

日本環境変異原学会、2004年11月、
長崎
中川ゆづき、田中憲穂：In vitro 小核試験
およびプラスミドDNA切断性試験
を用いたコウジ酸の光遺伝作用の検
討、日本環境変異原学会、2004年
11月、長崎
田中憲穂、板垣宏、今井弘一、大野泰雄、
大森崇、岡本裕子、川端留美、小島
肇夫、土肥孝彰、藤田百合子、畑尾
正人、笛木修、若栗忍、吉村功：酵
母光生育阻害試験および赤血球光溶
血試験を用いた光阻害試験：バッテ
リーのバリデーション及び評価委員
会での検討中間報告、
日本動物実験代替法学会、2004年
11月、長崎
吉村功、板垣宏、大野泰雄、大森崇、岡本
裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲
穂、谷川浩子、土肥孝彰、長谷川靖
司、藤田百合子、穂谷昌利、森真輝、
若栗忍、：酵母・赤血球試験の光毒性
試験代替法としてのバリデーション

研究、日本動物実験代替法学会、
2004年11月、長崎
本郷有克、若栗忍、石川陽一、梅田誠、田
中憲穂：基礎代謝としてのグルコー
ス取り込みを指標とする細胞毒性試
験、日本動物実験代替法学会、2004
年11月、長崎
渡辺美香、小林美和子、若栗忍、佐々木澄
志、山陰康次、倉田信弘、田中憲穂：
試験法および細胞種の違いによる細
胞毒性試験結果の検討、日本動物実
験代替法学会、2004年11月、長崎
北垣雅人、若栗忍、板垣宏、田中憲穂、豊
田英一：急性毒性試験代替法の検討
（2）II.2施設間における急性毒性
試験を予測するための2種の細胞毒
性試験の評価、日本動物実験代替法
学会、2004年11月、長崎
若栗忍、北垣雅人、板垣宏、田中憲穂、豊
田英一：急性毒性試験代替法の検討
（2）I.2施設間における2種の細
胞毒性試験の安定性、日本動物実験
代替法学会、2004年11月、長崎

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）

生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の収集・保存・供給システムの整備に関する研究

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教室 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23,000名（腎：8,000、膀胱15,000）の発症があり約8,000名（腎臓癌：3,000、膀胱：5,000）の死亡者があるが、有効な治療法は未だ確立されていない。後腹膜発生の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新規の治療法の展開が期待される。そのため遺伝子発現解析の研究材料となる尿路系と後腹膜悪性腫瘍の細胞株の樹立されたものは必要である。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1株、膀胱癌及び腎盂尿管癌の樹立を行った。

A. 研究目的

ヒト尿路上皮腫瘍（腎臓癌、膀胱癌等）及び後腹膜の腫瘍は国内の発症数が合計23,000名、死亡者数が8,000名とされるが、手術以外に有効な治療法は確立されていない。またこれらの腫瘍で確立され研究に利用できる株細胞は少ない。今後のゲノムプロジェクトの進展に伴い、発展すると予測されるゲノム解析研究及び、分子標的治療、免疫ペプチド療法などの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。これらの研究で材料の細胞株を細胞バンクに今後提供する。今後はこれらの細胞株の利用により、ゲノム研究の進展が期待される。

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、1500rpmで5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2004年12月の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学内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、腎細胞癌、膀胱癌、腎盂癌、各1株を樹立した。

KMRC-29

60歳女性で右腎臓から発生した腫瘍検体から確立した細胞株である。

標本の病理診断はclear cell carcinoma (淡明細胞型腎癌) Grade1、INF α 、pT1b、リンパ節転移(-)、他臓器転移(-)であった。(Fig.1a) 切除組織では広範な出血を認め、増殖性が早いと予測された。細胞増殖は遅く、細胞の形状は類円形—多角形である。(Fig.1b) 染色体は2倍体付近、数的異常はなし、VHL遺伝子異常はなし。

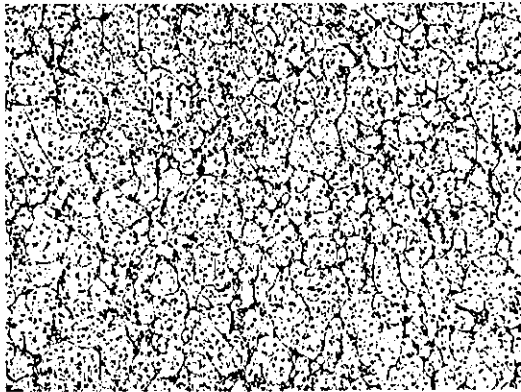


Fig. 1 (a)

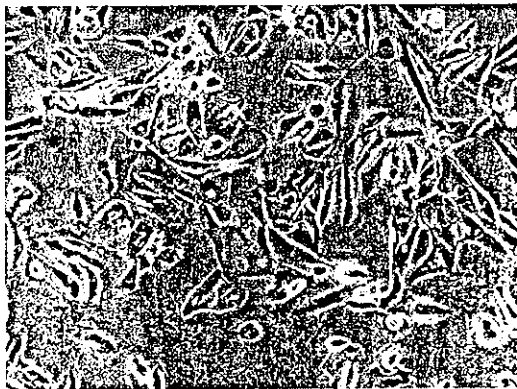


Fig. 1 (b)

Fig.1 (a) KMRC-29を抽出した腎細胞癌の病理組織像 (100倍) (b)KMRC-29の培養細胞像 (250倍)

KMBC-2

78歳男性の浸潤性膀胱癌の全摘出組織から樹立した細胞株である。標本の病理診断はtransitional cell carcinoma (squamous cell carcinomaを含む) 悪性度はGrade3、INF β 、pT3a、stage III、である。squamous cell carcinomaはtransitional cell carcinomaがmetaplasiaをおこしたと考えられる。

(Fig.2a) 他臓器転移(-)。細胞は円形の細胞が島状に増殖し、細胞内に空胞を持っており、分泌物の産生が考えられる

(Fig.2b)。この症例では膀胱癌に60%と比較的効果があるM-VAC化学療法

(Methotorexate, Vinblastine, Adriamycin, cisplatinを含む)の2コースに全く反応しなかった症例であり、KMBC-2はこれらの抗がん剤耐性の特徴を持つと予測される。細胞の倍加時間は40時間、染色体は3倍体の特徴を持つ。

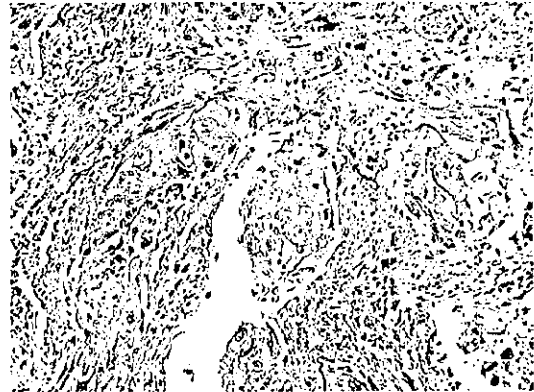


Fig. 2 (a)

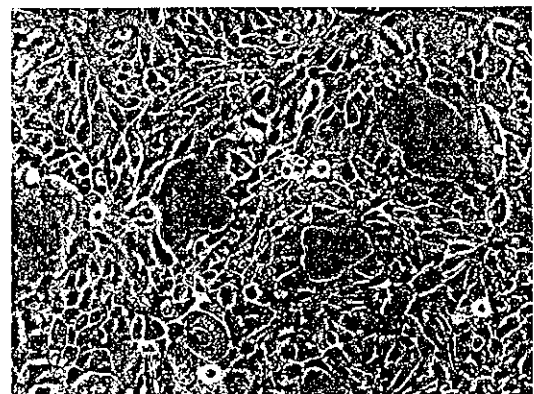


Fig. 2 (b)

Fig.2 (a) KMBC-2を抽出した腎細胞癌の病理組織像 (100倍) (b) KMBC-2の培養細胞像 (250倍)

KMPC-3

61歳女性、右腎盂癌から樹立した細胞株である。病理組織型はrenal pelvic cancer, papillary, invasive type, combined small cell neuroendocrine and sarcomatoid squamous cell. Grade3, synaptophysin 強陽性、chromograninA 陽性を示す。INFβ、pT3、静脈浸潤 (+)、リンパ管浸潤 (-) 他臓器転移 (-) であった。腎盂癌がsmall cell neuroendocrine carcinomaに変化し、肉腫様にも変化した症例である。細胞倍加時間は約60時間、染色体は3倍体の特徴を持つ。

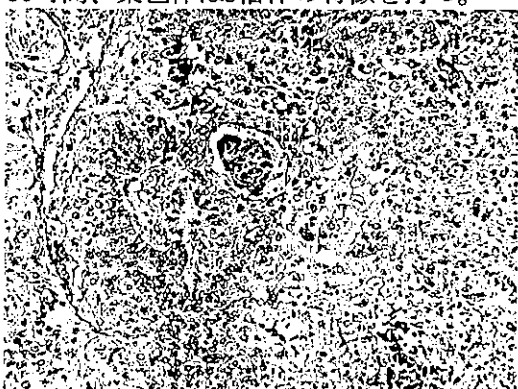


Fig. 3 (a)

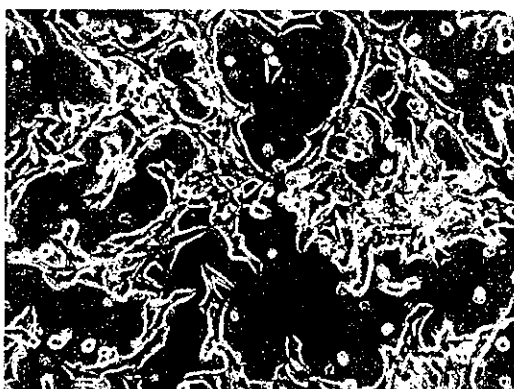


Fig. 3 (b)

Fig.3 (a) KMPC-3を抽出した腎細胞癌の病理組織像 (100倍) (b) KMPC-3の培養細胞像 (250倍)

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、数少ない化学療法のレジメンと手術療法以外に有効な治療法は確立されていない。また、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。我々は細胞バンクという点で細胞株を樹立し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ている。

本研究における班の大きな目的は、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。

KMRC-29は腎臓癌では一般に見られる腎細胞癌患者さんから確立された細胞株である。病理型はclear cell carcinoma (淡明型腎細胞癌) で樹立された細胞株はclear cell型の腎癌の細胞株と同様の特徴を持っている。また、von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子変異はない。今後腎細胞癌の発生進展の様式を見るには適した細胞株である。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。

KMBC-2はヒト移行上皮癌の患者さんから樹立された細胞で病的には扁平上皮化生を引き起こしているが、最も悪性度の高い移行上皮癌と考えて差し支えないと思われる。移行上皮癌では一般的な化学療法であるM-VAC療法に全く反応しなかったため抗がん剤耐性の研究に適していると考えられる。

KMPC-3は腎盂癌から樹立した細胞株であり一般の移行上皮癌に神経内分泌腫瘍と肉腫型癌が合併したものである。腎盂癌の中でも最も組織型が悪いものであり報告が過去5例

と少ない。我々もInternational Journal of Urology誌に近日中に掲載予定である。

今後も、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先端的な治療法に寄与するための基盤を支持していく。

E. 結論

本研究では腎細胞癌、膀胱癌、腎盂尿管癌の各1例から細胞株を樹立した。腎細胞癌はclear cell carcinoma、膀胱癌は抗がん剤耐性のtransitional cell、腎盂癌はneuroendocrine small cell carcinoma (+ transitional cell carcinoma) であり興味深い。特に後の2細胞株は他にも確立されたものが少なく、今後の尿路上皮系の癌の研究に役立つと考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimazaki N, Shuin T, et al.
Combined small cell carcinoma and sarcomatoid squamous cell carcinoma in the renal pelvis: a case report, International Journal of Urology, in press.

2. 学会発表

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

特になし

分担研究報告書

生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の収集・保存・供給システムの整備に関する研究

分担研究：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

研究要旨：本年度 KYSE-series のうち 3 株（KYSE200, 220, 270）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欠くべからざる資料となりうる物である。しかしながら、KYSE200 が以前に寄託した KYSE110 と遺伝子解析上同一と判定されたために、その旨を表記することとした。

分担研究者：嶋田 裕
京都大学医学研究科腫瘍外科学講師

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。また正常食道上皮細胞株の樹立も行った。

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）。寄託細胞の cross contamination が細胞バンクにて検討された。

C. 研究結果

1. 細胞の性状確認

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。細胞バンクの STR 分析にて既に寄託している KYSE110 と今回寄託した KYSE200 の cross contamination が疑われた。樹立に出来るだけ近いサンプルにて再検査を行ったが、同様の結果であった。樹立時の DNA finger print analysis では KYSE110 と KYSE200 は別の細胞であることが確認されており、cross contamination はその後に生じたものと推察された。我々の施設での解析では TRAIL

receptor 発現が両細胞で異なり、さらに薬剤への反応性も異なることから、KYSE200 を KYSE110 の亜株として更なる解析を試みている。

Aurora A および gastrin-releasing peptide (GRP) が食道癌において高頻度に遺伝子発現亢進が認められ、Aurora A は食道癌患者の予後に、GRP は食道発癌に関与することを明らかとした。(Tanaka E. Clin Cancer Res 2005 in press、Fang MZ carcinogenesis 2004) 。また Low Density Lipoprotein Receptor-Related 1B (LRP1B) が食道癌でメチル化されており、食道発癌と増殖に関与していることが判明した (Sonoda I et al. Cancer Res 2004) 。さらに Fascin および Dysadherin, Osteopontin が食道癌の予後に関与することも明らかとなった。(Hashimoto Y et al. Oncology 2004, Shimada Y et al. Oncology 2004, Shimada Y et al. Oncology 2005 in press)

食道癌細胞株のみならず食道正常上皮細胞数株を樹立し、これを利用して正常食道上皮に対する消化液逆流の影響を検討した (Kawabe A et al Life Science 2004) 。これらの細胞もまた有用な研究材料となると考えられた。

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、新鮮切除標本ならびに正常食道上皮と組み合わせることで解析することにより、食道癌における役割の解析が可能であった。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。しかしながら細胞間の cross contamination は重大な問題であり、対策が必要である。そこで細胞間の cross contamination の防止に細胞株ごとの培養液の

個別化、一度に扱う細胞は1個に限定すること、実験ごとのクリーンベンチの清拭などを徹底することとした。

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。しかしながら、細胞の cross contamination が生じていることが疑われ、その取り扱いには細心の注意が必要であることが再認識された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato F, Shimada Y, Selaru F, Shibata D, Maeda M, Watanabe G, Mori Y, Stass SA, Imamura M, Meltzer SJ

Prediction of survival in esophageal cancer using artificial neural networks

Cancer 2005 (in press)

2) Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Okumura T, Kan T, Watanabe G, Imamura M, Inazawa J, Shimada Y
The clinical significance of

Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma

Clin Cancer Res 2005 (in press)

3) Shimada Y, Watanabe G, Kawamura J, Soma T, Okabe M, Ito T, Inoue H, Kondo M, Mori Y, Tanaka E, Imamura M.

Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: Comparison with common tumor markers.

Oncology 2005 (in press)

- 4) Kan T, Shimada Y, Sato F, Ito T, Kondo K, Watanabe G, Maeda M, Yamasaki S, Meltzer SJ*, Imamura M
Prediction of Lymph Node Metastasis Using Artificial Neural Networks Based on Gene Expression Profiles in Esophageal Squamous Cell Carcinoma
Ann Surg Oncol 2004, 11:1070-1080
- 5) Itami A, Makino T, Shimada Y, Imamura M.
A case of primary malignant melanoma of the esophagus with long-term survival
Esophagus 1: 135-137, 2004
- 6) Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J
Frequent Silencing of Low Density Lipoprotein Receptor-Related 1B (LRP1B) expression by Genetic and Epigenetic Mechanisms in Esophageal Squamous cell carcinoma
Cancer Res 64 : 3741-3747, 2004
- 7) Hashimoto Y, Shimada Y, Kawamura J, Yamasaki S, Imamura M
The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma.
Oncology 2004, 67: 262-270
- 8) Shimada Y, Yamasaki S, Hashimoto Y, Ito T, Kawamura J, Soma T, Ino Y, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Imamura M.
Clinical significance of dysadherin expression in gastric cancer patients.
Clin Cancer Res 10: 2818-2823, 2004
- 9) Shimada Y, Hashimoto Y, Kan T, Kawamura J, Okumura T, Soma T, Kondo K, Teratani N, Watanabe G, Ino Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Imamura M
Prognostic significance of dysadherin expression in esophageal squamous cell carcinoma.
Oncology 2004 67: 73-80
- 10) Fang MZ, Song Y, Liu C, Yang GY, Nie Y, Liao J, Zhao X, Shimada Y, Wang LD, Tang CS.
Overexpression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas.
Carcinogenesis 25 : 865-871, 2004
- 11) Kawabe A, Shimada Y, Soma T, Maeda M, Itami A, Kaganoi J, Kiyono T, Imamura M
Production of prostaglandinE2 via bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells
Life Science 75: 21-34, 2004
- 12) Kaganoi J, Shimada Y, Kano M, Nagatani S, Okumura T, Watanabe G, Maeda M, Imamura M.
The detection of circulating oesophageal squamous carcinoma cells in peripheral blood and its impact on prognosis.
Br J Surg 91: 1055-1060, 2004
- 13) Isobe N, Onodera H, Mori A, Shimada Y, Arii S, Kitaichi M, Imamura M
Caspase-3 expression in human gastric carcinoma and its clinical significance
Oncology 66: 201-209, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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 独立行政法人 九州がんセンター臨床研究部 室長

研究要旨：癌骨転移および癌悪液質の発症機構研究に有用な子宮頸癌由来細胞株ならびにメラノーマ由来細胞株を寄託した。

A. 研究目的

癌骨転移や癌悪液質は癌患者の QOL 低下を招来するためその対策は重要であるが、発症機構については不明な点が多い。こういった病態の発症機構解明にはヒト癌由来細胞株が重要なツールとなり、本研究は癌骨転移あるいは癌悪液質の発症機構解明に有用な細胞株の探索を目的としている。

B. 研究方法及び結果

1. 寄託した細胞及びその特徴

分担研究課題では膵臓癌あるいは肺癌となっているが、本年度は癌骨転移および癌悪液質の発症機構の研究に用いている子宮頸癌由来細胞株（YUMOTO）とメラノーマ由来細胞株（SEKI）を寄託した。

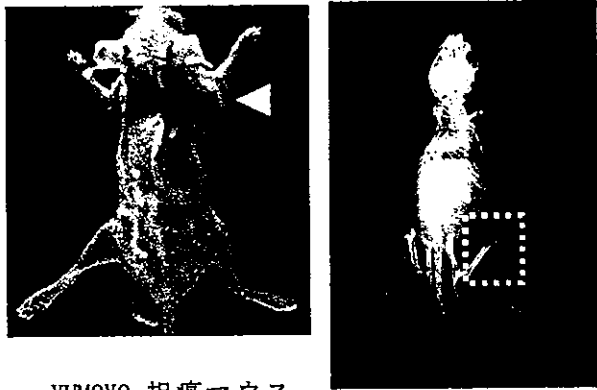
(1) YUMOTO 細胞

樹立経過：子宮頸癌患者（46 歳、女性）より手術時に摘出した組織切片をまずヌードマウスに移植、このヌードマウスで増殖した腫瘍より細胞株を樹立した（1）。細胞はフラスコに接着して増殖し、継代数は不明である。

意義：YUMOTO 細胞は IL-6 を産生し、YUMOTO 細胞を皮下接種した担癌マウス

によってこの悪液質が改善することから、本モデルにおける癌悪液質の起因物質は IL-6 であると Tamura ら(2)は報告している。我々も骨転移と IL-6 の関連をみる目的で本細胞をヌードマウス心腔内に接種し、図 1 に示すごとく骨転移がみられることを確認した。骨転移成立には活性化された破骨細胞による骨破壊が重要であるが、本モデルの骨転移の組織像をみると、骨に転移した YUMOTO 細胞の腫瘍胞巣周辺に TRAP 陽性の活性化破骨細胞が集積している像が確認された（図 2）。さらにこの骨転移は抗 IL-6 抗体の投与によって抑制された。これらの成績は本モデルにおける骨転移成立に IL-6 による破骨細胞活性化が重要であることを示唆している。

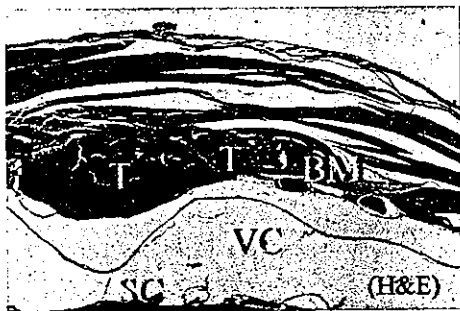
図 1



YUMOYO 担癌マウスの外観 (▲骨転移)

骨 X 線写真 (□骨転移)

図 2



脊椎に転移した YUMOYO 細胞が骨基質を破壊、脊髄腔(VC)に侵入し、そこで腫瘍(T)を形成している。



骨髄腔に形成された腫瘍胞巣周囲に赤色に染まった活性化破骨細胞の集積が見られる。

文献

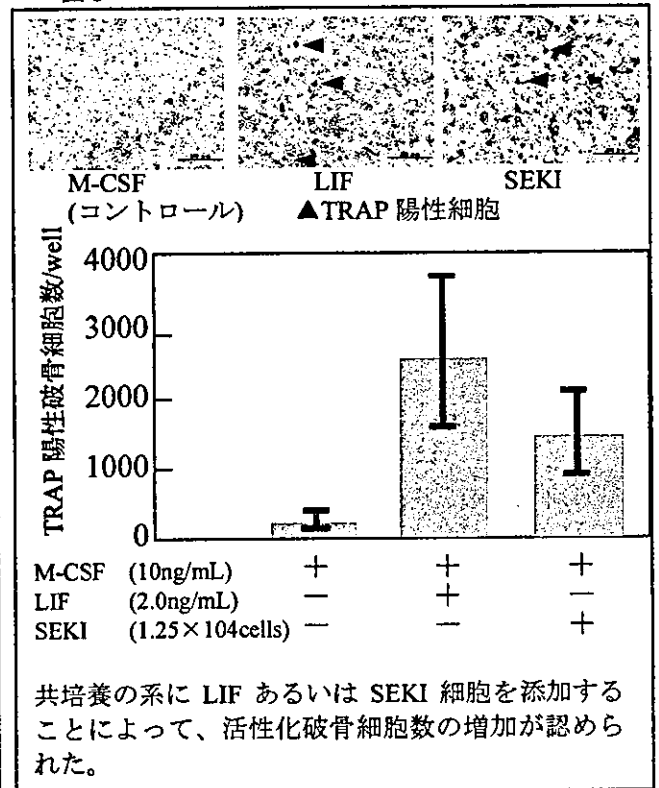
1. Tokita H, Tanaka N, Sekimoto K, et al. Experimental model for combination chemotherapy with metonidazole using human uterine cervical carcinoma transplanted into nude mice. *Cancer Res* 40: 4287-4294, 1980.
2. Tamura S, Fujimoto-Ouchi K, Mori K, et al. Involvement of human interleukin 6 in experimental cachexia induced by a human uterine cervical carcinoma xenograft. *Clin Cancer Res* 1: 1353-1358, 1995.

(2) SEKI 細胞

樹立経過：28 歳、女性の下腿皮膚メラノーマより樹立された (1)。SEKI 細胞は浮遊細胞として増殖する。

意義：SEKI 細胞を皮下接種した担癌マウスで癌悪液質がみられることは Kondo ら (1) により 1981 年に報告されているが、その後の研究でこの悪液質の起因物質は SEKI 細胞が産生する leukemia inhibitory factor(LIF)であることが判明した (2)。LIF は白血病細胞の増殖を抑制する因子として単離されたため、こういった名称がつけられたが、この他にも様々な生物活性を有しており、この中で我々は LIF の破骨細胞形成促進作用に着目し、メラノーマ骨転移との関連について検討した。LIF および LIF を産生する SEKI 細胞が破骨細胞の形成を促進することを *in vitro* の系で確認した (図 3)。

図 3



次に SEKI 細胞をヌードマウス心腔内に接種すると、その 3-4 週後に全身骨への多発性骨転移を認め (図 4)、組織学的検査にて骨髄腔に形成された SEKI 細胞の腫瘍胞巣周囲に多数の破骨細胞の集積が認められた (図 5)。また、siRNA 法によって LIF 発現を抑制した

細胞では、骨転移の頻度、腫瘍数および出現までの期間延長が認められた（表 1）。これらの成績は、SEKI 細胞の骨転移成立にとって SEKI 細胞で産生される LIF によって破骨細胞が活性化される過程が重要であることを示唆している。

図 4



多発性骨転移 (▲) および脊椎転移の脊髄圧排による膀胱直腸障害ならびに下肢麻痺を認める。



骨 X 線写真にて骨破壊を認める (▲)。

図 5



骨転移した SEKI 細胞腫瘍胞巣周囲に TRAP 陽性の活性化破骨細胞が集積している。

表 1

| 細胞 | 骨転移 | | |
|-------------------|-------|---------|---------|
| | 頻度(匹) | 個数(個) | 期間(週) |
| 親株 (n=11) | 11/11 | 8.9±2.2 | 3.8±1.0 |
| 対照株 (n=5) | 5/5 | 8.6±2.3 | 5.6±0.5 |
| LIF 抑制株 (n=13) | 5/13 | 0.7±1.0 | 7.7±0.8 |

Statistical significance: NS (not significant), * P<0.05, ** P<0.01. Comparisons are shown between parent and control (NS), parent and LIF-inhibited (NS), control and LIF-inhibited (**), and overall (**).

NS: not significant * P<0.05 ** P<0.01

文献

1. Kondo Y, Sato K, et al. Serum sialyltransferase and liver catalase activity in cachectic nude mice bearing a human malignant melanoma. Cancer Res., 41:2912-2916, 1981.
2. Mori M, Yamaguchi K, Honda S, et al. Cancer cachexia Syndrome developed in nude mice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. Cancer Res., 51:6656-6659, 1991.

2. 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) Iguchi, H., Mizumoto, K., Shono, M., Kono, A., Takiguchi, S. : Pancreatic cancer-derived cultured cells: Genetic alterations and application to an experimental model of pancreatic cancer metastasis. Culture of Human Tumor Cells (R. Pfragner, R. Ian Freshney, eds) John-Wiley & Sons, NY, pp 81-96, 2004.

(2) 井口東郎, 安田幹彦, 松尾 亨, 澄井俊彦, 船越顕博: 膵癌骨転移合併例の臨床的特徴およびその対策. 日本消化器病学会雑誌 101: 872-878, 2004.

(3). 澄井俊彦, 松尾亨, 井口東郎, 船越顕博: Stage IV膵癌に対する放射線化学療法と gemcitabine による化学療法の成績. 膵臓 19: 479-485, 2004.

(4) 畠中文香, 澄井俊彦, 安田幹彦, 井口東郎, 船越顕博: エラスターゼ 1 結合蛋白の存在を認め, RIA 法にて高エラスターゼ 1 血症を呈した 2 例. 膵臓 19: 432-436, 2004.

2. 学会発表

(1) 井口東郎. がん骨転移のメカニズムとその制御. 第 36 回 日本結合組織学会. シンポジウム「癌の浸潤・転移」(6月3,4日、福岡、2004)

(2) 井口東郎. 癌骨転移の病態およびその理論に基づいた治療戦略. 第 19 回 日本整形外科学会基礎学術集会. シンポジウム 3「病態と治療—基礎からみた進歩: 骨・軟部腫瘍」(10月21,22日、東京、2004) .

(3) 丸田樹明、滝口総一、小田義直、恒吉正澄、井口東郎. ヒトメラノーマ骨転移における骨破壊機構: Leukemia Inhibitory Factor(LIF)の関与. 第 19 回 日本分子生物学会. (12月8-11日、神戸、2004).

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、スキルス胃がんと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切望されている。この基礎実験並びに臨床的研究のためには、臨床癌由来の培養細胞が必須のツールとなる。スキルス胃がん由来培養細胞を6株樹立し、その特性解析を進めている。またヒト膵癌由来培養細胞の確立を試み、本年度は3株を樹立し、その生物学的特性を検討している。初代培養は7系を維持しており、安定した増殖を示す4系は樹立の可能性が高い。

A. 研究目的

スキルス胃がんと膵癌は、難治性消化器がんの代表である。特に、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因子を探索・開発することが、新たな治療法につながると考えられる。これらの研究を進める上で、ヒト膵癌由来培養細胞は必要不可欠である。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少なくない。そこで本研究では、新たにヒト膵癌由来培養細胞を樹立することを目的とした。

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製しているのので、この移植腫瘍を材料として培養細胞の株化を試みた。この移植株は、継代数が極めて少ない利点がある。SCID マウス（♀、5週令）は日本クレア（株）より購入し、6-8週齢で移植に用いた。

培養方法は、細胞移植後に腫瘍組織が直径5～10mmまで形成されたら無菌的に摘出し、1～2mm角ぐらいの組織片になるまで細切した。少量の10%牛胎児血清添加RPMI1640培養液に浮遊させ、シャーレに植え込んだ。組織片がシャーレ底面に確実に固定されたら、上記培養液を追加し、培養を開始した。5% CO₂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確立された。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

初代培養：マウス移植継代で、安定した増殖を示すヒト膵癌移植腫瘍株を選び、植え込み材料とした（腺癌由来6株、管状腺癌由来9株）。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。植え込み数日後より繊維芽細胞

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。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い、現在までに3細胞株の樹立に成功した。初代培養で維持しているものは、10ヶ月目2例、8ヶ月目2例、7ヶ月目2例、5ヶ月目1例、合計7系である。このうち4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。

細胞株の樹立と特性の解析：管状腺癌の1株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、植え込み13ヶ月頃より癌細胞の増殖が優位となり、線維芽細胞は自然消滅し樹立に成功した（Sui65と命名）。他の株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、ゆっくりと増殖を開始した。この増殖の不安定な少数の細胞を増やすため、コンデション培地の利用、或いは細胞数を調整することにより植え継ぎが可能となり、6-8ヶ月の初代培養でSui65（管状腺癌）、Sui70（腺癌）の2系を樹立した。現在、増殖特性や腫瘍マーカー、膵癌に関連する遺伝子（p53、k-ras、smad4など）の変化の解析を進めている。

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、薬学、工学など広範な分野で研究材料、あるいはツールとして用いられ、生命科学の発展に大きく貢献してきた。その研究資源化の重要性は論を待たない。しかし、未だ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。今までに多数のヒトがん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。中には病理組織型が高分化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の組織像を示す例もある。この細胞を用いた実験では、臨床癌の病態を反映することは出来ない。この観点からも、新たに培養細胞を樹立、その特性を明らかにし、病態に即した実験系の作成を進めることは意義のあることと思われる。

本研究で進めているスキルス胃癌と膵癌は、ヒト消化器癌の中でも極めて予後不良な悪性疾患であり、新たな治療戦略が強く期待されている。最近、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、遺伝子治療並びに細胞治療などの開発研究が盛んに進められている。この研究の為には、ヒト膵癌培養細胞は必須であり、その研究資源化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。今年度に樹立した胃がん細胞や膵癌細胞は、特性の解析が終了する来年度には、報告とともに細胞バンクに寄託したい。

最近、樹立者やその所属する研究施設の知的財産権が国の内外で重視されるようになってきた。細胞の供給依頼に関して、我々は以前より合意書を作成し、培養細胞の知的所有権を明確にしている。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などがある場合は、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にのみ使用し、新たな研究に使用する場合は樹立者の許可を得る。③本細胞株を用いた研究については、共同研究とし、樹立者の許可なく発表しない。④本細胞株を基にした特許出願、及び事業展開を堅く禁ずる。⑤供給された細胞を第三者へ再分与しない。研究の終了に際しては、樹立者にその旨連絡すると共に、供給された細胞を棄却する。」を確認後分与し、国際的にもトラブルも無く順調に推移してきた。上記合意事項③は、研究内容、或いは研究終了時の細胞の貢献度で判断している。細胞バンクへの寄託細胞の知的所有権は、その樹立者に帰属するものと考えられる。

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、新たな視点に立つ治療戦略の開発が急務である。この研究の遂行には、臨床癌由来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、ヒト膵癌由来細胞の研究資源化を試み、3培養細胞株の樹立に成功した。これらの細胞の特性解析を進めるとともに、初代培養を7系維持し、株化を目指している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanagihara, K., Tanaka, H., Takigahira, M., Ino, Y., Yamaguchi, Y., Toge, T., Sugano, K., and Hirohashi, S. Establishment of two cell lines from human gastric scirrhous carcinoma that possess the potential to metastasize spontaneously in nude mice. *Cancer Sci.* 95: 575-582, 2004
2. 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
3. Namiki, Y., Namiki, T., Date, M., Yanagihara, K., Yashiro, M., and Takahashi H. Enhanced photo-dynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome. *Pharmacological Research.* 50: 65-76, 2004
4. Luo, B., Murakami, M., Fukuda, M., Fujita, A., Yanagihara, K., and Sairenji, T. Characterization of Epstein-Barr virus infection in a human signet ring cell carcinoma cell line, HSC-39. *Microbes and Infection.* 6: 429-439, 2004
5. Ueno, M., Toyota, M., Akino, K., Suzuki, H., Kusano, M., Mita, H., Sasaki, Y., Nojima, M., Yanagihara, K., Hinoda, Y., Tokino, T., and Imai, K. Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumor Biol.* 25: 134-140, 2004
6. Murai, M., Toyota, M., Suzuki, H., Satoh, A., Sasaki, Y., Akino, K., Ueno, M., Takahashi, F., Kusano, M., Mita, H., Yanagihara, K., Endo, T., Hinoda, Y.,

Tokino, T., and Imai, K. Aberrant Methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, in press

7. Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, H., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Sasaki, H. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.*, in press

2. 学会発表

1. 柳原五吉、西尾和人. 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構の形態学的解析. 第13回日本がん転移学会学術集会 p57 (東京、2004)
2. 柳原五吉、西尾和人、落谷孝広、廣橋説雄. 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63回日本癌学会学術総会記事 p492 (福岡、2004)
3. 荒尾徳三、柳原五吉、小泉史明、福本久郎、西尾和人. ZD6474 の同所性移植胃癌腹膜播種モデルにおける抗腫瘍効果. 第63回日本癌学会学術総会記事 p495 (福岡、2004)
4. 似鳥修弘、猪野義典、中西幸浩、山田哲司、本田一文、柳原五吉、金井弥栄、北島政樹、廣橋説雄. 膵がんにおける組織因子発現の臨床病理学的意義および膵がん細胞株における生物学的意義の検討. 第63回日本癌学会学術総会記事
5. 柳原五吉、瀧ヶ平美里、小松輝夫. ヒトスキルス胃がんの腹膜播種性転移モデルの樹立とその有用性. 第51回日本実験動物学会総会講演要旨集 p219 (長崎、2004) p403 (福岡、2004)

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

2004年度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 杏林大学医学部医療学 教授

研究要旨

ヒトの臓器から細胞を分離し、樹立株化細胞を作成した場合、多くの細胞はその臓器が保有する機能を失うことが多い。本研究は、継代可能で、かつ臓器の機能を有する細胞株を樹立することを最初の到達目標とした。自己樹立した細胞株は多種の目的を持つ多くの研究者に分与されている。さらに機能を有する培養細胞の長期維持のため3次元培養法のバイオ人工肝の開発を行い、ラジアルフロー型バイオリクター(RFB)を開発した。その開発研究とがん細胞由来でない不死化ヒト肝細胞株の機能について薬物代謝等を検討した。

A. 研究目的

1. 本研究は肝・胆系細胞の保有する機能を検討し、優れた細胞株を株化樹立した。細胞バンクに登録した十株以上の細胞は、多くの研究目的に利用されている。これらを追跡し利用範囲を調査している。
2. ヒト肝・胆系細胞の機能発現を検討
3. 機能の維持と長期培養が可能な培養方法の研究開発（バイオ人工肝）

B. 研究方法

1. 樹立株化細胞の分与先を追跡調査。過去一年の利用状況を調べた。
- 2 & 3. 樹立ヒト不死化細胞とバイオ人工肝の開発。

C. 研究結果

I. 分与されたヒト肝・胆細胞株分与先追跡結果

1. 遺伝子導入実験
2. 化合物評価(培養系における装飾抑制)ヌードマウス移植後の抗腫瘍活性評価
3. 胆管上皮の発生・分化についての研究
4. 肝癌におけるチロシンキナーゼの発現とチロシンキナーゼ阻害薬の効果の検討
5. 消化器癌の生物学的解析

6. JHH-1 の分泌するコラーゲンの分析
7. 各種薬剤暴露時の薬剤反応性関連遺伝子の発現変化の解析
8. 胆管系癌に対する抗癌剤感受性試験
9. 胆嚢がん細胞株に対する分子標的薬の効果
10. 癌遺伝子の解析
11. 肝細胞癌の発育・進展過程における FGF の役割についての検討
12. 癌ゲノム異常解析
13. Genetic research, screening for homologous deletion Investigation of the expression of hepatic transporters

II. 肝・胆系細胞資源の利用状況

期間：2004年4月1日～2005年2月28日

供給実績：15件、36アンプル。(内、海外への供給：2件、5アンプル)

【内訳】

(肝実質細胞由来)

JCRB1062 JHH-1: 6アンプル

JCRB1028 JHH-2: 6アンプル

JCRB0435 JHH-4: 4アンプル

JCRB1029 JHH-5: 4アンプル

JCRB1030 JHH-6: 5アンプル

JCRB1031 JHH-7: 4アンプル

(胆管がん細胞由来)

JCRB1032 OZ : 3アンプル

(胆のうがん細胞由来)

JCRB1033 NOZ : 4アンプル

III. 樹立ヒト肝細胞株利用のバイオ人工肝の研究

1. 歴史的背景

1988年から2004年末までにアメリカでは67,500例の肝移植が行われた。臓器移植ネットワーク (UNOS) に登録して肝移植を待つ患者の数は、過去9年間に3倍に増え、昨年末で17,330人となった。このうち、移植を受けられた患者は5,135人(30%)で、その数は2000年頃から頭打ちとなっている。UNOSに登録後1年以内に移植を受けた人は待機患者の3割であり、4割の人は3年以上待っており、毎年2,000人が亡くなっている。これを

補うための生体肝移植は、全体の5%程度でやはり横這いである。一方、移植全体の8%を占める肝癌患者への移植成績が比較的良好なことから、待機患者は今後さらに増加していくと予想され、ドナー不足が改善される見込みはない。

人工肝研究の始まりは、1950年代である。初期の人工肝は機械的なものであり、比較的早く機能的に限界となった。しかし、1980年代後半より、研究が再び活発化し、動物由来の肝細胞を含む様々なタイプの肝細胞を応用したバイオ人工肝が開発された。臨床試験にまで到達したもの、あるいは途中で立ち消えになったものなど様々である。

2000年以降、世界の9施設でバイオ人工肝の臨床試験が行われた（アメリカ3、イタリア、中国各2、ドイツ、オランダ各1施設）。いずれの施設でも、急性肝不全や慢性肝不全の急性増悪、肝移植後の機能不全といった重篤な症例に対し、肝移植までの“bridge”として用いられた。フェーズ1および2レベルまで安全性の点で重大な問題は生じず、多くの例で臨床症状や血液生化学値の改善を認めている。ロサンゼルスおよびヒューストンの施設でrandomized controlled study（フェーズ3）が行われたが、生存率の改善にまでは至らなかった。

ピッツバーグ大学は、全米310の肝移植センターの1つであり、昨年は全米最多の240例の肝臓移植（全症例の5%）が行われた。バイオ人工肝の治験（フェーズ1および2）は1999年以降これまでに通算5例行われ、改良が加えられてきた。この医療チームを率いるGerlach教授は、先に挙げた9施設の1つであるフンボルト大学（ドイツ）のバイオ人工肝も手掛け、現在も平行して開発を続けるこの分野のリーダーのひとりである。彼に9施設に対する評価を聞いたところ、中国に関しては情報が少なく評価できないとした上で、最も臨床応用が進んでいる施設としては180例を越える臨床試験を行っているロサンゼルスのCedars-Sinai Medical Centerを挙げたが、人工肝の性能に関してはピッツバーグ大学およびアムステルダム大学のモデルを推奨した。また、イタリアでは既に開発が中止されたとのことであった。ピッツバーグ大学では、現在、新たな臨床試験が計画されているが、やはりヒト肝細胞の入手が不確実なため、次善の策として今回はブタが用いられる予定である。

2. バイオ人工肝臓に利用するヒト細胞

培養ヒト肝細胞利用の必要性

正常な成人の肝臓に匹敵する機能を備えた人工肝臓は、肝不全患者の肝臓移植までの“bridge”（代謝補助）として、また新薬開発における動物代替の薬物評価系として有用である。人工肝臓には初代ヒト肝細胞が最適であるが、肝部分切除の研究から人命維持のためには少なくとも健全肝の約20%（200g肝組織、 20×10^9 個の肝細胞）が必要であると言われており、深刻なドナー不足の中で必要時に充分量の肝細胞を供給することはほぼ不可能である。初代ヒト肝細胞を株細胞のように増殖させることができれば問題はないが、現時点ではどんなに栄養豊富な培地、また如何なる増殖因子を用いても充分な増殖は得られない。そこで、必要時に大量調製が可能な初代ブタ肝細胞、無限増殖性のヒト肝癌由来株細胞などを代用して人工肝臓の開発が進められてきた。しかし、ヒトとブタでは薬物代謝に違いがあること、またブタに潜在するレトロウイルスの影響、さらに癌細胞と正常細胞との間の代謝能の違いなどが指摘されてきた。

最近では、ヒト骨髄由来の多能性成体前駆細胞(MAPC)、ヒト胚性幹(ES)細胞から分化誘導して得られる肝細胞類似細胞の利用が検討されている。しかし、これらの細胞の機能を初代ヒト肝細胞と同等のレベルまで誘導するための培養方法の開発など課題が多い。

3. 不死化ヒト肝細胞株の研究

初代ヒト肝細胞に代わる細胞、つまり腫瘍性がなく無限の増殖能を有し、機能的に初代ヒト肝細胞に近似する不死化ヒト肝細胞株の開発に取り組んできた。ヒト胎児由来の初代肝細胞にシミアンウイルス 40 ラージ T 抗原(SV40LT)遺伝子を導入して不死化ヒト肝細胞株(OUMS-29)を樹立した。OUMS-29 細胞は典型的な上皮性形態を示し、核局在性の SV40LT 抗原を発現する。本細胞は非腫瘍性であり、無血清培地にて約 42 時間で倍加する。OUMS-29 細胞はアルブミンを分泌し、またチトクローム P450 (CYP)1A1, 1A2, 2E1, 3A などの薬物代謝酵素の他、様々な肝特異機能を発現する。OUMS-29 細胞を 90%肝切除による致命的な急性肝不全ラットモデルの脾臓内に移植すると、高アンモニア血症を防ぎ、顕著な延命効果を示す。これらの結果は、OUMS-29 細胞が同定した肝機能以外にも更に種々の機能を保持している可能性を示唆している。さらに、OUMS-29 細胞にヒト肝特異転写因子 HNF4 α 遺伝子を導入し、より機能アップした細胞株 OUMS-29/H-11 を樹立した。本細胞株は、元来の遺伝子発現の増強に加えて親株には認められない他種類の肝機能遺伝子 (ApoA1, ApoCII, ApoCIII など) も発現する。

4. 培養肝細胞 - 3次元展開における肝機能発現

肝細胞は生体内では血清タンパク質合成、糖新生、尿素形成、解毒など様々な肝特異機能を発現するが、一度体外に取り出され、培養に移されると急速にその機能を失う。これは培養環境が *in vivo* 肝臓のそれと大きく異なるからである。通常のプラスチックあるいはコラーゲンコートディッシュを用いた培養では、肝細胞はこれらの培養基質に容易に接着し、伸展して扁平になる。この形態変化が機能低下の大きな原因であると考えられている。*in vivo* 肝臓に類似する機能的な人工肝臓を作成するためには、肝細胞の丸い形態を維持して3次元高密度培養することが重要である。ラジアルフローバイオリアクター(RFB)によるヒト不死化肝細胞株の3次元高密度培養とその高機能発現について紹介する。使用しているラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) の細胞培養部分 (リアクター) はドーナツ状の円筒構造でその内側の空間に多孔質ガラスビーズを細胞担体として充填し、その外周から中心へ向かって培養液が逆放射状に流れる仕組みになっている (図 1A)。この流れによって中心部の細胞にも酸素や栄養分が行き渡ると共に、shear stress による細胞の損傷を少なく抑え得る利点がある。RFB に播種したヒト不死化肝細胞(OUMS-29)はガラスビーズの表面に重層化し、リアクター内の位置に依らず均等に増殖する (図 1B)。OUMS-29 細胞の表面には、生体内の肝細胞と同様に多数の微絨毛が認められる。OUMS-29 細胞は、その DNA 量および酸素消費量の増加から7週間で約 15 倍に増殖すると推定される (図 1C)。

RFB 培養時の OUMS-29 細胞のアルブミン産生は培養開始後の 1 週間に急激に増加し、