

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤村 昭夫

平成 16(2004)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提供された腎切除例の病理学的検討	5
斎藤 建	
2 人工肝臓カラム(キグナス)を用いた肝細胞株薬剤代謝の検討	7
永井秀雄・安田是和・佐田尚宏・王寧	
3 臨床腎臓検体の採取	13
徳江章彦・大島康雄	
4 臨床検体の管理・初代培養システムの構築	16
鈴木 誠	
5 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	18
間野博行	
6 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	
マイクロアレー実施・データ解析・精度管理	22
大島康雄	

III 研究成果の刊行に関する一覧表	27
--------------------	----

IV 健康危険情報	29
-----------	----

V 研究成果の刊行物 別刷	添付
---------------	----

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)

総括研究報告書

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

主任研究者 藤村昭夫 自治医科大学臨床薬理学教授

研究要旨

平成 14 年度はプライマリーヒト肝・腎細胞を得るための研究基盤整備を行い、平成 15 年度は肝腎障害をきたすことにより临床上問題となる薬物を複数用いて、薬物曝露・遺伝子発現解析を行った。平成 15 年度も平成 14 年度に引き続き、倫理評価ワーキンググループは手術検体の取り扱い・インフォームドコンセント書類の管理・匿名化などにつき監視を行った。倫理評価ワーキンググループの基準を満たしつつ、本プロジェクトで行う予定にしている薬物曝露・遺伝子発現研究に十分量と思われるヒト肝・腎プライマリーカルチャー細胞を得ることができた。

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に複数の腎毒性の知られている薬物を曝露させて遺伝子発現解析を行い、濃度依存性や時間依存性を評価した。膨大な遺伝子発現解析データを得たが、これらデータに意味づけを行い、知識として表現するバイオインフォマティクス部門では、まずデータの精度及び RNA の質を検討した。我々の遺伝子発現解析データによると RNA の状態は良好で、多くの場合信頼することができる結論された。信頼できない、あるいは RNA の状態が不良であったと推定される実験を解析対象から除くことが可能となった。実際のデータを用いて様々な解析手法を試みているが、本質的に遺伝子発現データは遺伝子の転写活性と密接に関連しており、この解析を行うことによって毒性学のみならず分子生物学全体に影響を及ぼしうる仮説を導き出すことかできるものと考えられる。しかしながら、全ゲノムのドラフトシーケンスが公開された現時点でも、このようなアプローチを取っているグループは見られない。これは、各トランスクリプトに対応する上流配列を確認することが現時点で困難であることによる。そこで、バイオインフォマティクス部門では、インテリジェントなアルゴリズムを用いた全ゲノムスキニングにより、各トランスクリプトに対応した上流配列を見だし、トランスクリプトの発現量(転写活性)との関連性を解析している。

平成 16 年度は多数の薬物をプライマリーヒト肝・腎細胞に曝露し、遺伝子発現解析を行うと同時に知識データベース構築へのアプローチを予定している。

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た後に、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ついてヒト-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、かつ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、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討することにより、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となっている。欧米では、既に医薬品の研究開発においてヒト組織を用いた有効性および安全性の評価が取り入れられており、我が国で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不可欠なものであり、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様式や説明文書の内容、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。腎臓尿管由来の細胞は、形態・Glut2発現・ γ GTP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・およびチクロームP450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、腎・肝毒性の知られている薬物とそうでない薬物へ曝露させ、適当な時間の後、細胞を回収して total RNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip を用いて解析する。

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

平成 14 年度はプライマリーヒト肝・腎細胞を得るための研究基盤整備を行い、平成 15 年度は肝腎障害を引き起こすことにより臨床問題となる薬物を複数用いて、薬物曝露・遺伝子発現解析を行った。平成 15 年度も平成 14 年度に引き続き、倫理評価ワーキンググループは手術検体の取り扱い・インフォームドコンセント書類の管理・匿名化などにつき監視を行った。倫理評価ワーキンググループの基準を満たしつつ、本プロジェクトで行う予定にしている薬物曝露・遺伝子発現研究に十分量と思われるヒト肝・腎プライマリーカルチャー細胞を得ることができた。

遺伝子発現解析部門では、得られた尿管プライマリー細胞に複数の腎毒性の知られている薬物を曝露させて遺伝子発現解析を行い、濃度依存性や時間依存性を

評価した。膨大な遺伝子発現解析データを得たが、これらデータに意味づけを行い、知識として表現するバイオインフォマティクス部門では、まずデータの精度及び RNA の質を検討した。我々の遺伝子発現解析データによると RNA の状態は良好で、多くの場合信頼することができる結論された。信頼できない、あるいは RNA の状態が不良であったと推定される実験を解析対象から除くことが可能となった。実際のデータを用いて様々な解析手法を試みているが、本質的に遺伝子発現データは遺伝子の転写活性と密接に関連しており、この解析を行うことによって毒性学のみならず分子生物学全体に影響を及ぼしうる仮説を導き出すことができるものと考えられる。しかしながら、全ゲノムのドラフトシーケンスが公開された現時点でも、このようなアプローチを取っているグループは見られない。これは、各トランスクリプトに対応する上流配列を確認することが現時点で困難であることによる。そこで、バイオインフォマティクス部門では、インテリジェントなアルゴリズムを用いて全ゲノムスキャンングにより、各トランスクリプトに対応した上流配列を見だし、トランスクリプトの発現量(転写活性)との関連性を解析している。

平成 16 年度は多数の薬物をプライマリーヒト肝・腎細胞に曝露し、遺伝子発現解析を行うと同時に知識データベース構築へのアプローチを予定している。

D 考察

ヒト組織を用いた研究開発の在り方専門委員会や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への応用について議論がなされており、貴重な組織の使用は、目的のはっきりした、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。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、今後の日本におけるヒト組織の研究応用に関する社会的信頼を得、研究基盤を固めてゆく予定である。

平成15年度までの研究により遺伝子発現解析によって得られたデータの解析は、その生成されるデータ量が膨大であるために、意味づけを行うことが簡単ではないことが明らかとなった。信頼できるデータを積み上げることが重要と考え、遺伝子発現データの信頼性をコントロールするための研究を中心に行ってきた。実験手順を管理することによってデータの信頼性を確保し、今後とも薬物曝露遺伝子発現解析を積み重ねてゆく予定である。

得られたデータは順次解析を行い、学会や論文などで公開した後、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、臨床検体を得るための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曝露して遺伝子発現解析を行った。現在薬物曝露遺伝子発現解析を積

み重ねるとともに、遺伝子発現解析のデータ解析手法を構築中である。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表(1-4)

1 Oshima Y, Fujimura A Function of a conserved residue in the amino terminal alpha-helix of four helical bundle cytokines Cytokine 2003,24 36-45

2 Oshima Y, Fujimura A, eds Analysis of 3'/5' Ratio of Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Tokyo, Japan Universal Acaemy Press, Inc, 2003 472-473pp

3 Oshima Y, Kurokawa S, Tokue A, Mano H, Ito K, Suzuki M, et al, eds Primary cell preparation and genome-wide gene expression analysis of human renal tubular cells Tokyo, Japan, 2003

4 Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Ueno S, et al DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia Leukemia 2003,17 1990-7

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提供された腎切除例の病理学的検討

分担研究者 斎藤 建 自治医科大学病理学講座教授

研究要旨

プライマリーヒト腎細胞を用いた研究に提供された11腎切除例を病理学的に検索し、以下の結果を得た。

腎細胞癌8例、腎盂移行上皮癌1例、尿管移行上皮癌2例の非腫瘍部が提供されていた。腎細胞癌の病期は全て pT1、尿路癌の病期は pTa だった。

倫理的に疑問点がある例は認められず、腎細胞採取は、腎細胞癌症例については、前回の基礎的検索に則った例で、腎細胞採取が行われていた。

尿管癌のため水腎症になっていた1例を除き、提供された腎は組織学的に正常だった。

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、臓器・組織切除術式が倫理的に妥当であることの第三者による確認である。

B 研究方法

自治医科大学附属病院で行われた腎切除例のうち、プライマリーヒト腎細胞を用いた研究に腎組織が提供された11例について病理学的に検索し、切除術式が妥当であるか、提供された腎細胞・組織が病理組織学的にほぼ正常であるかについて検索した。

(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であり、倫理的問題はない。

C 研究結果

1 疾患と病期

全例で腎全摘術が行われており、原疾患は腎細胞癌8例、腎盂移行上皮癌1例、尿管移行上皮癌2例だった。腎細胞癌は全て圧排性増殖を示し、5例は pT1b(4-7cm)で、3例は pT1a(4cm以下)だった。最も小さい腫瘍は 2.5cm だったが腎門部近傍にあったため、やむを得ず腎全摘術が行われた。3例の尿路癌の病期は pTa だった。

2 非病変部の状態

腎細胞癌例では、腫瘍により圧排された部分以外は肉眼的に異常はなく、7例は組織学的にも正常だったが、1例で微小腺腫が偶然発見された。尿路癌3例のうち、癌進展が6cmに及び、水腎症を呈していた尿管癌例では、組織学的にも円形細胞浸潤を伴う腎組織荒廃が認められたが、残る2例では腎病変は極めて軽度だった。

D 考察

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は、非腫瘍部がほぼ正常であることが多い腎癌取り扱い規約によるT1症例（最大径7cm以下の腎細胞癌）の手術で行うべきである。これが前回の検索の結論であった。今回の検索例の腎細胞癌は全てpT1で、1例に認められた微小腺腫を除くと、非腫瘍部は組織学的にも正常だった。したがって、プライマリーヒト腎細胞を用いた研究のための腎細胞採取は、腎細胞癌症例については、前回の基礎的検索に則って行われたと言える。また、早期腎盂・尿管癌のため切除された水腎症のない腎にも、研究のための腎細胞採取が可能なほぼ正常な腎組織が認められた。

なし
2 実用新案登録
なし
3 その他
なし

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が行われた11手術例に倫理的疑問点はなく、水腎症を来した尿管癌1例を除き、腎細胞採取部は組織学的に正常だった。

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

なし

H 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 特許取得

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

人工肝臓カラム(キグナス)を用いた肝細胞株薬剤代謝の検討

分担研究者 永井秀雄 自治医科大学消化器一般外科
分担研究者 安田是和 自治医科大学消化器一般外科
研究協力者 佐田尚宏・王寧

研究要旨

確立されたヒト肝細胞株 HepG2-GS に cytochrome P450 のアイソザイムである CYP 3A4 を導入、新細胞株 HepG2-GS-3A4 を作成した。この新細胞株および人工肝臓カラムを用いて、diazepam および ammonia の細胞内輸送、代謝の検討を行った。その結果この新細胞株は diazepam および ammonia 代謝能を有し、特に diazepam 代謝においては、代謝速度の速い temazepam への代謝が有意であることが確認された。

A 研究目的

新細胞株 HepG2-GS-3A4 の作成

ヒト肝細胞由来の HepG2-GS は、親株である HepG2 に glutamine synthetase (GS) を導入して作成された培養細胞株で、HepG2 と比較して薬剤代謝能が著明に向上している。今回の検討では、その HepG2-GS 株に、肝細胞としての機能をより強化する目的で、cytochrome P450 のアイソザイムである CYP 3A4 を導入し、新細胞株 HepG2-GS-3A4 を確立する。

HepG2 に GS 遺伝子および CYP 3A4 遺伝子を導入した。導入方法は Kim らの方法により行い、zeocin 耐性遺伝子を同時に導入することにより、遺伝子導入を確認した。この新たに作成した培養細胞株 HepG2-GS-3A4 の薬剤代謝能を *in vitro* で検討した。6 穴培養容器に十分量の HepG2-GS-3A4 細胞を培養後、培養液中に 0.1、0.3、3、10、30 μ g/ml の diazepam を投与、経時的な濃度変化を観察した。また HPLC 法により、diazepam の代謝産物の同定・定量を行った。

ヒト肝細胞株 HepG2-GS-3A4 を用いて作成した人工肝臓カラムにおける、diazepam および ammonia 代謝能の検討

人工肝臓カラムは体外循環式 3D バイオリアクターであるキグナス(図 1)を用い、新たに確立したヒト肝細胞株 HepG2-GS-3A4 をカラム内に培養、その薬剤代謝能を diazepam および ammonia において検討する。

ヒト肝細胞株 HepG2-GS-3A4 を用いて作成した人工肝臓カラムにおける、diazepam および ammonia 代謝能の検討

体外循環式 3D バイオリアクターであるキグナスは、glassfiber (4cmx3m) を多重に貼付したカラムと、培養液注入用ラインおよび排液用ラインよりなる。このカラム内に HepG2-GS-3A4 細胞 (HepG2-GS-3A4 群)、および HepG2 細胞を充填 (HepG2 群)、細胞を充填しないカラム(コントロール群)の 3 種類のカラムを作成し、実験を行った。培養液は 150ml/hr の速度で灌流する。薬剤代謝能測定のため、30 μ g/ml diazepam、もしくは

B 研究方法

新細胞株 HepG2-GS-3A4 の作成

pBudCE4 plasmid をベクターとして、培養細胞株

1mM ammonia を付加して、灌流、経時的濃度変化を観察した

C 研究結果

新細胞株 HepG2-GS-3A4 の作成

新細胞株 HepG2-GS-3A4 は、zeocin 耐性を示し、遺伝子導入が実証された。また diazepam 代謝の検討では、容量依存性に diazepam の低下がみられ(図 2)、また diazepam 代謝産物では terazepam が最も多く、容量依存性の増加がみられた(図 3) ammonia 代謝においても同様に容量依存性の低下がみられた(図 4)

ヒト肝細胞株 HepG2-GS-3A4 を用いて作成した人工肝臓カラムにおける、diazepam および ammonia 代謝能の検討

30 μ g/ml の diazepam 灌流実験では、HepG2-GS-3A4 群では有意な diazepam 量の減少がみられ、特に実験開始後 12-24 時間で代謝量が増加した(図 5) 代謝産物はやはり nordiazepam よりも terazepam が有意であった(図 6) また HepG2 群では、diazepam の代謝は観察されたが、コントロール群と比較して有意差を認めなかった(図 5) 1mM ammonia 代謝に関しては、HepG2 群では有意な ammonia 減少を認めなかったが、HepG2-GS-3A4 群では経時的に ammonia の減少を認めた(図 7)

D 考察

今回導入した CYP 3A4 遺伝子は、cytochrome P450 の約 30 存在するアイソザイムの中で約 30% を占め、diazepam 代謝における phase I 反応の約 80% を行う Diazepam は phase I 反応で、nordiazepam に代謝され、phase II 反応で oxazepam と terazepam へと代謝される この phase II 反応には glutamine synthetase が重要な役割を果たす。今回 phase I、II の両反応における key enzyme である glutamine synthetase と CYP 3A4 を、ヒト肝細胞培養株 HepG2 に導入し新細胞株 HepG2-GS-3A4 を確立した In vitro の検討で、

diazepam および ammonia の代謝能が示され、その代謝率は親株である HepG2 よりも有意に高かった。同様に cytochrome P450 のアイソザイムを導入した Ono らの検討¹⁾では、本研究よりも約 5-10 倍の代謝率であったが、これは細胞懸濁液を用いたという条件の差によると考えられた。また HepG2-GS-3A4 による代謝産物は、半減期の短い terazepam であることは、人工肝細胞として有利な点と考えられた。

人工肝臓カラム・キグナスを用いた検討でも、ほぼ in vitro と同様の代謝率が得られた。Enosawa ら²⁾は同様にキグナスを用い、HepG2-GS 細胞株を導入、当研究よりも 3-4 倍高い代謝率を得た。彼らの実験は 40 日間持続施行されている等、条件に違いがあるため一概には比較できないが、今後条件の改善等更なる検討が必要である。

E 結論

本研究ではヒト肝細胞株 HepG2 に、2 つの key enzyme である glutamine synthetase および CYP 3A4 を導入して、新細胞株 HepG2-GS-3A4 を確立した In vitro および人工肝臓カラム・キグナスを用いた検討で、diazepam および ammonia の代謝能を確認した。今後人工肝臓機能をより強化すべく、細胞株の確立および条件の改善等、更なる工夫が必要であると考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1) Ono S, Hatanaka T, Miyazawa S, Tsutsui M, Aoyama T, Gonzalez FJ, Satoh T. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C9 and the 3A subfamily. *Xenobiotica*, 1996, 26: 1155-1166

2) Enosawa S, Miyashita T, Suzuki S, et al. Long-term culture of glutamine-transfected HepG2

cells in circulatory flow bioreactor for development of a bioartificial liver Cell Transplantation 2000, 9 711-715

2 学会発表
なし

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

図1 人工肝臓カラム・キグナス

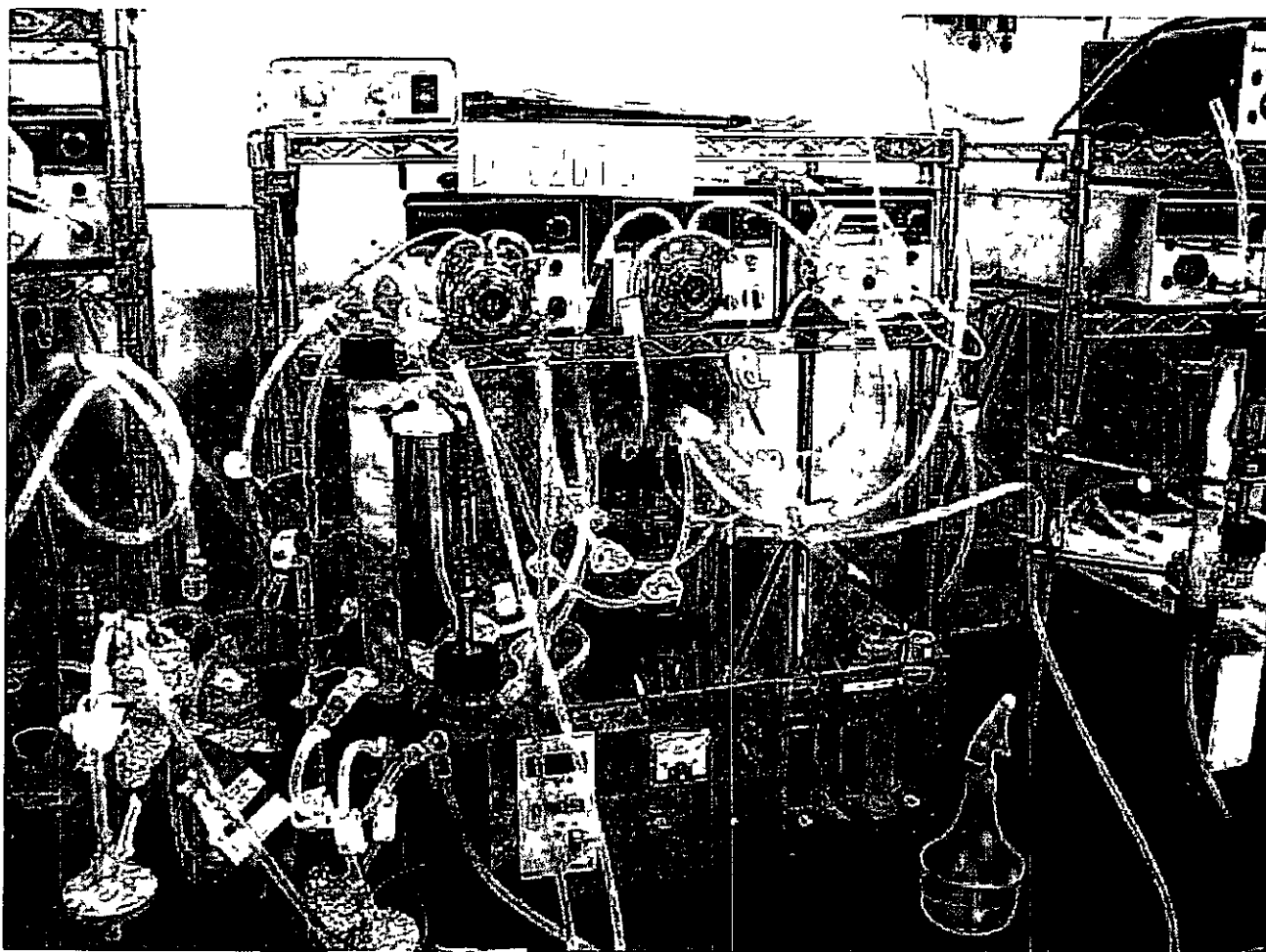


図 2 HepG2-GS-3A4 細胞株による diazepam の代謝 (DZP diazepam)

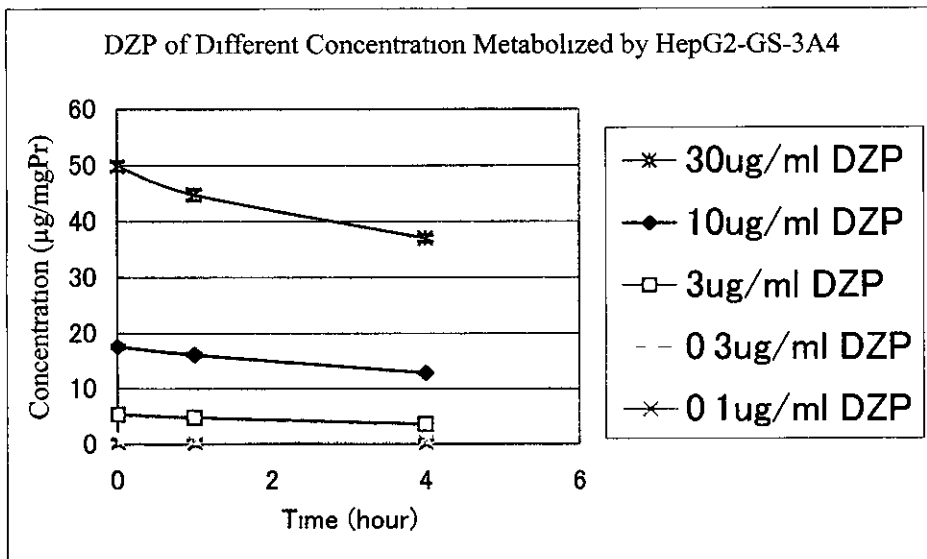


図 3 HepG2-GS-3A4 細胞株による diazepam 代謝による terazepam 産生 (DZP diazepam、TZP terazepam)

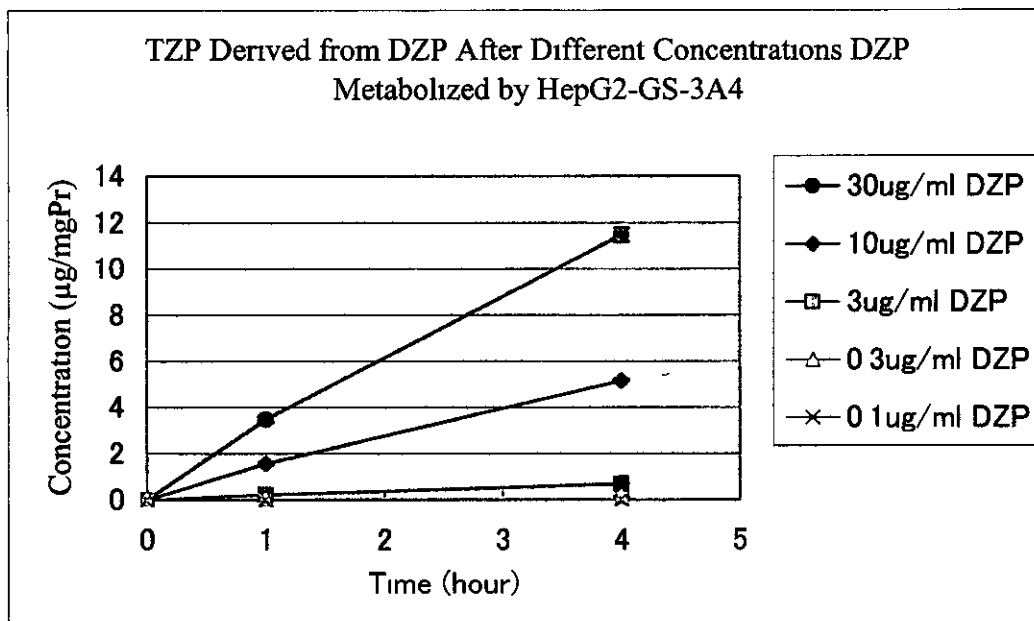


図 4 HepG2-GS-3A4 細胞株および HepG2 細胞株による ammonia の代謝

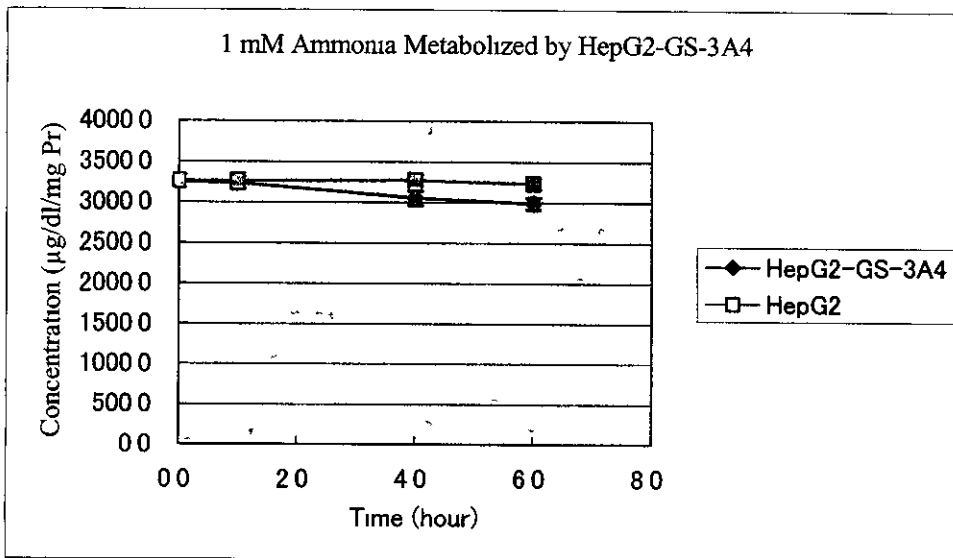


図 5 キグナスを用いた HepG2-GS-3A4 細胞株の diazepam 代謝

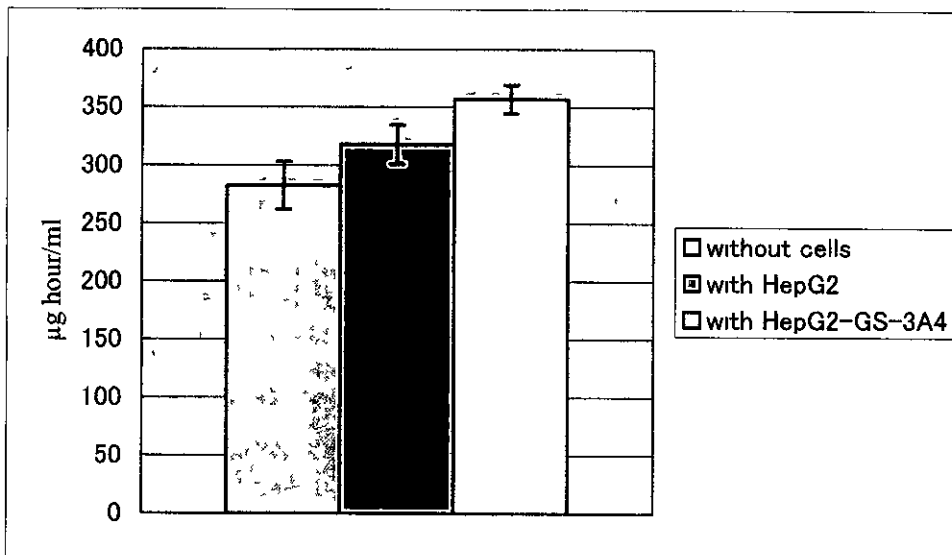
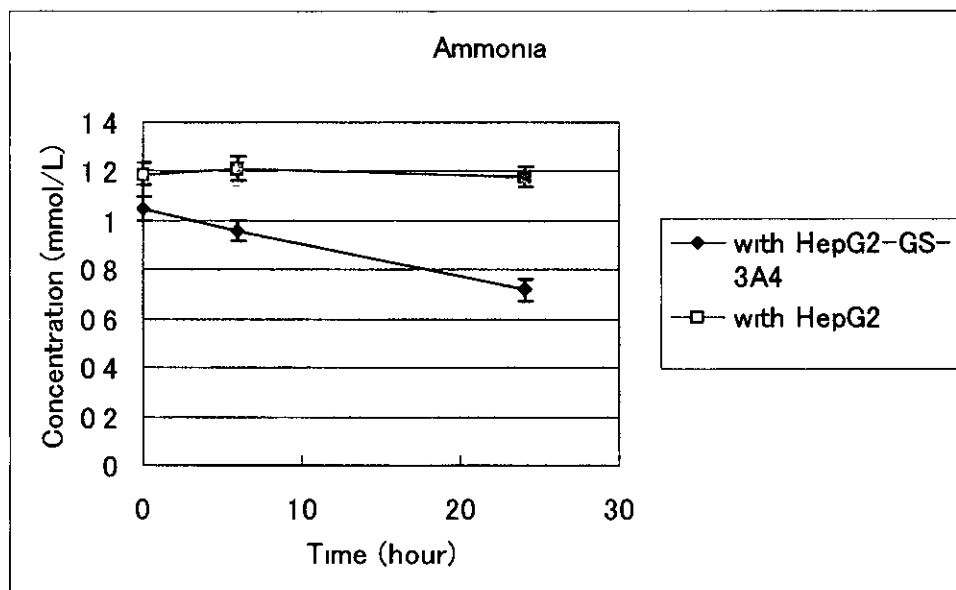


図6 キグナスを用いた HepG2-GS-3A4 細胞株の ammonia 代謝



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

分担研究者 徳江章彦 自治医科大学泌尿器科学教授

分担研究者 大島康雄 自治医科大学臨床薬理学助手

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。さらに日本人のプライマリー腎臓細胞を安定して得ることは今後、様々な *in vitro* の薬物曝露・毒性研究において、人種間の薬物に対する反応性の相違や、日本人における個人差を検討する上でも重要となる。さらに得られた細胞が凍結した状態で保存され、再度培養曝露実験に使用することができれば、そのハンドリング上の自由度が増すために研究を推進する上で大きなメリットといえる。本プロジェクトの開始より平成16年2月までの間に本院で片腎摘出術が施行された症例で、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14症例のうち、細胞分離に成功した10症例の細胞につき、細胞の増殖・形態の変化・凍結保存の影響などにつき検討した。

A 研究目的

得られた細胞の培養および凍結融解の影響を検討する。

細胞より抽出した RNA と凍結融解後に培養して抽出した RNA の遺伝子発現解析を行い、凍結融解前後における遺伝子発現の差の有無について検討した。

B 研究方法

平成16年2月までに本研究に賛同して頂いた患者さん14症例のうち、細胞培養に成功した10症例分の細胞につき検討した。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異なる上皮性の細胞であったため、尿細管細胞と考えられたが、確認のために膜表面 Glut-2 タンパク質の発現を FACS で、 γ GTP 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 NAG の濃度を測定した。長期の培養による影響を倒立位相差実体顕微鏡を用いて形態を観察することにより検討した。また、凍結融解の影響については凍結前の培養

(倫理面への配慮)

本研究に用いた細胞はすべて、当大学の倫理評価 WG が承認した方法で得た臨床検体である。

C 研究結果

研究にエントリーして頂いた14症例のうち10例より細胞の分離に成功した。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 GTP、NAG が発現しており、検討した範囲では尿細管由来の細胞として矛盾がなかった。これらの細胞形態は、培養開始より約4週間目

まではほぼ変化がないものと考えられた。しかし5週間目から6週間目にかけて、紡錘形でより細長い形態の細胞が散在してくるようになった。この細長い形態の細胞は線維芽細胞の形態と類似しており、また長期のプライマリーカルチャー細胞を培養するに従い増殖してくる点からも、線維が細胞として矛盾がなかった。

プライマリーカルチャー腎細胞を用いたその凍結前後で、無刺激の遺伝子発現を比較したところ、Cross Gene Error Modeling で発現解析に供することができると考えられたデータレンジにある範囲では、有意な遺伝子発現の差を呈した遺伝子は認めなかった。

D 考察

我々のプライマリーカルチャーの作成は、組織特異的な純化の手順を含まないために、得られた細胞群は、腎臓皮質に存在する様々な種類の細胞群の混在したものである。しかし、細胞純化の過程で行う遠心や酵素処理に対する細胞の感受性などの差により、結果として得られた細胞群の多くは尿細管細胞であった。

プライマリーカルチャー細胞は、多くの場合増殖速度が遅い。一方、線維芽細胞などの混入細胞の一部は比較的増殖速度が速い。したがって、当初検鏡上ほとんど確認することのできないほど少数のポピュレーションであった線維芽細胞が、長期の培養により増殖してくることが考えられる。このため、当初均一な、ほとんどが尿細管由来と考えられる細胞集団であったものが、5週目以降は線維芽細胞と思われる細胞が増殖し、培養6週目頃には培養細胞の半数近くまでが線維芽細胞様の細胞に置き換わった。したがって、腎臓の細胞を用いた薬物曝露遺伝子発現解析は、このような線維芽細胞の増殖が生じる前に行うことが望まれる。4週間目程度までに曝露実験を行うことが必要と考えられた。

未刺激の細胞を用いた、凍結融解前後の遺伝子発現に有意な変化は全く見られなかった。このように凍結融解前後で細胞の基本的な性質に

有意な変化があるという証拠は得られなかった。従って、凍結細胞を研究に用いても、未凍結のプライマリーカルチャーと同様の研究結果を得ることができるかと期待された。一方、近年腹腔鏡下での手術などの普及に伴い、手術中に研究用の細胞を得る機会はますます減少してくるものと考えられる。このため、手術のスケジュールに依存しない、凍結プライマリーカルチャー細胞の利用は、このような研究をさらに推進する上で非常に有用と考えられる。また、これらの細胞の利用を希望する学外の共同研究者への配布も凍結状態で行えるため、より好ましいと考えられる。

E 結論

プライマリーカルチャー細胞は培養開始後4週間以内に研究に使用することが望まれる。凍結融解は細胞の遺伝子発現に有意な変化をもたらさないため、今後様々な研究に凍結細胞を応用することが可能と考えられる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Oshima, Y, and Fujimura, A (2003) Function of a conserved residue in the amino terminal alpha-helix of four helical bundle cytokines Cytokine 24, 36-45

Oshima, Y, and Fujimura, A (2003) Analysis of 3'/5' Ratio of Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Universal Academy Press, Inc, Tokyo, Japan

Oshima, Y, Kurokawa, S, Tokue, A, Mano, H, Aito, K, Suzuki, M, Imai, M, and Fujimura, A (2003) Primary cell preparation and genome-wide gene expression analysis of human renal tubular cells, Tokyo, Japan

Oshima, Y, Ueda, M, Yamashita, Y, Choi, Y L, Ota, J, Ueno, S, Ohki, R, Koizumi, K, Wada, T, Ozawa, K, Fujimura, A, and Mano, H (2003) DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia Leukemia 17, 1990-7

2 学会発表

Yasuo Oshima, Shinsuke Kurokawa, Akihiko Tokue, Hiroyuki Mano, Ken Saito, Makoto Suzuki, Masashi Imai, Akio Fujimura, Primary cell preparation and genome-wide gene expression analysis of human renal tubular cells, Toxicogenomics International Forum 2003 (Shibuya, Tokyo)

Yasuo Oshima, Akio Fujimura, Analysis of 3'/5' Ratio of Action and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Genome Informatics Workshop 2003 (Yokohama, Kanagawa)

(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

臨床検体の管理・初代培養システムの構築

分担研究者氏名 鈴木 誠 自治医科大学薬理学助教授

研究要旨

臨床材料としてのマウス肝臓から初代培養細胞を効率よく作成するために、過去に用いられた方法に基づいて培養方法を確立した。

A 研究目的

臨床材料としての人肝臓から初代培養細胞を効率よく作成するために、その方法を確立する。このために、マウス肝より培養細胞の作成を試みる。

B 研究方法

(1)過去の論文にある方法

コラーゲナーゼ(1mg/ml)でインキュベート後

コラーゲナーゼ(1-2mg/ml, in PBS)にて消化
分離した細胞を遠心(2000rpm 2分)
し集めた後培養する。

(2)今回組み合わせて行った方法

コラーゲナーゼ(1mg/ml)でインキュベート後

ダウンス型ホモジナイザーで粉碎。

もしくは注射器を用いて粉碎。

粉碎物を集める。培養液にて培養。

コラーゲナーゼ(1mg/ml)でインキュベート後

【コラーゲナーゼ(1-2mg/ml, in PBS)、ディスパーゼ(1500U/ml in ICS, 1 mM CaCl₂)、トリプシン+EDTA(0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA-4Na, in HBSS, GIBCO)】

の3種類の消化の組み合わせを行った。

C D 研究結果・考察

(1)の方法を行ったが還流時間が短いためか、赤血球が大量に混じってきた。肝細胞も収率が悪く培養できなかった。(2)の方法を行ったが、粉碎法では細胞が分離でき培養も可能だった。しかし、赤血球がやはり大量に混じる事と、肝細胞は量的に少なかった事が問題として残った。酵素を組み合わせた方法でも肝細胞は分離できたがやはり、赤血球は大量に混じってきた。この方法のほうが肝細胞の分離はよかった。

そこで、まず肝細胞を機械的に破碎したのち、コラーゲナーゼで30分間消化した。ここで、いったん上澄みに含まれる赤血球と一部の肝細胞を捨てて、沈殿を再びデスペルサーもしくは、トリプシンで30分消化した。この方法だと、赤血球は大分除かれ、肝細胞がより多く分離されてきた。

E 結論

なし

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

なし

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 自治医科大学医学部教授

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。本研究計画では大量の遺伝子発現データを基に、視覚的にサンプルクラスを表示する方法について検討を加えた。

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。昨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を確立し、さらに本年度はそこで得られた大量の遺伝子発現データを基に、薬剤感受性の有無等について判定する統計的解析手法を検討した。

B 研究方法

1) 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、これを繰り返し行うことで任意の量の cRNA を得ることが可能となった。この 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 を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。