

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
研究成果発表抄録

研究番号：H10 - ゲノム039

培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究

主任研究者：水沢 博

国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部、第三室（細胞バンク）

分担研究者報告

1. 佐々木正夫 ヒト上皮系細胞の研究資源化に関する研究
2. 木村成道 正常二倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化、蛋白質の二次元展開を利用した細胞の同定手法の研究
3. 安本 茂 ヒト上皮基底層細胞及び不死化細胞の研究資源化に関する研究
4. 竹内昌男 ヒト脳神経系前駆細胞の樹立に関する研究
5. 原澤 亮 PCR 法を用いた混入ウイルス検出法の開発に関する研究
6. 阿部武丸 BVDVフリー血清によるペステivirus除去に関する研究
7. 加治和彦 正常2倍体細胞の研究資源化過程における酸素依存性機能発現変化

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)研究成果発表抄録

研究課題： 培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究

研究番号： H10 - ゲノム039

主任研究者： 所属施設 国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部、第三室(細胞バンク)

氏名 水沢 博

1. 研究目的

本研究は、培養細胞研究資源(主にヒト)の、収集、管理、分譲のために設立された厚生省細胞バンク(JCRB細胞バンク)事業の整備を目的に実施するものである。細胞バンクの運営に必須な課題を抽出して研究を実施し、得られた結果を日常的なバンク業務に反映させることを目的とするものである。

2. 研究方法

本研究は研究基盤の整備を最終的な目標としており、実施しなければならない課題は多岐にわたる。主要な課題を次の3点に整理した。細胞の培養・保存を通じて明らかになる培養細胞の性状を確認してその状況を把握すること。その結果得られる記録を整理して保存したうえでその情報を研究者に提供すること。厚生科学研究に必要なヒトプライマリ細胞の樹立と研究資源化を推進すること。研究方法はそれぞれ異なる。

品質管理

細胞の性状確認や状況把握は品質管理と称され、汚染検査、細胞同定が主要な課題である。汚染検査についてはマイコプラズマとウイルスの検出方法の確立とその実施が主要な課題となる。細胞の同定については、過去において核型分析やアイソザイム分析などを検討して利用してきたが、多数のヒト細胞が利用されるようになって新たな同定手法を確立する必要に迫られている。

品質管理に必要な実験手法の開発研究については主任研究者及び分担研究者の協力によって開発研究を進めている。

情報管理と公開

品質管理結果の「記録の整理」と「情報の提供」は主に主任研究者が実施している。これには2つの課題があり、一つは日常的なバンク運営における情報の整理をするためのデータベースの構築と維持である。2つ目は、整理したデータベースの内容を研究者に公開するための手法を開発することであるが、現在ではインターネットによるWorld Wide Webが普及したので、WWWへの変換法の開発研究が主な課題となり、プログラム作成とデバッグがその主な手法となる。

ヒトプライマリ細胞の確立(樹立も含む)と分譲

主任研究者及び分担研究者によって実施されている。現在進めているプライマリ細胞の樹立は、主に上皮系細胞の研究資源化であるが、一部神経系細胞やBVDVウイルスに汚染されていない牛由来細

胞の樹立も実施している。これらの研究においては株化まで目指した研究ならびに初代培養に特化した細胞系の確立を含む。さらに、過去において確立した細胞の分譲も一部担当している。特に、ヒト遺伝性疾患に由来するプライマリ細胞は倫理課題など未解決も問題もあり、バンクにおける管理の妥当性についての検討を要するため、採取した研究機関から直接分譲することとしてきた。また、現在細胞の分譲がHS財団に委託されているが、ここではプライマリ細胞の分譲と管理が困難なため、分担研究者が分譲業務を一部負担している。

(倫理面への配慮)

我々は、2年ほど前から倫理問題に関する資料の収集を進め、細胞バンク運営上の倫理問題の検討を進めている。収集した資料については、ホームページを通じて公開すると共に、国立医薬品食品衛生研究所当局に倫理審査委員会を設置することを働きかけてきた。その結果、平成11年度より正式に設置されることとなった。その中で細胞バンクが新規に収集する細胞培養のためのヒト組織については、組織の提供機関(主に病院)内の倫理審査委員会の承認を前提として当該機関における倫理審査委員会の承認を得て受け入れるシステムを確立しつつある。

ヒト組織については、培養後バンクに登録することを含めて患者に説明して同意を得た上で個人識別情報を消したCoded Unlinked Sample(匿名化、非結合サンプル)として受け入れるという基準を作りつつある。

3. 研究結果及び考察

品質管理

細胞の品質管理手法として、マイコプラズマの検査手法について設立以来検討を継続し、現在ではほぼ確立してきた。基本的な考え方として、検査は異なる原理に基づいた2つ以上の方法を利用して検査することを原則とした。マイコプラズマについては、DNAをターゲットにしたヘキスト染色、蛍光観察法に加え昨年までにRT-PCR法による検出法を確立して日常的な業務に移した。また、汚染細胞が発見された場合は、大日本製薬が開発したMC210によって除去することが可能になったので、これで除染を実施する作業手順を確立した。

ウイルスによる汚染検査は困難な点が多く未だ十分な体制が確立できていないが、日本組織培養学会での検討結果を参考に準備をすすめている。その一環として牛血清に由来するBVDV(牛下痢症ウイルス)の検出を昨年試み、ほとんどの細胞が汚染されていることとその原因が血清にある点を

明らかにした (RT-PCR 法)。そこで、本年は BVDV で汚染されていない血清の入手ルートを確認することと、BVDV で汚染されていない牛培養細胞の確立を実施することとした。この研究結果は、今後ヒトに特徴的ないくつかのウイルスの検出法の開発に生かす予定である。

ヒト細胞の同定については、過去においてサザンブロット法を利用し、ヒト多型性遺伝子で検査をするシステムを構築したが、アイソトープの使用等ルーチン化に困難があることが問題点として残されていた。ところが、近年 STR-PCR 法の出現により、より簡便で確実なデータを得ることが可能になってきたので、それを取り入れることとし研究を進めている。実験手法についてはほぼ確立しているので、バンクに保存されている細胞を利用して確実に同定可能であるか否かを中心に検討を進め、良い結果が得られている。

HeLa 細胞は多くのクロスコンタミが指摘されているので、それを中心に検討した事例では、ほぼ確実に HeLa 細胞を補足することが可能で、混入が疑われているもの全てが HeLa と同定された。それに加え新たに 3 株が他の細胞と置き換えられている可能性を発見するに及んでいる。

情報管理と公開

細胞バンク管理データベースについては早い時期に確立して日常業務に使用してきた。基本的な考え方は、文献データを含む学術情報を管理するデータベース、日常的な培養で発生する情報を管理するデータベース、保管場所を管理 (在庫管理) するデータベースの 3 つを基本データベースとした。このうち学術情報 DB と培養情報 DB に記録された情報を WWW に公開することとし、必要なプログラム開発を実施した。さらに、培養や実験から生じる生データのうち写真やグラフで得られるデータを画像データとして記録し、これも公開の対象とした。これらは <http://cellbank.nihs.go.jp/> から誰でも参照することができる。

また、STR-PCR 法によって得られる細胞同定に関する情報は約 9 5 桁の二進数データとして相互の識別に利用できることが明らかになったので、独立したデータベースを構築して管理することとした。さらにこのデータを WWW を通じて提供出来るようシステムの開発研究を進めている。一部サンプルは上記アドレスで参照できる。

ヒトプライマリ細胞の確立と分譲

ヒトプライマリ細胞については主に上皮系細胞を中心に確立を試みている。通常の培養法によって培養できるものやアウトグロース法によって培養できるものなどを確立してきた。また一部は、ウイルスによって不死化するところも分担研究者が実施している。また、これらの細胞が有効に利用できることを確認するために、細胞増殖抑制因子の分析なども進めている。これらの細胞については、当該年度に確立した細胞を翌年に登録する作業を進めている。登録にあたっては、上記で確立した品質管理手法によって汚染が無いことや、

他の細胞では無いユニークなものであることを確認しながら登録作業を進めている。さらに、ヒト神経系細胞も興味もたれている細胞で、分担研究者によって樹立が試みられている。

BVDV に汚染されていないウシ由来細胞は、汚染の状況を把握する際に必要になると思われ、分担研究者に依頼して樹立を試みている。昨年の調査により BVDV の汚染が思った以上に広範に及んでいることが明らかとなったが、ヒト細胞に対しては持続感染が無いと考えられ、BVDV 非汚染血清により速やかに消滅したが、ウシ細胞では明らかに持続感染していた。そのため、コントロールとなる非 BVDV 汚染細胞を確立することが必須である。

ヒト遺伝性疾患に由来するプライマリ細胞は、分担研究者によって維持管理がなされている。これは、培養が比較的難しいこともあって、HS 財団の窓口をとおさず、JCRB 細胞バンクを窓口として分担研究者の研究室から直接分譲を実施している。近年、分譲数がゆるやかだが増える傾向にある。また、ヒト正常線維芽細胞も培養が難しい点があり、分担研究者と HS 財団との間で緊密な連携を取りながら分譲事業に協力している。

プライマリ細胞の分譲には困難が伴ため、現在の HS 財団による分譲システムでは十分に対応できない。将来、これに対応するための分譲システムをどのように構築するか検討を行うことが必要になると思われる。

4. 評価

1) 達成度について

本研究班の目的は、厚生省細胞バンクを維持するために不可欠な基礎研究を実施することにある。そこで、品質管理、情報管理、新規細胞 (プライマリ細胞) の確立の 3 点に重点を置いて研究を進めている。本研究においては、基礎的研究が完了した時点で得られた結果や手順を実際の細胞バンク事業の推進のために実用化に移さなければならないという点が特徴である。

こうした複雑な問題はあつもの、毎年何らかの課題については達成を得てバンク事業の推進に貢献してきた。

マイコプラズマ検査法については、古典的な染色法のみ利用されてきたが、結果の判定において不安定な要素が存在していた。この解決には異なる原理に基づいた複数の検査法を併用する必要があると認識し、RT-PCR 法の開発を実施し実用化した。さらに、この方法はウイルスの検査に応用できることが明らかとなり、モデルケースとして BVDV の検査を試みた。BVDV を取り上げたのは、過去 ATCC において BVDV による汚染の有無が指摘されながら明確な回答をどのバンクも示すことができなかったため、RT-PCR 法を応用して事態が深刻であることを明らかにした。その結果、メーカーに依頼して BVDV フリーの血清を確保することに成功した。

細胞の同定についても、ヒト細胞の相互混入 (クロスコンタミ) が疑問視されながら、結果が不

安定で十分な回答を得ることができなかつた。我々は、1995年ごろから、DNAフィンガープリント法を改良したDNAプロファイリング法を確立して、いくつかの細胞についての確認をすることに成功していたが、アイソトープの使用やサザンブロッティング法など複雑な手法のため人材に限りのある状況下でルーチン化することに困難があった。そこでPCR法の応用を試み、現在ルーチン化に持ち込む努力を実施しているところである。この過程で新たにいくつかの細胞にクロスコンタミが認められる兆候を見出した。

情報管理は、コンピュータやソフトウェアの目まぐるしい進歩に合わせてデータベースシステムの改良が必須である。当該機関のような組織においては、ソフトウェアの開発をアウトソーシングすることが通例行われているが、厚生省細胞バンクでは基本的に自主開発を志向してきた。これは、予算の効率的な運用も含めて、目まぐるしく変化するコンピュータ事情に対応して、システムの改良を迅速に実施するための方策であり、成功しているように思える。

特に、ここ3年間の成果としては、これまで他のどのバンクも行っていなかった画像データを日常的に提供できるようなシステムを構築した点が特筆される。

新規細胞の確立については、本研究班では主にヒトのプライマリ細胞の確立を目指しているが、これらは実質的に基礎研究が伴わなければ良い研究材料の確立を得ることが出来ない。この部分は分担研究者の力を借りて、ヒト遺伝性疾患細胞、ヒト線維芽細胞、ヒト上皮系細胞などの確立を試みている。同時に、これらの細胞は培養と分譲が難しく、HS財団の分譲窓口を介しての作業は困難である。そのため、HS財団の窓口とは別に、本研究班の責任で分譲作業を実施した。

さらに、ヒト細胞を中心に扱うことから、倫理問題にも配慮したバンクシステムを構築することを考え、資料の収集やシステム構築に関する検討を実施し、倫理審査委員会の設置に努力した。

以上のように、進行は決して早くは無いが着実に細胞バンク基盤の整備は進行し、本研究班はその推進に貢献しているものと信じる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

細胞バンクが徹底した品質管理を実施することは、個々の研究者に安心して利用できる研究材料を提供する基盤が整備されることを意味し、学術的にも重要であることは間違いない。国際的にも、汚染の排除とクロスコンタミの排除は細胞バンクに課せられた責任であるという認識は定着し、本研究はそれに沿った内容で進めている。

さらに、細胞バンクがこのような研究にまじめに取り組むことによって、多くの研究者が個々のテーマに集中できる環境が整備され、研究の進展速度を押し上げる効果も期待できる。

3) 今後の展望について

ヒトゲノムプロジェクトの進行によりヒトの遺伝子塩基配列が全て明らかになる日も近く、今後ヒト遺伝子の多型性を利用したオーダーメイド医療などの開発研究が急務であるとされている。この研究においては、大量のヒト由来の細胞試料を利用する必要があるため、その提供ならびに保存において細胞バンクの役割が期待されている。

さらに、臓器移植の発展にともない、人工臓器の開発研究などの課題から再生医療の推進も期待されている。ここでも細胞研究資源の活用は不可欠で、より多くの細胞、特に再生能を獲得した細胞の保存と供給は非常に重要な分野となることが予測される。そうした中で細胞バンクがどの程度機能を果たせるかは不確定な要素が多いが重要な課題となると考えている。

こうした医療の将来を考えると、民族間の生物学的な差が問題となることが予測され、これまでのように安易に海外の細胞バンクから材料を入手すれば良いということが問題とされる時期が来ると思われる。これは日本での研究には日本人の細胞を使わなければならないことを意味しており、多くの日本国民の協力を得て研究資源を収集し、研究レベルで利用できるような体制を整える必要があるものと思われるが、本細胞バンク事業はそれを念頭に置いて基盤整備を実施する必要がある。

5. 結論

本研究は、細胞バンクにおける品質管理、情報管理、ヒトプライマリ細胞の樹立および分譲に関する研究を実施してきた。研究結果は日常的な細胞バンク事業の推進のために活用され、実務を支援してきた。さらに、情報提供システムの整備により、多くの研究者がバンクを利用しやすい環境が整備され、海外からの利用も増えつつある。将来の研究方向を考え、ヒトのプライマリ細胞の導入も積極的に推進している。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	13件
原著論文による発表	4件
それ以外の発表	1件

そのうち主なもの

論文発表

1. 田辺秀之, 祖父尼俊雄, 水沢博: Comparative Genomic Hybridization (CGH)法による細胞ゲノム解析 (Comparative genomic hybridization for genomic analyses of cells), 組織培養, 22, 194-198 (1996)
2. 増井徹: 上皮細胞特有の増殖と増殖停止の切替え機構 (Epithelial specific Mechanisms for switching growth and growth arrest), 蛋白質核酸酵素, 41(12) 1913-1919 (1996).
3. 日本組織培養学会編, 細胞バンク・遺伝子バンク, 共立出版, (1998)

4. 水沢 博 JCRB/HSRRB 細胞バンク培養細胞研究資源データベース、蛋白質核酸酵素 43(13),2015-2019 (1998).
5. 水沢博、田辺秀之、増井徹、高田容子、樽松美治、峰岸大輔、吉田東歩、佐藤元信、竹内昌男、阿部武丸、原沢亮、培養細胞系に混入するウシウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)のRT-PCR法による検出、Tissue Culture Research Communication 18: 131-138 (1999)

学会発表

1. 田辺秀之、高田容子、岡戸 清、祖父尼俊雄、水沢 博：CGH法による細胞バンク細胞株のゲノムの性状解析、第55回日本癌学会総会、平成8年度ポスター部門 No. 1354 (1996年10月)
2. 田辺秀之、石田貴文*、植田信太郎*、祖父尼俊雄、水沢 博：ヒト9番染色体の核型進化に関する研究：免疫グロブリンC-epsilon 3遺伝子の比較マッピング、第13回染色体ワークショップ(1996.2)
3. 田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博、テロメアおよびセントロメアDNAを用いたFISH法による培養細胞株の染色体分析、第56回癌学会総会
4. 田辺秀之、中川ゆづき、峰岸大輔、橋本雄之、田中憲穂、押村光雄、祖父尼俊雄、水沢博、Fish法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの性状解析、日本組織培養学会第70回大会、仙台市復興記念会館、1998、5月、21日 - 5月22日。
5. 増井 徹、高田容子、岩下新太郎、樽松美治、田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博、増殖停止関連遺伝子 eti-1 のアポトーシス誘導活性、日本組織培養学会第70回大会、仙台市復興記念会館、1998、5月、21日 - 5月22日
6. 増井 徹、高田容子、岩下新太郎、田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博、増殖停止関連遺伝子 eti-1 のアポトーシス誘導活性、第57回日本癌学会総会、横浜国際平和会議場(パシフィコ横浜)、1998.9.30-1998.10.2
7. 田辺秀之、中川ゆづき、峰岸大輔、橋本雄之、田中憲穂、押村光雄、祖父尼俊雄、水沢博、染色体ペインティング法および Reverse FISH 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの解析、日本人類遺伝学会第43回大会、10月14日 - 16日、山梨県甲府市、山梨県立県民文化ホール。
8. 田辺秀之、峰岸大輔、増井 徹、祖父尼俊雄、水沢博、ヒト腫瘍細胞株におけるテロメア癒合(telomeric association; tas)について。第16回染色体ワークショップ。1999.1.30-2.1、葉山

2) 海外

口頭発表	3件
原著論文による発表	6件
それ以外の発表	1件

そのうち主なもの

論文発表

1. Honma, M., Mizusawa, H., Hayashi, M., Kaoru, S., Ohno, Y., and Sofuni, T. Heterogeneity

of the Y chromosome following long-term culture of the human lung cancer cell line A549. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 32: 262-264, 1996.

2. Li-Gun Jia¹, Osada, M.¹, Ishioka, C.², Gamo, M., Ikawa, S., Suzuki, T., Shimodaira, H., Niitani, T., Kudo, T., Akiyama, M., Kimura, N., Matsuo, M., Mizusawa, H., Tanaka, N., Koyama, H., Namba, M., Kanamaru, R. and Kuroki, T., Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. *Molecular Carcinogenesis*, vol.19, 243-253, 1997
3. Inoue, A., Yokomori, K., Tanabe, H., Mizusawa, H., Sofuni, T., Hayashi, Y., Tsuchida, Y., and Shimatake, H. Extensive genetic heterogeneity in the neuroblastoma cell line NB(TU)1. *Int. J. Cancer*, 72: 1070-1077, 1997.

学会発表

1. Hideyuki Tanabe, Toshio Sofuni, Hiroshi Mizusawa: Comparative genomic hybridization (CGH) analysis for whole genomic chromosomal characterization of cell lines in JCRB cell bank, The 3rd Internet World Congress on Biomedical Sciences Symposium SBB0202, Recent Topics on the Qualification of Cultured Biomedical Research Resources, Poster ID No. AG0107(1996.12)
2. Tanabe, H., Ishida, T.*, Ueda, S.*, Sofuni, T. and Mizusawa, H.: Evolutionary consideration for the origin of human chromosome 9 by FISH analyses of comparative gene mapping of IGHEP2 in higher primates, Human Genome Mapping Workshop 96, Heidelberg, Germany (1996.3)
3. Mizusawa, H., Slow but steady movement of cell banking in Japan., In the session of "Management and Function of National Cell Line Repositories" Congress on in vitro biology, Las Vegas, (1998.5.30-6.3).
4. Mizusawa, H., Quality Control of Cell Lines at Japanese Collection of Research Bioresources, The 1st Korean Cell Line Research Workshop, Seoul National University (1998.6.18)
5. Mizusawa, H., Japanese Cell Lines in JCRB Cellbank, The 1st Korean Cell Line Research Workshop. Seoul National University, (1998.6.18)

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)なし

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)研究成果抄録

研究課題： 培養細胞研究資源の高度化および研究資源基盤整備に関する研究
課題番号： H10 - ゲノム039
分担研究課題： ヒト上皮系細胞の研究資源化に関する研究
分担研究者： 所属施設 京都大学放射線生物研究センター
氏名 佐々木 正夫

1. 研究目的

ヒトゲノムの全塩基配列の決定を数年後に控え、21世紀へ向けての重要課題はヒト遺伝子の多様性とその機能の解明と言われている。ヒト遺伝病の細胞はポスト・ゲノム研究戦略の重要な研究資源となる。特に、人の遺伝子の構造と機能は長い進化の上に成り立っているものであり、その遺伝的多様性と機能のダイナミズムは生物種固有のみならず人種固有のものがある。従って、我が国におけるポスト・ゲノム研究戦略には日本人に基づく研究資源が要求される。本研究の目的は、日本人遺伝病患者細胞の遺伝的特性を明らかにし、新しい科学のニーズに応える研究資源として保存し、研究支援を行うことにある。

2. 研究方法

全国の臨床医から疾患の細胞遺伝学的診断を委託された血液および皮膚組織について、細胞遺伝学的診断を行うと共に、一部の細胞を培養し、細胞株として樹立し、その遺伝学的特性を調べ、凍結保存をする。現在までの収集細胞株は、41疾患、903家系、1,237株である。そのうち33株についてはJCRB細胞バンクに登録し、研究者に配布している。過去3年間は、開発面では特に遺伝的多様性の高い小児再生不良性貧血の患者に重点をおき、細胞株の樹立と特性解析を行った。

(倫理面への配慮)

最近の患者については可能な限り、診断とは別に細胞培養による疾患の解明と治療法の開発という合意事項でインフォームド・コンセントを取っているが、診断材料の研究利用は病理組織からのDNA不死化とも共通した面があり、現在、京都大学医学部「医の倫理委員会・遺伝専門委員会」で検討中である。

3. 研究結果及び考察

小児再生不良性貧血74家系について調査を行った。マイトマイシンC(MMC)高感受性からファンconi貧血症と診断されたものが24家系、以前に収集した21家系と併せて45家系となる。これまでにクローニングされているA群遺伝子(FANCA)、C群遺伝子(FANCC)およびG群遺伝子

(FANCG/XRCC9)について突然変異解析を行った結果、FANCA遺伝子の突然変異が約70%の家系に、FANCG遺伝子の突然変異が約20%の家系に見られた。FANCC遺伝子の突然変異は見られなかった。日本人患者でG群が多いのが注目される。ファンconi貧血以外に姉妹染色分体交換(SCE)の高い患者が6例認められたが、これらの患者ではFANCA、FANCC、FANCG、XRCC2、XRCC3、RECQL1、RECQL5遺伝子は正常であったが、1例でBLM/RECQL2遺伝子に突然変異が1例認められた。その他、del(11)(q23-qter)の先天性染色体異常を持つ患者が2例認められた。臨床的にAtaxia telangiectasiaが疑われた患者のうちX線高感受性が確認できた10家系についてATM遺伝子を調べ、9家系に突然変異が認められた。また、Bloom症候群患者4例についてBLM遺伝子を調べ、何れの患者においても突然変異が認められた。これらFANCA、FANCG、ATM、BLM遺伝子に観察された突然変異は何れも欧米患者には認められない新規の突然変異であった。

4. 評価

1) 達成度について

ヒト遺伝病の中でも特に高発がん性の遺伝病について細胞の収集を行ってきた。ヒトの遺伝子は約60,000個と推定されており、その中でメンデル式遺伝が確認されているものが約1,200、遺伝様式が不確実なものを含めると約4,000近い遺伝形質が知られている。そのうち発がんに関係する遺伝形質としては約200が知られている。劣性遺伝病は複数の相補性遺伝子群からなる場合が多く、この数はさらに大きいものとなる。ファンconi貧血症は劣性遺伝であり、A-Hの8相補性群からなる。日本での患者の頻度は、両親の血族結婚の頻度から約130,000の出生に1人の割合となる。患者の細胞の収集は容易でないが、全国の臨床医の協力を得ることによりかなりの数の患者の細胞を収集することが出来たといえる。優性遺伝疾患等も含めてこれまでに収集された細胞株は41疾患1,237株であり、この種の細胞株の収集量は1研究機関として国内で唯一である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について
集団に保有されている劣性突然変異が何れも欧

米の患者にはない日本人特有のものであることは、日本人における疾病の発現と制御の遺伝的背景を考える上で重要な問題であるとともに、突然変異の国際比較は突然変異の起源、ひいては近代社会形成の遺伝学的基礎としても興味深い課題を提供する。また、遺伝子の多様性と機能、及びヒト集団の疾病構造に対する荷重はポストゲノム時代における研究戦略の重要課題である。

3) 今後の展望について

ヒトの遺伝病細胞は研究資源として極めて重要な位置を占めることから、米国では全米学士院の支援の下にヒト変異細胞バンクが設立されており、世界の研究者から細胞株を集め、研究支援を行っている。ここでも細胞の研究資材としての利用、特に有料配布、に対する患者のインフォームド・コンセントは十分に確立しておらず、細胞株の寄託者に任せている。今後、ヒト遺伝病細胞の重要性はますます増大するものと思われる。研究資源としての細胞の提供に対するインフォームド・コンセントの在り方を早急に定める必要がある。

5. 結論

ヒト遺伝病患者について細胞の収集と細胞遺伝学的診断を併合させて進めてきた。これにより、遺伝疾患の同定と特性を明らかにし、素性の正しい細胞株という利用価値の高い研究資源の開発を目指した。遺伝子の突然変異解析から、突然変異は何れも日本人固有のものであり、日本人集団を対象とした細胞株の開発が重要であることが確認された。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	17件
原著論文による発表	5件
それ以外(レビュー等)の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

江島洋介・立花章・佐々木正夫：高発がん性遺伝病とその原因遺伝子。現代化学, 33:143-149, 1997.

学会発表

佐々木正夫・立花章・江島洋介：発がんを支配するヒト劣性遺伝子群。第25回日本医学会総会、平成11年3月、東京。

2) 海外

口頭発表	2件
原著論文による発表	18件
それ以外(レビュー等)の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

Tachibana, A., Kato, T., Ejima, Y., Yamada, T., Shimizu, T., Yang, L., Tsunematsu, Y. and Sasaki, M. S.: The FANCA gene in Japanese Fanconi anemia: reports of eight novel mutations and analysis of sequence variability. Human Mutation, 13:237-244, 1999.

学会発表

Sasaki, M. S.: The role of Rad51/Rad54/Ku in radiation-induced chromosome aberrations in vertebrate cells. The 11th Int. Cong. Rad. Res., July 18-23, 1999, Dublin.

7. 知的所有権の出願・取得状況 該当なし。

厚生省科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)平成10年度研究報告書

研究課題： 培養細胞研究資源の高度化および研究資源基盤整備に関する研究
課題番号： H10-ゲノム-039
分担研究課題名： 正常二倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化、蛋白質の二次元展開を利用した細胞の同定手法の研究
分担研究者： 所属施設 (財)東京都老人総合研究所遺伝子情報部門
氏名 木村成道

1. 研究目的

老化研究および癌研究に資するため、ヒト正常二倍体細胞の新規樹立と供給並びに品質管理を目的として研究を行う。品質管理においては、染色体及び遺伝子解析法の検討とともに、蛋白質二次元展開に基づくプロテオーム解析技法を応用し、研究資源の維持・管理面での質的向上を目指す。

2. 研究方法

ヒト正常細胞のH S財団への供給は凍結アンプルで行い、種細胞の維持・保管は老人研の責任で継続して行うことになっている。成人、新生児と児童由来皮膚線維芽細胞は皮膚片から這い出し法により樹立した。正常細胞の品質確認には染色体分析(Flow karyotyping、FISH 解析)を行い、また、蛋白質二次元展開は固定化pH 勾配等電点電気泳動を一次元目、二次元目はSDS-PAGEで分離し、コンピュータによる画像解析とデータベース化により解析結果の比較検討を行った。

尚、ヒト正常細胞の採取・樹立に当たっては、当研究所倫理委員会の承認の下に作業を進めた。

3. 研究結果及び考察

過去3年間に作成、供給した凍結アンプル(H S財団と国立医薬品食品研究所マスターバンクへの送付)は肺及び皮膚線維芽細胞合わせて10種、アンプル数として合計285本である。凍結アンプル解凍後の生存率、マイコプラズマ・細菌の混入がないことなどを確認した。この間、皮膚線維芽細胞を中心に新規樹立(成人由来:TIG-112、TIG-114;新生児由来:TIG-121;児童由来TIG-118)が図られ、供給された。これらの新規細胞については、染色体構成、分裂寿命を確認したほか、増殖・遊走能などの性質の検討を行った。

TIG-7細胞は核学的には正常と判断されたが、分染法、flow karyotyping 解析の結果、rDNAの増幅に伴う異形性15番染色体(15p+)を保持していた。このrDNA増幅部位は脱メチル化剤、5-azaCに高感受性であり、クロマチン脱凝縮とそれに伴うDNA切断により、高頻度に小核を形成することが示唆された。

プロテオーム解析の中心となる二次元電気泳動

法に関して、東京都老人総合研究所プロテオームデータベースとしてホームページ上に公開した(http://proteome.tmig.or.jp/2D/2DE_method.html)。細胞老化研究の基盤整備のため各継代数における細胞内発現蛋白質のプロファイリングを行いデータベースを作成し、インターネットを介して一般に公開した。

4. 評価

1) 達成度について

本研究の目的であるヒト正常二倍体細胞の新規樹立と供給並びに品質管理に関する新しい方法論の確立の課題は基本的に達成された。今後、研究資源確保に向けて継続、発展させることが重要である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ヒト正常2倍体細胞の樹立、維持、管理の現状は国際的にも未成熟な段階にあり、今後本研究成果として様々な研究への本格的な利用が期待される。品質管理手法の発展により各種細胞の細部に渡る情報が蓄積され、遺伝子、蛋白質レベルでの比較検討が可能になりつつあることは、研究資源としての価値、有用性を今まで以上に高めている。

3) 今後の展望について

ヒト正常2倍体細胞の樹立、維持については、継続的な発展が期待できる。品質管理の面で、特に、プロテオーム解析手法が蛋白質レベルの解析法として世界標準になることが予想される中で、いち早く本研究で取り上げた先見性を指摘すべきであり、今後の発展が期待される。

5. 結論

ヒト正常二倍体細胞の新規樹立と供給、並びに、品質管理に関する新しい方法論の確立の課題を基本的に達成し、研究資源確保の見通しと研究資源としての価値、有用性を今まで以上に高めることに貢献することが出来た。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表： 26件
原著論文による発表： 1件

その内主なもの

論文発表

戸田年総・固定化pH勾配ゲルストリップを用いた
二次元電気泳動・生物物理化学・41・169-172・1997

学会発表

1. 近藤 昊、米沢由美子、井藤英喜、ヒト血清によるヒト胎児皮膚線維芽細胞の遊走抑制：血清分画、血清蛋白および供与者年齢の影響、日本基礎老化学会第20回大会、1997年6月18-20日、東京。
2. 近藤 昊、米沢由美子、オートクリン機構によるヒト胎児皮膚線維芽細胞遊走のシグナル伝達。日本動物学会第68回大会、1998年9月、東広島。
3. 金子孝夫、田原正一、近藤 昊、培養細胞の老化におけるDNA酸化傷害と抗酸化能の変化。日本基礎老化学会第22回大会、1999年6月、京都。
4. 佐藤卓朋、山本清高、三浦邦彦、石館基。Laser-Scan Cytometry によるヒト標的染色体領域の解析。第48回染色体学会、札幌、1997、9、20-21。
5. 佐藤卓朋、山本清高、三浦邦彦、石館基。5-azacytidine によるヒト TIG-7 細胞の部位特異的クロマチン脱凝縮と小核の誘発。日本環境変異原学会第27回大会、大阪、1998、11、23-24。
6. 戸田年総、木村成道、佐藤三佐子、杉本正信、古市泰宏・Werner症患者由来皮膚線維芽細胞における蛋白質発現動態の二次元電気泳動による解析 -- TMIG-2DPAGE 蛋白質データベースの応用 --。日本基礎老化学会第20回大会・1997年
7. 戸田年総、鈴木貴久、岡田雅子、菅原佳保里、杉本正信、古市泰宏、木村成道：EBウイルス転換ヒトBリンパ芽球の不死化過程における蛋白質の変動 --- 二次元電気泳動による分析 ---、第71回日本生化学会大会、1998年
8. 戸田年総、木村成道：老化研究におけるプロテオーム解析と異常蛋白質のデータベース化、日本基礎老化学会大会第21回大会シンポジウム、1998年
9. 戸田年総：プロテオームデータベースの構築と活用、第50回日本電気泳動学会総会シンポジウム、1999年
10. 戸田年総：プロテオーム研究における二次元電気泳動、画像解析、及びデータベースの現状と問題点、第72回日本生化学会大会シンポジウム、1999年

2) 海外

口頭発表： 4件
原著論文による発表：23件

その内主なもの

論文発表

1. H. Kondo, Y. Yonezawa, Bovine endothelial cell migration: Effects of signal transduction inhibitors. *Zool. Sci.*, 14(1997) Suppl. 33.
2. Kotoyo Isobe, Sayaka Ito, Hideka Hosaka, Yukio Iwamura, Hiroshi Kondo, Yasuo Kagawa and Jun-Ichi Hayashi, Nuclear-recessive mutations of factors involved in mitochondrial translation are responsible for age-related respiration deficiency of human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 273(1998)4601-4606.
3. H. Kondo, Y. Yonezawa, Signal transduction of human fetal skin fibroblast migration stimulated by an autocrine growth factor, bFGF. *Zool. Sci.*, Vol. 15, Suppl. 29, 1998.
4. Satoh, T., Yamamoto, K., Miura, K. F. and Ishidate, M., Jr. Cytogenetic analysis of heteromorphic short arm of 15p+ in a human diploid cell strain, TIG-7. *Chrom. Sci.*, 2: 51-55, 1998.
5. Satoh, T., Yamamoto, K., Sasaki, K. and Ishidate, M., Jr. Application of laser-scan karyotyping to analyze stable chromosomal aberrations induced by chemical carcinogens. *Cytometry*, in press, 1999.
6. Toda, T., Satoh, M., Sugimoto, M., Goto, M., Furuichi, Y. and Kimura, N. : A comparative analysis of the proteins between the fibroblasts from Werner's syndrome patients and age-matched normal individuals using two-dimensional gel electrophoresis. *Mech. Ageing Dev.*, 100(2), 133-143, 1998
7. Toda, T., Kaji, K. and Kimura, N. : TMIG-2DPAGE: A new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis*, 19(2), 344-348, 1998
8. Hiroshi Kondo, Yumiko Yonezawa and Hideki Ito, Inhibitory effects of human serum on human fetal skin fibroblast migration: Migration-inhibitory activity and substances in serum, and its age-related changes. In

Vitro Cell. Dev. Biol. (in press)

9. Toda, T., Sugimoto, M., Omori, A., Matsuzaki, T., Furuichi, Y. and Kimura, N.: Proteomic analysis of immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. Electrophoresis, in press (2000).

学会発表

1. Hiroshi Kondo, Yumiko Yonezawa and Hideki Ito: Age-related increase in inhibitory activity of human serum on human skin fibroblast migration. The XIIIth International Congress of Gerontology, 1997, 19-23 August, Aderade.
 2. Yumiko Yonezawa and Hiroshi Kondo: Possible involvement of R-SGF, a novel growth factor, in rat cancer. The XIIIth International Congress of Gerontology, 1997, 19-23 August, Aderade.
 3. Toda, T.: Quantitative Aspect of Two-dimensional Gel Electrophoresis and Protein Database for Research on Molecular Mechanisms of Aging. Electrophoresis '99, International Meeting of Electrophoresis Societies, 1999
 4. Toda, T., Sugimoto, M., Omori, A., Matsuzaki, T., Furuichi Y., and Kimura, N.: Proteomic analysis of immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. IPPC '99, International Proteome & Proteomics Conference 1st Pacific Rim 2-DE Meeting, 1999
7. 知的所有権の出願・取得状況
無し。

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム、遺伝子治療研究事業)研究成果発表抄録

研究課題： 培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究
課題番号： H10-ゲノム-039
分担課題： ヒト上皮基底層細胞及び不死化細胞の研究資源化に関する研究
分担研究者： 所属施設 神奈川県立がんセンター臨床研究所
氏名 安本 茂

1. 研究目的

- I) 研究資源としてのヒト上皮不死化細胞株の分離
- II) 正常ヒト上皮培養細胞の研究資源化と幹細胞
- III) 上皮幹細胞の分離同定
- IV) 幹細胞の臨床応用(細胞移植、遺伝子治療の標的細胞、再構成上皮組織の移植)

2. 研究方法

1) ヒト上皮細胞の分離培養：A) Explant - Outgrowth 法による組織片からの均一な上皮細胞の培養と回収。B) ディスパーゼによる上皮層の選択的剥離法及びトリプシンによる部分消化、コラーゲンIVコート培養皿による基底層細胞集団の選別的培養。

2) 上皮構成細胞の同定と幹細胞の分離法：増殖因子受容体、接着因子、ケモカイン類受容体の特異抗体を用いた細胞選別(フローサイトメーター、Dynabeads 法、細胞間接着法)

3) 幹細胞の増殖及び分化能力の検討：液適培養法(Droplet culture)の考案、適正培地の工夫による少数細胞(1-1000個)の培養を実現し幹細胞(上皮構成細胞の1-5%)の再生能力の解析

(倫理面への配慮)

ヒト手術検体(悪性新生物以外の疾患による)からの細胞の採取及び医学研究利用に関しては、外部識者二名を含めた神奈川県立がんセンター治験審査委員会及び臨床倫理委員会、及び聖マリアンナ医科大学倫理委員会において審査を受け、手術担当医師による被検者(患者)への口頭及び文書によるインフォームドコンセントを得た上で患者本人が特定されない検体資料として処理されているが、より吟味された社会的コンセンサスに対応していくための倫理委員会の整備を進めている。

3. 研究結果及び考察

不死化細胞の臨床応用：分離された不死化細胞株は細胞の遺伝子治療及び移植用のモデル系として実験に利用され始めている。今後、さらに遺伝

的疾患の不死化上皮細胞株の分離を進める予定でいる。

上皮幹細胞の分離培養：上皮構成細胞中1-5%の幹細胞の同定分離技術を確立し、幹細胞の増殖能力が極めて強いことを明らかにし、さらに分化能力も正常であることが明らかになった。分離されたわずかの幹細胞を10マイクロリットル単位で高密度で培養することにより、極めて高い増殖活性を維持した培養シートを2-4週間程度で作製することができ、さらに長期にわたって(10週以上)増殖能力が低下せず培養を継続できることを明らかにした。このことからヒト上皮初代培養細胞を供給するためには幹細胞の分離培養が優れていると考えられた。

臨床応用：幹細胞移植などの臨床応用に向けて上皮組織の再構築を実施し、ラット皮膚への移植実験によって検討を加えている。

4. 評価

1) 達成度

不死化細胞株の作製技術と供給体制はほぼ整ったと考える。一方、正常ヒト上皮初代培養細胞及び幹細胞の同定分離に関しても技術的にはほぼ確立され、臨床応用のための試験研究を実施する体勢が整ったと考える。分離された幹細胞の研究資源としての供給は実際上の制約が残っているが原理的に可能となった。

2) 成果の学術的、国際的、社会的意義

正常ヒト上皮培養細胞は技術的な側面や倫理的なコンセンサスの上からも幾つかの制約があるものの、医学創薬学的にその研究資源化の重要性は大きい。しかしながら、それらの特性の多くに関して正確に理解されている訳でなく、特に欧米の現状に較べその研究と利用に関し大きく立ち後れている。再生上皮の幹細胞の実体の解明と分離培養法の確立は幹細胞の生物学的基礎のみならず細胞移植による組織、臓器の再生や遺伝子治療の標的となる細胞を供給するなど臨床応用へ向けての潜在的な重要性を持った研究資源を提供する

3) 今後の展望

人体組織の入手に関して倫理的な側面や実際上のシステムチックな調製体制は一研究部門の限られた人員によって対応できる問題でなくなってい

る。医学、医療用の再生可能な組織（筋肉、脳神経、肝臓、軟骨、骨など）の幹細胞の同定分離をさらに発展させることが懸案され、その幾つかは当研究分担者が取り扱うことが可能になっている。しかし、特に幹細胞の分離を含めた供給体制はコストと担当スタッフについてのファイナンシャルサポートが不可欠である。臨床応用に向けての幹細胞の特性に関する幾つかの生物学的検討事項課題が残されているが、前年度までの課題であった、1)自己再生能力を持っているか?については、ある程度の自己再生が可能であることが明らかになってきている。5)幹細胞に寿命はあるか?に関しては、現在までの解析で、一般に信じられている以上の増殖及び生存能力を持つことが判明したが、細胞集団の再生能力が次第に低下することが避けられないため幹細胞事体の老化も進行すると考えられた。テロメア短縮がその一つの理由と考えられるがその詳細は検討中である。幹細胞に関する残りの課題、2)自己再生のための機構や分裂の様式があるか?3)組織構成細胞をクローナルに作り出せるか?4)分裂刺激因子類は何か?などに関してはさらに解析の継続が必要である。

5. 結論

1. ヒト正常上皮細胞の不死化細胞株の分離法を確立し、がん細胞由来の細胞株と異なり多くの点で正常細胞の形質を保持する有用な細胞株の研究資源化の技術体制を整えた。
2. 上皮細胞の長期増殖維持の培養条件を確立した。
3. 生化学的、分子生物学的解析が可能なレベルに達する正常上皮培養細胞の供給が一部可能となった。
4. 上皮幹細胞の分離法を確立し、条件付きで一部供給が可能となった。
5. 臨床応用に向けて幹細胞を用いた移植皮膚の作製が可能になった。

6. 研究発表

1) 国内

学会発表：省略

論文発表

1. 安本 茂。腫瘍マーカーとしてのテロメレーズの活性評価の研究。臨床成人病 28: 1258-1260, 1998.
2. 安本 茂。細胞の不死化と表皮幹細胞。Monthly Book Derm. 14: 61-71, 1998.
3. 安本 茂。ヒト再生上皮幹細胞の老化。医学のあ

ゆみ 188: 41-47, 1999.

4. 安本 茂。表皮幹細胞と培養皮膚。組織培養工学 25: 100-105, 1999.
5. 安本 茂。正常上皮幹細胞のテロメラ - ゼ活性と幹細胞。テロメア、テロメラ - ゼ(日本医学館) pp. 59-73.1999.
6. 安本 茂、国村忠司、木口一成、ヒト正常上皮幹細胞とテロメレーズ活性の発現調節免疫と侵襲、印刷中1999.

2) 海外

論文発表

1. Ohta, Y., Tsutsumi, K., Kikuchi, K. and Yasumoto, S. Two distinct human uterine cervical epithelial cell lines that were established after transfecting human papillomavirus 16 DNA. Jpn. J. Cancer Res.88: 644-651, 1997
2. Kikuchi, K., Tsutsumi, K., Ohta, Y. and Yasumoto, S. Time correlation of commitment to calcium-induced terminal differentiation in human ectocervical keratinocytes in suspension culture. Cell Growth & Differ. 8: 571-579, 1997
3. Kunimura, C., Kikuchi, K., Ahmed, N., Shimizu, A. and Yasumoto, S., Telomerase activity in a specific cell subset co-expressing integrin b1/EGFR but not p75NGFR/bcl2/integrin b4 in normal human epithelial cells. Oncogene 17: 187-197, 1998
4. Harada, H., Mitsuyasu, T., Seta, Y., Maruoka, Y., Toyoshima, K. and Yasumoto, S., Overexpression of bcl-2 protein inhibits terminal differentiation of oral keratinocytes in vitro. J. Oral. Pathol. Med. 27: 11-17, 1998
5. Kikuchi, K. and Yasumoto, S. Retention of cell adhesion and growth capability in human cervical cancer cells deprived of cell anchorage. Jpn. J. Cancer Res. 90: 867-873, 1999
6. T. Masunaga, H. Shimizu, C. Matsui, R. Aozaki, M. Morohashi, S. Yasumoto, T. Nishikawa. LAMB3 Gene Transfection into SV40-transformed Keratinocytes from Patient with Herlitz Junctional Epidermolysis Bullosa. Arch. Dermatol. Res. 1999, in press
7. 知的所有権の出願、取得状況(予定を含む) 予定(準備中): 二件

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)研究成果発表抄録

研究課題： 培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究
課題番号： H10-ゲノム039
分担研究課題： ヒト脳神経系前駆細胞の樹立に関する研究
分担研究者： 所属施設 (財)発酵研究所(所長)
氏名 竹内昌男

1. 研究目的

近年、ニューロンやグリア細胞へ分化する神経系前駆細胞がヒト胎児脳や成体脳に存在することが明らかになってきた。このヒト神経系前駆細胞は、中枢神経系の発生・分化の解明や細胞移植などの臨床応用への利用が期待されている。しかし、この細胞の培養系とくに細胞株の樹立例は極めて少なく、*in vitro*での詳細な性状解析が困難な状況にある。今回の研究の目的は、神経系前駆細胞を選択的に増殖させる方法を確立し、さらに株化の方法について検討することにある。

2. 研究方法

凍結保存されたヒト胎児脳細胞は、宝酒造株式会社を介し、米国 Biowhitaker 社から購入した。(発酵研究所では、ヒト細胞を研究に使用する上での倫理問題を審査する委員会の設置を検討中)。まず、ヒト胎児脳細胞の培養系から神経系前駆細胞を選択的に増殖させるための培地、培養基質、継代方法について検討した。神経系前駆細胞のマーカーとして、中間径フィラメントの1種であるネスチンを用い、ネスチン陽性細胞を神経系前駆細胞とみなした。次に神経系前駆細胞を不死化するため、16型ヒトパピローマウィルスのE7癌遺伝子の導入を試みた。長期継代により得られた細胞について増殖と分化に関する性質を調べた。

3. 研究結果及び考察

購入したヒト胎児脳細胞を血清含有培地で培養すると、約2週間後には全ての細胞が、長い突起を伸ばすクラスIII(-チューブリン陽性のニューロンとなり、増殖を停止した。種々の培地を検討した結果、ゲッ歯類の神経系前駆細胞の増殖因子であるepidermal growth factor(EGF)とfibroblast growth factor-2(FGF-2)を含む無血清培地が、ヒトのネスチン陽性細胞の増殖に有効であることがわかった。ネスチン陽性細胞は、フィブロネクチンとラミニンでコートした培養基質面では上皮細胞様の形態を示し、コートしていない培養基質面では、神経系前駆細胞に特徴的なニューロスフェアを形成した。継代法としては、プロテアーゼを用いず、ピペッティングによる細胞分散が有効であった。16型ヒトパピローマウィルスのE7癌遺伝子をレトロウィルスベクターを用いて、ネスチン細胞に導入した結果、倍加時間が約2日間で、約4ヶ月間にわたり継代培養が可能となった。この細胞は98%以上がネスチン陽性であり、EGFとFGF-2を培地から取り除き、増殖を停止すると、ニューロンとグリア細胞に分化するこ

とから、神経系前駆細胞を高い比率で含む細胞であることが示された。現在クローニングを行い、細胞株の樹立を試みている。

4. 評価

1) 達成度について

ヒトの中枢神経系前駆細胞を選択的に増殖させる培養方法を明らかにしたが、樹立にまでは至っていない。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ヒトの神経系前駆細胞は材料の入手が困難なことから、培養法の検討が進んでおらず、また細胞株の樹立例は2、3例に留まっている。今回の選択的培養法により、神経系前駆細胞の大量調製が可能になった。この方法で得られる細胞は、神経系の分化に関する基盤的研究や臨床への応用に有用と思われる。

3) 今後の展望について

神経系前駆細胞株の樹立をめざす。

5. 結論

ヒト胎児脳細胞から、epidermal growth factorとfibroblast growth factor-2を含む無血清培地を用いることにより、神経系前駆細胞を選択的に培養することが可能となった。さらに、16型ヒトパピローマウィルスのE7癌遺伝子を導入することにより、長期培養が可能となり、神経系前駆細胞を株化するための基礎となる方法が設定できた。

6. 研究発表

論文発表 3件

1) T. Yoshida, M. Satoh, Y. Nakagaito, H. Kuno

& M. Takeuchi, Cytokines affecting survival and differentiation of an astrocyte progenitor cell line. *Dev. Brain Res.* 76:147-150 (1993)

2) T. Yoshida & M. Takeuchi, Establishment of

an astrocyte progenitor cell line: induction of glial fibrillary acidic protein and fibronectin by transforming growth factor-(1. *J. Neurosci. Research* 35:129-137(1993)

3) Y. Nakagaito, M. Satoh, H. Kuno, T. Iwama,

M. Takeuchi, A. Hakura, & T. Yoshida, Establishment of an epidermal growth factor-dependent, multipotent neural precursor cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 34:585-592 (1998)

7. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)研究成果発表抄録

研究課題： 培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究
課題番号： H10-ゲノム039
分担研究課題： PCR法を用いた混入ウイルス検出法の開発に関する研究
分担研究者： 所属施設 東京大学医学部附属動物実験施設
氏名 原澤 亮

1. 研究目的

細胞培養の多くはペスティウイルスと呼ばれる哺乳動物由来の感染性因子により汚染されている。汚染原の多くは牛血清(牛胎仔血清)であるが、偶蹄類起源の培養細胞では、由来元の組織に感染していたウイルスがそのまま細胞培養中に持ち込まれる場合もある。そのため、牛、豚、羊由来の細胞ではそれぞれの動物種起源のペスティウイルスが検出されることがある。ペスティウイルスは牛ウイルス性下痢ウイルス1(BVDV-IaおよびBVDV-Ib)、牛ウイルス性下痢ウイルス2(BVDV-II)、豚コレラウイルス、ポーター病ウイルスの4種からなる。これら4種のウイルスは牛、豚、羊をそれぞれ侵すことから命名されたものであるが、その宿主域は必ずしも固定しておらず、これら動物種の壁を越えて相互に感染するだけでなく、他の偶蹄類にも感染することが知られている。ペスティウイルスは牛胎仔血清あるいは偶蹄類起源の組織を介して細胞培養に迷入し、細胞変性効果(CPE)を起こさないで不顕性感染となるため看過されやすく、しかも、一度感染が成立するとしばしば持続感染状態になる場合が多い。さらに、汚染した細胞培養を用いて生物製剤を製造すると、その汚染が最終製品へ波及する場合もあり、家畜ではこのような汚染生ワクチンの接種によるペスティウイルス感染事故が過去に発生している。ヒトに対するペスティウイルスの病原性は明らかでないが、文献によると人では約3割が本ウイルスに対する抗体を保有しているといわれる。また、最近になってエイズ患者から本ウイルスが分離されたという報告が海外であった。抵抗力や免疫が低下した病人を対象としている遺伝子治療においても細胞培養に依存する過程があり、そのために使用される細胞培養については厳重な汚染検査が求められるのは言うまでもない。ところで、これら3種のウイルスは、ポリクローン性抗体を用いた中和試験によってほとんど区別できないとされている。このため、ペスティウイルスにおけるウイルス種の同定は宿主動物種に依存してなされる場合が多く、しばしば混乱を招くことがある。本研究では細胞培養を汚染するペスティウイルスの遺伝的変異の自由度を探り、そこから得られた成果に基づいて

それぞれのウイルス種を同定するための方法を確立し、あわせて細胞培養から本ウイルスを除去する方法を求めることを目的とする。

2. 研究方法

細胞培養におけるペスティウイルス汚染は酵素抗体法、蛍光抗体法、ハイブリダイゼーション法、PCR法などにより試験的に検出が試みられている。本ウイルスは感染によりCPEを起こさないため、特異的な核酸や抗原物質の存在を証明する間接的検出法がとられる。いずれの方法も一長一短があるが、PCR法は最近注目されている重要な方法として普及していることに加えライゾアイトープなどの特殊な試薬や設備を必要としないという点、PCRプライマーさえ入手できればどこでも比較的容易に実施できる方法である。細胞培養を被検材料とする場合には、PCR法で陽性結果が得られれば、それは感染性因子の存在を意味すると考えてほぼ誤りがない。ペスティウイルスゲノムの5'非翻訳領域の塩基配列は属内でよく保存されている。そこで、初めに細胞培養の上清からRNAを抽出し、これを鋳型として5'非翻訳領域に対するcDNAを、M-MLV逆転写酵素と標的領域の下流に位置するプライマーを用いて37-90分間の反応により作成する。次に、標的領域を挟む一対のプライマーを用いてPCRを行い、そのPCR産物をアガロースゲル電気泳動により分画する。アガロースゲルから陽性バンドを抽出し、その塩基配列を決定する。得られた塩基配列について二次構造を推定し、既知のものと比較する。

3. 研究結果および考察

(1)細胞バンクに登録されている細胞系20株についてRT-PCR法を用いてBVDV汚染を調査した。その結果、15株(75%)からペスティウイルスRNAが検出された。本来の自然宿主である偶蹄類由来の細胞系では7株中6株が陽性であった。また、検査した人由来細胞系5株のすべてと猿由来細胞系4株中2株、および食肉類の犬・猫由来細胞系各1株が陽性を示したのは予想外であった。齧歯類由来細胞系1株は陰性であった。とくに羊由来細胞からは羊を自然宿主とするポーター病ウイルスRNAが検出された。本病はこ

れまでにわが国で発生したことはなく、ウイルスも存在しないので、細胞培養とともに国内に持ち込まれたと考えられる。

- (2) 細胞培養を用いて製造された生ウイルスワクチンについて RT-PCR 法を実施した。

6社で製造された人体用生ウイルスワクチン(麻疹、おたふく風邪、風疹、ポリオ)43検体中12検体(28%)が、また、動物用生ウイルスワクチン13検体中9検体(69%)がそれぞれ陽性を示した。これは精製されたワクチンにおいても細胞培養中の迷入ウイルスが混入する可能性を示唆している。このことは遺伝子治療に用いられる精製ベクターウイルス製品にも同様の危惧があることを意味しており、細胞培養段階における十分な汚染検査の必要性と矛盾するものではない。

4. 評価

1) 達成度

わが国における細胞培養についてペスティウイルス汚染状況を総合的に初めて明らかにすることに成功し、その成果を学術誌に公表した。

2) 学術的・国際的・社会的意義

細胞培養を汚染するペスティウイルスは遺伝的多様性がみられ、とくにゲノムの5'端非翻訳領域にみられる回文様塩基置換に基づいて型別が可能であること証明し、これにより細胞培養汚染ペスティウイルスの検出・同定が迅速に行えるようになった。細胞培養における本ウイルスの汚染は世界共通の問題であって、本研究を通して得られた成果により、問題解決への手がかりが与えられたと言ってもよい。遺伝子治療を始め、多くの高度医療システムにおいて細胞培養は不可欠の道具であり、その品質管理は医療過誤防止に計り知れない貢献をするものと考えられる。

3) 今後の展望

細胞培養におけるペスティウイルス汚染検査法は本調査研究によって、ほぼ所期の成果が得られたと思われる。今後、細胞培養を汚染するペスティウイルスを確実に除去する方法を開発するとともに、他のウイルス種についても汚染状況を調査する必要がある。

5. 結論

細胞培養を最も頻りに汚染するペスティウイルスを効率よく検出するためのPCR法を開発した。これにより、従来数日を要していた検査法が短時

間で行えるようになり、細胞培養の品質管理業務の省力化を進めることができる。とくにペスティウイルスはこれまで検出が困難とされてきたものであるが、PCR法の導入により高感度に検出することが可能となった。

6. 研究発表

(1) 論文発表

1. Senda, M., Parrish, C.R., Harasawa, R., Gamoh, K., Muramatsu, M., Hirayama, N., and Itoh, O. (1995) Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 33(1):110-113.
2. Harasawa, R. (1995) Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine* 13(1):100-103.
3. Matsuda, K., Harasawa, R., Li, J.-L., Kasama, T., Taki, T., Handa, S., and Yamamoto, N. (1995) Identification of phosphocholine-containing glycolipids purified from *Mycoplasma fermentans*-infected human helper T-cell culture as components of *M. fermentans*. *Microbiol. Immunol.* 39(5):307-313.
4. Harasawa, R., and Sasaki, T. (1995) Sequence analysis of the 5' untranslated region of pestivirus RNA demonstrated in interferons for human use. *Biologicals* 23(4):263-269.
5. Harasawa, R., Asada, K., and Kato, I. (1995) A novel repetitive sequence from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.* 57(3):557-558.
6. Harasawa, R., and Mizusawa, H. (1995) Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. *Microbiol. Immunol.* 39(12):979-985.
7. Harasawa, R., Lefkowitz, E.J., Glass, J.I., and Cassell, G.H. (1996) Phylogenetic analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of the genus *Ureaplasma*. *J. Vet. Med. Sci.* 58(3):191-195.
8. Sasaki, T., Harasawa, R., Shintani, M., Fujiwara, H., Sasaki, Y., Horino, A., Kenri, T., Ishii, K., and Chino, F. (1996) Evaluation of current sterility tests for human live viral vaccines. *Biologicals* 24: 51-55.
9. Harasawa, R. (1996) Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5' untranslated region. *Acta Virol.* 40:49-54.
10. Harasawa, R., and Cassell, G.H. (1996) Phylogenetic analysis of genes coding for 16S rRNA in mammalian ureaplasmas. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(3):827-829.
11. Kojima A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Tamura, Y., and Harasawa, R. (1996) Detection of mycoplasma DNA in

- veterinary live virus vaccines by the polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 58(10):1045-1048.
12. Sasaki, T., Harasawa, R., Shintani, M., Fujiwara, H., Sasaki, Y., Horino, A., Kenri, T., Asada, K., Kato, I., and Chino, F. (1996) Application of PCR for detection of mycoplasma DNA and pestivirus RNA in human live viral vaccines. *Biologicals* 24:371-375.
 13. Yoshida, M., Nakagaki, K., Nogami, S., Harasawa, R., Maeda, R., Katae, H., and Hayashi, Y. (1997) Immunologic protection against canine heartworm infection. *J. Vet. Med. Sci.* 59(12): 1115-1121.
 14. Harasawa, R., Maeda, R., Nogami, S., Nakagaki, K., Yoshida, M., Kataoka, Y., Kobayashi, H., Katae, H., and Hayashi, Y. (1997) Characteristics of nucleotide sequences flanking the trans-spliced leader SL1 exon in *Dirofilaria immitis*, *Brugia malayi*, and *Brugia pahangi*. *J. Vet. Med. Sci.* 59(12): 1149-1152.
 15. Giangaspero, M., Harasawa, R., and Verhulst, A. (1997) Genotypic analysis of the 5'-untranslated region of a pestivirus strain isolated from human leucocytes. *Microbiol. Immunol.* 41(10): 829-834.
 16. Matsuda, K., Li, J.-L., Harasawa, R., Taki, T., Handa, S., and Yamamoto, N. (1997) Phosphocholine-containing glycolipids (GGPL-I and GGPL-III) are species-specific major lipid antigens of *Mycoplasma fermentans*. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 233:644-649.
 17. Kojima A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, M., Nishimura, S., Harasawa, R., and Tamura, Y. (1997) Detection of *Mycoplasma* in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Biologicals* 25:365-371.
 18. Harasawa, R., and Giangaspero, M. (1998) A novel method for pestivirus genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods* 70:225-230.
 19. Harasawa, R. (1999) Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S rRNA spacer sequence. *Microbiol. Immunol.* 43: 127-132.
 20. Harasawa, R., and Giangaspero, M. (1999) Genetic variations in the 5' end and NS5B regions of classical swine fever virus genome among Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 43(4): 373-379.
 21. Yamakawa, H., Nagai, T., Harasawa, R., Yamagami, T., Takahashi, J., Ishikawa, K., Nomura, N., and Nagashima, H. (1999) Production of transgenic pig carrying MMTV/v-Ha-ras. *J. Reprod. Dev.* 45: 111-118.
 22. Giangaspero, M., and Harasawa, R. (1999) Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. *Vet. Microbiol.* 70:33-39.
 23. Harasawa, R., and Kanamoto, Y. (1999) Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *J. Clin. Microbiol.* 37(12): 4135-4138.
- (2) 学会発表
(海外)
1. Giangaspero, M., Harasawa, R., and Verhulst, A.: Primary and secondary structures in the 5'-untranslated genomic region of a pestivirus strain isolated from human leucocytes. 4th International Congress of Veterinary Virology, (Edinburgh, Scotland) August, 1997
 2. Harasawa, R., and Giangaspero, M.: A simple and practical approach for genotyping based on the palindromic structures in the 5'-untranslated region of pestivirus RNA. 4th International Congress of Veterinary Virology, (Edinburgh, Scotland) August, 1997
 3. Giangaspero, M., Vacirca, G., Harasawa, R., Buttner, M., Vanopdenbosch, E., Letellier, C., Panuccio, A., Belloli, A., and Verhulst, A.: Pestiviral RNA detected in modified live virus vaccines for human use. International Conference on Emerging Infectious Diseases, (Atlanta, Georgia) March, 1998.
 4. Harasawa, R.: Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S rRNA spacer sequence. 12th Conference of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), (Sydney, Australia) July, 1998.
 5. Giangaspero, M., and Harasawa, R.: Ovine pestiviruses - Their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. 4th Pestivirus Meeting by the European Society for Veterinary Virology, (Giessen, Germany) March, 1999.
 6. Harasawa, R., and Giangaspero, M.: Classical swine fever virus genovars among Japanese isolates. 4th Pestivirus Meeting by the European Society for Veterinary Virology, (Giessen, Germany) March, 1999.
- (国内)
1. 原澤 亮、水澤 博：動物細胞培養にみられる Pestivirus RNA の5' 非コード領域。第 120 回日本獣医学会 (鳥取市) 1995 年 11 月
 2. 原澤 亮、G.H. カッセル：16S rRNA 遺伝子とその下流のスペーサー領域からみた哺乳類ウレアプラズマの系統分類。第 121 回日本獣医学会 (相模原市) 1996 年 4 月
 3. 高田容子、増井 徹、田辺秀之、水沢 博、西村和子、原澤 亮：培養細胞を汚染するマイコプラズマの PCR 法による微量検出について。第 3 回日本微生物資源学会 (大阪市) 1996 年 6 月

4. 原澤 亮：5'端非コード領域からみた Pestivirus の系統分類。第3回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会(熱海市)1996年10月
 5. 原澤 亮：5'端非翻訳領域からみた Pestivirus の分類と同定。第123回日本獣医学会(藤沢市)1997年4月
 6. M. ジャンガスペロ、原澤 亮：ヒト由来 Pestivirus の5'端非翻訳ゲノム領域。第124回日本獣医学会(鹿児島市)1997年10月
 7. 吉田元信、中垣和英、野上貞雄、前田龍一郎、原澤 亮、小松忠人、小林 光、片江 宏巳、林 良博：犬糸状虫免疫犬に移植された diffusion chamber 内遊走細胞の解析。第126回日本獣医学会(江別市)1998年8月
 8. 原澤 亮、M. ジャンガスペロ：ゲノム両端の構造からみたブタコレラウイルス。第127回日本獣医学会(相模原市)1999年4月
-
7. 知的所有権の出願・取得状況
該当なし。

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)研究成果発表抄録

課題番号: H10-ゲノム039

分担研究項目: BVDVフリー血清によるペスティウイルス除去に関する研究

分担研究者: 所属施設 三菱東京製薬(株)中標津製造所

氏名 阿部武丸

1. 研究目的

BVDVフリー血清の作出に成功したことを機に、ペスティウイルス汚染が判明している細胞株を、この血清を用いた洗淨的継代培養によって、汚染細胞株の浄化を図れるか否かを検討することとした。

BVDVフリーのウシ細胞株を確立しペスティウイルス汚染ウシ細胞株との比較において洗淨的継代の効果・限界について検討する。

2. 研究方法

PCR検査によって、ペスティウイルス汚染が判明しているヒト、サル、ウシ由来の細胞株5株についてBVDVフリー血清を用いて洗淨的継代培養した。

BVDVフリーのウシ細胞株の確立を図った。

(倫理面への配慮)

牛の細胞を利用しているので現在は特に必要はない。

3. 研究結果及び考察

ヒト、サル由来細胞株のペスティウイルス汚染は、容易に除去されたが、ウシ由来細胞株は除去できなかった。培養用ウシ血清に由来する「極微量(PCR的)汚染」という新たな問題がクローズアップされた。

BVDVフリーのウシ血管内皮細胞の細胞プールを作製できた。

4. 評価

1) 達成度について

BVDVフリー血清による洗淨的継代培養による汚染細胞株の浄化の可能性についてはほぼ達成できた。培養用ウシ血清に由来する「PCR的汚染」という新たな問題については、さらに別の視点から検討を要する。

BVDVフリーウシ細胞株の確立は、ほぼ50%の達成状態。ペスティウイルス汚染ウシ細胞株との比較を検討しなければならない。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について保存細胞株におけるBVDV汚染に関し培養用ウシ血清に由来する「PCR的汚染」という新たな問題がクローズアップされたこと、並びに、フリー血清による洗淨的継代という方法の可能性が示されたことは、学術的にも興味深いことであり、国際的にも、社会的にも大いに意義あることである。

3) 今後の展望について

保存細胞株におけるBVDV汚染の実態の解明

BVDV以外の「PCR的汚染」の可能性についての検討

フリー血清による洗淨的継代という方法の可能性の追求。

BVDVフリーウシ細胞株と汚染細胞株との比較

5. 結論

単純なフリー血清による洗淨的継代培養による、汚染細胞株の浄化の検討は、「PCR的汚染」という新たな問題をクローズアップした。この新しい汚染概念の観点での細胞汚染問題の見直しは「培養細胞研究資源の高度化」の上で、極めて重要な課題と考えられる。

6. 研究発表

1) 国内

論文発表

水沢博、田辺秀之、増井徹、高田容子、樽松美治、峰岸大輔、吉田東歩、佐藤元信、竹内昌男、阿部武丸、原沢亮、培養細胞系に混入するウシウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)のRT-PCR法による検出, Tissue Culture Research Communication 18: 131-138 (1999)

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定も含む)

なし

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)研究成果発表抄録

研究課題： 培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究
課題番号： H10-ゲノム039
分担する研究項目：正常2倍体細胞の研究資源化過程における酸素依存性機能発現変化
分担研究者：所属施設 静岡県立大学大学院・生活健康科学研究科
氏名 加治和彦

1 研究目的

ヒトを対象とする生物学および医学において、ヒトの細胞の培養法の確立は極めて重要である。特に正常2倍体細胞はその正常性を維持しつつ培養、増殖させることにより、その性質の研究を可能にするのみならず、遺伝子治療や移植等の材料として求められている。血管内皮細胞は、心臓や血管およびリンパ系の内壁を一層で覆う細胞である。内皮細胞は、組織へ酸素や各種栄養素、ホルモンや成長因子を供給すると同時に、組織からの代謝産物を血管内に移動する。特に脳では脳血管閉塞が発達している。このように血管内皮細胞は、個体を維持するうえで極めて重要な役割を担っている。実際老化に伴い血管系が関与する疾病が増加する。

このようなことから、我々は第一にヒト血管内皮細胞の培養法の確立を計った。また個体の維持や老化に酸素や活性酸素が大きな影響を及ぼしていることが、明らかにされつつある。正常2倍体細胞に活性酸素が如何なる影響を及ぼすかを検討した。

2 研究方法

ヒト内皮細胞の血管材料としてヒトの臍帯を用いた。新鮮なヒト臍帯を最寄りの産院の協力を得て入手した。基礎培養液、培養皿は市販品を使用し、内皮細胞成長因子(ECGF)は仔ウシ脳から調製した。

(倫理面への配慮)

産院の協力によった。今回は特に供与者との個々の了解は取り付けていない。現在までのところ、所属大学では倫理委員会が機能しておらず、早急に設置する予定である。

3 研究結果および考察

(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞の初代培養： トリプシン-EDTA 溶液を臍帯静脈に注ぎ込み、両端を注射筒に接続する。静脈の内壁の内皮細胞は、この消化酵素の働きで剥がれてくる。この細胞を回収して培養する。約2時間の操作で簡単にヒトの臍帯静脈内皮細胞を単離し培養することができる。ヒトの内皮細胞はウシラットのそれとは異なり、典型的な敷石状の集合模様を呈さない。しかし血

液凝固第8関連因子で間接蛍光染色すると、染色された分泌顆粒がたくさん細胞中に見られるので内皮細胞であると確認できる。このようにしてほぼ100%が内皮細胞からなる細胞集団を得る。

(2) ヒト内皮細胞の培養条件： ヒト以外の動物の内皮細胞は比較的簡単に増殖させることができる。ウシやブタの内皮細胞は、MEMに10%の胎児ウシ血清(FBS)を加えた培養液で簡単に増える。ヒトの内皮細胞は、この条件では全く増殖しない。細胞の培養条件を決めるために、基礎培養液、増殖因子、それに培養基の検討を試みた。種々の培養条件で細胞を培養皿に蒔き、コロニーの形成を観察した。基礎培養液にMCD B-104を選び、10%FBSを加えさらに、増殖因子としてECGFを含むカクテルを添加した。培養皿をゼラチンでコートする。この条件でHUVECは約20時間ごとに分裂し、継代培養も容易で、55から125の細胞集団倍加(PDL)を行なった。培養の鍵はECGFで、これは我々が新生ウシ脳から部分精製した。酸性FGF(aFGF)と塩基性FGF(bFGF)の混合物である。

(3) 細胞の継代培養と細胞寿命： コンフルエントに増殖した細胞集団派直ちに継代培養する必要がある。ヒト内皮細胞はコンフルエントのまま維持すると、細胞は数日以内に培養液中に浮き上がり、新たな細胞分裂による補給も不十分で培養系全体が一見不健康になる。これはECGF飢餓によるプログラム細胞死(アポトーシス;後述)による。ヒトの線維芽細胞や平滑筋細胞と同様に、内皮細胞も細胞集団倍加数が有限である。すなわち細胞集団は有限回の分裂の後、分裂能力を失う。その最終細胞集団倍加数(PDL)は、50から120PDLであった。この値はヒト線維芽細胞のそれと同様のレベルであった。内皮細胞は老化するにつれて大きくなり、細胞同士の配向性が崩れてくる。

(4) ヒト内皮細胞のプログラム死(アポトーシス): ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖にはECGFが必須であった。ECGFの存在のもとで増殖している内皮細胞の培養系からECGFを除くと、細胞は数時間後には培養皿の底面から浮かび上がり始め、次第に小さな破片に分かれて死んでしまう。2~4日たつと、細胞の90%以上は培養系から消失する。しか

しECGFを除くと同時にシクロヘキシミドを加えると、この細胞死が著しく阻止された。これは、ECGF (-)による細胞死には、蛋白合成が必要であることを示している。ECGF除去によって浮かび上がった直後の細胞の核のDNAは、ヌクレオソーム単位の断片化が確認され、細胞にアポトーシスが誘導されたことが分かった。したがって、内皮細胞にアポトーシスを誘導させることなく、最終寿命まで培養するか為には、ECGF飢餓を如何に防ぐかが重要である。

- (5) SODの遺伝子導入： ヒト正常細胞はその正常性の特質として、細胞寿命を持っている。またヒトを対象とする研究である制約から、トランスジェニックの技術を導入することが不可能である。それに代わるものとして、若いPDLの細胞に遺伝子を導入することを試みた。レトロウイルスをベクターにSOD遺伝子をのせ、ヒト由来のフェニックス細胞によりパッケージングした。このウイルスを内皮細胞に感染させた。

この結果内皮細胞は染色体に新規の遺伝子がDNAとして導入された。この形質転換細胞も細胞寿命を持つが、標的遺伝子の発現のコントロールが可能である。今後この形質転換内皮細胞の解析を行う予定である。

4. 結論

ヒト臍帯血管内皮細胞は、ゼラチンをコートした培養皿に、MCDB-104を基礎培養液に10%胎児ウシ血清、ECGF(50~100ng/ml)、EGF(10ng/ml)さらにヘパリン(10~100ug/ml)を添加した培養液で培養すると、著しい細胞増殖が得られる。この細胞はECGF飢餓でアポトーシスが誘導される。ECGF飢餓が起こらないようにECGFを十分供給し、細胞集団がコンフルエントになる前に継代培養を続けると、この細胞の最長寿命と思われる55~125PDL(細胞集団倍加数)を引き出すことができる。この培養条件は、ヒトの臍帯以外の組織の大血管の内皮細胞にも適用できる。TNFやIL-1がヒト内皮細胞の細胞寿命に影響を及ぼす。

1. 論文発表

TMIG-2DPAGE: A new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. Toda, T., Kaji, K. and Kimura, N. (1998) Electrophoresis, 19: 344-348.

Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom., Masuda,

S., Araki, T., Kaji, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 235: 59-63 (1997).

Integrin 4 is involved in apoptotic signal transduction in endothelial cell Is., Miao, J., Araki, S. and Kaji, K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 233: 182-186 (1997).

Enhancement of apoptosis in developing chick neural retina cells by basic fibroblast growth factor., Yokoyama, Y., Ozawa, S., Kaji, K. et al., J. Neurochem., 68: 2212-2215 (1997)

Inhibition of phospholipase promote apoptosis of human endothelial cells., Miao, J., Kaji, K., Araki, S., J. Biochem., 121: 612-618 (1997).

2. 学会発表

血管内皮細胞の老化に及ぼす酸素分圧の影響、伊倉宏一、太田敏郎、加治和彦，第71回日本生化学会大会(名古屋)1998年10月