

## 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

分担研究者: 内尾こずえ (独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 主任研究員

### 研究要旨

創薬・疾患研究にとって細胞は重要な研究ツールである。しかしながら、微生物汚染やクロスコンタミネーションした細胞の研究利用が大きな問題となっており、汚染や誤謬のない細胞の提供が資源事業の課題である。これまでに医薬基盤研究所・細胞バンクにおいて、ヒト細胞株のクロスコンタミネーション検査が既に行われていたが、マウス細胞株は検査が実施されていない状況であった。そこで本研究では、マウス由来細胞株のコレクションについて、マイクロサテライトマーカーを利用したクロスコンタミネーション検査を実施する。研究資源バンクから供給される細胞資源の高品質化に貢献し、創薬・疾患研究の発展の一助としたい。

### 研究目的

培養細胞は疾患研究に不可欠な研究ツールであり、研究の発展に大きく貢献してきた。しかしながら最近、細胞の汚染・誤謬が大きな問題となっている。医薬基盤研究所・細胞バンクにおいて、ヒト細胞株のクロスコンタミネーション検査法が確立されており、検査実施サンプル中の約10%がクロスコンタミネーションを起こしていることが報告されている。しかしながらマウス細胞株においては、これまで検査が実施されていなかった。疾患・創薬研究にはマウス細胞株も多く利用されていることから、品質管理は不可欠である。さらにマウスは疾患感受性に系統差があることが報告されていることから、系統の取り違えや誤謬

は研究の精度を著しく低下させるものである。そこで本研究において、マウス細胞株のクロスコンタミネーション検査を実施し、高品質な細胞提供に貢献したい。

### 研究方法

#### < マイクロサテライトマーカーの選択 >

ゲノム上には、1から複数塩基対の反復配列(マイクロサテライト)が広範囲に多数散在し、マウス系統によりその反復回数に多型が存在する。この反復配列の近傍にプライマーを設計し、PCRを行い、電気泳動パターンの多型として検出可能である。すでにマウス細胞のクロスコンタミネーション検査法として報告されている文献(Yoshino et al., IBC 2010; 2:14, 1-9)

を参照し、マウス系統の判別が可能な6箇所  
のサテライトマーカー (D1Mit159, D2Mit395, D4Mit170, D5Mit357, D13Mit253, D17Mit51) を選択した。

#### < DNA抽出とPCR >

C57BL/6J, BALB/cB, DBA/2J, C3H/HeJ, FVB/N, 129SVJ マウスの約2ミリメートルの尾より QIAGEN EZ1 DNA extraction kit を用いて DNA を抽出した。またマウス細胞についても同様に QIAGEN All prepDNA/RNA kit を用いて DNA を抽出した。各マイクロサテライトマーカーのプライマーを用いて PCR を行った (Promega, GoTaq Master Mix)。センスプライマーには蛍光ラベルを施した (Backman, Dye2,3,4)。PCR 産物はキャピラリー電気泳動 (Beckman CEQ8800) にて解析した。解析結果は図1のようになる。

#### 結果および考察

まず主要なマウス系統を判別できるマーカーを6箇所選択し、クロスコンタミネーション検査法を確立した (表1)。本年度は細胞バンクのコレクションから、多様なマウス系統 (C57BL/6, BALB, C3H, 129, ICR, swiss albino) 由来細胞株の検査を実施した。その結果、BALB/c マウスから樹立された BALB 3T3 (JCRB9005) を改変した細胞5株 (JCRB0601, 1356, 0149, 1355, 1357) が swiss albino マウス由来の細胞と判定され、クロスコンタミネーションを起こしていることが分かった。これら5種類の細胞はすべて同じ研究者より寄託された株である。解析

結果より、これら5種類の細胞は swiss albino マウスから樹立された 3T3 L1 株 (JCRB9014) と培養過程でクロスコンタミネーションを起こしたと考察された。また JCRB1215 は寄託者から C3H マウス由来細胞株と情報提供を受けたが、C57BL/6 マウス由来細胞株であることが判明した。さらに JCRB1198, 1199 についても樹立者から C57BL/6 マウス由来と情報提供があったが、解析の結果、C57BL/6 と CBA マウス由来のゲノムが混在していることが分かった。この細胞株はノックアウトマウスの組織由来であり、マウスのコンジェニック化が不完全である可能性が高かったため、寄託者に細胞を樹立した経緯を確認した。その結果、ノックアウトマウス作製には ES 細胞 TT2 株 (C57BL/6 x CBA) を使用しており、マウス樹立から2世代目で細胞株を樹立したことが分かった。そのため、C57BL/6 と CBA マウス両方のゲノムが検出されたと考察された。JCRB1198, 1199 については、クロスコンタミネーションではなく、マウスのコンジェニック化が不完全であると判断でき、今後由来マウス系統情報の表記を修正する。

これまでにヒト細胞株においてもクロスコンタミネーションが多数報告されているが、マウス細胞においても同様の現象が確認された。引き続き医薬基盤研究所 細胞バンクのマウス細胞コレクションのクロスコンタミネーションの有無を検査し、誤謬のない高品質細胞を提供できるよう尽力したい。

## 研究発表

### <論文発表>

1. Uchio-Yamada K., Sawada K., Tamura K., Katayama S., Monobe Y., Yamamoto Y., Ogura A., Manabe N. Tenc1 Deficient Mice Develop Glomerular Disease in a Strain-Specific Manner. *Nephron Experimental Nephrology*. 2013; 123: 22-33
2. Tamura K., Uchio-Yamada K., Manabe N. Noto T., Hirota R., Unami A., Matsumoto M., Miyamae Y. Gene Expression Analysis Detected Low Expression Level of C1s Gene in ICR-derived Glomerulonephritis (ICGN) Mice. *Nephron Experimental Nephrology*. 2013; 123: 34-45
3. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K., Matsuda J. Zygosity Determination in Hairless Mice by PCR Based on Hr(hr) Gene Analysis. *Exp Anim*. 2013; 62(3): 267-273.

### <学会発表>

1. 河原崎 正貴、矢口 文、千葉 洋祐、鎌田 彰、小泉 大輔、島田 昌彦、内尾 こそえ、根本 直「食餌誘導性肥満マウスにおける畜肉食あるいは魚食が代謝に及ぼす影響」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 24-26 日、名古屋(口頭)
2. 河原崎 正貴、矢口 文、千葉 洋祐、鎌田 彰、小泉 大輔、島田 昌彦、内尾 こそえ、根本 直「食餌誘導性肥満マウス

- における畜肉食あるいは魚食が代謝に及ぼす影響」第 8 回メタボボロームシンポジウム、2013 年 10 月 3-4 日、福岡(口頭)
3. 里 直行、森-植田 茉莉、田中稔久、武田朱公、向園昌弘、澤口翔伍、内尾-山田 こそえ、篠原 充、村山繁雄、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「糖尿病はアルツハイマー病における恒常性維持機構を破綻させる」第 32 回日本認知症学会学術集会、2013 年 11 月 9 日、松本(口頭)
  4. 鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こそえ、松田潤一郎「PTEN 抑制剤投与によるマウス卵巣の組織的变化」第 106 回日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 12 日-14 日、東京(ポスター)
  5. 鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こそえ、松田潤一郎「マウス清掃状態精子の受精能に及ぼす resveratrol の効果」第 60 回実験動物学会、2013 年 5 月 15 日-17 日、つくば(ポスター)
  6. 里 直行、森-植田 茉莉、田中稔久、澤口翔伍、向園昌弘、武田朱公、篠原 充、村山繁雄、内尾-山田 こそえ、上田裕紀、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「Abeta is prerequisite. But insufficient to cause tau phosphorylation in vivo: Tau phosphorylation in APP mice by diabetes.」第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3-7 日、神戸(ポスター)
  7. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K., Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. Possible involvements of

Abeta, insulin signaling and tau phosphorylation in the pathological interaction between Alzheimer disease and diabetes. □ AAIC 2013 The Alzheimer's Association International Conference 2013,

Boston, July 14, 2013 (ポスター)

知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. マウス系統のマイクロサテライトマーカー

Marker	D1Mit159	D2Mit395	D4Mit170	D5Mit357	D13Mit253	D17Mit51
C57BL/6	190	126	103	124	77	157
BALB	134	133	119	114	109	154
DBA	134	133	119	144	98	154
129	180	154	103	124	105	163
C3H	174	120	113	144	101	140
FVB	180	160	113	140	101	141

図 1 キャピラリー電気泳動像

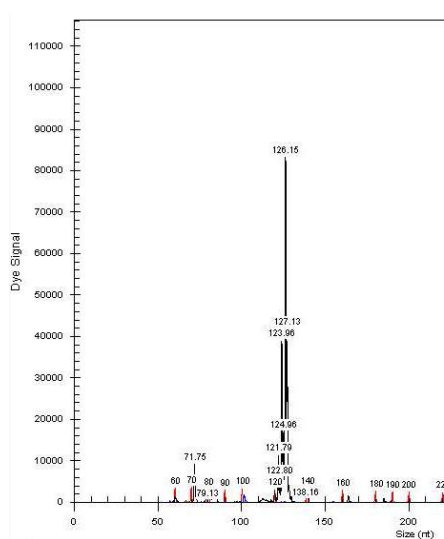


表2 マウス細胞株の検査結果

	細胞名	寄託者からの	
		マウス系統情報	判定結果
JCRB1204	KUM7	C3H/He	C3H/He
JCRB9014	3T3 L1	swiss albino	swiss albino
JCRB0017	P388	DBA/2	DBA/2
JCRB1348	3LL	C57BL/6	C57BL/6
JCRB0202	B16 melanoma	C57BL/6	C57BL/6
JCRB0706	tsFT101	C3H	C3H
JCRB1322	m5S	ICR/Jcl	ICR/Jcl
JCRB9003	NCTC Clone 929	C3H/An	C3H/An
JCRB0720	OTT6050	129/Sv	129/Sv
JCRB9005	BALB/3T3 A31	BALB/c	BALB/c
JCRB1202	KUM6	C3H/He	C3H/He
JCRB1349	Ex-3LL	C57BL/6	C57BL/6
JCRB1447	4T1-Luc	BALB/cfC3H	BALB/c
JCRB1474	B16-F0-Luc	C57BL/6	C57BL/6
JCRB9005	BALB/3T3 A31	BALB/c	BALB/c
JCRB0601	BALB/3T3 A31-1-1	BALB/c	swiss albino
JCRB1356	A31-1-1	BALB/c	swiss albino
JCRB0149	Bhas42	BALB/c	swiss albino
JCRB1355	1-1ras1000	BALB/c	swiss albino
JCRB1357	1-1src	BALB/c	swiss albino
JCRB1215	HS-22	C3H/He	C57BL/6
JCRB1199	R201C	C57BL/6	C57BL/6 and CBA
JCRB1198	GP8	C57BL/6	C57BL/6 and CBA