

201407031A

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26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

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所
医薬基盤研究所 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

平成27年(2015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	-----	8
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 7
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 9
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	-----	2 0
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 4
6. マイコプラズマ検査法に関する研究	原澤 亮	-----	3 0
7. 多指(趾)症手術摘出検体の研究資源化	絵野沢 伸	-----	3 3
8. 肝臓組織の品質管理・供給体制整備	中村和昭	-----	3 6
9. 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 9
1 0. ヒト由来試料に関する情報データベースの構築	坂手 龍一	-----	4 9
1 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	内尾こずえ	-----	5 8
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----		6 2
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----		6 5

平成26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。また、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。

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。また、2014年 Science 誌に掲載された記事によると、HeLa 細胞（子宮頸がん由来）の誤認細胞である HEP-2 細胞（喉頭がん由来）を用いた研究報告が1,182雑誌に5,789報も掲載され、174,000もの引用がなされており、同様に HeLa 細胞の誤認細胞である INT 407 細胞（小腸由来）を用いた研究報告が271雑誌に1,336報も掲載され、40,000もの引用がなされている。これらの細胞による研究費の浪費は約3.18億ドル（約380億円）に相当すると試算されている。さらに日本の KAKEN データベースで両細胞名を検索してみると HEP-2 細胞で143件の研究費（2000年以降80件、2000年以前63件）、INT 407 細胞で11件（2000年以降5件、2000年以前6件）の研究費が支給されている現状が明らかとなる。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4000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、20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、表現型解析に関しては、再生医学への応用を目指して、ES細胞の多能性に破綻をきた

した変異体を複数同定した。

・ 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

前年度までに検討した至適条件において、ハプロイドES細胞にトラップベクターを導入し、2000個以上のコロニーをピックアップして解析した。その結果、約200個のクローンが目的のクローンであることが判明した。

・ 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

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。CMVプロモーターに加えEF1 α プロモーターを採用した細胞改変を行ない、肝細胞がん由来する6種類のルシフェラーゼ発現がん細胞株を樹立し、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23試料の提供(滑膜組織9試料; 関節リウマチ8例、変形性関節症1例、大腸組織2試料、小腸組織2試料、凍結滑膜細胞6試料、口蓋扁桃リンパ小片4試料)を実施した。また、多指(趾)症の形成外科手術で生じる余剰指(趾)組織から皮膚などの細胞を分離し、研究資源

化のための予備検討を行なった結果、資源化が可能であることが分かった。

<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

培養動物細胞の培養液に広く用いられているウシ血清の原料となる血液におけるヘモプラズマ汚染は培養細胞を扱う研究者にとって警戒すべき事象である。その感染同定法について開発研究を実施した。

・ 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を行い、データの更新を行うとともに、その検索サイト充実を図った。

・ 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880検体を検査し、74検体（73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68種の細胞のうち9種（13.2%）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

食道がん細胞を中心に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、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するよう研究を進めた。

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68種の新規細胞の収集、4,022アンプルの分譲を行った。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。特に本年度も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。また、生物種同定に関する国際ガイドライン策定のため ATCC-SDOの活動に参画し、DNA Barcoding に関する「Species Level Identification through DNA Barcodes」というガイドラインを作製開始した。

3) 今後の展望について

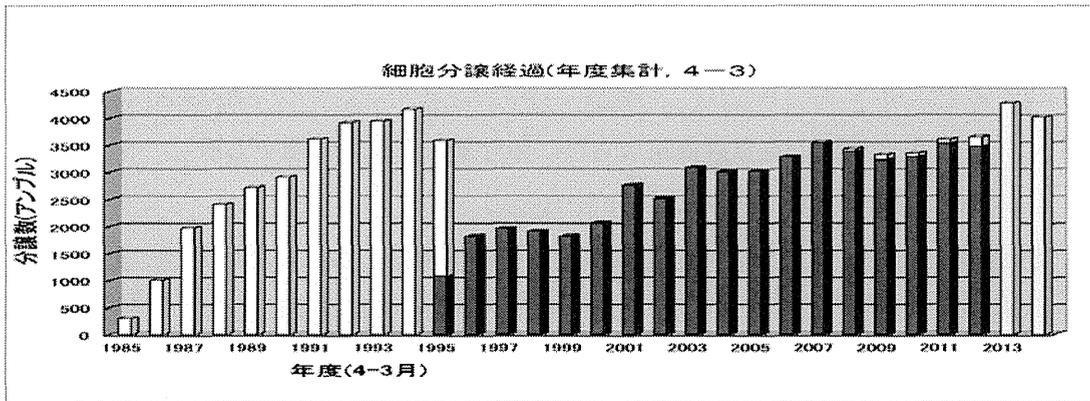
JCRB細胞バンクが分譲した細胞数は本年度4,022アンプルとなり、国内外の研究者に有用な細胞資源の供給を実施することが出来た。これは培養細胞を用いた研究が広く普及したことと、保有する細胞資源の数が増加しているのに比例していると考えるのが妥当である。しかし、細胞

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。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。



JCRB細胞バンクにおける分譲実績推移

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	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

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4000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880検体を検査し、74検体（73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 13 株ならびにマウスホモ変異体 ES 細胞 14 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宅配便にて受け取り、検査に使用した。

- ・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°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、日本国内細胞バンク (JCRB 細胞

バンク、理研細胞バンク)において新規登録されたヒト細胞株の STR データをデータベースに登録した。

④逆転写酵素活性測定によるウイルス否定試験

Reverse Transcriptase Assay, colorimetric, Version1.3 (Roche 社製)を使用して逆転写酵素の活性の有無を測定した。

<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、日本国内細胞バンク (JCRB 細胞バンク、理研細胞バンク)において新規登録されたヒト細胞株の STR データをデータベースに登録した。

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、肝細胞がん 6 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 10 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 4 6 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、880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880検体を検査し、74検体(73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68種のうち、9細胞種(陽性率13.2%)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

食道がん細胞を中心にがん関連遺伝子に関するリシーケンスを実施し、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構築を実施した。今後順次データベース更新を行いながら細胞情報として公開を検討する。

④ 逆転写酵素活性測定によるウイルス否定試験

これまでに発光細胞、iPS 細胞等、その細胞の作製のためウイルスベクターが使用されるがこれらウイルスベクターが残存していれば、組換え生物としての取扱いが必要となるうえに、本当のレトロウイルスやレンチウイルスなどを見分けがつかないことが問題となる。そこで逆転写酵素活

性が無いことにより、ウイルス粒子の生成が起こらないことを証明し、ウイルス否定を行う方法を開発した。その結果本年度17株の発光細胞を分譲開始することができた(表4)。

＜細胞認証に関わる国際共同研究＞

平成24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多くの科学雑誌に記事の寄稿を行い、細胞誤認が排除できるよう活動を行った。また昨年度までに構築した細胞認証に必要なデータベースのデータ更新登録を実施し、検索サイトならびに発信情報の充実を図った(図1)。

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続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。本年度はJCRB細胞バンクで非常に多く分譲されている肝細胞がん株を新たに発光細胞資源として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、現在も引き続き、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46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880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74検体(73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68種のうち、9細胞種（陽性率13.2%）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。

③ がん遺伝子プロファイル

昨年度までに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。これらの情報をデータベース化して細胞情報に付加するためデータベース構築に取り組んだ。今後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ことが期待される。

④ 逆転写酵素活性測定によるウイルス否定試験

これまでに多くの発光細胞の分譲体制を確立してきたが、遺伝子導入効率の観点からレンチウイルスベクターを遺伝子導入に用いている。このレンチウイルスベクターによって我々が細胞品質管理の一環として実施しているウイルススクリーニング検査においてHIV陽性と判定されてしまうケースが多々見られた。これは遺伝子導入に用いられたベクターの一部が細胞に残存しており、検査系に反応して陽性となってしまふものと考えられるが、これを否定できないと安全な細胞使用に影響が出てしまうため、逆転写酵素活性を測定することでウイルス粒子の形成ができないことを証明して、代用することを考え、検査系開発を行った。その結果、すべての細胞において逆転写酵素活性は検出されず、これによりレンチウイルスベクターで作成された発光細胞17種を分譲開始することができた。

<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。本年度は Science 誌、Nature 誌に記事を掲載していただき、細胞誤認による研究社会への影響に関して大々的に周知を行った。これによる研究者一人一人に細胞誤認の現状を認識していただき、細胞誤認がなくなるような研究の展開を考えて頂く良い機会となることを期待している。

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ト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) Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. : Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. Genes (Basel). 11(4):1095-114 (2014)
- 2) Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, Kuroda M, Hanada K. The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. DNA Res. 21(6):673-83(2014)
- 3) Cell line cross-contamination: WSU-CLL is a known derivative of REH and is unsuitable as a model for chronic lymphocytic leukaemia. International Cell Line Authentication Committee (ICLAC). Leuk Res. 38(8):999-1001 (2014)
- 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, 縦山明日香, 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 Vol.22(1) : 174-7(2014)
- 5) 小原有弘, 佐藤元信, 西條薫, 中村幸夫 細胞誤認：その現状と研究者にもとめられる対策 実験医学 Vol.32(9) : 1413-8(2014)
- 6) 小原有弘, 日常の細胞培養管理から考える培養関連機器にもとめられる機能と製品像 クリーンテクノロジー Vol.24(7) :28-30(2014)
- 7) 小原有弘, 「《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術」：細胞の凍結保存・輸送方法の留意点 (株)技術情報協会出版 2014年

- 8) 小原有弘, 「実験者/試験検査員の誤ったデータの取扱い・試験誤操作防止策」: 細胞培養 (株)技術情報協会出版 2014 年

2. 学会発表

国内会議

細胞培養における品質管理 “目に見えない汚染に目を向けることから始める”, 小原有弘, 日本組織培養学会第 87 回大会 5 月 (東京)

「厚生労働省の生物資源バンクの取り組みについて」, 小原有弘, 第 41 回日本臓器保存生物医学会, 11 月 (大阪)

日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究 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、第 41 回日本マイコプラズマ学会学術集会 5 月 (東京)

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞株 HUV-EC-C のゲノムに組み込まれた HHV-6B の存在様式 塩田節子、鈴木治、小澤みどり、平山知子、湯華民、森康子、渡辺健、清水則夫、亀岡洋祐、笠井文生、小原有弘、第 62 回日本ウイルス学会学術集会 11 月 (横浜)

国際学会

1. Status of Mycoplasma Contamination in Culture Cell Lines: A Survey of Major Institutions in Japan. Kohara A.,

Ohtani A., Ozawa M., Hirayama N., Kawaguchi E., Shioda S., R. Harasawa, International Organization for Mycoplasma 2014. 6, Blumenau, Brazil.

2. Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease.

Kohara A., Hirayama N., Shioda S., Ozawa M., Ohtani A., Kawaguchi E., Iemura M., Matsuyama A., European, Middle Eastern & African Society for Biopreservation & Biobanking Annual Meeting 2014. 10, Leipzig, Germany

3. Genomic changes in tumor cell lines revealed by comparison between culture passages; implications for heterogeneity resulting from progressive rearrangements. Kasai F., Hirayama N., Ozawa M., Shioda S., Kohara A., The 20th International Chromosome Conference 2014. 9, Canterbury, Kent, England

由来組織	細胞株	Luc発光
肝細胞がん	Hep G2	Very Good
	HuH-7	Good
	HLF	Good
	HLE	Very Good
	HuH-6	Very Good
	JHH-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-1	胆管がん	OZ
	JHH-1		HuH28
	JHH-2	胆嚢がん	NOZ
	JHH-4	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2	細胞名3	細胞登録番号4	細胞名5
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	Cont10-K1
AyuK16A10	Fmnl2-K1	AyuK17E05	Ptpn11-K1	AyuK8G11	Nedd4-K1
AyuK19F03	Nmt2-K1	AyuK7G11	Rsrc2-K1	AyuK9E04	AU019823-K1
AyuK11E04	Csnk2a1-K1	AyuK14E01	Kntc1-K1	AyuK6H07	Cbx1-K1
AyuK15G02	Kpna4-K1	AyuK16C10	Gnb2-K1	AyuK9F02	Tbrg4-K1
AyuK8A06	Nmt1-K1	AyuK18E01	Ibtk-K1	AyuK10C05	Map2k1-K1
AyuK14E11	Milt6-K1	AyuK13G06	BC024479-K1	AyuK13E11	Cbx5-K1
AyuK15H03	Psmc3ip-K1	AyuK15E07	Leo1-K1	AyuK9F02	Pml-K1
AyuK17B02	Tada2l-K1	AyuK12C12	Igsf9b-K1	AyuK18B12	Epn2-K1
AyuK16c12	Trim71-K1				

表 3 分譲可能となったホモ変異体マウス ES 細胞

がんの種類	細胞登録番号	細胞名
胃がん	JCRB1485	IM95/CMV-Luc
	JCRB1433	MKN-1/CMV-Luc
	JCRB1473	MKN-74/CMV-Luc
肝細胞がん	JCRB1592	Hep G2-Luc
	JCRB1610	HLE-Luc
	JCRB1591	HLF-Luc
	JCRB1600	HuH-7-Luc
子宮がん	JCRB1579	Ishikawa 3-H-12-Luc
	JCRB1609	OVCAR-3/CMV-Luc
	JCRB1594	SK-OV-3/CMV-Luc
食道がん	JCRB1584	TYUC-1-Luc
乳がん	JCRB1438	BT-20/CMV-Luc
	JCRB1450	BT-474/CMV-Luc
	JCRB1559	MDA-MB-231-Luc
肺がん	JCRB1558	RERF-LC-KJ/CMV-Luc
皮膚がん	JCRB1577	HSC-1-Luc
マウス線維芽	JCRB1503	NIH3T3/ATCC/CMV-Luc

表4 ウイルス否定試験後に分譲開始した発光細胞



図1 細胞認証に関する情報発信・データベース検索サイト

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ハプロイド ES 細胞を宿主としたノックアウトバンクを作製する。
- 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ンプベクターを導入する。遺伝子トランプベクターが 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ることで獲得する。
(倫理面への配慮)
マウスハプロイド ES 細胞を用い、しかも動物作製実験を行わないので、倫理面の問題はない。
- C. 研究結果
前年度検討した条件（1400V, 10msec, 3pulses）でハプロイド ES 細胞にトランプベクターを導入し、2000 個以上のコロニーをピックアップして解析した。その結果、約 200 個のクローンが目的のクローンであることが判明した。
- D. 考察
約 200 個のクローンがどういった遺伝子を破壊しているか詳細なデータベースを作成していく。
- E. 結論
目的のクローンが獲得できている可能性が高いので、今後、バイオリソースとして研究者に分配するシステムを構築して行く予定である。
- F. 健康危険情報
(分担研究報告書は記入不要)
- G. 研究発表
- 論文発表
 - 1.) Tokunaga M, Kokubu C, Maeda Y, Sese J, Horie K, Sugimoto N, Kinoshita T, Yusa K, Takeda J., Simulation and estimation of gene number in a biological pathway using almost complete saturation mutagenesis screening of haploid mouse cells., BMC Genomics. 2014 Nov 24;15(1):1016.
 - 2.) Kokubu C, Takeda J., When half is better than the whole: advances in haploid embryonic stem cell technology. Cell Stem Cell. 2014 Mar 6;14(3):265-7. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.001.
 - 学会発表
 - 1.) 第 66 回日本細胞生物学会大会「ハプロイド ES 細胞を利用した遺伝子探索」奈良県奈良市、2014.6.11

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 |