

## Doing Good Science: Authenticating Cell Line Identity

### より良いサイエンスのために：細胞株の同一性認証

By Jill Harley Dunham<sup>1</sup>, Pam Guthmiller<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Ph.D. Candidate Department of Pharmacology Emory University, Atlanta, GA, <sup>2</sup>Promega Corporation

原文(英語)は [http://www.w.w.promega.com/pnotes/101/17252\\_15/17252\\_15.pdf](http://www.w.w.promega.com/pnotes/101/17252_15/17252_15.pdf) 参照

#### イントロダクション

既に発表された研究結果が再現可能であることは、科学研究において発見を確認・裏付けする上で重要です。もしデータが再現できなければ、研究者はその研究の継続について疑問が生じることになります。多くの生物医学研究では、American Type Culture Collection (ATCC) のような保存機関あるいは共同研究者から入手した培養細胞が使われています。そのうち推定15-20%で、実験に用いた細胞株の誤同定や他の細胞株とクロスコンタミネーションが起きていると考えられています(1-3)。認証試験の結果、ATCC、Coriell Institute for Medical Research、European Collection of Cell Cultures (ECACC)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)、Japanese Collection of Research Resources (JCRB) は全て、寄託者が誤同定した細胞株を受け入れていることが確認されました(4,5)。それに加え、幹細胞株の場合は、幹細胞の増殖に必要なフィーダー細胞層を構成しているマウス細胞とのコンタミネーションが起きます。コンタミネーションや誤同定は、明らかにこれらの細胞を使用して出された学術論文の質や、研究結果の正当性に対して非常に大きな脅威をもたらす可能性があります。このような理由から、現在では多くの保存機関が寄託された細胞株認証を行い、クロスコンタミネーションがないかどうかをモニターしています。

#### この問題の歴史的背景

最初のヒト由来のガン細胞株HeLaは1952年に開発され、それからの15年間、異なる組織に由来するさらに多くのヒト細胞株が開発されました(6)。1968年には、研究者によって多くの培養細胞がもともとの由来組織の性質とは一致しない特性を示すことが明らかになりました。これが、細胞の培養方法によって細胞に予期せぬ変化が起こりうるという最初の証明となりました。技術の進歩によってクロスコンタミネーションは減少したものの、どの細胞が既に影響を受けているかを診断することのできる試験法はほとんどありませんでした。しかしそれ以来、短時間でできて安価な標準化法の開発が進みました。このような進歩によって多くの細胞クロスコンタミネーションが排除されるようになりましたが、それでもクロスコンタミネーションは大きな問題でありつづけてきました。ATCCや他の類似の保存機関は、現在、クロスコンタミネーションをモニターし、配布する全ての細胞株の認証を行っています。しかし、個々の研究者の大部分は、これらの機関が行うような細部にわたる認証作業を行うことはありません。実際、2004年にカリフォルニア大学バークレー校のGertrude Buehringとその共同研究者が約500人の生物学者を調べたところ、ショートタンデムリピート(STR)解析によるDNAフィンガープリンティングのような標準化技術を用いて自らの使っている細胞株を定期的に確認しているのは、全ての研究者の半分以上に過ぎませんでした(6)。全ての細胞株の認証を求めなければ、誤同定は深刻な問題であり続けることが予想されます。



すべてはうまくいっていた。HeLa細胞株から発現したY染色体マーカーに気づくまでは...

その他のバイオ実験マンガ (Tech Toon) については [www.promega.com/pnotes/techtoons/](http://www.promega.com/pnotes/techtoons/) をチェックしてください。

## 認証による時間と費用の節約

矛盾のあるデータや疑わしいデータはもとより、クロスコンタミネーションも時間とお金を無駄にしてしまいます。例えば、イスラエルのガン研究者であるMordechai Liscovitchの場合、関連していると考えていた2つの乳ガン細胞株(MCF-7とMCF-7/AdrR、現在はNCI/ADR-RESと再命名)についての研究に3年を費やしました。しかし後になって、これらの細胞株には関連がないことが判明しました。一部の研究者はすでに1998年にこれらの細胞株の誤同定を疑っていましたが、これらの細胞株の実際の実験は最近まで確定しませんでした(4,7)。NCI/ADR-RESはもともと考えられていた乳ガン細胞株MCF-7に由来するものではなく、むしろ卵巣ガン細胞株OVCAR-8に近いものでした(7)。これらの3つの細胞株は全て、薬剤スクリーニングに日常的に用いられるNCI-60細胞パネルの一部です(4)。

Liscovitch研究室は誤った細胞株同定に基づく間違った結論を含む論文の発表をキャンセルしました。しかしながら、誤同定した細胞株に基づく結論を含む数多くの研究が学術雑誌に発表されています。南カリフォルニア大学ロサンゼルス小児病院小児医療研究所のCharles Patrick Reynoldsは、これまでに発表されている細胞生物学の論文のうち35-40%のデータが妥当性を欠いており撤回が必要だろうと推定しています。この推定から、アメリカカトリック大学のRoland Nardoneは、アメリカ国立衛生研究所(NIH)やアメリカ癌学会といった主要機関からの助成金を受ける条件として、また細胞培養ベースの研究を代表的なジャーナルに発表する際の条件として、細胞株の認証を要求すべきだとしています。彼はまた、技術者や研究者に、クロスコンタミネーションの防止・検出に関する教育をするよう要求しています。彼らは専門学会で以上のようなポリシー提案に賛同を得るべく働きかけをしており、基準が採択されるよう学術会議やワークショップを開いています。このような変化が科学研究においては不可欠だという信条を持って、Nardone博士は“細胞株の誤同定とクロスコンタミネーションの蔓延による混乱と浪費を憂う特別研究者グループ”によってスタートした“細胞株認証の世界的な認知月間”[2008年5月]に共同参加しました。

ATCC(7)やFDAといった機関もクロスコンタミネーションの問題を認識しています。これらの機関は、薬剤の生産に使用する細胞株など作業過程で用いる物質の同一性と純度を調べるべきだと考えています(8)。同様に、最近になってNatureは新しいヒト胚幹細胞(ES細胞)株についてのみ、論文報告にSTRフィンガープリンティングのデータを要求しました(4)。学術雑誌や助成機関も細胞株の誤同定という問題を認識していますが、それに取り組むにはどうするのが一番良いのか把握していません。著者はどの時点で、例えば論文審査の前後どちらで細胞株を同定・認証すれば良いのでしょうか？著者が断定した細胞株について、それを確かめる根拠はどこから来るのでしょうか？

時間とお金が無駄であることに加えて、誤同定した細胞株を用いれば、一貫性あるいは再現性のない発見、学術雑誌での論文撤回、健康への潜在的な影響なども起こりえます。薬剤やワクチン、その他のバイオ医薬は、研究室における発見、しかも多くは細胞培養を用いた発見に基づいて創られています。誤解されやすいデータや誤ったデータに基づいて作られた製品は、製品の生産や様々な疾病治療への応用が遅れる主な原因となります。治療の開発に時間がかかれば、それだけ多くの人がそれらの病気に侵されることになるのです。

## 簡便かつ迅速な細胞株同定を実現するSTRベース法

これらの全ての問題は、安価で現在の標準法である細胞株認証方法を用いれば防ぐことができますが、同定のためにはその手順を踏まなくてはなりません。DSMZ(ドイツ細胞バンク)のRoderick MacLeodとその共同研究者は、約90%の科学者が、新しい細胞株についての細胞バンクの要求を無視あるいは拒否しており、将来的な細胞株確定をめざした細胞株DNAフィンガープリンティング法定着を妨げていることを明らかにしました(5,7)。同種間・異種間のクロスコンタミネーションを検出する方法と、なぜそれが重要なのかということを経験者に教育することが必要です。細胞培養におけるクロスコンタミネーションの同定には、アイソザイム解析、染色体分析、ヒトリンパ球抗原(HLA)分析、増幅断片長多型(AFLP)解析といった多くの方法が用いられています。しかしながらより優れているのはSTRプロファイリングで、DNAに基づいた犯罪科学捜査において確立された方法です。ATCCでは多重(マルチプレックス)PCR(プロメガPowerPlex® 1.2 System)を用いてSTR解析を行い、8つのSTRローカスに加え性別決定のためのAmelogeninを同時に増幅しています(9,10)。解析したそれぞれのヒト細胞株について特異的な反復DNAのパターンが得られ、これを標準プロファイルと比較することで、新しいストックそれぞれのプロファイルが確認できます。ATCCでは既に、女性由来の細胞株においてY染色体特異的な増幅産物があることが分かり、6つの細胞株がそれ以上広がることを防ぎました。研究コミュニティでは、STRプロファイリングが世界的な基準技術となり、細胞株のコンタミネーションを検出・排除されることを希望しています。

## StemElite™ IDとCell ID™ SystemによるSTRベースの細胞株認証

プロメガは、犯罪科学捜査および父子確定検査を行うときに用いるSTRプロファイリングシステムの供給をリードしており、PowerPlex® 1.2 STR解析システムは、細胞培養施設においても細胞株認証の最も信頼されるツールとなっています。StemElite™ ID SystemとCell ID™ Systemを使えば、より簡単に細胞株の認証を行うことができます。これらの改良システムには、簡便にヒト細胞株を同定・認証すると同時に、同種間での細胞株クロスコンタミネーションを検出するために必要な試薬が含まれています。

## より良いサイエンスのために：細胞株の同一性認証

Cell ID™ Systemでは、ヒトゲノムにおける特異的な高多型ローカスをSTR解析し、10種類のローカスを同時に増幅して3色で検出します(図1、パネルA：9のSTRローカスと性別同定のためのAmelogenin；D21S11, TH01, TPOX, vWA, Amelogenin, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818を含む)。これら一連のローカス情報が遺伝子プロファイルとして提供され、ランダムに一致する確率は $2.92 \times 10^9$ 分の1にもなります。

StemElite™ ID Systemを使うと、10種類のヒト遺伝子ローカス(図1、パネルB：1つのマウス遺伝子ローカス、9のSTRローカス、性別同定のためのAmelogenin；D21S11, TH01, TPOX, vWA, Amelogenin, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818を含む)を同時に増幅し、3色で検出することができます。これらのローカスの情報を総合すると遺伝子プロファイルが得られ、ランダムに一致する確率は $2.92 \times 10^9$ 分の1です。同時に、マウスのプライマーが含まれているので、ヒト細胞株にマウスが1%でもコンタミネーションしていれば検出することができます。これらのシステムにはホットスタートTaq DNAポリメラーゼが含まれているので、室温での反応液セットアップに便利です。増幅後、サンプルは各ローカスのアレルサイズを決めるためのスタンダードと合わせ、キャピラリー電気泳動に1回注入するだけです。図2では、Cell ID™ Systemを使って細胞株のコンタミネーションを検出しています。遺伝子プロファイルはallele-callingソフトウェアを用いて決定しました。

研究者は自身の研究室で細胞株識別を行えない場合でも、多くの場合、機器類(キャピラリー電気泳動など)やソフトウェアを備え、細胞株プロファイリングの経験を持つ研究所コア施設やサービス会社を利用することができます。文献に見られる一般的な推奨では、細胞株の同一性を確定するために、初期継代(培養の第一週)で認証を行うことが提案されています。細胞は凍結前にもう一度検査し、細胞が活発に成長している期間は2ヶ月に1回、そして論文発表前にもう1度確認すべきです。研究室で2種類以上の細胞株を用いている場合は、すべての細胞株を最初に検査し、クロスコンタミネーションを排除すべきです。

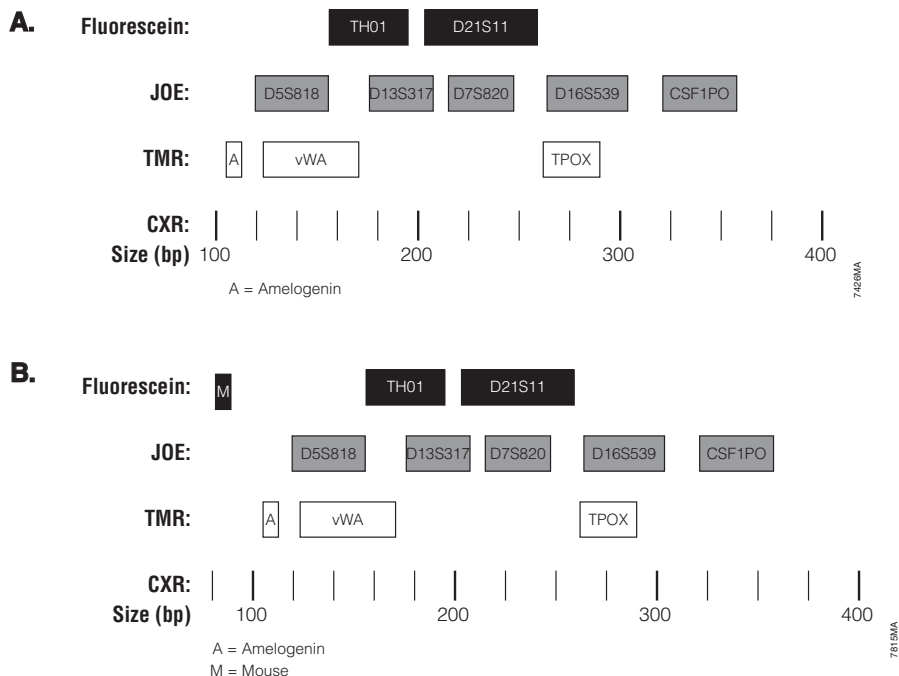


図1. StemElite™ IDおよびCell ID™ Systemsのアレル範囲

パネルA. Cell ID™ Systemで増幅したSTRフラグメント。パネルB. StemElite™ ID Systemで増幅したフラグメント。どちらのシステムにおいてもフラグメントは異なる色素で標識されており、キャピラリー電気泳動でサイズ別に分離。各サンプルにはフラグメントのサイズを決定するためのサイズスタンダードが含まれる。フルオレセインで標識したローカスは黒色で示す。JOEで標識したローカスは灰色、TMRで標識したローカスは白色で示す。CXRで標識したInternal Lane Standard 600フラグメントは黒色バーで表示した。

## まとめ

生物学における研究およびテクノロジーにとって細胞培養は重要なものであり、細胞株認証を適切に実施することは全ての研究者に広く利益をもたらします。しかし、クロスコンタミネーションは問題であり続けています。新しい細胞株が増加し、世界中の研究室において高頻度で細胞培養が利用されるようになったことで、品質管理(すなわち細胞株の認証)の基本原則に深刻なギャップが生じています。誤同定された細胞株の使用やその結果得られた疑わしいデータに基づき発表された研究論文から、臨床目的の幹細胞株やその他の細胞株に至るまで、クロスコンタミネーションは実験室の実験台から病院までの全ての領域における科学に影響を与えているのです。細胞培養の操作と取り扱いを大きく変えなければ、問題はさらに大きく深刻になると考えられます。

細胞株の認証テストに関する試薬および受託サービスについては以下をご覧ください。

<http://www.promega.co.jp/cellidentification/>

## 参考文献

1. Drexler, H.G., Dirks, W.G. and MacLeod, R.A.F. (1999) *Leukemia* **13**, 1601–7.
2. Drexler, H.G. *et al.* (2001) *Blood* **98**, 3495–6.
3. Cabrera, C.M. *et al.* (2006) *Cytotechnology* **51**, 45–50.
4. Chatterjee, R. (2007) *Science* **315**, 928–31.
5. MacLeod, R.A.F. *et al.* (1999) *Int. J. Cancer* **83**, 555–63.
6. Buehring, G.C., Eby, E.A. and Eby, M.J. (2004) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **40**, 211–5.
7. Liscovitch, M. and Ravid, D. (2007) *Cancer Lett.* **245**, 350–2.
8. FDA. General Requirements for Laboratory Controls. 21 CFR 211.160 and 21 CFR 610.18.
9. ATCC *Connection Newsletter* (2000) **21**, 1–2.
10. Masters, J.R. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8012–7.

## プロトコル

- ◆ *Cell ID™ System Technical Manual #TM074*, Promega Corporation  
[www.promega.com/tbs/tm074/tm074.html](http://www.promega.com/tbs/tm074/tm074.html)
- ◆ *StemElite™ ID System Technical Manual #TM307*, Promega Corporation  
[www.promega.com/tbs/tm307/tm307.html](http://www.promega.com/tbs/tm307/tm307.html)

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Cell ID™ System	50 反応分	G9500	150,000
StemElite™ ID System	50 反応分	G9530	160,000

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

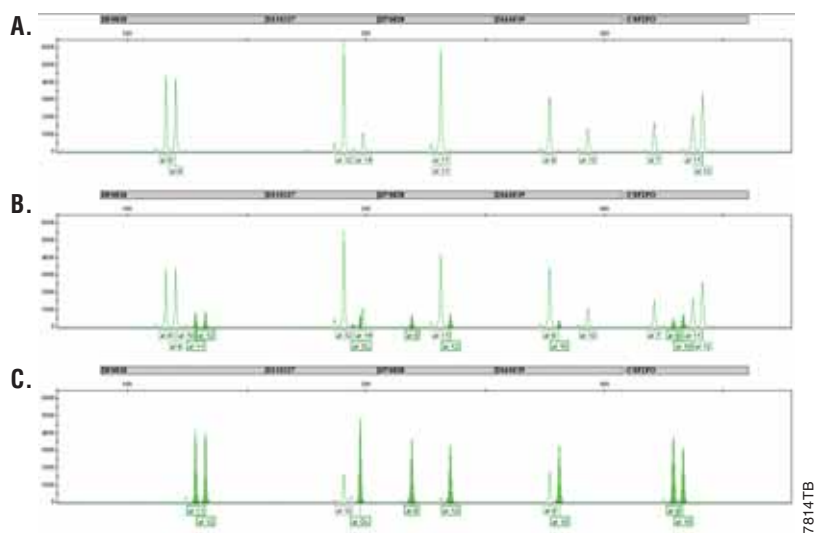


図2. Cell ID™ Systemによる細胞株コンタミネーションの判定

パネルA. HEK293細胞株のSTRプロファイル。パネルB. HeLa細胞株が29%コンタミネーションしたHEK293細胞株のSTRプロファイル。パネルC. HeLa細胞株のSTRプロファイル。DNAはMaxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kitを用いて10<sup>6</sup>細胞から抽出し、Cell ID™ Systemで増幅した。増幅産物はキャピラリー電気泳動装置で検出した。便宜上、ここではJOEで標識したアレルプロファイルのみを表示した。