

20020782

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露、

遺伝子発現に関する研究(H14-トキシコ-006)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤村 昭夫

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究	1
-----------------------------------	---

藤村昭夫

II. 分担研究報告

1. プライマリーヒト腎細胞を用いた研究に適した腎細胞癌手術例についての病理学的検討	4
--	---

斎藤 建

2. 肝切除症例の臨床的検討および人工肝臓カラムを用いた薬剤透過性の検討	8
--------------------------------------	---

永井秀雄, 安田是和, 佐田尚宏, 王寧

3. 臨床腎臓検体の採取・初代培養システムの構築	14
--------------------------	----

徳江章彦・今井正・大島康雄

4. DNAマイクロアレー装置管理・データ解析手法の推進に関する研究	16
------------------------------------	----

間野博行

5. マイクロアレー実施・データ解析・精度管理	20
-------------------------	----

大島康雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
---------------------	----

IV. 健康危険情報	24
------------	----

V. 研究成果の刊行物・別刷	添付
----------------	----

研究要旨

本研究は日本人のプライマリー肝・腎細胞を用いて、日本人における医薬品の安全性を予測するシステムを構築することを目的とする。平成14年度は患者さんから肝・腎組織を採取し、これを用いてプライマリーヒト肝・腎細胞を作成するまでの研究基盤整備を行った。その結果、倫理評価ワーキンググループの監視下で採取された組織を用いて、プライマリーヒト肝・腎細胞を作成することが可能であることが明らかとなった。今後は得られた細胞に多数の薬物を曝露し、GeneChipを用いて遺伝子発現解析を行う予定である。

A. 研究目的

本研究は日本人における医薬品の安全性を、前臨床試験において予測するシステムを構築するとともに、ヒト組織を用いた研究に関する基盤を整備することを目的とする。

現在、医薬品の研究開発においては、まず最初に動物を用いた前臨床試験が行われて、その有効性や安全性が確認され、その後ヒトに薬物を投与する臨床試験が実施されている。しかし、薬物の代謝や反応性にはヒト-動物間に種差が存在するために、動物実験では予期されなかった毒性が発現する例も知られている。したがって、ヒト組織を用いた試験を行うことによって、動物実験では明らかにできなかった有害反応が予測可能となることが期待される。

一方、医薬品の有効性や体内動態に人種差が存在することは広く知られている。したがって、日本人ヒト組織を用いて医薬品の研究開発を行うことは、日本人にとってより有効で安全性の高い医薬品を創製するために必要である。また、医療の現場では患者に対して、複数の薬物が同時に投与されること

が多い。この際の薬物相互作用による有害反応の発現については、その組合せが多数に及ぶために臨床試験で全てを明らかにすることは困難であり、薬物が市販された後に、その危険性が明らかになることも少なくない。このような場合においても、ヒト組織を用いて薬物の代謝や反応性を遺伝子発現レベルで検出することにより、薬物相互作用の発現を予測することが可能である。

医薬品の研究開発は、日米欧で共通の基準に沿って行われることになっている。欧米では、既にヒト組織を用いた有効性および安全性の評価が医薬品の研究開発に取り入れられており、我が国も同様にヒト組織を用いた研究開発を推進していく必要がある。さらに、ヒト組織の研究開発を推進することにより、画期的な医薬品の発見や人工臓器作成なども可能となるものと期待される。以上のように、ヒト組織を研究開発に利用することは保健医療の向上に必要なものであり、その利用については公明で且つ厳正な一定の要件を守りつつ、積極的な推進を図ることが重要である。

こうした流れの中で、本研究の特徴

はこの動物とヒトという異種間の遺伝子発現情報のブリッジング、および不死化された細胞株とプライマリー細胞の間の遺伝子発現情報のブリッジングを視野に入れ、ヒト肝・腎由来のプライマリー細胞を用いて遺伝子発現解析を行う点にある。

B. 研究方法

腎臓・肝臓を切除する際にやむを得ず正常の腎臓・肝臓組織も切除されることがある。本研究ではこれらの組織を用いてプライマリー細胞を作成する。

ヒト組織を利用するために、当大学における遺伝子解析研究倫理審査委員会、生命倫理委員会、個人情報識別管理者、病理診断部からなる倫理評価ワーキンググループにおいて、組織採取の方法や、採取量、インフォームドコンセントの取得方法や説明文書の内容、各責任体制の明確化やアフターケアの対応を審査し、さらに切除部位を病理標本より評価するとともに、患者さんの匿名化を行う。

臨床検体採取部門はインフォームドコンセントを患者さんより得た後、外科手術中に得られた組織を細胞プロセッシング部門へ送る。

細胞プロセッシング部門は採取部門より得た細胞を処理し、プライマリーカルチャーを行うとともに、細胞の由来を担保するためのデータを得る。腎臓尿細管由来の細胞は、形態・Glut 2 発現・ γ G T P 発現・NAG 発現で評価する。また、肝細胞由来の細胞は、形態・アルブミン産生能・およびチトクローム P 4 5 0 発現で評価する。

遺伝子発現解析部門では、上記の方法で腎臓尿細管あるいは肝細胞由来であると担保された細胞を用いて、それぞれ腎・肝毒性の知られている薬物と知られていない薬物へ暴露させ、適当な時間の後に、細胞を回収して、total RNA として Affymetrix 社の GeneChip で解析する。

バイオインフォマティクス部門では発現解析して得られたデータを処理し、知識データベースを構築する。

C. 研究結果

当大学における遺伝子解析研究倫理審査委員会、生命倫理委員会、個人情報識別管理者、病理診断部からなる倫理評価ワーキンググループは、本研究の計画書を審査し、連結不可匿名化を行うことを条件のひとつとして本研究計画を承認した。これらの委員会実施計画承認後も、手術検体一つ一つの切除状態を病理診断部が検討することにより、不適切な手術が行われないように監視を行っている。さらに、研究計画の実施が適切であるか否かについて、遺伝子解析研究倫理審査委員会は部外委員も参加して平成 15 年 3 月 24 日に査察を行った。

臨床検体採取部門では、当病院で肝臓および腎臓の手術の適応があると診断された患者さんに研究の内容等の倫理評価ワーキンググループで承認された研究計画を説明し、インフォームドコンセントを取得した後、検体を採取した。患者さんの治療を優先するために、エントリーした症例のうち肝臓では約 40%、腎臓では約 20%で研究目的の組織採取を断念した。

細胞プロセッシング部門では採取された細胞を処理し、得られた培養細胞の評価を行った。腎臓由来の細胞では形態・Glut 2 発現・ γ G T P 発現・NAG 発現より、主たる成分は尿細管由来であると判断した。肝臓由来の細胞は形態・アルブミン産生能より肝細胞であると考えられたが、さらに確認のための評価実験を行っている。

遺伝子発現解析部門では、得られた尿細管プライマリー細胞を用いて、濃度依存性や時間依存性が評価できるように様々な条件下で腎毒性の知られている薬物を暴露させて遺伝子発現解析を行った。すでに膨大な遺

伝子発現解析データを得ているが、これらデータへ意味づけを行い知識として整理するバイオインフォマティクス部門では、まずデータの精度を検討した。本研究グループで得た遺伝子発現解析データを検討したところ、RNAの状態は良好で、おおむね信頼できるデータが得られていると考えられた。信頼できない、あるいはRNAの状態の不良であったと推定された1実験についてはデータを解析に利用しないこととした。

D. 考案

ヒト組織を用いた研究開発の在り方専門委員会や公的な議論の場である日本病理学会などでこれまで手術等により得られた検体の研究応用について議論がなされており、貴重な組織は、目的のはっきりした、あるいは重要性が理解しやすい研究に使用すべきであるという点に関して意見が一致している。この点に関して本研究で実施するトキシコゲノミクスプロジェクトの重要性とヒト組織の利用の必要性が、外部委員を含む倫理委員会において承認されている。今後も採取されたヒト組織の倫理的妥当性についてさらに監視と査察が倫理評価ワーキンググループにより行われる予定である。これらの実践を積み重ねることにより、今後のヒト組織の研究応用に関する基盤を固めてゆく予定である。

平成 14 年度の研究により臨床サン

プルより肝細胞・尿細管細胞を培養することが可能となり、研究基盤がほぼ整備されたものと考えられる。今後は暴露実験に利用する薬物の種類を増やし、遺伝子発現解析により得られたデータを積み重ねてゆく予定である。また、得られたデータは利用可能な形でホームページなどにより情報発信することを予定している。

E. 結論

倫理的監視の元で手術時に得られたヒト組織（肝臓・腎臓）を使用して、臨床検体を得るシステムを構築することができた。さらに、これらの検体より尿細管細胞・肝細胞を得ることができ、これらの細胞に薬物を暴露して遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析のデータの精度は良好と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得；なし
2. 実用新案登録；なし
3. その他；なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

プライマリーヒト腎細胞を用いた研究に適した

腎細胞癌手術例についての病理学的検討

（検体採取時の倫理的配慮からの監視のための基礎的データ）

分担研究者 斎藤 建 自治医科大学病理学教授

研究要旨

プライマリーヒト腎細胞を用いた研究に適した腎手術例を抽出するため、自治医科大学附属病院における腎細胞癌手術例 56 例を病理学的に検索し、以下の結果を得た。

1. 臨床病期 T2 以上の腎細胞癌 14 例（腫瘍径 7cm をこえる 13 例と腫瘍径 7cm 以下だが大静脈腫瘍塞栓のある 1 例）のうち、研究に適した健常腎組織が認められたのは 2 例のみだった。
2. 臨床病期 T1（腫瘍径 7cm 以下）の腎細胞癌のうち、1/3 で浸潤性増殖あるいは静脈浸潤を認める腫瘍径 2.6cm から 7cm までの 24 例のうち、1 例で部分切除が行われていた。腎全摘術が行われた 23 例の全てで研究に適した健常腎組織を認めた。
3. 浸潤性増殖、静脈浸潤を認める例がない腫瘍径 2.5cm 以下の腎細胞癌 18 例では、半数で部分切除術が行われていた。部分切除検体に研究に適した健常腎組織を認めたのは 1 例のみだった。

結論；腎細胞を用いた研究に適しているのは臨床病期 T1 の腎細胞癌手術例であるが、2.5cm 以下の場合には出来るだけ部分切除を行うべきである。

A. 研究目的

ヒト手術検体の健常部から、研究を目的として組織・細胞を採取する際に最も重要なのは、組織・細胞が治療のため切除された範囲内から採取されていることの第三者による確認である。このためには、治療のための臓器切除範囲を、予め正確に把握しておくことが必要である。また、切除された肝・腎組織内に研究に適した健常組織が含まれていないこともあるので、どのような術前診断による切除臓器内に、研究に適した組織が存在する可能性が極めて高いことを知っておくことが、肝細胞・腎細胞提供についてのインフォームド・コンセントを得るために不可欠である。

このための基礎的検索は、切除肝については既に行われた。そこで今回は腎切除例について検索した。

B. 研究材料と研究方法

平成 12 年 1 月 1 日から平成 14 年 12 月 31 日までの 3 年間に、自治医科大学附属病院で行われた腎切除例のうち、腎盂・尿路癌、水腎症・腎盂腎炎・腎膿瘍による腎切除例の殆どでは、研究に適した健常腎組織が残存していなかった。腎芽腫による切除腎の非腫瘍部にも、全例で異常所見が認められた。血管筋脂肪腫による手術例では、顕微鏡的に健常な部分が認められたが、この腫瘍が過誤腫的性格

を有し、多発することが多いので、光顕的正常部に異常が存在する可能性は否定できなかった。一方、最も多い腎細胞癌手術例では健常腎組織が残存していることが多かった。そこで、腎細胞癌手術例について詳細に検索することにした。

この3年間に、腎細胞癌あるいは腎細胞癌疑いの術前診断で手術されたのは61例である。このうち2例は良性間葉系腫瘍であった。また、3例は長期透析後の続発性嚢胞腎に発生した癌で、非癌部は腎細胞を用いた研究に適さないものであった。この他、手術後の病理学的検索により腎細胞癌と判明した例が3例あったが、術前のインフォームド・コンセント得なければならないという、腎細胞を用いた研究に適さない検体なので除外し、術前診断された腎細胞癌56例を検索対象とした。

まず、腫瘍の大きさと進展状態により、腎癌取り扱い規約に従い、最大径が4cm以下の臨床病期T1a、4cmを越えるが7cm以下のT1b、7cmをこえるか、腎・下大静脈浸潤が明らかだったT2以上に分類した。T1aは、更に、2.5cm以下のT1aiと2.6cm以上のT1aiiに亜分類した。その後、病理組織学的検索により、腫瘍細胞の異型度をⅠ度(G1)、Ⅱ度(G2)、Ⅲ度(G3)に、増殖様式を膨張性の α 、浸潤性の γ 、その中間の β に、静脈浸潤については、浸潤が認められないv0、小静脈1切片のみに認められるv1、複数切片あるいは中型静脈に認められるv2、主腎静脈あるいはそれより遠位に認められるv3に分類し、病理組織学的病期を決定すると共に、研究に適した組織学的にはほぼ正常な腎組織が十分に存在するか否かを検索した。

(倫理面への配慮)

この研究は、手術例の全例について病理診断部で行っている病理学的検索を基礎とするものなので、倫理的問題はない。

C. 検索結果(表1)

1. 臨床病期T1ai 症例:

腫瘍の最大径が2.5cm以下の18例のうち、腫瘍が上極あるいは下極にあった9例では、腎部分切除が行われていた。腎全摘術が行われた9例中8例では、腫瘍が腎門部、あるいは腎中央部に存在した。細胞異型が高度な腫瘍はなく、全て膨張性増殖を示し、静脈浸潤は認められず、最終病期は全てpT1aであった。

部分切除が行われた9例中、腫瘍が腎中央部よりに存在した1例では、腎のほぼ半分が切除されたため、研究に適したほぼ正常な腎組織が十分量認められた。残る8例では十分な健常組織は認められなかった。腎全摘術が行われた9例中1例では、非癌部腎組織の萎縮が高度で、健常部はなかった。残る8例では十分量の健常腎組織を認めた。

2. 臨床病期T1aii 症例:

腫瘍の最大径が2.6cm以上、4.0cm以下の12例中、腎上極から突出した3.5cm大の腫瘍に対し腎部分切除が行われた。研究。細胞異型が高度な腫瘍はなかったが、増殖様式 β が3例あり、1例で主腎静脈に腫瘍塞栓を認め、最終病期はpT3bになった。残る11例はpT1a期だった。部分切除例の非腫瘍部は僅かだった。腎全摘術が行われた11例の全てで十分量の健常腎組織を認めた。

3. 臨床病期T1b 症例:

12例の全てで腎全摘術が行われていた。T1a症例に比しG2症例が増加したが、高度異型例はなく、増殖様式 β は、腎被膜を越えた浸潤を認めたため最終病期がpT3aになった1例のみだった。残る11例の最終病期はpT1bだった。軽度の静脈浸潤を2例に認めたが、前述したpT3a例に静脈浸潤はなかった。全例で十分な健常腎組織を認めた。

4. 臨床病期T2以上症例:

この14例のうち、腎内原発巣の大きさが7cm以下の例は、下大静脈内腫瘍塞栓が高度な1例のみだった。増殖様式 α で静脈浸潤が

認められない腫瘍は、嚢胞性腎細胞癌 1 例のみだった。残る増殖様式 α の 4 例の全てで静脈浸潤が確認できた。静脈浸潤が確認できなかった嚢胞性腎細胞癌以外の 2 例は、増殖様式 β で最終病期は pT3a だった。

ほぼ健常な腎組織が認められたのは 2 例のみだったが、双方とも静脈浸潤を認め、血行性撒布の可能性が否定できない微小な satellite lesion が 1 例に認められた。嚢胞性腎細胞癌では嚢胞による圧迫のため、ほぼ健常と言える非癌腎組織は認められなかった。

D. 考察

今回の検索は、UICC 分類に準じた現在の腎癌取扱い規約による T 分類の有効性を証明するものになった。臨床病期 T1 に分類される 7 cm 以下の腫瘍 42 例のうち、増殖様式 β は 4 例、静脈浸潤を認めたのは 5 例で、34 例 (81%) では両者が認められなかったのに対し、T2 以上の 14 例のうち、両者が認められなかったのは、低悪性度腫瘍に分類されている嚢胞性腎細胞癌 1 例のみだったからである。T2 以上の症例の病理学的所見のうち特に重要なのは、14 例中 11 例に静脈浸潤を認め、7 例で主腎静脈あるいはそれより遠位に腫瘍血栓を認めたことである。したがって、T2 以上の腎細胞癌症例の非癌部は、腫瘍細胞の血行性撒布の可能性が否定できないので、基本的に腎細胞を用いた研究に適しないと考えるべきである。逆に言うと、研究に適した検体は、T1 腎細胞癌の非癌部なのである。

しかし T1 癌の悪性度も腫瘍径により異なる。今回の検索では、T1 癌のうち、腫瘍径が 2.6cm 以上の 24 例のうち 8 例 (33%) で、増殖様式 β 、静脈浸潤の何れかが認められたのに対し、1992 年の腎癌取扱い規約で T1 とされていた 2.5cm 以下の腫瘍 18 例は、全て増殖様式 α で静脈浸潤が認められなかった。このう

ち、上極あるいは下極腫瘍の 9 例で腎部分切除所見が行われ、腎全摘が行われた 9 例のうち 8 例は、部分切除が困難な腎中央部あるいは腎門部腫瘍であったという、自治医科大学付属病院に於ける腎細胞癌手術術式は、この病理学的所見に対応したものである。

現在の悪性腫瘍手術術式は、QOL 維持のための縮小傾向にある。研究のための腎細胞採取が予定される手術の場合も、2.5cm 以下の腎細胞癌は、可能な限り腎部分切除という原則を維持しなければならない。部分切除術では研究に適した十分な健常部が得られないことが多いが、それを除外しても、研究に適した腎切除検体は、年間約 10 例はある。検体採取を行っても、腎部分切除症例がむしろ増加すれば、健常腎細胞採取のため過剰な切除が行われるのではないかという、臓器提供者の不安が解消するであろう。

E. 結論

プライマリーヒト腎細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究のための腎細胞採取の適応例は、腎癌取扱い規約による T1 症例 (最大径 7 cm 以下の腎細胞癌) の手術例である。但し、2.5cm 以下の腫瘍の場合は、出来るだけ腎部分切除を行うべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 ; なし
2. 実用新案登録 ; なし
3. その他 ; なし

表 1 : 腎細胞癌 5 6 例の病理学的所見

臨床 病期*	切除術式		異型度			増殖様式			静脈浸潤				病理学的病期					健常部 有無	
	部分	全摘	G1	G2	G3	α	β	γ	v0	v1	v2	v3	1a	1b	2	3a	3b		
T1ai	9	9	9	9	0	18	0	0	18	0	0	0	18	0	0	0	0	9	9
T1aii	1	11	6	6	0	9	3	0	9	2	0	1	11	0	0	0	1	11	1
T1b	0	12	2	10	0	11	1	0	10	2	0	0	11	0	1	0		12	0
T2 \geq	0	14	2	8	4	5	7	2	3	2	2	7			5	2	7	2	12
計	10	46	19	33	4	33	11	2	40	6	2	8	29	11	5	3	8	34	22

* : T1ai ; 腫瘍径 2.5cm 以下、T1aii ; 腫瘍径 2.6~4.0cm、T1b ; 腫瘍径 4.1~7.0cm

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究
肝切除症例の臨床的検討および人工肝臓カラムを用いた薬剤透過性の検討

分担研究者 永井秀雄 自治医科大学消化器一般外科教授

分担研究者 安田是和 自治医科大学消化器一般外科教授

研究協力者 佐田尚宏・王寧

研究要旨

2002年自治医科大学消化器一般外科では71例の肝切除術を施行した（男性43例、女性28例、平均年齢は56.0歳、肝移植ドナー26例を除くと65.0歳）。疾患別の内訳は肝移植ドナー26例を、肝細胞癌17例、転移性肝癌15例、その他13例であった、術後合併症としては胆汁瘻6例、創感染・創開3例、虚血性心疾患2例、腹腔内出血1例、肝不全1例がみられ(morbidity 18.3%)、腹腔内出血の1例に再手術を要し、肝不全の1例を失った(mortality 1.4%)。十分にインフォームド・コンセントを行った上、薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究に供するために3例の切除肝を提供した。また、上記と平行してヒト肝細胞株HepG2 3A4を用いて作成した人工肝臓カラムにおける、diazepamの細胞内輸送、代謝の検討を開始した。今年度は基礎的検討のみで終了したが、次年度にはイヌを用いた体外循環の検討を行う予定である。

A. 研究目的

1. 平成14年における当科における肝切除症例を臨床的に検討する。
2. ヒト肝細胞株HepG2 3A4を用いて作成した人工肝臓カラムにおける、diazepamの細胞内輸送、代謝を検討する。

B. 研究方法

1. 平成14年における当科の肝切除症例の病歴および外科データベースから、その臨床的特徴を抽出、検討する。
2. 人工肝臓作成と薬剤量の測定
ヒト肝細胞株HepG2 3A4はヒト由来で、3A4遺伝子をHepG2株に導入して作成したもので、Diazepamの代謝を促進する特徴を有する。この細胞株を、glassfiber

(4cmx3m)を貼付したカラム内に充填、灌流して数日間培養、実験に供する人工肝臓カラムを作成する(図1)。細胞のviabilityは培養液中のglucoseおよびlactateを測定することにより評価した。

基礎的実験として、作成したカラム内の流量を一定に保ち、回収液量の測定を行った。またこのカラム内にdiazepamを含有する溶液を作成し、その回収液中のdiazepamおよびその代謝産物であるnordiazepam、oxazepam、temazepam濃度をHPLC法にて測定した。

C. 研究結果

1. 2002年当科における肝切除術
2002年1月より12月までの12ヶ月間、自治医科大学消化器一般外科では1580名

の入院症例があり、1078 件の手術を行った。そのうち肝切除術を施行した症例は 71 例、男性 43 例、女性 28 例、平均年齢は 56.0 歳(肝移植ドナー26 例を除くと 65.0 歳)であった。疾患別の内訳は肝移植ドナー26 例を除く 45 例中、悪性疾患が 39 例(86.7%)と過半数を占めていた(表 1)。

悪性疾患の内訳では肝細胞癌が 17 例、転移性肝癌が 15 例、その他 6 例、転移性肝癌の原発は、結腸・直腸 9 例、胃 3 例、卵巣 1 例、前立腺 1 例、膵 1 例であった。

術前併存症としては肝硬変が 17 例にみられ、その他心疾患 4 例、肺疾患 3 例、高血圧 2 例などがみられた(表 2)。術後入院死亡は肝不全を発症した 1 例(mortality 1.4%、肝細胞癌再発に対して肝区域切除施行した 68 歳男性)、合併症としては胆汁瘻 6 例、創感染・創開 3 例、虚血性心疾患 2 例、腹腔内出血 1 例がみられ、腹腔内出血の 1 例に再手術が必要であった(morbidity 18.3%、表 3)。

肝切除検体を薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究に供するために肝切除量に配慮することはなかった。また検体を上記研究に供するときは、自治医科大学倫理委員会により承認された、説明文書および同意書を用い、十分にインフォームド・コンセントを行った。上記検討には 3 例の切除肝を提供した。

2. 人工肝臓作成と薬剤量の測定

生理食塩水を定常流量(60ml/hr x 4 時間)でカラム内を灌流する検討では、回収率 95.5-112.4%、平均 101.5%とほぼ全量回収が可能であった。また HPLC 法にて、試料サンプル用いて diazepam およびその代謝産物の nordiazepam、oxazepam、temazepam 濃度測定を行った(図 2)。測定結果は再現性があり、十分に信頼に耐えるものであった。

D. 考察

1. 肝切除術

当科における肝切除術は、2000 年 39 例、2001 年 56 例、2002 年 71 例と増加の傾向にある。この原因のひとつは、2001 年から当院で開始された生体肝移植である。肝移植ドナーの肝切除術は 2001 年 11 例、2002 年 26 例で、この例を除くと 2001 年 45 例、2002 年 45 例となる。2002 年の疾患別内訳では肝細胞癌、転移性肝癌でほぼ 90%を占める。肝臓の薬剤代謝を考える上で、肝細胞癌症例は背景に肝硬変を認めるため、別個に検討する必要がある。転移性肝癌症例などが薬剤曝露、遺伝子発現の検討には有効であると考えられた。

2. 人工肝臓作成と薬剤量の測定

今年度は、ヒト肝細胞株 HepG2 3A4 を用いて作成した人工肝臓カラムにおける、diazepam の細胞内透過性の検討は基礎的な段階で終了した。今後の実施計画としては実験動物としてはイヌを用いて体外循環を行い、人工肝臓カラムによる diazepam 代謝メカニズムの解明を目指したい。

E. 結論

2002 年当科における肝切除症例は 71 例あり、mortality 1.4%、morbidity 18.3%であった。近年当科における肝切除症例は増加の傾向にある。人工肝臓カラムによる diazepam 代謝メカニズムの解明は基礎実験を終えた。次年度にはイヌを用いた体外循環による検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

表1 1. 肝切除術内
訳

	肝葉切除術	肝区域切除術	肝部分切除術	合計
肝細胞癌		13	4	17
胆管細胞癌		2		2
転移性肝癌	3	8	4	15
その他の肝腫瘍	1	2		3
肝移植ドナー	7	19		26
肝内結石症		2		2
胆管癌			3	3
胆嚢癌	2			2
その他の胆道疾患	1			1
合計	14	46	11	71

表2 2. 術前併存疾患

肝硬変	17
心疾患	4
肺疾患	3
高血圧	2
糖尿病	1
合計	27

表3 3. 術後合併症

		再手術	入院死亡
胆汁瘻	6		
創感染・創_開	3		
虚血性心疾患	2		
腹腔内出血	1	1	
肝不全	1		1
合計	13	1	1

図1. 人工肝臓カラム

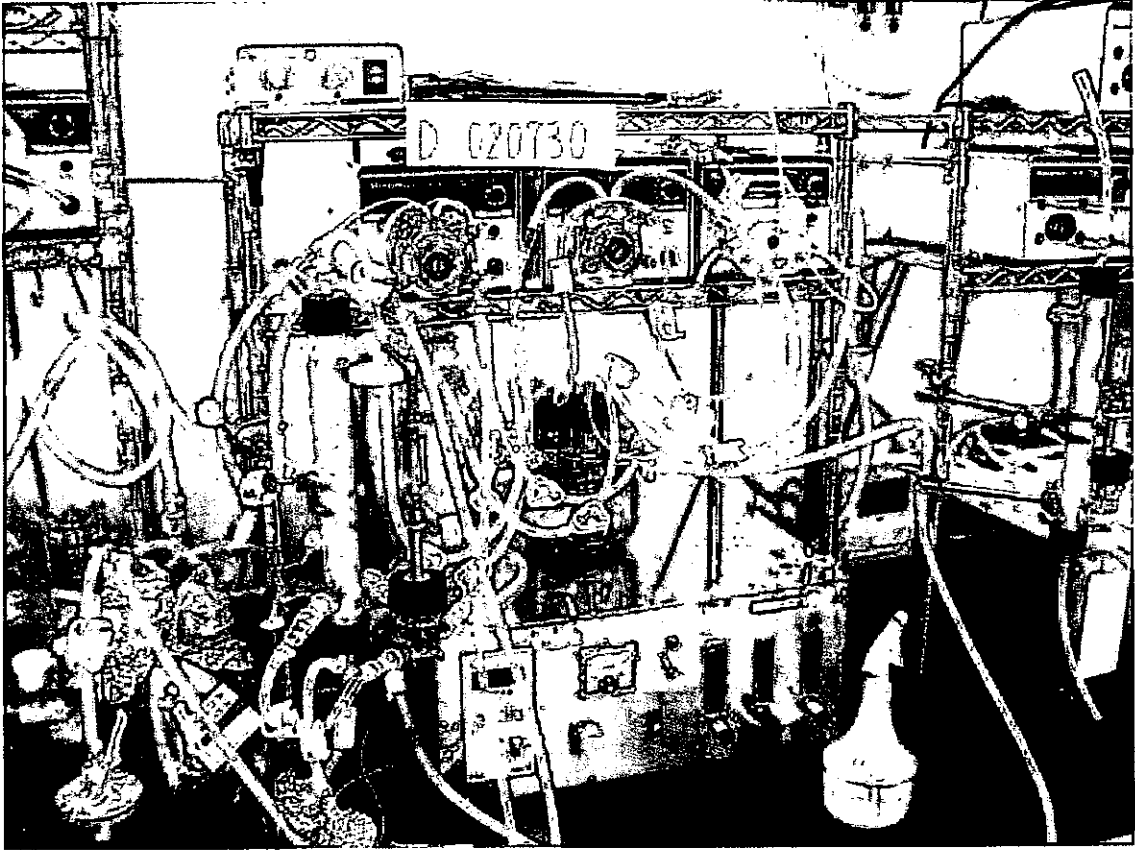
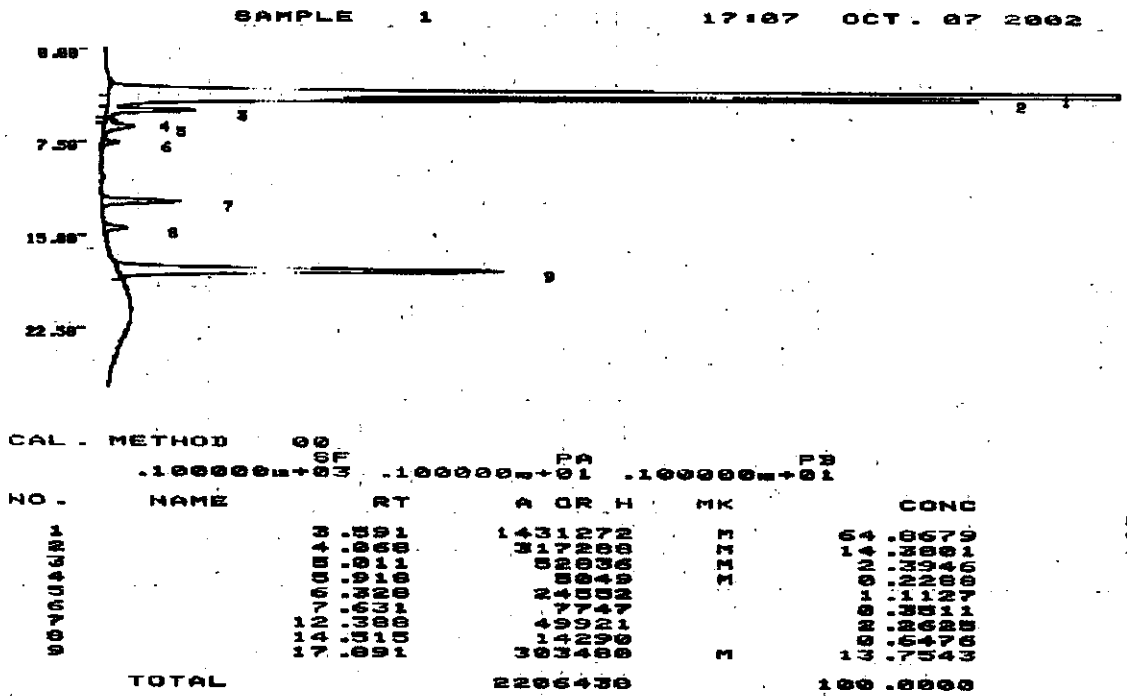


図2. 典型的な HPLC チャート



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

臨床腎臓検体の採取・初代培養システムの構築

分担研究者 徳江章彦 自治医大泌尿器科学教授

分担研究者 今井正 自治医科大学薬理学教授

分担研究者 大島康雄 自治医大臨床薬理学助手

研究要旨

本プロジェクトにおいて臨床サンプルを安定して得ること、およびその品質を管理することはプロジェクト全体の根幹をなす。本プロジェクトの開始より平成15年2月までの間に本院で片腎摘出術を施行された症例のうち、インフォームドコンセントを得て本研究へエントリーした10症例につき検討した。本年度は、細胞分離の手法の確立と得られた細胞の品質の評価を行ったので、これらについて報告する。

A. 研究目的

今後我々の研究で利用する腎臓由来の上皮性細胞（主に尿細管細胞）を安定して分離する技術の確立とその信頼性・再現性を検討する。

B. 研究方法

平成15年2月までに本研究に賛同して頂いた患者さん10症例につき検討した。コラーゲナーゼ処理やホモゲナイゼーション処理、ディスパーゼ処理やトリプシン・EDTA処理を組み合わせることで細胞が得られるか否かを評価した。得られた細胞はその形態から線維芽細胞などとは明らかに違う上皮性の細胞であったため、尿細管細胞と考えられたが、確認のため膜表面 Glut-2 タンパク質の発現を FACS で、 γ G T P の発現を細胞化学的にそれ

ぞれ評価した。さらに培養上清中の β 2 ミクログロビンと N A G の濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究に用いた細胞はすべて、当研究グループの倫理評価 WG が承認した方法で得た臨床検体である。

C. 研究結果

表1に示すとおり研究にエントリーして頂いた10症例のうち6例より細胞の分離に成功した。2例は温阻血時間が60分を超えた時点でまだ腎臓が切除できる見込みがなかったため手術中に組織の採取を断念した。処理の手法としては Case1 で行ったトリプシン EDTA 単独での処理で細胞が得られたが、Case2 ではトリプシン EDTA 単独では細胞が得ら

れず、これにコラーゲナーゼ処理を加えたが細胞はやはり得られなかった。我々が試みた範囲ではディスパーゼ処理およびトリプシン EDTA 処理がもっとも再現性よく生きた細胞を得ることができるようであった。

表 1 症例一覧

Case #	年齢 性別	温阻血 min	処理	結果
Case1	78/M	12	T&EDTA	細胞が得られた
Case2	48/M	79	C + T&EDTA	細胞が得られず
Case3	46/M	60	N/A	採取断念
Case4	63/M	60	N/A	採取断念
Case5	57/M	12	D + T&EDTA	細胞が得られた
Case6	65/F	58	D + T&EDTA	細胞が得られた
Case7	73/F	10	T&EDTA + H	細胞が得られず
Case8	47/M	38	D + T&EDTA	細胞が得られた
Case9	76/M	68	D + T&EDTA	細胞が得られた
Case10	35/M	50	D + T&EDTA	細胞が得られた

略語：T&EDTA、トリプシン・EDTA 処理； C、コラーゲナーゼ処理； H、ホモゲナイゼーション； D、ディスパーゼ処理

得られた細胞は、形態的には上皮由来のほぼ均一なものであった。これらの細胞には膜表面 Glut-2、 γ G T P、N A G が発現しており、調べた範囲では尿細管細胞由来の細胞として矛盾がない。

D. 考察

これまでの報告ではコラーゲナーゼ処理とホモゲナイゼーションの組み合わせが、尿細管細胞の分離にしばしば用いられているが、我々が試みた範囲では、ディスパーゼ処理とトリプシン EDTA 処理を組み合わせることにより比較的安定して尿細管細胞を得ることができた。症例間の条件に差があり症例数も少ないために厳密な比較試験という形にはなっていない

が、ディスパーゼ処理とトリプシン EDTA 処理の組み合わせは細胞を得る目的に適していると考えられる。得られた細胞の形態や様々なタンパク質の発現パターンから、この得られた細胞は尿細管細胞としての形質を有していると考えられた。

E. 結論

ディスパーゼ処理とトリプシン EDTA 処理の組み合わせは、尿細管細胞の分離に適している。こうして得られた尿細管細胞は少なくとも一部の尿細管としての形質を保持していた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

DNA マイクロアレー装置管理・データ解析手法の推進に関する研究

分担研究者 間野博行 自治医科大学ゲノム機能研究部教授

研究要旨

ヒトの様々な疾患細胞に対して薬剤の有効性及びその副作用の程度をあらかじめ予測することは未だ困難である。DNA マイクロアレーは数千～数万種類のヒト遺伝子に関する発現量を網羅的に解析する最新の研究機器であり、トキシコゲノミクス解析においても中心的な役割を果たすと期待される。本研究計画では少量のヒト細胞を用いた DNA アレー解析システムを確立し既に複数の薬剤感受性関連遺伝子の候補を同定した。

A. 研究目的

治療目的の薬剤による重篤な副作用はしばしば致死的であり、実際の臨床の場においては各個人における副作用の発症予測法の開発が急務である。これまで齧歯類等の組織・細胞株を用いた発現解析による薬剤感受性メカニズムの解析は報告があったが、実際のヒト臨床検体を用いた網羅的発現解析は稀であった。本年度の分担研究においては微量のヒト検体を用いた信頼性の高い DNA チップスクリーニング法の確立を目指し、さらに薬剤感受性関連遺伝子の候補を同定することを試みた。

B. 研究方法

- 1) まず微量のサンプルよりの再現性の良い mRNA 増幅法の確立を目指

した。患者検体よりトータル RNA を抽出した後、T7 RNA ポリメラーゼの結合配列を含んだオリゴ dT ヌクレオチドをプライマーとして 1st strand complementary DNA (cDNA) を合成した。これを二本鎖の cDNA に変換した後、T7RNA ポリメラーゼによって complementary RNA (cRNA) を増幅した。次に random 6-mer オリゴヌクレオチドをこれに結合させ、増幅 cRNA を基質とした cDNA をさらに合成した。本ステップサイクルで mRNA 分画を約 50-100 倍に増幅することに成功し、これを繰り返し替えることで任意の量の cRNA を得ることが可能となった。

- 2) 0.5~1 μ g の cRNA を基質として二本鎖 cDNA を合成し、さらに T7 RNA ポリメラーゼを反応させることで数十 μ g の cRNA を合成した。その際ビオチン化した NTP を添加することでランダムにビオチン標識された cRNA を得た。これを Affymetrix 社のヒト GeneChip とハイブリダイズさせ、洗浄した。ビオチン化 cRNA のチップ上スポットへの結合量は、蛍光色素 phycoerythrin (PE) 結合ストレプトアビジンにさらにハイブリダイズさせ、レーザーで励起させることで PE からの蛍光強度として検出した。
- 3) 寛解導入目的の化学療法によって完全寛解に至った白血病患者骨髄細胞と完全寛解導入に失敗した患者骨髄細胞を DNA チップによって発現比較を行い、後者特異的遺伝子の同定を目指した。

(倫理面への配慮)

本研究計画はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠した自治医科大学の倫理委員会の認可を受けており、患者さまには研究計画の説明とサンプルの提供を希望する説明書をお渡しし、同意書に署名をいただいている。

C&D. 研究結果及び考察

- 1) まず我々の mRNA 増幅法が安定かつ再現性良いことを確認する目的で、トータル RNA 及びそれより一

回増幅した cRNA (aRNA1)、2 回増幅した cRNA (aRNA2) について同じタイプの GeneChip に結合させ、遺伝子発現量の比較を行った。その結果ピアソンの相関係数はトータル RNA と aRNA1 間で 0.807 であり、aRNA1 と aRNA2 間では 0.931 であった。このように我々の RNA 増幅法は本来の RNA 分布を良く保った形で行われていることが明らかになった。

- 2) 次に寛解療法抵抗性白血病と治療感受性白血病患者骨髄細胞を GeneChip によって比較し、治療抵抗性患者においてのみ発現量が亢進している遺伝子群の同定を目指した。その結果、複数の遺伝子が前者特異的に発現することが判り、またその一部については定量的 real-time PCR 法によっても発現特異性が確認された。さらに興味深いことに遺伝子 A (特許申請中) は血液細胞に発現導入することによりピンクアルカロイド系薬剤に対する抵抗性を誘導することが示された。

E. 結論

以上より我々は安定した RNA 増幅法を確立し、今後の本研究計画に対する基盤技術の開発に成功した。しかも既に薬剤感受性規程遺伝子の候補を同定することにも成功しており、DNA チップ解析の有効性を実証した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 主な論文発表

- 1) Yoshida K, Ueno S, Iwao T, Yamasaki S, Tsuchida A, Ohmine K, Ueda M, Yamashita Y, Ota J, Chayama K, Sato K and Mano H. "Identification of pancreatic ductal carcinoma-specific genes by DNA microarray with ductal cells of normal- and cancer-origin" Cancer Sci in press.
- 2) Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T. "Gα12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF" Proc Natl Acad Sci USA 100: 733-738, 2003.
- 3) Mano H "TEC KINASES" in Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine. (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ) 3107-3110, 2002.
- 4) Ohki R, Yamamoto K, Mano H, Lee RT, Ikeda U and Shimada K. "Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays" J Hypertens 20: 685-691, 2002.
- 5) Makishima H, Ishida F, Ito T, Kitano K, Ueno S, Ohmine K, Yamashita Y, Ota J, Ota M, Yamauchi K and Mano H. "DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes" Br J Haematol 118: 462-469, 2002.

2. 主な学会発表

- 1) 間野博行「BAMP スクリーニング：白血病解析への包括的アプローチ」第64回日本血液学会・第44回日本臨床血液学会合同総会合同シンポジウムにて招待講演（平成14年9月、横浜）
- 2) 間野博行「造血幹細胞を用いた新しいDNA マイクロアレイスクリーニング法」第47回日本人類遺伝学会総会シンポジウムにて招待講演（平成14年11月、名古屋）

H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髄異形成症候群(MDS)の検出方法及びMDSの治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日
- 2) 国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日
- 3) 出願番号：特願 2001-337752・発明者：間野博行・名称「多発性骨髄腫の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日：2001年11月2日
- 4) 出願番号：特願 2001-