

不死化 DMD 細胞、供与されても気を付けろ！

瀬尾めぐみ^{#1} 牧(黒田)由紀子^{#1} 住友日香^{#1} 大島玲子^{#1} 三ツ井貴夫^{#1}

#1 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地 1354 番地

受付 2024.3.7 受理 2024.3.8 出版受託 2024.3.11

要旨

生命科学研究や医療の進歩には人の細胞を用いる研究が不可欠である。このような時代の要請に応えるため、ヨーロッパの一部の国ではヒトの疾患筋細胞バンクが設立されている。

私は、Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) の研究を進める中で、DMD モデル培養細胞の樹立を計画した。当初は横紋筋肉腫由来の細胞株 (RD) においてゲノム編集による Dystrophin 遺伝子ノックアウトを業者に依頼し、樹立を試みるも成功には至らなかった。そのため、A 施設に依頼し、DMD 患者生検筋より樹立した不死化 DMD および健常コントロール細胞の供与を受けた。この手続きには時間と労力を要したが、細胞を入手してからが問題であった。

キーワード： Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD)、ゲノム編集

不死化細胞の供与に至った経緯

まず、横紋筋肉腫由来の細胞株 (RD) の Dystrophin 遺伝子ノックアウトを計画し、遺伝子編集のための vector 作製を S 業者に選定した。書類作成や相手施設の審査に半年以上を費やし、ようやくスタートさせることができ、1 年後にやっとベクターが到着した。到着後、すぐに培養を始めたが、思うような結果が得られず、試行錯誤の上、KO 細胞株は結局樹立できなかった。この業者に少なくない費用を支払ったが、成功の保証はしないと最初から契約書類に書かれていたため、泣く泣く樹立を断念した。そこで、DMD 患者骨格筋の初代培養細胞を使えないかと考え、不死化細胞の供与先 (細胞バンク) を探すことになった。

供与をうけるまでの流れ

- ①BANK 探し (国内、海外)
- ②ヨーロッパの A 施設を選定し、供与依頼メールを送る。
- ③先方の指示に従い必要書類を作成し、研究内容を当院の倫理委員会に諮る。
- ④倫理委員会の承認を得て書類を A 施設へ送付。
- ⑤半年ほど連絡なし。
- ⑥ようやく供与が認められ細胞が配送され

た。
⑦届いた細胞をみて安堵したが、後で届いた大変高額な輸送費の請求書を見てびっくりした。

方法

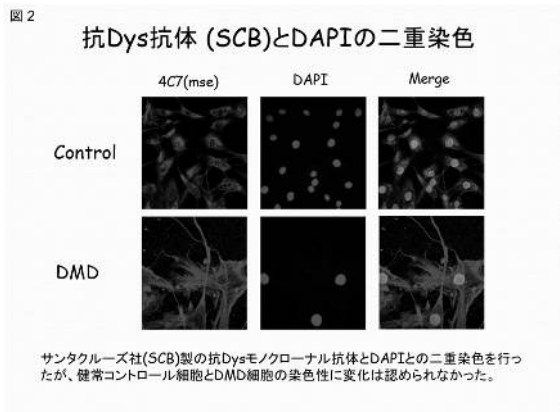
供与を受けた不死化 DMD 細胞および健常コントロール細胞を推奨された培地で起こし、培養を行った。6 種類の抗ジストロフィン抗体 (4C7 (SCB), PA5-89628 (Thermo), 自家製 Dys 抗体 (460-489), NOVOCASTRA Dys1, 2, 3) と DAPI との 2 重染色を行った。(図 1)



Correspondence to: 瀬尾 めぐみ, 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地 Phone: +81-88-324-2161 Fax: +81-88-324-8661 e-mail: seo.megumi.ey@mail.hosp.go.jp

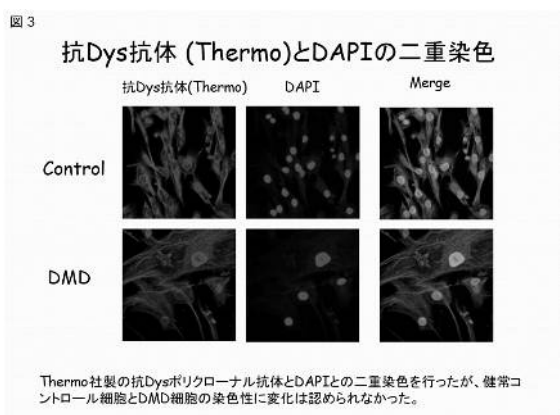
結果

① 抗 Dys 抗体 (SCB) と DAPI の二重染色 (図 2)



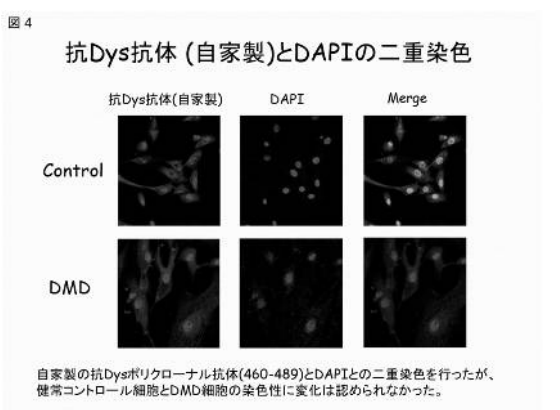
サンタクルーズ社 (SCB) 製の抗 Dys モノクローナル抗体と DAPI との二重染色を行ったが、健常コントロール細胞と DMD 細胞の染色性に変化は認められなかった。¹⁾

② 抗 Dys 抗体 (Thermo) と DAPI の二重染色 (図 3)



Thermo 社製の抗 Dys ポリクローナル抗体と DAPI との二重染色を行ったが、健常コントロール細胞と DMD 細胞の染色性に変化は認められなかった。

③ 抗 Dys 抗体 (自家製) と DAPI の二重染色 (図 4)



自家製の抗 Dys ポリクローナル抗体 (460-489) と DAPI との二重染色を行ったが、健常コントロール細胞と DMD 細胞の染色性に変化は認められなかった。

まとめ

- ① 健常コントロール細胞は、抗ジストロフィン抗体で細胞質が染色された。
- ② DMD 細胞は 6 種類の抗体に対してコントロールと同様に染色された。
- ③ 供与先に問い合わせしてみたが、こちらの手技を疑われただけで、改善策は見つけれなかった。
- ④ 細胞 BANK から入手した細胞であっても、うまくいかないこともあることを経験した。最近、B 施設から供与をうけた。今後はその不死化細胞を用いて研究を進める予定である。

考察

- ① そもそも、専門業者に発注し、購入した試料の品質には何の疑いも持たないことが普通である。しかし、我々が入手した蛋白は本来のものとは全く別物であったことが判明するのに、何と 3 年以上かかってしまった。
- ② 専門を自称する委託業者を安易に信用してはならぬという痛恨の教訓を得た。

引用文献

- 1) Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, et al Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet, 2006;15: 883-895.