

200400219A

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤村 昭夫

平成 17(2005)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. ヒト肝細胞を用いた研究に提供された転移性肝癌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	7
永井秀雄・安田是和・佐田尚宏	
3. 臨床腎臓検体の採取	11
森田辰男・大島康雄	
4. 臨床検体の管理・初代培養システムの構築	15
鈴木 誠	
5. DNAマイクロアレイ装置管理・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	
マイクロアレイ実施・データ解析・精度管理	21
大島康雄	
7. 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	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(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

本研究は日本人のプライマリー肝・腎細胞を用いて、日本人における医薬品の安全性を予測するシステムを構築することを目的とする。平成 14-15 年度は患者から肝・腎組織を採取し、これを用いてプライマリーヒト肝・腎細胞を作成するまでの研究基盤整備を行った。平成 16 年度は得られた細胞に 20 種類の薬物(および薬物類似化学物質)を曝露し、GeneChip を用いて遺伝子発現解析を行った。薬物曝露・遺伝子発現解析に応用が容易な、遺伝子上流配列・転写因子解析データベースを構築した。このデータベースは外部のデータベースにリンクしており、広範囲な応用が期待できる。

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、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はヒト-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され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安全性の高い医薬品を創製するために必要と考え

られる。

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になっている。欧米では、既にヒト組織を用いた有効性および安全性の評価が医薬品の研究開発に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。こ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した。

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取得方法や説明文書の内容、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、患者の匿名化を行った。

臨床検体採取部門はインフォームドコンセントを患者より得た後、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った。

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。

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、薬物曝露・遺伝子発現解析を Affymetrix 社の GeneChip を用いて解析した。

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した。

C. 研究結果

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は、本研究の計画書を審査し、連結不可匿名化を行うことを条件のひとつとして本研究計画を承認した。これらの委員会は実施計画承認後も、手術検体一つ一つの切除状態を病理診断部が検討することにより、不適切な手術が行われないよ

うに監視を行った。

臨床検体採取部門では、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について、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を示したうえで説明し、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。患者の治療を優先するために、エントリーした症例のうち肝臓では約 40%、腎臓では約 20%で研究目的の組織採取を断念した。

細胞プロセッシング部門では採取された細胞を処理し、得られた培養細胞の評価を行った。

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を用いて、時間依存性が評価できるような条件下で腎毒性の知られている 20 種類の薬物を曝露させて遺伝子発現解析を行った。解析結果の一部は、定量 PCR 等で発現量変化を確認するとともに、メカニズムへのアプローチを行った。

遺伝子発現解析データ意味づけを行い知識として整理するバイオインフォマティクス部門では、発現データをその発現、すなわち転写活性と考え、転写因子の活性を示すデータとして処理するデータベースを構築した。

D. 考案

ヒト組織を用いた研究開発の在り方専門委員会や公的な議論の場である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応用について議論がなされており、貴重な組織は、目的のはっきりした、あるいは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。この点に関して本研究で実施するトキシコゲノミクスプロジェクトの重要性とヒト組織の利用の必要性が、外部委員を含む倫理委員会において承認された。

これらの実践を積み重ねることにより、今後のヒト組織の研究応用に関する基盤整備がおおむね完了したと考えている。

平成 16 年度は 20 種類の薬物(薬物類似構造を有する化合物を含む)の遺伝子発現解析により得られたデータを積み重ねた。得られたデータは学術会議・科学雑誌などで公開するとともに、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。得られたデータを解析することにより、薬物が示した腎障害のメカニズムへアプローチすることができた。

当初のもう一つの目的であるトキシコゲノミクス研究へ貢献しうるデータベースも完全ではないものの公開することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

発表論文

大島康雄, 藤村昭夫: 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究: 臨床薬理 2005年1月号; 36(1): 11-12

学会発表

大島康雄, 藤村昭夫: シンポジウムトキシコゲノミクス-現状と臨床薬理学への応用- 日本人組織を用いたト

キシコゲノミクス研究: 臨床薬理学会
年会 2004年9月 静岡

2) 海外

発表論文

Oshima Y, Tojo A, Fujimura A, Niho Y, Asano S.: Potent receptor-mediated cytotoxicity of granulocyte colony-stimulating factor-Pseudomonas exotoxin, a fusion protein against myeloid leukemia cells: Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 25;319(2):582-589

Oshima Y, Komatsu N, Ozawa K, Fujimura A.: CML Developed in a Japanese Family Transmitting a Novel Point Mutation in the Thrombopoietin Gene (TPO): blood, 2004 Nov; 104(11- part 2 of 2 parts): 141b (Abs# 4220)

Oshima Y, Kurokawa S, Tokue A, Mano H, Saito K, Suzuki M, Imai M, Fujimura A: Primary Cell Preparation of Human Renal Tubular Cells for Transcriptome Analysis: Toxicol Mechanisms and Methods, 2004 Sep/Oct; 14(5): 309-316

Oshima Y, Ishida Y, Shinohara A, Mano H, Fujimura A: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: Experimental Hematology, 2004 Jul; 32(suppl): 34 (Abs# 14)

学会発表

Yasuo Oshima, Yusuke Ishida, Ayumi Shinohara, Hiroyuki Mano, Akio Fujimura.: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: 33rd Annual Meeting of International Society for Experimental Hematology, Jul 2004, New Orleans, USA

Fujimura A: Recent advances of clinical pharmacology: Toxicogenomics: Japan-China Joint Meeting Of Basic And Clinical Pharmacology Sep 2004, Shizuoka, Japan

Fujimura A, Oshima Y: Toxicogenomics: The 17th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Oct 2004, Jeonju, Korea

Kishimoto S, Oshima Y, Gemba M, Fujimura A: Cisplatin induced gene expression in primary human renal cortical cell ~ an approach to get rid of cisplatin's nephrotoxicity ~: Toxicogenomics International Forum 2004, Oct 2004, Kyoto Japan

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
- 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
ヒト肝細胞を用いた研究に提供された転移性肝癌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

ヒト肝細胞を用いた研究に提供された肝切除例10例を病理学的に検索し、以下の結果を得た。

1. 大腸癌肝転移9例、乳癌肝転移1例の非腫瘍部が提供されていた。
2. 全例で適切な手術検体からほぼ健常な肝細胞が採取されていた。

A. 研究目的・材料・方法

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必須なのは、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。このための基礎的検索は既に行われたので、今回は、平成15年2月から平成16年10月までに自治医科大学附属病院で行われた手術例のうち、ヒト肝細胞を用いた研究のために肝組織が提供された10例の転移性肝癌切除検体について病理学的に検索し、以前の検索結果と対比して検討した。

(倫理面への配慮)

この研究は、手術例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。

B. 検索結果

1. 臨床的事項

原発巣切除と肝転移切除が同時に行われたのは1例で、残る9例では、原発巣切除後出現した転移に対し肝切除が行われた。9例が大腸癌の転移、1例が乳癌の転移であることは、病理組織学的所見の対比と免疫組織化学的検索により確認した。原発巣切除から肝切除までの期間が最も長いのは乳癌の10年で、最も短いのは2ヶ月だった。

2. 切除肝所見

3例で左葉切除、1例で右葉切除が行われていた。最も巨大な転移は右葉切除例に認められ、最大径14cm(切除肝重量2600g)だった。この4片葉切除例の転移巣から切除縁までは5mm未満だった。肝区域切除が行われた6例の転

移巣遠位に認められた非癌組織は全て4cm未満で、5例では転移巣から切除縁までは5mm未満だった。転移から切除縁まで12mmだった1例の転移は被膜下に存在した。

3例で、研究試料が採取された非癌部に軽度の肝細胞脂肪化を認めた。残る7例中、巨大転移を認めた右葉切除例では、転移周囲肝細胞変性が高度だったが、研究試料採取部はほぼ正常だった。残る6例の非癌部に異常はなかった。

C. 考察

以前の転移性肝癌手術例の検討により、肝区域切除例では、転移巣から切除縁まで1cm以下、転移巣遠位非癌部肝組織4cm以下でも、80%以上で研究に適した光顕的に正常肝組織が存在した。したがって、肝細胞採取に際しても、原則としてこの範囲の肝切除を行うべきである。なお、手術の縮小傾向を反映し、このような肝切除例は前期には41%だったが、後期には72%と増加していた。

肝細胞採取が行われた今回の検索例では、区域切除が行われた6例全例で転移巣遠位非癌部は4cm未満であり、転移が被膜下にあった1例を除く5例で、転移巣から切離縁まで5mm未満だった。片葉切除が行われた4例でも、転移巣から切除縁までは5mm未満だった。このように、以前より切除範囲は縮小し

ているに拘わらず、全例でほぼ正常な肝組織が研究試料として採取されていた。

D. 結論

ヒト肝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肝細胞採取が行われた10手術例に倫理的問題はなく、肝細胞採取部は組織学的にほぼ正常だった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得;なし
 3. 実用新案登録;なし
- 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
肝切除症例の臨床的検討

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

研究要旨

2004年自治医科大学消化器一般外科では78例の肝切除術を施行した(男性53例、女性25例、平均年齢は59.8歳、肝移植ドナー15例を除くと65.8歳)。疾患別の内訳は転移性肝癌31例、肝細胞癌20例、肝移植ドナー15例、その他12例であった。術後合併症としては胆汁漏6例、創感染・創哆開3例、呼吸器合併症3例、肺梗塞2例がみられたが、死亡例はなかった(morbidity 24.4%、mortality 0%)。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。

A. 研究目的

2004年における当科の肝切除症例を臨床的に検討する。

B. 研究方法

2004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¹⁾²⁾から、その臨床的特徴を抽出、検討する。

C. 研究結果

2004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1894名の入院症例があり、1325件の

手術を行った。そのうち肝切除術を施行した症例は78例(男性53例、女性25例、平均年齢は59.8歳、肝移植ドナー15例を除くと65.8歳)であった。疾患別の内訳は転移性肝癌31例、肝細胞癌20例、肝移植ドナー15例、その他12例であった(表1)。術前併存症としては肝硬変、慢性肝炎が15例にみられ、その他高血圧8例、糖尿病10例、肺疾患8例、心疾患3例、慢性腎不全1例がみられた(表2)。術後入院死亡はみられなかった。術後合併症としては胆汁漏6例、創感染・創哆開3例、呼吸器合併

症 3 例、肺梗塞 2 例などがみられた (morbidity 24.4%、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。

D. 考察

2004 年当科における入院数、手術件数は、2000 年と比較すると、入院件数で約 2 倍、手術件数で約 1.5 倍と著明な増加傾向にある。その中で肝切除術も、2000 年 39 例、2001 年 56 例、2002 年 71 例、2003 年 68 例と増加の傾向であり、2004 年は 78 例と前年比 10 例増加した(図 1)。2004 年の疾患別内訳では肝細胞癌、転移性肝癌で 65.4%を占めた。Mortality は 2002 年 18.3%、2003 年 13.2%であったが、2004 年は 24.4%とやや増加した。これは、術前併存疾患あり症例が 42 例(53.8%)と、手術高リスク症例が多かったためと考えられる。2004 年肝切除による死亡例はなく、68 例中 1 例を失った 2003 年の成績 (mortality 1.5%)と比較して改善した。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

どが薬剤曝露、遺伝子発現の検討には有効であると考えられた。

E. 結論

2002 年当科における肝切除症例は 78 例あり、morbidity 24.4%、mortality 0%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、2004 年は死亡例なく、安全に手術を施行し得た。

F. 参考文献

- 1) 自治医科大学消化器一般外科業績集 2003
- 2) 自治医科大学消化器一般外科業績集 2004

G. 健康危険情報

該当なし。

H. 研究発表

該当なし。

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

該当なし。

表 1 肝切除症例の疾患別内訳(2004 年)

転移性肝癌	31 例
肝細胞癌	20 例
肝移植ドナー	15 例
胆管癌	5 例
胆嚢癌	3 例
胆腫瘍・血管腫	2 例
胆内結石症	1 例
胆嚢胞	1 例
計	78 例

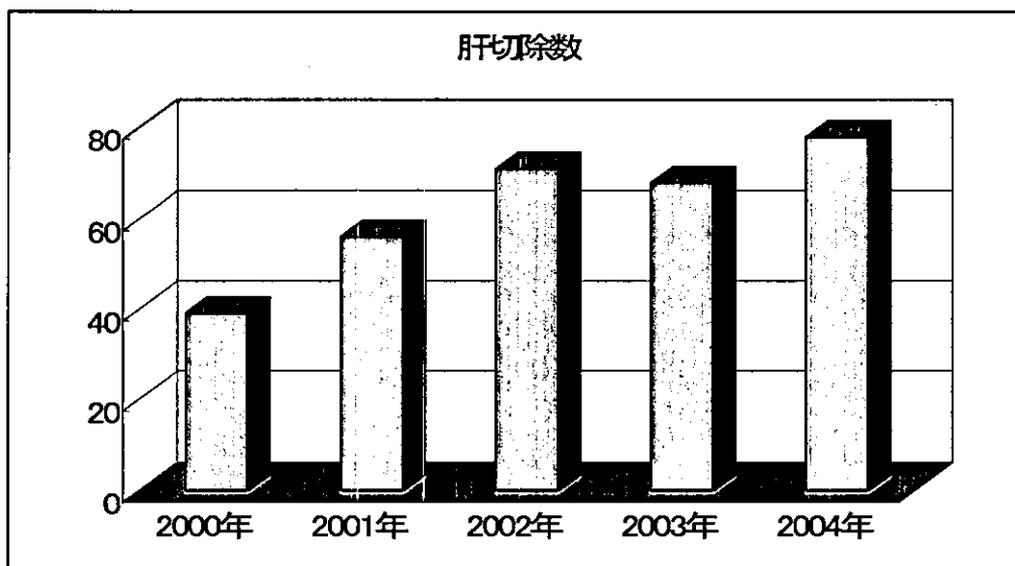
表 2 肝切除症例の術前併存症(2004 年、重複あり)

肝硬変・慢性肝炎	15 例
糖尿病	10 例
高血圧	8 例
肺疾患	8 例
心疾患	3 例
慢性腎不全	1 例
その他	4 例
計	42 例

表 3 肝切除術の術後合併症(2004 年)

胆汁漏	6 例
創感染・創哆開	3 例
呼吸器合併症	3 例
肺梗塞	2 例
イレウス	1 例
神経障害	1 例
乳び漏	1 例
腹腔内膿瘍	1 例
仙骨部褥瘡	1 例
計	19 例

図1 肝切除数の年別推移(自治医科大学消化器一般外科)



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 森田辰男 自治医科大学腎泌尿器外科学教授
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

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である。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、日本人のプライマリー腎臓細胞を安定して得ることは重要である。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。平成16年度に本院で片腎摘出術が施行された症例のうち、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細胞分離に成功した2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年度は、2症例より本研究への賛同が得られ、細胞培養に成功した。従って、2症例分につき検討した。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た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

本研究に対する賛同が得られ2症例のいずれにおいても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きたが、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、また長期間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、線維芽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、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

本研究における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と期待された。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

培養開始後4週間以内での研究がプライマリーカルチャー細胞を用いた

場合には適当と考えられた。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た。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H, Harada M.
Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer binding protein α in G-CSF signaling pathway.
J Biol Chem. 2005 Jan 21; [Epub ahead of print]

Oshima Y, Tojo A, Fujimura A, Niho Y, Asano S.
Potent receptor-mediated cytotoxicity of granulocyte colony-stimulating factor-Pseudomonas exotoxin, a fusion protein against myeloid leukemia cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 25;319(2):582-9.

2. 学会発表

Yasuo Oshima, Yusuke Ishida, Ayumi Shinohara, Hiroyuki Mano, Akio Fujimura.
Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia
Annual Meeting of International Society for Experimental Hematology, Jul 2004, New Orleans, USA

大島康雄, 藤村昭夫
シンポジウム トキシコゲノミクス-現状と臨床薬理学への応用- 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究
臨床薬理学会年会 2004年9月 静岡

Saeko Kishimoto, Yasuo Oshima, Munekazu Gemba Akio Fujimura.
Cisplatin induced gene expression in primary human renal cortical cell ~ an approach to get rid of cisplatin's nephrotoxicity ~
Toxicogenomics International Forum 2004, Oct 2004, Kyoto Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし

4. 実用新案登録:なし

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 鈴木 誠 自治医科大学薬理学講座助教授

研究要旨

臨床材料として得られる肝臓の状態を想定して、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さらに消化方法などを検討し培養方法を検討した。

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、マウス肝の断片より培養細胞の作成を試みる。

B. 研究方法

過去の論文にある方法: 燐酸バッファーなどで、十分に還流する。コラーゲナーゼ(1mg/ml)で還流する場合もある。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。

今回組み合わせて行った方法 (1) 還流を行わない。コラーゲナーゼ(1mg/ml)で消化分離後(時間を検討)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。
(2) 還流を行わない。コラーゲナーゼ

(1mg/ml)で消化分離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。これをフィルター(140 μ m)に通し、通過しなかった破片をさらに【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消化する。細胞分離を確認しながら、分離を確認。沈殿物を培養液にて培養。

C. 研究結果

(1)の方法で消化、破碎するだけの方法を行った。コラーゲナーゼ+ディスパーゼ後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。磷酸バッファー(2ml)で一度還流し、同じ方法を用いたが、赤血球の混在はなお大量に認められた。

そこで、(2)の方法を検討した。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、沈殿を再びデスペーセもしくは、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。

D. 考察

今回の検討について:肝臓の細胞は、ほぼ一様で、培養の方法は確立されている。おおくの培養方法は、動物で行っており、還流し血球を除去してから行われている。しかも還流時間は、数十分以上にわたる場合がおおく、還流の重要性が伺える。一般に赤血球が混じる事は、培養の上で嫌われている。過剰 Fe による培養の阻害、赤血球蛋白による細胞接着の阻害が推定されている。しかし、人の肝臓を還流して用いる事は、臨床材料を用いる場合はほぼ不可能である。従って、今回はあえて、還流しない方法で、培養ができるか否かを検討した。

まず、実際に今回の(1)の方法では赤血球が混じた場合培養はうまくいかなかった印象があった。分離後、顕微

鏡で確認すると、ほとんどが赤血球で、肝細胞と考えられる細胞は、ごくわずかか、あってもシャーレに付着できない状態であった。この方法は、消化酵素を組み合わせで行ったが、あまり、改善できたとはいえない。昨年、臨床材料である腎臓の尿細管をこの方法で分離できたが、肝臓には適用できないのではないかと考えられた。

そこで、まず、肝臓を細切して、洗った後、コラーゲナーゼで、消化し、さらに粉碎する事によって、分離した細胞を捨てた。この捨てた細胞の中には、肝細胞も含まれていると考えられるが、赤血球の混在の方が影響が大きいので、あえて捨てる事にした。この残りをデスペーセ+コラーゲナーゼもしくは、トリプシン+EDTA で30分以上消化した場合に、肝細胞を取り出すことができた。

しかし、この方法は、やわらかいマウスの肝を材料にした場合に可能な方法かもしれない。臨床材料に直接応用できるか否かは不明である。人の場合を考えると、肝硬変などの繊維化が混在してくるはずなので消化時間を長くする事、粉碎を行った後のフィルターを複数組み合わせ、赤血球だけ除く事、などが考えられる。粉碎を十分にでき、かつフィルターで赤血球のみを除く事ができるならば、早く確実に肝細胞を得る方法として、有用だと考えられる。赤

血球を除くためにパーコールを用い、細胞を比重で分ける事も考えられる。しかしこの場合、比重や、遠心回転数など検討する項目は、かなりあり、確立するのは大変な作業と考えられる。いずれの場合も、マウスでは行えないであろう。可能ならば、大きな実験動物であれば人に応用できる方法になると思われる。

人に応用する場合の問題点:以上の考案より人に応用する場合の問題点をまとめると。

1. 還流できないために赤血球の混入は避けられない。Fe 成分によって細胞の増殖は阻止される。
2. 細胞を分離するために細切後に密度勾配遠心法で細胞を分離する方法が最もよいと考えられた。しかし、この方法はマウスで条件を決めるのは人に応用できないという点で行わなかった。
3. 実際に人の臨床材料を用い、何回か条件を検討しないと肝細胞培養は行えないであろうと結論できる。具体的には肝臓を細切した後、デスパーゼ+コラーゲナーゼもしくは、トリプシン+EDTAにて細胞を分離する。この際消化液を数回に分けて、変える必要がある。この細胞群を50%パコール下の液で、x回転x分行い。細胞群を分離し、その中間層を培養すればよいと考えられた。xの条件はヒトで行わないと決定し得ない。

E. 結論

臨床材料を想定して、マウスの肝臓の断片から肝細胞を取り出す方法を試みた。赤血球の混在が問題であり、これを取り除く方法を考えた。臨床材料を扱うために、さらに検討が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
 5. 実用新案登録:なし
- 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・データ解析技法の推進」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:我々はヒト疾患細胞の膨大な遺伝子発現データベースを構築する目的で、広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。同バンクに既に保存された 600 例を越えるサンプルの中から、急性骨髄性白血病 99 例について、全ヒト遺伝子の発現量解析を DNA チップを用いて行った。得られた膨大な遺伝子発現データおよび各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後 365 日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基に AML の新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNA チップは数千-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。

我々は白血病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ストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いて DNA チップ解析を行うことで、(1)白血病の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2)白血病の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、(3)病期

が進行する白血病類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を目指した

B 研究方法

上記検体群を用いて以下のように DNA チップ解析を行った。細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず in vitro にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ビオチン CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA (cRNA) を作製した。このビオチン化 cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素 PE 結合アビチンと反応させた。この DNA チップ上の cRNA 結合スポットを Affymetrix 社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理を GeneSpring 7.0 (Silicon Genetics 社)にて行った。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び栃