

平成15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7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

課題番号		
20030960A KH71066	免疫抑制剤の体内動態並びに薬効発現に関わる蛋白群の遺伝子解析を基盤とした移植臓器における拒絶反応防御に関する研究	乾 賢一 …… 1
961A KH71067	インフォームドコンセントに基づいた外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制の確立とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション	大野泰雄 …… 11
962A KH71068	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用	永森静志 …… 21
963A KH71069	ヒト組織・細胞の新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究－ヒト組織バンクの効率的運用へ向けて－	松浦成昭 …… 25
964A KH72076	公共的な研究利用ヒト組織バンクシステム構築の検討	小林英司 …… 30
965A KH72077	眼組織からの幹細胞等の同定・単離・細胞株化およびこれらの保存方法に関する研究	篠崎尚史 …… 36
966A KH72078	ヒト組織の創薬研究資源化に関する研究	林 真 …… 42

ヒト組織・細胞の新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究—ヒト組織バンクの効率的運用へ向けて—

所 属 大阪大学大学院医学系研究科

研究者 松浦 成昭

研究要旨 ヒト組織は摘出後、3時間までか保存液中で6時間までの間に液体窒素で凍結すれば、材料として大きな活性低下がない可能性が示された。タンパク質レベル、DNAレベルでは手術切除後12時間くらいの時間経過までは十分に解析を行えた。

分担研究者

(1) 大阪大学大学院医学系研究科

門田守人

(2) 大阪大学大学院医学系研究科

吉川秀樹

(3) 東北大学大学院医学系研究科

堀井 明

(4) 山形大学医学部

倉智博久

(5) 東京大学大学院医学系研究科

名川弘一

(6) 東京慈恵会医科大学

大石幸彦

(7) 杏林大学医学部

村田厚夫

(8) 京都大学大学院医学系研究科

今村正之

(9) 近畿大学医学部

塩崎 均

(10) 熊本大学医学部

江上 寛

(11) 大阪府立成人病センター

今岡真義

(12) 箕面市立病院

吉川宣輝

(13) NTT西日本大阪病院

門田卓士

(14) 労働福祉事業団関西労災病院

富田尚裕

(15) 大鵬薬品工業株式会社

福島正和

(16) 大日本製薬株式会社

藤井敏彦

(17) 武田薬品工業株式会社

日下雅美

(18) 日本オルガノン株式会社

吉野公一郎

A. 研究目的

本研究は手術あるいは病理剖検時に得られるヒトの新鮮組織を用いることにより、薬物の有効性、安全性を評価する方法を検討していくものである。また、昨年度においてすでに設立されたヒト組織のバンクの効率的な運用をめざして、産学共同のネットワーク・システム作りを企図するものである。

医薬品の研究開発において、ヒトと動物の間に薬物の代謝や反応性に相違が見られ、動物を用いた薬理試験等の結果が必ずしもヒトに適合しないことがあり、ヒト組織を用いた薬物の

有効性、安全性の検討は欠かせない。本研究により、人体に対する薬物の作用や代謝機序の正確な把握が可能となることから、無用な臨床試験や動物実験の排除、被験者の保護に充分配慮した臨床試験の実施が期待できるとともに、薬物相互作用の予測も可能となる。また、このように、新薬開発を効率化するだけでなく、直接的にヒトの病変部位を用いることによって、疾病メカニズムの解明や治療方法、診断方法の開発などに大きく貢献できるものと期待される。

ヒト組織新鮮材料の提供に当たり、通常は手術で摘出された臓器の一部が当てられることになるが、理想的な状態で材料を採取することは通常困難である。すなわち、ヒト組織材料は手術で摘出してから、家族に見せたり、病変を確認するための種々のプロセスを経てから採取され、かなりの時間が経過することになる。本研究の目的は手術標本の時間経過から、どれくらいまで組織材料が利用可能であるか、明らかにすることにある。新鮮組織のほかに過去の手術サンプルでホルマリン固定パラフィン包埋された標本についても使用可能かどうかを検討する。

また、ヒト組織新鮮材料入手に際しての提供者からの同意を得るに際して、インフォームドコンセントの書式および対応する倫理委員会等について調査研究を行い、問題点を点検することも重要な問題であり、検討した。

B. 研究方法

手術標本からのヒト組織材料の採取に際して、摘出後の時間経過によりどれくらいまで使用可能か、また阻血時間など手術の影響はどの程度あるのか、タンパク質、mRNA、DNA レベルに分けて検討した。また、剖検材料から研究の目的とするタンパク質、mRNA、DNA を得ることが出来るかどうか、基礎的検討を行った。さらに生検組織について手術摘出材料との比較を行った。

これらの研究はヒト組織を用いる場合、インフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の承認が必要であるが、現段階では倫理委員会の承認を得ていないので、大部分は動物（マウス、ラット）を用いて、手術標本からの組織材料の採取について、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNA がそれぞれの程度、傷害を受けるかを検討した。生検組織については分担研究

施設・関西労災病院および大阪大学医学部第2外科の協力を得て、検討を行った。

また、本ヒューマンサイエンス総合研究において関連した研究を行っている小林英司研究班の班会議、公開シンポジウムに参加し、意見交換を行った。さらに、ヒト組織を用いる研究を実施する研究者および提供する方と考えられる外科医にインタビューを実施し、意見交換を行った。

C. 研究成果

1) 手術標本からの組織材料の採取について、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNA がそれぞれの程度、傷害を受けるかを動物および一部ヒトの組織を用いて検討した。総蛋白質量、酵素活性は血管の結紮の有無、摘出後の状態（室温・氷冷）の影響をほとんど受けなかった。また、摘出後の時間経過の検討からも大部分の臓器では6時間まで保持された。しかし、膵臓は時間経過とともに活性の低下を認めた。また、膵臓以外は死後3時間までの摘出で活性の低下は見られなかった。一方、DNA は12時間以内であれば、RNA は3時間以内であれば、大きな差を認めなかった。このことから、摘出後、3時間くらいまでに液体窒素で凍結すれば、材料として大きな活性低下がない可能性が示唆された。

剖検材料についても同様に癌胎児性抗原（CEA）を例に検討した。剖検材料は死亡直前の状態に大きく左右されるが、タンパク質やDNA レベルはおおむね保たれており、多くの場合、解析が可能であった。mRNA レベルは一般的には解析困難であるが、死後1時間程度ではRT-PCRで解析可能であった。

生検標本はタンパク質、DNA は良好に得られたが、mRNA は短時間で凍結しない限り、大幅な活性低下を認めた。また、凍結からもどす時に RNase の阻害剤を用いない場合は活性低下が見られた。生検標本は小さなサンプルで温度の影響を受けやすく、そのために種々の要因で活性低下がおこると考えられた。小サンプルは取扱いに慎重さを要すると考えられた。mRNA について小サンプルの保存を種々の条件でさらに検討したところ、RNAlater を用いて、摘出1時間以内に保存し、TRIzol（あるいは RNeasy）で抽出するのが最も効率が良かった。

将来ヒト組織バンクの扱うサンプルの中には過去のホルマリン固定パラフィン標本も対象になる可能性がある。ホルマリン固定パラフィン標本はホルマリンと言う変性剤、アルコール・キシレンの有機溶媒、約 60℃の熱、そして液体のパラフィンとタンパク質や核酸の保存にとっては問題になる因子が多数含まれている。しかし、一方では過去の標本の組織構造は保持されており、多くの場合、免疫組織化学的に種々のタンパク質も検出されている。そこで、ホルマリン固定パラフィン標本が条件によってどの程度使用可能かの検討を行った。その結果、ホルマリン固定時間が少なくとも 3 日以内で有機溶媒、熱、液体のパラフィンの中にいる時間が一晚程度であれば、多くの場合免疫組織化学的にタンパク質を検出することは可能であった。さらに、抽出バッファや方法を工夫すればウェスタン法によるタンパク質の検出も可能であった。mRNA については容易ではないが、3 時間以内のホルマリン固定時間なら抽出は可能であった。DNA は 3 日のホルマリン固定まで抽出できた。ホルマリン固定パラフィン標本を対象にできれば過去のストックを利用できるので、制限はあるが考慮すべき点であると考えられる。

2) 組織バンクの扱うサンプルの中に血液細胞、骨髄細胞、さらに未分化幹細胞が重要な 1 つの群を形成すると考えられる。血液細胞を材料に細胞表面抗原である接着分子および CD16 の発現をフローサイトメトリーで測定した。定性的には採取後 48 時間程度でもヒストグラムパターンには大きな変化は見られなかったが、定量性が必要な場合には短時間のプロセスが必要であると考えられた。

3) インフォームドコンセントの取得の点において、臓器を摘出する側の外科医から説明の難しさが指摘された。病气や手術に関して気持ちが落ち着かない手術前の説明で、ヒト組織バンクの説明を十分に理解させるのはかなり難しいのではないかという意見が多く見られた。手術前に十分な説明を行わずに、臓器を組織バンクの目的でプロセスすることは出来ないため、その説明を容易にするためのマニュアルが必要であるという意見も多かった。また、摘出臓器の量的な妥当性、その一部を組織バンクに回すことが患者の診断上、不利益を被らないかどうかの判断を公平にする役割を病理医に求めるべきであるという指摘も見られた。小林英司グループの班会議では、一般参加の患者サイドからの疑問の声が多く寄せられ、インフォームドコ

ンセントを得る際の、組織バンク事業の必要性を世間的に啓発していくことが重要であると考えられた。

D. 考察

手術標本からの組織材料については一般的にはタンパク質レベル、酵素の活性、DNA レベルの解析は手術後 12 時間くらいは安定であり、十分に行えると考えられた。手術手技や阻血影響は予想より少ない結果が得られた。一方、mRNA レベルは 3 時間程度までは問題なかったが、条件に左右されることが多く、今後の課題と考えられた。剖検材料もタンパク質レベル、DNA レベルの解析は十分に行えると考えられた。生検標本からの mRNA は取扱いに慎重さを要し、小サンプルの場合の難しさを示していた。

ヒト組織を医薬品の研究開発に用いる場合、提供者である患者より得るインフォームドコンセントの難しさが指摘された。ヒト組織バンク事業の必要性の理解を世間的に十分に啓発していく必要が感じられた。

E. 結論

手術標本からの組織材料の採取について、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNA がそれぞれどの程度、傷害を受けるかをマウス・ラットの種々の組織を用いて検討した。

1) 総蛋白質量、酵素活性は血管の結紮の有無、摘出後室温状態・氷冷状態、摘出後時間(3 時間まで)の影響をほとんど受けなかった。脾臓のみが死後(3 時間)摘出で低下を認めた。

2) DNA は摘出後 12 時間で、RNA は 3 時間で低下を認めた。

3) ヒト組織からの RNA 抽出は室温では 3 時間で、保存液中では 6 時間で低下を認めた。マウス・ラットの組織に比べて、手術の影響を受けているものと考えられた。

以上より、ヒト組織は摘出後、3 時間までか保存液中で 6 時間までの間に液体窒素で凍結すれば、材料として大きな活性低下がない可能性が示唆された。

手術材料からの時間経過の検討および、剖検材料を用いた検討では、タンパク質レベル、DNA レベルの解析は採取後 12 時間後までは十分に行えるが、mRNA レベルは数時間以内に分解され、今後さらに細かい検討を必要とすると考えられた。手術手技、阻血などの影響は少

なかったが、小サンプルの場合は取扱いに注意が必要であった。mRNA について小サンプルの保存を種々の条件でさらに検討したところ、RNAlater を用いて、抽出1時間以内に保存し、TRIzol (あるいは RNeasy) で抽出するのが最も効率が良いことが明らかにされた。

F. 研究発表

1) Tani N, Higashiyama S, Kawaguchi N, Madarame J, Ota I, Ito Y, Ohoka Y, Shiosaka S, Takada Y, Matsuura N: Expression level of integrin $\alpha 5$ on tumor cells affects the rate of metastasis to the kidney. *Brit J Cancer* 88:327-333, 2003.

2) Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A: Bag-1 expression in thyroid neoplasm: its correlation with Bcl-2 expression and carcinoma dedifferentiation. *Anticancer Res* 23:569-76, 2003.

3) Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A: Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms. *Histopathology* 42:492-7, 2003.

4) Xu X, Yamamoto H, Sakon M, Yasui M, Ngan CY, Fukunaga H, Morita T, Ogawa M, Nagano H, Nakamori S, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M: Overexpression of CDC25A Phosphatase Is Associated with Hypergrowth Activity and Poor Prognosis of Human Hepatocellular Carcinomas. *Clin Cancer Res* 9:1764-1772, 2003.

5) Ito Y, Miyoshi E, Uda E, Yoshida H, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A: 14-3-3 sigma possibly plays a constitutive role in papillary carcinoma, but not in follicular tumor of the thyroid. *Cancer Lett* 196:87-91, 2003.

6) Ito Y, Yoshida H, Shibahara K, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Uchimi T, Kuwano M, Miyoshi E, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A: Y-box binding protein expression in thyroid neoplasms: Its linkage with anaplastic transformation. *Pathol Int* 53:429-33, 2003.

7) Takahashi Y, Teshima T, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Madachi A, Ikeda S, Mizuno H, Ogata T, Nojima K, Furusawa Y, Matsuura N:

Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose. *Cancer Res* 63:4253-7, 2003.

8) Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A. Syndecan-1 expression in thyroid carcinoma: stromal expression followed by epithelial expression is significantly correlated with dedifferentiation. *Histopathology* 43:157-64, 2003.

9) Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M: JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology*, 125:556-71, 2003.

10) Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Nakano K, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A. Survivin expression is significantly linked to the dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Oncol Rep* 10:1337-40, 2003.

11) Madarame J, Higashiyama S, Kiyota H, Madachi A, Toki F, Shimomura T, Tani N, Ohishi Y, Matsuura N: Transactivation of epidermal growth factor receptor after heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor shedding in the migration of prostate cancer cells promoted by bombesin. *Prostate* 57:187-95, 2003.

12) Ito Y, Miyauchi A, Yoshida H, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Taniguchi N, Matsuura N, Kuma K, Miyoshi E. Expression of alpha 1, 6 fucosyltransferase (FUT8) in papillary carcinoma of the thyroid: its linkage to biological aggressiveness and anaplastic transformation. *Cancer Lett* 2000:167-72, 2003.

13) Hamada Y, Nokihara K, Okazaki M, Fujitani W, Matsumoto T, Matsuo M, Umakoshi Y, Takahashi J, Matsuura N: Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR. *Biochem Biophys Res Commun* 310:153-7, 2003.

14) Ito Y, Yoshida H, Matsuzuka F, Matsuura N, Nakamura Y, Nakamine H, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A: Cdc2 expression in primary thyroid lymphoma: its relationship with biological aggressiveness and G2 cyclins. *Pathol Res Pract* 199:533-8, 2003.

- 15) Ito Y, Miyoshi E, Uda E, Yoshida H, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A: 14-3-3 sigma possibly plays a constitutive role in papillary carcinoma, but not in follicular tumor of the thyroid. *Cancer Lett* 2000:161-166, 2003.
- 16) Mori S, Tanaka M, Nanba D, Nishiwaki E, Ishiguro H, Higashiyama S, Matsuura N: PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and upregulates ectodomain shedding of heparin-binding EGF-like growth factor. *J Biol Chem* 278:46029-34, 2003.
- 17) Nakatsuji Y, Nshio Y, Tani N, Adachi K, Ohmichi M, Hisamoto K, Morishige K, Kurachi H, Tasaka K, Murata Y, Matsuura N: Epidermal growth factor enhances invasive activity of BeWo choriocarcinoma cells by inducing $\alpha 2$ integrin expression. *Endocrine J* 50:703-14, 2003.
- 18) Waki H, Masuyama T, Mori H, Maeda T, Kitade K, Moriyasu K, Tsujimoto M, Fujimoto K, Koshimae N, Matsuura N: Ultrasonic tissue characterization of the atherosclerotic carotid artery. *Circ J* 67:1013-6, 2003.
- 19) Tomita N, Fukunaga M, Ohzato H, Tamura S, Sugimoto K, Aihara T, Miki H, Takatsuka Y, Matsuura N, Iwanaga T, Fukayama N, Sugano K: The Novel Germline Mutation of hMSH2 Gene in a Case of a Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) Patient Who Meets the Revised Amsterdam Criteria. *Jpn J Clin Oncol* 33:486-489, 2003.
- 20) Ito Y, Yoshida H, Motoo Y, Miyoshi E, Iovanna JL, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A: Expression and cellular localization of p8 protein in thyroid neoplasms. *Cancer Lett* 201:237-244, 2003.
- 21) Ito Y, Yoshida H, Matsuzuka F, Matsuura N, Nakamura Y, Nakamine H, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A: Jun activation domain-binding protein 1 expression in malignant lymphoma of the thyroid: its linkage to degree of malignancy and p27 expression. *Anticancer Res* 23:4121-4125, 2003.
- 22) Xu X, Sakon M, Nagano H, Hiraoka N, Yamamoto H, Hayashi N, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Ito Y, Matsuura N, Monden M: Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 11:25-32, 2004.
- 23) Ito Y, Miyoshi E, Sasaki N, Kakudo K, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A: Polo-like kinase 1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma. *Br J Cancer* 90:414-418, 2004.
- 24) Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A: Maspin expression is directly associated with biological aggressiveness of thyroid carcinoma. *Thyroid* 14:13-8, 2004.
- 25) Ogawa M, Yamamoto H, Nagano H, Miyake Y, Sugita Y, Hata T, Kim BN, Ngan CY, Damdinsuren B, Ikenaga M, Ikeda M, Ohue M, Nakamori S, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M: Hepatic expression of ANG2 RNA in metastatic colorectal cancer. *Hepatology* 39:528-39, 2004.
- 26) Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, Hirai I, Tanino H, Kokawa Y, Naito Y, Okamura Y, Ota I, Tani N, Matsuura N: Increased expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci* 95:142-8, 2004.
- 27) Ito Y, Yoshida H, Matsuzuka F, Matsuura N, Nakamura Y, Nakamine H, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A: Cdc25A and cdc25B expression in malignant lymphoma of the thyroid: Correlation with histological subtypes and cell proliferation. *Int J Mol Med* 13:431-5, 2004.
- 28) Sugita Y, Wada H, Fujita S, Nakata T, Sato S, Noguchi Y, Jungbluth AA, Yamaguchi M, Chen YT, Stockert E, Gnjatich S, Williamson B, Scanlan MJ, Ono T, Sakita I, Yasui M, Miyoshi Y, Tamaki Y, Matsuura N, Noguchi S, Old LJ, Nakayama E, Monden M: NY-ESO-1 Expression and Immunogenicity in Malignant and Benign Breast Tumors. *Cancer Res* 64:2199-204, 2004.

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
 - 2) 実用新案登録
 - 3) その他
- いずれも特記事項なし。

平成15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7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成16年9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