

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

ヒト組織・細胞の研究資源としての高度化と公共ヒト組織・  
細胞バンク の利用促進に関する研究  
(H21-政策創薬-一般-008)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

ヒト組織・細胞の研究資源としての高度化と公共ヒト組織・  
細胞バンク 利用促進に関する研究

(H21-政策創薬-一般-008)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所

平成 22 (2010) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告 ヒト組織・細胞の研究資源としての高度化と公共ヒト組織・細胞バンク システム利用促進に関する研究 後藤雄一	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 神経筋疾患患者筋芽細胞の樹立と利用に関する研究 後藤雄一	-----	4
2. 神経筋疾患患者から樹立した筋芽細胞を用いた病態・治療研究 西野一三	-----	6
3. 医療機関内ヒト組織採取・提供システムの検討 小林真一	-----	9
4. ヒト組織の研究資源高度化と利用促進のためのパネル化 熊井俊夫	-----	12
5. 公的バンクへのヒト肝組織及び肝細胞提供システムの構築 大段秀樹	-----	15
6. 不死化ヒト筋疾患由来筋細胞の樹立とその有用性に関する研究 橋本有弘	-----	18
7. 効率の良い初代ヒト培養細胞の不死化法の開発 清野 透	-----	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	27

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）  
総括研究報告書

ヒト組織・細胞の研究資源としての高度化と  
公共ヒト組織・細胞バンクシステムの利用促進に関する研究

主任研究者 後藤 雄一（国立精神・神経センター神経研究所）

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1千に達した。それらを用いた研究成果が報告できた。また代表的な筋疾患の不死化筋芽細胞の作製に成功し、その増殖能、分化能などを検討した。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を行い、そのノウハウの蓄積が他の試料提供機関の参考になると考えられた。

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) 小林真一 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (3) 熊井俊夫 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (4) 大段秀樹 広島大学大学院先進医療開発科学講座  
外科学
- (5) 橋本有弘 国立長寿医療センター研究所
- (6) 清野 透 国立がんセンター研究所

1. 目的

本研究では、ヒト組織を公共バンクに分譲し、広く研究者に利用してもらうことが目的である。国立精神・神経センターに登録されている筋芽細胞から代表的な疾患の不死化細胞を構築し、公共バンクに分譲する。また将来我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を完成させるとともに、提供施設間のネットワークなどを通じて本事業の効率化や省力化を図ることを目的としている。

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) 肝組織等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。

また、広島大学において手術で得られた肝組織及び肝細胞をヒューマンサイエンス研究資源バンクに提供する。

イ. 小腸での CYP 遺伝子多型と mRNA 発現量の関係  
臍頭十二指腸切除外科手術により摘出された非病変部の小腸を用いて、CYP 遺伝子タイピングを行う。  
ウ.

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。

(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、承認を得て行った。

### 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21年12月末現在で、総凍結筋は11,469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1034検体に達した。これらの試料を用いて、遠位型ミオパチー等の筋疾患の病態、治療研究の成果が上がった。

#### 2) 筋芽細胞の純粋化、不死化

代表的な筋疾患患者由来筋芽細胞に、変異CDK4+Cyclin D1+hTERTを導入して細胞を不死化させた。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ることを確認した。

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、公共バンク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

聖マリアンナ大学では今年度は47例の肝、小腸組織が、学内、HSRRBへ提供された。本事業における同意取得率は87%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。また広島大学では、肝組織検体2検体をHS財団に提供した。

これら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) 小腸を用いたCYP遺伝子多型とmRNA発現量の関係  
CYP遺伝子多型の頻度は、CYP3A4\*1/\*1が88%、CYP3A5\*1/\*1が34%、\*1/\*3が31%、\*3\*3が34%であった。CYP2C19\*1/\*1が21%、\*1/\*2が55%、\*1\*3が18%、\*2\*3が6%であった。CYP2D6\*1/\*1が23%、\*1/\*10が33%、\*10\*10が40%、\*5\*10が3%であった。CYP2\*9が\*1/\*1が90%、\*1/\*3が9%であった。

また小腸において各mRNAの発現パターンはCYP3A4が62.2%、CYP2C19は16.2%、CYP2C9は11.7%、CYP2D6は5.2%、CYP3A5は4.8%、CYP1A2は20%であった。

#### 5) ヒト肝細胞の公共資源化

広島大学では、日本人の肝細胞を本邦で初めて公的資源化することに成功し、今年度は1検体をHS財団に提供した。

### 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、不死化筋芽細胞樹立法の有用性の確認、ヒト肝細胞のHS財団への提供は研究成果である。

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。この点は、分担研究者の橋本が研究を継続しており、純粋化をさらに進めてゆく。利用者からみたヒト組織に関するアンケート調査はまだ進んでいない。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：増井徹)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。不死化細胞のパネル化を進めることで新しい研究成果が出てきている。。

#### 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と公共バンクへの提供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可能である。また、肝細胞については、HS 財団では取り扱か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。

#### 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行った。

#### E. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 神経筋疾患患者筋芽細胞の樹立と利用に関する研究

分担研究者 後藤 雄一（国立精神・神経センター神経研究所）

**研究要旨** 国立精神・神経センター神経研究所及び武蔵病院において、平成11年から患者由来の筋芽細胞（及び線維芽細胞）の樹立を行ってきた。本研究が開始される前（平成20年末現在）ですでに954検体となっていた。平成21年1月から12月までの間に80検体を追加し、総計1034検体となった。p16/RB経路の不活化とテロメラーゼの活性化による代表的な筋疾患筋芽細胞の不活化を行い、筋芽細胞集団の純粋化、分化誘導などの高度化に道を開くとともに、公共バンクへの試料提供を積極的に進める準備ができた。

### A. 研究目的

本研究は、わが国に見合った実状下でヒト組織を採取し、同組織を適切にかつ十分量多くの研究者に非医療用ヒト試料として利用できるよう保存・管理するためのシステム構築のための検討を行う。全体構想の中で、特に筋芽細胞に焦点を当て、不活化、保存法の技術開発をさらに高度化させることで、あらゆる神経・筋疾患の筋芽細胞をリサーチ・リソースとして確保し、創薬のための有効性・安全性についての研究を推進させることを目的としている。

### B. 研究方法

#### 1. 筋芽細胞登録の推進と研究者への供与

国立精神・神経センターでは、共神経筋疾患の診断システムと研究資料保存システムを構築し活動している。すでに1万件を超える患者登録と凍結筋保存がある。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、また共同研究として研究者に供与する。

#### 2. 不活化筋芽細胞の樹立とパネル化

p16/RB経路の不活化とテロメラーゼの活性化による代表的な疾患の筋芽細胞の不活化を行い、パネル化を行う。

（倫理面での配慮）

診断、研究使用についてあらかじめインフォーム

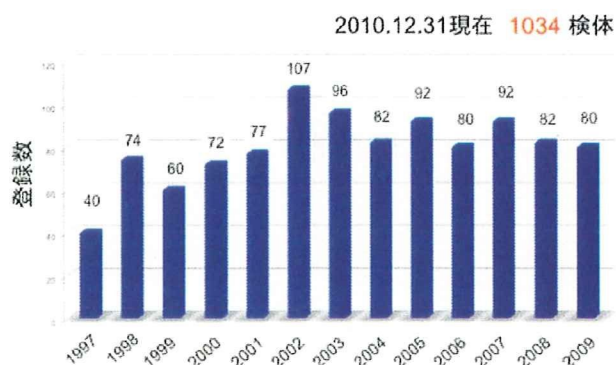
ドコンセントを得た患者の骨格筋を利用する。そのフォームは、国立精神・神経センター倫理委員会武蔵地区部会で承認されている。また筋芽細胞データベースへの入力情報は、スタンドアローンのPCにて担当者である後藤が管理している。

### C. 研究結果

#### 1. 筋芽細胞登録の推進と研究者への供与

平成21年1月～12月までに新たに80検体の筋芽細胞の樹立を行った（総数で1034検体）。またその多くは、皮膚由来の線維芽細胞の樹立も同時に行っている。

### 筋芽細胞の登録数



また、疾患の分類としては、以下に示すように、筋ジストロフィーを中心に、各種筋疾患を網羅することができている。Duchenne型筋ジストロフィーだけでも、30種類以上の種々の遺伝子変異の異なる筋芽細胞を登録した。疾患構成については、

昨年報告したものと大差ない。

## 保存されている筋芽細胞の内訳

筋ジストロフィー	235	}	合計
DMD	70		
BMD	32		
LGMD	46		
FCMD	24		
OPMD	11		
その他	52		
神経原性筋萎縮症	27		
ミトコンドリアミオパチー	135		
遠位型ミオパチー	24		954検体
先天性ミオパチー	106		(2008.11.30 現在)
その他	168		
診断不明	220		
未診断	39		

また共同研究として研究者に筋芽細胞を供与した。rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチー、Urlich 病、Nonaka 病（国立精神・神経センター神経研究所、西野一三部長）、Duchenne 型筋ジストロフィー（国立精神・神経センター神経研究所、武田伸一部長）、ミトコンドリア脳筋症（国立精神・神経センター神経研究所、後藤雄一部長）などである。

### 2. 不死化筋芽細胞の樹立とパネル化

代表的な筋疾患として、筋ジストロフィー（Duchenne 型、Becker 型、福山型）、ミトコンドリア病（3243 変異、8993 変異、欠失型）、稀少な筋疾患である還元型ミオパチー、巨大ミトコンドリアを有するミオパチー、X 連鎖性自己食空砲ミオパチーの筋芽細胞を不死化した。

不死化した筋芽細胞は、血清濃度を下げること容易に筋管細胞への分化が誘導できることを確認した。

### D. 考察、結論

登録培養細胞の数は順調に伸び100例を超えた。これらの研究資源を有効に活かすことが重要である。その意味で、不死化細胞のパネル化と iPS 細胞の樹立への貢献は、本資源の有効活用の起爆剤となる。

本研究で採用している不死化処理は、分化能を保持した細胞として取り扱えられるもので、たとえば、筋分化の変調によって起きていると考えられる一群の先天性ミオパチー研究に有用な研究資源となり得る。また、筋芽細胞から脂肪細胞、

骨芽細胞、軟骨芽細胞への分化能も保たれており、分化に関連する研究にも十分対応できる。

さらにこれらの筋芽細胞（同時に採取している線維芽細胞）から iPS 細胞を作製することで、心筋症を伴う筋疾患における心筋障害などの細胞生理学的研究にも利用できると考えられる。

このような情報を広く研究者に広報して、共同研究を推進してゆくことが重要と考える。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Komaki H, Nishigaki Y, Fuku N, Hosoya H, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Wakamoto H, Koga Y, Tanaka M: Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1800, 313-315, 2010

#### 2. 学会発表

- 1) Goto Y: The 3243 mutation : From molecular characterization to clinical implications. 10th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Daegu, Korea, 6.10, 2009
- 2) Hatakeyama H, Sawa K, Goto Y: A systematic cell-based analysis for the patients with cytochrome c oxidase deficiency. The 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, USA, 10.20-24, 2009
- 3) Hatakeyama H, Sawa K, Goto Y: Functional threshold in mitochondria with cytochrome c oxidase deficiency: A cell-based diagnostic approach for mitochondrial diseases. The 6th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, Taipei, TAIWAN, 10.30-11.1, 2009

### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 「筋レポジトリの拡充と筋芽細胞を用いた病態・治療研究」

研究分担者 西野 一三

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 部長

### 研究要旨

国立精神・神経センターでは、年間約 500 の凍結生検筋をエントリーしており、保存している総凍結筋検体数は平成 21 年 12 月末までに 11469 となった。数年前より、培養筋の保存も開始し、平成 21 年 12 月末までに 1064 検体となった。本筋レポジトリの中から培養検体 10 検体が不死化のために供与された。本レポジトリを活用し、多くの重要な研究成果が発表されてきており、医学発展への貢献度は計り知れない。

### A. 研究目的

国立精神・神経センターでは、武蔵病院 DNA 診断・治療室を窓口としており、筋病理を中心とした統合的サービスを提供している。診断後の検体は、将来の再検査の可能性と神経・筋疾患の病態解明と治療法開発を目指した研究に活用するために生検筋レポジトリとして保存している。1997 年からは細胞生物学的な検査の必要性も踏まえて培養筋も保存している。本研究では、特に培養筋を中心とした活用方法の実態について検討した。

### B. 研究方法

総検体数および年間検体数を明らかにする。また、実際にどのような研究に役立てられているのかを、特に培養筋に重点を置き、明らかにする。

（倫理面への配慮）

研究に使用される全ての検体は、国立精神

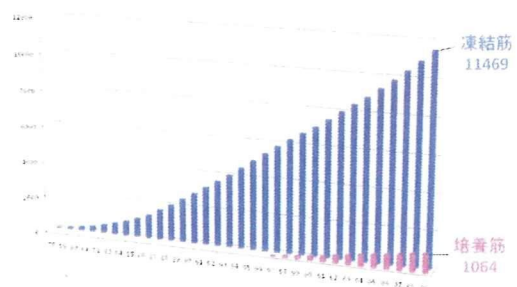
・神経センター倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可（インフォームドコンセント）を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用している。

### C. 研究結果

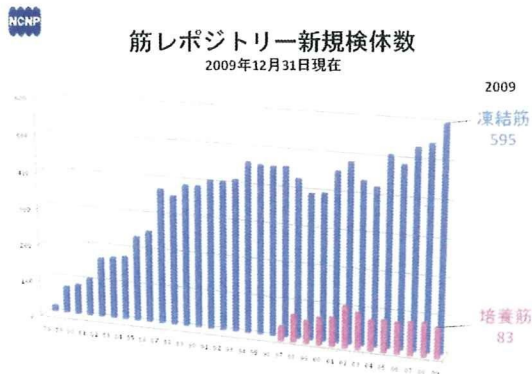
凍結筋総検体数は、平成 21 年 12 月 31 日までの凍結筋総検体数は、11469 検体に達した。



筋レポジトリ蓄積検体数  
2009年12月31日現在



平成 18 年、19 年、20 年、21 年の凍結筋検体増加数は、それぞれ 483 検体、531 検体、543 検体、595 検体であり、平成 21 年は過去最高の新規検体数を記録した。



診断目的で全検体について、約 80 枚の連続切片を作製し、17 種類の組織化学染色を行っている。このうち、特に ATPase 染色に関しては、10 枚以上の連続切片を作製して、酸性側・アルカリ側それぞれ最低 5 段階の漸増 pH 条件下で染色を行っている。さらに、筋ジストロフィーの可能性のあるものに関しては、18 種類の抗体を用いた免疫組織化学染色が行われ、見逃しの少ない高度な診断システムが組み立てられている。本レポジトリ-検体を用いて、これまで様々な研究が行われてきた。そのうちのひとつとして、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) 患者培養筋でのシアル酸化合物の有用性検討が挙げられる。我々は、DMRV 患者筋ではシアル酸量が低下していることに加え、GNE 代謝産物の投与によりヒト培養筋でのシアル化状態を回復することが可能であることを確認した。しかしモデルマウスへの投与においては、シアル酸量は正常の 60-70%程度にしか回復しなかった。そこで、より強力にシアル化を回復させる薬剤の開発が求められる。我々は各種 GNE 代謝産物とその誘導体のシアル化回復効果を培養筋で調べ、Ac4ManNAc が優れた効果を示すことを明らかにした。

## D. 考察

国立精神・神経センターにおいて保存されているヒト骨格筋レポジトリ-は、極めて質の高い診断システムと表裏一体のものであり、単なる骨格筋のバンクでなく、付加価値の極めて高いレポジトリ-である。その有用性が改めて確認された。

今後は、不死化に成功した筋芽細胞を用いた研究を積極的に進めていく予定である。

## E. 結論

国立精神・神経センターのヒト骨格筋レポジトリ-は、質・量ともに世界最高水準のものであり、日本が世界に誇るべきシステムである。今後は、不死化筋芽細胞の活用法に関する検討が必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I: A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI. *Brain Dev.* 31: 465-468, 2009

Shalaby S, Mitsuhashi H, Matsuda C, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Defective Myotilin Homodimerization Caused by a Novel Mutation in MYOT Exon 9 in the First Japanese Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A Patient. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68:

701-707, 2009

Mimaki M, Hatakeyama H, Ichiyama T, Isumi H, Furukawa S, Akasaka M, Kamei A, Komaki H, Nishino I, Nonaka I, Goto YI: 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

Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*. 5: 795-804, 2009

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest*. 119: 2623-2633, 2009

## 2. 学会発表

Nishino I: The Japanese families. ENMC XMEA and related disorders workshop, Naarden, Netherland, 6.19, 2009

Nishino I: Distal vacuolar myopathy with rimmed vacuoles. ENMC XMEA and related disorders workshop, Naarden, Netherland, 6.20, 2009

Nishino I: Congenital muscular dystrophies. 19th World Congress of Neurology, Education Program: Neuromuscular Disorders, Bangkok,

Thailand, 10.25, 2009

Nishino I: Muscle pathology. 19th World Congress of Neurology, Workshop: Diagnostic Approaches in Neuromuscular Diseases, Bangkok, Thailand, 10.25, 2009

Nishino I: Myopathy: update in diagnosis and treatment. 19th World Congress of Neurology, Symposium: Child Neurology 1, Bangkok, Thailand, 10.27, 2009

Nishino I: Approach to Congenital Myopathies. 8th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) Scientific Meeting, Mumbai, India, 5.24, 2009

Nishino I: Sialic Acid Treatment of Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles (DMRV). 9th Annual Asian and Oceanian Myology Center Scientific Meeting, Seoul, Korea, 3.26, 2009

西野一三, Malicdan MCV, 門間一成, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療法開発. 第50回日本神経学会総会, 仙台, 5.21, 2009

西野一三, Malicdan MCV, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療法開発. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.10, 2009

## 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

## 医療機関内ヒト組織採取・提供システムの検討

研究分担者 小林真一 (聖マリアンナ医科大学医学部 薬理学 教授)

### 研究要旨

日本におけるヒト組織バンク構築のためのシステム効率化を聖マリアンナ医科大学におけるヒト組織の研究資源化をバンクのモデルとして行った。システムの人的資源の拡充と各部門との連携強化をはじめとして各部門のシステムの効率化が図られた。今年度は収集された組織数の増加に伴い疾患別の検体の提供も可能となり、資源としての高度化がはかられた。これらの検討を通し、薬物の効果・副作用などを評価検討する研究および肝疾患の発症と治療に関する研究への利用にも適したヒト組織の学内バンキングシステムが構築された。

### A. 研究目的

医薬品の代謝には肝臓の薬物代謝酵素が大きな役割を果たしていることが知られている。この薬物代謝酵素には種差のあることが知られており、動物ではなくヒトでの薬物代謝酵素の働きに関する研究が必要である。また薬物の効果や副作用に重要に関わっている肝薬物代謝酵素の遺伝子多型に人種差のあることが明らかになっており、その違いを調べるには、欧米人のものと日本人の肝臓組織を用いた検討が必要になっている。さらに最近では小腸にも薬物代謝酵素が存在し、小腸における薬物代謝が注目されている。

欧米では脳死患者から得られた組織の一部が移植不適合になり、広く研究利用されているが、日本では法的に認められていない。そこで、日本人の組織を研究に用いるためには外科手術などで摘出された残余組織のうち、病理検査に用いない部分を利用する以外今のところ方法がない。

聖マリアンナ医科大学 (以下、本学) で

は平成 13 年より学内ヒト組織バンクシステムを構築し、日本人の組織を研究利用するためのシステム構築をすべく検討してきた。また財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒト組織公共バンク(以下、HSRRB)への効率的なヒト組織提供および資源の高度化についても検討してきた。

このヒト組織バンクのシステム効率化と資源の系統的な整理が臨床研究にこれら組織を効率的に利用するバンクシステムの利用価値向上にかかせない。そこで今回、今後のヒト組織バンクシステムの充実と拡大に向けての基盤整備を検討した。

### B. 研究方法

(本年度バンク事業)

本年度もあらかじめCRCが説明文書と口頭で十分に医師の説明を補足し、文書同意を得た患者から手術で切除された肝組織で病理検査に影響を与えない部分を学内に保存し、また同時にHSRBBへの提供に同意された肝組織はHSRBBに提供のための

準備をした。

昨年度から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関係する外科医、内科医、病理医と検討してきた。本年度はこのシステムについて検証し、問題点を整理するとともに改善を行った。

#### (倫理面への配慮)

本学においては、臨床研究に関わるいくつかのガイドラインに則した生命倫理委員会があり、本研究におけるヒト組織の改善と研究利用については生命倫理委員会で審査、承認された。対象は、治療目的で外科手術により肝組織の切除を受ける患者ならびに膵臓癌などで膵頭十二指腸切除術を受ける患者である。事前に臨床研究コーディネーター（CRC）が十分な補助説明をした後、医師が文書による同意を得た。患者の個人情報、個人情報管理者により連結可能または不可能匿名化を行い、施錠付き保管庫にて個人情報の厳密な管理を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 本年度バンク事業

本年度は 47 件の肝、小腸組織を学内、HSRRB バンクへ提供した。うち、HSRRB への提供同意は 31 件であった。同意取得率は学内向け、HERBB とも 87% と同じであった。

#### 2. 肝組織採取システムの効率化

本事業も年数を重ねることで消化器・一般外科、消化器・肝臓内科、診断病理の医師にシステムが浸透し、理解と協力が得られやすくなった。特に消化器・一般外科の医師には本システムの浸透度が高く、手術

前の説明では医師が事前にバンク事業の簡単な説明も行っており、CRC への説明の引き継ぎが順調に行われるようになった。

また小腸組織の採取システムについても検討を加えた。膵頭十二指腸切除術では小腸部分は直接病理診断には関係ないため、特に内科医、病理医などの支援を受けずに小腸組織の採取とバンキングが可能となった。

### D. 考察

本年度は 47 件の組織のバンクへの提供があった。例年 45～57 件程度の提供で推移していることから本年度の提供数もほぼ例年通りであったと思われる。また、同意取得率も学内向けで 110 件（87%）と例年通りであった。この 3 年間の通算で肝臓組織が 70 件提供された。

バンクの検体数が増えることにより原疾患別（良性腫瘍、転移性肝臓癌、非ウイルス性原発性肝臓癌、B 型肝炎由来肝臓癌、C 型肝炎由来肝臓癌など）の肝組織が収集でき、臨床研究のバリエーション（ヒト試料の付加価値）が増えた。臨床研究の大きな時間的障壁として各群のヒト組織の収集をより短時間に行えるかが重要である。本バンクでは検体数の増大と多様な原疾患の収集により、さまざまな研究への資源価値の向上に寄与していると考えられる。

これまでと同様、問題点として本業務に関するマンパワーの不足が挙げられた。例年 4～5 件程度が採取システムにおけるマンパワー不足あるいは CRC 不在のために提供が見送られることがある。現在は大学の勤務医も減少しており、バンクシステムの増員も円滑には進まない状況が続いている。

今後、各診療科との連携をさらに強めること  
によって人的資源の効率的活用を試みて  
いきたい。

HSRRB 用に提供された肝組織のうち、  
HIV 検査の行われていない検体について送  
付できない状態が続いている。今年度外科  
への本問題の改善提言を行った。その結果、  
一部外科医は全例に HIV 検査を行って  
いることが明らかとなった。この検査は本  
事業とは関係なく、一般的な医療の中で行  
われていたことであり、今後各手術を行う  
全例の患者に対する HIV 検査を徹底して  
いくことが外科医の間で確認された。今後  
本事業に提供される組織も HIV 検査を受  
けた検体が多くなり、HSRRB に提供でき  
る組織も増加する可能性が示唆された。

#### E. 結論

本年度は肝組織採取システムの人的資源や  
協力関係について問題点の整理を行った。  
また、各部門との連携を強化した。

#### F. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会発表)

なし

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

## ヒト組織の研究資源高度化と利用促進のためのパネル化

研究分担者 熊井俊夫(聖マリアンナ医科大学大学院 遺伝子多型・機能解析 准教授)

### 研究要旨

ヒト組織を用いた研究は多岐にわたり、ヒト組織バンクの研究利用資源としての高度化が要求される。今回、学内ヒト組織バンク向けに保存されている小腸組織の薬物代謝酵素 (CYP) の遺伝子多型と mRNA 解析を行い、遺伝子多型情報と mRNA 情報のパネル化を検討することにより日本人小腸 CYP についての初めての基礎データとして研究資源の高度化を行った。

#### A. 研究目的

ヒト組織の研究利用の重要性は広く認識されている。本邦では臓器移植法の問題もあり、その利用は手術などで摘出された組織のうち、病理検査で用いない残余部分を利用する他はない。これまでにヒト組織の研究利用は主に肝臓が中心であった。最近小腸にも薬物代謝酵素が存在し、初回通過効果に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。このため、肝臓のみならず小腸の研究も重要となった。

聖マリアンナ医科大学 (以下、本学) では 2001 年より学内ヒト組織バンクシステムを構築し、日本人の組織を研究利用するためのシステムを構築検討してきた。また日本人の組織を財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒト組織公共バンク (以下、HSRRB) へ効率的に提供することについても検討してきた。ヒト組織は本学生命倫理委員会の承認を得た上で収集し、研究に利用している。本学大学病院において膵頭十二指腸切除手術適応患者に十分に説明文書と口

頭で説明後、文書同意を得て、手術時に摘出した病理検査に用いない残余小腸組織の一部を研究用に採取している。

本学では 2001 年度よりヒト組織提供医療機関としての基組織盤整備事業 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) を推進してきた。この事業により学内に保存されているヒトを研究資源としてさらに付加価値を高める必要性がある。

小腸における日本人の詳細なデータはまだ十分とはいえない。そこで、本学で蓄積しているヒト小腸組織の研究資源高度化を目指して、小腸における薬物代謝酵素 (CYP) の遺伝子多型と mRNA 発現パターンについて検討した。

#### B. 研究方法

(小腸組織での CYP 遺伝子多型と mRNA 発現量の関係)

本学大学病院にて、膵頭十二指腸切除術施行予定の患者に、本研究について文書を用いて説明し、同意の得られた 35 名を対象とした。平均年齢は  $62.7 \pm 1.7$

歳(51歳～81歳)で、男性25人、女性10人であった。疾患は膵臓癌：12人、胆管癌：13人、十二指腸乳頭部癌：8人、膵管内乳頭腫瘍：2人であった。手術により摘出された組織のうち、非病変部位を直ちに液体窒素にて凍結し、実験に供するまで-80℃で保存した。Genomic Prep™ cells and tissue DNA Isolation kit(GE Healthcare)を用いて、遺伝子多型については特異的なプライマーを用いたPCR法を施行し、電気泳動し遺伝子多型を同定した。mRNA抽出キット RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega)を用いてmRNAを抽出した。RT反応後、リアルタイムPCR法にてmRNA量を測定し、GAPDHで補正した。

(倫理面への配慮)

本学においては、倫理指針等のガイドラインに則した生命倫理委員会があり、本研究はその生命倫理委員会にて審査、承認された。対象は治療目的で外科手術により事前に臨床研究コーディネーター(CRC)が十分な補助説明をした後、医師が文書同意を得た。患者の個人情報個人情報管理者を置き、連結可能または不可能匿名化処置を行い、個人情報の厳密な管理を行った。

## C. 研究結果

### 1. 小腸組織での遺伝子多型関係

今回の小腸における各薬物代謝酵素各種遺伝子多型素によって差が見られた。CYP3A4\*1/\*1が88%、CYP3A5\*1/\*1が34%、\*1/\*3が31%、\*3\*3が34%で

あった。CYP2C19\*1/\*1が21%、\*1/\*2が55%、\*1/\*3が18%、\*2\*3が6%であった。CYP2D6\*1/\*1が23%、\*1/\*10が33%、\*10\*10が40%、\*5\*10が3%であった。CYP2\*9が\*1/\*1が90%、\*1/\*3が9%であった。

小腸において各mRNAの発現パターンはCYP3A4が62.2%、CYP2C19は16.2%、CYP2C9は11.7%、CYP2D6は5.2%、CYP3A5は4.8%、CYP1A2は20%であった。

## D. 考察

これまでも小腸において薬物代謝酵素CYP3A4の発現についてはいくつかの報告がなされていた。しかしながら小腸で他のCYP分子種発現についての研究は世界的にもほとんどなされてこなかった。今回の日本人の小腸における研究は世界的にも価値のあるデータとなった。各遺伝子多型の発現パターンについてCYP3A4、CYP3A5、CYP2C19、CYP2\*9、CYP2D6、CYP1A2はこれまでに肝臓などで報告されたパターンと一致していた。一方日本人小腸ではmRNA発現パターンに関し日本人での初めてのデータが明らかになった。即ちCYP3A4は肝臓での値に比べて62.2%と高く、小腸でのCYP3A4の重要性が再確認された。プロトンポンプ阻害薬の代謝に関係するCYP2C19は16.2%であった。小腸でプロトンポンプ阻害薬が代謝される可能性について今まで明らかになっておらず、日本人小腸における重要な結果といえる。非ステロイド性抗



炎症薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬の代謝に関係している CT2C9 は 11.7%、向精神病薬や鎮咳薬の代謝に関係する CYP2D6 は 5.2%であった。肝臓における発現パターンとは異なり、これら日本人小腸での CYP 分子種のデータは日本で初めてのものと言える。

#### E. 結論

学内ヒト組織バンク向けに保存されている小腸組織について各遺伝子多型と mRNA 発現量の関係について明らかにした。

#### F. 研究発表

1. 誌上発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

## 公的バンクへのヒト肝組織及び肝細胞提供システムの構築

分担研究者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

**研究要旨** 人種間には多くの酵素発現パターンに差が存在することから、我が国でのヒト組織を用いた創薬研究には日本人の組織が必須である。研究資源としてのヒト組織の入手は手術摘出検体がふさわしいとの見解（厚生科学審議会答申「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」、さらに遺伝子解析研究のガイドライン（三省合同ガイドライン；平成13年3月29日）が示されるなか、これらの見解、ガイドラインの整合性を踏まえたヒト組織提供システムおよび公共バンク構築のための倫理的問題、技術的問題について検討してきた。この分担研究ではこれまで行ってきた手術検体からの公的機関への肝組織提供（ヒト肝細胞・組織の公的資源化）の継続と、研究資源確保システムのモデル化と試料提供施設間のネットワーク化などを視野に入れた効率化、省力化について検討する。また、組織・細胞の取得から公共組織バンクを介した研究利用にまでに関わる倫理的、医療経済的問題についても検討を加える。

### A. 研究目的

ヒト組織、特に肝組織・肝細胞に関する手術検体を適正に提供できるシステムの構築と適応の拡大、普遍化に向けた可能性、倫理的問題、技術的問題について検討する。

### B. 研究方法

これまで正常ヒト肝細胞を利用した研究の経験を活かし、手術等で摘出されたヒト肝組織及び分離した肝細胞を、公的なヒト組織バンク（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、HSRRB）へ提供する基盤整備を行った。本研究でも同様に HSRRB への組織提供を継続して行う。その上で下記の検討を行う。

1. 手術から得られた肝組織・肝細胞を、提供医療機関ごとに、組織採取から公共バンクへの提供までのシステムを完成させる。
2. 研究資源としての付加価値を高める肝組織処理法などを検討する。
3. 公共ヒト組織バンクでは取り扱わない感染組織などについての特異な試料提供や、稀有な

肝疾患症例の検体としての有用性についての情報等を発信する。

（倫理面の配慮）広島大学病院の全入院患者を対象にした病理検体の研究・教育利用の理解と同意を得るシステム（包括的同意）の継続利用、HSRRB への組織提供に関するヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に準じた倫理審査の承認、院内病理医との関係を継続する。

### C. 研究結果

1. HSRRB への肝組織・細胞提供の継続  
転移性肝腫瘍 HSRRB 提供への承諾を得、肝組織及び肝細胞として提供可能であったヒト肝組織2検体、ヒト肝細胞1検体を HSRRB へ提供した。
2. 稀有な肝癌症例（胆管細胞癌、混合型肝癌）からの細胞分離、培養の試み  
胆管細胞癌2症例、混合型肝癌1症例の癌組織からの細胞分離を試みた。preliminary な試みであり、効率的な細胞採取法、長期培養法の確立を今後検討する。

## D. 考察

組織提供者からはヒト組織研究利用の重要性の理解と協力が得られた一方で、社会一般のヒト手術検体の研究利用の有用性の理解は十分とは言えず、学会、各種情報機関誌、ホーム・ページや市民公開講座などを通じた社会への啓発活動行う必要がある。また、これまで行ってきた基盤整備をもとに、手術検体全般（癌組織）を公的資源化して、新たな研究利用体系を拡充することも必要であろう。

大腸癌化学療法後の肝転移手術症例の増加に伴い、背景肝が CASH (chemotherapy associated steato hepatitis) の病態を合併した症例が増え、研究検体として益々価値の高いものになっている。また、近年 NASH(non alcoholic steato hepatitis)からの肝細胞癌の発癌症例が増加し、その病態解明から発癌のメカニズムの解析に注目が集まっている。当大学でも感染症を背景としない NASH からの肝細胞癌への発癌症例数が増加する傾向にあり、今後貴重な検体として公的資源化を進めていく必要があると思われた。

## E. 結論

ヒト肝組織・肝細胞を公的なヒト組織バンクへ提供に関して実践を重ねる一方で、今後これまでに構築したシステムの適切化、普遍化を進めて、我が国の公的バンクへの新たな組織提供医療機関のすそ野を拡げる必要がある。これは日本の生命科学発展に寄与する重要な研究基盤整備となる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) M. Ohira, M. Ishifuro, K. Ide, T. Irei, H. Tashiro, T. Itamoto, K. Ito, K. Chayama, T. Asahara, H. Ohdan : Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients: A concept for predicting persistent thrombocytopenia. Liver Transplantation, 2009, 15(2) :208-215
- 2) K. Oishi, T. Itamoto, T. Kobayashi, A. Oshita, H. Amano, H. Ohdan, H. Tashiro, T. Asahara :

Hepatectomy for hepatocellular carcinoma in elderly patients aged 75 years or more. Journal of Gastrointestinal Surgery 13(4) :695-701, 2009

- 3) H. Tahara, Y. Tanaka, K. Ishiyama, K. Ide, M. Shishida, T. Irei, Y. Ushitora, M. Ohira, M. Banshodani, H. Tashiro, T. Itamoto, T. Asahara, M. Imamura, S. Takahashi, K. Chayama, H. Ohdan : Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. Transpl Int, 2009, 22(8) :805-813
- 4) Y. Ushitora, H. Tashiro, T. Ogawa, Y. Tanimoto, S. Kuroda, T. Kobayashi, Y. Miyata, T. Itamoto, T. Asahara, H. Ohdan : Suppression of hepatocellular carcinoma recurrence after rat liver transplantation by FTY720, a sphingosine-1-phosphate analog. Transplantation, 2009, 88(8) :980-986
- 5) M. Ohira, K. Ishiyama, Y. Tanaka, M. Doskari, Y. Igarashi, H. Tashiro, N. Hiraga, M. Imamura, N. Sakamoto, K. Chayama, T. Asahara, H. Ohdan : Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. The Journal of Clinical Investigation, 2009, 119(11) : 3226-3235
- 6) A. Oshita, Bachellier P, Rosso E, Oussoultzoglou E, Lucescu J, Asahara T, Jaeck D. : A new technique for reconstruction of the middle hepatic vein without graft interposition: the digging technique. Hepatogastroenterology, 56(94-95) :1507-1510, 2009
- 7) H. Amano, H. Tashiro, T. Itamoto, A. Oshita, H. Niitsu, H. Ohdan, T. Asahara: Successful living donor left liver transplantation by using liver graft with multiple large cysts: a case report. Transplant Proc. 41(9) :3923-3926, 2009
- 8) H. Ohdan : Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. Clin Pharmacol Ther, 2010, 87(1) :23-6

- 9) M. Banshodani, K. Ishiyama, H. Amano, H. Tashiro, K. Arihiro, T. Itamoto, H. Ohdan: A case of hepatic angiomyolipoma with minimal intratumoral fat content. Case Report in Gastroenterology, 2010, in press.
- 10) H. Tahara, K. Ide, N. B. Basnet, Y. Tanaka, H. Matsuda, C. Takematsu, Y. Kozutsumi, H. Ohdan: Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. Journal of Immunology, 2010, in press
- 11) 大段秀樹, 田中友加, 大平真裕, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田代裕尊, 板本敏行, 茶山一彰, 浅原利正: C型肝炎肝移植患者のアロ免疫応答とC型肝炎ウイルス量の関係. 今日の移植, 2009, 22 (1):9-12
2. 学会発表
- 1) 田原裕之, 田中友加, 井手健太郎, 伊禮俊充, 大平真裕, 番匠谷将孝, 田代裕尊, 板本敏行, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰, 大段秀樹: (サージカルフォーラム) 生体肝移植後のB型肝炎ワクチン療法奏功に関与する因子の検討. 第109回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 2009. 4. 2-4
- 2) H. Ohdan, T. Onoe, M. Banshodani: (Symposium) Liver sinusoidal endothelial cells tolerize alloreactive T cells via MHC class II recognition liver transplantation. Joint Conference of the 10<sup>th</sup> Biannual Cell Transplant Society Congress and the 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society for Japan Organ Preservation and Medical Biology, Okayama (Japan), 2009. 4. 20-21
- 3) M. Ohira, K. Ishiyama, T. Asahara, K. Chayama, H. Ohdan: Adoptive Immunotherapy with Liver Allograft-Derived NK/NKT Cells: A New Paradigm for Inducing Anti-HCV Response after Liver Transplantation. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A. ), 2009. 5. 30-6. 3
- 4) H. Tazawa, T. Irei, Y. Igarashi, H. Tashiro, T. Asahara, H. Ohdan: Successful use of an immunosuppressive regimen aimed at temporally depleting B cells and blocking B-1 cell differentiation in ABO-incompatible liver transplantation. American Transplant Congress 2009, Boston, (U. S. A. ), 2009. 5. 30-6. 3
- 5) M. Doskali, M. Ohira, K. Ishiyama, Y. Tanaka, T. Asahara, K. Chayama, H. Ohdan: Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3+CD56+ Cells for inducing anti-HCC and anti-HCV immune-Activity in liver transplantation recipients. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A. ), 2009. 5. 30-6. 3
- 6) H. Tahara, Y. Tanaka, H. Tashiro, M. Imamura, S. Tahahashi, K. Chayama, H. Ohdan: Successful Hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A. ) 2009. 5. 30-6. 3
- 7) M. Banshodani, Y. Igarashi, Y. Tanaka H. Ohdan: Evidence for tolerizing alloreactive T cells by liver sinusoidal endothelial cells in a liver endothelium repopulation in vivo model. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A. ), 2009. 5. 30-6. 3
- 8) T. Irei, H. Ohdan: CD1D Deficiency Abrogates antibody production against blood group carbohydrates but does not impede that against xenogeneic carbohydrate determinants. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A. ), 2009. 5. 30-6. 3
- 9) Y. Igarashi, M. Banshodani, T. Irei, Y. Tanaka, H. Ohdan: Liver sinusoidal endothelial cells tolerize B cells
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし