

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性・安全性に関する研究

創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（総合研究報告）

所 属 大阪大学大学院医学系研究科
研究者 松浦 成昭
研究期間 平成 16 年 4 月～18 年 3 月

研究要旨 ラットおよびマウスの組織を用いて、ヒトの手術をシミュレーションして、血管処理による虚血時間、手術操作、摘出から処理までの時間、保存時間等が DNA、mRNA、タンパク質、酵素活性に与える影響を検討した。その結果、総タンパク質量、酵素活性は摘出後 12 時間までは手術操作、血管の結紮の有無および虚血時間、摘出後室温状態・氷冷状態等の影響をほとんど受けなかった。RNA レベルについては摘出後 3 時間までか保存液中で 6 時間までの間に液体窒素で凍結すれば、大きな活性低下がない可能性が示された。また、個々の細胞をばらばらにして使用するよりも、細胞間の接着性あるいは基底膜などとの相互作用を保持した状態の方が、高い viability を有することが明らかとなった。

分担研究者

- | | |
|----------------------|-------|
| (1) 大阪大学大学院医学系研究科 | 門田守人 |
| (2) 大阪大学大学院医学系研究科 | 吉川秀樹 |
| (3) 大阪大学大学院医学系研究科 | 澤 芳樹 |
| (4) 東北大学大学院医学系研究科 | 堀井 明 |
| (5) 山形大学医学部 | 倉智博久 |
| (6) 東京大学大学院医学系研究科 | 名川弘一 |
| (7) 東京慈恵会医科大学 | 清田 浩 |
| (8) 東海大学医学部 | 加藤俊一 |
| (9) 京都大学大学院医学研究科 | 嶋田 裕 |
| (10) 近畿大学医学部 | 塩崎 均 |
| (11) 大阪市立大学医学部 | 平川弘聖 |
| (12) 大阪府立成人病センター | 石川 治 |
| (13) 箕面市立病院 | 吉川宣輝 |
| (14) NTT西日本大阪病院 | 門田卓士 |
| (15) 労働福祉事業団関西労災病院 | 富田尚裕 |
| (16) 大阪けいさつ病院 | 辻本正彦 |
| (17) ヒューマンサイエンス振興財団 | 澤田秀和 |
| (18) 国立病院機構大阪医療センター | 辻仲利政 |
| (19) 国立病院機構長崎医療センター | 鬼塚伸也 |
| (20) カルナバイオサイエンス株式会社 | 吉野公一郎 |
| (21) シスメックス株式会社 | 石原英幹 |
| (22) アンジェス MG 株式会社 | 玄番岳践 |
| (23) 株式会社カルディオ | 倉田寛一 |

A. 研究目的

本研究は手術あるいは病理剖検時に得られるヒトの新鮮組織を用いることにより、薬物の有効性、安全性を評価する方法を検討していくものである。また、すでに設立されているヒト組織のバンクの効率的な運用をめざして、産学共同のネットワーク・システム作りを企図するものである。

医薬品、臨床検査法の研究開発において、ヒトと動物の間に薬物の代謝や反応性に相違が見られ、動物を用いた薬理試験等の結果が必ずしもヒトに適合しないことがあり、ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性の検討は欠かせない。本研究により、人体に対する薬物の作用や代謝機序の正確な把握が可能となることから、無用な臨床試験や動物実験の排除、被験者の保護に充分配慮した臨床試験の実施が期待できるとともに、薬物相互作用の予測も可能となる。また、このように、新薬開発を効率化するだけでなく、直接的にヒトの病変部位を用いることによって、疾病メカニズムの解明や治療方法、診断方法の開発などに大きく貢献できるものと期待される。

ヒト組織新鮮材料の提供に当たり、通常は手術で摘出された臓器の一部が当てられることになるが、理想的な状態で材料を採取することは多くの場合、困難である。すなわち、ヒト組織材料は止血を初めとする種々の手術操作による影響を免れないし、手術で摘出されてからも、本人あるいは家族に対する手術の説明に使用されたり、病理検査で病変を確認するための種々のプロセスを経てから採取されたりすることで、かなりの時間が経過することになる。本研究の目的は手術で摘出された臓器からのサンプルがヒト組織材料としてどの程度の質が保証されるのかを明らかにするものである。すなわち、手術操作の影響をどの程度に受けるのか、また摘出されてからの時間経過として、どれくらいまで組織材料が利用可能であるかを検討することにより、今後のヒト組織バンクの効率的な運用の一助になることを期待するものである。また、新鮮組織のほか過去に過去の手術サンプルでホルマ

リン固定パラフィン包埋された標本についても使用可能かどうかを検討する。

B. 研究方法

手術標本からの組織材料の採取に際して、手術操作の影響、血管処理による虚血時間、摘出から処理するまでの時間経過、保存時間など手術や術後の影響はどの程度あるのか、タンパク質、mRNA、DNA レベルに分けて検討した。今回は大部分の検討についてラットおよびマウス組織を用いて、ヒトの手術をシミュレーションして検討をおこなった。また、剖検材料から研究の目的とするタンパク質、mRNA、DNA を得ることが出来るかどうか、基礎的検討を行った。さらに生検組織について手術摘出材料との比較を行った。また、ラットおよびハムスターの骨格筋から筋細胞を分離、培養する際に、トリプシン・EDTAを用いて細胞をばらばらにしたものを使用する場合と、温度応答性皿のシステムを用いて、プロテアーゼ等を用いず、細胞間の接着性、基底膜との接着性を保った状態で使用する場合の種々の viability についても検討を行った。

また、本ヒューマンサイエンス総合研究において関連した研究を行っている小林真一研究班の班会議、公開シンポジウムに参加し、意見交換を行った。さらに、ヒト組織を用いる研究を実施する研究者および提供する方と考えられる外科医にインタビューを実施し、意見交換を行った。

(倫理面への配慮)

これらの研究はヒト組織を用いる場合、インフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の承認が必要であるが、現段階では倫理委員会の承認を得ていないので、大部分は動物(マウス、ラット)を用いて、手術標本からの組織材料の採取について、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNA がそれぞれどの程度、

傷害を受けるかを検討した。生検組織については分担研究施設・関西労災病院および大阪大学医学部第2外科の協力を得て、検討を行った。これらの施設では倫理委員会の審査で了承された後に、書面による説明で十分なインフォームドコンセントを行い、研究内容の詳細および意義をわかりやすく説明した。

C. 研究成果

1) 手術標本からの組織材料の採取について、手術操作の影響、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNAがそれぞれどの程度、傷害を受けるかをラット、マウスおよび一部ヒトの組織を用いて検討した。ヒトの胃癌、大腸癌、肝癌の手術の調査で、血管を結紮してから摘出するまでの阻血時間は平均1時間程度であることを明らかにしたので、最大阻血時間は2時間とした。総タンパク質量、酵素活性は手術操作、血管の結紮の有無、摘出後の状態(室温・氷冷)の影響をほとんど受けなかった。また、摘出後の時間経過の検討からも大部分の臓器では6時間まで保持された。しかし、膵臓は時間経過とともに活性の低下を認めた。また、膵臓以外は死後3時間までの摘出で活性の低下は見られなかった。一方、DNAは12時間以内であれば、RNAは3時間以内であれば、大きな差を認めなかった。このことから、摘出後、3時間くらいまでに液体窒素で凍結すれば、材料として大きな活性低下がない可能性が示唆された。ラットおよびハムスターの骨格筋から分離した筋細胞の培養系からのタンパク質、遺伝子レベルの検討では、温度応答性培養皿を用いて、細胞間あるいは細胞・細胞外基質間の接着性を保持した状態の方が、発現レベルが高いことを示された。

剖検材料についても同様に癌胎児性抗原(CEA)を例に検討した。剖検材料は死亡直前の状態に大きく左右されるが、タンパク質やDNAレベルはおおむね保たれており、多くの場合、解析が可能であった。mRNAレベルは一般的には解析困難であるが、死後1時間程度ではRT-PCRで解析可能であった。

生検標本はタンパク質、DNAは良好に得られたが、mRNAは短時間で凍結しない限り、大幅な活性低下を認めた。また、凍結からもどす時にRNaseの阻害剤を用いない場合は活性低下が見られた。生検標本は小さなサンプルで温度の影響を受けやすく、そのために種々の要因で活性低下がおこると考えられた。小サンプルは取扱いに慎重さを要すると考えられた。mRNAについて小サンプルの保存を種々の条件でさらに検討したところ、摘出1時間以内にRNAlaterなどの保存液に入れて4℃で保存するか、-20℃以下で凍結すればかなり良好なmRNAが得られることが明らかとなった。また、検討するmRNAも_アクチンのようにどの細胞にもかなりの量が存在する物は大きな変化を受けにくい、相対的に少量の分子は注意が必要であった。ヒト組織摘出にあたり手術中には血管を結紮して血行が遮断されるので、血行遮断時間を調査した。胃癌、大腸癌、肝臓癌の手術でそれぞれ平均1時間程度の血流途絶の状態が起こっているという結果が得られた。しかし、虚血時間は術式にもよるので、さらに細かい検討が必要である。

将来ヒト組織バンクの扱うサンプルの中には過去のホルマリン固定パラフィン標本も対象になる可能性がある。ホルマリン固定パラフィン標本はホルマリンと言う変性剤、アルコール・キシレンの有機溶媒、約60℃の熱、

そして液体のパラフィンとタンパク質や核酸の保存にとっては問題になる因子が多数含まれている。しかし、一方では過去の標本の組織構造は保持されており、多くの場合、免疫組織化学的に種々のタンパク質も検出されている。そこで、ホルマリン固定パラフィン標本が条件によってどの程度使用可能かの検討を行った。その結果、ホルマリン固定時間が少なくとも3日以内で有機溶媒、熱、液体のパラフィンの中にある時間が一晚程度であれば、多くの場合免疫組織化学的にタンパク質を検出することは可能であった。さらに、抽出バッファーや方法を工夫すればウェスタン法によるタンパク質の検出も可能であった。mRNAについては容易ではないが、3時間以内のホルマリン固定時間なら抽出は可能であった。DNAは3日のホルマリン固定まで抽出できた。ホルマリン固定パラフィン標本を対象にできれば過去のストックを利用できるので、制限はあるが考慮すべき点であると考えられる。

2) 組織バンクの扱うサンプルの中に血液細胞、骨髄細胞、さらに未分化幹細胞が重要な1つの群を形成すると考えられる。血液細胞を材料に細胞表面抗原である接着分子およびCD16の発現をフローサイトメトリーで測定した。定性的には採取後48時間程度でもヒストグラムパターンには大きな変化は見られなかったが、定量性が必要な場合には短時間のプロセスが必要であると考えられた。

3) インフォームドコンセントの取得の点において、臓器を摘出する側の外科医から説明の難しさが指摘された。病気や手術に関して気持ちが落ち着かない手術前の比較的短時間の説明で、ヒト組織バンクの意義についての説明を十分に理解させるのはかなり難しいのではないかという意見が多く見られた。手術前に十分な説明を行わずに、臓器を組織バンクの目的でプロセスすることは出来ないため、その説明を容易にするためのマニュアルが必要であるという意見も多かった。また、

摘出臓器の量的な妥当性、その一部を組織バンクに回すことが患者の診断上、不利益を被らないかどうかの判断を公平にする役割を病理医に求めるべきであるという指摘も見られた。小林真一グループの会議では、一般参加の患者サイドからの疑問の声が多く寄せられ、インフォームドコンセントを得る際の、組織バンク事業の必要性を世間的に啓発していくことが重要であると考えられた。

D. 考察

手術標本からの組織材料については一般的にはタンパク質レベル、酵素の活性、DNAレベルの解析は手術後12時間くらいは安定であり、十分に行えると考えられた。手術手技や阻血影響は予想より少ない結果が得られた。一方、mRNAレベルは3時間程度までは問題なかったが、条件に左右されることが多く、今後の課題と考えられた。骨格筋を用いた検討から、細胞単位で分子培養すると細胞間・細胞基質間の接着性を保持した状態よりもタンパク質、mRNAの発現レベルが著明に減少する可能性があり、注意を要すると考えられた。剖検材料もタンパク質レベル、DNAレベルの解析は十分に行えると考えられた。生検標本からのmRNAは取扱いに慎重さを要し、小サンプルの場合の難しさを示していた。また目的とする分子が_アクチンのように多量に含まれているか、少量の物質かによっても異なる可能性が考えられた。

ヒト組織を医薬品の研究開発に用いる場合、提供者である患者より得るインフォームドコンセントの難しさが指摘された。ヒト組織バンク事業の必要性の理解を世間的に十分に啓発していく必要が感じられた。

E. 結論

手術標本からの組織材料の採取について、手術操作の影響、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNAがそれぞれどの程度、傷害を受けるかをマウス・ラットの種々の組織を用いて検討した。

1) 総タンパク質量、酵素活性は血管の結紮の有無、摘出後室温状態・氷冷状態、摘出後時間(3時間まで)の影響をほとんど受け

なかった。脾臓のみが死後（3時間）摘出で低下を認めた。

2) DNAは摘出後12時間で、RNAは3時間で低下を認めた。

3) ヒト組織からのRNA抽出は室温では3時間で、保存液中では6時間で低下を認めた。マウス・ラットの組織に比べて、手術の影響を受けているものと考えられた。

以上より、ヒト組織は摘出後、3時間までか保存液中で6時間までの間に液体窒素で凍結すれば、材料として大きな活性低下がない可能性が示唆された。

手術材料からの時間経過の検討および、剖検材料を用いた検討では、タンパク質レベル、DNAレベルの解析は採取後12時間後までは十分に行えるが、mRNAレベルは数時間以内に分解され、今後さらに細かい検討を必要とすると考えられた。手術手技、阻血などの影響は少なかったが、小サンプルの場合は取扱いに注意が必要であった。mRNAについて小サンプルの保存を種々の条件でさらに検討したところ、RNAlaterを用いて、摘出1時間以内に保存し、TRIzol（あるいはRNeasy）で抽出するのが最も効率が良いことが明らかにされた。

F. 研究発表

1) Ogata T, Teshima T, Kagawa K, Hishikawa Y, Takahashi Y, Kawaguchi A, Suzumoto Y, Nojima K, Furusawa Y, Matsuura N: Particle Irradiation Suppresses Metastatic Potential of Cancer Cells. *Cancer Res* 65:113-120, 2005.

2) Onodera Y, Hashimoto S, Hashimoto A, Morishige M, Mazaki Y, Yamada A, Ogawa E,

Adachi M, Sakurai T, Manabe T, Wada H, Matsuura N, Sabe H: Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J* 24:963-973, 2005.

3) Kim BN, Yamamoto H, Ikeda K, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Fujie Y, Ogawa M, Hata T, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Monden T, Matsuura N, Monden M: Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. *Int J Oncol* 26:1217-1226, 2005.

4) Yamamoto Y, Hirakawa E, Mori S, Hamada Y, Kawaguchi N, Matsuura N: Cleavage of carcinoembryonic antigen induces metastatic potential in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 333:223-9, 2005.

5) Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, Takagi A, Hayashi T, Suzuki R, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M: Oxaliplatin, a Potent Inhibitor of Survivin, Enhances Paclitaxel-induced Apoptosis and Mitotic Catastrophe in Colon Cancer Cells. *Jpn J Clin Oncol* 35:453-463, 2005.

6) Kondoh H, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Kitagawa-Sakakida S, Memon IA, Kawaguchi N, Matsuura N, Matsuda H: Reorganization of cytoskeletal proteins and prolonged life expectancy caused by hepatocyte growth factor in a hamster model of late-phase dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:295-302, 2005.

- 7) Iwata K, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Kawaguchi N, Matsuura N, Nakamura T, Matsuda H: Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates the progression of cardiac remodeling in the hypertrophied heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:719-25, 2005.
- 8) Hata T, Yamamoto H, Ngan CY, Koi M, Takagi A, Damdinsuren B, Yasui M, Fujie Y, Matsuzaki T, Hemmi H, Xu X, Kitani K, Seki Y, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M: Role of p21waf1/cip1 in effects of oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4:1585-94, 2005.
- 9) Inoue O, Shukuri M, Hosoi R, Amitani M, Matsuura N, Hatazawa J, Takai N: Distinct different intra-tumor distribution of FDG between early phase and late phase in mouse fibrosarcoma. *Ann Nucl Med* 19:655-9, 2005.
- 10) Hirao T, Nanba D, Tanaka M, Ishiguro H, Kinugasa Y, Doki Y, Yano M, Matsuura N, Monden M, Higashiyama S: Overexpression of ADAM9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells. *Exp Cell Res* 312:331-339, 2006.
- 11) Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, Sakakida-Kitagawa S, Memon IA, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuda H: Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* 69:466-75, 2006.
- 12) Matsuura N, Miyamae Y, Yamane K, Nagao Y, Hamada Y, Kawaguchi N, Katsuki T, Hirata K, Sumi S, Ishikawa H: Aged garlic extract inhibits angiogenesis and proliferation of colorectal carcinoma cells. *J Nutr* 136:842S-846S, 2006.
- 13) Katsuki T, Hirata K, Ishikawa H, Matsuura N, Sumi S, Itoh H: Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *J Nutr* 136:847S-851S, 2006.
- 14) Fujiwara A, Terashima H, Shishido A, Nishiki J, Yoshida K, Miyauchi K, Madachi A, Matsuura N: Evaluation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Activity with Film *in situ* Zymography for Improved Cytological Diagnosis of Breast Tumors. *Breast Cancer* in press.
- 15) Maeda J, Inoue M, Okumura M, Ohta M, Minami M, Shiono H, Shintani Y, Matsuda H, Matsuura N: Detection of occult tumor cells in lymph nodes from non-small cell lung cancer patients using reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen mRNA with the evaluation of its sensitivity. *Lung Cancer* in press.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得
 - 2) 実用新案登録
 - 3) その他
- いずれも特記事項なし。

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社