

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

目 次

課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御 機構の解析とその研究資源化に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
研 究 者 林 真

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部	水沢 博
国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部	増井 徹
国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部	田辺 秀之
三菱化学生命科学研究所先端技術開発部門	岩下 新太郎
東京都立大学法学部	石井 美智子

要 旨

研究用のヒト組織・細胞試料の性質を検討し、厚生労働省細胞バンクの運営と、HS 組織バンクの立上げに利用できる情報もあるものと考えている。この試料より単離した増殖抑制活性を持つ新規遺伝子のたんぱく質の局在及び糖鎖修飾を明らかにした。

1. 研究目的

昨年の世界医師会ヘルシンキ宣言（エディンバラ改訂、http://www.wma.net/e/policy/17-c_e.html, 2000）に代表されるように、ヒト資料（試料・モノと情報を含めて資料という）を用いた研究は創薬研究の中で重要な位置をしめている。欧米を中心にヒト資料を利用したゲノム創薬の動きはその激しさを増している。

このような背景の元に、この2年の間、日本政府はヒト資料を用いた研究の指針を集中的に策定している（Table 1）。これらのガイドラインはヒト資料を用いることに由来する「倫理問題」と呼ばれるものに対処することを目的としている。ゲノム研究、クローン技術、再生医療・ヒトES細胞技術など次世代経済の牽引役になると考えられている研究技術分野にとって、ヒト資料の研究利用が不可欠であり、一般市民の理解・協力・提供なくしては研究を進めることができない。ところが、日本では「専門家の内輪の論理」に起因する自浄作用の不足と専門家は社会の認知に無関心であるという一般の認識がある。さらに、ゲノム研究が重要だといいいながら、中学高校の教育課程からDNAや遺伝に関する内容が部分的に削除されるという逆行現象まで行われている。反対に、欧米では過去30年に渡るヒト資料の研究利用の歴史を生かし、且つ、膨大なゲノム研究費の3-5%を倫理、法学、社会学、教育、特に高校生たちへのゲノム・遺伝子教育に支出をし、次世代の担い手を育てようとしているのが現状だ。

このような状況の中で、我々は厚生労働省の細胞バンクとして、日本におけるヒト資料の公的研究資源化についての検討と実践に携わってきた。基本的人権、人間の尊厳、生命倫理という面から倫理問題が重要であるという立場がある。我々はその立場から一步引いて、「Honesty is the best policy.」という立場から、医学生物学研究推進のためには、日本におけるヒト資料の研究利用の倫理問題について根源的に対応する必要があると考え、本事業を推進している。特に科学研究を根元で支える公的研究資源バンクという仕事をしている立場から、「科学的」という言葉のもつ根源的意味に立ち返って倫理問題を捉え、研究者の動機付けの原点を模索する必要があると考える。試料を扱う実務、試料を利用した研究、それらにまつわる倫理問題の検討というそれぞれに離れた部分に足場を求めながら係わっていく重要性は理論的には理解されると思うが、それが実践できる場として、公的研究資源バンクの重要性ははかり知れないと考える。このような公的研究資源バンクとしての立場

を堅持し、今後も日本におけるヒト資料の研究利用への取り組みを続けていく。

整理すると、ヒト試料を用いた研究、公的研究資源化には3つのことが重要である。1) ヒト試料を公的研究資源として用いるための倫理問題の整備、2) ヒト試料の共有形態(公的研究資源化の技術問題)に関する検討、3) その資料を用いた研究。前述したように、それぞれの問題点は補いつつ、且つ、相互に刺激しあいながら本事業の推進に貢献している。今年度は、ガイドラインが多数策定されたため、倫理面での事業が重要となった。われわれがこれまで蓄積してきた倫理問題検討の経験が有効であったと考えている。

本事業の一方の柱である医学生物学研究に関しては、生体に近い正常ヒト上皮細胞の初代 outgrowth 培養系を用いて創傷治癒研究システムを開発した。創傷治癒機構の解析はヒト組織の成り立ちを研究することであり、生物学、医学、再生医学の領域で重要な基礎研究である。われわれはこれまでに増殖促進機構と独立した増殖停止機構の存在を明らかにした。現在、創傷治癒機構の中心に位置する増殖停止のメカニズムについて研究を進めている。この研究の成果は生体内で重要な細胞同士の協調的増殖調節、特に増殖から増殖停止へのスイッチ機構への関与が期待される増殖停止関連遺伝子のたんぱく質レベルでの研究を進めている。

Table 1. Japanese government guidelines.

- 1、厚生科学審議会先端医療技術評価部会、ヒト組織を用いた研究開発の在り方に関する専門委員会、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」、1998。
http://www.mhw.go.jp/shingi/s9812/s1216-2_10.html
- 2、中央薬事審議会バイオテクノロジー特別部会、細胞・組織利用医薬品等検討小委員会、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」2000。<http://www.nihs.go.jp/mhw/jouhou/cell/cell-a.pdf>
- 3、中央薬事審議会バイオテクノロジー特別部会、細胞・組織利用医薬品等検討小委員会、「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」、2000。
<http://www.nihs.go.jp/mhw/jouhou/cell/cell-b.pdf>
- 4、厚生科学会議先端医療評価部会、「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」、2000。
http://www.mhw.go.jp/topics/idensi/tp0530-1_b_6.html#para-b
- 5、科学技術会議生命倫理委員会、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」、2000。
<http://www.sta.go.jp/shimon/cst/rinri/gensoku00614.html>
- 6、ヒトゲノム解析研究に関する共通指針検討委員会、厚生労働省、文部科学省、経済産業省、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、2001。
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/0103/h0329-3.html>
- 7、科学技術会議生命倫理委員会、「クローン技術による人個体の産生等について」、1999。
http://www.sta.go.jp/shimon/cst/rinri/clo91227_1.html
- 8、科学技術会議生命倫理委員会、ヒト胚研究小委員会、報告書「ヒト胚性幹細胞を中心としたヒト胚研究に関する基本的考え方」、2000。http://www.sta.go.jp/shimon/cst/rinri/clo91227_1.html、2000。

2. 研究方法

1) 倫理問題への取り組み

われわれはHS研究事業のもとに、平成7年度よりヒト試料を用いた研究倫理問題に取り組んできた。日本国内、国外の膨大な倫理関連資料を収集・検討し、それと同時に内外の倫理問題に関係する人たちの人的ネットワークの構築を行ってきた。このような倫理問題への取り組みの基礎となる構造の構築と同時に、(1) 本事業に参加する増井は日本組織培養学会の倫理問題検討委員会の委員として、また単独にシンポジウム計画、講演、政府ガイドラインへの意見の取りまとめ、学会シンポジウムでの講演を行った、(2) 細胞バンク独自のヒト資料の研究利用に関する倫理問題の勉強会を企画実行し、その報告書を関係者に配布した。(3) 専門家20名あまりからなる勉強会を立上げた。

(4) 本事業に参加する水沢と石井が政府のガイドライン作成に参加した。生命・研究倫理関係資料収集、分析、議論、人的ネットワーク構築、倫理委員会の立上げ、研究計画の申請、外部組織提供医療機関との交渉などのこれまでのHS研究事業の成果がこれらの活動で生かされている。

2) アデノウイルスを用いたEti-1発現系の確立.

HAタグつきEti-1の哺乳類発現系は、通常の発現プラズミドを用いたトランスフェクション法では検出が困難であった。ただ一つ成功したGFPとの融合蛋白質の発現系は、タグたんぱく質のために、Eti-1の糖修飾が阻害され、局在も乱されていることが最終的に明らかとなった。そこで、我々はアデノウイルス発現システムを構築した。ただし、通常のアデノ発現システムではウイルスを得ることができなかつたので、Cre-recombinase誘導型のloxPアデノウイルスベクターを用いてシステムを確立した。この発現系を用いて以下のことが示された。

3) Eti-1のN糖鎖修飾について.

Eti-1はその配列解析から2箇所N型糖修飾部位が認識される。そこで、Eti-1とその欠失タイプ発現ウイルスを作成して、それらをVero細胞で発現させ、N-グリコシダーゼ処理し、ウェスタンブロット法により解析、抗HAタグ抗体を用いて検出した。

4) タグ抗体を用いたEti-1とΔEti-1の細胞内局在について.

全長のEti-1(309aa)とアルターナティブスプライシングで生じるΔEti-1(85aa)をVero細胞に発現させて、それらの局在を抗HAタグ抗体を用いて検出した。

3、研究成果

1) 細胞バンク倫理問題勉強会.

今年度は細胞バンク独自のヒト資料の研究利用にまつわる倫理問題について勉強会を開催した。その結果、多くの方々との討論を通じてヒト試料の研究利用について検討を進展させることができた。以下平成12年度に開催した勉強会についての報告する。

第一回細胞バンク倫理問題勉強会は「研究用ヒト試料提供におけるインフォームド・コンセント」という主題で、2000年7月4日(火曜日)午後1時30分—5時の予定で国立医薬品食品衛生研究所、センター会議室で開催した。プログラムは以下のようである。1)「法学の立場から」唄孝一先生(ばいこういち)東京都立大学名誉教授、北里大学医学部教授、2)フロアーからの発言、米田典子様(よねだのりこ)、東京大学医学部付属病院・組織バンク、組織移植コーディネーター、3)「精神医学の立場から」吉川武彦先生(きっかわたけひこ)、国立精神・神経センター、精神保健研究所、所長

参加者は国立医薬品食品衛生研究所8名、同・審査センター4名、HS財団2名、製薬工業協会4名、製薬会社2名、大学法学倫理関係者3名、出版社1名という計24名の参加があった。お知らせは身内だけであったのですが参加者の数とそこでの討論の充実度はこの問題に対する興味の高さを示すものであった。この会のまとめを添付する(参考資料1)。

ヒト試料(組織・細胞等)は医学生物研究に欠かすことのできない研究資源として注目を集めている。1999年末より政府によるヒト試料の研究利用に関する倫理問題ガイドラインの策定が行われ、どのガイドラインでも提供者よりのインフォームド・コンセント(IC、説明に基づく承諾)が重要であると謳われています。ところが、研究への試料提供のICがどのようなもので、医師の行う治療方針へのインフォームド・コンセントとはどこが同じで、どこが異なったものであるのか議論されていません。指針によっては「研究者」が説明をするようになっています。

本事業で推進しているヒト組織の収集及び初代培養細胞の培養、保存、分譲において、ICに対する根本的理解が重要であるとの認識から勉強会ではこの問題点の整理からはじめました。

ICの勉強会を開きたいという話を何人かの方にしたときに、診療に際してのICに対する不満が大きいことに驚きました。現在ICということばは、診療における患者への情報開示と深くかかわったものとして理解されています。

唄先生のICの理論的枠組み整理から、患者に手術に際してということの研究用の組織提供を求めることの矛盾が示されました。病気であり自身の治療のために手術を受ける患者にとって、自分と直接関係の無い研究に資料提供をするという自己決定権をGenuine Volunteernessをもって行使することは、利己と利他という矛盾する立場を同時に果たすことが求められます。私自身、医療のついで行われる負担の少ない提供として手術摘出材料の提供を考えていました。この理論的矛盾がどのように位置付けられ、解消し得るのか、或いは、矛盾は矛盾のまま認め、枠組みを作るか、社会の認知を得るためには重要な課題であるように思われます。その手がかりになりそうなのが、それで

は患者として治療を受けることは“Volunteerness”とは関係が無いことなのかという問いであるように思われます。

ICの補完と代替の問題については、多くの問題点が提示されました。補完としての倫理審査という考え方は理解しやすい考え方です。それと同時に、代替としての倫理審査の役割は、補完とはかなり異なったものであることが判りました。例えば、研究利用に対する承諾のない既存試料の取扱いを倫理委員会の判断に委ねる場合、補完で予想される倫理委員会の機能よりも社会的認知を受けた、あるいは、倫理委員会の信用を担保する機構が必要のように思われます。

これに関連して、ICのない既存試料の利用承諾の代替として連結不可能匿名化を用いることは、自己決定権を個人情報保護とすりかえて議論するものだという指摘が別の会でありました。ICの代替はこのように考えていくと代諾者の問題、既存試料の利用の問題等、大きな問題を含むことも予想されます。この問題に対応していくためにはIC理論の構築が、倫理委員会の検討の質についての議論との関係のなかで論じられる必要があるように思われます。

米田さんからの話では、現実に組織提供のためにICを頂く際の説明現場での緊迫した状況が伝わってきました。また、Donor Cardの存在自体が移植用の組織提供について家族で話し合うきっかけを与えている点は面白く思いました。臓器提供の量はそれほど増えてはいないのですが、提供問題に対しての社会への問題提起として、Donor Cardの普及が大きな役割を果たしていることが理解されます。と同時に、このようなカードに研究用の試料提供の項目が加わったときに、どのように受け取られるのか興味深いことです。丁度2000年10月から、臓器移植法の見直しが始まります。この見直しで、黒川委員会の答申にあるように、脳死体から移植のために摘出された臓器を研究へ利用することが検討される可能性があります。今回に検討で「研究利用の問題」に決着がつくとは思われませんが、将来Donor Cardの選択項目に「研究利用」が載る意味は大きいことのように思います。

移植用の組織提供と研究用のそれとの大きな違いは、移植用の場合に「他人の命が助かる」という判り易さがあることです。それでは、研究はヒトの病気治療に役でないかということ、高度先端医療或いは有効な治療薬の開発にはヒトの試料を用いた研究が不可欠です。この、間接的関連を理解してもらうことは、我々が思っている以上に難しいことです。ニュースに「病気の原因遺伝子が見つかった」ということが出ても、そのためにどれほど多くの患者さんからの提供サンプルと病歴情報が必要であるのか、また、対照として健常人のサンプルが必要であるのかについての解説はありません。抽象的に研究の必要性を理解することが難しいでしょう。しかし、長期にわたって研究を進めるために倫理的枠組みを作ることの重要性を、研究者にも、また、患者にもアピールできるのではないかと考えられます。

吉川先生の話からは、ICが限定された意味を持つものではなく、人間学として大きく捕らえることも必要であることが理解されました。よく考えると他人と接することは、特に、説明し、議論し、結論を出し、決断するというような場合に、ICの仕組みと同じような問題が存在すると考えられます。

精神医学的治療過程で、ICは治療と切り離せない、或いは、治療の一部として重要な意味を持つこと、また、それを支える精神科医の「スキル」の重要性を知ることができました。もちろんスキルの果たせる役割はIC全体の一部に過ぎないのですが、誠意や精神論の強調と対峙するものとして重要なことです。ICの説明にあたる者にとって、コミュニケーションスキル等の体系的な思考と実技の訓練が可能であることを示唆します。しかし、臓器移植コーディネーターの場合も、また、米田さんのように組織移植コーディネーターの場合にも、吉川先生が触れられたような、「スキル」に対する体系的訓練の場は用意されていないようです。コーディネーターの自助努力に頼っている状態では、説明プロセスの問題点を点検するシステムは育ってこないように思われます。

人が一つのことを納得するまでの「時間の問題」は、ICの現実で重い問題となります。米田さんの話からその現実での重さ、特に肉親を失ったという特殊な場面での問題が提示され、吉川先生の話の中で、これに対する精神医学的意味づけがされました。この説明を受け、それを納得して受け入れるまでに必要な時間に関して、前もって考えたり、議論したりする機会があることが重要であり、その機会が決断に要する時間の問題にとって重要な要因となる可能性があります。もちろん、現実すべてを代替することはできなくても、部分的に決断を支えるものとして、前もって組織等の提供につい

て考えたり、家族で話し合ったりすることは重要と思われます。ということは、先ほどの Donor Card のところでしましたように、研究用の組織提供の選択肢がカードに載ることによって、それが家族の話題として出てくることは、研究用試料提供にとって重要な意味があると思われます。

第二回の細胞バンク倫理問題勉強会は、3省ゲノム・遺伝子解析研究指針の策定をにらみつつ、倫理問題のいろいろなところで顔をだす、「自己決定権」対「公益」の構図を、代表的単因子遺伝病である筋ジストロフィーの保因者診断における論理と実際を通じて明確にして、ゲノム研究の問題点を実感することを目的としました。「筋ジストロフィーにおける遺伝子診断とインフォームド・コンセント」という題名で開催、場所は比較的多くの人たちに都合よく御集まり頂くために、日本薬学会、長井記念講堂で2001年2月2日（金曜日）午後3時—6時に開催いたしました。

参加者は国立医薬品食品衛生研究所7名、同審査センター3名、国立病院3名、大学法学倫理関係者5名、大学薬学部1名、政府財団6名、マスコミ・新聞・出版社8名、製薬工業会4名、バイオ関連会社2名、大使館1名、日本看護協会2名、患者団体1名、一般2名の計45名の参加者がありました。特にマスコミ等の関係者が多く、その前後の取材が活発であったことが印象的でした。

プログラムは以下のようなものでした。1)「遺伝子診断の倫理的ジレンマ：倫理原則と行動準則のはざま」白井泰子国立精神・神経センター、精神保健研究所、社会精神保健部、室長、2)「臨床の現場から一試料提供者のねがいと診療に関わる医師からの伝言」中井博史、国立療養所西多賀病院、小児科、臨床研究部、部長。

ゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、原則が策定され、解読された遺伝情報の利用に関する夢も語られています。しかし、遺伝情報を扱う研究者、或いはそれに関わる者にとって、遺伝情報は「AGTC」からなるデジタル情報である部分が大きく、それが生身の人間と関わる関わり方を想像するよすがが少ないのが実情です。現状では「ゲノム・遺伝子解析の倫理問題」といわれることについての重要な視点を育てることは難しいように思われます。今回は「筋ジストロフィーの遺伝相談法及び病態に基づく治療の開発に関する研究」厚生省精神・神経疾患研究依託費、石原班での議論も含めて検討をお願いしました。

筋ジストロフィーのケースを取り上げたのは、昨年石原班の公開研究発表会に参加した際の激しいやり取りが印象に残ったからです。

筋ジストロフィーと呼ばれる病気の中で、デュシェンヌ型とベッカー型といわれるものがあります。これらの病気はジストロフィンという遺伝子に異常が起きることによって、筋肉が壊れやすくなることによって起きる病気であると考えられています。ジストロフィンとは筋肉の細い線維を束ねる3枚重ねの膜をとめるホチキスのような蛋白質で、筋肉を強く保つ役割をしていると考えられています。デュシェンヌ型はこの蛋白質がほとんどなく、ベッカー型はこのたんぱく質の量が正常に比べて少ないか、少し異常があると考えられています。筋肉が進行性に弱くなり、胸の呼吸に必要な筋肉が動かなくなる病気です。

ジストロフィンという遺伝子はX染色体に載っているために、伴性遺伝という現象を示します。ヒトの染色体は46本あります。そのうちの22対（44本）は常染色体という男性でも女性でも共通の染色体です。しかし、性染色体は女性ではXXであり、男性ではXYから構成されます。女性のXXは父親と母親から一本ずつ受け継がれます。男性のXYは父親からのYと母親からのXを受け継ぎます。ここで、X染色体上のジストロフィン遺伝子に異常があるものをX'とします。女性の場合には正常なX遺伝子と異常なX'を持つXX'の場合でも、正常な遺伝子が異常な遺伝子の作用を弱めて、症状が出なかったり、弱い場合が多いのです。そこで、X'染色体をもつ保因者の女性を母親にもつ、X'を受け継いだ男の子においては、1:1の比率でX'が遺伝し発症します。症状の重いデュシェンヌ型は3000-5000人の男の子に1人の割合でこの病気になり、そのうちの1/3は親から異常を持つ染色体を受け継いだのではなく、本人自身の染色体に異常が生じたことによると考えられています。

このような筋ジストロフィーの遺伝を知るために、患者男性を兄弟にもつ女性の兄弟に対して保因者診断が行われる場合があります。その診断は、女性の兄弟がX'を持つかを診断するののものであり、患者自身にとってのメリットはありません。

白井先生班は自己決定権を重視し保因者診断について検討を重ね、保因者診断における手続きと関連書類の検討・作成を行ってきた成果を発表しました。自己決定権を尊重する立場にたつと、患者

男性、保因者診断を受ける女性の双方が16歳以上であること、説明に基づいた書面による同意をそれぞれから取ることが条件となります。そのような白井班の発表の後で、患者団体の会長である貝谷氏の発言が求められました。「私は本人がいやだといっても採血して保因者診断をする。」という発言は長男が患者であり、女性の兄弟を4名持つ父親の発言でした。実感のない発言や、利己的な発言ではなく、それこそ、その真中にある父親の発言でした。これに続き医師たちも臨床の現場での患者本人を守ることと患者の家族の不可避的な要求の間での葛藤について強い意見を述べられました。これがこの会を開こうと思ったスタートでした。現在第二回目の勉強会のまとめを作成中です。

2) ヒト試料の保存形態の分類

病理標本を含めてヒト資料にはどんな出所があって、それがどういう役割をしていて、「バンク化」という言葉と絡めたときにどういうふうに使われているかということについて検討しました (Table 2)。

Table 2. Japanese collections of human material for research and clinical purposes.

1. 治療目的の収集
 - 1.1 血液関連
日本赤十字社、臍帯血バンク
 - 1.2 治療用組織バンク
皮膚、心臓弁、大動脈、抹消血管、耳小骨、鼓膜、骨、靭帯、鞏(キョウ)膜
(肝細胞、ラ氏島、気管、気管支: 計画中)
2. 臨床検査的収集
 - 2.1 組織標本等
 - 2.1.1 病理標本等.
 - 2.1.2 法医学、監察医務院等での標本等.
 - 2.1.3 外科系臨床での資料.
 - 2.2 主に血液関連.
 - 2.2.1 先天性代謝異常の検出用資料 (産院で行う生化学的検査).
 - 2.2.2 臨床検査会社.
3. 研究用ヒト資料の主な収集.
 - 3.1 組織バンク, HAB, HS ヒト組織バンク
 - 3.2 細胞バンク
 - 3.2.1 公共性のあるバンク: 公的バンク、公共性のある企業運営バンク
 - 3.2.1 私的バンク: 企業内バンク等
 - 3.3 遺伝子バンク
 - 3.4 共同研究レベルでの収集—研究班としての組織化
 - 3.5 販売ベースの供給

手術、バイオプシー、解剖、あるいは血液・血清・血球のサンプルといった検査に使われた試料が含まれる病理標本は病院の中央検査部門、大学の病理学教室で保存されています。患者の病気の診断に使用され、その残りの部分は病歴サマリーと共に集積され、まとまった形で病気の原因を調べるに使われています。一つの症例のサンプル数が集まるのが重要で、そのような条件がそろって病因遺伝子を決めることができるようになります。しかし、大規模な病理試料のバンキングが重要であるにも拘わらず、今のところ、外部の研究者が自由に利用可能な体制にはなっていませんし、複数の医療機関を通じた集積でない場合が多いのが現状です。法医学、あるいは監察医務院等での資料は、病気とは必ずしも関係ありませんが、病理標本と同じ現状があると考えられます。病理学会、法医学会ともに試料の取扱いに関する自主ルールを作成しています。このような、モノを管理している学会の動きが今後重要であると考えられます。

血液関連の人資料収集として、日本赤十字と臍帯血バンクがあります。また、関連するものとして、先天性代謝異常の検出資料があります。一方で臨床検査会社は、血液サンプルを主とした多量のサンプルを集積しています。病歴はないのですけれども、日本人の全体の様子を知ることができる可能性があります。現状ではこれらの重要なサンプルは本来の検査以外の目的には使用できません。研究に利用するという枠組みでは、日本赤十字は、「輸血に使用できなかった血液は、輸血の有効性、安全性向上、試薬の製造等のために使用させていただく場合があります」という、この枠組みに従って研究に提供されています。それから、臍帯血バンクはネットワーク化され承諾書で「移植研究用に」ということで研究に使う可能性が明言されています。特に臍帯血バンクは一人の提供者からの採取細胞数が少

ない場合には廃棄されるので、研究利用の可能性がります。

組織バンクでの移植用組織は、法令で決められた臓器と異なり、死体からの提供であり、保存可能であり、ミニマムマニピュレーションであるという特徴をもちます。治療用の組織バンクでは、追跡調査ができるということが必須です。それは治療成績の評価と同時に、一提供者の組織が複数の患者さんへの移植に使われる場合に、感染症のコントロールのためにも重要な課題です。また、モノの性質から採取に必要な人員の派遣し、よい状態の組織を得ることが不可欠です。しかし、組織移植バンクの場合、研究用使用ということが明記されているところは少ないようです。

研究用ヒト資料バンクとしては、HABとヒューマンサイエンスのヒト組織バンクがあります。研究用組織バンクは後に述べる細胞バンクに比べて、多様な研究計画からの要請に対応する必要があり、今後の課題として。

細胞バンクははっきりと「公共性のある」と「私的な」とがあります。「公共性がある」というのは情報公開、分譲というようなことが、一般の社会に対してなされているという意味であり、研究資料の共有によって、相互に研究成果が検証可能な研究環境を作ります。

海外から輸入され購入可能なヒト試料が増加しています。今後、この問題にどう対処するのか、という話はあまり出てこないのですが、重要な問題だと思います。

保存されている試料の利用の形態、バンクとしての機能について分類してみると1)「死蔵」ということで、貯蔵されていても利用されていない、オプティマルユーズには明らかに反する形なのですが、これは随分な量があるはずで、2)「個人所蔵」というのは、個々の研究者、医師がそれぞれの目的のために所蔵することで、個人の異動とか退職等によって廃棄されたりします。3)「機関として所蔵」というのが、先ほどの病理部とか、医療機関の中央検査部の場合がこれに相当します。この場合、外へ供給されることは考えておりません。4)「供給できる体制で所蔵する」というのが一般的なバンキングということになります。ですから、原則として公平分譲であって、いちばん大事なことは資料の標準化を通じて、共通言語として資料を使えるようにすることです。

3) ゲノム・遺伝子解析の材料であるDNAと組織・細胞の性質の違いについて。

「知の共有社会」ということがIT革命をベースにして喧伝されています。その面から見ると、ゲノム遺伝子の塩基配列は電子的な情報に完全に置き換えられる面があります (Figure 1)。それは、インターネット上でデジタル情報としてやり取りされ、その電子情報が得られれば、手間のかかる場合はあっても「モノとしてのDNA断片」を文字情報から再現する技術が確立されているのです。あたかも、物質転送のように「デジタル情報」と「モノ」とが等価的に扱える環境が整っているわけです。それでは、元のDNA試料と再現されたDNA断片とは、もとの試料提供者とどのような関係にあるのでしょうか。これについては、知的所有権の部分以外ではあまり論じられていないと思われます。

DNAの配列情報は先ほどから述べている共有・再現性という点で、また、誰が解析しても同じ結果が得られるはずであるという点で優れた科学性を持つわけです。それと同時に次に扱う組織・細胞というゲノム翻訳機の複雑性、固別性、生物性等と遺伝情報の距離に関する総合的検討が今後の課題ではないかと思われます。

組織・細胞はゲノムの面で提供者のそれを反映しています。さらに、組織も細胞も提供者から頂いた「体の部分」の特性を反映する面もあるのです。例えば、血液や皮膚などは相互に互換できない特性を持つわけです。さらに、組織・細胞から得られた「情報」はそれがいかに詳細なものであっても、元のモノを再現できません。この点でヒト組織・細胞は、遺伝情報のモノへの再現性とは異なった、個人の生に由来する倫理問題を強く含む側面があります。

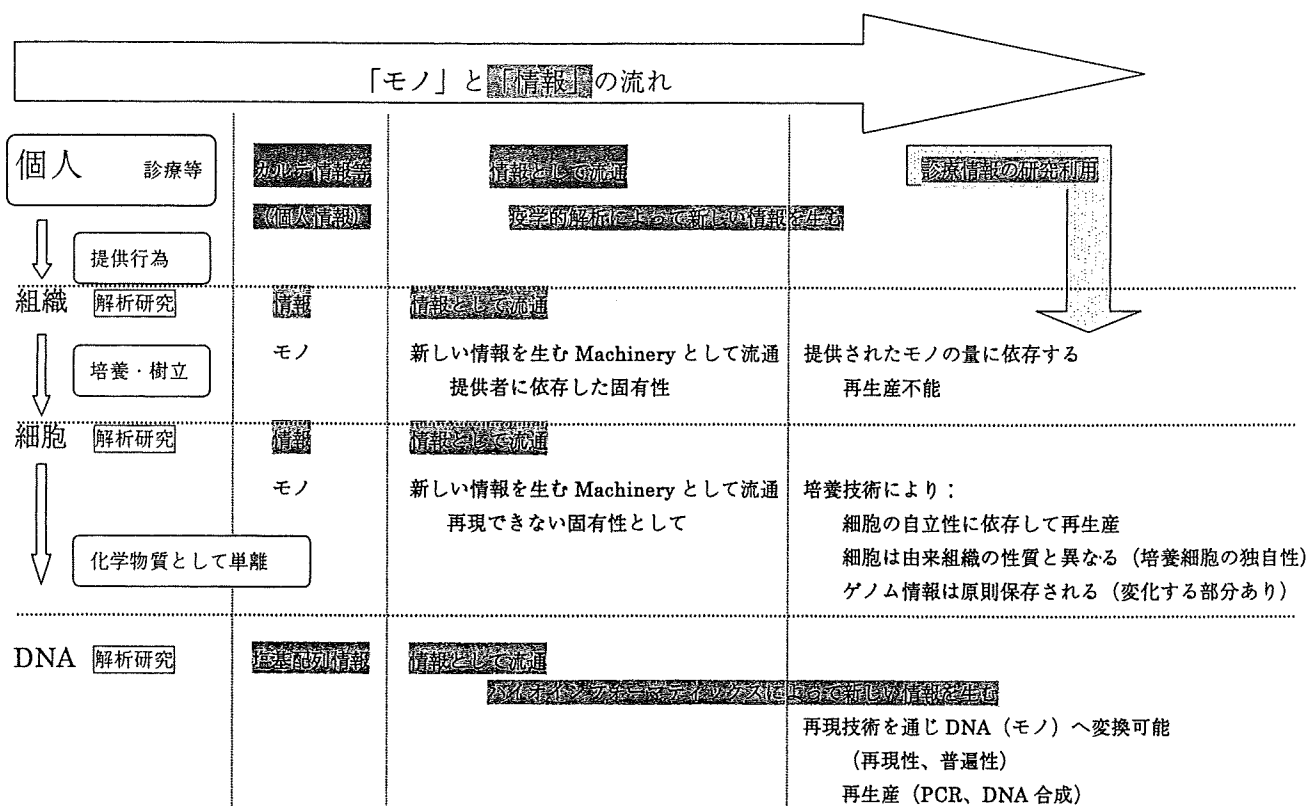
DNAは配列情報に置き換えが効き、再現性のあるモノ(?)です。しかし、細胞や組織はその複雑性、固有性、生物性の故に、情報とともに、「モノ」自体が流通することが重要です。それと同時に、組織・細胞は核を持ち、提供者の遺伝情報を得ることもできるのです。今後の組織・細胞の取扱いにおける遺伝情報の潜在性も重要な問題です。

以上のように一括りされる組織・細胞も提供者との関係において異なった性質を持ちます。

組織は提供者からの提供量がすべてであり、それ自身を増やすことができません。例えば提供頂いた肝臓を薬物代謝実験に用いて使い切ってしまうと、新たな提供を受けるしかありません。このように、組織においては、その質と量の両面で提供者に依存しています。また、それは、提供時の状態

にも依存しています。提供時に適切な処理がされなかった組織は試料としての価値を失います。そのような点で「一回性」という性質を強くもちます。

一方、組織から人工環境で増殖し得る細胞を得た場合には状況は異なります。株化された細胞は培養技術によって、提供者からは独立に増やすことができます。人工環境で増殖し得る細胞は、その由来する組織の性質を部分的には反映しますが、「培養細胞」は元の組織とは異なります。例えば肝臓細胞を培養すると肝臓本来の機能は急速に失われるのです。このように「培養細胞」は、性質と増殖性の面で提供者からの独立性が高く、提供者の生から遠い距離にあると考えています。一方で提供者のゲノム組成は保存されています。この保存をベースにして法医学で用いられる個人識別ゲノム解析技術を用いて細胞株の識別同定ができます。周知のように培養細胞では染色体の形態が乱れていますが、提供者個人を同定に使えるくらいはゲノムが保存されているのです。言い換えると、培養細胞は提供者個人のゲノムを粗悪コピーしている状況といえます。このゲノムの「粗悪コピー」という現象が提供者との倫理的距離としてどう測られるのかは興味深い今後の課題です。



4) ヒト子宮頸部組織由来の培養上皮細胞の公的研究資源化

現在の研究においては、ヒト資料の研究でゲノム・遺伝子解析研究を抜きにしては語ることはできない。そこで、平成 12 年度の審査で承認された申請を、現在の 3 省ゲノム・遺伝子解析研究指針に照らして再申請し、また、協力医療機関である関東中央病院への新たに申請をする必要が生じている。このプロセスと同時に、われわれが保存しているヒト組織の利用に関しても、利用できるような倫理審査を申請するつもりである。このような取り組みを通じて、現在の枠組みの問題点とそれへの対処、また、それらを含めての問題点を検討することができる。

5) Eti-1 の糖鎖修飾.

Loxpアデノウイルス発現系を用いて、初めてEti-1の全長をTag抗体で検出できるようになった (Figure 2)。Eti-1の予測分子量は33Kdであるが、実際は45Kdに中心をもつ (40-50kd) の幅の広いバンドとして検出される。アミノ酸配列の解析から、2箇所のNグリコシレーションサイトが予想されていた。そこで、全長たんぱく質を発現させ、クルードエキストラクトを調製し N-glycosidase F処理すると、約33Kdのバンドが検出された。さらに、予想されるグリコシレーションサイト (83, 90番目のアスパラギン) を含む部分を欠失した発現系を確立したところ、グリ

コシレーションによる分子量の増加が見られなくなった。これらの結果から、Eti-1がN-グリコシレーションされることが示された。また、通常一箇所の糖修飾による分子量の増加は2-4Kdと考えられていることから、我々は予想される2箇所のグリコシレーションサイトが修飾を受けていると考えている。

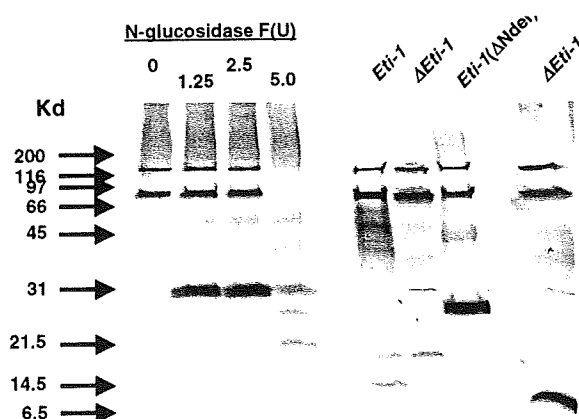
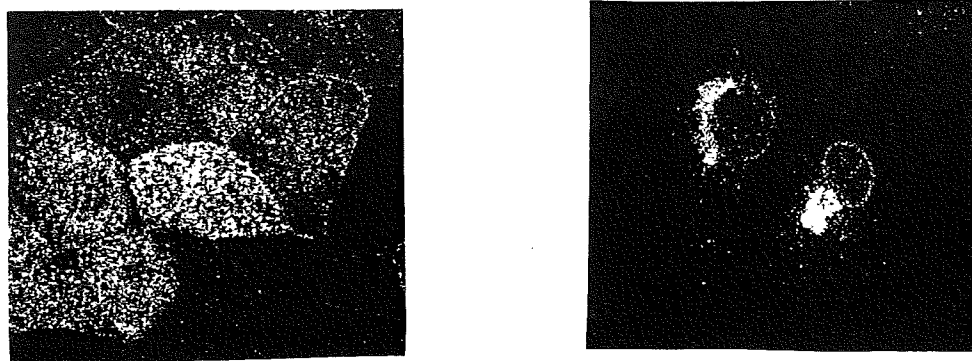


Figure 2. N-glycosidase digestion of Eti-1 and its derivatives (anti HA).

7) Eti-1の細胞内局在.

HA のタグを用いたアデノウイルス発現系を用いて、Eti-1とアルターナティブスプライシング型 delataEti-1の局在を検討した結果、全長は細胞膜に、シートフォームは核膜に局在することが明らかとなった (Figure 3).



A. Membrane localization of Eti-1. B. Nuclear membrane localization of ΔEti-1.
Figure 3. Localization of Eti-1 and ΔEti-1.

4、考察

1) 倫理問題の枠組みについて.

ヒト資料の研究利用に関する大枠である組織・細胞の研究利用に関してはガイドラインが作られる必要があることは厚生労働省からの発言でもはっきりしている。公的資源バンクとしては、このヒト組織・細胞の利用に関する検討の重要性をにらんで資料・議論・人的ネットワークともに準備しておく必要がある。

2) Eti-1 たんぱく質について.

これまで全長のたんぱく質を捉えることができなかった。それは、全長が膜たんぱく質であって、そのために大量に発現することが困難であったことが予想される。バクテリア発現システムの場合には T7RNA ポリメラーゼをファージで導入する pET のシステムを用いても発現を確認すらできなかった。また、バキュロウイルス発現システム、通常のアデノウイルス発現システムでもウイルスを作成できなかった。誘導型 Loxp アデノ発現ウイルスに *eti-1* を組替えて、Cre 発現アデノウイルスで誘導することは画期的であった。また、SV40 を組み込んだ 293 細胞は Eti-1 の増殖抑制活性に比較強く、リーク発現で死滅することは無かったようである。

5、まとめ

1) 倫理問題の枠組みについて.

先に述べたように、倫理問題への取り組みが地に足のついたものになるためには、研究と倫理の両面に目配りをする必要がある。その点で、細胞バンクで、研究資源化にかかわりつつ、ヒト資料を用いて研究を行ない、倫理問題の枠組みについて検討を加えていくことは、失うものもあるが、得るところも大きく、意義深いことであると考えている。「Honesty is the best policy.」という立場から、医学生物学研究推進のためには、日本におけるヒト資料の研究利用の倫理問題について根源的対応する必要があると考え、本事業を推進している。特に科学研究を根元で支えるバンクという仕事をしている立場から、「科学的」という言葉のもつ根本の意味に立ち返って倫理問題を捉え、研究者の動機付けの原点を模索する必要があると考える。このような公的研究資源バンクとしての立場を堅持し、今後も日本におけるヒト資料の研究利用への取り組みを続けていく。

2) Eti-1 たんぱく質について.

今回の結果から、細胞膜たんぱく質の向きが明らかとなった。グリコシレーションは小胞体の内側で起こり、細胞外へ向くことから、全長たんぱく質の膜貫通の順序が明らかとなった。全長たんぱく質は8回膜貫通型のたんぱく質であることが予想され、それぞれに、細胞外、細胞内ドメインが明らかとなった。

6. 研究発表

増井徹、水沢博 細胞と組織の凍結保存と解凍操作、*蛋核酵*、45、2195-2201 (2000).

増井徹、祖父尼敏雄、石井美智子、今西由紀夫、安井英明、高田容子、林真、水沢博、厚生省細胞バンクにおけるヒト組織・細胞取り扱い倫理問題への取り組み、*組織培養研究* 19,1-15 (2000).

高田容子、増井徹、田辺秀之、原沢亮、水沢博、培養細胞系でのマイコプラズマのPCR検出法、*組織培養研究* 19,131-138 (2000).

Masui, T. Framework is indispensable to promote the use of human material in pharmacogenetics. *Atlern. Animal Test Exp.* 7, 66-67 (2001).

Masui, T. An outgrowth culture system of normal human epithelium: an in vitro model to study the coordination of cellular migration and proliferation. *MRC Monogram*, 2001 (in press).

増井徹 中村晃忠、行政による枠組みの整備と社会認知について、*蛋核酵*、45、2354-2356 (2000).

増井徹 ガイドライン 第8回組織移植医療研究会、2001 (印刷中)。

松村外志張、増井徹、宇都木伸、ヒト細胞・組織の取扱に関する倫理的諸問題、in 「バイオ医薬品の品質・安全性評価」、LIC、2001 (印刷中)

宇都木伸、迫田朋子、恒松由記子、野本亀久雄、唄孝一、増井徹、松村外志張、ヒト組織・細胞の取扱いと法・倫理、*ジュリスト*、1993、2-35、2001.

Oomizu, S., Honda, J., Takeuchi, S., Kakeya, T., Masui, T. and Takahashi, S. Transforming growth factor- α stimulates proliferation of mammothrophs and corticotrophs in the mouse pituitary. *J Endocrinol* 165, 493-501 (2000)

7、知的所有権の取得状況

特許出願：細胞増殖抑制因子、米国特許出願 No. 08/952,736

PCT/JP97/01987 (米国、EPC、日本)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社

