスコンタ

ミネーションの現状 DNA 多型学会誌 (2013 印刷中)

### 2. 学会発表

#### 国内会議

JCRB 生物資源バンクの新展開. 佐藤元信、BIotech2013、第 12 回国際バイオテクノロジー展/技術会議、5 月 (東京)

DNA 多型解析によって明らかとなったヒト培養細胞のクロスコンタミネーションの現状 家村将士、小堀眞季、小澤みどり、平山知子、川口英子、大谷梓、樫山明日香、塩田節子、小原有弘 日本 DNA 多型学会 第 22 回学術集会 11 月 (仙台)

研究ツールとしての培養細胞の活用と問題点、小原有弘 日本薬学会東海支部講演会 1 月 (名古屋)

日局参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」の PCR 法の見直しに関する研究 内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英、日本薬学会第 134 年会 3 月 (熊本)

マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株および標準 DNA の調製 窪崎敦隆、菊池裕、宮原美知子、遊佐精一、島崎愛加、石橋侑季、鈴木俊宏、小原有弘、大谷梓、佐々木裕子、松山晃文、大倉華雪、古田美玲、内田恵理子、山口照英、日本薬学会第 134 年会 3 月 (熊本)

国際学会

1. Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease. Kohara A., Hirayama N., Ozawa M., Ohtani A., Kawaguchi E., Iemura M., Shioda S., Momiyama A., Kobori M., Masui T.: Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease. International Society for Biological and Environmental Repositories: ISBER 2012 Annual Meeting & Exhibits 2013.5, Sydney, Australia.
2. Genomic profiles of tumor cell lines collection analyzed by high-resolution array-based comparative genomic hybridization (aCGH) and next-generation sequencing (NGS). Kohara A., Hirayama N., Ozawa M., Ohtani A., Iemura M., Shioda S. American Society of Cell

Biology: 2013 ASCB Annual Meeting, New Orleans, Louisiana (2013.12)

3. Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease. Kohara A., Satoh M., Yoshida T., Kosaka T., : 5th ANRRC International Meeting Shonan (2013.10)
4. Human Tissue Bank at the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) : Kosaka T., Ohnishi A., Masui T., Kohara A. : Availability of Surplus Surgical Tissues for Biomedical Research. 5th ANRRC International Meeting Shonan (2013.10)

由来組織	細胞株	Luc発光
乳がん	SK-BR-3	Very Good
	MDA-MB-231	Good
子宮内膜がん	Ishikawa 3-H-12	Good
食道がん由来 (小細胞がん)	TYUC-1	Very Good
皮膚がん (有棘細胞がん)	HSC-1	Very Good
	HSC-5	Very Good

表1 本年度分譲可能となった発光がん細胞

がんの種類	細胞株名	がんの種類	細胞株名
肝細胞がん	HuH-7	肝細胞がん	HLE
	huH-1		HLF
	Hep G2	胆管がん	OZ
	JHH-1		HuH28
	JHH-2	胆嚢がん	NOZ
	JHH-4	肝芽腫	HUH-6 Clone5
	JHH-5	食道がん由来 (腺がん)	KYAE-1
	JHH-6		
	JHH-7		

表2 現在遺伝子改変中のがん細胞一覧

細胞登録番号	細胞名	細胞登録番号	細胞名	細胞登録番号	細胞名
AYUK14G12	Nr5a2-K1	AyuK6F01	Gpatch4-K1	AyuK16E07	Lrch4-K1
AYUK13F05	Phf20-K1	AyuK6D12	Smg5-K1	AyuK18C02	1110007L15Rik-K1
AYUK8C12	Gm561-K1	AyuK8B01	Ilf2-K1	AyuK17A12	Lnx2-K1
AyuK8E11	Ube2c-K1	AyuK10A10	Cdc42se1-K1	AyuK10H04	Cbx3-K1
AyuK12C11	Ctdspl2-K1	AyuK15A08	Anp32e-K1	AyuK6E04	Armet-K1
AyuK14C04	Fubp3-K1	AyuK12C03	Fryl-K1	AyuK7G08	Rbm5-K1
AyuK14G01	Cdca7-K1	AyuK6B03	G3bp2-K1	AyuK8C06	Cnot10-K1
AyuK16A10	Fmnl2-K1	AyuK17E05	Ptpn11-K1	AyuK8G11	Nedd4-K1
AYUK19F03	Nmt2-K1	AyuK7G11	Rsrc2-K1	AyuK17E10	Myh9-K1
AyuK11E04	Csnk2a1-K1	AyuK14E01	Kntc1-K1	AyuK6H07	Cbx1-K1
AyuK15G02	Kpna4-K1	AyuK16C10	Gnb2-K1		

表3 分譲可能となったホモ変異体マウス ES 細胞

International Cell Line Authentication Committee | ICLAC.org

**Cell Line Checklist for Manuscripts and Grant Applications**

This checklist is designed as a resource for scientists who write or review manuscripts and grant applications that use cell lines. Some cell lines will give unreliable results if used for research – for example, cross-contaminated cell lines no longer correspond to donor tissue and so may not represent the correct species, tissue type or disease state. Such misidentified or false cell lines produce unreliable research data and we urge reviewers to highlight their use wherever possible.

This checklist will help the author or reviewer to look for obvious cell line quality concerns. The checklist may also be used to communicate any quality concerns to be addressed prior to publication or funding.

**Manuscript or Grant Information**

Title or Manuscript/Grant ID:	
Cell Lines used:	
Cell Lines used with Quality Concerns:	

**Cell Line Information**

Reporting Requirement	Yes or No (No includes Not Known) Add further comment if required
Cell line is known to be cross-contaminated or otherwise misidentified. See the ICLAC website for a database of known misidentified cell lines and Recommendation 1) below.	
Authentication testing has been performed. The method and results should be listed. See Recommendation 2) below.	
Human cell lines: STR profile is available with the manuscript/grant application. See Recommendation 2) below.	
Mycoplasma testing has been performed. The method and results should be listed.	

つづく

**チェックリストの内容**

広く科学雑誌の論文審査員に頒布し、細胞使用研究におけるチェックを厳格化

論文あるいは研究費申請タイトル、使用した細胞株名など基本の情報

①使用した細胞が誤認細胞のリストに記載されている細胞でないこと

②ヒト由来細胞であればSTR多型解析を実施し、そのデータを記載するとともに新規の細胞であればドナーのプロファイルと一致すること。既存細胞であればデータベースと照合した結果

③マイコプラズマに関する検査を実施し、検出されなかったこと

図1 国際共同研究によって作成した Cell Line Checklist の内容

# STR

Top コンテンツ リンク

デストユーザー 様でログイン中です

---

**Search Programs for the STR profile database of the JCRB Cell Bank**

1. Simple comparison among JCRB cells.

Pick up one human cell from the database and compare with all other human cells in the database.

2. Mutual comparison between selected JCRB cells.

Select human cells as many as you want then compare between those selected cells.

3. Matching analysis between your data and JCRB cells.

Compare your STR data with cells in the JCRB cell bank.

図2 現在構築中の細胞認証に関するデータベース検索サイト（見本）

創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究  
(H25-創薬-指定-007)

研究分担者 竹田 潤二 大阪大学医学系研究科・教授

研究要旨

ハプロイド ES 細胞における遺伝子変異クローンの獲得法の確立に関する研究

A. 研究目的

ハプロイド ES 細胞は、ゲノムが 1 コピーしか存在しないので遺伝子とその機能の関係を探索するために適している。我々は、遺伝子機能を効率よく解析するためにはプロイド ES 細胞を宿主としたバンクを作製する。

B. 研究方法

ハプロイド ES 細胞は、ハプロイド状態からディプロイド状態に容易に推移する。そこで、ハプロイド細胞の割合が 90% の細胞にバーコード付きの遺伝子トラップベクターを導入する。遺伝子トラップベクターが 1 コピー、ハプロイド ES 細胞に導入された細胞をバーコードと薬剤選択を組み合わせて獲得する。

C. 研究結果

条件検討を繰り返し、Neon によるトランスフェクション(1400V, 10msec, 3 pulses)が一番よいことが判明した。一方、遺伝子トラップベクターは、トランスポゾンシステムを利用しているが、その量はトランスポゼース発現ベクターが 1 マイクログラムでトランスポゾントラップベクターは 0,1 マイクログラムである。この条件で、2000 個以上のコロニーをピックアップし解析中である。予備的結果では、2000 コロニーのうち、約 20% が目的のクローンであることが判明している。

D. 考察

ハプロイド ES 細胞に遺伝子トラップベクターを効率よく、しかも 1 コピー導入できる条件が判明したので、今後は効率よく破壊された遺伝子を同定して行きたい。

E. 結論

条件検討が終了したので、今後は効率よくバンク作製を行ないたい。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書は記入不要)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.) Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, **Takeda J**, Inokawa H, Horie K, Yagita K., An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 $\alpha$  as an endogenous clock regulator. *PLoS One*. 28;8(6):e67241. doi: 10.1371/journal.pone.0067241., 2013.
- 2.) Yamanishi A., Yusa K., Horie K., Tokunaga M., Kusano K., Kokubu C. and **Takeda J**., Enhancement of microhomology-mediated genomic rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase. *Genome Research*. 23(9):1462-1473 doi:

10.1101/gr.152744.112., 2013

2. 学会発表

- 1.) 関西実験動物研究会 30 周年記念大会  
(第 120 回研究会)「変異 ES 細胞バンクは変異マウス作製に代替たりうるか?」、京都府京都市、2013
- 2.) 第 32 回日本認知症学会学術集会「ES 細胞は遺伝子改変マウス作製に必要不可欠の存在か?」長野県松本市、2013
- 3.) Conference on Transposon and Genome Engineering 2013, Gene discovery by transposons in diploid and haploid ES cells, Budapest, Hungary, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む)

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

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

ホモ変異体マウス ES 細胞株の樹立に関する研究  
研究分担者 堀江 恭二 奈良県立医科大学・教授

## 研究要旨

遺伝子に変異の導入された細胞株は、遺伝子機能を解析する上で有用であるのみならず、創薬に向けた標的遺伝子の同定や疾患メカニズム解明のためのモデル系としても重要である。このような変異細胞を大量に資源化するために、我々が開発した手法をマウス ES 細胞へ適用して、遺伝子の両コピーに変異の導入されたホモ変異体 ES 細胞株を樹立した。さらに、これらのホモ変異体の遺伝子機能解析を行うことで、資源としての有用性を示した。

### A. 研究目的

特定の遺伝子機能が破壊された細胞株は、創薬における標的遺伝子の探索や疾患メカニズム解明のためのモデル実験系として、極めて有用である。しかし、ヒトやマウスのような哺乳動物細胞では、遺伝子破壊の表現型を解析するには 2 コピー存在する遺伝子の両方を破壊したホモ変異体を取得する必要がある。従来の遺伝子破壊法では、多数の遺伝子に対して迅速にホモ変異体を単離することは困難であった。本研究では、我々が独自に開発したホモ変異体単離法をマウス ES 細胞へ適用し、創薬・疾患研究に有用な細胞資源を取得する。また、得られた細胞株を用いた遺伝子機能解析も行い、細胞資源としての有用性を示す。

### B. 研究方法

我々は既に約 2,000 株のヘテロ変異体 ES 細胞株を取得済みである。これらのヘテロ変異体について、過去の文献を検索することにより、機能に関する情報の乏しい遺伝子や、疾患モデルの観点から興味深いと考えられる遺伝子を選定した。これらの遺伝子に対応するヘテロ変異体 ES 細胞に対して、我々が報告済みの手法（Nature Methods 8:1071-7, 2011）を用いて、細胞周期の 4N の時期における相同染色体間組換えを誘発し、ホモ変異体を誘発・単離した。また、得られた細胞株に対して、様々な分化誘導系を適用することで、初期分化に重要な遺伝子の機能解析を行った。

### C. 研究結果

25 個の遺伝子についてホモ変異体 ES 細胞株を樹立した。また、ES 細胞の未分化維持に必須の

LIF の非存在下でも多能性を維持できる変異体を同定・解析し、再生医学への応用のための基礎的知見を得た。

### D. 考察

今後は、遺伝子機能解析にとどまらず、創薬の標的遺伝子の同定へ向けた応用性についても検討を進めたい。

### E. 結論

既に樹立済みの手法により、変異体の単離は順調に進行している。また、変異体を用いた遺伝子機能解析の有用性を示すこともできた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

無し

#### 2. 学会発表

Yoshida J., Horie K. Genome-wide comparative analyses of retroviral and DNA-type transposon vector integration sites in mouse embryonic stem cells. Implication for reprogramming study. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2013 June 12-15, Boston, USA.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

無し