条件的不死化細胞の創薬研究への応用

特集 細胞治療と DDS

東 佐 由 美*

Possible use of conditionally immortalized tissue cell lines for drug discovery

Now that the human genome project has been completed, the rationale of genome-oriented development of medicine has been stressed. Conditionally immortalized cell lines could play an important role in "post-genome" projects, as they are applicable to high throughput screening system, which enables the prompt and massive screening of lead compounds and their optimization. In this regard, clonal cells, derived from temperature-sensitive simian virus 40 large tumor antigen gene transgenic mice, are interesting. They grew at the permissive temperature (33°C), but their growth was arrested at the non-permissive temperature (39°C). Therefore, first, under the permissive condition, we could establish cell lines, which had been impossible to establish because of their character and the small quantity. Second, through a simple method like a temperature shift from 33°C to 39°C, we can also analyze gene expression profiles and their functions during the cell maturation. Finally, clonal cells derived from a T-antigen transgenic mouse, after being genetically crossed with a mutant mouse, would be utilized as the tools to examine the targeted gene function. Actually, by using vitamin D receptor gene-disrupted mice as mutants, we have established clonal bone marrow stromal cell lines and have clearly shown that 1,25(OH)₂D₃ suppresses differentiation of stromal cells into adipocytes in a VDR-dependent manner.

ヒトゲノムプロジェクトが完遂し、ゲノム創薬がクローズアップされている。条件的不死化細胞は、いわゆる“ポストゲノム”の時代において、ハイスループットスクリーニングなどにより、迅速に大量の化合物をスクリーニングする際のツールとしてもきわめて有用であり、創薬のシーズ探索のツールとして大きな貢献が期待される。

条件的不死化細胞株化のための手法の一つとして、温度感受性 SV 40 T 遺伝子を導入した動物を用いる方法がある。本手法により樹立された細胞株は、培養温度が 33°C の条件では増殖するが、39°C にシフトさせると増殖を停止し分化するという特性を持つ。したがって本手法においては、第一に、これまで株化が困難であった組織や、微量にしか採取できない細胞の、許容培養温度条件下での増殖が可能となり、より広範な種類の細胞の株化が期待される。第二に、培養温度をコントロールするだけで細胞分化を誘導できることから、分化に伴って発現する遺伝子プロファイルを調べたり、その機能解析などへの応用も可能である。また、さらに、特定の遺伝子を欠損した動物と交配して得られた動物から同様に細胞株が樹立できれば、欠損遺伝子の生理機能の解析手段となりうる。実際、ビタミン D 受容体 (VDR) が欠損した細胞株を作出し、1,25(OH)₂D₃ は、VDR 依存性に骨髄間質細胞の脂肪細胞への分化を抑制していることを明らかにすることができた。

今後、本手法が創薬をはじめ医薬品開発に活用されることを期待したい。

Sayumi Higashi*

key words : conditionally immortalized cell lines, drug discovery, SV40T, vitamin D receptor, 1,25(OH)₂D₃

医薬品の研究開発の手法は、科学技術の進歩に伴い革新的な変化を遂げつつある。

医薬品開発の創生期には、ある特定の疾患やその周辺領域で経験と知識を蓄積した研究者による“勘”と偶然性によって、膨大な化合物群から医薬品のシーズが探索されていた。疾病の原因や病態などに

精通した研究者は、帰納的に最も適すると考えられるスクリーニング系を選択し、化合物を絞り込んでいったのである(図 1)。多種多様の化合物のスクリーニング優先度設定はもちろんのこと、既存薬がまったく存在しない場合には、スクリーニング系の選択の妥当性そのものさえ研究者に委ねられていたわけであり、医薬品の開発は多くの資源、労力、時間を要するものでありながら、研究者の職人技に頼

* Product Research Department, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd
中外製薬株式会社製品育成研究部

図1 創薬アプローチの変化
臨床開発品を見いだすまでの従来法とゲノム創薬の対比

る部分が大であったことは否定できない。

その後、分子生物学とバイオテクノロジーの発展は、生体由来の微量生理活性物質を医薬品にすることを可能にし、インターフェロンやエリスロポエチン顆粒球刺激因子(G-CSF)が誕生した。また、遺伝子治療など遺伝子レベルでの疾病治療のアプローチが図られ、ついには、2000年6月に米国、日本、欧州を巻き込んだヒトゲノム・プロジェクトにより、ヒトの全遺伝子の塩基配列(ヒトゲノム)の解読が完了した。いま、時代は、ゲノム情報に基づく創薬、“ゲノム創薬”の時代にいたったといっても過言ではない。

ゲノム創薬については、成書^{1,2)}に詳しいが、ゲノム情報に基づいて、病気や病態に効果を示す新しい医薬品を論理的に研究開発しようとする取り組みのことである。つまり、疾患に強く関与することが想定される遺伝子は、DNAチップやバイオインフォマティクスなどを活用することによって特定することができるので、どの遺伝子が発症のメカニズムに関与するか、あるいは疾患の原因であるかの検討が可能となった。そして、疾患の原因になっている遺伝子、あるいは変異遺伝子を明らかにして正常遺伝

子を制御することにより治療可能性を追求していく、という論理的かつ合理的なアプローチが可能になった。

さらに、実際に候補物質を見だし創薬につなげるために、化合物の合成とスクリーニングを行う段階でも、現在では、著しい効率化が図られている。つまり、コンビナトリアルケミストリによる多種多様な化合物の短時間での合成や、それらをハイスループット法(HTP)にて自動的にスクリーニングするという、新しい手法の導入である。これらは、かつて多くの労力と時間を要したリード化合物探索と最適化のためのステップに要する時間の短縮に大きく寄与している(図1)。このように、ゲノム創薬の理想形においては、疾患のメカニズムを明らかにしたあとに、つぎに新薬の候補物質を探索していくという段階的なアプローチにより、新薬となりうる候補品を見つける効率と確率を飛躍的に向上させることが期待されるのである。

しかしながら、研究者の知識や経験がゲノム創薬に生かされることが最も望ましい形であることはいうまでもない。ここで留意すべき点は、創薬のためのアプローチ法は進歩しても、基本となる実験方法

や材料、そして病態モデルの確立がその構築に必須要件となることである。まさに、“不死化細胞”は今後も薬効薬理解析のツールでありつづけるのみならず、HTPなどのスクリーニング系における実験ツールとして重要な位置付けにある。

そこで、本稿では、まず、条件的不死化細胞の創薬における有用性について考察したあと、一例として、SV 40 T トランスジェニックマウスを使った条件的不死化細胞と、さらに、ビタミンD受容体(VDR)が欠損した不死化細胞を構築し、これらを用いてビタミンDが分化に及ぼす影響についてVDRが果たす役割について検討した結果を紹介する。

条件的不死化細胞の創薬における有用性

生体由来初代培養細胞のほか、株化された細胞株を用い、試験管内(*in vitro*)で維持成長させる方法(組織培養法)は、生体機能学的、細胞生物学的、生化学的あるいは分子生物学的など、あらゆる解析手段を駆使して迅速かつ詳細に生体細胞機能を分析する際の手段としてきわめて有効であることは周知である。また、近年、生体機能、組織、細胞さらには分子レベルの研究法の開発と進歩により、動物実験を代替する実験系としても注目されている。

組織培養法については、しかしながら、考慮すべき問題点がいくつかある。まず、初代培養細胞そのものが、大量に細胞を集める手間や再現性などの問題点を有することである。一方、初代培養細胞を株化することはこれらのデメリットを解消するうえで有用であり、各種組織由来の均一な細胞を得ることができ、さらに機能や性質の解析が容易になるものの、やはり問題点を含む。つまり、増殖が活発で株化しやすい細胞は未成熟で、そもそも細胞機能を発現しておらず、一方、生体内各組織の分化した細胞は増殖能が低く株化が難しいからである。さらに、株化の過程で増殖能を獲得した細胞のほとんどは、細胞の形態性状や分化機能を失っており、細胞の機能や性質の検討には使用できないのが通常である。

以上のことから、細胞機能の安定的な発現が維持され、また、細胞の増殖性が保持された、不死化細胞株を樹立することができれば、*in vitro*における

図2 細胞周期

細胞周期は、DNA合成期(S期:synthesis phase)および細胞分裂期(M期:mytosis phase)と、S期とM期の間で、S期の前のG1期(gap 1 phase)とM期の前のG2期からなる。正常細胞が分化成熟するときには、細胞は増殖を止めG1期から脱し休止期(G0)に移行する。

生理活性の解析や創薬のスクリーニング細胞として非常に有用である。さらに、毒性試験への応用も可能となり実験動物の代替法として、その利用価値はきわめて大きいものと期待される。

1. 細胞増殖と不死化

細胞は、細胞周期を1回転することによって1細胞が2細胞に分裂する。細胞周期は、図2に示すように、DNA合成期(S期:synthesis phase)、細胞分裂期(M期:mytosis phase)と、S期とM期の間で、S期の前のG1期(gap 1 phase)とM期の前のG2期からなる。正常細胞が分化成熟するときには、細胞は増殖を止めG1期から脱し休止期(G0)に移行するが、永続的に増殖を継続する癌細胞には存在せず、細胞は分裂を止めない。

正常細胞の寿命は有限であり、細胞の増殖・分化、そして死の過程は細胞自身にプログラムされたスケジュールに従って進行し、一定回数の細胞分裂を経ると“老化”状態になり、分裂を停止する。初代培養細胞がやがて死滅するのはこのためである。一方、癌細胞では、癌遺伝子や癌抑制遺伝子をコードする蛋白質の発現が確認されており、これらの分子が細胞周期を制御して細胞が増えつづけ、“腫瘍”という病態を引き起こすとされている。ところが、現在、これらの遺伝子は、正常細胞でも細胞周期を調節する分子として作用していることが明らかになってき

た。つまり、癌遺伝子は細胞増殖をいわばスイッチ“ON”の状態に維持する役目を果たし、癌抑制遺伝子は“OFF”することによって、細胞周期を調節する役割を果たしているのととえることができるのである。

増殖を“ON”に維持する働きをする遺伝子には、発癌遺伝子(c-myc, ras など)のほか、アデノウイルス、SV 40 ウイルスなどの DNA 型腫瘍ウイルスの癌遺伝子またはその腫瘍抗原遺伝子がある。これらの遺伝子を導入して形質転換を起こすと、細胞は不死化して継代が可能にできることが知られている。

たとえば、SV 40 ウイルスが感染すると細胞は限界を超えて増殖する。これは、SV 40 の持つ T 抗原(または、T 抗原蛋白)をコードする遺伝子によって引き起こされることが明らかにされている。T 抗原は、1979 年に T 抗原特異的に結合する蛋白として発見された、p 53 という核蛋白質に結合して p 53 の機能を阻害する³⁾。p 53 は cdk (cyclin dependent kinases)の阻害物質、p 21/Waf/Cip の発現を誘導し細胞周期を停止させる作用を持つ⁴⁾。すなわち、SV 40 の T 抗原は細胞増殖抑制性に作用する p 53 の作用をブロックすることによって細胞増殖を維持させるのである。

東北大学加齢医学研究所の帯刀らは、組織非特異的にすべての体細胞に温度感受性 SV 40 T 抗原遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、種々の細胞株樹立のための材料としての有用性を指摘している⁵⁾。本トランスジェニックマウスは、その全身に SV 40 T 抗原遺伝子が発現しており、原理的には、すべての組織や臓器由来の細胞が不死化できる可能性がある点で非常に興味深い。実際に、温度感受性の SV 40 T 抗原を発現している、本マウスの腎⁶⁻⁸⁾、肝⁹⁾、肺¹⁰⁾、脳¹¹⁾、軟骨¹²⁾、あるいは骨髓由来の細胞¹³⁻¹⁶⁾から細胞株を樹立した報告がある。これらは、33°Cでは高い増殖能を示す一方、39°Cでは T 抗原は失活・分解されるため細胞は増殖を停止しその分化機能を発現する。これは、本マウスを用い、33°Cで培養すれば、通常はほとんど増殖しない細胞でさえも株化の可能性があるうえ、永久的な増殖能を保持した細胞が比較的短期間(2~3 カ月間)に樹立でき、さらに、培養温度を 39°Cにシフトさせ

ることにより増殖を停止させ分化を誘導することも可能であることを示している。つまり、本細胞株は、一定の性状を示すことが必須であるスクリーニング系への応用のみならず、培養温度を調節することによって細胞固有の分化形質の発現を制御も可能なことから、分化に伴う遺伝子発現やそのプロファイルの解析にも活用が可能と考えられる¹⁷⁾。

2. 条件的不死化細胞を用いた検討例

本邦において、骨粗鬆症、乾癬、慢性腎不全、副甲状腺機能低下症、ビタミン D 抵抗性クル病・骨軟化症などの治療薬として広範に用いられているビタミン D の作用メカニズムや薬理作用の検討に活用する目的で、条件的不死化細胞の樹立とビタミン D の VDR を介する作用の解析を試みた。

ビタミン D は、腸管からのカルシウム吸収、骨での破骨細胞形成や石灰化骨の形成、さらに腎尿管のカルシウム再吸収の調節などを介して、カルシウム代謝の調節に必須の役割を果たしている。さらにビタミン D は多様な細胞において強力な分化誘導作用を発現し、その結果、皮膚細胞の分化への効果を介する乾癬の治療や、リンパ系細胞の増殖・分化への影響を介する免疫機能の調節、あるいは、腫瘍細胞の増殖抑制に基づく抗腫瘍効果を示すことなどが知られている¹⁸⁾。これらのビタミン D の多様な作用は、核内に存在する VDR との結合による標的遺伝子上のビタミン D 応答領域の結合を介して、その転写活性の調節により発現するものと説明されており、VDR 遺伝子ノックアウトマウスでは、骨カルシウム代謝系の異常のほか、脱毛など、VDR 機構異常に基づくビタミン D 依存性Ⅱ型患者と同様の異常が認められる¹⁹⁾。一方で、また、ビタミン D 作用のなかには、遺伝子発現の調節では説明しえない短時間で作用発現がみられるものも存在する²⁰⁾。したがって、ビタミン D の多様な作用の機序を検討するにあたっては、生体(*in vivo*)あるいは組織レベルからの検討に加え、細胞および分子レベルで、核内受容体である VDR と関連付けて分子レベルで解析することが不可欠と考えられる。そこで、VDR を欠損したマウスと、SV 40 T 抗原遺伝子トランスジェニックマウスとを交配させて、種々の分化段階にあ

図 3 温度感受性 SV 40 T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスと VDR 遺伝子ノックアウトマウスとの交配

る間質細胞系の細胞を樹立し、まず、安定した増殖条件下で VDR の生理作用の解析に供した。さらに、VDR が細胞の分化に及ぼす影響を検討することを目的として実験を行った²¹⁾。不死化細胞樹立のための材料として、大腿骨および脛骨から洗い出した骨髓細胞のうち培養皿に付着する細胞で、将来的に、骨、脂肪、筋肉などに分化する間葉系の細胞を用いることとした。

VDR 遺伝子ノックアウトマウスと温度感受性 SV 40 T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスとの交配は図 3 に示すように行った。つまり、雄性 SV 40 T トランスジェニックマウス (SV 40 T +/-) から精子を採取して、雌性 VDR +/- マウスと体外受精させ、VDR と SV 40 T 遺伝子をそれぞれ Southern blot あるいは PCR-Southern 解析で検出し、まず、SV 40 T +/-, VDR +/- マウスを選択してきた。この雄をさらに雌の VDR +/- マウスと再度体外受精させることにより、最終的に目的とする SV 40 T +/-, VDR -/- マウスを得た。対照として SV 40 T +/-, VDR +/+ マウスを使って以下の試験に用いた。

マウスから採取した大腿骨と脛骨からフラッシュアウトして単離した骨髓細胞は、10%ウシ胎児血清

を含む培地 (Iscov's minimum essential medium) に播き込んで 33°C, 95%湿度, 5% CO₂ の条件下培養を開始した。付着した細胞を 20 代以上継代して増殖が安定した時点で limiting dilution 法によって株化した。

まず、その増殖性を検討した。その結果、SV 40 T +/-, VDR +/+ あるいは SV 40 T +/-, VDR -/- の遺伝子型を示すマウスから得られた細胞株は、ともに、33°C では増殖し、コンフルエントに達したあと 39°C に培養温度を移行させると、細胞は増殖を停止し温度感受性 SV 40 T 抗原依存性に細胞増殖が制御されていることが確認された (図 4)。また、これらの細胞株は 33°C で培養しているときは線維芽細胞様の形状を示していたが、骨芽細胞への分化度を検討する目的で、骨芽細胞マーカーであるアルカリ性フォスファターゼ (ALP) 染色を行ったところ、SV 40 T +/-, VDR +/+ マウス由来の 2 株のうち 1 株と、SV 40 T +/-, VDR -/- 由来の 9 細胞株のうち 2 株については ALP 染色陽性であり、継代を繰り返しても ALP 染色性は保持された。以上のことから、SV 40 T 抗原が作用している条件下では、種々の分化段階の株化が可能であり、樹立された細胞は増殖性ととともにその分化形質

図4 SV40T+/-, VDR+/+細胞株とSV40T+/-, VDR-/-細胞株の細胞増殖性の検討
いずれの細胞株も33°Cで培養を開始し、コンフルエントに達した時点で39°Cに培養温度を移行させた。
...□...: 33°C, ●: 39°C

も維持していると考察された。

つぎに、SV40T+/-, VDR+/+マウスとSV40T+/-, VDR-/-マウス由来細胞株を分化させる目的で、33°Cで培養してコンフルエントに達したあと、39°Cに移行させたところ、VDR-/-においてのみ、Oil Red-O染色陽性の脂肪細胞が出現することを見いだした。SV40T+/-, VDR+/+細胞では、Oil Red-O陽性細胞数は検出が可能であった細胞であっても $1,854 \pm 287$ cells/cm²に留まったのに対し、SV40T+/-, VDR-/-細胞では著明な脂肪細胞分化の亢進を認め $7,740 \pm 27$ cells/cm²に達した細胞株も存在した。このとき、ビタミンDのVDRを介した脂肪細胞分化への影響を検討する目的で、温度移行時より1,25(OH)₂D₃を終濃度10⁻⁸ Mとなるように添加したところ、SV40T+/-, VDR+/+細胞ではOil Red-O陽性細胞は、さらに 806 ± 170 cells/cm²へと著しく減少したのに対し、SV40T+/-, VDR-/-細胞では $6,934 \pm 1,437$ cells/cm²とほとんど影響を受けなかった(図5)。以

図5 ビタミンDのVDRを介した脂肪細胞分化抑制作用
いずれの細胞株も33°Cで培養を開始しコンフルエントに達した時点で39°Cに培養温度を移行させた。その際、1,25(OH)₂D₃を10⁻⁸Mとなるように添加し、7日間培養後にOil red-O染色により脂肪細胞数を計測した。

上のことから、ビタミンDがVDRを介して脂肪細胞分化を抑制することが明らかになった。

つまり、トランスジェニックの手法により成功したVDR遺伝子を欠く骨髄間質系の温度感受性株の樹立により、ビタミンDは骨芽細胞、脂肪細胞を含む間葉系細胞分化を調節する重要な生理的因子であることが示唆されたのである。

一方、本細胞株は比較的短時間の刺激による、細胞分化を伴わない細胞応答においても、VDRの関与の検出や解析に有用であり、創薬への応用の可能性があることはいうまでもない。さらに、SV40T抗原を発現し、かつ、VDRが欠損したマウスからは、原理的には、ビタミンDの作用部位である、骨、腸管粘膜、腎尿細管、皮膚、リンパ球などからの不死化細胞株の樹立と解析も可能と考えられ、今後の検討が期待される。

結 語

ヒトゲノムプロジェクトが完遂し、ゲノム創薬がクローズアップされている。条件的不死化細胞は、いわゆる“ポストゲノム”の時代において、ハイスループットスクリーニングなどにより、迅速に大量の化合物をスクリーニングする際のツールとしてもきわめて有用であり、創薬のシーズ探索のツールとして大きな貢献が期待される。

条件的不死化細胞株化のための手法の一つとして、温度感受性 SV 40 T 遺伝子を導入した動物を用いる方法がある。本手法では、これまで株化が困難であった組織や、微量にしか採取できない細胞の許容培養温度条件下での増殖を可能とし、より広範な種類の細胞の株化が期待される点で有用である。さらに、本手法によって樹立された細胞株は、SV 40 T 抗原の許容温度条件下で増殖し、非許容温度条件下では増殖を停止する性質を持つことから、培養温度をコントロールするだけで細胞分化を誘導して、分化に伴って発現する遺伝子プロファイルを調べたり、その機能解析などへの応用も可能である。また、特定の遺伝子を欠損した動物と交配して得られた動物から同様に細胞株が樹立できれば、欠損遺伝子の生理機能の解析手段となりうる。実際、VDR が欠損した細胞株を作出し、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は VDR 依存性に骨髄間質細胞の脂肪細胞への分化を抑制していることを明らかにすることができた。

今後、本手法が創薬をはじめ医薬品開発に活用されることを期待したい。

文 献

- 野口照久・他：ゲノム創薬 創薬のパラダイムシフト。ポストシークエンスのゲノム科学 5。(古谷利夫・増保安彦・辻本豪三・編)、中山書店、東京、2001、p 208.
- 野口照久・他：ゲノム創薬の新潮流。CMC ブックス。(古谷利夫・編)、(株)シーエムシー、東京、2000、p 181.
- 田矢洋一、野田 亮、山本 雅：がん抑制遺伝子、がん遺伝子ハンティング。実験医学バイオサイエンス 4。洋土社、東京、1992、p 80-91.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R et al.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4): 817-825, 1993.
- Yanai N, Satoh T, Kyo S, Abe K, Suzuki M et al.: A tubule cell line established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Jpn J Cancer Res* 82: 1344-1348, 1991.
- Takeuchi K, Yanai N, Takahashi N, Abe T, Tsutsumi E et al.: Different cellular mechanisms of vasopressin receptor V1 and V2 subtype in vasopressin-induced adenosine 3',5'-monophosphate formation in an immortalized renal tubule cell line, TKC 2. *Biochem Biophys Res Commun* 29: 202(2): 680-687, 1994.
- Sekine T, Hosoyamada M, Haga-Mizuno A, Takeda M, Suzuki M et al.: Ammonia production in cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Contrib Nephrol* 110: 98-102, 1994.
- Hosoyamada M, Obinata M, Suzuki M, Endou H: Cis-platin-induced toxicity in immortalized renal cell lines established from transgenic mice harboring temperature sensitive SV 40 large T-antigen gene. *Arch Toxicol* 70(5): 284-292, 1996.
- Yanai N, Suzuki M, Obinata M: Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Exp Cell Res* 197(1): 50-56, 1991.
- Sugiyama N, Tabuchi Y, Numata F, Uchida Y, Horiuchi T et al.: Establishment and characterization of tracheal epithelial cell lines, TM 01 and TM 02-3, from transgenic mice bearing temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Cell Struct Funct* 23(3): 119-127, 1998.
- Hosoya K, Tetsuka K, Nagase K, Tomi M, Saeki S et al.: Conditionally immortalized brain capillary endothelial cell lines established from a transgenic mouse harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *AAPS PharmSci* 2(3): E 27, 2000.
- Kitaoka E, Satomura K, Hayashi E, Yamanouchi K, Tobiume S et al.: Establishment and characterization of chondrocyte cell lines from the costal cartilage of SV 40 large T antigen transgenic mice. *J Cell Biochem* 81(4): 571-582, 2001.
- Hattori K, Muta M, Toi M, Iizasa H, Shinsei M et al.: Establishment of bone marrow-derived endothelial cell lines from ts-SV 40 T-antigen gene transgenic rats. *Pharm Res* 18(1): 9-15, 2001.
- Arakawa E, Hasegawa K, Yanai N, Obinata M, Matsuda Y: A mouse bone marrow stromal cell line, TBR-B, shows inducible expression of smooth muscle-specific genes. *FEBS Lett* 481(2): 193-196, 2000.
- Negishi Y, Kudo A, Obinata A, Kawashima K, Hirano H et al.: Multipotency of a bone marrow stromal cell line, TBR 31-2, established from ts-SV 40 T antigen gene transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 268(2): 450-455, 2000.
- Okuyama R, Yanai N, Obinata M: Differentiation capacity toward mesenchymal cell lineages of bone marrow stromal cells established from temperature-sensitive SV 40 T-antigen gene transgenic mouse. *Exp Cell Res* 218(2): 424-429, 1995.
- Obinata M: Possible applications of conditionally immortalized tissue cell lines with differentiation functions. *Biochem Biophys Res Commun* 286(4): 667-672, 2001.
- Feldman D et al.: Vitamin D. Academic press. (eds. Feldman D, Glorieux FH, Pike JW), San Diego, 1997, p 1285.
- Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K et al.: Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nature Genetics* 16(4): 391-396, 1997.
- Norman AW, Ishizuka S, Okamura WH: Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76(1-5): 49-59, 2001.
- Higashi S, Uchida Y, Saito M, Inoue D, Yanai N et al.: Clonal stromal cell lines established from VDR-deficient, SV 40 T-transgenic mice. *J Bone Miner Res* 15(Suppl): F 505, 2000.