

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17012017

研究課題名（和文） 個体レベルでのがんの統合的研究

研究課題名（英文） Integrated cancer research using in vivo models

研究代表者

山村 研一（YAMAMURA KENICHI）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：90115197

研究成果の概要（和文）：2005年から2009年までの間に、7つの支援グループを組織し、がん研究者に対して以下のような支援を行った。トランスジェニックマウス及びキメラマウス作製を計1463件実施した。単純なトランスジェニックマウス作製はやや減少傾向にあり、条件的破壊が多くなっている。ES細胞の相同組換え等に関する相談は191件で、これには実際の技術指導、ベクター等の供与、その他相談を含む。1,798件の微生物学的モニタリングの依頼があり、25,769検体の検査を行った。ここ数年、特定施設で *Pasteurella pneumotropica* や消化管内原虫の汚染が継続して見出されるものの、マウス肝炎ウイルスを含め、問題となる感染症はほとんど認められなくなった。寄託された系統について、生化学マーカーおよびマイクロサテライトマーカーにより遺伝学的モニタリングを行い、1367個体実施した。遺伝子操作マウス等の寄託凍結保存数は7985件、供給系統数は4358件であった。MHVに感染したマウス等2739系統のクリーニングを行った。凍結融解胚および凍結精子由来新鮮胚を短期間（3～4日）冷蔵保存できる技術を用いて、全国に胚をクール宅配便による供給を開始した。生殖工学に関する講習会を国内で24回、136名に対して実施した。CARDでの登録・承認・公開・編集システム（CARD Entry）を改善し、IMSR登録に必要な情報の必須化、ontology情報を追加し機能を強化した。細胞バンクとして、7357件配布した。病理形態解析支援として、合計55件の病理解析支援を行った。

研究成果の概要（英文）：We organized 7 groups to support cancer research in Japan during 2005 and 2009 academic year. We produced 1463 transgenic or knockout mouse strains and responded to 191 consultations by distributing materials such as targeting vectors. The number of request for conditional gene targeting instead of simple knockout is increasing in recent years. Microbiological monitoring and genetic monitoring using biochemical/microsatellite markers were accomplished for 25,769 samples in 1798 cases and 1,367 samples, respectively. Due to these efforts, infection to laboratory mouse is rarely seen under SPF condition in these years. We cryopreserved embryos and sperms for 7,985 strains and supplied 4,358 strains. Infected 2739 strains were recovered and cleaned from viruses using in vitro fertilization technique. We started to supply embryos under refrigerated condition using a new method by which recovered embryo can be preserved for 3 or 4 days. We held the course for reproductive engineering for 24 times to 136 trainees. CARD-RBASE was established with necessary function such as links to other web sites. We supplied 7,357 cell lines for cancer researchers. We also carried out pathologic analyses for 55 genetically engineered mouse strains upon request.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	73,400,000	0	73,400,000
2006年度	76,900,000	0	76,900,000
2007年度	76,900,000	0	76,900,000
2008年度	79,200,000	0	79,200,000
2009年度	79,200,000	0	79,200,000
総計	385,600,000	0	385,600,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：

キーワード：遺伝子改変マウス、相同組換え、凍結保存、微生物学的モニタリング、遺伝学的モニタリング、データベース、病理形態学、組織診断

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子病であり、個体レベルで生じる現象であることから、がん研究においても遺伝子操作動物の重要性が認識され、すさまじい勢いで作製されつつある。このためがん研究の発展のためには、統合がんとして種々の支援を集中的に行うことが必要であると判断された。そこで、まず遺伝子改変マウスの作製と関連する技術相談、作製されたこれらの遺伝子改変マウスの微生物学的及び遺伝学的統御、さらに作製された遺伝子改変マウスの利用促進のため凍結保存・供給、そのために必須のデータベース構築、病理形態学支援、そしてがん由来の細胞株の供給を行うこととなった。

2. 研究の目的

がん研究を一段と進展させるため、以下の支援業務を行うことを目的とする。

- (1) 遺伝子改変マウスの作製と関連技術支援
- (2) 微生物学的モニタリング
- (3) 遺伝学的モニタリング
- (4) 配偶子および胚の凍結保存と供給および汚染マウスのクリーニング
- (5) 遺伝子改変マウスのデータベース構築と維持
- (6) 細胞バンク
- (7) 病理形態学的解析

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス（山村、山田、荒木）
単離した遺伝子をマイクロインジェクション法にてマウス受精卵に注入しトランスジェニックマウスを作製する。ES細胞を用いた相同組換え法によりノックアウト ES クローンを単離し、それを胚盤胞にインジェクションしてキメラマウスを作製する。また、ノ

ックアウトマウス作製及び部位特異的組換えに必要な材料(薬剤耐性遺伝子、*lox* 配列、Cre 発現ベクターなど)を揃え、供給できるようにするとともに、実際用いる場合どのようにしたらうまくいくかの適切な助言を行う。
(2) 微生物モニタリング（伊藤）

動物実験が微生物による汚染がなく円滑に行われたことの確認と、我が国の主要研究機関の実験動物の微生物学的管理状況を把握するために、研究班の班員から送付された実験動物や動物の血清材料などについて微生物モニタリングを実施した。モニタリングは以下の項目について行う。

培養による検出：*Citrobacter rodentium*, *Corynebacterium kutscheri*, *Mycoplasma pulmonis*, *Pasteurella pneumotropica*, *Salmonella* spp.

抗体検査による検出：*Clostridium piliforme*, Ectromelia virus, Lymphocytic choriomeningitis virus, Mouse hepatitis virus (MHV), *Mycoplasma pulmonis*, Sendai virus (HVJ)

寄生虫検査による検出：蟻虫、消化管内原虫、外部寄生虫

(3) 遺伝モニタリング（加藤）

マウスの遺伝生化学的モニタリング項目（タンパク、酵素、細胞膜抗原 19 項目）およびマウスのマイクロサテライト DNA マーカー（10 種類）を用いて行う。

(4) 凍結保存、供給、クリーニング（中潟、中尾、小幡）

中潟法による精子の凍結、vitrification 法による 2 細胞期胚を凍結保存する。また、汚染した雄マウスの精子を用いて体外受精を行い、クリーニングを行う。

(5) データベース (山崎)

熊本大学の生命資源研究・支援センターの動物資源開発研究部門に寄託された遺伝子改変マウス等に関し、データベースを Oracle-DBMS を用いて構築し、閲覧・検索・ダウンロード用の Web アプリケーションを開発しサービスを開始する。

次に、データ管理システム (CARD Entry) を構築し、複数の担当者が Web 上で情報入力から査定、公開状況の変更までを行えるようにする。さらに管理システムの機能を拡張し、オンラインで寄託マウスの情報を登録することができるようにする。

(6) 細胞バンク (松居)

がん研究に貴重な癌細胞、培養細胞等の医用細胞について、維持保存、収集、および品質検査による品質管理を行ない、広く各研究機関への供給を行なう。品質検査としては、細胞株を培養するたびに通常の生存率および微生物検査を行ない、Short Tandem Repeat (STR) 解析による個体識別法を利用したヒト細胞間クロスコンタミネーションの解析、アイソザイム検査による細胞株の動物種同定、ハイブリドーマの抗体産生能検査およびマイコプラズマ汚染検査 (PCR 法および、Hoechst33258 による核染色) を行なう。

供給している細胞株、ならびに全国の研究者の保有する可移植性腫瘍細胞株について調査しデータベースとして公開することで、細胞資源の簡便な検索を可能とし、細胞株の情報を広く提供する。

(7) 病理形態学 (鱈淵 他)

遺伝子操作の進歩に伴い、多くの遺伝子改変動物が作製されており、個体レベルで遺伝子機能解析のため、背景の病態を含めた高品質の病理形態解析の需要が高まっている。一方で、実験動物での病理診断の経験をもつ病理研究者の数は限られている。本委員会では、電子メール等による広報を通じて、幅広く特定領域研究者からの要請に応じ、適切な専門家を紹介する。本委員会による支援は単なる病理診断にとどまらず、正確な解析が可能となるような動物の処理、標本の作成、そして、病理診断まで、一貫した支援を提供し、その多くが共同研究として発展させる。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウス (山村、山田、荒木)

トランスジェニックマウス及びキメラマウス作製を計 1463 件実施した。4 倍体キメラ作製や、既に存在する遺伝子操作マウスからの ES 細胞樹立などの技術支援も行った。

Cre 発現ベクター、Cre による組換えで発現誘導できる CAG-loxP-CAT-loxP-cloning

site-pA カセットを持つプラスミド、lox 配列を含む薬剤耐性遺伝子、Flp 発現ベクター、Flp 遺伝子発現マウスなどを供給した。また、ロックアウト作製後、ターゲティングベクター上のネオマイシン耐性遺伝子を任意の遺伝子に置換可能な「可変型」KO ベクターを構築し、希望する研究者に配布した。また、exon の置換などに対応するベクターも構築し、配布を行った。

ES 細胞の相同組換え等に関する相談は 191 件で、組換えによる遺伝子置換を計画している研究者にプラスミド構築の仕方・ES 細胞への導入条件・組換え体の検出法などの指導等を行なった。

可変型遺伝子トラップベクターで遺伝子トラップを行い、トラップされた遺伝子の配列情報を、可変型遺伝子トラップクロンデータベース、EGTC (<http://egtc.jp/>) で公開し、22 件の供給依頼に対応した。

(2) 微生物モニタリング (伊藤)

1798 件の微生物学的モニタリングの依頼があり、25769 検体の検査を行った。ここ数年、特定施設で *Pasteurella pneumotropica* や消化管内原虫の汚染が継続して見出されるものの、マウス肝炎ウイルスを含め、問題となる感染症はほとんど認められなくなった。遺伝子改変マウス作出の増加や、研究機関間での動物の授受機会も増加しているにもかかわらず、日本の主要研究機関で維持されているマウスが微生物学的におおむね良好な状態であることが示された。日本の医学・生物学分野の基盤となる実験動物の品質管理を今後も継続する必要があると考えられる。

(3) 遺伝モニタリング (加藤)

寄託された系統について、生化学マーカーおよびマイクロサテライトマーカーにより遺伝学的モニタリングを行い、1367 個体実施した。生化学マーカーを用いたモニタリングについては浜松医科大学で系統維持されている近交系マウス、肥満・糖尿モデルマウス系統、銅代謝異常マウス系統および新たに開発した突然変異マウスなどを対象にした。マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝検査は熊本大学 CARD の寄託マウス等を対象にして実施した。交配によるマッピングは熊本大学 IMEG のジーントラップマウス等を対象にして実施した。FISH によるマッピングは京都大学再生医科学研究所のトランスジェニックマウス等を対象に行った

(4) 凍結保存、供給、クリーニング (中瀬、中尾、小幡)

遺伝子操作マウス等の寄託凍結保存数は 7985 件、供給系統数は 4358 件であった。MHV

に感染したマウス等 2739 系統のクリーニングを行った。近年、遺伝子操作マウスの作が増加しており、操作した遺伝子の存在を確認すること、またカルタヘナ法を遵守するために操作遺伝子の情報を正確に記載することが必要である。導入した遺伝子操作マウスの遺伝子検査を実施した結果、約 10%のマウスに導入された遺伝子や情報に誤りが検出された。これらの誤りを全て是正し、正確な情報を添付したマウスを提供した。凍結融解胚および凍結精子由来新鮮胚を短期間(3~4日)冷蔵保存できる技術を開発、全国に胚をクール宅配便で供給するシステムを確立した。

(5) データベース(山崎)

マウス系統情報の公開用データベース(CARD R-BASE)および情報管理システム(CARD Entry)を開発し、安定的に情報提供できる体制を実現した。格納系統数は 1293 系統、データ利用者は月平均約 1000 人に達した。CARD R-BASE は外部の関連サイトとのリンクを充実させおり、IMSR, JMSR, EGTC, MGI, OMIM, GO などが連携 DB である。CARD Entry は内部管理のみならず寄託者がオンラインでデータ登録する機能を有するなど、高い拡張性と持続性を特徴として実用に供している。

(6) 細胞バンク(松居)

東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターの保有する細胞株の品質管理、供給業務並びに新規細胞株の収集を行なった。その結果、平成 17 年度から平成 21 年度までに合計 7668 件の細胞株を全国の研究者へ供給した。内訳として細胞種別集計では、ヒト細胞株 5312 件、マウス細胞株 1567 件、ラット細胞株 358 件、ハイブリドーマ 252 件、その他細胞株 179 件であり、施設別集計では、国内の大学及び公共機関 6484 件、民間機関 943 件、国外 241 件であった。また、細胞株の収集活動の結果、平成 17 年度から平成 21 年度までに合計 28 株の新規寄託細胞株を収集することができた。

「当センターから供給可能な細胞株」のリストについて、細胞株の性質を記載しHP上(<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/ccr/>)に公開し、状況に応じて常に情報を更新した。全国の研究者の保有する可移植性腫瘍細胞株について、平成 16 年度に全国の研究者にアンケート調査を行い、平成 18 年 2 月に「日本で維持されている可移植性腫瘍株一覧表」のリストについて、HP上(<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/ccr/>)にデータベースを更新した。また、このデータベースはがん特定のHPにもリンクされた。平成 17 年度から平成 21 年度までの両デ

ータベースへのアクセス件数は、合計で約 172725 件(確認可能な件数のみ)であった。

上記 A、B の結果に示されるように、国内外の幅広い研究活動へ対して十分に品質管理された細胞株の供給および情報提供を実施することができた。

(7) 病理形態学(鰐淵 他)

支援した病理形態解析は 55 件になり、主なものとして以下のような支援を行った。

MT1-MMP ノックアウトマウス(東大・医科
研・清木元治先生)および E-cadherin の
コンディショナル・ノックアウトマウス
(東京医科歯科大・医・湯浅保仁先生)
を用いて、それらの遺伝子のがんの形
成・進展に及ぼす作用を解析した。

国立がんセンター堺隆一先生からの依頼
により、「Cas ノックアウトマウスの神経
組織の異常の有無の検索」を支援した。
金沢大学大学院医学系研究科循環医科学
専攻 多久和典子先生からの依頼により、
「G 蛋白共役型受容体(AGR16/Edg5/S1P2)
KO マウスに高率に発症するリンパ腫の検
索」を支援した。

金沢大学大学院医学研究科血管分子生理
学教室 多久和陽先生・多久和典子先生
からの依頼により、「S1P2 欠損マウス、ス
フィンゴシンカイネーストランスジェニ
ックマウスおよびそれらの野生型マウス
における全身組織での病理診断」を支援
した。

東京大学医科学研究所癌細胞シグナル研
究分野 手塚徹先生からの依頼により、
「Cb1-b 欠損、Lyn 欠損マウス、ANA
欠損マウス、Six3-Cre Cbl/Cbl-b 二重欠
損マウスおよびそれらの野生型マウスに
おける全身組織での病理診断」を支援し
た。

東京大学医科学研究所癌細胞シグナル研
究分野 鈴木 亨先生からの依頼により、
「Tob/p53 遺伝子操作マウスおよびその
野生型マウスにおける全身組織での病理
診断」を支援した。

千葉大学医学研究院免疫発生学研究室
中山俊憲先生からの依頼により、「Spic ト
ランスジェニックマウス、Shn-2 欠損マ
ウスおよびそれらの野生型マウスにおけ
る全身組織での病理診断」を支援した。

東京大学医科学研究所癌細胞シグナル研
究分野 渡海紀子先生からの依頼により、
「Kid ノックアウトマウスについての病
理組織学的検索」を支援した。

東京大学医科学研究所癌細胞シグナル研
究分野 米田光弘先生からの依頼により、
「ANA ノックアウトマウスの肺について
の病理組織学的検索」を支援した。

東京大学医科学研究所癌細胞シグナル研

究分野 鈴木亨先生からの依頼により、「Tob/Ras 遺伝子操作マウスについての病理組織学的検索」を支援した。
自治医科大学再生医学研究部 増田茂夫先生からの依頼により、「腫瘍における CD231 免疫染色定量解析」を支援した
自治医科大学再生医学研究部 増田茂夫氏からの依頼により、「腫瘍組織における CD231 などの発現について」の免疫組織化学的解析を支援した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Yamazaki, Y. and Sugawara, H. National BioResource Project Information Center. Experimental Animals. 査読有, 58 巻, 2009, 75-84
Takeo T, Kaneko T, Haruguchi Y, 他 15 名 15 番目 Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. Cryobiology. 査読有, 2009, 58 巻, 196-202
Suzuki, K., Yamaguchi, Y., Villacorte, M., Mihara, M., Akiyama, M., Shimizu, H., Taketo, M. M., Nakagata, N., Tsukiyama, T., Yamaguchi, T. P., Birchmeier, W., Kato, S. and Yamada, G. Embryonic hair follicle fate change by augmented β -catenin through Shh and Bmp signaling. Development, 査読有, 136 巻, 2009, pp.367-372
Kazuo Goto, Nobuhito Hayashimoto, Masahiko Yasuda, Tomoko Ishida, Shuko Kameda, Akira Takakura, and Toshio Itoh. Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice. 査読有, Exp. Anim., 58, 2009, 135-140.
Yoshiki, A., Ike, F., Mekada, K., Kitaura, Y., Nakata, H., Hiraiwa, N., Keiji, M., Ijuin, M., Kadota, M., Murakami, A., Ogura, A., Abe, K., Moriwaki, K., Obata, Y. : The Mouse resources at the RIKEN BioResource Center. Exp. Anim., 査読有, 58 巻, 2009, 85-96
Yamamura, K. and Araki, K. Gene trap mutagenesis in mice: New perspectives and tools in cancer research. Cancer Sci. 査読有, Vol.99, 2008, pp.1 - 6.
Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond, Nat Rev

Genet, 査読有, 9 巻, 2008, 129-140
Cao X, Tsukamoto T, Seki T, Tanaka H, Morimura S, Cao L, Mizoshita T, Ban H, Toyoda T, Maeda H, Tatematsu M. 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. Int J Cancer, 査読有, 122 巻, 2008, 1445-1454
Takabayashi, S., Iwashita, S., Hirashima, T., and Kato, H. The novel tetratricopeptide repeat domain 7 mutations, Ttc7^{sn-jic}, with deletion of the TPR-2B repeat causes severe flaky skin phenotype. Exp Bio Med, 査読有, 232 巻, 2007, 695-699.
Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, AG., Nishikawa, S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. Cell. 査読有, 129 巻, 2007, 1377-1388
Hayashimoto, N., Ueno, M., Takakura, A. and Itoh, T. A specific polymerase chain reaction based on the *gyrB* gene sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory mice. J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci., 査読有, 46 巻, 2006, 54-58.

[学会発表](計 4 件)

中瀧直己、古波蔵恵里、他 10 名、凍結融解マウス胚の冷蔵輸送、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜

荒木喜美、岡田由香、荒木正健、山村研二：

ES細胞において *lox71* 部位に対して良い組換え効率を示す新たな RE 変異 *lox* の探索、第 40 回日本発生生物学会・第 50 回日本細胞生物学会合同大会、2007、5.28 - 30、福岡

加藤秀樹、木村二郎、西川哲、高林秀次。マウスクローズドコロニーに内在する自然突然変異遺伝子、第 53 回日本実験動物学会総会、2006 年 5 月、神戸。

目加田和之、山崎京子、斉藤昭男、中村哲枝、村上亜弓、森脇和郎、小幡裕二、吉木淳、理研バイオリソースセンターにおけるマウス系統基礎特性検査について、第 53 回日本実験動物学会総会、2006 年 5 月、神

戸

〔図書〕(計1件)

Araki, K. CRC Press, Boca Raton, USA.
Exchangeable gene trapping. in
Genetically Engineered Mice (eds
Sundberg. J.P. & Ichiki T.) 2005,
pp.131-143

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計2件)

名称: トラップベクターおよびこれを用いた
遺伝子トラップ法

発明者: 山村研一、荒木喜美

権利者: 株式会社トランスジェニック

種類: 特許

番号: EP1201759

取得年月日: 平成22年3月10日

名称: トラップベクターおよびこれを用いた
遺伝子トラップ法

発明者: 山村研一、荒木喜美

権利者: 株式会社トランスジェニック

種類: 特許

番号: US7312075

取得年月日: 平成19年12月25日

国内外の別: 国外(米国)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学生命資源研究支援センター

<http://www.irda.kumamoto-u.ac.jp/>

東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源
センターから供給可能な細胞株

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/ccr/>

日本で維持されている可移植性腫瘍株一
覧表

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/ccr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 研一 (YAMAMURA KENICHI)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
教授

研究者番号: 90115197

(2) 研究分担者

山田 源 (YAMADA GEN)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号: 80174712

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・

准教授

研究者番号: 90211705

伊藤 豊志雄 (ITO TOSHIO)

財団法人実験動物中央研究所・動物医学研
究室・室長

研究者番号: 20106644

加藤 秀樹 (KATOH HIDEKI)

浜松医科大学・動物実験施設・准教授

研究者番号: 30142053

中潟 直己 (NAKAGATA NAOMI)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
教授

研究者番号: 30159058

中尾 和貴 (NAKO KAZUKI)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科
学総合研究センター・動物資源開発室・動
物実験支援ユニット・ユニットリーダー

研究者番号: 20217657

小幡 裕一 (OBATA YUICHI)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソ
スセンター・センター長

研究者番号: 30177290

山崎 由紀子 (YAMAZAKI YUKIKO)

国立遺伝学研究所・准教授

研究者番号: 00239956

松居 靖久 (MATSUI YASUHISA)

東北大学・加齢医学研究所・

医用細胞資源センター・教授

研究者番号: 40241575

鰐淵 英機 (WANIBUCHI HIDEKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90220970

深町 博史 (FUKAMACHI HIROSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・講師

研究者番号: 70134450

三森 国敏 (MITSUMORI KUNITOSHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 10239296

牛島俊和 (USHIJIMA TOSHIKAZU)

国立がんセンター(研究所及び東病院臨床
開発センター)・発がん研究部・部長

研究者番号: 90232818

小川 勝洋 (OGAWA KATSUHIRO)

旭川医科大学・病理学講座腫瘍病理分野・
名誉教授

研究者番号: 50045514

立松正衛 (TATEMATSU MASAE)

愛知がんセンター研究所・腫瘍病理部・副
所長

研究者番号: 70117836

(3) 連携研究者

なし