

200400219B

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14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 藤村 昭夫

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表_____ 25

III. 研究成果の刊行物・別刷_____ 添付

IV. (資料) 別紙1

別紙2

別紙3

別紙4

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)
総合研究報告書
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ために、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した。本研究では腎臓・肝臓を切除する際に、やむを得ず病変部と同時に切除された非病変部の腎臓・肝臓組織を用いてプライマリー細胞を作成した。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作成を行うとともに、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由来であると担保された細胞を用いて、腎毒性の知られている薬物と知られていない薬物を曝露させ、遺伝子発現を Affymetrix 社の GeneChip で解析した。遺伝子発現における個人差を評価する目的で、腎臓由来 RNA 11 症例を Affymetrix 社の GeneChip で解析した。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、さらに、知識を得るために適した遺伝子上流配列データベースおよび転写因子結合配列データベースを検索するソフトウェアを開発した。

分担研究者氏名・所属機関名および所属機関における職名

大島康雄・自治医科大学・臨床薬理学助手
永井秀雄・自治医科大学・外科学教授
安田是和・自治医科大学・外科学教授
森田辰男・自治医科大学・泌尿器科学教授
齋藤 健・自治医科大学・病理診断部教授
鈴木 誠・自治医科大学・薬理学助教授
間野博行・自治医科大学・ゲノム機能研究部教授
篠原 歩・東北大学大学院情報科学研究科・システム情報科学教授

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した。

現在、医薬品の研究開発においては、まず最初に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その後に、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。

さらに、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。この際の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。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な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、積極的に推進を図ることが重要である。

このような流れの中で、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つつ、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、患者さんの匿名化を行った。

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。腎臓尿細管由来の細胞は、形態・Glut2発現・ γ GTp発現・NAG 発現で評価した。また、肝細胞由来の細胞は、形態・アルブミン産生能・およびチトクロームP450発現で評価した。

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、それぞれ腎・肝毒性の知られている薬物と知られていない薬物を暴露させ、適当な時間の後に、細胞を回収して total RNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip で解析した。

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。

上記の通り研究をおこなうにあたり、役割分担を担った各部門を設置し、それぞれの分担研究者が部門の責任者として研究を遂行した。(図1)

C. 研究結果

1. 検体採取システム・プライマリーカルチャー作成・得られた細胞の評価

1-a. 検体採取

自治医科大学付属病院で、肝臓・腎臓切除手術を受けた患者より、肝臓または腎臓組織を得た。これら組織よりヒトプライマリーカルチャーを作成した。研究に使用する目的で患者由来の臨床検体を得るに当たり、倫理評価ワーキンググループより研究計画につき審査を受けた。肝臓(別紙 1)および腎臓(別紙2)について倫理評価ワーキンググループへ提出された研究計画書、および、それぞれの審査結果(別紙3・4)を添付する。インフォームドコンセントを患者より得、匿名化を行い、術後の病理組織の評価を病理診療部が行うことによつて、不要な非病変部を切除することの無いように倫理評価ワーキンググループが評価し続けた。

エントリー症例は肝臓 15 症例・腎臓 14 症例。主な現疾患は肝臓では大腸癌の肝転移・腎臓では片側腎腫瘍であった。(図2)

1-b. プライマリーカルチャー作成

実験動物由来の切除組織よりプライマリーカルチャーを作成する手順はいくつか教科書的記載がある。ヒト以外の実験動物由来組織のプライマリーカルチャーを作成する際、コラーゲナーゼなどを支配血管へ注入するいわゆる還流を行うことによつて、しばしば良好な結果が得られる。ヒト臨床由来の組織は、患者の治療を第一に考えて術式が決定されるため、還流を行うことは不可能であった。また、支配血管を結紮した後、周辺組織の処理・止血処置・病変部位の確認を術中に行っているため、血流が遮断してから氷温培養液に浸すまでの間、体温のまま血液から酸素供給のない状態で組織が経過する”温疎血時間”が発生してしまう。この様に動物とヒトでは種間の生物学的性質の差以外

にも検体処理に関わる条件が異なるため、予め動物実験で得た様々な経験は必ずしも臨床検体の処理には生かされなかった。われわれは臨床検体を用いてプライマリーカルチャーを作成の評価を行った。得られた臓器より腎臓皮質組織を細切し、ディスパーゼ、トリプシン EDTA 処理することにより比較的安定したプライマリーカルチャーを得ることが可能となった。

1-c 細胞の評価

ヒト臓器は複数の組織の集合体である。プライマリーカルチャーはその作成過程でクローン化の手順を踏まないため、複数の組織由来の細胞を含むものと推定される。したがって、その使用に際して由来組織を明らかにしておくことは重要である。

まず腎臓由来のプライマリーカルチャーに関しては、得られた腎臓細胞は上皮細胞様の形態を有した。さらに、腎臓特異的遺伝子を発現していた。以上より得られた細胞の多くは造血系の細胞など腎臓組織に混入していた他組織ではないと考えられた。腎臓上皮の中にはメザンギウム組織・尿細管組織・間質組織などが多く存在する。我々のプライマリーカルチャーでは、得られた細胞の多くは γ GTP を発現し、Glut-2 を発現していた。以上、得られた細胞は主に近位尿細管由来であると考えられた。(図3)

次に肝臓由来のプライマリーカルチャーに関しては、肝臓は主に肝細胞よりなるが、その他にも脈管系組織や免疫系細胞も存在する。我々のプライマリーカルチャーでは Cyp3A4 の発現が確認され、また、培養上清にアルブミンが検出されたため、アルブミン産生能を保有していたと考えられた(図4)。したがって、多くの細胞が肝細胞であると

考えられた。 γ GTP の発現は明らかではなく、胆道系組織の混入は否定できないが、存在したとしても極わずかであろうと考えられた。

患者検体を研究に利用する際の問題点の一つとして、研究にエントリーする適応のある患者が、研究の都合に適したタイミングで我々の施設を訪れることが期待できない点が挙げられる。多くの医科学研究に貢献してきた細胞株などのように、凍結保存の後融解して使用することが可能であれば、研究を大いに推進させる可能性がある。我々は凍結融解を試み、その前後で培養を行い、遺伝子発現を比較した。この結果、凍結前のプライマリーカルチャーと凍結後のプライマリーカルチャーは同様の遺伝子発現を示しており、遺伝子発現から見た細胞の性質は凍結融解により有意な影響を受けないと判断された。(図5)

2. 得られた日本人プライマリーカルチャーの遺伝子発現における個人差等の評価

2-a. 個人差の評価に使用することができた細胞

これまで 11 人分の患者由来の細胞をプライマリーカルチャーにすることができた。薬物曝露刺激などを行わずに培養し、基礎的な遺伝子発現を解析した。11 人分の細胞をそれぞれ3回に分けて培養し、遺伝子発現解析を行った。結果的に 9 人分のサンプルが解析対象として我々の基準に適合し、評価の対象となった。2 人分の細胞は、凍結保存後の発育が不良で、良質な RNA が得られなかったため、解析対象として適していないと判断した。

一方、参考のために海外調整済みの腎臓由来細胞 RNA も入手し、遺伝子発現解析を行なった。海外由来のサンプ

ルは 8 ロット(8人分)入手し、1 ロットあたり 3 回に分けてラベリング・発現解析を行った。このうち 5 ロット分が解析対象として我々の基準に適合した。日本人由来 vs 海外由来の発現の差を明らかにするために、ノンパラメトリックテストで行い、さらにベンジャミン・ホクバーク補正を行った。

2-b. 個人差

各個人ごとの平均と分散を各遺伝子ごとに計算して、t-test, p 値を 0.01 を有意水準として検定したところ、63 のトランスクリプトについて有意に個人間で発現量が異なると判定された。約 44,000 トランスクリプトの中の 63 であり、日本人の中におけるばらつきの割合は少ないと考えられた。(図6)

海外由来のサンプルは細胞の処理手順などが明らかにされておらず、単純な比較は注意が必要である。解析の結果、以下のような結果が得られた。有意水準 p 値 0.05 未満を有意と設定し、さらに発現量として 5 倍以上両群間で差のある遺伝子を計算したところ、343 トランスクリプトが結果として得られた。このようにして得られた遺伝子発現を観察したところ、日本人由来の遺伝子発現は比較的均一であったが、海外由来の遺伝子発現は変化量が大きいと思われた。(図7)

3. 解析手順の標準プロトコール

当研究部で行っている解析プロトコールを図8に示す。GeneChip システムでは 4 万を超えるトランスクリプトが一度に測定されるため、データハンドリングには通常の生物学的な統計学的手法とは異なるテクニックが必要である。

多くの測定された遺伝子は発現していない、あるいは有意な変化を来していないものと推定される。こうした前

提でデータから有意な変化を来す遺伝子発現データを抽出する手順として以下の手順を踏んでいる。1) 3 ステップからなるノーマライゼーション、2) 3 ステップからなるノイズ除去および 3) 時間経過を軸とした発現量変化のクラスタリング。さらに、最近行った platinum complex の GeneChip データと定量 PCR のデータとの相関情報をもとにさらに手直しする予定である。

4. 遺伝子発現予備実験

尿細管プライマリーカルチャーを対象とした。細菌毒素(ETA) (4種類の濃度、6 タイムポイント)を用いて曝露実験を行った。このとき使用した ETA には、肝臓障害性が知られている。また、抗腫瘍薬として開発中に、腎毒性が報告された。濃度は WST1assay による IC50 値を基準とし、その 1x, 0.1x, 0.01x, 0.001x の濃度を曝露した。曝露時間は前, 5min, 30min, 60min, 6hr, 24hr とした。

各実験ポイントに 3 枚の GeneChip 使用した。

4-a. Hormetic Effect

”病理学的所見・細胞毒性が検出できる濃度より低濃度の曝露でも、何らかの遺伝子発現変化が見られるのではないか”という仮説から、低濃度での曝露を IC50 との比較で検討した。少なくとも一部の遺伝子では、IC50 の濃度で示すような遺伝子発現変化が 1/1000 の低濃度でも同様に観察された。(図9)

4-b. QT クラスタリング

多くの遺伝子発現情報から意味のある知識を抽出する手順として、Cross Gene Error Model や QT clustering 等の手順を踏み、遺伝子を分類した。ETA を例とした曝露実験では 651 のクラス

ターが形成された。図ではこのうちの 4 つを示す。(図 10)

4-c. アノテーションに基づく遺伝子の分類

一方、アノテーションに基づき遺伝子の機能(または推定される機能)を 329 種類に分類した。

QT クラスタリングにより得た各クラスターの構成遺伝子リストと、アノテーションに基づく遺伝子リスト間に相同性の有無を検定し、2つのクラスターがそれぞれ、遺伝子リストと有意な相同性を有すると判定された。各クラスター内には共通の機構が発現を制御している可能性がある。遺伝子の発現は上流の発現制御領域と転写因子等の DNA 結合蛋白質の反応が関わっている場合が知られている。そこで、クラスタリングにより得られた遺伝子リストと上流配列の検討が重要となる。

5. データベース

上流配列と遺伝子リストを研究する上で有用なツールを開発した(図 11)。入力として1) 配列、2) 遺伝子、および 3) 遺伝子リストを受付け、それぞれに対して出力は1) プローブセット ID, 2) 転写因子リストおよび、3) 転写因子・転写因子結合配列を出力する。特徴は、遺伝子の ID としてプローブセット ID を利用し、我々の使用している GeneChip システムとの相性が良い。入力する項目はプローブセット ID と解析対象範囲程度で良く、簡単である。さらに文献データベースへリンクしている。

本報告書作成時点(2005年3月)には、次のアドレスより公開されている。
<http://www.i.kyushu-u.ac.jp/~y-ishida/DBANGEL/>

6. パスウェイ解析

大量のデータから知識を取り出すために、クラスタリングとは異なるアプローチとして、パスウェイ解析も試みている。代謝経路やシグナルトランスダクション経路(Pathway)が、明らかになっており、遺伝子情報との関連が明確にされているものを可視化した。フリーで利用できる KEGG (京都大学)と SPAD(九州大学)の Pathway 情報を利用した。

解析例としている ETA は、蛋白質合成に不可欠な elongation factor 2 を ADP リボシル化することにより不可逆的に不活化し、蛋白質合成阻害がその毒性の主たる活性とされている。蛋白質合成阻害がおこることによって、アミノ酸代謝が影響を受けるものと推定される。図 12 は Alanine, Aspartate の代謝経路図で、着色されているのが遺伝子発現データ。5 分・15分・6時間・24 時間後の発現データを図 12 で示す。この結果より、アミノ酸代謝にかかわる酵素群が発現誘導・抑制を受けている様子が観察できた。

7. 薬物曝露

これまでに 21 種類の薬物の曝露研究を行った。曝露条件を図 13 に示す。

アミノグリコシド系抗生物質の誘導する遺伝子発現変化を図示する。これらは4つのクラスターに分類され、用いた抗生物質はすべて同様の変化を誘導するように見える(図 14)。

プラチナ錯体曝露後の遺伝子発現変化を図示する。5 つクラスターが表示されているが、実際には 3 つのクラスターに分類された。残りの2つはコントロールとしてスパイクした RNA が表示されている。

8. 定量 PCR との比較

上記のプラチナ錯体曝露研究により得られたクラスタリング中の遺伝子に

ついて real-time PCR を行った。real-time PCR は taqMan 法(アプライドバイオシステムズ社、アッセイオンデマンド試薬)を用い、ABI7700 機種を用いた。これまでのところ発現量変化の相関性が最も良好であったのは、AP1S1 (adaptor-related protein complex 1, sigma 1, GeneBank accession #NM_001283) であった(図 16)。AP1S1 遺伝子導入細胞において Cisplatin 感受性が増加し、一方、遺伝子ノックダウン細胞において Cisplatin 耐性が獲得され、Cisplatin による殺細胞活性との関連が示唆された。

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した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。さらに、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と査察が倫理評価ワーキンググループにより行われた。今後もヒト組織の研究応用に関する基盤を固めてゆく予定である。

本研究により臨床サンプルより肝細胞・尿細管細胞を培養することが可能となり、研究基盤がほぼ整備されたものと考えられる。今後も曝露実験を継続し、遺伝子発現解析を積み重ねてゆく予定である。プラチナ錯体で得られた AP1S1 遺伝子と同様に、他の薬物曝露により得られた結果についても、遺

伝子発現の確認を行うとともに腎障害メカニズムへアプローチすることを予定している。また、転写因子データベース・配列解析ソフトの開発時期には、ヒトゲノムデータがドラフトシーケンスしか公開となっていなかったが、これをゲノムデータ完成版(2004 年秋公開の build 35)へ対応する予定である。

さらに、本研究で得られたデータを基にして、本研究で用いた方法論のバリデーションを行なうために、既知の腎障害分子メカニズムが発現データに反映されているか否か、あるいは、海外・国内臨床試験成績に差が出たケースについて、我々の腎臓細胞遺伝子発現の人種差データで解釈が可能か否かなどについて、公開・非公開の外部データと照合する作業を予定している。

現状ではヒトプライマリーカルチャーを広く様々な研究へ用いやすい環境が整備されたとは言い難く、プライマリーカルチャーと細胞株のブリッジングが可能であればより好ましいと考え、細胞株との比較解析を試みる予定である。

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・肝細胞を主たる成分とするプライマリーカルチャーを得ることができ、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

□頭発表 3件

原著論文による発表 0件
それ以外(レビュー等)の発表 2件

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

□頭発表 6件
原著論文による発表 31件
それ以外(レビュー等)の発表 6件

発表論文

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
3. その他:なし

研究体制

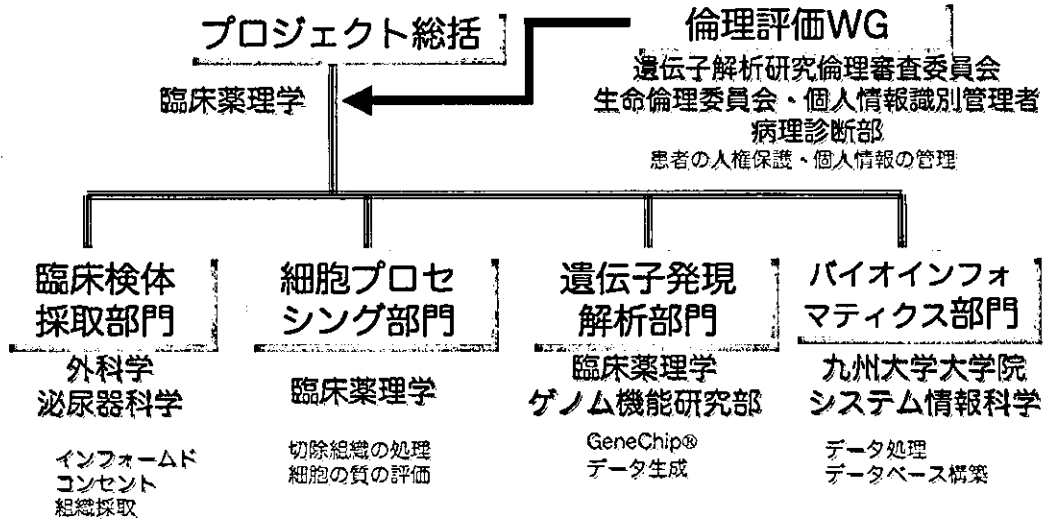


図1. 研究体制

注: バイオインフォマティクス部門分担研究者 篠原は本研究の主要な部分を九州大学大学院システム情報科学において行ったが、本報告書作成中の2005年3月に東北大学大学院情報科学研究科・システム情報科学に異動した。これに伴いデータベースを公開しているサーバーが、本報告書作成時点の2005年3月に九州大学から東北大学への移動途中である。

エントリー症例

腎臓

症例	年齢	性別	診断	温浴血時間 (分)
1	78	男	右尿管腫瘍	12
2	48	男	左腎腫瘍	79
3	46	男	右腎腫瘍	>60
4	73	女	右尿管腫瘍	10
5	63	男	左腎盂腫瘍	...
6	57	男	左腎腫瘍	12
7	35	男	右腎腫瘍	50
8	65	女	腎臓胎瘍	58
9	47	男	左腎腫瘍	48
10	76	男	右腎腫瘍	68
11	61	女	右腎腫瘍	48
12	44	女	左腎腫瘍	80
13	33	男	右腎腫瘍	46
14	71	男	左腎腫瘍	...

肝臓

症例	年齢	性別	診断	温浴血時間 (分)
1	69	女	大腸癌	
2	50	男	大腸癌	
3	64	男	大腸癌	
4	57	男	肝内胆管癌	
5	48	女	乳癌	
6	62	男	大腸癌	
7	55	男	大腸癌	
8	76	男	大腸癌	
9	79	男	大腸癌	
10	77	女	大腸癌	
11	62	男	大腸癌	
12	55	男	胃癌	
13	70	男	大腸癌	
14	77	女	大腸癌	
15	65	女	大腸癌	

図2 エントリー症例

研究参加に賛同いただいた症例は肝臓 15 症例・腎臓 14 症例。主な現疾患は肝臓では大腸癌の肝転移・腎臓では片側腎腫瘍であった。肝臓では肝癌症例の多くが、非癌部も肝硬変のため肝機能異常を来しているため、肝癌の切除症例はエントリーすることがなかった。大腸癌の症例の多くは原発巣である病変部位の大腸切除後に転移が明らかとなったケースであった。一方、腎臓は術前に組織診断が確定しているケースはまれであった。術後は”連結不可匿名化”をしたため、組織診断を症例IDとリンクさせた情報として得ることができなかった。

細胞の由来の評価

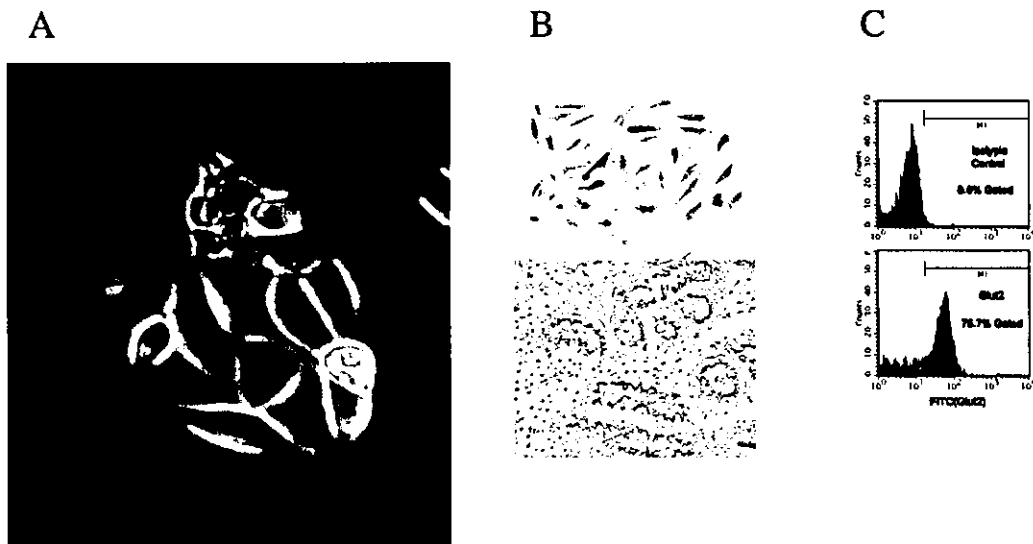


図3 ヒト腎臓プライマリーカルチャーの細胞の由来の評価

腎臓皮質組織を処理して得られた細胞は、A. 形態として上皮由来の細胞として矛盾がなかった。さらに B. gamma-GTP 活性を有していた (B 上パネル)。なお、B 下パネルはラット腎固定切片における gamma-GTP 活性で、gamma-GTP 染色の系が稼働していることを確認する目的でプライマリーカルチャーと同時に染色した。C. Glut-2 発現をフローサイトメトリーにより確認した。上パネルがアイソコントロールで、下パネルが Glut-2 染色である。

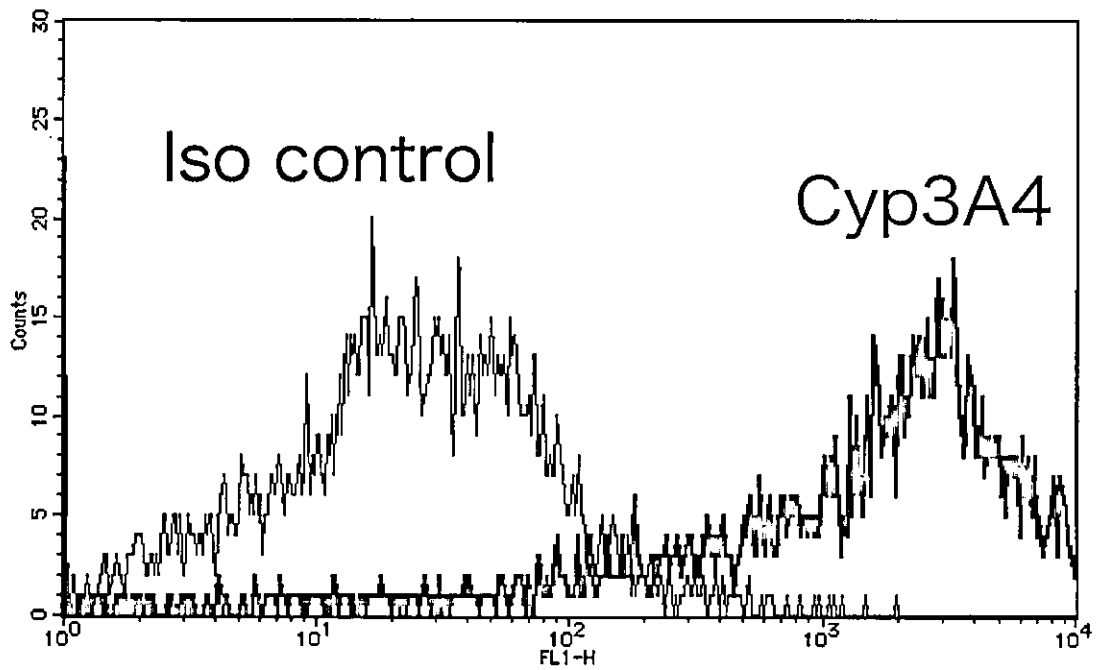


図4 ヒト肝臓由来プライマリーカルチャーの細胞の由来の評価

細胞質 Cyp3A4 発現をフローサイトメトリーにより確認した。横軸は FITC 発光で検出した Cyp3A4 発現量で、縦軸が度数の度数分布として示す。肝臓由来のプライマリーカルチャー細胞の多くが Cyp3A4 を発現しており、肝細胞由来の細胞が多くを占めると考えられた。

凍結融解の遺伝子発現へ及ぼす影響

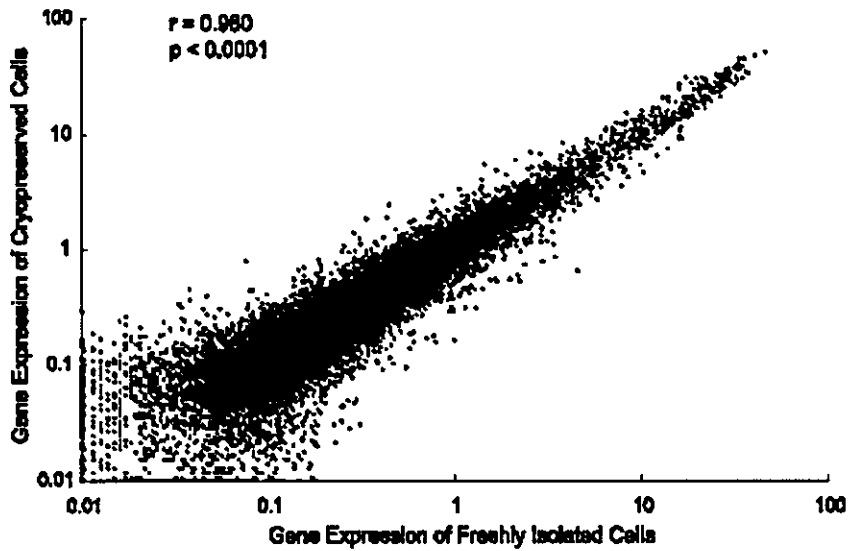


図5 凍結融解が遺伝子発現へ及ぼす影響

ヒト腎臓由来プライマリーカルチャー細胞を凍結保存前(横軸)と凍結保存後、融解させて培養し(縦軸)、遺伝子発現解析を行った。ほぼ同様の遺伝子発現を示しており、凍結融解により多くの遺伝子は有意な影響を受けないと判断された。

日本人腎プライマリーカルチャー細胞の遺伝子発現

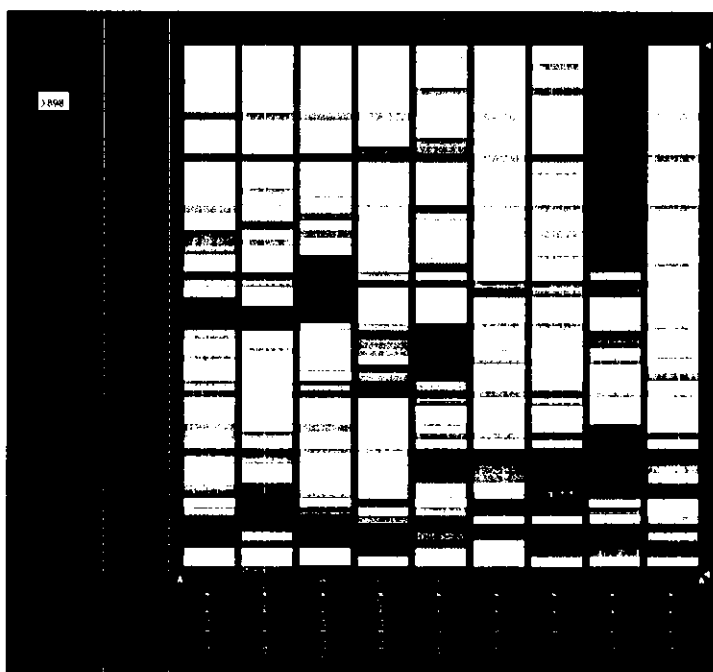


図6 日本人腎プライマリーカルチャー細胞の遺伝子発現

解析された 44,000 トランスクリプトの内、有意水準 $p=0.01$ 以下で個人差有りとして判定されたトランスクリプトは 63 であった。

日本人および輸入腎細胞遺伝子発現

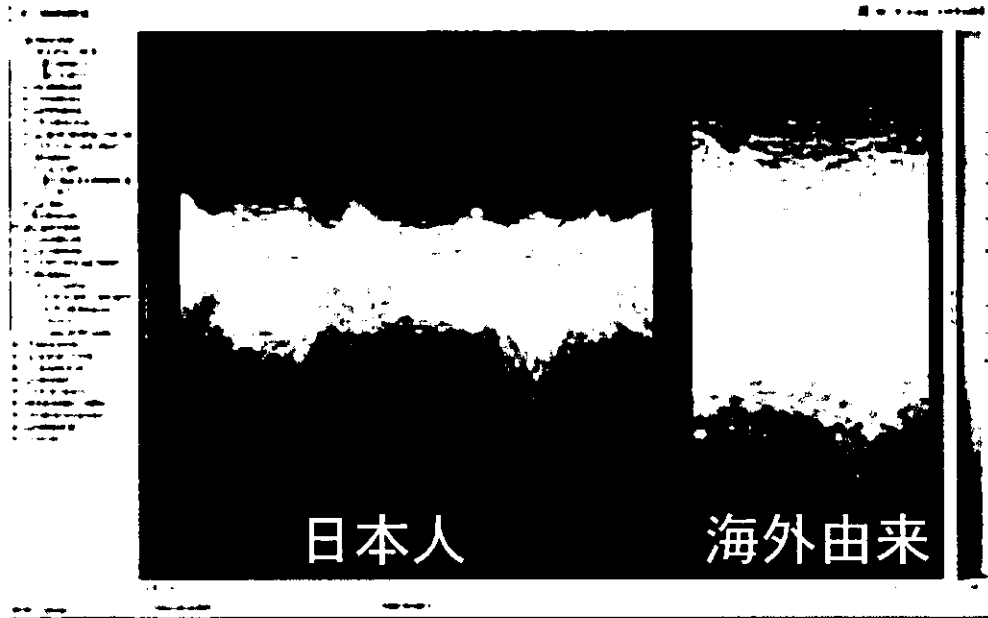


図7 日本人および輸入腎細胞遺伝子発現

我々の調整した腎臓細胞と海外調整済み腎臓細胞における遺伝子発現。両者は同一の手順で調整されたものではないため単純比較には注意が必要である。解析の結果、343トランスクリプトについて両群間で大きな発現量の差があると判定された。発現量の変化が日本人プライマリーカルチャーと比較して輸入腎臓細胞の方が大きい。

解析手順

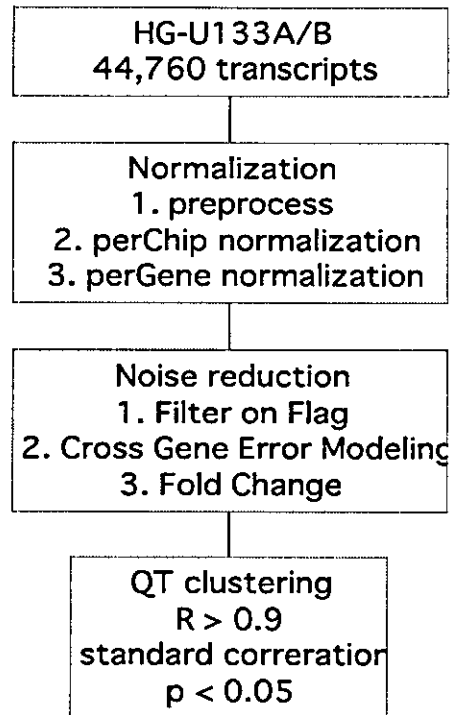


図8解析手順

基礎研究により得た情報を基に当研究部で標準とした解析手順をしめす。

Normalization 1. preprocess では、対数計算を可能とするため、0(0.01未満)とされた発現量を0.01にした。Normalization 2. perChip normalization では、文献上のHouseKeeping Genes を基に per chip ノーマライゼーションを行った。3. perGene normalization では、曝露前値を1として、時間経過後の発現量変化割合を示すように perGene normalization を行った。ノイズリダクションのステップでは、発現量が陽性で、少なくとも3倍程度の発現割合の変化を時間経過中に来したデータのみを解析対象とすることとした。発現量が小さいデータはノイズの影響で発現割合の変化が大きく見積られる擬陽性変化が出やすいためである。

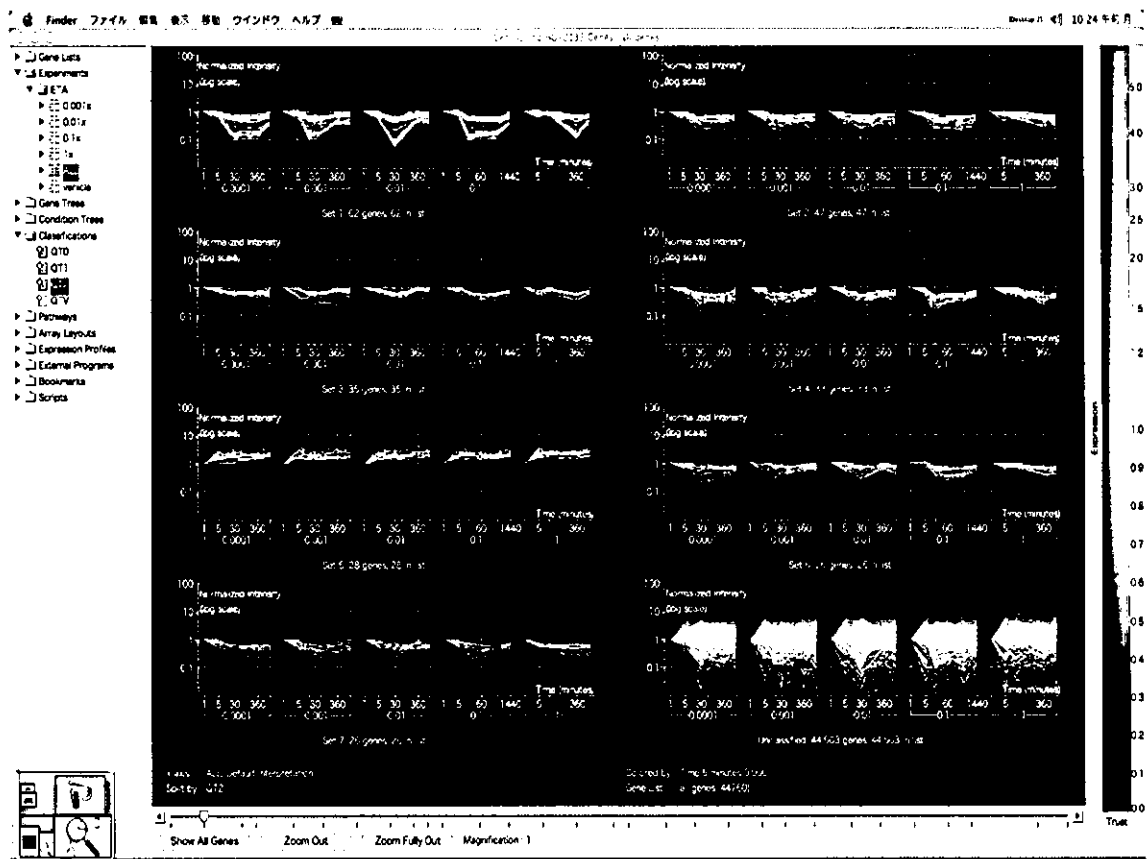


図9 Hormetic Effect

病理学的・生化学的変化を来す濃度よりも低い濃度でも、遺伝子発現変化が検出される場合がある。これを Hormetic Effect と言う。必ずしも濃度依存的とは言えず、高濃度と低濃度で同様の変化が見られるものも少なくない。図の横軸のカテゴリーは濃度、横軸は時間経過、縦軸は発現量を示す。QT clustering により7つのクラスターが得られ、IC50 の 10000 分の 1 の濃度でも IC50 と同様の時間経過による変化を来す遺伝子群があることがわかった。

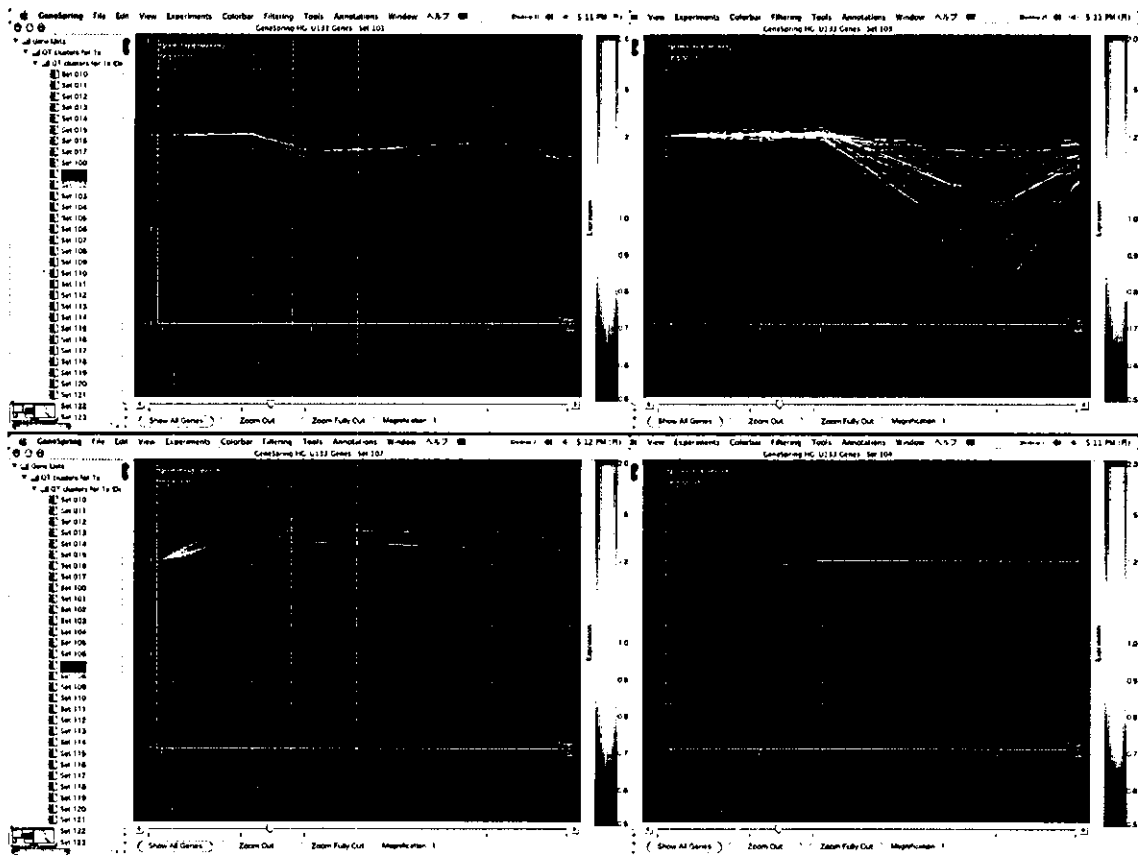


図 10 QT クラスタリング

横軸が時間経過・縦軸が曝露前発現量を1としたときの発現変化の割合。ここでは雰囲気だけを見ていただく目的で、4つのクラスターを示す。それぞれのクラスターには少なくとも10の遺伝子が含まれ、それぞれの発現相同性は統計的手法で有意と判定されたもののみを含む。