

2) 乾燥羊膜特性解析

光学顕微鏡にて羊膜生組織と他の加工羊膜組織とを詳細な形態的解析を行う。

3) 乾燥羊膜タンパク質解析

乾燥羊膜よりタンパク質を抽出し、ウエスタン・ブロッティング法にて α 1-antitrypsinとOCT3/4の発現解析を行う。生物材料としての構造解析(物性)、張力、保水性解析を行う。

4) 糖鎖高分子の開発と糖鎖ポリマーゲイッシュでの細胞培養

これまで、糖鎖として用いてきたラクトビオン酸は、ポリマーに誘導された際、肝臓の実質細胞上のアシアロ糖タンパク質レセプターとのみ相互作用し、肝細胞を特異的に相互作用させる。より純度の高いラクトビオン酸作成法を検討しポリスチレン誘導体型糖鎖ポリマーを合成する。ヒト株化細胞であるCHO細胞、B16細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞を用いてマトリックスのキーマテリアルとなる新たに合成した糖鎖ポリマーによる細胞培養を行う。血清は添加せず、37℃、5%CO₂インキュベーターにて所定の時間培養し、細胞の形態と増殖程度を位相差顕微鏡にて観察した。これら細胞の70%コンフルエント培養系に、各ポリマーの0.1W/V%溶液を添加し、細胞に対する毒性評価を行う。

5) ヒト乾燥羊膜による創傷治癒効果

作成した乾燥羊膜をマウスの創傷部位へ移植を行った。マウスをペントバルビタールで麻酔後、皮下に達する直径5mmの傷をデルマパンチで作成した。あらかじめシリコンカルチャーに乾燥羊膜を接着剤で添付したものを接着剤と絹糸による縫合で創傷部位に固定し、4日目及び7日目の組織を組織学的に観察する。採取した組織をパラフィン包埋後、薄切切片をアザン染色し、光学顕微鏡による観察を行う。更に、画像解析システム(MataMorph)により上皮長を測定し、定量・生物検定を行った。

6) 新規組換えヒトI型コラーゲンa1鎖の作成法開発

組換えヒトI型コラーゲンa1鎖の産生(株)ネオシルクでは組換えヒトI型コラーゲンa1鎖を中部絹糸腺で合成し、その組換えa1鎖を含む絹糸を吐くトランスジェニックカイコCOL1A1を作成システムを開発してきた。バキュロウイルス由来転写活性因子のCOL1A1カイコへの導入、およびトランスジェニックカイコのホモ接合体化によって、組換えa1鎖合成量を増加

させ、得られた繭から、効率性の高い組換えヒトI型コラーゲンa1鎖を抽出・精製法を検討し、精製した組換えヒトI型コラーゲンa1鎖を市販の天然コラーゲンおよびゼラチンと比較を行う。

a) BmNPV由来転写調節因子IE1の導入とトランスジェニックカイコの確立

組換えヒトI型コラーゲンa1鎖を中部絹糸腺で合成するトランスジェニックカイコCOL1A1において、バキュロウイルスBmNPV由来の転写調節因子IE1を発現させ、ハイブリッドトランスジェニックカイコCOL1A1/IE1を作出する。COL1A1カイコ成虫蛾からゲノムDNAを抽出し、トランスポゾンによる遺伝子挿入部位の周辺のゲノム配列をBIO S&T社APAgene Transgene Locator Kitを用いたasymmetrical PCR法によって決定し、その塩基配列をもとにホモ体、ヘテロ体判別のためのオリゴヌクレオチドDNAを調製しPCRにて遺伝子型の識別を行うことにより、ホモ接合体を選別を行う。このようにして、ホモ接合体トランスジェニックカイコ(COL1A1/IE1)2を得て、このカイコの継代飼育を続け、繭を回収する。

b) 組換えヒトI型コラーゲンa1鎖の合成量の確認

得られたトランスジェニックカイコ(COL1A1/IE1)2の繭中の組換えヒトI型コラーゲンa1鎖をSDS-PAGEによって確認を行う。画像解析ソフトImageJによって組換えヒトI型コラーゲンa1鎖由来バンドのデンスシトメトリーの定量を行い、数値化を行う。組換えヒトI型コラーゲンa1鎖を繭から抽出し、不純物を除去・精製後得られた組換えヒトI型コラーゲンa1鎖を回収した沈殿は0.5M NaCl/0.5 M CH₃COOH 60 mlに再溶解し、10 Lの水に対して透析を3回、計18時間、4℃で行う。透析後、回収した組換えヒトI型コラーゲンa1鎖溶液は0.22 mmフィルターによるろ過滅菌を行った後、凍結乾燥したものを獲得する。

c) 組換えヒトI型コラーゲンa1鎖と市販コラーゲンあるいはゼラチンとの比較

・CDスペクトルの測定

組換えヒトI型コラーゲンa1鎖、市販コラーゲン((株)高研AteloCell I-PC)、市販コラーゲンを50℃で10分間熱処理したもの、および市販ゼラチン(Sigma社bovine type A gelatin)を100 mg/mlの

濃度で 0.1 CH₃COOH にて調製し、それぞれの遠紫外域 (195-250 nm) の 4°C における円二色性分散スペクトルを計測した。また、組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖と市販のコラーゲンおよびゼラチンの、熱遷移 (4-60°C) に伴う CD スペクトル (224 nm) の変化の計測を行う。

・ゲル化および繊維化の条件検討

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の凍結乾燥物に 5% になるよう水を加えて室温で溶解し、その後水中に静置することでゲル化させ、市販ゼラチン (Sigma 社 bovine type A gelatin) においても同様に 5% になるよう水を加え、37°C で温めながら溶解させた後、冷却してゲルを調製し、これらのゲルを 1°C ずつ温度を上昇させながら観察を行い、ゲルの溶解が始まる融点を解析する。続いて溶解した 5% 溶液を融点の場合とは逆に 1°C ずつ温度を下降させながら観察を行い、ゲル化が始まる点、すなわち凝固点を求める。

コラーゲンは塩の存在下で 37°C でインキュベーションすることによって繊維化 (ゲル化) が起こる。組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖において繊維化の解析を行う。市販ウシ I 型コラーゲン ((株) 高研 AteloCell I-PC)、市販ゼラチン (Sigma 社 bovine type A gelatin)、および組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の 0.5% 酸性溶液をそれぞれ 8 ml 準備し、10 x PBS 1 ml、および 50 mM NaOH, 260 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES 溶液 1 ml と、水中において混合した後シャーレに展開し、37°C で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、それぞれのシャーレにおけるゲル化の有無を観察する。

7) 組換えヒトヒト I 型コラーゲン a1 鎖の iPS 細胞特性保持に関する解析

上記工程により精製・凍結乾燥した組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の 0.1% 溶液を作成する。通常の iPS 細胞培養工程では、フィーダー細胞を播種する前段階としてブタ由来のゼラチンが使用されているが、その代替として 0.1% 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を用いて iPS 細胞の培養を行う。培養継代を行い、iPS 細胞の特性解析を行う。すなわち、形態学的観察、未分化特異的マーカー解析、多分化能解析、細胞核型解析を行う。形態学的評価は、種々の培養環境に対して、

a) ヒト iPS 細胞の特徴: 3-4 層の平坦で辺縁が明瞭な細胞コロニーを形成する。

b) 未分化特異的マーカー: OCT3/4、SOX2、SSEA4、TRA1-60、TRA1-81 の発現をモノクロナール抗体を用いた免疫組織学的により検定する。

c) 多分化能解析: 良好に培養維持された iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下及び腎皮膜下へ移植し腫瘍形成後、三胚葉への分化を確認するために Tuj-1、MF-20、AFP の抗体を用いた免疫組織学的解析を行う

倫理面への配慮

ヒト乾燥羊膜作成にあたり、ヒト検体を使用するため、その採取とその後の検体管理にあたり以下の点に留意する。

インフォームドコンセント: 研究用の検体提供に際し、十分な説明を行い、本人からの文書による同意をうける。この同意は検体が被験者本人と連結できる限り、撤回することができ、非同意や同意撤回により、不利益をうけることのないようにする。

個人情報の保護: 患者の個人情報を最大限に保護するために、患者の個人識別情報を検体より取り除いて符号化・番号化を行う匿名化を、患者検体採集時に行い、患者個人識別情報と検体との対応表を、「個人識別情報管理者」が厳重に管理する。

富山大学医学部・承認番号 44、平成 17 年 6 月 24 日

国立成育医療センター・受付番号 55、平成 16 年 11 月 15 日

C. 研究結果

安定的に Hyper-Dry 乾燥羊膜を提供・保存できるシステムが構築できた。実体顕微鏡下では生羊膜には不透明な白色を呈し、HYPER-DRY 乾燥羊膜には透明感があったが、凍結乾燥は生羊膜羊膜よりもさらに不透明な白色となり、HYPER-DRY 乾燥羊膜と顕著な差が観られた。生羊膜では敷石状に見える上皮が観察でき、HYPER-DRY 乾燥羊膜でも生羊膜と同様に、敷石状の上皮が観察できた。凍結乾燥には小さな穴が観られ、細胞の区別が難しいものとなった。生羊膜には上皮・間葉系細胞と結合組織がよく保存されていた。HYPER-DRY 乾燥も同様によく保存されていた。凍結乾燥では上皮細胞は濃縮し、結合組織に細胞を認めず、膠原繊維が強く結びついていた。HYPER-DRY 乾燥の方が、凍結乾燥よりも形態をよく保持した。

ウエスタン・ブロッティング法によりタンパク質の変性を生羊膜と比較したところ、乾燥羊膜で、 α antitrypsin と Oct3/4 の抗原性が保持されていた。HYPER-DRY 乾

乾燥羊膜と凍結乾燥には顕著な差が観られたが、細胞の保存状態によるものと考えられた。HYPER-DRY 乾燥羊膜内の蛋白質の変性は抗体による認識に耐える程度には保持されていた。

細胞選択増殖活性を持ち、ミネラルの吸収促進効果が認められる乳糖の酸化生成物であるラクトビオン酸を HPLC シングルピークで作製することができた。他の糖鎖に関しても同様の操作で精製が可能であった。合成ポリマー糖鎖はポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、SUS、ポリプロピレンなどの医療素材にコーティングが可能である。これらの医療素材は、ゲル、不織布、ファイバー、シート、フィルムなどの形状に加工し、細胞培養に使用することが可能である。従って、このような医療素材からできた培養デバイスに糖鎖ポリマーをコーティングすることでより効率の良い培養基材を作成することが可能になる。他に、0.01W/V%の水溶液にフラブレン、CoQ10、アスタキサンチンなどの疎水性薬物を添加すると、ポリマー内に疎水性薬物を包接し、超音波処理などによりクリアな水溶液を与えることがわかった。

細胞認識性に重点をおいた糖鎖ポリマーを多数、改良開発することができ、B16メラノーマ細胞、CHO 細胞、HepG2 細胞、NIH3T3 細胞などの様々な性質の細胞が培養できること、さらに、糖鎖や共重合した化合物の性質に応じて細胞の接着・増殖がコントロールされることができた。

糖鎖ポリマーは、糖鎖や共重合した化合物により細胞に対する認識性が異なることが明らかになり、疎水性薬物を水中にナノレベルで分散できる可能性があることが示唆された。これらのことから、HYPER-DRY 乾燥羊膜は上皮細胞の保存が良いのに対し、凍結乾燥では悪いことがわかった。

Hyper-Dry ヒト乾燥羊膜は高い組織親和性等から人工器官（部分補填型）として非常に有用性が高いことが示せた。更に、膜への修飾が可能でドラッグデリバリーシステム（DDS）の基材となりうる可能性を示し、ステロイド剤、コラゲナーゼ抑制因子等の膜への含浸と薬品の徐放を行えることが判明し、DDS とし基材として開発を行う。

移植結果：

創傷作成後 4 日目で上皮組織により覆われ、その状態は、対象群に比し乾燥羊膜群で上

皮反応が顕著であった。上皮形成された長さを測定し生物検定を行った結果、4 日目の乾燥羊膜移植部位では有意に増長していた。表皮上皮の促進効果は 4 日目の羊膜移植群で $296.51(\pm 44.71) \mu\text{m}$ 、コントロール群で $150.20(\pm 23.17) \mu\text{m}$ であった ($p < 0.05$)。

新規組換えヒトヒト I 型コラーゲン a1 鎖と iPS 細胞特性保持について

a) BmNPV 由来転写調節因子 IE1 の導入とトランスジェニックカイコの確立

トランスジェニックカイコ COL1A1 と IE1 合成トランスジェニックカイコを交配し、得られた卵よりふ化した幼虫を約 8 日間飼育した時点で、蛍光顕微鏡下での蛍光観察によってハイブリッドカイコのスクリーニングを行った結果、ハイブリッドカイコ COL1A1/IE1 が得られた。得られた幼虫は、成虫となった後、繭を正常に形成した。

b) 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の合成量の確認

SDS-PAGE 法により組換えコラーゲン a1 鎖の予想分子量である 120 kDa 付近にバンドが見られた。このバンドは野生型カイコ (w1-pnd) が形成した繭の抽出液認められなかった。

c) 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖と市販コラーゲンあるいはゼラチンとの比較

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖、市販コラーゲンおよび市販ゼラチンとの CD スペクトルの測定を行った結果、すべてのサンプルにおいてコラーゲンタンパク質典型的な 198-200 nm の負のピークが確認できた。コラーゲン三重らせん構造の存在を表す 220-225 nm の正のピークは市販コラーゲンにおいて最も顕著に見られた。また、市販ゼラチンにおいても若干のピークが確認でき、変性されずに残った三重らせん構造がわずかに残っていると考えられた。一方、組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖においては 224 nm のピークはほとんど見られなかった。このことは組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖には三重らせん成分が含まれていないことを示唆している。市販コラーゲンを 50°C で熱処理したところ、224 nm のピークが完全に消失し、組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の波形とほぼ一致した。このことから組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の二次構造は熱変性させた天然コラーゲンの状態に近いことが強く示唆された。

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を用い

て5%ゲルを作製し、その融点および凝固点を調べたところ、それぞれ17°C、10°Cになった。対照として同時に調べた市販ウシゼラチンにおいては、融点30°C、凝固点26°Cであった。市販ゼラチンに比べると組換えヒトI型コラーゲンα1鎖の融点、凝固点は共に10°C以上低く、市販ゼラチンに比べ溶けやすく固まりにくい性質を持つことが判明した。

コラーゲンは塩の存在下で37°Cでインキュベーションすることによって繊維化（ゲル化）が起こる。同条件でウシI型コラーゲン、組換えヒトI型コラーゲンα1鎖、市販ゼラチンにおいて繊維化が起こるかどうかを調べた結果、コラーゲンにおいてのみゲル化が起こった。このことから組換えヒトI型コラーゲンα1鎖は生理的条件下でゲル化（繊維化）は起こらないことが判明した。

d) 組換えヒトI型コラーゲンα1鎖のiPS細胞特性保持に関する解析

凍結乾燥された組換えヒトI型コラーゲンα1鎖体より0.1%溶液を作成しiPS細胞培養へ用いた。

- ・ iPS細胞の形態的特徴を保ったまま20継代数以上良好に培養維持可能であった。
- ・ 未分化特異的マーカーであるOCT3/4、SOX2、SSEA4、TRA1-60、TRA-1-81の発現を免疫組織学的解析を行ったところ、明瞭な発現が認められ、対象で行っている標準化されている方法でのES細胞と何ら異なることはなかった。
- ・ 多分化能解析について良好に培養されたiPS細胞を免疫不全マウスの皮下及び腎皮膜下へ移植し、1.5ヶ月経過観察し腫瘍の形成を認め、多分化能解析を行った結果、外胚葉・中胚葉・内胚葉マーカーであるTuj1、MF-20、AFPが陽性であり多分化能も問題なく保持されていることが確認できた。

D. 考察

HYPER-DRY乾燥羊膜がいずれの凍結乾燥羊膜よりも生羊膜に近い形態学的構造を示したことから、1) 必要時に利用できる2) 管理保管に手間とコストのかからない乾燥羊膜が作製できたと考えた。将来の人工器官に向けた基盤研究では、糖鎖ポリマーはナノレベルで分散でき、乾燥羊膜にこれらポリマーを塗布することで、細胞のよりよい培養環境を提供できると共に、疎水性の細胞活性化因子を包接し、細胞培養時に徐放させることで、人工器官

へのより確実なアプローチが可能になると考えられた。この糖鎖ポリマーによる細胞の認識性と反応の違いがどのようなメカニズムで引き起こされているのかを詳細に検討していくことで、より高度な細胞培養システムの構築が可能になる。

本研究課題における新規の乾燥羊膜はマウス創傷治癒モデルにおいて、有意に上皮形成促進作用が認められたことから、創傷を早期に治癒する効果があると考えられた。

本研究において、細胞の足場接着タンパク質の1つであるヒトI型コラーゲンの合成を試みた。第一段階として、すでに作出していた組換えヒトI型コラーゲンα1鎖を含む繭を作るトランスジェニックカイコを改良することによって、組換えα1鎖合成量の増加を試みた。続いて第二段階として、得られた繭から組換えα1鎖の抽出・精製を行った。第三段階として、得られた組換えα1鎖を天然のコラーゲンあるいはゼラチンと比較した。最終的に獲得できた良質な凍結乾燥された組換えヒトI型コラーゲンα1鎖のiPS細胞の特性保持への効果を検定した。ホモ接合体のトランスジェニック体を作製することで、導入遺伝子は1コピーから2コピーへ増加する事になり、組換えタンパク合成量が1.5倍以上の産物量を獲得することが可能であった。今回得られたホモ接合体化ハイブリッドカイコ(COL1A1/1E1)2を大量飼育することによって、組換えコラーゲンα1鎖を大量生産することが可能である。得られた組換えヒトI型コラーゲンα1鎖の物性解析より、その性質は熱変性させたコラーゲンに近く、「組換えヒトゼラチン」と呼ぶことが適当と思われる。一般的なゼラチンは、ウシやブタの骨・皮などをアルカリで処理した後、温水で抽出することにより得られるコラーゲンの変性産物であるため、このような操作で得られたゼラチンは安価であるが、アルカリや熱による分解を受けるため低分子化している。一方、今回得られた組換えヒトゼラチン（組換えヒトI型コラーゲンα1鎖）は分子量が均一であることが大きな相違点であり、加えて、ヒト型であるため抗原となる可能性低いこと、ウイルス等への感染リスクが低いこと、などが従来の動物由来ゼラチンに比したメリットになると考えられる。純度の高いヒトI型コラーゲンα1鎖を生産するシステムを確立できた。

その良質に精製できたヒトI型コラーゲンα1鎖を用いたiPS細胞培養においては、

その特性が長期にわたって保持されていることが確認でき、今後再生医療対応の培養システムを構成する重要な要素となることが判明した。

E. 結論

将来の安全的な再生医療マテリアルを供給するために、我々が開発してきた HYPER-DRY 乾燥羊膜はヒト由来生羊膜に非常に近似した形質を保持し、長期保存が可能な組織を作成できた。新規に開発した糖鎖ポリマーは細胞と共培養する中で、細胞を特異的に認識し反応性の違いをみせ、機能性マトリックス構築することができた。ヒト由来の長期保存で安定的な人工羊膜の足場を応用すれば、より安全で高度な細胞培養システムの構築が可能になり人工器官開発の重要な基盤づくりができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chen AE, Egli D, Niakan K, Deng J, **Akutsu H**, Yamaki M, Cowan C, Fitz-Gerald C, Zhang K, Melton DA, Eggan K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell*. 4(2):103-6. 2009

Umezawa A, **Akutsu H**. Osteogenesis and chondrogenesis from a stem cell source. *Clin Calcium*. 18(12):1721-7. 2008

Hamatani T, Yamada M, **Akutsu H**, Kuji N, Mochimaru Y, Takano M, Toyoda M, Miyado K, Umezawa A, Yoshimura Y. What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes?. *Reproduction*. 135(5):581-92. 2008

Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, **Akutsu H**. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online*. 16(1):41-50. 2008

Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, **Akutsu H**, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev*. 75(1):150-5. 2008

Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, **Akutsu H**, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs

in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(35):12921-6. 2008

Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T, Toda A, **Nikaido T**. Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue Cell*. 40(2):75-81. 2008.

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, **Nikaido T**, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Tissue Cell*. 26(2):300-311. 2008.

Toda A, Okabe M, Yoshida T, **Nikaido T**. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*. 105(3):215-228. 2007.

Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, **Nikaido T**, Konishi I, Nishizawa O. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng*. 13(3):513-524. 2007.

Honda A, Abe R, Makino T, Norisugi O, Fujita Y, Watanabe H, Nishihira J, Iwakura Y, Yamagishi S, Shimizu H, **Shimizu T**. Interleukin-1beta and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci*. 49(1):63-72. 2008.

Asano Y, Makino T, Norisugi O, Watanabe H, Abe R, Shimizu H, **Shimizu T**. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 49(1):95-7. 2008.

Makino T, Nagasaki A, Furuichi M, Matsui K, Watanabe H, Sawamura D, Shimizu H, **Shimizu T**. Novel mutation in a fumalate hydratase gene of a Japanese patient with multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis. *J Dermatol Sci*. 48(2):151-3. 2007.

Nemoto I, **Shimizu T**, Fujita Y, Tateishi Y, Tsuji-Abe Y, Shimizu H. Tumour-like muscular sarcoidosis. *Clin Exp Dermatol*. 32(3):298-300. 2007.

Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Nakashima A, Shiozaki A. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*. 76(1-2):30-9. 2007.

Saito S, Shima T, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet.* 24(9):379-86. 2007.

Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin Immunopathol.* 29(2):115-22. 2007.

Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, **Saito S**. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 149(1):139-45. 2007.

Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med.* 28(2):192-209. 2007.

Yoneda S, Sakai M, Sasaki Y, Shiozaki A, Hidaka T, **Saito S**. Interleukin-8 and glucose in amniotic fluid, fetal fibronectin in vaginal secretions and preterm labor index based on clinical variables are optimal predictive markers for preterm delivery in patients with intact membranes. *J Obstet Gynaecol Res.* 33(1):38-44. 2007.

G. 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

ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究

所 属： 国立精神・神経センター神経研究所

研究者： 後藤 雄一

研究期間：平成 18 年 4 月～平成 21 年 3 月

研究要旨 ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のために、骨格筋・筋芽細胞と肝組織・肝細胞をプロトタイプとして、登録・保存・利用システムの研究を行った。国立精神・神経センターに登録されている凍結筋は 1 万を超え、また筋芽細胞は約千に達した。一方、肝組織、肝細胞については、聖マリアンナ大学と広島大学の 2 つの提供施設内における試料と情報管理システムの構築と課題を明らかにした。

分担研究者

- (1) 西野一三 国立精神・神経センター神経研究所
- (2) 小林英司 自治医科大学分子病態治療研究センター
- (3) 小林真一 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (4) 熊井俊夫 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (5) 浅原利正 (H18, 19) 広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学
- 板本敏行 (H20) 同上
- (6) 橋本有弘 国立長寿医療センター研究所
- (7) 清野 透 国立がんセンター研究所

1. 研究目的

本研究では、ヒト組織を外科的に採取し、適切にかつ分量多くの研究者に研究用ヒト試料として提供できるよう公共バンクと連携した保存・管理するためのシステム構築の検討を行う。特に我が国で遅れている各科を横断的にまたがるシステムを検討し、将来わが国の各医療機関でも構築が可能なヒト組織提供機関としてのモデルシステムについて検討する。そのため、生検骨格筋及び摘出肝組織をモデルとしてシステム構築を行うことを目的とする。

2. 研究方法

- 1) 骨格筋及び筋芽細胞提供医療施設内（国立精神・神経センター）の試料と情報の管理システム整備

国立精神・神経センター神経研究所及び病院で行っている凍結骨格筋登録、筋芽細胞樹立を継続

して行う。

- 2) 筋芽細胞の純粋化、不死化及び分化能の検討

筋芽細胞に、不死化遺伝子として HPV16 E7, p16INK4a に結合しない変異 CDK4 (CDK4R24C), Cyclin D1, hTERT などを発現するレンチウイルスベクターを作成し種々の組み合わせで導入する。さらにそれらの分化能、染色体安定性を検討する。

- 3) 肝組織提供医療施設の試料と情報の管理シ

ステムの整備（聖マリアンナ医大、広島大学）

ア. 組織摘出から保存までのシステム構築

聖マリアンナ大学でのヒト肝細胞のバンク化のシステムとして、昨年度、手術で切除された肝組織を病理検査に影響を与えず、かつ有効に採取するシステムについて外科医、病理医、内科医と検討する。

イ. ヒト組織多元的調整法至適化と効率化の検討

外科手術により摘出されヒューマンサイエンス研究資源バンク（HSRRB）に提供されている肝組織を中心に遺伝子多型のパネル化を行う。また同組織を用いて、良性腫瘍、大腸癌の転移性腫瘍、原発性肝臓癌の患者より外科手術により摘出され提供された肝組織について蛋白発現を比較検討する。さらに脂肪肝を用いて試料調整法の検討を行う。

- 4) ヒト肝細胞の公的資源化（広島大学）

広島大学病院でのヒト肝細胞バンクのシステム化

を進めるとともに、手術等で摘出されたヒト肝組織から肝細胞への分離、保存、培養を行い、肝細胞を資源化する。また、得られた肝組織、肝細胞を公共バンクへの提供についての同意を得ているものについては、HSRRB への提供を行う。

5) ヒト組織の研究資源化における倫理的研究

ヒト組織の研究資源化にともなう倫理的問題を、実際に試料を収集している施設で実態調査を行う。

6) ヒト組織公共バンクに関するパブリックアクセプタンスに関する調査

バンク事業のパブリックアクセプタンスを進めるため、ヒト組織バンクに対する一般市民のアンケート調査を行う。

(倫理面への配慮)

研究者の所属する施設の倫理委員会に本研究に関する倫理申請を行い、承認を得ると共に、分担研究者の一人である小林英司(自治医科大学)は、本研究に関する倫理的問題を包括的に研究する。

3. 研究結果及び考察

1) 骨格筋及び筋芽細胞提供医療施設内(国立精神・神経センター)の試料と情報の管理システム整備

平成20年11月末現在で、総凍結筋は10,827検体に達し、このシステムを基盤にして患者骨格筋から筋芽細胞を樹立し、その数は974検体に達した。また共同研究として施設内使用139検体、施設外使用28検体であった。既に保存されている筋芽細胞を、ヒューマンサイエンス研究資源バンクへ分譲することを研究計画に入れていたが、実際は実行できていない。その理由は線維芽細胞が混在している細胞ではなく、以下2で行った筋芽細胞の純粋化、不死化されたものがより分譲に適していると判断した。

2) 筋芽細胞の純粋化、不死化

患者由来筋芽細胞に、変異CDK4+Cyclin D1+hTERTを導入した細胞は全く増殖遅延することなく50代以上も延命・不死化させることに成功した。さらに、不死化した細胞の筋分化能、染色体安定性を検討し、分化能を保持したまま不死化され、しかも正常核型を維持していることが判明し科学的価値が高い。

この不死化細胞樹立の方法は、従来の従来の方法に比べ優れており、研究上で優先度の高い筋芽細胞に対してこの方法を応用した不死化筋芽細胞パネルを樹立し、HS財団への細胞株提供を行うことが可能となった。

3) 肝組織提供医療施設の試料と情報の管理システムの整備

3年間で45例の肝組織がHSRRBへ提供するために採取された。本事業における同意取得率は86.3%と高く、研究資源が効率的に得られていることを示している。CRCと組織採取にかかわる人員をそれぞれ増員して、教育・研修を行った。本研究から内科の医師も組織採取スタッフとして参加した。その結果、内科の医師のヒト組織バンクへの理解が深まり手術室内での作業に余裕が生まれ、組織保存がさらにスムーズに行えるようになった。

これら聖マリアンナ大学、広島大学でのシステム構築のノウハウは今後の試料提供機関の運営に生かすことができる。

4) ヒト組織多元的調整法至適化と効率化の検討

HSRRBに提供されている肝組織におけるCYP1A2, 2C19, 2D6, 3A4, MDR-1の遺伝子多型についてパネル化を行った。本情報は公共バンクで使用可能な日本人肝組織の遺伝子多型情報であるため、利用する研究者の研究効率化に著しく貢献すると考えられる。

また原発性肝臓癌を原疾患とする肝組織では良性腫瘍や大腸癌の転移性腫瘍を原疾患とする肝組織と発現の異なる蛋白が存在することが明らかとなった。

脂肪肝では脂質成分が多く、特に細胞膜、核分画は収率が低下することが明らかとなった。

5) ヒト肝細胞の公共資源化

日本人の肝細胞を本邦で初めて公的資源化できたことは優れた研究成果であると考えられる。また、HSRRBへの組織提供に関する倫理審査委員会の承認(平成17年4月、第420号に追加してHSRRBへの提供のため、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に準じた追加申請を行い、承認を得た)。CRCの配置(平成18年4月から継続して配置)。平成20年12月現在、転移性肝臓癌症例からHSRRB提供への承諾を得て肝組織9症例、肝細胞8症例の提供を行った。

6) ヒト組織の研究資源化における倫理的研究

細胞株の保存・供給・寄託という操作における現状や問題点等を東北大学加齢研究所附属医療用細胞資源センター及び国立精神・神経センターの視察を通じて考察した。心停止ドナーからの研究資源の現状についても関係者と協議した。

7) ヒト組織公共バンクに関するパブリックアクセプタンスに関する調査

一般市民 1500 人を対象としてヒト組織バンクについてアンケートを実施したところ 570 名から回答が得られた。この結果、一般市民のバンク事業に対する認知度は高くないが、説明することで理解が得られることが明らかとなった。

4. 評価

1) 達成度について

ほぼ研究計画とおりに達成した。特に、凍結筋・筋芽細胞の登録数の増加・利用促進、不死化筋芽細胞樹立法の確立、ヒト肝細胞の公的資源化は十分な研究成果である。

一方で、研究計画とおりに実行できなかった点は、①筋芽細胞の HS バンクへ分譲、②利用者からみたヒト組織に関するアンケート調査、についてである。筋芽細胞の分譲については、線維芽細胞が混在している初代培養のままではなく、純粋化・不死化した筋芽細胞の方がより分譲に適していると判断したため、不死化樹立法確立を待っていたために研究期間内の実行が遅れた。利用者からみたヒト組織に関するアンケート調査は行っていない。これについては、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業：生物資源の「生物資源研究事業の企画及び生物資源の所在情報等に関するデータベースの構築に関する研究」班（主任研究者：水澤博）と連携を取りながら進めることにしている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

リサーチ・リソースの確保は疾患研究にとって不可欠である。筋レポジトリーの質・量及びそれらを用いた研究成果は国際的に高く評価されている。また、肝細胞の公的資源化は、日本人の薬物代謝を研究する際の大きなサポートとなることは間違いなく、今後の有効利用が待たれる。

3) 今後の展望について

凍結筋及び筋芽細胞のレポジトリーは不死化筋芽細胞パネルの追加などを通じて今後も有効に生かして行

くことが可能であり、世界に冠たるシステムとして継続させることが肝要と考える。また、肝細胞については、HS 財団では取り扱われない肝癌などの感染組織の収集と利用などの新たな展開が可能である。さらに試料提供機関間のネットワーク化などを行い、本事業の効率化や省力化を図るべきである。

5. 結論

本研究により、筋レポジトリーの高度化が推進した。また試料提供施設の運営に必要なノウハウが獲得できた。ヒト肝細胞の資源化が実現し、肝組織と合わせ HSRRB への試料提供を着実にいった。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	26 件
原著論文による発表	2 件
それ以外(レビュー等)の発表	4 件
その主なもの	

○櫻井史穂子、中谷祥子、熊井俊夫、田中政巳、松本直樹、大坪毅人、小林真一. ヒト組織の研究利用に関する患者、医師等の意識調査. 臨床薬理. 2006; 37: 305-311

○中谷祥子. 臨床研究の支援～ヒト組織バンク事業にかかわって～. 臨床薬理, 38: (3) 23S-24S, 2007

○前川貴子、中谷祥子、熊井俊夫、松本直樹、大坪毅人、田所衛、小林真一. ヒト組織を研究利用するために一ヒト組織バンク事業に対する一般生活者の意識調査一. 臨床薬理, 38: 349-354, 2007

○天野尋暢 他: 手術から得られたヒト肝組織の研究利用ー広島大学における肝再生医療とヒト肝組織バンク設立に向けた取り組みー第 119 回日本薬理学会関東部会 2008. 10. 4

2) 海外

口頭発表	2 件
原著論文による発表	3 件
(関連文献	25 件)
それ以外(レビュー等)の発表	0 件

その主なもの

○ Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra CA, Nonaka

I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease: *Neurology* 69: 1043-1049, 2007

○ Mimaki M, Hatakeyama H, Ichiyama T, Izumi H, Furukawa S, Akasaka M, Kamei A, Komaki H, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Different effects of novel mtDNA G3242A and G3244A base changes adjacent to a common A3243G mutation in patients with mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 9: 115-122, 2009

7. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究

所 属 国立精神・神経センター 神経研究所
疾病研究第二部

研究者 後藤 雄一

研究要旨 ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のために、骨格筋・筋芽細胞と肝組織・肝細胞をプロトタイプとして、登録・保存・利用システムの研究を行った。国立精神・神経センターに登録されている凍結筋は1万を超え、また筋芽細胞は約千に達した。一方、肝組織、肝細胞については、聖マリアンナ大学と広島大学の2つの提供施設内における試料と情報管理システムの構築と課題を明らかにした。

分担研究者

- (1) 西野一三 国立精神・神経センター神経研究所
- (2) 小林英司 自治医科大学分子病態治療研究センター
- (3) 小林真一 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (4) 熊井俊夫 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (5) 浅原利正 (H18, 19) 広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学
- 板本敏行 (H20) 同上
- (6) 橋本有弘 国立長寿医療センター研究所
- (7) 清野 透 国立がんセンター研究所

1. 研究目的

本研究では、ヒト組織を外科的に採取し、適切にかつ十分量多くの研究者に研究用ヒト試料として提供できるよう公共バンクと連携した保存・管理するためのシステム構築の検討を行う。特に我が国で遅れている各科を横断的にまたがるシステムを検討し、将来わが国の各医療機関でも構築が可能なヒト組織提供機関としてのモデルシステムについて検討する。そのため、生検骨格筋及び摘出肝組織をモデルとしてシステム構築を行うことを目的とする。

2. 研究方法

- 1) 骨格筋及び筋芽細胞提供医療施設内（国立精神・神経センター）の試料と情報の管理システム整備
国立精神・神経センター神経研究所及び病院で行っている凍結骨格筋登録、筋芽細胞樹立を継続

して行う。

- 2) 筋芽細胞の純粋化、不死化及び分化能の検討
筋芽細胞に、不死化遺伝子として HPV16 E7, p16INK4a に結合しない変異 CDK4(CDK4R24C), Cyclin D1, hTERTなどを発現するレンチウイルスベクターを作成し種々の組み合わせで導入する。さらにそれらの分化能、染色体安定性を検討する。
- 3) 肝組織提供医療施設の試料と情報の管理システムの整備（聖マリアンナ医大、広島大学）

ア. 組織摘出から保存までのシステム構築

聖マリアンナ大学でのヒト肝細胞のバンク化のシステムとして、昨年度、手術で切除された肝組織を病理検査に影響を与えず、かつ有効に採取するシステムについて外科医、病理医、内科医と検討する。

イ. ヒト組織多元的調整法至適化と効率化の検討

外科手術により摘出されヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)に提供されている肝組織を中心に遺伝子多型のパネル化を行う。また同組織を用いて、良性腫瘍、大腸癌の転移性腫瘍、原発性肝臓癌の患者より外科手術により摘出され提供された肝組織について蛋白発現を比較検討する。さらに脂肪肝を用いて試料調整法の検討を行う。

- 4) ヒト肝細胞の公的資源化（広島大学）

広島大学病院でのヒト肝細胞バンクのシステム化

を進めるとともに、手術等で摘出されたヒト肝組織から肝細胞への分離、保存、培養を行い、肝細胞を資源化する。また、得られた肝組織、肝細胞を公共バンクへの提供についての同意を得ているものについては、HSRRB への提供を行う。

5) ヒト組織の研究資源化における倫理的研究

ヒト組織の研究資源化にともなう倫理的問題を、実際に試料を収集している施設で実態調査を行う。

6) ヒト組織公共バンクに関するパブリックアクセプタンスに関する調査

バンク事業のパブリックアクセプタンスを進めるため、ヒト組織バンクに対する一般市民のアンケート調査を行う。

(倫理面への配慮)

研究者の所属する施設の倫理委員会に本研究に関する倫理申請を行い、承認を得ると共に、分担研究者の一人である小林英司(自治医科大学)は、本研究に関する倫理的問題を包括的に研究する。

3. 研究結果及び考察

1) 骨格筋及び筋芽細胞提供医療施設内(国立精神・神経センター)の試料と情報の管理システム整備

平成20年11月末現在で、総凍結筋は10,827検体に達し、このシステムを基盤にして患者骨格筋から筋芽細胞を樹立し、その数は974検体に達した。また共同研究として施設内使用139検体、施設外使用28検体であった。既に保存されている筋芽細胞を、ヒューマンサイエンス研究資源バンクへ分譲することを研究計画に入れていたが、実際は実行できていない。その理由は線維芽細胞が混在している細胞ではなく、以下2で行った筋芽細胞の純粋化、不死化されたものがより分譲に適していると判断したためである

2) 筋芽細胞の純粋化、不死化

患者由来筋芽細胞に、変異CDK4 + Cyclin D1+hTERTを導入した細胞は全く増殖遅延することなく50代以上も延命・不死化させることに成功した。さらに、不死化した細胞の筋分化能、染色体安定性を検討し、分化能を保持したまま不死化さ

れ、しかも正常核型を維持していることが判明し科学的価値が高い。

この不死化細胞樹立の方法は、従来の従来の方法に比べ優れており、研究上で優先度の高い筋芽細胞に対してこの方法を応用した不死化筋芽細胞パネルを樹立し、HS財団への細胞株提供を行うことが可能となった。

3) 肝組織提供医療施設の試料と情報の管理システムの整備

3年間で45例の肝組織がHSRRBへ提供するために採取された。本事業における同意取得率は86.3%と高く、研究資源が効率的に得られていることを示している。CRCと組織採取にかかわる人員をそれぞれ増員して、教育・研修を行った。本研究から内科の医師も組織採取スタッフとして参加した。その結果、内科の医師のヒト組織バンクへの理解が深まり手術室内での作業に余裕が生まれ、組織保存がさらにスムーズに行えるようになった。

これら聖マリアンナ大学、広島大学でのシステム構築のノウハウは今後の試料提供機関の運営に生かすことができる。

4) ヒト組織多元的調整法至適化と効率化の検討

HSRRBに提供されている肝組織におけるCYP1A2, 2C19, 2D6, 3A4, MDR1の遺伝子多型についてパネル化を行った。本情報は公共バンクで使用可能な日本人肝組織の遺伝子多型情報であるため、利用する研究者の研究効率化に著しく貢献すると考えられる。

また原発性肝臓癌を原疾患とする肝組織では良性腫瘍や大腸癌の転移性腫瘍を原疾患とする肝組織と発現の異なる蛋白が存在することが明らかとなった。

脂肪肝では脂質成分が多く、特に細胞膜、核分画は収率が低下することが明らかとなった。

5) ヒト肝細胞の公共資源化

日本人の肝細胞を本邦で初めて公的資源化できたことは優れた研究成果であると考えられる。また、HSRRBへの組織提供に関する倫理審査委員会の承認(平成17年4月、第420号)に追加してHSRRBへの提供のため、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に準じた追加申請を行い、承認を得た。CRCの配置(平成

18年4月からも継続して配置)。平成20年12月現在、転移性肝腫瘍症例からHSRRB提供への承諾を得て肝組織9症例、肝細胞8症例の提供を行った。

6) ヒト組織の研究資源化における倫理的研究

細胞株の保存・供給・寄託という操作における現状や問題点等を東北大学加齢研究所付属医療用細胞資源センター及び国立精神・神経センターの視察を通じて考察した。心停止ドナーからの研究資源の現状についても関係者と協議した。

7) ヒト組織公共バンクに関するパブリックアクセプタンスに関する調査

一般市民1500人を対象としてヒト組織バンクについてアンケートを実施したところ570名から回答が得られた。この結果、一般市民のバンク事業に対する認知度は高くないが、説明することで理解が得られることが明らかとなった。

4. 評価

1) 達成度について

ほぼ研究計画とおりに達成した。特に、凍結筋・筋芽細胞の登録数の増加・利用促進、不死化筋芽細胞樹立法の確立、ヒト肝細胞の公的資源化は十分な研究成果である。

一方で、研究計画とおりに実行できなかった点は、①筋芽細胞のHSバンクへ分譲、②利用者からみたヒト組織に関するアンケート調査、についてである。筋芽細胞の分譲については、線維芽細胞が混在している初代培養のままではなく、純粋化・不死化した筋芽細胞の方がより分譲に適していると判断したため、不死化樹立法確立を待っていたために研究期間内の実行が遅れた。利用者からみたヒト組織に関するアンケート調査は行っていない。これについては、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業：生物資源の「生物資源研究事業の企画及び生物資源の所在情報等に関するデータベースの構築に関する研究」班（主任研究者：水澤博）と連携を取りながら進めることにしている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

リサーチ・リソースの確保は疾患研究にとって不可欠である。筋レポジトリーの質・量及びそれらを用いた研究成果は国際的に高く評価されている。また、肝細胞の公的資源化は、日本人の薬物代謝を研究する際

の大きなサポートとなることは間違いなく、今後の有効利用が待たれる。

3) 今後の展望について

凍結筋及び筋芽細胞のレポジトリーは不死化筋芽細胞パネルの追加などを通じて今後も有効に生かして行くことが可能であり、世界に冠たるシステムとして継続させることが肝要と考える。また、肝細胞については、HS財団では取り扱われない肝癌などの感染組織の収集と利用などの新たな展開が可能である。さらに試料提供機関間のネットワーク化などを行い、本事業の効率化や省力化を図るべきである。

5. 結論

本研究により、筋レポジトリーの高度化が推進した。また試料提供施設の運営に必要なノウハウが獲得できた。ヒト肝細胞の資源化が実現し、肝組織と合わせHSRRBへの試料提供を着実にいった。

6. 研究発表

1) 国内

《口頭発表》15件

- 1) 天野尋暢 他：肝硬変合併肝細胞癌に対する肝切除術の工夫(ビデオディスカッション)．第108回日本外科学会定期学術集会，長崎，2008.5.15-17
- 2) 天野尋暢 他：ミラノ基準を逸脱した肝細胞癌に対する肝切除の意義と移植適応拡大の可能性．第44回日本肝癌研究会，大阪，2008.5.22-23
- 3) 天野尋暢 他：肝臓外科領域における術後胆道系合併症の予防に必要な解剖—生体肝移植ドナーの画像解析から—(ミニシンポジウム)．第20回日本肝胆膵外科学会，山形，2008.5.28-30
- 4) 大下彰彦 他：当科における、肝細胞癌に対する肝切除術式の適応と周術期管理について—Morbidity, Mortalityゼロを目指して—．第20回日本肝胆膵外科学会，山形，2008.5.28-30
- 5) 田代裕尊他：多発性肝のう胞を持つ高齢者ドナーの肝移植の1例．第20回日本肝胆膵外科学会，山形，2008.5.28-30
- 6) 小林剛 他：単発肝細胞癌切除例の予後規定因子．第20回日本肝胆膵外科学会，山形，2008.5.28-30
- 7) 天野尋暢 他：肝細胞癌外科治療の現状と適応拡大の可能性．第44回日本肝臓学会総会，大阪，2008.6.5-6

日本肝移植研究会, 横浜, 2008. 6. 19-20

9) 田代裕尊 他: 右葉グラフトにおける中肝静脈枝再建の工夫. 第26回日本肝移植研究会, 横浜, 2008. 6. 19-20

10) 大下彰彦 他: 当科における生体肝移植ドナー手術の工夫と術後成績. 第26回日本肝移植研究会, 横浜, 2008. 6. 19-2

11) 田代裕尊 他: 生体部分肝移植後の血流不全に対する予防と対策(シンポジウム). 第63回日本消化器外科学会総会, 札幌, 2008. 7. 16-18

12) 大下彰彦 他: 当科における肝細胞癌に対する腹腔鏡(補助)下肝切除の現況. 第63回日本消化器外科学会総会, 札幌, 2008. 7. 16-18

13) 黒田慎太郎 他: 稀な胆管嚢胞腺癌に対して肝切除し得た3症例. 第63回日本消化器外科学会総会, 札幌, 2008. 7. 16-18

14) 天野尋暢 他: 手術から得られたヒト肝組織の研究利用—広島大学における肝再生医療とヒト肝組織バンク設立に向けた取り組み—第119回日本薬理学会関東部会 2008. 10. 4

15) 塩見浩介、清野透、後藤雄一、橋本有弘。細胞周期調節因子とテロメラーゼによるヒト多能生筋前駆細胞の不死化。第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会 合同大会。2008年12月9日～12日、神戸

《原著論文による発表》 1件

1) 谷本新学 他: 先天性肝外門脈下大静脈短絡路に合併した肝腺腫. 広島医学 61(11):715-716, 2008

《それ以外(レビュー等)の発表》 1件

1) 小林英司: これからの医師こそトランスレーショナル・リサーチャーに. Medical Tribune :88, 2008年4月17日

2) 海外

《口頭発表》 2件

1) H. Tashiro et al: Preservation of recipient's middle hepatic vein(MHV) is useful for reconstructing MHV tributaries in living donor right liver transplantation XXII International Congress of The Transplantation Society Sydney, 2008. 8. 10-14

2) A. Oshita et al: LAPAROSCOPIC-ASSISTED HEPATECTOMY

FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMAS IN OUR INSTITUTE (workshop). 11th World Congress of Endoscopic Surgery, Yokohama, 2008. 9. 2-5

3) A. Oshita et al: Innovative Reconstruction of the Middle Hepatic Vein Tributaries for Right-lobe Graft in Living Donor Liver Transplantation 18th world Congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists Istanbul, 2008. 10. 8-11

4) S. Kuroda et al: A Case of the biliary cystic tumor with repeated hemobilia followed up for 8 years. 18th world Congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists Istanbul, 2008. 10. 8-11

《原著論文による発表》 3件

1) Yamashita S, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single-large mitochondrial DNA deletions. *J Hum Genet* 53:598-606, 2008.

2) Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra CA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease: *Neurology* 69: 1043-1049, 2007

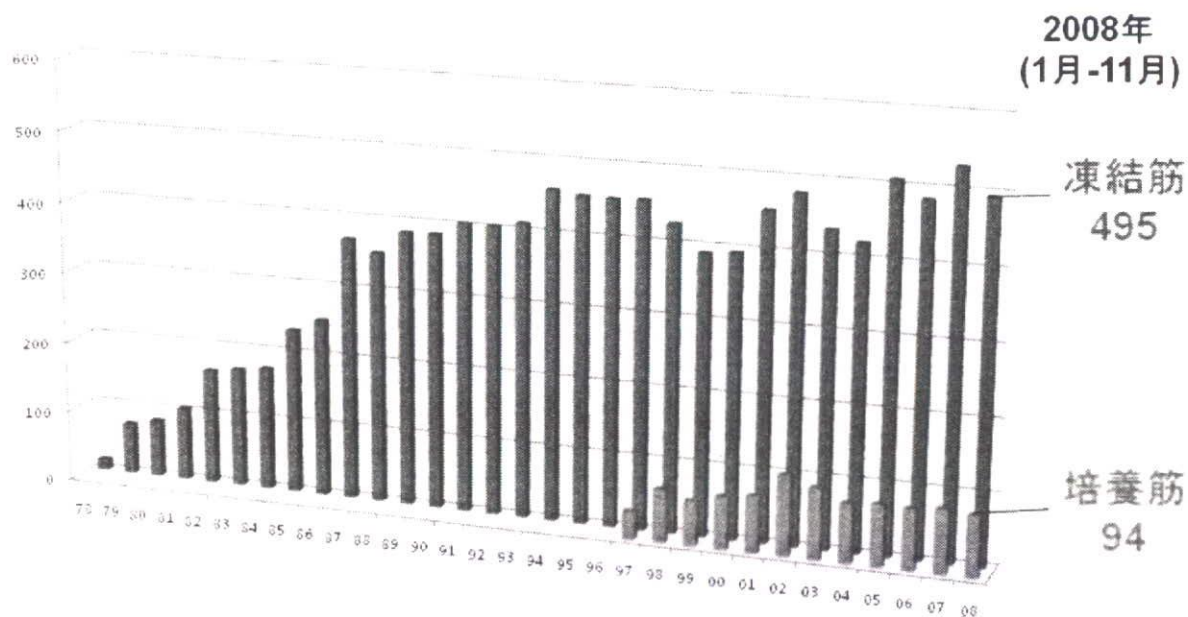
3) Mimaki M, Hatakeyama H, Ichiyama T, Izumi H, Furukawa S, Akasaka M, Kamei A, Komaki H, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Different effects of novel mtDNA G3242A and G3244A base changes adjacent to a common A3243G mutation in patients with mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 9: 115-122, 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし



筋レポジトリー新規検体数

2008年11月30日現在

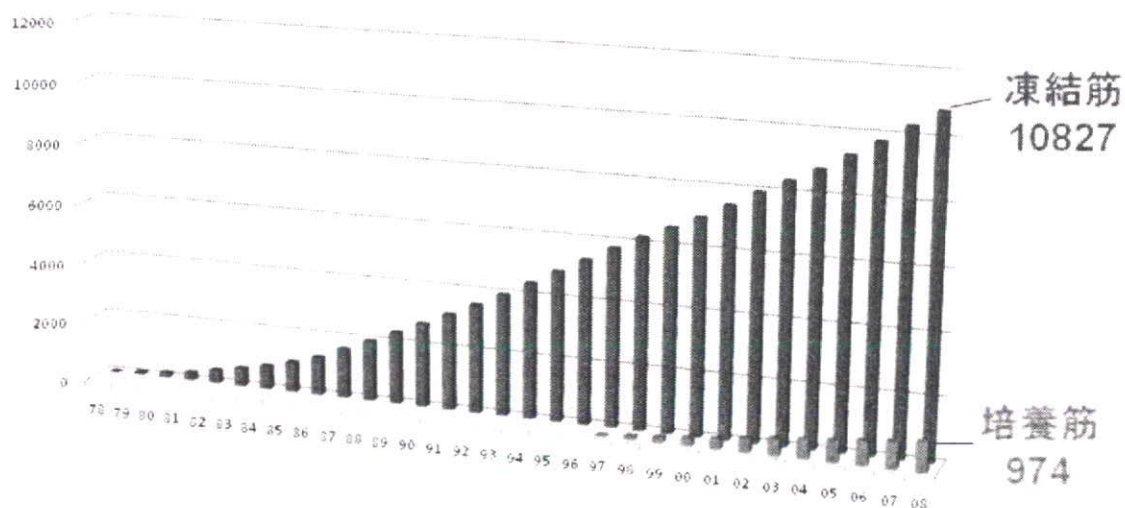


年間400~500の凍結筋、90件前後の筋芽細胞の登録がある。



筋レポジトリー蓄積検体数

2008年11月30日現在



2007年6月で、凍結筋検体の総数が1万検体を超えた。筋芽細胞も2008年度中に1000件に達する見込みである。

若手研究者奨励研究

微生物変換によるリファンピシン類の新規リード化合物の創出と創薬への応用

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 星野 泰隆
研究期間 平成19年4月～平成21年3月

研究要旨

Rifampicinは多くの結核患者の人命を救ってきたが、ヒトの薬物代謝関連酵素であるP450を誘導するため、HIV/AIDSと結核の複合感染症において抗HIV薬の作用を低下させてしまう。したがって、rifampicin類を微生物変換させ抗HIV薬と併用可能な新規候補化合物の創出を目指す。

A. 研究目的

今もなお、全世界において結核は患者数の非常に多い疾病であり、年間で約200万人もの人々の命が失われている。また、現在では既存の抗結核薬が効かなくなった多剤耐性結核菌(MDR-TB)やHIV/TBの複合感染が非常に大きな問題となっており、WHOを中心として数多くの政策が取られている。このような状況の中で、日本における結核に対する治療薬は、INHやRFPなどの5種類しか存在しない。また1965年のRFPの開発以降、新薬の投入は昨年までなされていなかった。ようやく2008年7月にrifabutin(ファイザー社)が結核および非結核性抗酸菌症の治療薬として承認された。このような現状で、結核に対する新薬の期待は全世界で高まっており、現在OPC-67683(大塚製薬)やPA-824(TB-Alliance & Novartis社)などの新薬候補の開発が進められている。

その上近年問題が激化したHIV/TBに関しては、新規結核患者920万人中70万人がHIVに感染しており、170万人の結核死亡者のうち20万人はHIVに感染していたという結果(Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008)が出ている。日本でも、結核患者数は10万人当たり19.8人(2007年)であり、1999年当時(34.6人)と比較すると若干改善方向にあるといえる(結核の統計2007)。しかし、これとは反対に、HIV/AIDSの新規患者数は、2004年に年間1000人以上となり、2007年には年間1500人という現状であり、現在も増加傾向にあるといえる。したがって、HIV/AIDSと結核の複合感染症が今後増加することは必至

である。このHIV/TBの複合感染症の問題点としては、唯一殺菌的に作用するRFPが抗HIV薬と相互作用することにより併用しにくい薬剤であることである。原因としてRFPがヒトの薬物代謝関連酵素P450(CYP3A4等)を強力に誘導し、抗HIV薬であるプロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬の血中濃度を著しく低下させ効果を減弱させてしまう点である。したがって、我々は、薬物代謝に係わるP450(CYP3A4)の強い誘導を引き起こさない点や多剤耐性結核菌に有効という点に着目し、新規化合物の取得を目的として新規抗結核薬の研究を行うものである。

我々は、今までに報告のないRFPの修飾酵素を見いだしている。この酵素は、本研究により新規な部位への酸素の付加が行われていることが判明した。本酵素によって変換された化合物に関しては、抗微生物活性を修飾後であっても活性を有しているため、この化合物をリード物質とした新規化合物の創出を目指し、候補薬剤の探索研究を行う。

このようにHIV/TBの複合感染症に対して使用できるということに着目し、この状況に使用可能な化合物の候補を創出することより、現段階では治療に困難が付きまとうHIV/TB感染症に対して、貢献することができる。特に、日本においてはHIV/AIDS感染者は近年増加傾向にあり、今後問題がより明確化するであろうHIV/TB感染者における感染症(結核などを中心とした)に対して、予防および治療の分野において還元できるものである。

B. 研究方法

(1) rifampicin (RFP) の monooxygenase による変換物の取得

我々のグループにより行われた *Nocardia farcinica* のゲノム解析の結果から *Rhodococcus equi* において RFP 耐性に関与していると報告されている monooxygenase と相同性を有している遺伝子を見出した。本遺伝子は、FAD-binding のモチーフを有しており、補酵素として、フラビンを必要とすると推測される。

はじめに monooxygenase 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、大腸菌内で monooxygenase タンパク質を発現できるように構築した。微生物変換の方法としては、resting cell を用いた変換方法を利用した。まず大腸菌内で monooxygenase タンパク質を発現させる。次にリン酸緩衝液中にて monooxygenase タンパク質を発現した大腸菌の resting cell を用いて、RFP の変換反応を行った。

(2) RFP 変換物の精製および構造解析

Resting cell 変換反応後の変換反応液を、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。得られた化合物に関しては、質量分析および、一次元、二次元の NMR を用いて構造解析を行った。

(3) RFP 変換物の P450 の誘導活性

ヒト薬物代謝酵素である P450 を強力に誘導することが知られている。通常、酵素誘導試験には初代肝細胞を用いるが、ロット間によるばらつき等が懸念されるため、安定な形質を保ったヒト肝癌由来の細胞株 FLCs (Functional Liver Cells) を用いた。培養した FLC-5 及び FLC-7 細胞に、RFP-oxy を任意の濃度で添加し、48 時間後に Total RNA を抽出した。陽性コントロールとして RFP を使用し、また RFP と比較して P450 の誘導能の低い rifabutin を比較用化合物として、RFP-oxy と同様に試験を行った。

得られた Total RNA を用いて、RT-PCR 法によってヒトの薬物代謝酵素である P450 の誘導能を測定した。測定した P450 としては、RFP により主に誘導される CYP3A4 の他に文献上 RFP 添加により誘導することが判明している CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 および CYP2C19 についても RNA の発現を測定した。コントロールとしては、GAPDH を利用した。

(4) RFP 変換物の抗微生物活性

得られた RFP 変換物の抗微生物活性を以下の非検菌を用いて測定した。グラム陽性菌として *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis, *Nocardia farcinica*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, グラム陰性菌として *Escherichia coli*, を用いた。

(5) rifamycinSV, rifabutin, rifapentine の変換物

RFP 変換反応と同様に、*Nocardia* の monooxygenase 遺伝子をクローニングした大腸菌の resting cell を用いた微生物変換反応を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、RFP の変換物を取得するために *N. farcinica* 由来の monooxygenase を大腸菌に導入し実験をおこなっている。したがって“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律”に該当するため、“国立感染症研究所 組換え DNA 実験実施規則”に従い遺伝子組換え実験申請を行い、然るべき拡散防止措置を行使し、研究を行った。

また、研究を進める上で各実験施設の責任者の管理、監督の下に実験を行った。必要に応じて安全主任者の助言や指導を受けた。

C. 研究結果

(1) RFP の変換物

N. farcinica 由来の monooxygenase を導入した大腸菌を用いた resting cell 反応により RFP を変換させた。次に変換反応液を Diaion HP-20 およびシリカゲルのカラムクロマトグラフィーに供し、次に薄層クロマトグラフィーを用いて、掻き取り分取を行った。掻き取ったものを Sephadex LH-20 のカラムクロマトグラフィーにて精製を行い、最終的に約 100mg の RFP 変換物を得た。

得られた RFP 変換物は、RFP よりも極性が増大し、RFP はクロロホルムに可溶であるが、難溶解性に変化していた。また、RFP は水に難溶解性であるが、変換物では可溶化していた。色に関しては、RFP はオレンジ色を呈しているが、RFP 変換物では、赤紫色を呈していた。

(2) RFP 変換物の抗微生物活性に関して

RFP 変換物の MIC を測定したところ、RFP と比較して、抗菌活性の低下がみられた。*Nocardia* 属菌およびグラム陰性菌 *E. coli* において、RFP では抗菌活性を弱いながら示していたが、RFP 変換物では 64 μ g/ml 以上となり、活性が低下していることがわかる。その他のグラム陽性菌では、RFP ももとの MIC 値が高い値であるが、変換物では、活性が 1/1000 程度になっているが、活性は残存

している。

(3) RFP 変換物の P450 の誘導活性

RIF 変換物の P450 の誘導活性に関しては、RT-PCR のより CYP3A4, CYP2C9 および CYP2C19 に関して誘導活性が認められた。比較対象化合物 rifabutin に関しても、CYP3A4, CYP2C9 および CYP2C19 の誘導が認められた。陽性コントロールである RIF に関しては、薬剤の濃度と mRNA の発現量に相関が認められた。また本検出系では、CYP1A2, CYP2B6, および CYP2C8, に関しては、誘導活性は認められなかった。

(4) RFP 変換物の構造

RFP の変換物に関しては、質量分析より分子量が 838 であることが判明した。また、高分解能質量分析より m/z 839.40838 ($[M+H]^+$) であり、 $C_{43}H_{58}N_4O_{13}$ であることが推定された。したがって、RFP (MW823) から分子量 16 増加した化合物であることが判明した。UV スペクトラムにおいては、RFP では UV478 付近に吸収に認められるが、RFP 変換物では UV478 付近に大きな吸収が認められなかった。 1H -、 ^{13}C -NMR の解析から、RFP と RFP 変換物比較すると 34 位のメチル基水素および 1' 位の水素が異なっており、34 位メチル基の水素原子では、低磁場側にシフトしていた。同様に 1' 位の水素においても低磁場側にシフトしていることが観測された。1' 位の炭素に低磁場シフトが観測され、1~10 位までのナフタレン骨格部分の炭素原子のシグナルは非常に弱く観測された。また、 1H - ^{15}N HMBC の測定により、NH (アミド)、3' 位および 6' 位の窒素原子が観測されたが、2' 位の窒素原子のシグナルは検出されなかった。

これらの結果および RFP の結果をもとに、各シグナルを帰属することができた。したがって、ピペラジン骨格の 2' 位の窒素原子に OH が導入された化合物であることが判明した。

(5) rifamycinSV, rifabutin, rifapentine の変換物

RFP の変換反応と同様に、rifamycinSV, rifabutin, rifapentine の変換反応を試みた。

RifamycinSV に関しては、大腸菌を用いた resting cell による変換後、COSMOSIL 75C₁₈-OPEN、Sephadex LH-20 のカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。得られた rifamycinSV 変換物を用いて質量分析を行った結果、rifamycinSV と比較して分子量が 16 増加しており、RFP 変換物と同様に本化合物は酸素原子が導入された化合物であると推測された。得られた rifamycinSV 変換物は、RMY よりも極性が増大しており、UV440nm の吸収

が UV400nm 付近にシフトしていることが、判明した。

'Rifabutin および rifapentine に関しても、RFP と同様に nocardia の monooxygenase により変換されることを確認した。

D. 考察

我々は、*Nocardia* のゲノム中より見出した RFP の monooxygenase を利用し、抗結核薬である RFP の微生物変換によって RFP 変換物を取得した。

構造解析に関しては、ピペラジン骨格の 2' 位に酸素原子が導入された化合物であると考えられるが、ピペラジン骨格に酸素原子が導入された化合物の報告は RFP-6' -N-oxide (合成過程での副産物) がある。この化合物の文献上の結果と本研究において解析した結果では、RFP との比較と同様に、34 位のメチルプロトンの低磁場シフトは観察されていないこと、7' 位のメチルプロトンのケミカルシフトが異なることおよび 6' 位の窒素のケミカルシフトに差があることなど、またその他の物理化学性状から、この化合物とは異なり、新規化合物であることが判明した。

本化合物の抗微生物活性は、RFP と比較して、グラム陽性菌において 1/1000 程度に低下していることが判明したが、抗菌活性が残存していることから、リード化合物として有効であると考えられる。P450 の誘導活性は、CYP3A4, CYP2C9 および CYP2C19 で認められたが、rifabutin と同程度の誘導であり、RFP より誘導能は弱いと推測された。

Rifamycin SV 変換物に関して構造解析が完了していないが、Rifamycin 系化合物において、S-form と SV-form をとることが知られているおり、1) UV スペクトルが異なる、2) sample の色が SV-form ではオレンジだが S-form では紫色を呈する、3) 34 位のメチルプロトンのケミカルシフトが SV-form ではマイナス領域、S-form はプラス領域低磁場シフトをとる、4) NH 水素のケミカルシフトは、S-form と SV-form では異なり、S-form では高磁場側にシフトしている、という点があげられる。したがって、UV440nm の吸収が UV400nm にシフトしていること等から、S-form に変化している可能性があり、ナフタレン骨格の 1 位もしくは 4 位の水酸基がカルボニル基になっている可能性が示唆された。また、rifabutin および rifapentine に関しては、monooxygenase により変換が進むことが判明したことから、今後変換物の解析を行う必要がある。

本研究にて得られた RFP 変換物は、P450 の誘導活性は rifabutin と同程度であることから、リー

ド化合物候補としての可能性を有している。しかし 1/1000 になった抗菌活性の増強が今後の課題である。また、いくつかの rifamycin 系抗生物質の変換物も見いだしたことから、更なる研究により、本研究の目的である抗 HIV 薬と併用可能な薬剤の新規リード化合物の取得を可能にできるものであろう。

E. 結論

N. farcinica のゲノム配列上から見出された monooxygenase を用いて大腸菌の Resting Cell 反応によって RFP 変換物を得た。

この化合物は、質量分析および NMR の結果から RFP に酸素原子が一つ入った化合物であり、構造解析からは、ピペラジン骨格の 2' 位の窒素に酸素原子が取り込まれ、ナフタレン骨格の 4 位が carbonyl 構造になっている化合物であることが判明した。したがって、RFP 変換物は今までに報告のある RFP 類縁化合物とは、どれとも一致しなく新規化合物であった。この RFP 変換物は、RFP と比較して抗菌活性は約 1000 倍程度低下していたが依然として数 $\mu\text{g/ml}$ 程度の活性を有している。また、ヒトの薬物代謝酵素 P450 のヒト肝がん由来の FLC 細胞株を用いた誘導試験では、CYP3A4 の誘導活性を有していた。しかし、rifabutin と同程度の誘導能であり、RFP のよりも若干ではあるが誘導能弱いと推定された。

また、Rifamycin 系抗生物質である rifamycin SV、rifabutin および rifapentine を用いた変換反応を試みたところ、3 剤とも変換することが判明した。本化合物に関しては詳細な解析が今後必要である。

以上のような monooxygenase を用いた rifampicin の変換反応から新規化合物を得ることができた。得られた化合物に関しては、薬剤代謝酵素である P450 を rifabutin と同程度の誘導活性であった。今後の研究の進展により、HIV/TB に使用可能な新規抗結核薬の開発に貢献できるものであると考えられる。

F. 研究発表

1 論文発表

Hoshino Y, Watanabe K, Iida S, Suzuki S, Kudo T, Kogure T, Yazawa K, Ishikawa J, Kroppenstedt RM, Mikami Y.

Nocardia terpenica sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis.

Int J Syst Evol Microbiol. 2007 Jul;57(Pt 7):1456-60.

2 学会発表

(1) Ishikawa, J., Chiba, K., Hoshino, Y., Ishino, K., Kogure, T., Mikami, Y.
Development of a genetic analysis system for *Nocardia* species.

International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Newcastle upon Tyne, U. K.
2007年8月26-30日

(2) Hoshino, Y., Chiba, K., Fukai, T., Igarashi, Y., Mikami, Y., Ishikawa, J.
Identification of the salicylate synthase gene of *Nocardia farcinica* and its role in the biosynthesis of nocobactin.

International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Newcastle upon Tyne, U. K.
2007年8月26-30日

(3) 五ノ井 透, 星野泰隆, 矢沢勝清, 石川 淳, 三上 襄

病原性放線菌 *Nocardia* 属 64 種が産生するシデロフォアの多様性の解析

第 22 回日本放線菌学会大会 (広島) 2007 年 5 月

(4) 千葉和宏, 星野泰隆, 石野敬子, 石川淳
病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるシデロフォア nocobactin の生合成遺伝子の同定

第 81 回日本細菌学会総会 (京都) 2008 年 3 月

(5) 藤井匠子, 千葉和宏, 石野敬子, 星野泰隆, 佐藤浩之, 石川 淳

病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるアミノ配糖体リン酸化酵素遺伝子の同定

第 23 回日本放線菌学会大会 (山梨) 2007 年 7 月

(6) Hoshino, Y., Chiba, K., Fukai, T., Igarashi, Y., Ishino, K. and Ishikawa, J.
Identification of two gene clusters for nocobactin biosynthesis in *Nocardia farcinica*.

UK-Japan Workshop on Genomics of Antibiotic-producing Actinomycetes: Implications and Applications, Tokyo

10月30日-11月1日

(7) 石川 淳, 黒田誠, 関塚剛史, 星野泰隆, 三上 襄

次世代シーケンサーによる *Nocardia terpenica* のゲノム解析の試み

第 3 回日本ゲノム微生物学会

(8) 石野敬子, 千葉和宏, 星野泰隆, 石川 淳
病原性放線菌ノカルジアのシデロフォア生合成遺伝子の細胞障害性への関与

第 82 回日本細菌学会総会 (京都) 2009 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況