

## 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

スキルス胃癌と膵癌は診断も難しく、極めて予後不良であり、新たな視点に立った診断・治療戦略の開発が切望されている。この基礎的並びに臨床的研究には、臨床癌由来の培養細胞が必須のツールとなる。スキルス胃癌由来培養細胞を樹立し、その特性解析を進め、HSC-series のうち3株を寄託した。また、ヒト膵癌由来培養細胞の樹立を試み、安定した増殖を示す10株の樹立に成功した。その生物学的特性や浸潤・転移能などを検討し、異種移植実験モデルとしても基礎研究はもとより、抗がん物質評価系としての有用性を示した。

### A. 研究目的

スキルス胃癌と膵癌は、難治性消化器癌として知られる。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している進行癌であり、リンパ節転移、肝転移、腹膜播腫などの頻度も高く極めて予後不良である。この癌を制御するには、その発生と増殖・進展機構を細胞・分子レベルで解明し、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、並びに既に樹立したスキルス胃癌細胞株の特性解析を進めた。

### 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ため、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% CO<sub>2</sub> 存在下で静置培養を行い、細胞の状態を観察しながら週2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

細胞株の樹立：SCID 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（腺癌由来6

株、管状腺癌由来9株)を選択して植え込み材料とし、培養方法は固形癌に良く利用される組織片培養法による。初代培養の状況は、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、主に次の二通りの経過がみられた。① 植え込み2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。また、② 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、6ヶ月頃より癌細胞が浮遊、ゆっくりと増殖を開始し、コンデション培地等の利用により樹立できた。初代培養期間は78日から長いもので405日を経て、安定した増殖を示すヒト膵癌由来培養細胞10株(Sui-65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -73, -74)の樹立に成功した。この内訳は管状腺癌の6株、腺癌4株である。

特性の解析：増殖形態は単層敷石配列を呈し、倍加時間は23から48時間、腫瘍マーカーはTPAを全ての株で産生しているが、CEA, CA19-9, CA125などは、細胞によって異なっていた。膵癌に関連する癌遺伝子の解析では、k-rasの突然変異は10株中8細胞に認められ、これはcodon12 GGT(Gly)に集中していた。一方、p53の変異は10株中8細胞に認められ、codon133 ATG(Met), codon135 TGC(Cys), codon175CGC(Arg), codon245GGC(Gly), codon248 CGG(Arg), codon253 ACC(Thr)と変化に富んでいた。smad4遺伝子に関しては現在解析中である。

寄託細胞株とその特性：ヒト胃癌由来の3細胞株を寄託した。

#### 1) HSC-59細胞

癌性腹膜炎を併発した胃癌患者(52歳、女性)の腹水中の癌細胞を植え込み、89日間の初代培養を経て継代培養可能となった。免疫不全動物(ヌードマウス、SCIDマウス)への移植で、造腫瘍性を認め、形成された腫瘍の病理組織型は低分化型腺癌に印環細胞癌が混在し、生検での組織型に類似していた。CA19-19, CEA, TPAなど腫瘍マーカーも産生していた。

#### 2) HSC-60細胞

癌性腹膜炎を併発したスキルス胃癌患者(40歳、男性)の腹水中の癌細胞を植え込み、197日の初代培養期間を経て細胞株として樹立した。ヌードマウス皮下への移植により造腫瘍性を認めた。形

成された腫瘍の病理組織型は印環細胞癌であり、生検での組織型に類似していたが、間質細胞は多くなかった。CEAレベルは高くはないがCA19-19, TPAなど腫瘍マーカーも産生していた。

#### 3) HSC-64細胞

癌性腹膜炎を併発した胃癌患者(41歳、女性)の腹水中のがん細胞を植え込み材料とし、73日間の初代培養を経て細胞株を樹立した。細胞形態学的には生検材料の癌細胞と類似しており、典型的な癌細胞であり、in vitroでは、極めて安定した増殖を示した。しかし、ヌードマウス、SCIDマウス並びにNOD-SCIDマウスなどへの度重なる移植でも、造腫瘍性は認められなかった。腫瘍マーカーはCA19-19, CEA, TPAなどいずれも高い発現を示した。

#### D. 考察

これまで数多くの癌細胞株が樹立され、癌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癌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多い。樹立時は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腺癌の組織像を示す例もある。このような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確立を進めることは意義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。これらの研究の為に、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

つであり、継続的な研究として必要と考えられる。

#### E. 結論

ヒト消化器癌の中でも、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、培養細胞 10 株の樹立に成功した。これらの細胞の特性解析を進めている。

#### 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 (寄託細胞の樹立に関する昨年度の論文である)
2. Yanagihara K., Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.* 2005, 96: 323-32.
3. Arao T, Yanagihara K., Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, Nishio ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int J Cancer.* 2006, 118: 483-9.
4. 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, Imai K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 1021-7.
5. Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, Fukaya M, Yanagihara K., Sakamoto H, Yoshida T, Sasaki

H. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.* 2005, 65: 2115-24.

6. Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K., Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M, Hirohashi S. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 2531-9.
7. Namiki Y, Namiki T, Yoshida H, Date M, Yashiro M, Matsumoto K, Nakamura T, Yanagihara K., Tada N, Satoi J, Fujise K. Preclinical study of a "tailor-made" combination of NK4-expressing gene therapy and gefitinib (ZD1839, Iressatrade mark) for disseminated peritoneal scirrhous gastric cancer. *Int J Cancer.* 2005, Oct 4; [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

1. 柳原五吉、西尾和人. 腹膜播種の進展はイメージング解析で定量化できる. 第 14 回日本がん転移学会総会 p53 (大阪、2005)
2. 柳原五吉、落谷孝広、西尾和人、廣橋説雄. 同所性移植モデルを用いたヒトスキルス胃がんの腹膜播種進展過程の解析. 第 64 回日本癌学会学術総会記事 p116 (札幌、2005)
3. 並木禎尚、並木珠、伊藤昌孝、柳原五吉、八代正和、藤瀬清隆. 胃癌における新規光感受性ステルスリポソームの抗腫瘍効果の検討. 第 64 回日本癌学会学術総会記事 p502 (札幌、2005)
4. 柳原五吉、瀧ヶ平美里. 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進展過程の定量的解析. 第 24 回分子病理学研究会支笏湖シンポジウム要旨集 p21 (支笏湖、2005)

#### 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

2005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化に関する研究

分担研究者 永森静志 杏林大学医学部医療学 客員教授

### 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アクター(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とそ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. ヒト肝・胆系細胞資源の利用状況

下記のヒト肝胆由来の腫瘍細胞株は2003年3月から2005年12月までの永森らが樹立し、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)に保存を依頼し、研究、試験、教育等に利用を希望する施設または研究者への細胞分譲状況を示した表である。

JHH: ヒト肝細胞癌由来細胞株、NOZ: ヒト胆のう癌由来細胞株、

OZ：ヒト胆管癌由来細胞株

登録番号細胞名	03年1月～	03年3月～	03年4月～	04年4月～	05年2月～
	03年12月	04年2月	04年2月	05年2月	05年12月
JCRB1062 JHH-1	0	0	0	6	4
JCRB1028 JHH-2	1	1	1	6	2
JCRB0435 JHH-4	5	3	2	4	2
JCRB1029 JHH-5	4	4	3	4	2
JCRB1030 JHH-6	2	2	1	5	2
JCRB1031 JHH-7	4	4	2	4	4
JCRB1033 NOZ	6	6	6	4	5
JCRB1032 OZ	3	4	4	3	6
合計	25	24	19	36	27

1.2 上記細胞株のおもな研究目的

2003年分

- \* JCRB1028 JHH-2 肝細胞癌株における細胞周期と functional p53 の発現との関係
- \* JCRB1435 JHH-4 食品添加物の肝臓の細胞に及ぼす影響について
- \* JCRB1435 JHH-4 肝臓に対する各種薬剤の制癌効果に関する研究
- \* JCRB1029 JHH-5 肝臓に対する各種薬剤の制癌効果に関する研究
- \* JCRB1029 JHH-5 ヒト肝細胞癌発生の基礎研究
- \* JCRB1030 JHH-6 p38MAPK に対する糖尿病新薬 DHEA の影響
- \* JCRB1030 JHH-6 ヒト肝細胞癌発生の基礎研究
- \* JCRB1031 JHH-7 肝細胞癌株における細胞周期と functional p53 の発現との関係
- \* JCRB1031 JHH-7 B型肝炎ウイルスの発癌メカニズムの解明
- \* JCRB1033 NOZ 代謝実験
- \* JCRB1033 NOZ 胆嚢癌におけるカドヘリン発現の研究
- \* JCRB1033 NOZ 胆嚢癌 cell line における homeodomain protein CDX2 の発現を研究する。
- \* JCRB1033 NOZ 癌遺伝子の検索、遺伝子治療研究
- \* JCRB1033 NOZ Development of gene therapy for gall bladder cancer.
- \* JCRB1032 NOZ 胆管癌の遺伝子発現プロファイルの解析
- \* JCRB1032 NOZ 胆管癌に対する自殺遺伝子療法
- \* JCRB1032 NOZ Cholangio carcinoma adenoviral gene therapy.

2004年分

- \* 遺伝子導入実験
- \* 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

- \*胆管上皮の発生・分化についての研究
- \*肝臓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
- \*消化器癌の生物学的解析
- \*JHH-1 の分泌するコラーゲンの分析
- \*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
- \*胆管系癌に対する抗癌剤感受性試験
- \*胆嚢がん細胞株に対する分子標的薬の効果
- \*癌遺伝子の解析
- \*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
- \*癌ゲノム異常解析
- \*Genetic research, screening for homologous deletion Investigation of the expression of hepatic transporters

2005 年分

- \*JCRB1033 胆嚢癌における血管新生分子の網羅的解析
- \*JCRB1029 HBV の研究に使用
- \*JCRB1031 HBV の研究に使用
- \*JCRB0435 消化器癌の生物学的解析
- \*JCRB1031 消化器癌の生物学的解析
- \*JCRB1062 消化器癌の生物学的解析
- \*JCRB1032 肝内胆管癌細胞株の特定遺伝子の発現を調べる
- \*JCRB1032 膵癌・胆道癌の抗癌剤感受性規定因子の探索
- \*JCRB1033 膵癌・胆道癌の抗癌剤感受性規定因子の探索
- \*JCRB1033 胆嚢癌、癌遺伝子スクリーニング
- \*JCRB0435 肝炎ウイルス感染の解析
- \*JCRB1062 肝炎ウイルス感染の解析
- \*JCRB1033 K-ras mutation check (PCR-RFLP 法)に対する positive-negative control に使用
- \*JCRB1031 マウスへの移植実験
- \*JCRB1032 細胞周期にかかわる糖鎖転移酵素の解析
- \*JCRB1028 肝癌肝細胞の同定
- \*JCRB1030 肝癌肝細胞の同定
- \*JCRB1062 肝細胞癌の機序解明
- \*JCRB1028 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討
- \*JCRB1029 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討
- \*JCRB1030 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討
- \*JCRB1031 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討

- \*JCRB1062 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討
- \*JCRB1032 Investigation of prognostic factor of gallbladder carcinoma
- \*JCRB1033 Investigation of prognostic factor of gallbladder carcinoma
- \*JCRB1032basic research
- \*JCRB1032 Testing cytotoxic activity of new chemical entities on bile duct carcinoma

## 2. 分与した細胞株での代表研究例（JHH-4 の無血清株 FLC-4 利用研究例）

樹立した高機能保持ヒト由来肝細胞と新しく開発した培養細胞機能をより高めることができるバイオ人工肝による3次元培養法との結合システムをつくり薬物の有効性と安全性の評価法を新しく確立し、それぞれの専門施設と共同でそれらの基準システムとなることを目指した。以下に共同研究によりヒト肝由来細胞株の多機能性を示す。

肝機能の亢進の試み：HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現

名古屋大学農芸化学科の小田裕昭博士と永森らが開発したラジアルフローバイオリアクター（RFB）で培養された FLC-4 細胞においても、HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現が増強するか調べ、肝細胞は立体化することによって、その分化表現型を高く維持することができた。したがって3次元的に細胞形態が変化することであることが明らかとなった。

ヒト培養肝細胞系を用いた酵素誘導：CES 遺伝子の発現調節機構

千葉大学薬学部の千葉 寛、細川正清博士らと RFB を用いたヒト肝がん由来細胞の三次元培養法により *in vivo* に近い薬物代謝および酵素誘導の *in vitro* 評価系として有用であると考えられた。

薬物輸送系の評価：バイオリアクター上の FLC4 における輸送系 L トランスポーターの解析  
L トランスポーター

杏林大学医学部薬理学の遠藤 仁、金井克好博士らと、FLC4 から抽出した poly(A)<sup>+</sup>RNA を用いて発現クローニングを行い、単一 cDNA を単離した。さらに、単離した cDNA を用いて、FLC4 のアミノ酸系 L の分子実体を明らかにし、その構造的及び機能的特性を解析した。

輸送系 L の分子実体に関しては、2つのアイソフォーム（LAT1 及び LAT2）が存在することをすでに明らかにしている。これらは、ともに輸送系 L の古典的阻害薬 BCH 及び上記新規阻害薬 KYT0193 によって抑制される。ヒト膀胱癌由来 T24 細胞に代表される一般の培養細胞には、LAT1 のみが発現する。これに対して FLC4 細胞の輸送系 L は、BCH によって抑制されるが、KYT0193 では抑制されない未知の（LAT1 でも LAT2 でもない）輸送系 L トランスポーターを有することが研究の成果に基づき結論された。

抗ウイルス薬評価系の開発

RFB培養系を利用してC型肝炎ウイルス（HCV）の持続的増殖系を樹立して、抗ウイルス薬の評価法を開発することを目的とした。

永森は国立感染症研究所ウイルス第2部の宮村達夫、鈴木哲朗博士らと、ヒト肝由来細胞株 FLC-4 にこの HCV の患者血清と合成 RNA を導入して RFB 培養を行った。FLC 細胞とラジア

ルフローバイオリアクターを用いて、HCV の *in vitro* での、大量培養に成功した。

#### レプリコン細胞における細胞増殖変化の解析

京都大学医学部ウイルス研究所所長下遠野那忠博士らに依頼し、現在までのところ Huh7 細胞に導入した HCV 部分ゲノムは効率よく自己複製していることが確認できている。

そこで、本細胞については HCV 蛋白質の発現による細胞の増殖特性がどのように変化するかを中心に解析。FLC4 細胞における HCV ゲノム複製細胞の樹立を行っている。

#### ヒト型の遺伝毒性試験法の確立

国立医薬品食品衛生研究所の本間正充博士には、FLC 系細胞を元にして、誘発性遺伝子突然変異頻度と、変異体の遺伝子解析を行った依頼した。

1) 小核試験: FLC4 および HepG2 細胞を用いて *in vitro* 小核試験を試みた。FLC4 細胞の遺伝的不安定性が示唆された。FLC4 細胞、HepG2 細胞とも代謝活性化が必要ない MMC、MMS に対しては用量依存的な細胞毒性と、小核の誘発が認められた。

2) 遺伝子突然変異の検出: 遺伝子突然変異試験用に樹立されたトランスジェニック FLC4- $\lambda$ 13 細胞より DNA を抽出した。cII 遺伝子をターゲットとした自然突然変異体プラークの出現頻度は  $12.7 \times 10^{-3}$  と極めて高く、これはマウスでのトランスジーンにおける自然突然変異頻度の 100 倍に相当した。この細胞を MNNG によって処理し、誘発性突然変異頻度を観察したところ、これに対し、突然変異は 20~30 倍誘発された。

#### D. 考察

1. ヒト肝・胆系細胞の保有する機能を樹立培養細胞株のなかに存在することを証明した。これらの特徴を利用して多くの研究者に利用され始めた。細胞バンクに登録した十株以上の細胞は、今後さらにその培養時の安定な性格よりより多くの研究目的に利用されるであろう。これらを追跡し利用範囲を調査し、詳細な報告書の作成が次に待たれる。

2 & 3. ヒト肝・胆系細胞の機能発現は、培養時 3 次元の展開があつて初めて、その機能発現が増強される。適切な培養環境は立体的構築のほか、結合した細胞間の培養液の栄養や酸素が均等に流通し、重力加重が平均化された状況、すなわちラジアルフロー型バイオリアクターが機能の維持と長期培養が可能な培養方法として優れていると考えられる。

#### E. 結論

ヒト肝細胞由来の樹立株細胞は、その培養環境の改善を行うことにより、多くの正常細胞が本来保有していた機能を発現する。

とくに、3 次元的展開により培養を行う、ラジアルフロー型バイオリアクターとの組み合わせは優れた培養方法である。

#### F. 健康危険情報

特になし。



## G. 研究発表

---

1. Tsuboi S, Y, Nagamori S, et al., Anti-endostatin monoclonal antibody enhances growth of human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activity of endostatin secreted by the transplanted cells in nude mice.

Int J Oncol. 2004 ;25:1267-71.

2. Akiyama I, Nagamori S, et al., Expression of CYP3A4 by an immortalized human hepatocyte line in a three-dimensional culture using a radial-flow bioreactor. Int J Mol Med. 2004;14:663-8.

3. Miyazaki M, Nagamori S, Huh NH. et al., Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Res. 2004, 15;64:4155-61

## H. 知的財産権の出願・登録状況

---

発明の名称：肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

発明者：永森静志

出願人：科学技術振興事業団

特許出願日：2002年8月21日

国際出願番号：PCT/JP00/05582

国際特許公開 W001/014517 肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

発明の名称：ハイブリッド型人工肝臓

発明者：永森静志、旭メデカル

---

## ヒト組織の研究資源化に関する研究

分担研究者 小林 真一 聖マリアンナ医科大学 薬理学 教授

### 研究要旨

手術時に摘出した肝臓組織の疾患部位（癌部位）および非疾患部位（正常部位）を採取し、肝臓組織から初代肝細胞を単離し培養を行った。この初代肝細胞が生体内の肝機能を反映するかどうか薬物代謝酵素活性やその他の肝特異的転写因子の発現について検討した。初年度は、患者由来の非癌部位における初代肝細胞の単離法の確立を目的とした。二年目は、初代肝細胞の培養条件について比較し、薬物代謝酵素活性の維持を目的とした初代肝細胞の長期培養について検討した。また癌部位組織から癌細胞の単離培養を行い、抗癌薬の効果を評価することを試みた。その結果患者の病態、肝臓組織の摘出部位そして培養条件により薬物代謝酵素活性に影響を与えることがわかった。最終年度は、これまで得られた結果から、患者由来初代肝細胞の最適な培養条件を評価し、細胞生存率が高く、生体内の肝機能を反映した質の高い肝細胞を維持する培養システムを構築した。

#### A. 研究目的

本研究はヒト組織提供医療機関としての学内ヒト組織バンクシステムを構築し、さらにヒト組織の研究資源化を目的とした検討を行ってきた。そこで聖マリアンナ医科大学（以下、本学）病院において、肝癌および肝疾患の外科手術適応患者より文書で同意を得て、手術時に摘出した肝臓組織の疾患部位（癌部位）および非疾患部位（正常部位）の一部を採取し、初代肝細胞の培養法を検討している。この肝細胞を利用して、抗癌薬またはその他の薬物に対する効果を評価することを最終目的として、この初代肝細胞が生体内の肝機能をどの程度反映するか、薬物代謝酵素活性やその他の肝特異的転写因子の発現を指標として最適な培養条件を

検討した。つまり薬物の効果・副作用などの研究可能な肝臓組織の機能を維持した質の高い、生存率の高い細胞を維持する培養システムを構築し、将来的には病態背景を伴った初代肝細胞を細胞バンクへ供給することを目指している。

#### B. 研究方法

##### （非癌部位肝臓組織の初代培養）

外科手術室で採取した患者肝臓組織は氷冷培養液（HANK'S）に入れ一時保存し、直ちに肝臓組織を37℃の灌流液で脱血処理し、温浴下でコラゲナーゼ酵素処理を行った。単離した初代肝細胞は、フィルターで不純物を除去した後遠心し、混入した赤血球を溶血剤で除去し洗浄した。肝細胞は無血清 William's E 培地に浮遊さ

せ細胞数を算定した。細胞数を  $5 \times 10^5/\text{ml}$  に調整し、コラーゲンコーティング 24 穴プレートにて、 $37^\circ\text{C}5\%\text{CO}_2$  下で培養した。

初代肝細胞は 24 時間静置後、William's E 培地に様々な成長因子 (EGF, insulin, etc) を添加したものを基礎培地とし、さらに 10%FCS 添加群、10%ヒト血清添加群、ランフォード培地 (日水製薬提供) 群の 4 群で培養を行い経過観察した。

(肝薬物代謝酵素および肝特異的転写因子の発現)

初代肝細胞は経時的 (Day0, 1, 3, 5, 7) に回収し、肝機能の指標として薬物代謝酵素である CYP3A4 の蛋白発現について検討した。肝細胞 CYP3A4 mRNA 発現は RT-PCR 法で解析した。また、CYP3A4 活性はルシフェラーゼ発光法で測定した。Albumin mRNA の発現、薬物トランスポーター (P 糖蛋白) の発現についてもあわせて検討した。

(癌部位肝組織の初代培養)

採取した癌部位の肝組織は氷冷培養液 (HANK'S) に入れ一時保存した。抗生物質添加 HANK'S 内で 1 時間静置後、組織を細切した。組織はフィルターで不純物を除去した後遠心した。回収した細胞は算定後 10%FCS 添加 DMEM 液で培養した。

(倫理面への配慮)

本研究は、三省共同のガイドライン「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則した本学の生命倫理委員会で審査、承認後、これらの倫理指針に準拠して行った。治療目的で外科手術により肝組織の切除を受ける患者を対象とし、事前に臨床試

験コーディネーターが十分な補助説明をした後、文書による同意を得た。患者の個人情報 は個人情報管理者を置き、連結可能または不可能匿名化を行い、個人情報の厳密な管理を行った。

## C. 研究結果

### 1) 患者由来肝細胞培養法の確立

本年度は、患者 5 例 (女性 2 名、男性 2 名、年齢  $58.5 \pm 15.3$  歳; 原発性肝癌 2 例、転移性肝癌 2 例、肝腫瘍 1 例) より採取した肝組織を初代肝細胞培養に使用した。過去 3 年間の肝組織取得状況は、表 1 に示す。採取した肝組織は、病理医の協力のもと病理診断に用いる部分を除いた残余部分を研究に使用し、約 1g から 5 g を培養に用いることが出来た。

初代肝細胞の長期培養を可能にするため細胞単離方法の改良を行い、cell viability 90%以上の確保が可能になった。薬物代謝酵素活性の維持を目的とした培地条件の検討として、成長維持因子 (EGF, insulin, etc.) 添加 William's E 液を基礎培地とした無血清群、10%FCS 添加群、10%ヒト血清添加群および新しくランフォード培地 (日水製薬より提供) 群を加え、それぞれ培養し経過観察した。10%FCS 添加群、10%ヒト血清 (HS) 添加群では培養 3 日目より形態的に変化が生じたが、無血清群およびランフォード培地群は肝細胞の形態を維持していた (図 1)。

### 2) 薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現

初代肝細胞の薬物代謝酵素 (CYP3A4) 活性、mRNA および蛋白発現を検討した。単離直後の初代培養肝細胞は、どの培地で培養しても、同じ患者の肝組織中の

CYP3A4 mRNA および蛋白発現とほぼ同程度発現していた。無血清群およびランフォード培地群では、CYP3A4 蛋白発現は、7日目まで維持されていたが、FCS および HS 添加群は培養3日目からともに低下した。CYP3A4 活性も蛋白発現の結果と同様の傾向を示した。

### 3) 肝機能指標因子および薬物トランスポーターの発現

肝機能の指標となる Albumin の mRNA 発現を検討した。4種類の培地で培養しても、培養1日目、3日目まで培養開始(day0)と同程度に Albumin mRNA は発現していた(図2)。肝特異的転写因子である Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) 4 $\alpha$  蛋白発現は培養1日目で、いずれの培地においても発現していた。しかし FCS および HS 添加群では3日目より減弱する傾向が見られた。無血清群およびランフォード培地群は、HNF4 $\alpha$  蛋白発現が7日目まで維持されていた。薬物トランスポーターである P 糖蛋白発現は4群の培養条件で5日目まで同程度の発現が見られた。

### 2) 癌部位肝組織の初代培養

癌部位の細胞培養は、転移性肝癌の手術を受けた患者1例で試みたが、癌細胞株が樹立されなかった。

## D. 考察

ヒト初代肝細胞培養の確立は、薬物の効果・副作用などの評価のための研究に必須である。本研究では初代肝細胞の長期培養を目指し、生体内の肝機能を反映した細胞の培養法を確立することを目的とした。患者由来の初代肝細胞の樹立は、患者の病態によって肝組織自体の機能低下が著しくま

たは高齢による肝の線維化を認めたときは、細胞の生存率は低く肝薬物代謝酵素活性も低い。しかし患者の病態を反映した患者由来肝細胞の確立が将来のテーラーメイド医療につながることは間違いない。

ヒト肝臓癌などの手術件数は、年々増加傾向にあるが、現在培養を行う肝組織は非感染症 (HIV, HBV, HCV 等) 組織に限定しており、疫学的にも感染症が大半を占める肝臓癌では、培養に使用できる肝組織の例数は少ない(表1)。

本研究では、初代肝細胞の単離法を検討し、これまで問題となっていた薬物代謝酵素 CYP3A4 活性の減少を克服し、数日間 CYP3A4 活性を維持した細胞を得ることが出来た。またこの初代肝細胞は、アルブミン mRNA を発現し、薬物排泄に関わる薬物トランスポーターの P 糖蛋白も発現していることから、今後薬効評価に使用できると考える。今回検討した培養条件では、無血清培地またはランフォード培地を用いた方法が最適と考えられた。これまで得られた初代肝細胞がいずれも7日目には減少するため、継代培養は不可能であり、今後は患者の病態を反映した肝細胞の不活化を行う必要性を感じた。しかし、今回検討した初代培養肝細胞は、患者が将来、薬物治療を行う時の、薬物の効果・毒性を評価するための研究資源として十分であると考えられた。

また癌細胞の初代培養は、癌組織の病態(壊死を含む)にかなり左右されるため、現状では樹立が困難であるが、樹立可能な細胞株については、各種抗癌薬の効果を評価するシステムを確立して行く予定である。

## E. 結論

本大学病院で肝臓癌および胆管癌などで手術を受けた患者 21 例(3 年間総数)の切除肝から、肝細胞初代培養を施行した。初代培養肝細胞の肝機能および薬物代謝酵素の活性維持を目的とした培養条件は無血清培地またはランフォード培地を用いることで研究に使用可能な初代肝細胞が得られた。今後は感染症を持つ肝組織での初代肝細胞の培養と病態別の患者由来肝細胞の不死化細胞株の樹立も考慮に入れ検討することが必要であると考えた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

(学会発表)

1. 松本直樹、熊井俊夫、中谷祥子、櫻井志穂子、武半優子、田中正巳、渡辺実、谷口良子、神尾浩司、小林真一、大坪毅人。ヒト組織供給機関としてのバンクシステム構築。第 78 回日本薬理学会年会。
2. 武半優子、関根進、熊井俊夫、松本直樹、小林真一。イリノテカンの持続投与における肝細胞癌細胞の P 糖蛋白発現およびアポトーシスに及ぼす影響。第 78 回日本薬理学会年会。
3. 武半優子、熊井俊夫、渡辺実、関根進、松本直樹、小林真一。肝薬物代謝酵素 CYP 3A7 遺伝子発現調節における癌抑制遺伝子 p53 の関与について。第 12 回 HAB 研究機構学術年会。

4. 武半優子、熊井俊夫、関根進、松本直樹、小林真一。ヒト肝細胞癌細胞における p53 を介したイリノテカンのアポトーシス機序の解析。第 112 回に日本薬理学会。関東部会。

5. 武半優子、熊井俊夫、中谷祥子、渡辺実、櫻井史穂子、松本直樹、小林真一。ヒト初代肝細胞の培養条件の違いによる薬物代謝酵素 CYP3A4 活性および肝機能維持に関する検討。第 26 回日本臨床薬理学会年会

6. 熊井俊夫、中谷祥子、武半優子、櫻井志穂子、向後二郎、都築慶光、田中正巳、中野浩、高木正之、大坪毅人、田所衛、小林真一。学内ヒト組織バンクシステムの基盤整備と効率の良い組織提供について－診断病理部門の関与－。第 26 回日本臨床薬理学会年会。

(論文発表)

1. イリノテカン活性代謝物 SN-38 によるヒト肝細胞癌株細胞 Huh7 のアポトーシスおよび薬物耐性への影響。関根進、武半優子、熊井俊夫、松本直樹、小橋優、小林真一。聖マリアンナ医科大学雑誌 33 : 445-454, 2005.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

特になし

平成	原発性 肝細胞 癌	胆管癌	転移性 肝癌	その他 (肝腫 瘍)	合計	平均年齢
15年度	2	2	1	0	5	58.0±17.5
16年度	3	3	3	2	11	61.4±12.3
17年度	2	0	2	1	5	58.5±15.3

表1 患者由来初代肝細胞培養の背景

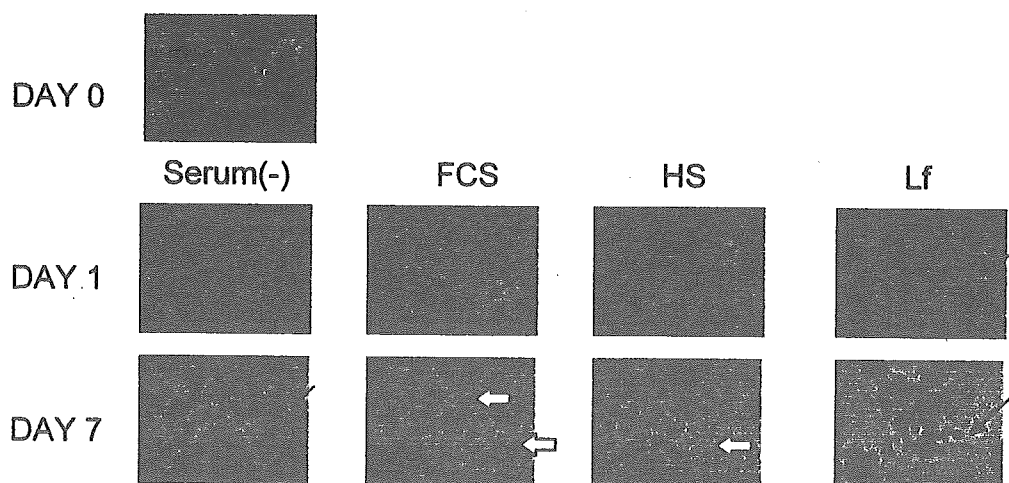


図1 培養条件の違いによる初代肝細胞の形態変化

Serum(-): 無血清培地 FCS: FCS添加培地 HS: HS添加群 Lf: ランフォード培地  
矢印←: ヒト肝細胞。 ←は肝細胞から線維芽細胞に形態変化した細胞

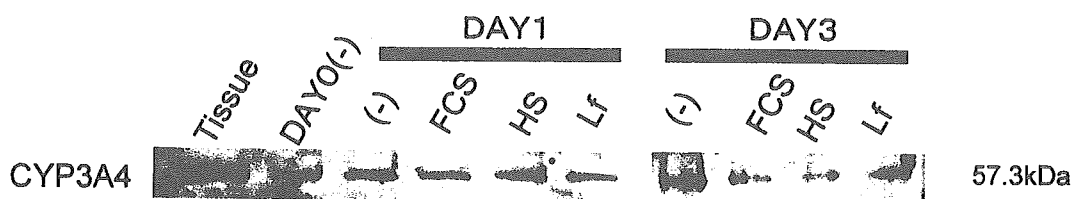


図2 初代肝細胞におけるCYP3A4の蛋白発現

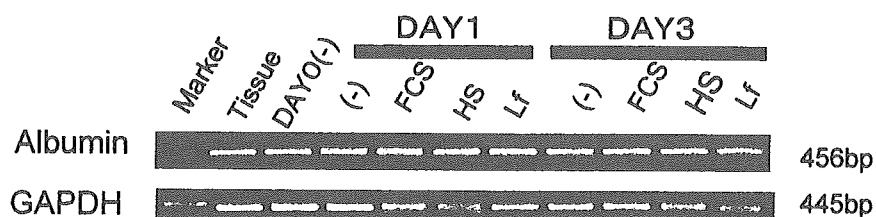


図3 初代肝細胞におけるAlbuminのmRNAの発現