

D. 研究発表

1. 論文発表

1. L. Muller, D. Blakey, K. L. Dearfield, S. Gal-  
loway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D.  
Kirkland, J.T. Macregor, J. M. Parry, L.  
Schechtman, A. Smith, N. Tanaka and H.  
Yamasaki: Strategy for genotoxicity testing  
and stratification of genotoxicity test re-  
sults-report on initial activities of the IWGT  
Expert Group, Mutation Research 540:165-176  
(2003).

2. 渡辺美香、小林美和子、佐々木澄志、田中憲穂、  
V79細胞を用いたコロニー形成試験における低pH  
による重金属の細胞毒性作用の変化、秦野研究所

年報 26:14-18 (2003) .

3. Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka,  
Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten: The  
long-term foreign body reaction is not in-  
fluenced by initial implant material cyto-  
toxicity, submitted to Biomaterials &  
Biocompatibility (2004).
4. Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada,  
Noriho Tanaka and Makoto Umeda: An assay method  
for the prediction of tumor promoting poten-  
tial of chemicals by the use of Bhas 42 cells,  
Mutation Res., 557, 191-202(2004).

2. 学会発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

ヒト尿路上皮腫瘍（腎臓癌、膀胱癌等）及び後腹膜の肉腫の樹立に関する研究

分担研究者 執印太郎 高知大学医学部腎泌尿器制御学講座 教授

研究要旨

ヒト尿路上皮腫瘍（腎臓癌、膀胱癌）は年間に合計二万三千名（腎：八千、膀胱一万五千）の発症があり死亡者が約八千名（腎臓癌：三千、膀胱：五千）あるが、その有効な治療法は確立されていない。後腹膜発生腫瘍の症例は少ないが殆どが進展例で難治性である。近年ゲノムプロジェクトの進展に伴い、分子標的治療、免疫ペプチド療法などの革新的な治療法の発展が予測される。そのため遺伝子発現解析の研究材料となる尿路及び後腹膜悪性腫瘍の細胞株の確立されたものは必須と考えられる。本研究では尿路系と後腹膜腫瘍の細胞株の確立を目指して腎臓癌2株（原発腫瘍1株、腎臓癌副腎転移1株）、比較的希な孤立性線維性腫瘍(malignant solitary fibrous tumor)1株の確立を行った。

A. 研究目的

ヒト尿路上皮腫瘍（腎臓癌、膀胱癌等）及び後腹膜の腫瘍（肉腫）は国内の発症数が合計二万三千名、死亡者数が八千名とされているが、手術以外に有効な治療法は確立されていない。又これらの腫瘍で確立され研究に利用出来る株細胞は少ない。今後、発展すると予測されるゲノム解析研究及び、それに基づく分子標的治療、免疫ペプチド療法などの革新的な研究を基盤からサポートする目的で、ヒト尿路上皮腫瘍（腎臓癌、膀胱癌等）及び後腹膜腫瘍の樹立に関する研究を行った。これらの研究により材料の細胞株を細胞バンクに今後提供する。

B. 研究方法

手術材料から得た腫瘍検体1cm角をD-MEM+10%FBSに入れて約20分間細切後にD-MEM+10%FBS10mlと10%コラゲナーゼ10mlを加えて37度で3時間攪拌し、攪拌後にD-MEM30mlを加え1500rpm5分間遠沈した。上清を除去し細胞にD-MEM+20%FBSを加えて初代培養した。0.25%トリプシン/0.02%EDTA処理して1:3から4希釈して継代培養し安定して継代培養が可能な株細胞の確立を行った。検体によっては細切し

たものをPlastic dishに直接播種する explant 法も行った。

(倫理面への配慮)

我々は学内の3省庁の倫理指針に基づいた組織検体（細胞株）と血液検体を匿名で患者さんより取得するため、又細胞バンクに寄託するための研究計画書を倫理委員会に提出し許可を得ている。また、患者さんより同意を取得している。

C. 研究結果

今回の研究で、比較的希な後腹膜腫瘍、malignant solitary fibrous tumor 1株と腎臓癌副腎転移1株、原発腎臓癌1株を確立した。

KMF-1

54歳女性で左副腎から発生した腫瘍検体から確立した細胞株である。この症例はmalignant melanomaも合併していた。標本は病理診断がsolitary fibrous tumorであった。孤立性線維性腫瘍(Solitary fibrous tumor)は希な腫瘍で主に胸膜から発生するとされている。この腫瘍は主に間葉系から発生し、胸膜、脳、軟部組織、骨皮膜、肝臓、

腎臓、眼窩、咽頭喉頭から発生する。病理標本上は卵円形から spindle 型の細胞が混在している。非上皮性腫瘍であるが培養細胞の形態は多角形で比較的大型の細胞である。細胞の増殖速度は比較的遅い。世界で初めて後腹膜由来の solitary fibrous tumor 培養細胞として確立したという論文報告を現在投稿中である。solitary fibrous tumor はこれまで細胞株として確立したものはなく後腹膜発生の腫瘍の解析に有用である。

#### KMRM-A 1

75歳男性、腎臓癌の対側の副腎転移から確立した細胞株である。転移性腎臓癌の細胞組織型は clear cell carcinoma (淡明型腎細胞癌)、Grade3 であり、血管成分が多い腫瘍組織である。確立した細胞の von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の遺伝子変異は陰性である。細胞形態は繊維芽細胞様、spindle 型である。細胞の増殖速度は遅い。clear cell 型腎細胞癌は VHL 遺伝子変異陽性のものと VHL 遺伝子変異陰性のものに分けられ、遺伝子異常から考えておのおのが異なった発生経路を持つ腫瘍と考えられる。VHL 遺伝子変異陰性の癌は遺伝子変異陽性の癌に比べて多臓器転移が多く予後が悪いとされる。この症例は初診時に皮膚転移で発見されている。いくつかの発生経路を持つと考えられる VHL 遺伝子陰性の clear cell 型腎臓癌の遺伝子発現の特徴と発生経路の解析に有用な株細胞と考えられる。

#### KMRC-2 1

60歳男性、腎臓癌から確立した細胞株である。病理組織型は clear cell carcinoma (淡明型腎細胞癌)、悪性度 Grade3>Grade2、infiltrating type、静脈浸潤陽性であった。他臓器転移(-)、確立した細胞の von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の遺伝子変異陽性、nucleotide262(T → A)、Amino acid 88 (Try → Arg)、細胞形態は多角形から一部繊維芽細胞様、細胞増殖速度は中等度である。このように腎細胞癌発生の最初の trigger となるとされる癌抑制遺伝子の VHL 遺伝子変異が決定されており、VHL 遺伝子陽性の clear cell 型腎臓癌の遺伝子発現の特徴と発生経路の解析に有用な株細胞と考えられる。

#### D. 考察

ヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜の腫瘍(肉腫)は国内の発症数、死亡数とも比較的多い腫瘍であるが、手術以外に有効な治療法は確立されていない。又これらの腫瘍で細胞株として確立し細胞バンクに寄託されて研究に利用が可能な株細胞は少ない。今後、ゲノム解析研究及び、それに基づく分子標的治療、免疫ペプチド療法などの革新的な研究が発展すると予測される現在、細胞バンクという点でこれらの基盤からサポートする目的でヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜腫瘍の樹立に関する研究を行った。

本研究における最大の大きな目的は、収集した培養細胞研究資源を最大限に生かすために必要な研究資源基盤を国内に確立することにある。我々は3省庁の倫理指針を遵守してその旨の研究計画書を本学倫理委員会に申請して許可を得ている。

KMF-1 は主に胸膜より発生する solitary fibrous tumor が後腹膜より発生したものを偶然、細胞株化することができたものである。Mesenchyme (間葉系) origin の希な腫瘍から確立されている。この分野の研究は少ないため重要な研究用の細胞資源となりうると考えられる。

KMRM-A 1 は腎臓癌では比較的希な副腎転移より確立された株細胞であり、病理型は clear cell carcinoma (淡明型腎細胞癌) であるが、確立された細胞株は繊維芽細胞様であり病理組織所見にみられた最も悪性度の高い腎臓癌細胞の特徴を示している。また、von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子変異は陰性である。腎細胞癌の発生と転移の機序を解明するには有効な細胞株と考えられる。

KMRC-2 1 は VHL 遺伝子変異陽性、細胞株の形態もほぼ上皮様である。従来から VHL 遺伝子変異陽性の clear cell 型の腎細胞癌細胞をいくつかバンクに寄託しているが、この癌細胞は VHL 遺伝子 213 アミノ酸の中で 88 番目の遺伝子異常であり、VHL 蛋白の機能から考えると ElonginC と結合する Alpha-domain やユビキチン化を受けるために基質蛋白が結合する beta-domain のどちらの異常でもでもないため、VHL 蛋白の con-

formationを微妙に変化させている蛋白の構造異常と予測される。VHL蛋白の機能を解析する点では興味深い細胞株といえる。我々は以前にVHL遺伝子の変異(+)腎癌4株、VHL遺伝子の変異(-)腎癌株1株を寄託しておりこれらを参考に研究材料になる。

今後、本教室ではこれらの特徴のある細胞株を細胞バンクに寄託して今後、ゲノム解析研究及び、それに基づく分子標的治療、免疫ペプチド療法などの革新的な研究が発展に寄与するための基盤を支援していく。

#### E. 結論

本研究では尿路系と後腹膜腫瘍の細胞株の確立を目指して腎臓癌2株(原発腫瘍1株、腎臓癌副腎転移1株)を確立した。腎臓癌1株は腎臓癌の主な原因遺伝子で癌抑制遺伝子の von Hippel-Lindau 病遺伝子変異陰性、1株は陽性であった。また、比較的希なmesenchymal originの後腹膜腫瘍malignant solitary fibrous tumor1株の確立を行った。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

1. 庵地孝嗣、後腹膜孤立性線維性腫瘍(Solitary Fibrous Tumor)の1例、第55回日本泌尿器科学会西日本総会、2003年11月15日。

#### 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（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

## ヒト食道癌由来細胞株・膵癌由来細胞株の樹立に関する研究

分担研究者 嶋田 裕 京都大学医学研究科腫瘍外科学 講師

### 研究要旨

本年度 KYSE-serise のうち 3 株 (KYSE170, 180, 190) を寄託した。これらの細胞はそれぞれ個性的な性格を有し、すでに主要な遺伝子解析が行われていることから食道癌研究に必要な欠くべからざる資料となりうる物である。現在も継続して細胞株の樹立を進めている。また知的財産権について、京都大学と細胞使用希望者との MTA の取り交わしを基本とすることで細胞バンクとの調整がほぼ終了し、その施行に当たってのアウトラインが試作された。

### A. 研究目的

食道癌・膵癌は難治癌で、その治療成績の向上は急務である。その為には研究による成果の積み重ねが必要であり、研究の遂行には容易に実験系を作成できる細胞株が不可欠である。しかしながら、現在までに樹立が報告された細胞株のうち、現在でも使用可能な細胞株の絶対数が不足しており、細胞のさらなる樹立を目的とした。

### B. 研究方法

インフォームドコンセントにより承諾の得られた食道癌・膵癌の患者さんの切除標本より、食道癌細胞株および膵癌細胞株の樹立を試みた。樹立細胞における遺伝子解析を行い、食道癌に関与する癌遺伝子および癌抑制遺伝子の解析を行った。近年は CGH 解析およびマイクロアレイによる網羅的解析を行った。遺伝子解析が行われ、生物学的評価が定まった細胞株について細胞バンクへの寄託を行うこととした。（倫理委員会における承認番号 #232, #548, #G48）

### C. 研究結果

#### 1. 知的所有権の明記

我々は、現在まで 50 株の細胞の樹立に成功した。このうち昨年までに 6 株、本年度 3 株を細胞バンク

に寄託した。近年、樹立したヒト培養細胞について、細胞の提供者の方々の同意が重視されるようになってきているのと同時に、樹立者ならびに樹立者が所属する研究機関の知的財産権が国際的に重視される傾向になりつつある。そのため、京都大学においては培養細胞のような知的財産権が付与されると考えられる研究資源を公的な研究資源バンク等に提供する際には、資源の利用方法などに関する何らかの取り決めを定めておく必要があるという認識が確立しつつある。そこで、我々は、JCRB 細胞バンクの担当者である主任研究者と相談のうえ、次のようなモデルを試作することとした。

基本的な考え方として、公的で非営利組織である大学や研究機関に所属する研究者が細胞を研究に利用することは妨げないものとする。従って、JCRB 細胞バンクを通じて非営利を目的とする大学や研究機関に分譲することはこれまでどおりの方法を踏襲することとした。しかし、何らかの営利目的で研究を実施する機会が多いと考えられる企業並びに企業に所属する研究機関が細胞を利用する場合は、細胞の分譲依頼に先立ち樹立者と協議のうえ MTA を取り交わした上で JCRB に細胞の分譲を申し込むという方法を採用することとした。そのため、JCRB 細胞バンクからインターネット上に公開される細胞のカタログ情報の中に、企業利用者

は事前に樹立者と相談するよう促す文書を添付することとした。

このような方法を採用することで、培養細胞に付随する知的所有権の所在を明確にすることは今後重要になると考えるものである。

## 2. 細胞の性状確認

樹立細胞の解析については食道癌細胞株の樹立と予後が相関することと、食道癌細胞株樹立に関係する遺伝子はp53, MDM2であることが明らかとなった(Shimada Y. Clin Cancer Res 2003)。またCCR7陽性食道癌患者がリンパ節転移を来しやすく、予後不良であるが、その理由としてCCR7陽性食道癌細胞株がリガンドの刺激によりあたかも樹状細胞のように突起を出してリンパ節に移動することを示唆した(Ding Y. Clin Cancer Res 2003)。近年、肺癌の癌抑制遺伝子として同定されたTSLC1が食道癌でもメチレーションにより発現が抑制されており、それらの症例は予後不良であることと、TSLC1欠損株にTSLC1を導入することにより食道癌の増殖がほぼ100%抑制されることを明かとした。(Ito T. Cancer Res 2003)。網羅的CGH解析により見いだされたZASC1もメチレーションが関与して食道癌で発現が低下していることが細胞株で明かとなった(Imoto Cancer Res 2003)。また食道癌細胞株10株でPPARgamma/RXRヘテロダイマーの発現が認められ、PPARgammaおよびRXRのリガンド投与により食道癌細胞株において増殖抑制の相乗効果が得られた(Hashimoto Y. Eur J Cancer 2003)。さらには食道癌細胞株を含めた消化器癌がhedgrhogシグナルにより広範に刺激を受けていることを明かとした(Berman Nature 2003)。

## D. 考察

食道癌細胞株は広範な遺伝子変化を生じているが、新鮮切除標本と組み合わせて解析することにより、癌独自の遺伝子変化と生体の間葉系細胞との反応が生体内では存在していることが明らかとなった。細胞株は癌独自の遺伝子変化の解析及び、遺伝子導入としてのターゲットであり、食道癌の細胞生物学的機構解明の強力なツールである。

## E. 結論

我々の樹立した細胞株は種々の遺伝子発現や遺伝子発現抑制が認められ、食道癌研究に有用な資

料提供をおこなえる。今後も継続して細胞株樹立に務めていきたい。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes de Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA., Widespread requirement for hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours., Nature 425: 846-851, 2003.
- 2) Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, Murakami Y, Imamura M., Involvement of TSLC1 in Progression of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Cancer Res 63: 6320-6326, 2003.
- 3) Hashimoto Y, Shimada Y, Itami A, Ito T, Kawamura J, kawabe A, kaganoi J, Maeda M, Watanabe G, Imamura M, Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma., Eur J cancer 39 : 2239-2246, 2003.
- 4) Ding Y, Shimada Y, Maeda M, Kawabe A, Kaganoi J, Komoto I, Hashimoto Y, Miyake M, Hashida H, Imamura M, Association of CC chemokine receptor-7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma Clin Cancer Res 9: 3406-3412 2003.
- 5) Shimada Y, Maeda M, Watanabe G, Yamasaki S, Komoto I, Kaganoi J, Kan T, Hashimoto Y, Imoto I, Inazawa J, Imamura M. Cell culture in esophageal squamous cell carcinoma and the association with molecular markers. Clin Cancer Res 9: 243-249, 2003.

### 2. 学会発表

- 1) Kan Kondo, Naoki Teratani, Takatsugu Kan, Seiji Yamasaki, Yutaka Shimada, Masayuki Imamura, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) used synergistically with Cisplatin (CDDP) induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma (SCC) through activation of both the extrinsic and the intrinsic apoptosis path-

- ways, 94th annual meeting of AACR Washington 2003. 7. 12.
- 2) Naoki Teratani, Kan Kondo, Takatsugu Kan, Seiji Yamasaki, Yutaka Shimada, Masayuki Imamura, Epigenetic control of gene expressions in esophageal cancers and normal esophageal epithelium - from analysis of cyclinD2 gene and protein, 94th annual meeting of AACR Washington 2003. 7. 12.
  - 3) Shiro Nagatani, Junichi Kaganoi, Michio Okabe, Yutaka Shimada, Takatsugu Kan, Go Watanabe, Masayuki Imamura, MMP2 and MMP9 are negatively regulated by STAT1 in esophageal squamous cell carcinoma cells, 94th annual meeting of AACR Washington 2003. 7. 12.
  - 4) Takatsugu Kan, Yutaka Shimada, Fumiaki Sato, Go Watanabe, Shiro Nagatani, Masato Maeda, Seiji Yamasaki, Stephen J. Meltzer, Masayuki Imamura. Prediction of lymph node metastasis using artificial neural network analysis based on gene expression profiles in esophageal squamous cell carcinomas, 94th annual meeting of AACR Washington, 2003. 7. 13.
  - 5) Junichiro Kawamura, Izumi Komoto, Yutaka Shimada, Ryuichiro Doi, Koji Fujimoto, Kan Kondo, Yoshinori Ino, Michiie Sakamoto, Setsuo Hirohashi, Masayuki Imamura. Immunohistochemical Analysis of the cell-cell adhesion molecules in gastrinoma 94th annual meeting of AACR Washington 2003. 7. 12.
  - 6) Yosuke Hashimoto, Yutaka Shimada, Masato Maeda, Izumi Komoto, Toshihiko Masui, Junichiro Kawamura, Tetsuo Ito, Harutaka Inoue, Ryuichiro Doi, Masayuki Imamura, Loss of tight junction formation is associated with fascin expression in pancreatic carcinoma. 94th annual meeting of AACR Washington 2003. 7. 12.
  - 7) Toshiya Soma, Yutaka Shimada, Atsushi Kawabe, Yosuke Hashimoto, Junichi Kaganoi, Masato Maeda, Masayuki Imamura. Induction of prostaglandin E synthase (PGES) by gastro-esophageal reflux (GER) contents in normal and cancer cells of the esophagus. 94th annual meeting of AACR Washington 2003. 7. 13.
  - 8) Junichi Kaganoi, Shiro Nagatani, Michio Okabe, Yutaka Shimada, Go Watanabe, Kanji Ishizaki, Masayuki Imamura, Distinct Roles of IFN-gamma-STAT1 Pathway between Cancer Cells and Normal Cells in Esophageal Squamous Epithelium, 94th annual meeting of AACR, Washington, 2003. 7. 12.
  - 9) Tetsuo Ito, Yutaka Shimada, Yosuke Hashimoto, Junichi Kaganoi, Takatsugu Kan, Go Watanabe, Yoshinori Murakami, Masayuki Imamura, The role of TSLC1 gene in esophageal squamous cell carcinoma, 94th annual meeting of AACR, Washington, 2003. 7. 12.
  - 10) Watanabe Go, Kaganoi Junichi, Nagatani Shiro, Okabe Michihiko, Shimada Yutaka, Kan Takatsugu, Imamura Masayuki, STAT3 constitutive activation of normal esophageal epithelial cells, 94th annual meeting of AACR, Washington, 2003. 7. 12
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

ヒト膵臓癌由来細胞株、肺癌由来細胞株の樹立に関する研究

分担研究者 井口 東郎 国立病院九州がんセンター 医長

研究要旨

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の起因物質として単離され、骨転移や癌悪液質などの癌に関わる様々な病態との関連が示唆されているPTH関連蛋白(PTHrP)を産生・分泌する肺癌由来細胞3株を樹立し、その病態解明のための実験系の構築を行っている。

A. 研究目的

PTH関連蛋白(PTH-related protein; PTHrP)は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の起因物質として単離されたが、それ以外にも骨転移や癌悪液質などの癌に関わる様々な病態との関連が示唆されている。本年度は、PTHrPを発現した細胞株を樹立し、これら病態解明の実験系の構築を目的としている。

ヌードマウスへの皮下接種によってマウスに高カルシウム血症が観察され、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症のin vivoモデルとしてその病態解明に有用な手段となる。また、HARA細胞をヌードマウス心腔内に接種することで、その4-8週後に高率に溶骨性骨転移が誘導され、骨転移のin vivoモデルとして骨転移機構の解明あるいは骨転移に対する治療薬の開発にとって有用な実験系と考えられる。

B. 研究方法及び結果

1. 寄託した細胞及びその特徴

本年度はPTHrPを発現したヒト肺癌細胞株3種を寄託した。

1). HARA細胞

樹立経過：肺扁平上皮癌患者（57歳、男性）の胸水より樹立した。本患者は高度の高カルシウム血症（15.8 mg/dl）を合併しており、PTHrPの血清レベルがC端アッセイで1408 pmol/Lと著明に高値であった。

意義：PTHrPを発現した癌細胞は数多くみられるが、とりわけこのHARA細胞はPTHrPを高発現しており、

当該細胞関連文献

1. Iguchi, H., Katakami, H., Ichinose, Y., Nishi, Y., Tanaka, S., Hara, N., Ohta, M., Haji, M., and Nawata, H. : A case of squamous cell lung carcinoma with high concentration of parathyroid hormone-related peptide in serum and pleural effusion presenting hypercalcemia. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84 : 419-424, 1993.
2. Ichinose, Y., Iguchi, H., Ohta, M., and Katakami, H. : Establishment of lung cancer cell line producing parathyroid hormone-related protein. *Cancer Lett.*, 74 : 119-124, 1993.
3. Iguchi, H., Tanaka, S., Ozawa, Y., Kashiwakuma,

- T., Kimura, T., Hiraga, T., Ozawa, H., and Kono, A. : An experimental model of bone metastasis by human lung cancer cells: the role of parathyroid hormone-related protein in bone metastasis. *Cancer Res.*, 56 : 4040-4043, 1996.
4. Iguchi, H., Onuma, E., Sato, K., and Ogata, E. : Involvement of parathyroid hormone-related protein in experimental cachexia induced by a human lung cancer-derived cell line established from a bone metastasis specimen. *Int. J. Cancer*, 94 : 24-27, 2001.
- 2). HARA-B細胞
- 樹立経過: HARA細胞のヌードマウス心腔内接種によって形成される骨転移巣から樹立した細胞で“bone”の“b”をとって“HARA-B”と命名した。
- 3). MS-1-L
- 樹立経過: 肺小細胞癌患者(54歳、男性)の胸水より樹立された細胞で、フラスコには接着せず浮遊細胞として増殖する。
3. Iguchi, H., Tanaka, S., Ozawa, Y., Kashiwakuma, T., Kimura, T., Hiraga, T., Ozawa, H., and Kono, A. : An experimental model of bone metastasis by human lung cancer cells : the role of parathyroid hormone-related protein in bone metastasis. *Cancer Res.*, 56 : 4040-4043, 1996.
4. Iguchi, H., Onuma, E., Sato, K., and Ogata, E. : Involvement of parathyroid hormone-related protein in experimental cachexia induced by a human lung cancer-derived cell line established from a bone metastasis specimen. *Int. J. Cancer*, 94 : 24-27, 2001.

意義: HARA-B細胞ではHARA細胞に比較してPTHrPの発現がさらに増加している。ヌードマウス心腔内接種による骨転移形成は、HARA細胞で既に90%以上という高率に骨転移を認めるが、HARA-B細胞でも同等あるいはそれ以上の頻度で骨転移形成がみられる。PTHrPは高カルシウム血症あるいは骨転移といった腫瘍に随伴する病態に深く関与しているが、さらに我々はPTHrPが癌悪液質の病態にも関与していることを明らかにした。HARA-B細胞を皮下移植されたヌードマウスは、体重減少とともに脂肪組織、筋組織重量の低下、低血糖といった悪液質を呈するが、HARA細胞よりPTHrP発現がさらに高いHARA-B細胞でより確実に悪液質が誘導され、悪液質の病態解明にとって有用な実験系となる。

意義: 肺小細胞癌はSIADHの合併も多く、ADHやGRPをはじめとした様々な生理活性ペプチドを産生、分泌することが知られているが、肺小細胞癌ではPTHrPを産生しているにも関わらず、高カルシウム血症の合併は比較的少なく、その理由についても不明である。肺小細胞癌で産生されるこれら生理活性ペプチドは、癌細胞自身の増殖を促進する“autocrine growth factor”として機能しているものもあり、肺小細胞癌におけるPTHrPの役割についても同様の機能が予測され、そういった研究に本細胞は有用であると考えられる。

#### 当該細胞関連文献

1. Iguchi, H., Katakami, H., Ichinose, Y., Nishi, Y., Tanaka, S., Hara, N., Ohta, M., Hji, M., and Nawata, H. : A case of squamous cell lung carcinoma with high concentration of parathyroid hormone-related peptide in serum and pleural effusion presenting hypercalcemia. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84 : 419-424, 1993.
2. Ichinose, Y., Iguchi, H., Ohta, M., and Katakami, H. : Establishment of lung cancer cell line producing parathyroid hormone-related protein. *Cancer Lett.*, 74 : 119-124,

#### 当該細胞関連文献

1. Iguchi, H., Katakami, H., Masuda, N., Takada, M., and Kono, A. Establishment and Characterization of the parathyroid hormone-related protein(PTHrP) producing human small cell lung carcinoma cell line(MS-1). *Hum. Cell*, 9 : 75-78, 1996.

#### 2. 倫理面への配慮

上に記載した本年度寄託細胞については、2000年以前に樹立した細胞株で多くの研究者によって既に利用されてきている。倫理面では当時の取扱に従っている。

しかし、現在では研究実施に際して、ヒトに由来する検体（血液、尿、腫瘍、等などの試料）の使用については、患者本人に十分に説明して文書で同意を取得したものについてのみ使用することとするよう改善されている。また、現在では九州がんセンターには倫理委員会が設置され、本研究も倫理委員会での承認を得たうえで実施するなど改善された。

### 3. 寄託細胞の知的所有権

細胞の知的所有権はその細胞の樹立者に帰属するものとする。バンクからの細胞の供与に際しては樹立者の許可が必要であり、またこれら細胞を使って遂行した実験結果の発表（学会、論文）についても樹立者との協議のうえ行うことが必要である。

### C. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 松尾 享、荒武良総、畠中文香、内村浩太郎、横田昌樹、澄井俊彦、井口東郎、船越顕博、八反田洋一. : 長期間の gemcitabine 投与に溶血性尿毒症症候群をきたした膵がんの1症例. 膵臓 18 : 495-500, 2003.
2. 畠中文香、松尾 享、荒武良総、内村浩太郎、横田昌樹、澄井俊彦、井口東郎、船越顕博. : 早期胃癌再発の癌性腹膜炎に対してTS-1が奏効した1症例. 癌と化学療法 30 : 703-706, 2003.
3. 井口東郎. : 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症

. Clinician's Journal 3 : 2003.

4. 船越顕博、澄井俊彦、横田昌樹、井口東郎. : 消化器疾患と腰痛. 臨床と研究 80 : 412-416, 2003.

#### 2. 学会発表

1. Iguchi, H., Uchimura, K., Yokota, M., Sumii, T., Funakoshi, A. Increased incidence of bone metastases and its management in hepatocellular carcinoma (HCC). The 39th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (ASCO). (May 31-June 3, Chicago, 2003).
2. 井口東郎、澄井俊彦、船越顕博. 膵癌における骨転移合併の増加ならびにその対策. 第34回日本膵臓学会大会. シンポジウム「進行膵癌の治療」2. 切除困難膵癌の治療と予後 : stage IV a を含めて合理的な治療を探る. (7月10-11日、千葉、2003)
3. Iguchi, H., Maruta, S., Takiguchi, S. Bone metastasis model with multi-organ dissemination of human melanoma cells : possible involvement of leukemia inhibitory factor (LIF). The 94th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR). (July 11-14, Washington, D. C., 2003).
4. 井口東郎、荒巻裕子、滝口総一. サイトカインを標的とした癌悪液質の分子標的治療. 第62回日本癌学会総会. (9月25-27日、名古屋、2003).

厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
分担研究報告書

## 実験腫瘍及びヒト消化器がん由来細胞株の樹立に関する研究

分担研究者 柳原 五吉 国立がんセンター研究所実験動物管理室長

## 研究要旨

ヒト消化器がんの中でも、膵癌は極めて予後不良であり、新たな視点に立った治療戦略の開発が望まれている。この実験的研究のためには、臨床癌由来の培養細胞が必須の Tool となる。そこでヒト膵癌 SCID マウス移植株を材料として、ヒト膵癌由来培養細胞の樹立を試みた。現在全て初代培養中(植え込み13ヶ月が最長)であるが、合計15系の培養系を維持している。このうち3培養系は安定した増殖を示しているため、樹立できる可能性が高い。

## A. 研究目的

膵癌(浸潤性膵管癌)は、診断時には膵管壁を越えて膵実質にまで浸潤する進行癌であり、リンパ節転移、肝転移、腹膜播腫などの頻度も高く予後不良の難治性癌の代表である。この癌を制御するには、その発生と増殖・進展機構を分子病理学的に解明し、得られた知見をもとにその過程を阻止または遅延させる物質を探索・開発することが、新たな治療法につながると考えられる。これらの基礎実験を進める上で、ヒト膵癌由来培養細胞は必須の Tool となる。さらに個体レベルでの実験が必要であり、培養細胞の免疫不全マウスへの移植で、臨床に近似した病態モデルを作成することも望まれている。今までに多数の細胞株が報告されているが樹立当初の性格を示さない株もあり、そのような観点からも、本研究では新たにヒト膵癌由来培養細胞を樹立することを目的とする。

## B. 研究方法

培養材料は既に共同研究者(落合淳志・国立がんセンター研究所支所臨床腫瘍病理部)がヒト膵癌由来の移植株を作成しているため(未発表)、この移植腫瘍を材料として培養細胞の株化を行う。この移植株は移植継代数が少ないことが利点である。

SCID マウス(♀、5週令)は日本クレア(株)より購入し、6から8週齢で移植に用いた。

培養方法は、移植した細胞が直径5~10mm程度の大きさの腫瘤になったら組織を無菌的に摘出し、抗生物質含 RPMI1640 培養液で数回洗浄後、癌組織を小曲剪刀で1~2mm角ぐらいの組織片になるまで細切、或いは二本のメスを用い、刃の間で癌組織を鋭角に切断した。少量の10%牛胎児血清添加 RPMI1640 培養液に浮遊させ、60mmシャーレに15から20個の組織片が存在するように植え込んだ。組織片がシャーレ底面に確実に固定されたら、培養液をゆっくりと追加し、培養を開始した。腹水中の細胞であれば、直ちにヘパリン(5 $\mu$ g/ml)を加えた後、遠心し(700rpm, 5min)細胞を回収した。抗生物質添加 RPMI1640 培養液で数回洗浄後、10%牛胎児血清添加 RPMI1640 培養液に浮遊させ、植え込み細胞数に変化を持たせて、出来るだけ多くのシャーレに播き込んだ。5%CO<sub>2</sub>存在下で静置培養を行い、細胞の状態を観察しながら週二回、培養液の半量を交換した。

## (倫理面への配慮)

培養材料としたヒト膵癌由来の移植株は、共同研究者の落合淳志博士によってインフォームドコン

セントの後、臨床研究倫理指針に従って作成されたものである。動物実験は、国立がんセンター動物実験倫理委員会で審査、承認されたもので“国立がんセンターにおける動物実験の指針”を遵守した。

### C. 研究結果

ヒト膵癌由来移植腫瘍株の維持・保存： 培養材料の確保のため、移植腫瘍は入手時に植え込みに使用すると同時に凍結保存した。樹立できるまで一部はSCIDマウスの皮下、腹腔内或いは膵臓に同所性移植にて継代維持した。ヒト膵癌由来移植腫瘍株の内、安定した増殖を示す15株（腺癌由来6株、管状腺癌由来9株）を選び植え込み材料とした。培養方法は前述の如く、固形癌に良く利用される組織片培養法によった。腹腔内移植で腹水を形成するものについては、腹水中の癌細胞を常法により回収して培養した。

初代培養： 植え込み数日後より線維芽細胞が急速に増殖し、上皮性細胞（癌細胞）の増殖を阻害する傾向が認められたので、線維芽細胞の除去を行った。癌細胞と線維芽細胞でトリプシン感受性の異なる場合には、通常利用する0.25%Trypsin-0.02%EDTAを希釈し、上皮細胞間の線維芽細胞を剥離した。また、癌細胞のコロニー（5～10mm）と線維芽細胞が長期間共存している場合には、癌細胞を選択的に増やす方法として、クリーンベンチ内で顕微鏡下にラバー（ポリスマン）で上皮細胞に触れないように線維芽細胞のみを剥離した。いずれも、剥離した線維芽細胞の浮遊している培養液を直ちに捨て、PBSで数回洗浄後、培養液を加えた。さらに培養を続け、再び線維芽細胞が増殖してきたら同じ操作を繰り返した。

このように初代培養では線維芽細胞が消失し、癌細胞が増殖してコンフルエントになるまで、培養液の交換と線維芽細胞の除去を繰り返し行っている。現在は（3月10日）いずれも初代培養中であるが、植え込み13ヶ月目1例、10ヶ月目2例、8ヶ月目4例、7ヶ月目6例、5ヶ月目2例合計15系である。このうち次の3培養系は安定した増殖を示しているため、樹立できる可能性が高い。1系は線維芽細胞を主とする間質細胞と長い間共存していたが、癌細胞の増殖が優位となり、線維芽細胞は自然に消滅した（初代培養13ヶ月目）。他の2培養系は線維芽細胞の下に潜るようにして球状、或いは敷

石状を呈する上皮細胞が共存していたが、6ヶ月頃より癌細胞が浮遊し、ゆっくりと増殖を始めた。この増殖の不安定な少数の細胞を増やすため、コンデション培地、feeder layerなどの使用、或いは細胞数を調整することにより別のシャーレに植え継ぎが可能となり、癌細胞を選択的に得ることが出来た（10ヶ月目の2例）。また、in vitroで分化傾向を示す高分化型腺癌由来移植株は、度重なる植え込みにも関わらず癌細胞が徐々に減少し、6ヶ月後には完全に消滅した。

### D. 考察

これまで数多くの癌細胞株が樹立され、がん研究はもとより医学のみならず、生物学、薬学、工学など広範な分野で研究材料、あるいはToolとして用いられ、生命科学の発展に大きく貢献してきた。その有用性は今後も不変と思われる。しかし、今日でも全ての癌腫の細胞株があるわけではなく、希少型の腫瘍や難治性癌とされる疾患からも多数の株が樹立されることが望まれる。また比較研究のためには、同一臓器由来の正常細胞の株化も必要であろう。

ヒト消化器癌の中でも、極めて予後不良な悪性疾患である膵癌とスキルス胃癌は、新たな視点からの治療戦略の開発が期待されている。特に膵癌は外科切除以外に種々の治療法が行われているが、殆どの場合、膵癌の診断、即、死というのが現状である。膵癌はこれといった原因物質は特定されておらず、遺伝的背景も不明である。最近では膵癌は複数の遺伝子異常を伴い、前がん病変から段階的過程を経て発生することを示唆する所見も得られており、既成の治療法に加え、遺伝子治療並び細胞治療などが開発されている。これらの実験的研究を行うためには、ヒト膵癌由来の培養細胞は必須のToolであり、その樹立は基礎並びに臨床の研究基盤を強化する、極めて重要な研究課題の一つである。

さらには、免疫不全動物への移植で、臨床に近似した膵癌の病態を示すモデルを作成することが望まれる。これは個体レベルでの実験系として、薬剤評価系や癌の増殖・進展機構の研究の分野においても多大な貢献をすることが予想される。我々は、ヒトスキルス胃がん由来培養株を樹立し、そこから分離した高転移株を用いてマウスモデルを樹立

している。本研究で進めている膵癌に関しては、今までに多数の細胞株が樹立されているが、樹立当初の性格を示さない株も少なくない。樹立当初は病理組織型が高分化型腺癌であったものが、長期継代培養中に変化し、異種移植すると低分化或いは未分化の組織像を示す例がある。これでは臨床癌の病態を反映したモデルを作成することが出来ない。このような観点からも、新たに培養細胞を樹立後、その特性を明らかにし、病態モデル作成を進めることは意義のあることと思われる。

様々な癌に対する確実な樹立の方法（マニュアル）があるわけではなく、それぞれの臓器或いは組織型による癌細胞の性質を考慮し、創意工夫をしながら進めているのが現状である。我々の研究室では、今までにヒトがんや実験腫瘍から培養細胞の樹立を行ってきたが、70から80%の確率で株化に成功している。従来の植え込んで「たまたま樹立出来た」ではなく、経験に加え科学的根拠に基づいた処置を行い、樹立を成功させる努力が必要である。培養細胞を樹立することが、“難治がん中の難治がん”といわれる膵癌攻略の突破口を開くきっかけを作ることにつながれば、という希望を持ち実験を行っている。

培養細胞の樹立（研究資源化）の重要性は前述したが、開発研究として実際に施行しようとする問題点も少なくない。まず、初代培養を辛抱強く、長期に亘り継続することが要求される。しかも、この培養期間中は発表できるような成績は出ない。さらに今日では「樹立し、その特性解析した成績のみ」では、論文として受理され難い。これらのことから若い研究者は、極力このような地味で忍耐の要る、且つ、リスクを伴う仕事を避ける傾向が強い。培養細胞の資源化とその方向付けについての議論の必要性を痛感している。

最後に、樹立した培養細胞の取り扱いについて述べたい。樹立者は「目的があって樹立するのであり、この目的の研究に使用することが優先されるべきである」が、「樹立を学会等で報告する」と即、供給依頼がある。依頼により分与すると“解析は急速に進む”場合が多いので、「樹立した」という論文が出る前に、分与者の論文が受理されるような場合が多い。また論文中に樹立に関する原著論文の引用も無く、ひどい場合には出所さえ判らないようなものもある。欧米諸国ではこのようなこと

は経験したことがない。これらの問題に対処する為、我々は供給依頼・合意書を作成している。合意事項として「①樹立者の当該細胞に関する優先権を全面的に尊重する。また、樹立者からの使用上の制限がある場合は、それらに従って使用する。②供給された細胞は依頼時の研究目的（上記）にのみ使用し、新たな研究に使用する場合には樹立者の許可を得る。③供給された細胞を第三者へ分与しない。\*④本細胞株を用いた研究（上記）は共同研究とする。」を確認後、分与している。合意事項\*④に関しては、研究内容、或いは研究が纏まった時の細胞の貢献度で判断し決めている。

## E. 結論

ヒト消化器がんの中でも、スキルス胃癌と膵癌は極めて予後不良であり、新しい視点に立った治療戦略の開発が期待されている。この基礎実験の遂行には、臨床癌由来の培養細胞が必須のツールとなる。そこでヒト膵癌 SCID マウス移植株を材料として、ヒト膵癌由来培養細胞の樹立を試みた。現在全て初代培養中（植え込み13ヶ月が最長）であるが、合計15系の培養系を維持している。このうち3培養系は安定した増殖を示しているので樹立できる可能性が高い。培養細胞を樹立することが“難治がん中の難治がん”といわれる膵臓がん攻略の突破口を開くきっかけを作ることにつながれば”という希望を持ち研究を進めている。

## F. 健康危険情報

特に無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mori, K., Aoyagi, K., Ueda, T., Danjoh, I., Tubosa, Y., Yanagihara, K., Matsuno, Y., Sasako, M., Sakamoto, H., Mafune, K., Kaminishi, M., Yoshida, T., Terada, M., and Sasaki, H. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 931-937, 2004

### 2. 学会発表

1. 柳原五吉、西尾和人、広橋説雄 ヒトスキルス胃

---

がんの腹膜播種モデルの樹立とその有用性 第12 回日本がん転移学会学術集会 p84 (金沢、2003)	態学的解析 第20回日本疾患モデル学会総会要旨 集p12 (大阪、2003)
2. 柳原五吉 ヒトスキルス胃がんの腹膜播種モデル の樹立とその有用性 日本癌学会総会記事 p492 (名古屋、2003)	H. 知的財産権の出願・登録状況 1. 特許取得 無し 2. 実用新案登録 無し
3. 柳原五吉、瀧ヶ平美里、落谷孝広 マウス転移モ デルを用いたヒト胃がんの腹膜播種形成機序の形	

---

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
 分担研究報告書

ヒト肝・胆系組織由来細胞の研究資源に関する研究

分担研究者 永森静志 杏林大学医学部総合医療学

研究要旨

生体から分離して樹立した培養細胞株は本来生体で持っていた機能を失うことが知られている。これを改善する目的で我々は機能を維持したまま樹立細胞系を作ることを肝臓ならびに胆嚢癌細胞で試み成功してきた。こうした細胞をバンクに寄託し、多くの研究者の利用に供することは研究の活性化に寄与する。ここでは、寄託した細胞を中心に実施された研究の概略を紹介し、その有効性について紹介する。

A. 研究目的

機能を維持したヒトの肝臓や胆嚢に由来する細胞株は極めて少なく、研究のネックになっている。この状況を改善する目的で、我々は肝臓や胆嚢の機能を維持している培養細胞系の樹立を試み、多くの成功を収めてきた。

B. 研究結果

1. ヒト肝・胆系細胞資源の利用状況

1.1. 下記のヒト肝胆由来の腫瘍細胞株は2003年3月から2004年2月までの永森らが樹立し、JCRB細胞バンクに寄託し、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)から、研究・試験・教育等に利用を希望する施設または研究者への細胞の分譲に関する状況を表に示した。

JHH: ヒト肝細胞癌由来細胞株、NOZ: ヒト胆のう癌由来細胞株、OZ: ヒト胆管癌由来細胞株

登録番号	細胞名	2003.1	2003.3	2003.4
		2003.12	2004.2	2004.2
JCRB1062	JHH-1	0	0	0
JCRB1028	JHH-2	1	1	1
JCRB0435	JHH-4	5	3	2
JCRB1029	JHH-5	4	4	3
JCRB1030	JHH-6	2	2	1
JCRB1031	JHH-7	4	4	2
JCRB1033	NOZ	6	6	6
JCRB1032	OZ	3	4	4
合計		25	24	19

1.2. 上記細胞株のおもな研究目的

JCRB1028 JHH-2  
 肝細胞癌株における細胞周期と functional p53 の発現との関係

JCRB0435 JHH-4  
 食品添加物の肝臓の細胞に及ぼす影響について  
 肝臓に対する各種薬剤の制癌効果に関する研究

JCRB1029 JHH-5  
 肝臓に対する各種薬剤の制癌効果に関する研究  
 ヒト肝細胞癌発生の基礎研究

## p38MAPK に対する糖尿病新薬 DHEA の影響

JCRB1030 JHH-6

ヒト肝細胞癌発生の基礎研究

JCRB1031 JHH-7

肝細胞癌株における細胞周期と機能的 p53 の発現との関係

## B 型肝炎ウイルスの発癌メカニズムの解明

JCRB1033 NOZ

代謝実験、胆嚢癌におけるカドヘリン発現の研究、胆嚢癌 cell line における homeodomain protein CDX2 の発現を研究する。

## 癌遺伝子の検索、遺伝子治療研究

JCRB1032 OZ

胆管癌の遺伝子発現プロファイルの解析、胆管癌に対する自殺遺伝子療法に関する研究

## 2. 開発した細胞株での研究

樹立した高機能保持ヒト由来肝細胞と新しく開発した培養細胞機能をより高めることができるバイオ人工肝による 3 次元培養法との結合システムをつくり薬物の有効性と安全性の評価法を新しく確立し、それぞれの専門施設と共同でそれらの基準システムとなることを目指した。以下に共同研究によりヒト肝由来細胞株の多機能性を示す。

## 肝機能の亢進の試み

HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現

名古屋大学農芸化学科の小田裕昭博士と永森らが開発したラジアルフローバイオリアクター (RFB) で培養された FLC-4 細胞においても、HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現が増強するか調べ、肝細胞は立体化することによって、その分化表現型を高く維持することができた。したがって 3 次元的に細胞形態が変化することであることが明らかとなった。

## ヒト培養肝細胞系を用いた酵素誘導

CES 遺伝子の発現調節機構

千葉大学薬学部の千葉 寛、細川正清博士らと RFB を用いたヒト肝がん由来細胞の三次元培養法により *in vivo* に近い薬物代謝および酵素誘導の *in*

*vitro* 評価系として有用であると考えられた。

## 薬物輸送系の評価

バイオリアクター上の FLC4 における輸送系 L トランスポーターの解析 L トランスポーター

杏林大学医学部薬理学の遠藤 仁、金井克好博士らと、FLC4 から抽出した poly(A)<sup>+</sup>RNA を用いて発現クローニングを行い、単一 cDNA を単離した。さらに、単離した cDNA を用いて、FLC4 のアミノ酸系 L の分子実体を明らかにし、その構造的及び機能的特性を解析した。

輸送系 L の分子実体に関しては、2 つのアイソフォーム (LAT1 及び LAT2) が存在することをすでに明らかにしている。これらは、ともに輸送系 L の古典的阻害薬 BCH 及び上記新規阻害薬 KYT0193 によって抑制される。ヒト膀胱癌由来 T24 細胞に代表される一般の培養細胞には、LAT1 のみが発現する。これに対して FLC4 細胞の輸送系 L は、BCH によって抑制されるが、KYT0193 では抑制されない未知の (LAT1 でも LAT2 でもない) 輸送系 L トランスポーターを有することが研究の成果に基づき結論された。

## 抗ウイルス薬評価系の開発

RFB 培養系を利用して C 型肝炎ウイルス (HCV) の持続的増殖系を樹立して、抗ウイルス薬の評価法を開発することを目的とした。

永森は国立感染症研究所ウイルス第 2 部の宮村達夫、鈴木哲朗博士らと、ヒト肝由来細胞株 FLC-4 にこの HCV の患者血清と合成 RNA を導入して RFB 培養を行った。FLC 細胞とラジアルフローバイオリアクターを用いて、HCV の *in vitro* での、大量培養に成功した。

## レプリコン細胞における細胞増殖変化の解析

京都大学医学部ウイルス研究所所長下遠野那忠博士らに依頼し、現在までのところ Huh7 細胞に導入した HCV 部分ゲノムは効率よく自己複製していることが確認できている。

そこで、本細胞については HCV 蛋白質の発現による細胞の増殖特性がどのように変化するかを中心に解析。FLC4 細胞における HCV ゲノム複製細胞の樹立を行っている。

## ヒト型の遺伝毒性試験法の確立

国立医薬品食品衛生研究所の本間正充博士には、FLC系細胞を元にして、誘発性遺伝子突然変異頻度と、変異体の遺伝子解析を行った依頼した。

1) 小核試験: FLC4 および HepG2 細胞を用いて in vitro 小核試験を試みた。FLC4 細胞の遺伝的不安定性が示唆された。FLC 4 細胞、HepG2 細胞とも代謝活性化が必要ない MMC、MMS に対しては用量依存的な細胞毒性と、小核の誘発が認められた。

2) 遺伝子突然変異の検出: 遺伝子突然変異試験用に樹立されたトランスジェニック FLC4-λ13 細胞より DNA を抽出した。cII 遺伝子をターゲットとした自然突然変異体プラークの出現頻度は  $12.7 \times 10^{-3}$  と極めて高く、これはマウスでのトランスジーンにおける自然突然変異頻度の 100 倍に相当した。この細胞を MNNG によって処理し、誘発性突然変異頻度を観察したところ、これに対し、突然変異は 20 ~ 30 倍誘発された。

### (研究倫理面への配慮)

今年度寄託した細胞は、2000 年以前に樹立された細胞が中心であり、当時はヒト由来の細胞についての倫理的取扱いに関する統一的ガイドラインが無かった。そのため、細胞の提供等については、個別に患者さんならびに家族に説明をすることがあっても文書で記録を残すことは求められていなかった。2000 年に作成されたガイドラインによっても、その点は考慮されており、多くの研究者により利用されていることまた、それに関する論文が既に多数存在しているため、これらの細胞については、バンクに寄託することとした。今後ヒト由来の組織を利用する場合には学内倫理委員会の審査

を受けて研究を実施することになる。

### C. 発表論文

1. 永森静志、パイオ人口肝:可能性と課題、細胞 35: 450-455 (2003).
2. Pascal Pineau, Anges Marchio, Seishi Nagamori, Shuichi Seki, Pierre Tiollais and Anne Dejean, Homozygous Deletion Scanning in Hepatobiliary Tumor Cell Lines Reveals Alternative Pathways for Liver Carcinogenesis, *Hepatology*, 37:852-861(2003).
3. Ellappan Babu, Yoshikatsu Kanai, Arthit Chairoungdua, Do Kyung Kim, Yuji Iribe, Sahatchai Tangtrongsup, Promsuk Jutabha, Yüwei Li, Nesar Ahmed, Shinichi Sakamoto, Naohiko anzai, Seishi Nagamori, and Hitoshi Endou, Identification of a Novel System L Amino Acid Transporter Structurally Distinct from Heterodimeric Amino Acid Trnsporters. *J of Biological Chemistry*, 278:43838-43845, 2003.
4. Hideki Aizaki, Seishi Nagamori, Mami Matsuda, Hayato Kawakami, Osamu Hashimoto, Hiroaki Ishiko, Masaaki Kawada, Tomokazu Matsuura, Satoshi Hasumura, Yoshiharu Matsuura, Tetsuro Suzuki and Tatsuo Miyamura. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the tree-ementional radial-flow bioreactor. *Virology*, 314:16-25 (2003).

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）  
分担研究報告書

## ヒト組織の研究資源化に関する研究

分担研究者 小林 真一 聖マリアンナ医科大学 薬理学 教授

### 研究要旨

ヒト組織の研究資源化を目的として、肝癌および肝疾患の外科手術適応患者より文書同意を得て、手術時に摘出した肝臓組織の疾患部位および非疾患部位（正常部位）から初代肝細胞を単離し培養した。この初代肝細胞が生体内の肝機能を反映するかどうか薬物代謝酵素活性やその他の肝特異的転写因子の発現について検討した。初代肝細胞は患者の病態、肝組織の摘出部位そして培養条件により薬物代謝酵素活性に影響を与えることが分かった。今後は薬物の効果・副作用などの評価を検討するための研究に適した肝組織の機能を維持した質の高い、生存率の高い肝細胞を維持するシステムの構築を目指している。

### A. 研究目的

医薬品の研究開発には動物実験のほかにヒト組織を利用した研究が必要である。従来は米国から白人の移植不適合ドナーの組織を輸入し研究に使用していた。

しかし薬物の効果や副作用に重要な役割を担っている肝薬物代謝酵素の働きは、人種間での違いが明らかになり、日本人の組織を用いた検討が重要になってきた。

そこで聖マリアンナ医科大学では学内ヒト組織バンクシステムの構築を試みようとしている。本学病院において肝癌および肝疾患の外科手術適応患者より文書同意を得て、手術時に摘出した肝臓組織の疾患部位および非疾患部位（正常部位）の一部を、個人情報の漏洩防止のために匿名化を行い（個人情報管理者）、また生命倫理委員会の承認を得た上で研究に利用することを目的としている。この時、採取した肝の組織量が十分量である場合は、初代肝細胞に単離し培養する。この肝細胞を利用して、抗癌薬またはその他の薬物に対する効果を調べる。はじめに、この初代肝細胞が生体内の肝機能を反映するかどうか薬物代謝酵素活性やその他の転写因子、蛋白の発現について検討

する。さらに薬物の効果・副作用などの研究可能な肝組織の機能を維持した質の高い、生存率の高い細胞を維持するシステムを構築し、細胞バンクに供給することを目的とする。

### B. 研究方法

#### （肝組織の初代培養）

採取した肝組織は氷冷培養液（HANK'S）に入れ一時保存した。直ちに肝組織は細切後コラゲナーゼで37℃15分間酵素処理をし、初代肝細胞を単離した。単離した肝細胞はフィルターで不純物を除去した後、FCS（牛胎児血清）添加培養維持因子William E液に浮遊させ細胞数を算定した。細胞数を5 x 10<sup>6</sup>/mlに調整し、poly-L-lysine コーティング24穴プレートにて、37℃5%CO<sub>2</sub>下で培養した。

#### （肝薬物代謝酵素の蛋白発現）

初代肝細胞は経時的に一部回収し、肝機能の指標として薬物代謝酵素であるCYP3A4の発現について検討した。肝細胞CYP3A4 mRNA発現はRT-PCR法で、CYP3A4蛋白は免疫細胞染色で解析した。

また、CYP3A4活性はルシフェラーゼ発光法で

測定した。

### (倫理面への配慮)

聖マリアンナ医科大学においては、三省庁共同のガイドライン「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に則した生命倫理委員会があり、本研究はその生命倫理委員会で審査、承認後、治療目的で外科手術により肝組織の切除を受ける患者を対象として事前に説明し、文書による同意を得た後、遂行した。患者の個人情報情報は個人情報管理者を置き、連結不可能匿名化を行い、個人情報の厳密な管理を行った。

## C. 研究結果

### 1. 肝細胞培養の確立

聖マリアンナ医科大学病院で肝疾患および肝癌で手術を受けた患者5例（女性4名、男性1名、年齢 $58 \pm 17.49$ 歳；原発性肝癌2例、胆管癌2例、転移性肝癌1例）より採取した肝組織を初代肝細胞培養に使用した。採取した肝組織約1gから、およそ $2 \times 10^8$ の細胞が単離できた。単離した細胞のviabilityは95%以上であった。従来は血液還流を行い血管残存の影響を完全に排除していたが、術中の阻血時間が長くと薬物代謝酵素活性が低下することが予想されるため、血液還流を行わず肝組織を細切した。

培養細胞は時間経過をおって一部回収し、薬物代謝酵素活性（CYP3A4）のmRNAおよび蛋白発現を検討した。単離直後の初代培養肝細胞は同じ肝組織からのmRNAおよび蛋白はとほぼ同程度発現していた。しかし培養2日目からはmRNA発現、蛋白発現ともに低下する傾向を示した。

初代肝細胞の薬物代謝酵素活性の測定は、HPLCで測定する従来の方法では、感度が低いため十分な評価が出来ない。そのためCYP3A4の基質とルシフェリンの誘導能を

を利用しCYP3A4活性を測定した。

現段階では肝細胞癌株および肝芽種細胞株を用いたCYP3A4活性の測定は可能になったが、初代肝細胞培養での測定はまだ調製段階である。

## D. 考察

初代肝細胞培養を行うためには採取した肝組織が約1g以上あることが望ましい。より多くの肝

組織を研究に用いるためには、病理医の診断に必要な十分量の組織採取を行った上で、残余部分を研究かつ培養に使用できるシステムに改善することが急務であると考えられる。

また患者の病状によって肝組織自体が脂肪肝または高齢による肝の繊維化を認めたときは、細胞は生存率が低く肝薬物代謝酵素活性も低いため研究には使用しにくい。このことも含め、肝細胞の初代培養の確立までにはいくつかの問題点がある。今回、平均的に培養開始4日目までは細胞の生存は可能になった。しかしCYP3A4発現が低下し、分離直後のCYP3A4活性と同レベルで維持できる培養方法に改善していくことが重要である。さらにその測定法も確立することが今後の課題である。

## E. 結論

聖マリアンナ医科大学病院で肝疾患および肝癌で手術を受けた患者5例の切除肝から、肝細胞初代培養を施行した。初代培養肝細胞のviabilityは95%以上であったが、培養2日目からはCYP3A4mRNA発現および蛋白発現ともに低下する傾向を示した。

今後の課題は、CYP3A4活性の測定法を確立し、さらにCYP3A4活性維持できる培養方法に改善していくことである。

## F. 研究発表

### (学会発表)

1. 渡辺実、熊井俊夫、武半優子、松本直樹、鈴木聡、佐藤哲男、小林真一. ヒト肝臓におけるCYP3A4発現の個人差と転写因子との関係に関する研究. 第76回日本薬理学会年会, 2003.
2. 熊井俊夫、菅原章隆、武半優子、渡辺実、神尾浩司、松本直樹、山口晋、小林真一 5-Fluorouracilによるdihydropyrimidine dehydrogenase mRNA発現抑制におけるP53の関与. 第76回日本薬理学会年会, 2003.
3. 武半優子、熊井俊夫、渡辺実、中谷祥子、神尾浩司、谷口良子、雨宮浩、山口晋、小林真一. ヒト肝組織における薬物代謝酵素および転写因子の発現第10回HAB協議会学術年会, 2003.
4. 小林真一. 実際の臨床現場における医薬品の安

- 
- 全性に対する考え方. 第30回日本トキシコロジー学会学術年会, 2003.
5. 熊井俊夫、中谷祥子、松本直樹、武半優子、神尾浩司、谷口良子、田中政巳、関根進、守屋仁布、中野浩、山口晋、小林真一. 臨床試験コーディネーターを導入したヒト組織バンクシステムの構築. 第24回日本臨床薬理学会年会, 2003.
6. 小林真一. 組織提供の立場から一肝組織を例として—第3回ヒューマンサイエンス研究資源バンク技術講習会, 2004.
- G. 知的所有権の出願・取得状況  
なし
-