

20031270

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露、

遺伝子発現に関する研究(H15-化学-001)

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

プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露、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 肝切除症例の臨床的検討および肝不全モデル犬作成の試み	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 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 プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露・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	20
--	----

大島康雄

6 バイオインフォマティクス	26
----------------	----

篠原 歩

III 研究成果の刊行に関する一覧表	29
--------------------	----

IV 健康危険情報	31
-----------	----

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(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露、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 15 年度は2種類の化合物 (Pseudomonas Exotoxin A, 4-phenylbutyrate)を用いて、化学物質曝露後の遺伝子発現解析を行った。さらに、培養細胞を用いてヒ素化合物(Arsenic trioxide)の曝露実験を行った。ヒ素化合物については、今後遺伝子発現解析データの分析を行う。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の化学物質曝露・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のクオリティの評価を行うとともに、化学物質曝露実験および遺伝子発現解析を行った。これまでの方法では解釈困難な膨大な遺伝子発現解析データを得たが、これらのデータに意味づけを行い、知識として表現することを目的としたバイオインフォマティクス部門では、ヒトゲノムデータを基に、GeneChp HG-U133 チップセットにプロットされている全てのトランスクリプトのゲノム上の上流配列をデータベース化し、今後の解析の基礎を築いた。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いる。そこで、それぞれのトランスクリプト発現量とトランスクリプションファクターの関連性の解析を行っている。

平成 16 年度はより多くの化学物質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ともに知識データベース構築へのアプローチをさらに推進することを予定している。

### A 研究目的

多くの化学物質の中で実験動物では何ら有害反応を示さなかったが、日常生活で使用中にヒトに重篤な有害反応を来だし、使用が中止されるものがある。さらに稀ではあるが身体に不可逆的な障害をもたらし、社会問題化することもある。したがって、この様な化学物質を早期に検出し、よ

り高い安全性を確保するために、ヒトを対象とした何らかの科学的解決法が求められている。肝および腎は生命維持のための重要臓器であるが、しばしば有害化学物質のターゲットとなる。また、基礎研究でしばしば用いられる継代培養細胞の多くはガン化しており、遺伝子発現が正常細胞と異なることがある。そこで本研究で

はプライマリーヒト肝・腎細胞に肝・腎障害性化学物質を曝露させ、DNA マイクロアレーによる網羅的遺伝子発現プロファイリングを行なう。さらに得られたデータを基にして、化学物質の安全性を早期に予測するためにバイオインフォマティクスを応用し、新しい毒性評価法を確立することを目的とする。

## 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。腎臓尿細管由来の細胞は、形態・Glut2発現・ $\gamma$  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、腎・肝毒性の知られている化学物質とそうでない化学物質へ曝露させ、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

腎臓・肝臓を切除する際の非病変部の組織の利用に関して、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か、本研究実施計画を承認した。承認後も、手術検体一つ一つの切除状態を病理診断部で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。臨床検体採取部門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から、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に基づき、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。得られた検体は細胞プロセッシング部門へ送られた。

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た。腎臓尿細管由来の細胞の評価は、形態・Glut2発現・ $\gamma$  GTP発現・NAG発現で行い、主に尿細管由来の細胞が得られたと考えられた。また、肝細胞由来の細胞の評価は、形態・アルブミン産生

能・CYP3A4 発現で行い、肝細胞が得られたと考えられた。以上のような手順によって手術時に得られたヒト組織（肝臓・腎臓）を使用して、遺伝子発現解析研究を行う研究基盤を整備することかできた。

遺伝子発現解析部門では、上記の細胞を用いて、腎・肝毒性の知られている化学物質とそうでない化学物質を様々な濃度で曝露させ、適当な曝露時間の後に細胞を回収して、その RNA を Affymetrix 社の GeneChip®を用いて解析した。尿細管ブライマリー細胞に、腎毒性の知られている化合物（Pseudomonas Exotoxin A）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。

バイオインフォマティクス部門では発現解析により得られたデータを処理し、知識データベースを構築することを目的としている。本年度は、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、信頼することが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実験データを解析対象から外すことか可能となった。また、遺伝子発現データは遺伝子転写因子の活性と密接な関連があると考えられる。現在のところ、我々の試みているような手法は一般には行われていない。これは全ゲノムスキャンニングにより上流配列を予測する手法が未熟なためと考えられる。我々は現在入手しうる最新のゲノムドラフトシーケンスを用いてこの上流配列の決定を試み、そのプロモーター部位における転写因子特異的な配列の評価を試みている。

#### 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。

これまで我々が行ってきた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、従来の古典的な統計解析手法では意味づけを行うことは簡単ではないことが明らかとなった。新たなデータ解析手法を推進することが重要であるとともに、当面は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。実験手順をプロセスごとに管理・評価することによって、データの信頼性を確保するとともに、レトロスペクティブにデータの信頼性を検証することを可能とした上で、今後も化学物質曝露後の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、広く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、これらの細胞に化学物質を曝露して遺伝子発現解析を行った。現在化学物質曝露に伴う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, Aito 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(化学物質リスク研究事業)

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 原疾患と病期

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。

#### 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

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(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

肝切除症例の臨床的検討および肝不全モデル犬作成の試み

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

2003年自治医科大学消化器一般外科では68例の肝切除術を施行した(男性42例、女性26例、平均年齢は55.5歳、肝移植ドナー15例を除くと61.0歳)疾患別の内訳は転移性肝癌24例、肝細胞癌16例、肝移植ドナー15例、その他13例であった術後合併症としては創感染・創哆開4例、虚血性心疾患2例、硬膜外血腫1例、胆汁瘻1例、肝不全1例がみられ(morbidity 13.2%)、肝不全の1例を失った(mortality 1.5%)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肝不全モデル犬の作成を試みた門脈-大動脈シャント作成1時間後肝動脈を結紮することにより作成した作成1時間後からGOT、GPTの上昇がみられ、10時間後には正常値の30倍に達したアルブミン生産能は28%減少、10時間後から血圧・脈拍の低下が認められ、平均23時間後に死亡した肝不全モデル犬として、今後の検討に十分供することができると考えられた

A 研究目的

2003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

門脈-大動脈シャントおよび肝動脈結紮により肝不全モデル犬を作成する

B 研究方法

2003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

門脈-大動脈シャントおよび肝動脈結紮による肝不全モデル犬作成

肝不全モデル犬は Abouna<sup>1)</sup>および Takeyama<sup>2)</sup>の方法を一部改変して行った平均体重10kgのビーグル犬を用い、全身麻酔下に開腹、門脈を肝門部で切離、近位部を腎動脈分枝直上の下大静脈と端側吻合を行ったイヌ肝には固有肝動

脈以外の側副血行路が発達しているため(図1)、吻合直後に総肝動脈、右胃動脈、胃十二指腸動脈の結紮を行ったその後、経時的にGOT、GPT、総ビリルビン、ammonia、albuminの測定を行ったまた肝細胞代謝能を検討する目的で、肝動脈結紮15時間後に、diazepam 3mg/kgを経静脈的に投与、薬物動態を正常犬と比較検討した

C 研究結果

2003年当科における肝切除術

2003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1837名の入院症例があり、1217件の手術を行ったそのうち肝切除術を施行した症例は68例(男性42例、女性26例、平均年齢は55.5歳、肝移植ドナー15例を除くと61.0歳)であった疾患別の内訳は転移性肝癌24例、肝細胞癌16例、肝移植ドナー15例、その他13例であった(表1)転移性肝癌の原発は、

結腸・直腸 19 例、胃 3 例、卵管 1 例、乳腺 1 例であった。術前併存症としては肝硬変が 14 例にみられ、その他高血圧 7 例、糖尿病 5 例、肺疾患 3 例、心疾患 2 例、慢性腎不全 1 例がみられた(表 2)。術後入院死亡は肝不全を発症した 1 例 (mortality 1.5%、肝細胞癌に対して肝区域切除施行した 48 歳男性)、合併症としては創感染・創哆開 4 例、虚血性心疾患 2 例、胆汁瘻 1 例などがみられた (morbidity 13.2%、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。

門脈-大動脈シャントおよび肝動脈結紮による肝不全モデル犬作成

動脈結紮 1 時間後より GOT、GPT の上昇が認められ、10 時間後には正常値の 30 倍のレベルに達した(図 2)。Ammonia 値の有意な上昇は認めなかった。Albumin 値は動脈結紮直後から低値を示し、総ビリルビン値はなだらかな上昇が 2-14 時間後に認められ、その後漸減した(図 3)。また肝不全モデルでは diazepam 代謝および代謝産物出現の遅延がみられ、その半減期は 6 倍に延長していた(図 4a,b)。動脈結紮 10 時間後から血圧・脈拍の低下が認められ、平均 23.1 時間後に死亡した。

#### D 考察 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 例と増加の傾向であり、2003 年は前年並みの 68 例であった。2002 年には肝移植ドナーが 26 例であったが、2003 年には 15 例と減少し、肝細胞癌など悪性疾患が 39 例から 45 例と増加した。2003 年の疾患別内訳では肝細胞癌、転移性肝癌でほぼ 58% を占めた。

Mortality は前年とほぼ変化なかったが、morbidity に関しては 2002 年 18.3% から 2003 年 13.2% と減少がみられており、手術成績は向上した。肝臓の薬剤代謝を考える上では、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か薬剤曝露、遺伝子発現の検討には有効であると考えられた。

2 門脈-大動脈シャントおよび肝動脈結紮による肝不全モデル犬作成

今回検討した肝不全モデル犬は、Abouna<sup>1)</sup> および Takeyama<sup>2)</sup> の方法を一部改変して作成した。Abouna は門脈-大動脈シャント作成 24 時間後に 2 時間肝動脈をクランプすることにより肝不全を作成、平均生存時間は 17.3 時間であった。また Takeyama<sup>2)</sup> は門脈-大動脈シャント作成後 20 分以内に肝動脈および胆管を結紮し、平均 15.5 時間生存する肝不全モデルを作成した。今回の検討では、イヌ肝臓に流入する多数の側副血行路を考慮し、肝動脈だけではなく胃十二指腸動脈および右胃動脈を結紮した。平均生存時間は Abouna および Takeyama の結果よりもやや長く、23.1 時間であった。作成直後より albumin 値の低下および GOT、GPT 値の上昇がみられ、10 時間後からは循環不全が著明となり、作成後の病理学的検討では明かな肝壊死が認められ、急性肝不全モデルとして十分に検討しうるものであった。また薬物代謝能を diazepam の代謝で検討したが、血中半減期が正常例の 6 倍にまで延長していた。その代謝産物の出現割合には有意差なく、肝不全による代謝能低下に合致する結果であった。今後このモデルを用いて、種々の薬物代謝動態の検討を行いたい。

#### E 結論

2002 年当科における肝切除症例は 68 例あり、mortality 1.5%、morbidity 13.2% 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り、2002 年よりも手術成績の向上がみられた。

門脈-大動脈シャントおよび肝動脈結紮による

確認した 今後このモデルを用いて種々な薬物代謝の検討を行いたい

参考文献

Abouna GM, Ganguly PK, Hamdy HM, Jabur SS, Tweed WA, Costa G Extracorporeal liver perfusion system for successful hepatic support pending liver regeneration or liver transplantation a pre-clinical controlled trail Transplantation, 1999, 67 1576-1583

Takeyama O, Ikai I, Yagi Y, Satoh S, Kanazawa A, Uesugi T, Nishitai R, Okabe H, Katsura N, Terajima H, Yamaoka Y Effect of prostaglandin E1 on the efficacy of xenogeneic extracorporeal pig liver perfusion in a canine model of acute hepatic failure Liver Transplantation, 2001, 7 526-532

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

図1 イヌ肝臓への動脈血流

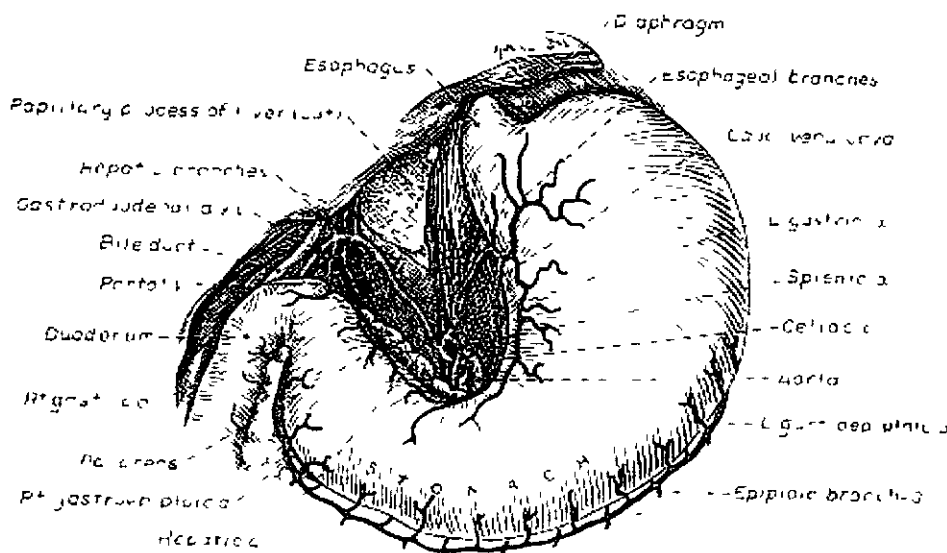


図2 イヌ肝不全モデルにおける GOT、GPT、ammonia の経時的変化

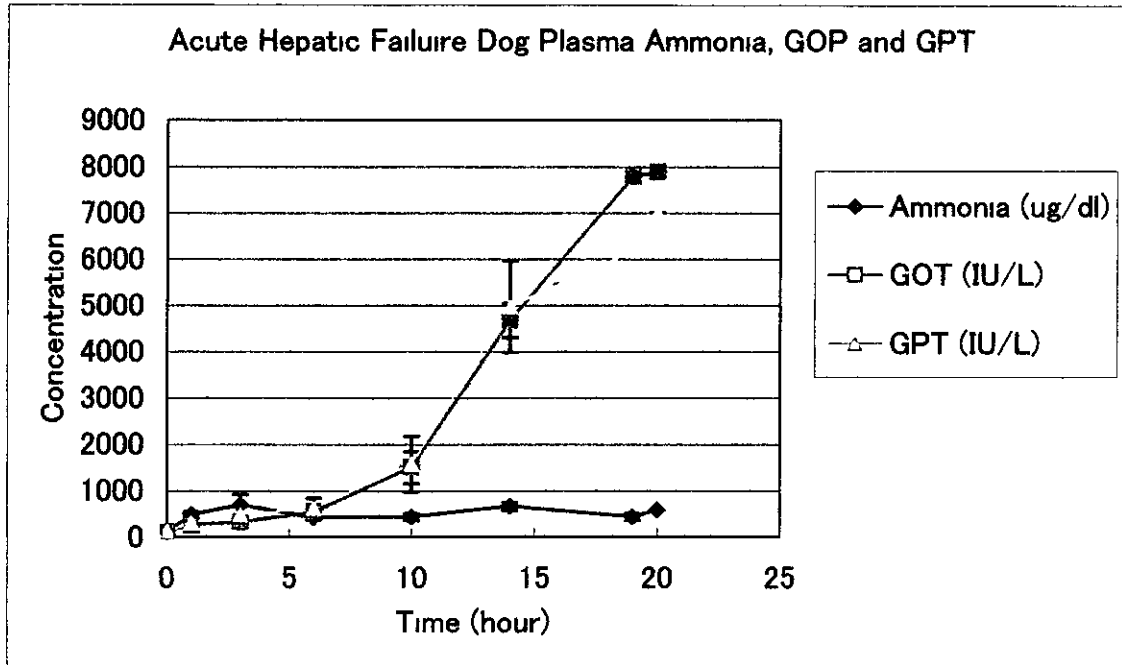


図3 イヌ肝不全モデルにおける albumin、T-bilirubin の経時的変化

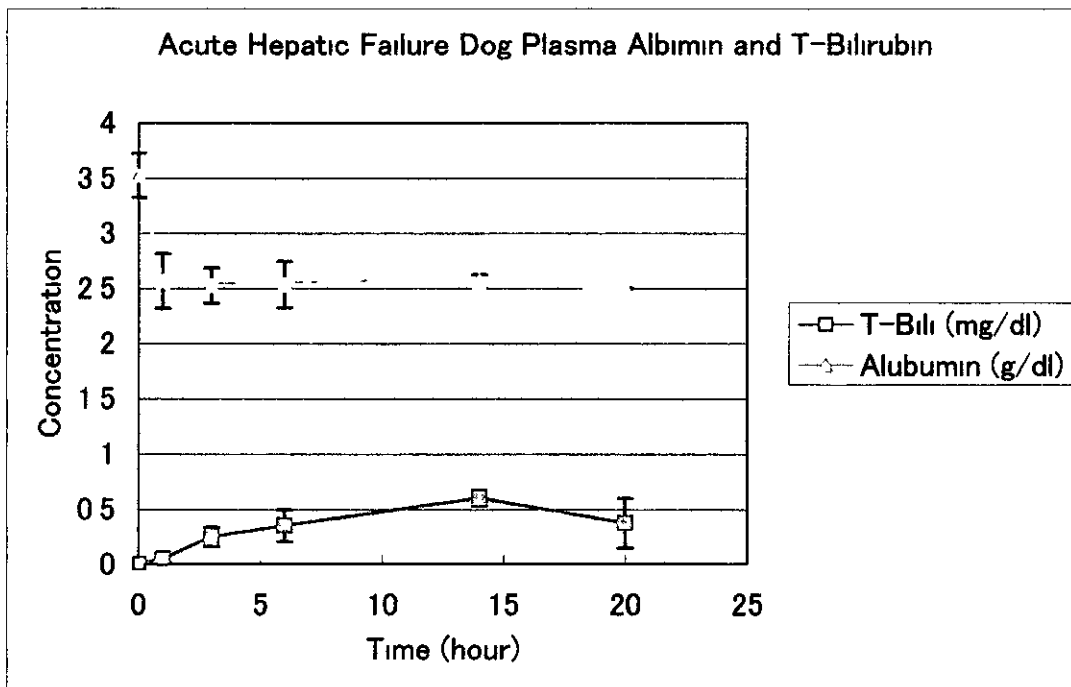
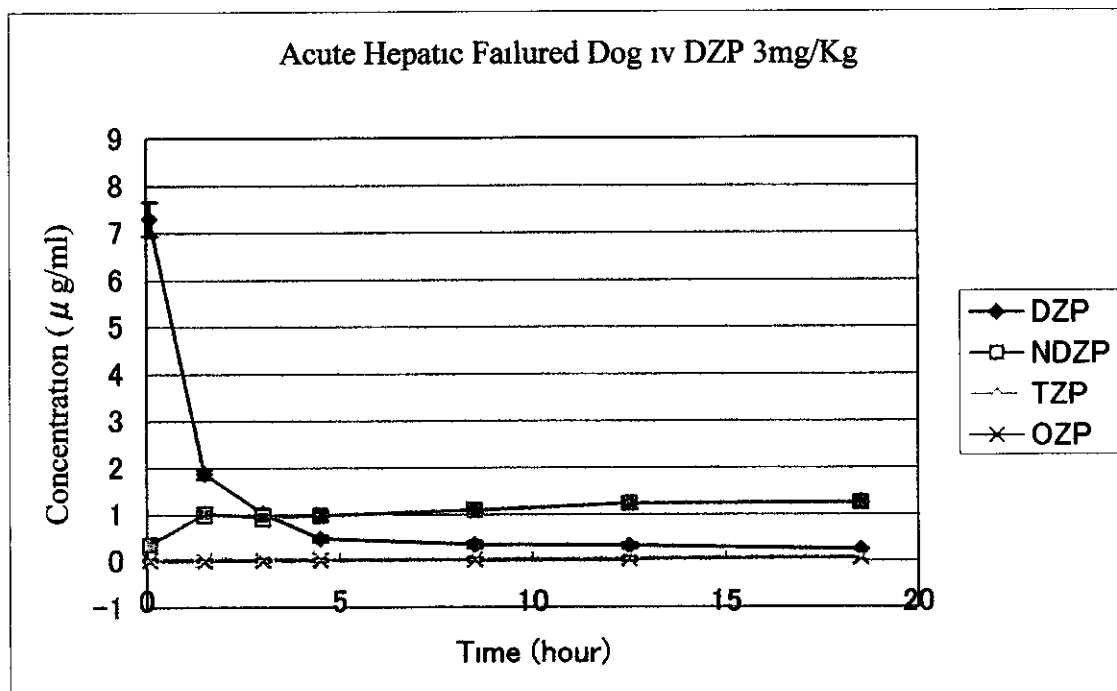


図 4 肝不全モデル(a)および正常犬(b)における diazepam とその代謝産物(DZP diazepam、TZP terazepam、NDZP nordiazepam、OZP oxazepam)

(a)



(b)

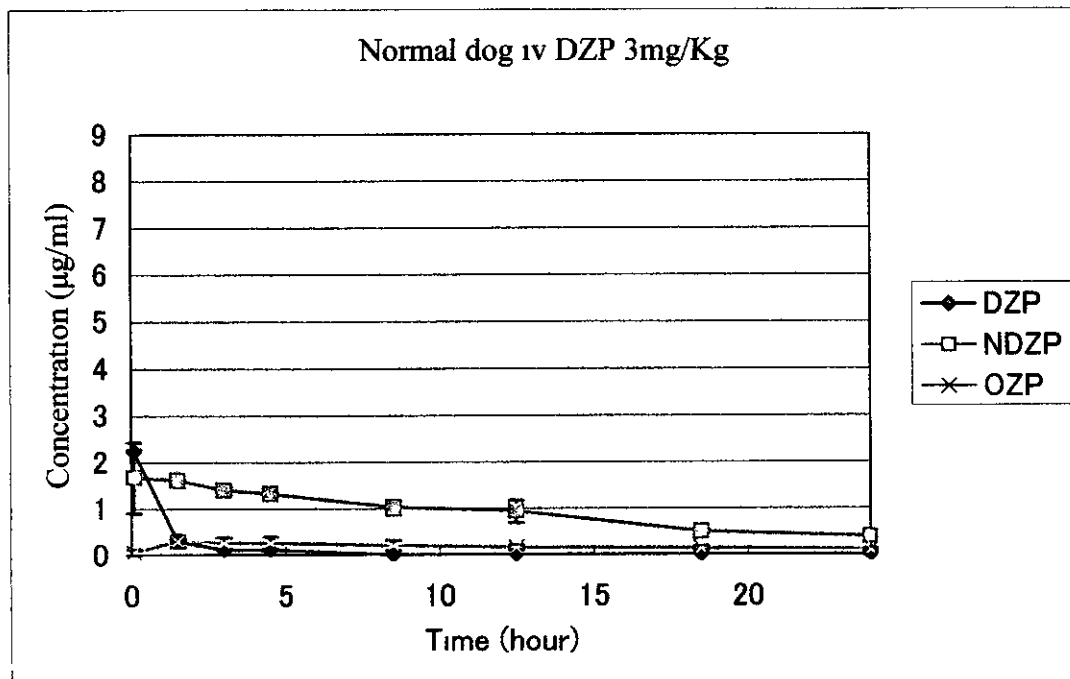


表 1 1 肝切除術内訳

	肝葉切除術	肝区域切除術	肝部分切除術	合計
転移性肝癌	8	12	4	24
肝細胞癌	5	6	5	16
肝移植ドナー	8	7		15
その他の肝腫瘍		2	3	5
胆管細胞癌	2	1		3
肝内結石症	2	1		3
胆嚢癌			2	2
合計	25	29	14	68

表 2 2 術前併存疾患

肝硬変	14
高血圧	7
糖尿病	5
肺疾患	3
心疾患	2
慢性腎不全	1
合計	32

表 3 3 術後合併症

	症例数	入院死亡
創感染・創哆開	4	
虚血性心疾患	2	
胆汁瘻	1	
硬膜外血腫	1	
肝不全	1	1
合計	9	1

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

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* の化学物質曝露・毒性研究において、人種間の薬物への反応性の相違や、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。

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か、確認のために膜表面 Glut-2 タンパク質の発現を FACS で、 $\gamma$  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  $\beta$  2 ミクログロブリンと 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その形態を観察することにより行った。また、凍結融解の影響については凍結前の培養細胞より抽出した 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。

(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 症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、 $\gamma$  GTP、NAGが発現しており、検討した範囲では尿細管細胞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て凍結前後で、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、特定の組織に特異的な純化の手順を含まないため、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化学物質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実験では、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と期待される。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 Acaemy 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 , Komuma, 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 Actin 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

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。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、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、これを繰り返すことで任意の量の 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  $\mu$ 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チ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。

2)急性骨髄性白血病(AML)患者には治療抵抗性の症例と、比較的予後良好の薬剤感受性群が存在する。DNA マイクロアレーは数千〜数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。我々は AML などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞(あるいはその近傍)の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しこれを用いて DNA アレー解析を行った。得られた遺伝子発現プロファイルを基に薬剤感受性群と抵抗性群との間

に発現量が異なる遺伝子セットを Student's t-test によって抽出し、それらの発現量を基に *k*-nearest neighbor 法による予測アルゴリズムを検証した。

(倫理面の配慮)

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)既に我々の mRNA 増幅法によって遺伝子発現データのプロファイルに変化があるか否かを検討したところ、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マイクロアレーに結合させ、遺伝子発現量の比較を行った。その結果 Pearson 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) 骨髄異形成症候群 (MDS) 計 22 例および特発 AML28 例の白血病芽球分画における網羅的遺伝子発現解析を Affymetrix 社 GeneChip HGU95A (>12,000 ヒト遺伝子)を用いて行い、各疾患内に予後にリンクした新たなサブグループ群が定義可能なこと、またこれらの鑑別診断に用いる新しい分子マーカーを10種類以上同定した (Tsutsumi et al, in submission, Oshima et al, *Leukemia* 17 1990, 2003)。

3)純化白血病幹細胞分画をプロテオミクス解析することにより白血病の染色体不安定性に関わる遺伝子産物の同定にも成功した (Ota et al, *Oncogene* 22 5720, 2003)。

4) MDS の病期進展機構を明かにする目的で、病初期及び進行期の患者より得た CD133 陽性分画を用いて DNA マイクロアレー解析し、病期依存性に発現する遺伝子群を同定した。特に病期進行と共に発現が低下する遺伝子として

PIASy が同定された。PIASy は small ubiquitin-like modifier (SUMO)を基質に結合させる酵素をコードしており、細胞内蛋白分解系に関与する。本遺伝子を血液細胞株へ導入すると、発現上昇に伴って細胞死が誘導されることが示された。すなわち PIASy は癌抑制遺伝子として機能し、不応性貧血の悪性を防ぐ生理的「ブレーキ」として働くことが明らかになった (Ueda et al, *Br J Haematol* 123 288, 2003)。

5) PIASy の遺伝子破壊動物を作成し、その表現型を検討中である。PIASy 遺伝子をホモに欠損する個体は血中白血球数が上昇し、正常個体に比べて造血機能が活性化することがわかった。現在本動物に、癌遺伝子発現個体を交配させることで白血病誘導モデル実験を行っている。

## E 結論

以上より我々は安定した RNA 増幅法を確立し、さらに既に得たフレッシュ疾患細胞における膨大な遺伝子発現データセットの抽出に成功した。これらデータより疾患の病期移行、あるいは薬剤感受性にリンクして発現が変化する遺伝子を同定することに成功し、またさらにこれら遺伝子の発現をもとに患者長期予後の予測にも成功している。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 主な論文発表

1) Choi YL, Makishima H, Ohashi J, Yamashita Y, Ohki R, Koizuma K, Ota J, Isobe Y, Ishida F, Oshimi K and Mano H DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3-CD56+ fractions *Leukemia*, in press

2) He H, Hirokawa Y, Gazit A, Yamashita Y, Mano H, Kawakami Y, Kawakami, Hsieh CY, Kung HJ, Lessene G, Baell J, Levitzki A and Maruta H The

- Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation *Cancer Biol Ther*, in press
- 3) Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, Ohki R, Choi YL, Wada T, Konishi F, Nagai H and Mano H Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas *Int J Cancer* 108 237-242, 2004
- 4) Yoshida K, Ueno S, Iwao T, Yamasaki S, Tsuchida A, Ohmine K, Ohki R, Choi YL, Koinuma K, Wada T, Ota I, Yamashita Y, Chayama K, Sato K and Mano H Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma *Cancer Sci* 94 263-270, 2003
- 5) Ueno S, Ohki R, Hashimoto T, Takizawa T, Takeuchi K, Yamashita Y, Ota J, Choi YL, Wada T, Koinuma K, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K and Mano H DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure *Biochem Biophys Res Commun* 307 771-777, 2003
- 6) Ueda M, Ota I, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K and Mano H DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome *Br J Haematol* 123 288-296, 2003
- 7) Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF *Proc Natl Acad Sci USA* 100 733-738, 2003
- 8) Ota I, Yamashita Y, Okawa K, Kisanuki H, Fujiwara S, Ishikawa M, Choi YL, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Compton D, Kadoya T and Mano H Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders *Oncogene* 22 5720-5728, 2003
- 9) Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Ozawa K, Fujimura A and Mano H DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia *Leukemia* 17 1990-1997, 2003
- 10) Ohmine K, Nagai T, Tarumoto T, Miyoshi T, Muroi K, Mano H, Komatsu N, Takaku F and Ozawa K Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR *Stem Cells* 21 315-321, 2003
- 11) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Ikeda U and Shimada K Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes *Cardiovasc Drugs Ther* 17 231-236, 2003
- 12) Ogata Y, Takahashi M, Ueno S, Takeuchi K, Okada T, Mano H, Ookawara S, Ozawa K, Berk BC, Ikeda U, Shimada K and Kobayashi E Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro *Hypertension* 41 1156-1163, 2003
- 13) Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell I, Mano H, Brennan FM, Webster D and Foxwell BM Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production *J Exp Med* 197 1603-1611, 2003
- H 知的所有権の出願・取得状況
- 1)国際公開番号 PCT/WO97/34007・発明者 間野博行・名称「PROMOTER」・出願人 間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日 1997年9月18日
- 2)公開番号 特開 2001-269174・発明者 間野博行・名称「骨髓異形成症候群(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
- 3)国際公開番号 PCT/WO 01/64946・発明者 間野博行・名称「METHOD OF DETECTING