

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	樅山 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。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>

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 H₂O 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 30 分処理後、PCR 反応: 95 15 分処理後、94 15 秒, 60 60 秒の反応を 45 サイクルで行った。

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。

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>

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。

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。

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>

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。

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収載するべく研究活動を実施した。

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	Fmn12-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.	

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

チェックリストの内容

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

つづく

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

テストユーザー 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）