

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 細胞、組織(研究資源・材料)の収集、収集した細胞の増殖(複製)、細胞あるいは組織の評価(品質管理)、評価した研究資源の適切な保存管理(資産管理)、

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 一朗：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。細

胞、組織（研究資源・材料）の収集、収集した細胞の増殖（複製）、細胞あるいは組織の評価（品質管理）、評価した研究資源の適切な保存管理（資産管理）、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、様々な誤謬を生じやす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りリアルタイム 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

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。

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 を使用して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。