

200908020A

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究推進事業

ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の
有効性、安全性評価システムの構築

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者
野村 大成

平成22(2010)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築 -----	1
野村大成	
II. 分担研究報告	
1. マイクロアレイを用いた継代維持ヒト組織の遺伝子発現の検索 -----	7
梁 治子	
2. ヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立 -----	10
小原 有弘	
3. 呼吸器疾患移植組織と免疫機能の解析 -----	12
立花 功	
4. 消化器等一般外科手術組織の移植系の確立 -----	13
本行忠志	
5. 前立腺腫瘍、前立腺肥大組織の移植維持系の確立 -----	15
野々村祝夫	
6. 婦人科腫瘍、胎児組織の移植維持系の確立 -----	17
榎本隆之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	23

I. 総括研究報告

ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の有効性、 安全性評価システムの構築

研究代表者 野村 大成（独）医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究では、20年間継代維持凍結保存してきたヒト頭頸部、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌組織の再移植保存に加え、未調査のヒト原発腫瘍組織、本研究所資源部所有の培養細胞の移植維持凍結保存、ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持を計り、総括的ヒト組織維持システムを3年間で完成させる。いずれも我々が20年間実施してきた研究の発展を期するものであり、その成果はおのずから医薬品の有効性・安全性の研究のみならず環境有害物質の人体影響評価に用いられ、国民の健康に大きく貢献できる。

研究分担者氏名・所属研究機関名及
び所属研究機関における職名

梁 治子・独立行政法人医薬基盤研究所・
プロジェクトサブリーダー

小原有弘・独立行政法人医薬基盤研究所・
研究員

立花 功・大阪大学・医学系研究科・
講師

本行忠志・大阪大学・医学系研究科・
准教授

野々村祝夫・大阪大学・医学系研究科・
准教授

榎本隆之・大阪大学・医学系研究科・
准教授

A. 研究目的

1986年、Bosma博士よりT細胞、B細胞機能の欠如したSCIDマウスC.B17-*scid*⁺の供与を受けた。しかし、原種は、80%前後に正常T、B細胞が出現し、約半数が8ヵ月以内に白血病死した。C.B17-*scid/scid*マウスのうち、IgM、IgGが検出限界以下のものを20代以上選択的兄妹交配することにより、Leaky、白血病死を激減させた。現在、世代数はF₅₃を超えている。これにより、初めてヌードマウス等に生着したことの無いヒト悪性腫瘍が急激に増

殖し、自然遠隔転移すること（J Rad Res, 1900, Jpn J Cancer Res, 1991, 93）、ヒト良性腫瘍もゆっくり増殖すること

（Carcinogenesis, 1992, Cancer Det, 1997, Cancer Lett, 1998, 2002）、最終的には、ヒト正常臓器・組織の長期間（～3年）の継代維持に成功した（Cancer Res, 1997, Cancer Lett, 1998；以後Super-SCIDと呼ばれる）。350回にわたり、ヒト脳組織を除く正常組織、前がん組織の維持を行った。大腸ポリープを除き、移植後の病理組織像やホルモン分泌能等はよく維持されている。また、移植ヒト皮膚に太陽紫外線類似光（UVB）を照射し、世界で初めて、人工的にヒトがんの誘発に成功した（Cancer Res, 1997）。ヒト骨髄、免疫細胞もよく維持される（Mutat Res, 2008）。ヒト胎児組織も増殖分化し継代維持できた。ヒトヘルペスウイルスのようにヒト皮膚のみを宿主とするウイルスに関する感染症研究にも極めて重要な武器となっている。

本研究では、20年間継代維持凍結保存してきたヒト頸部腫瘍、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌腫瘍等の再移植保存を2年間で、未調査のヒト前立腺、脳、肺他の原発腫瘍組織、本研究所資源部所有の培養細胞の移植維持を3年間で、また、良性腫瘍、正常組織、胎児由来組織の継代維持に努め、総括的ヒト組織維持システム構築の基盤を3年間で完成させる。いずれも我々が20年間実施してきた研究の発展を期するものであり、その成果は医薬品の有効

性・安全性の研究のみならず環境有害物質の人体影響評価に用いられ国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献する。

B. 研究方法

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；C. B17-*scid* [原種] に加え、C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備する。*bg^J*, *H* 導入マウス(野村ら、1993)も用意する(野村)。
2. ノードマウス・通常の SCID マウスに生着したことの無いヒト悪性腫瘍、良性腫瘍、前がん病変(主として頭頸部腫瘍、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌腫瘍等)を Super-SCID マウスで継代移植維持後凍結保存(1988~1995)し、2005年、大阪大学より医薬基盤研究所に移動、保管している。凍結保存組織を再移植することにより継代維持能力の確認を開始する(野村)。
3. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；ホルモン非依存性前立腺癌、前立腺肥大組織、各種肺がん臨床組織の移植、継代維持から開始する。自然遠隔転移を確認する(野村、野々村)。
4. 培養細胞移植；資源部細胞バンクにおいて、遺伝子、微生物汚染のないことが確認できている培養細胞(腫瘍、骨髄細胞等)の皮下、腹腔、当該臓器内移植を行う。腹腔内移植系の成立は定量的制がん研究に重要である。中皮腫、前立腺がん細胞、大腸がん細胞等から開始する。(野村、小原)。
5. ヒト正常組織・細胞の長期維持；成人脳以外の臓器組織の長期(~2年)維持の大規模実験は終了している。確認しリストを作成する。但し、ヒト甲状腺組織(バセド一病由来)、骨髄細胞、胎児由来組織(皮膚、肺、脂肪等)継代移植マウスは常備に努める。短時間宇宙飛行実験にも備える(野村、本行、立花、榎本)。
6. 移植組織・細胞の継代維持による形態・機能の変化の調査；継代による組織変化は病理学的には認めていない(8. 研究目的欄論文参照)が、形態学的観察に加え、機能変化を生化学的あるいはマイクロアレイを用い遺伝子発現レベルで解析する(梁、野村)。

(倫理面への配慮)

手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」(代表・野村)、12週未満退治組織に対しては、「ヒト胎児組織維持SCIDマウスを用いた医薬品等評価システムの開発」(代表・野村)の2課題で、倫理委員会の承認をえている。手術時等で採取されるヒト組織の譲渡に関しては、医療機関の倫理委員会の承認を得た上、担当医が医薬基盤研究所客員研究員等として参画する。厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除やに関しては、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。

動物実験に関しては、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、研究をおこなっている。

その他の指針等(指針等の名称：厚生科学審議会「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」、日本産科婦人科学会会告「死亡した胎児・新生児の臓器等を研究に用いることの是非や許容範囲についての見解」、および、「同上」に対する解説。)

C. 研究結果

本研究課題について、以下に示す当初研究計画・方法どおり実施し、予定通りの成果が得られた。また、8月より、流動研究員として、堀家なな緒が参加し、SCID マウスの飼育管理から実験解析まで、大きな実績を上げている。

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；C. B17-*scid* [原種]、C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備し、*bg^J*, *H* 導入を開始した(野村)。GFP を導入し、近交化を開始した(野村)。
2. 長期継代維持後凍結保存ヒト組織・細胞の再移植・保存；継代移植維持後凍結保存(1988~1995)悪性腫瘍のうち、Yolk Sac

腫瘍、肺がん、結腸がん、頭頸部腫瘍等について実施成功した（野村）。ヒト悪性腫瘍も、正常臓器・組織、良性腫瘍移植前で見られたように肺がん、乳がん、大腸がん、下咽頭がんの移植後の組織の形態は移植前の組織形態と比べて変化はない（図-1、2、3）。

図-1 Lung Cancer in Peutz-Jeghers Syndrome Patient

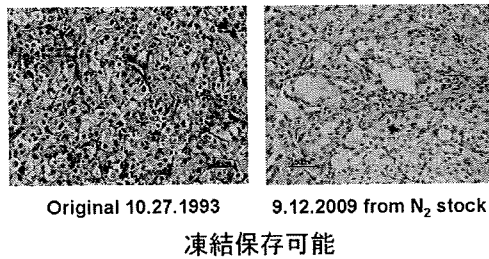


図-2 Colon Cancer

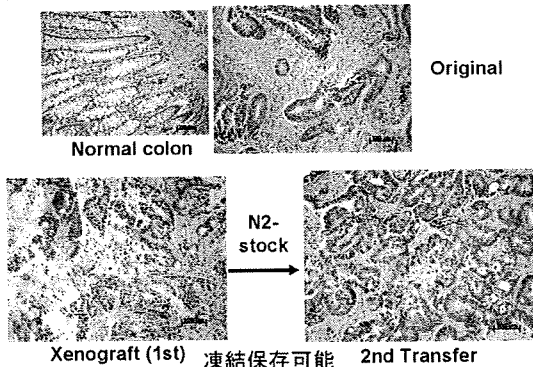
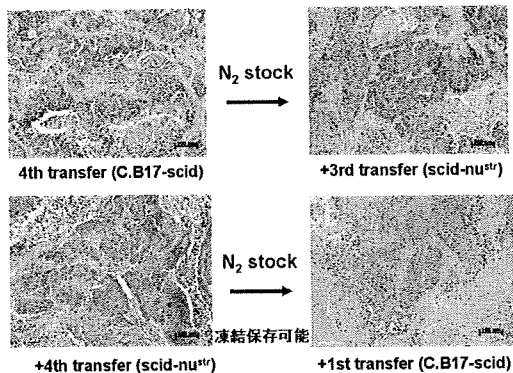


図-3 下咽頭扁平上皮がん

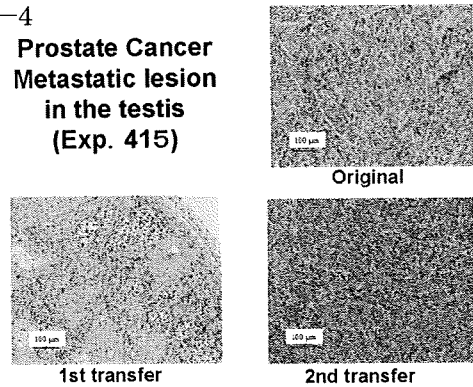


ヒトの York Sac Tumor をプログラムフリーザーで凍結し液体窒素中で保存したものを SCID マウスに再移植しても、生着し急速に

増殖し移植前の組織の形態をよく保持していた。このことは、ヒト York Sac Tumor のみでなく大腸がん、肺がん、頭頸部がん等の再移植のサイクルを繰り返しても、組織像に変化がないことを見出した。

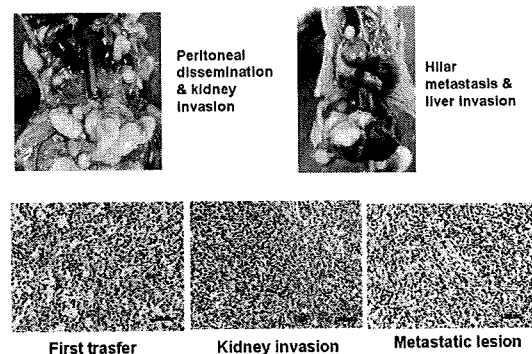
3. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；今まで移植が極めて困難といわれているヒト前立腺癌（睾丸転移巣）の適切な SCID マウスへの移植を実施し成功している。すでに腫瘍形成しており、継代し組織形確認中である（野村、野々村）。(図-4)。

図-4 Prostate Cancer Metastatic lesion in the testis (Exp. 415)



4. 培養細胞移植；資源部細胞バンクにおいて、遺伝子、微生物汚染のない培養細胞（腫瘍、骨髄細胞等）を保存している。ヒト培養がん細胞については、ヒトの前立腺がん PC-3、中皮腫 JMN-1B、乳がん MCF-7 細胞株等を SCID マウスに移植した。予想どおり、培養がん細胞は SCID マウス体内で急速に増殖し巨大な腫瘍を形成した。転移もした。移植された細胞は均質な細胞塊を形成し、継代移植しても形態は変わらない（図-5、6、7）。

図-5 Prostate Cancer Cell PC3



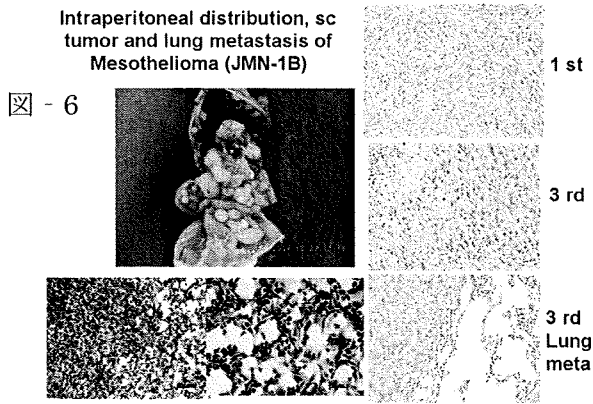


図 - 6

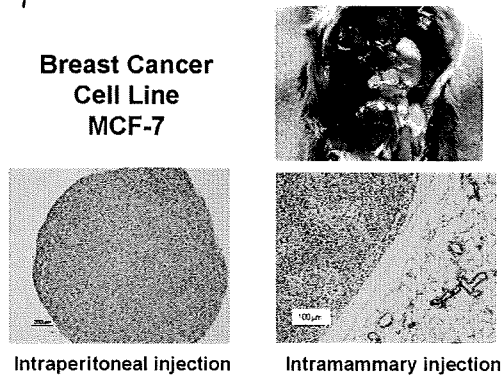


図 - 7

培養がん細胞は SCID へ移植すると容易に増殖する。腹腔内注入すると、腹瘤を形成し移植時の細胞数と移植・増殖した tumor nodule の数とにきれいな相関がみられた (図-8) ので、定量的制がん研究に用いられる。

図 - 8 Distribution of Intraperitoneally Injected Mesothelioma Cell Line JMN-1B

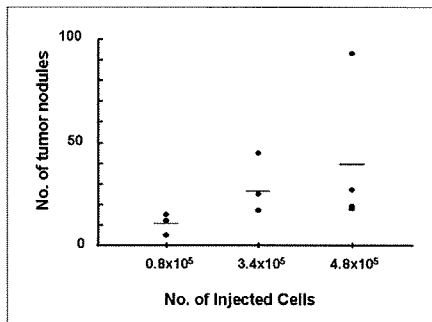
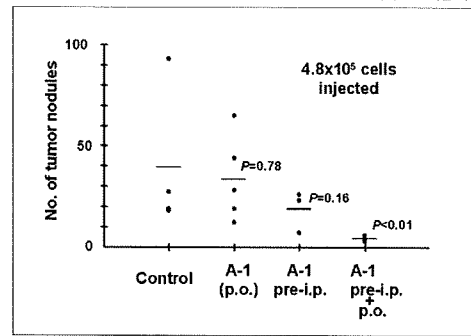


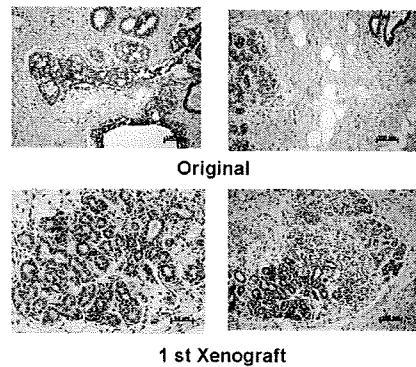
図-9 は、ヒト悪性腫瘍細胞 JMN-1B を SCID マウスに注入し、生理活性物質 (A) の効果を調べた実験で、tumor nodule 形成に抑制効果があることを示したモデル実験である (図-9)。(野村、立花、小原)。

図 - 9 Inhibitory Effects of Biomodifier on the Development of Intraperitoneally Injected Mesothelioma Cell Line JMN-1B in SCID Mice



しかしながら、乳がんの例 (図-10 と 7) をみてほしい。培養乳がん細胞を SCID マウスに移植してもがん細胞の塊があるだけで、臨床例にみるようながん特有の構造を形成するわけでない。致命的な差といえる。

図 - 10 Breast Cancer



5. ヒト正常組織・細胞の長期維持; ヒト正常組織の移植リストを作成した。また、ヒト甲状腺組織 (バセドー病由来)、胎児由来組織 (皮膚、肺、脂肪等) 継代移植マウスは常備に努めている ((図-11、12)野村、本行、立花、榎本)。

図 - 11 Normal Human Lung (from 11 weeks embryo)

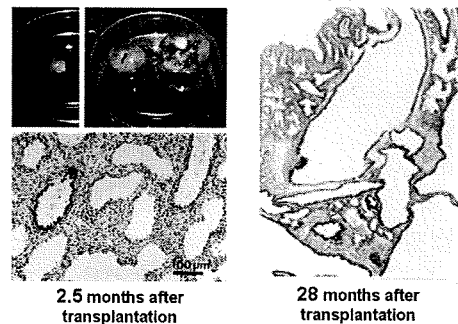
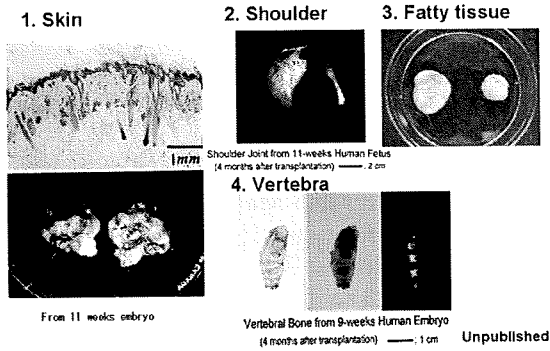
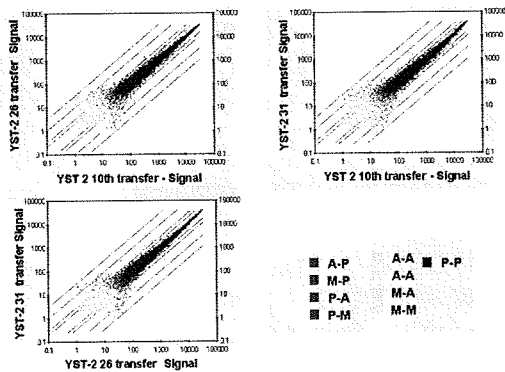


図 - 12 Development and Growth of Unidentified Human Embryonic Mass in SCID Mice



6. 移植組織・細胞の継代維持による形態・機能の変化の調査; ヒト悪性腫瘍の継代維持と保存については、前述の如く、SCID マウス移植悪性腫瘍組織片を N₂ 保存→再移植のサイクルを繰り返しても増殖し、組織像には変化がないことを見出している。いくつかのヒトがんの例で示したごとく移植による形態変化はみられなかった (図-1, 2, 3)。より詳細な検証のため、マイクロアレイを用い、遺伝子発現の変化についても、移植 10, 26, 31 代目組織をそれぞれ比較したところ変化はなかった (図-13)。移植による形態および遺伝子発現の変化がほとんどみられず、かつ N₂ 保存・再移植によって、ヒト悪性腫瘍は SCID マウス中で増殖する。ヒトがんを生きたまま永久保存するところができる (梁、野村)。

図 - 13 Subcutaneously Transplanted Yolk Sac Tumor



ヒト培養がん細胞の SCID マウス移植後の遺伝子発現の変化は初代で大きく以降大きな変化はなかった (図-14, 15)。

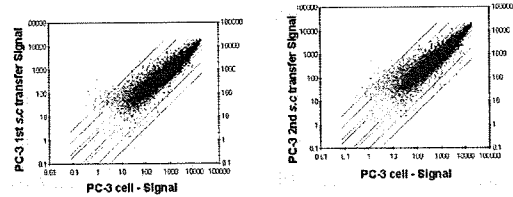


図 - 14

■ A-P ■ A-A ■ P-P
■ M-P ■ A-A ■ A-A
■ P-A ■ M-A ■ M-A
■ P-M ■ M-M ■ M-M

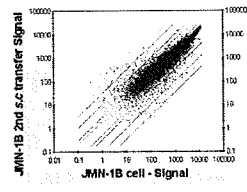
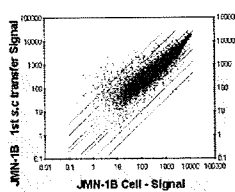
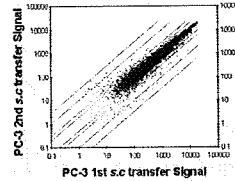
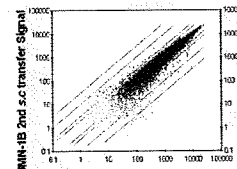


図 - 15



■ A-P ■ A-A ■ P-P
■ M-P ■ A-A ■ A-A
■ P-A ■ M-A ■ M-A
■ P-M ■ M-M ■ M-M

以上の如く、当初予定通りの成果が得られた。

D. 考察

SCID に移植した正常ヒト甲状腺組織の遺伝子発現への影響を調べるために、移植前組織と移植後組織の遺伝子発現を比較した。遺伝子発現に変化があったのは、約 1 週間目までにすぎず、その後 4 週間までは変化がなかった。発現に変化があった遺伝子は、移植したほとんどの組織で共通しており、細胞変性、再生に関するものであった。これらの結果から、遺伝子発現の変化は通常現象であること、また移植後 1 週間までは、宿主である SCID マウスからの栄養や、酸素が不十分であるためと示唆された (梁分担報告書記載)。

ヒト悪性腫瘍に関しては、SCID マウス移植組織片をプログラムフリーザーにて凍結後、液体窒素保存 (N₂) することにより、移植・保存→再移植のサイクルを繰り返しても、増殖能、組織像に変化がないことを既に証明している (Inohara, Nomura, et al, 1992, Fukuda, Nomura, et al, 1998 他)。さらに本研究で、

遺伝子発現の変化も限られていることが、明確になったため、必要に応じてN₂保存から組織を起こし、SCID マウスに再移植する事により、ヒト悪性腫瘍組織を永久に生きたまま確保できる画期的方法が確立したといえる。培養がん細胞については、移植により急速に増殖し巨大な腫瘍を形成し、転移もし、移植細胞数に応じて腫瘍を形成することから、定量的治療研究には大いに役立つ。しかし、がん細胞の塊があるだけで、ヒト臨床がん組織、移植後がん組織で見られるがん特有の組織構造が全く見られない。ヒトがんの研究、治療には適さないものと考ええる。

E. 結論

ヒト甲状腺組織の移植による遺伝子発現の変化は、移植後1週間目では、約3%（4倍以上の発現変化）変化したが、その後4週間までは変化がなく安定している。また、ヒト悪性腫瘍のプログラムN₂保存・移植における移植組織の形態的变化、遺伝子発現の影響は僅かであった。これらの結果から、ヒト悪性腫瘍を生きたまま永久に保存できる事が明らかになった。この成果は、*in vivo*でのヒト悪性腫瘍の資源化に大いに貢献できる。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Iwamori M., Shibagaki, T., Nakata, Y., Adachi, S., Nomura, T. Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross-reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli. *J. Biochem.* 146(2), 185-191, 2009.
- (2) M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiat. Res.* 173, 205-213, 2010.
- (3) Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. *Mutat Res.*, 696,107-113 2010

- (4) 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤 哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。*Space Utiliz Res.* 26: 249-251, 2010.

2. 学会発表

- (1) Taisei Nomura. Dietary Modulation to Prevent Cancer and Malformation in Mice. In: Dietary Modulation of Xenobiotics Transport and Metabolism. 3rd Asian Pacific Regional Meeting of The International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Bangkok, Thailand, May 10-12, 2009.
- (2) Taisei Nomura. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. In: The 15th Alexander Hollaender Course; Genome-Environment Interactions and Genetic Toxicology, September 23 – 26/27, 2009, Astana, Kazakhstan.
- (3) Taisei Nomura. Differential Sensitivity of Mice and Human Tissues to Radiation Sources. In: HIBMC/PMRC Joint Meeting, Tatsuno, Hyogo, Dec. 15, 2009,.
- (4) H Nakajima, T Saito, KG Yeliseeva, H Ryo, T Hongyo, Y, Yamaguchi, NA Kartel, EV Krupnova, V Trusova, AM, Voitovich, VS Piskunov, TP Smirnova, EI Anisimova, V. Afonin, T Todo, T Nomura. Ecological decrease, biological concentration and genome stress of radionuclides in plants and animals after Chernobyl catastrophe. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 2009. 8. 20-25, Firenze – Italy.
- (5) 野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。相模原、2010. 1. 26.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： 特になし

II. 研究分担報告書

マイクロアレイを用いた継代維持ヒト組織の遺伝子発現の検索

分担研究者 梁 治子（独）医薬基盤研究所 プロジェクトサブリーダー

研究要旨：ヒト正常組織（甲状腺）は Super-SCID マウスへの移植によっても形態・機能がよく維持されている。より詳細な変化を確認するため、マイクロアレイを用い、ヒト組織の移植前後および放射線照射の影響による変化の有無を比べ、移植ヒト組織における継代・維持過程および放射線照射による影響での安全性を知る。

A. 研究目的

ヒトの正常臓器・組織は市販の SCID マウスには定着しない。野村らが改良した IgG、IgM 値が ELIZA 法による値が検出限界以下の改良型 SCID マウス (Super-SCID) を用いることにより、ヒト組織・臓器の長期維持（～3 年）が可能になり、しかも、形態・機能は長期維持期間中にも保持されることがわかった (Nomura, et al, 1997)。このことから、初めてヒトの臓器・組織に対し、さまざまな物質の直接影響を調べることが可能になった。その中でも、甲状腺はヒト・動物の発達や成長に重要な内分泌器官の 1 つであり、放射線や内分泌かく乱物質に感受性が高い器官である。Super-SCID に移植した正常ヒト甲状腺の長期維持期間中（約 3 年）移植後約 1 週間目と比べ病理学的変化、マウス血清中のヒト甲状腺ホルモン (T3) 量の変化はほとんどみられず、甲状腺刺激ホルモン TSH によく反応していることがわかっている (Fukuda, Nomura, et al, 1998)。より詳細な変化を検出するため、マイクロアレイを用い遺伝子発現の変化を調査する。

B. 研究方法

材料：ヒト甲状腺は、バセドウ氏病の患者（20 歳と 23 歳女性）より、美容上の理由で切除された甲状腺を共同研究者松塚博士（神戸、隈病院）より提供を受け用いた。これら患者の術前の甲状腺ホルモン値は正常範囲内であった。

ヒト甲状腺移植と放射線照射：手術により切除されたヒト甲状腺（上述）を、高濃度抗生物質を含む生食中で 5-6 mm 角に細かく切断し、Super-SCID（重度複合免疫不全）マウス (C57BL/6-*scid/scid*、または C. B17-*scid/scid*) の背中皮下に左右に 1 片ずつ移植した。ヒト甲状腺（20 歳女性）の SCID マウスへの移植前後の遺伝子発現変化を調べるために、移植後 1、2、3、4 週間目における遺伝子発現変化を調べた。

ヒト甲状腺（23 歳女性）の放射線照射は、移植マウスにガンマ線または中性子線を照射するこ

とで行った。中性子線照射は近畿大学原子力研究所原子炉 (URT-KINKI) でおこなった。照射野での 1W の出力における線量率は、中性子線とガンマ線がそれぞれ約 0.2 Gy/h である。実際マウスを用いての線量測定を行い確認した。ガンマ線照射は大阪大学医学部 Gammacell 40 Exactor の ¹³⁷Cs-ray による。線量率は、1.19 Gy/min である。合計 23 片の移植甲状腺は、0.2 Gy (4 片)、0.4 Gy (4 片) と 0.6 Gy (3 片) の中性子線を、1.0 Gy (4 片)、2.0 Gy (4 片) と 3.0 Gy (3 片) のガンマ線を照射した。8 片は非照射であり、非照射の同期の control として用いた。放射線照射は SCID マウスに移植後 1 日目に行い、2 週間後移植甲状腺をマウスより摘出した。

ヒト甲状腺における遺伝子発現レベルの変化は、非照射対照群については、移植前の甲状腺の発現レベルと比較し、照射群については、同期の非対照群と比較することで行った。遺伝子発現は GeneChip (HG-Focus Array; ヒト遺伝子 8500 個、Affymetrix Inc) を用いた。

遺伝子発現の解析：SCID マウスより摘出したヒト甲状腺は、直ちに液体窒素で保存した。RNA 抽出は、液体窒素で保存したヒト甲状腺を液体窒素で凍結した金属ブロックで粉状にし (Cryopress, Microtec Co., Ltd), Trizol (Invitrogen) 中で homogenize したのち、抽出した。RNA 抽出から GeneChip 解析までは、Affymetrix 社のプロトコールに従って行った。発現解析は GeneChip operating software GCOS のより行った。（倫理面への配慮）

ヒト組織の SCID マウスへの移植に関しては、医薬基盤研究所および関連施設での研究倫理委員会の承認のもとに施行している。

手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持 SCID マウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」（代表・野村）、の課題で、倫理委員会の承認を得ている（添付）。手術時等で採取されるヒト甲状腺組織の譲渡に関しては、頭頸部（阪大耳鼻咽喉科猪原、隈病院松

塚)が医薬基盤研究所客員研究員等として参画し、
 厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が
 移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト
 組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・
 危険性の排除に関しては、文書・口頭で十分にイン
 フォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書
 にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、
 本人および親権者の同意を得ている。

動物実験に関しては、医薬基盤研究所動物実験委
 員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登
 録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、
 研究をおこなっている(添付)。梁(分担者)は、
 これらの申請課題での(代表者野村)研究者に含
 まれている。

C. 研究結果

SCID 移植正常ヒト甲状腺組織の自然および、放
 射線照射による遺伝子発現への影響

1、ヒト甲状腺の移植による遺伝子発現の自然変 化:

遺伝子発現の変化は、移植前組織の発現と比較
 すると、4倍以上の発現変化がみられた遺伝子
 数は数移植後1週間目で約3%であったが、2、3、
 4週間目ではそれ以上の変化はなかった(表-1、
 Mutat. Res, 2008)。これら変化のあった遺
 伝子は34遺伝子であり、ほとんどの非照射
 群に共通してみられ(図-1、Mutat. Res 2010)
 細胞の変性、再生に関する遺伝子であった。

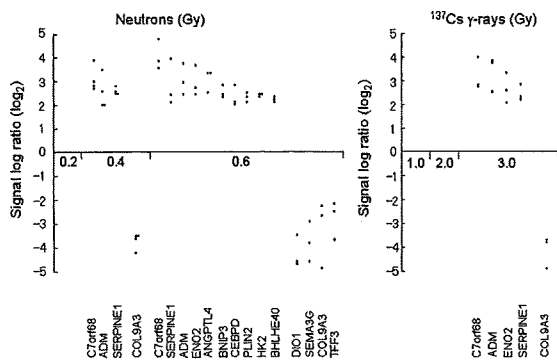
表 1

Changes in gene expression in the transplanted human thyroid tissues—comparison
 with surgically resected original thyroid tissue

Weeks after transplantation	No. of genes examined	Change in gene expression	
		Increase (> x4)	Decrease (< x(1/4))
1	8500	92	195
2	8500	88	138
3	8500	95	129
4	8500	87	127

Human thyroid tissues from a Graves' disease patient (20 years, female) were trans-
 planted s. c. to SCID mice, and changes in gene expression (4-fold differences) were
 analyzed by GeneChip (Affymetrix HG Focus Array; 8500 genes).

図 1

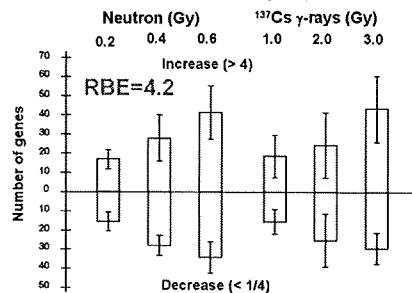


2、移植したヒト甲状腺における放射線照射による 遺伝子発現への影響:

遺伝子発現は、移植同時期の非照射対照群と
 比較すると、ガンマ線、中性子線照射とも、4
 倍以上の発現変化は、線量依存的に増加した(図
 -2、Mutat. Res 2010)。また中性子線照射は

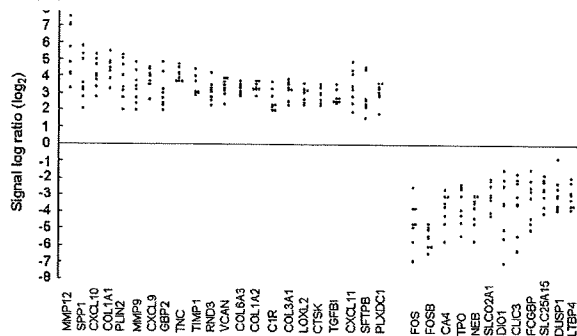
ガンマ線照射に比べ、同じ線量当たりで約4.2
 倍の遺伝子発現変化をおこした。非照射群でみ
 られたように照射群に共通してみられる4倍以
 上の遺伝子発現変化を示す遺伝子はほとんどな
 かった。しかし、ガンマ線3 Gy、中性子線0.4、
 0.6 Gyの高線量照射群では、14個の遺伝子のみ
 が高線量群全ての甲状腺組織片に共通していた。
 これらの遺伝子は、変性と再生(8遺伝子、ア
 ポトーシス(3遺伝子)、転写因子(2遺伝子)
 などであった(図-3、Mutat. Res 2010)。

図 2 Changes in Gene Expression by Neutrons and γ -rays



S. Adachi et al. / Mutation Research 696 (2010) 107–113

図 3



D. 考察

SCID 移植正常ヒト甲状腺組織の移植による自
 然遺伝子発現への影響については、移植前後の組
 織の遺伝子発現を比較することで、移植による変
 化が約1週間目まで現れ、その後4週間までは変
 化がないことがわかった。発現変化している遺
 伝子はほとんどの甲状腺組織に共通であり、細胞
 の変性、再生に関するものであった。これらのこ
 とは、発現変化は通常現象であること、また移植
 1週間までは、宿主であるSCIDマウスからの栄養
 や、酸素が不十分であるためと示唆される。

他方、放射線照射によって、遺伝子発現変化に
 共通する遺伝子はわずかであり、しかも高線量照
 射群でしかみられなかった。放射線照射による損
 傷は特定されるのではなく、ランダムな現象であ
 ると思われる。また、中性子線の遺伝子発現に対
 するRBE値(生物学的効果比)が4.2を示した。こ
 のことは、遺伝子発現変化の主因はDNAの2重鎖切
 断であることが示唆される。ヒト正常組織ではじ
 めて環境の影響を直接しらべた報告であり、化学
 物質等の影響も検討できる系であることを示し
 た。

E. 結論

ヒト甲状腺組織の移植による遺伝子発現は、移植後1週間目では約3%（4倍以上の発現変化）変化するが、その後4週間までは変化がない。放射線照射による発現異常の変化は、線量依存的に増加した。これらのことは、ヒト正常組織をSCIDマウスに移植しても、遺伝子発現の異常は1週間後からは、安定しているため研究に用いることができる。放射線照射による遺伝子発現の変化は、感度がよく、化学物質等の安全性研究に貢献できる系と示唆される。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. Radiat. Res. 173, 205–213, 2010.
2. Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. Mutat Res., 696,107-113 2010
3. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤 哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。Space Utiliz Res. 26: 249-251, 2010.

2. 学会発表

1. 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。相模原、2010. 1. 26。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： 特になし

ヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立

分担研究者 小原有弘（独）医薬基盤研究所 研究員

研究要旨：抗がん剤開発に欠かせない創薬モデルマウス作成のため、細胞バンクに登録されている高度に品質管理された、多種類のがん細胞の培養ならびに供給を行い、担がんマウス作成を分担した。また、ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株の寄託を受け、担がんマウス作成のための細胞資源整備を行った。

A. 研究目的

研究に用いる培養細胞の品質管理は非常に重要であり、研究によって得られた成果に非常に大きく寄与するが、研究者が研究に用いる培養細胞の品質に無関心であるのが現状である。これまでに我々は公的細胞バンクとして細胞品質管理に注力し、高品質細胞の供給を実現してきた。本研究ではヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立のため、品質管理されたがん細胞の培養ならびに供給を行うことで効率的な創薬モデルマウス作成の可能性を分担する。

また、本年度細胞バンクに寄託されたルシフェラーゼ安定発現がん細胞株について担がんマウス作成のための細胞資源整備を行う。

B. 研究方法

1. 細胞培養

JCRB0077: PC-3 は Eagle's minimal essential medium with 10% heat inactivated fetal bovine serum、JCRB1002:K562/ADM は RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum、JCRB0225:COLO320 DM は Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum、JCRB0134:MCF-7 は Eagle's minimal essential medium with NEAA, 1.5g/l NaHCO₃, 1mM pyruvate and 0.01mg/ml insulin with 10% fetal calf serum にて培養を行い、担がんマウス作成のため増殖させた細胞を生理食塩水に懸濁させ SCID マウスへの移植を行った。

2. ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株

自治医科大学において樹立されたルシフェラーゼ安定発現がん細胞株の寄託（Table 1）を受け、その細胞情報の登録、培養条件の検討を行った。

C. 研究結果

1. SCID マウスへ移植する培養ヒトがん細胞系の管理。下記の細胞について、細胞樹立時の情報を

元に、細胞の培養条件を検討し、担がんマウス作成に必要な細胞量の増殖を行うとともに、微生物汚染検査、マイコプラズマ汚染検査、ウイルス汚染検査、細胞個別識別検査等の品質管理を行った。

1) JCRB0077: PC-3

62 歳男性より樹立されたアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株であり、癌遺伝子である c-myc の増幅が確認されている。順調に増殖した。

2) JCRB1002:K562/ADM

53 歳女性より樹立された慢性骨髄性白血病細胞株であり、抗がん剤のアドリアマイシンに耐性をもつ細胞である。腹腔内、静脈内に注入では、増殖がみられなかった。

3) JCRB0225:COLO320 DM

55 歳女性より樹立された大腸腺癌由来細胞株であり、染色体の一部が増幅して元の染色体から脱離し、独立した小型の染色体として存在する二重微小染色体（ダブルミニニュート）を有した細胞株であり、その二重微小染色体上に癌遺伝子である c-myc が増幅した状態で存在している。順調に増殖した。

4) JCRB0134:MCF-7

69 歳女性より樹立された乳がん細胞株であり、内分泌かく乱物質の検索に用いられるエストロゲン受容体発現細胞株である。マウス乳腺内移植にて、腫瘍形成がみられた。

D. 考察

ヒト由来の悪性腫瘍ならびに良性腫瘍、さらには正常組織の培養・増殖法が in vitro において開発されているが、創薬研究においては in vitro のみではなく in vivo における開発薬剤の評価が欠かせない。また、悪性腫瘍の転移モデルマウスは抗がん剤開発においては非常に有力なツールとなる。本研究においては創薬研究に必要な担がんモデルマウス作成、その腫瘍形成能、転移能評価の検討のため、前立腺がん、乳がんをはじめとするがん細胞の培養・増殖・供給を行ったが、細胞の培

養方法ならびにその品質管理を規格化することにより、担がんマウス作成効率の向上と再現性の確保が期待できる。特に、免疫の欠損する SCID マウスに対しては、微生物管理が極めて重要である。培養可能ながん細胞は世界中に広く普及しているが、培地や継代方法をはじめとする細胞の取扱が研究者によって様々であり、同じ細胞の名前であっても細胞の表現型に違いにあることが多い。特にがん細胞はゲノムの不安定性により、ゲノム変化が大きく、継代培養によって細胞が変化しやすい。これらの細胞を用いて担がんマウスを作成する場合には、十分な細胞ストックを同一ロットで確保し、担がんマウス作成までのプロトコールを一定にすることで、研究の再現性を向上することが可能であると考えられ、研究ツールとして細胞を確保するには公的な細胞バンクが果たす役割は大きいと考えられる。今後、細胞バンクが保有する高品質な細胞が、創薬モデルマウス作成に用いる細胞資源として有用であることを実証し、更なる細胞資源の活用法開発に努めたい。

E. 結論

抗がん剤開発に欠かせない創薬モデルマウス作成のため、細胞バンクに登録されている高度に品質管理された、多種類のがん細胞の培養ならびに供給を行い、担がんマウス作成を分担し、期待どおりの成果を得た。また、ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株の寄託を受け、担がんマウス作成のための細胞資源整備を行った。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文 (3)

Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*. 127, 1-8. 2010.

Dirks WG, Macleod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H. Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. *Int J Cancer*. 126, 303-304, 2010.
Takeuchi M, Takeuchi K, Ozawa Y, Kohara A, Mizusawa H. Aneuploidy in immortalized human mesenchymal stem cells with non-random loss of chromosome 13 in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 45,290-299, 2009.

2. 学会発表

英文 (2)

T Suzuki, A Kohara, A Ramadan, Y Kikuchi, M Honma, M Hayashi. Comparative study on in vivo genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan endemic nephropathy. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) 8月 イタリア フィレンツェ

A. Kohara, W. G. Dirks, H. G. Drexler, Y. Nakamura, M. Furue, M. Mizusawa Warning: The Serious Problem of Mistaken Identities of Cultured Human Cell Lines. 2009 In Vitro Biology Meeting 6月 アメリカ チャールストン

和文 (2)

鈴木孝昌、小原有弘、ラマダン アリ、菊池 裕、本間正充、林 真 バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A 日本環境変異原学会第 38 回大会 ポスター 11 月 静岡

Takayoshi Suzuki, Arihiro Kohara, Mieko Kogi, Shiori Tanabe, Masamitsu Honma. CGH array analysis on variations in chromosome 8 amplifications containing c-myc in various cancer cell line. 第 68 回日本癌学会学術総会 ポスター 10 月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

呼吸器疾患移植組織と免疫機能の解析

研究分担者 立花功 大阪大学 講師

研究要旨：われわれは、膜タンパクであるテトラスパニン CD9 と CD81 のダブルノックアウトマウスが肺に炎症を自然発症することを見出した。またそのメカニズムとして、CD9 は脂質膜ミクロ領域において LPS 受容体である CD14/TLR4 コンプレックスの形成を阻害し、マクロファージの活性化を負に制御している可能性を証明した。

A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は 2020 までに世界の死亡原因の第三位になると推測されている。本研究では、COPD 発症メカニズムにおける膜タンパクテトラスパニンの関与を動物モデルを用いて明らかにする。

B. 研究方法

CD9/CD81 ダブルノックアウトマウス肺の解析を行った。また、CD9 ノックアウトマウスに LPS を投与し、マクロファージを分離し解析した。（倫理面への配慮）マウスには、麻酔薬・鎮痛剤を使用し、また過剰麻酔による安楽死により苦痛軽減措置をとった。

C. 研究結果

CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスはヒト COPD 類似の肺気腫と骨粗鬆症を示した。肺では、マクロファージの浸潤が増強していた。また、CD9 ノックアウトマクロファージでは、LPS 投与後の CD14/TLR4 コンプレックスの形成が亢進しており、TNF- α の産生増加など強い炎症反応が見られた。

D. 考察

膜4回貫通型タンパクテトラスパニンCD9とCD81は、マクロファージの炎症反応を負に制御することで COPD の発症を抑制している可能性がある。今回はマウスのみデータであるが、実際に Super-SCID移植ヒト肺を用いた解析も必要であろう。

E. 結論

テトラスパニンCD9とCD81はCOPDの発症予防的に働く。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文（2）

Takeda Y, He P, Tachibana I, Zhou B, Miyado K, Kaneko H, Suzuki M, Minami S, Iwasaki T, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Yoshida M, Osaki T, Komori T, Mekada E, Kawase I.

Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J Biol Chem.* 283, 26089-26097, 2008.

Suzuki M, Tachibana I, Takeda Y, He P, Minami S, Iwasaki T, Kida H, Goya S, Kijima T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Kawase I. Tetraspanin CD9 negatively regulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation and lung inflammation. *J Immunol.* 182, 6485-6493, 2009.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

消化器等一般外科手術組織の移植系の確立

研究分担者 本行忠志 大阪大学 准教授

研究要旨：消化器がん研究のため、各種消化器がんおよび良性腫瘍を収集するとともに、がん関連遺伝子等の検索を行う。

A. 研究目的

消化器等一般外科手術組織を大阪大学および関連病院における手術例よりがん組織を選択し移植系の確立に提供するとともに、がん関連遺伝子の検索を行う。

B. 研究方法

消化器一般外科組織のうち本年度は大腸がん、大腸ポリープ正常粘膜組織から SCID マウスへの移植に適切な組織の選択を行う。また、野村らの改良した Super-SCID マウスにヒト甲状腺組織を移植し、組織の SCID での長期維持中（～2年）の自然および放射線照射したヒト組織において、がん関連遺伝子の突然変異が起こるかどうかを調べた。

1. ヒト甲状腺等移植 SCID マウスの長期維持と放射線照射：

ヒト甲状腺は、頭頸部腫瘍切除の際、治療上、切除を余儀なくされた正常甲状腺組織および、バセドー病の内科（薬物）療法治癒例で、甲状腺ホルモン

等が正常値を示す症例で、巨大な腫瘍のためやむを得ず切除されたヒト甲状腺組織を許可を得て、改良 SCID マウスへの移植に用いた。放射線照射は、ヒト甲状腺組織置換 SCID マウスに照射することで行った。放射線照射は、今回は中性子線照射を行った。近畿大学原子力研究所の原子炉（URT-KINKI）は出力 1W 時、約 0.2 Gy/hr の中性子線とガンマ線約 0.2 Gy/hr のガンマ線の線量率である。

2. がん遺伝子の検出：

がん関連遺伝子として *p53*, *K-ras*, *c-kit*, *β-catenin*, *RET*, *bak*, *BRAF* 遺伝子を用い、本行らにより開発された放射性同位元素を用いない PCR- ‘Cold SSCP’ 法および direct sequencing 法 (Mutat. Res. 2008) によりおこなった。すなわち、各移植ヒト甲状腺組織から DNA を抽出し、各プライマー（表-1）を用いて PCR 法で遺伝子を増殖し、PCR 産物を SSCP 電気泳動にかける。

表 1

The PCR primer pairs for the amplification of *p53*, *K-ras*, *c-kit*, *β-catenin* and *RET* genes

Genes	Oligonucleotide	Temperature (°C)	
		Annealing	SSCP
<i>p53</i>			
exon 4a	5'-TTTTCACCCATCTACAGTCC-3' upstream 5'-CAAGAAGCCCAGACGGAAC-3' downstream	58	20
exon 4b	5'-CCTGGCCCTGTCTCTCT-3' upstream 5'-AAGAAATGCAGGGGATACG-3' downstream	58	20
exon 5a	5'-TCTGTCTCTCTCTCTCTA-3' upstream 5'-CATGTGCTGTGACTGCTTGT-3' downstream	57	35
exon 5b	5'-TGTGCAGCTGTGGGTTGATT-3' upstream 5'-CAGCCCTGTCTCTCTCCAG-3' downstream	62	25
exon 6	5'-TTGCTTTAGGTTCTGGCCCT-3' upstream 5'-TAGGGAGGTCAAATAAGCAG-3' downstream	60	35
exon 7	5'-TGCCACAGGCTCCCAAGG-3' upstream 5'-AGGGGTGACGGCAAGCAGA-3' downstream	60	25
exon 8	5'-TCTGTCTCTCTTTCTCTAT-3' upstream 5'-CGCTTCTGTCTGCTTGT-3' downstream	56	10
<i>K-ras</i>			
exon 1	5'-CATGTTCTAATATAGTCACA-3' upstream 5'-CTCTATTGTTGGATCATATTCGTCC-3' downstream	48	25
exon 2	5'-ACTGTGTTTCTCCCTCTCA-3' upstream 5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCA-3' downstream	48	5
<i>c-kit</i>			
exon 11	5'-TGATCTATTTTCCCTTCTC-3' upstream 5'-AGCCCTGTTCATACTGAC-3' downstream	56	20
exon 17	5'-CATGGTCGGATCACAAAGAT-3' upstream 5'-ATTATGAAAGTACGGAAC-3' downstream	58	15
<i>β-catenin</i>			
exon 3	5'-GCTGATTGATGGAGTGG-3' upstream 5'-GCTACTGTGTTCTTGAGTGAA-3' downstream	56	25
<i>RET</i>			
exon 10	5'-ATTAAAGCTGGCTATGGAC-3' upstream 5'-CACTCACCTGGATGTCTC-3' downstream	58	25
exon 11	5'-ATCCACTGTGCGACGAGCTG-3' upstream 5'-GAAGTCACTCAGCTGA GG-3' downstream	60	25
exon 16	5'-TCTCTTAGGGTGGATTCC-3' upstream 5'-CACACTTACACTCACTTTG-3' downstream	55	20

Exons 4 and 5 of *p53* were divided into two regions, exon 4a (262 bp), exon 4b (173 bp), exon 5a (155 bp) and exon 5b (167 bp) for PCR.

再PCR産物を精製後、Direct sequencing法で、塩基配列を得る。変異の検出解析のために、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて遺伝子変異の検索を行った。SSCPゲルでの突然変異は、正常と移動度の異なるバンドとして検出される。ゲルないの変異バンドを切り取りテンプレートとして用い、再PCR増殖することで、突然変異を持つDNAフラグメントが濃縮される。

(倫理面への配慮)

研究に際し、細胞株以外に臨床検体の採取・利用も不可欠であるが、インフォームドコンセントを得たうえで、手術で摘出された組織を用いるため、患者に危害が及ぶことはなかった。

C. 研究結果

表2に示す如く、中性子線0.2Gy毎週計6回照射(1.2 Gy)後5-13ヶ月では、11例中にいずれの遺伝子の突然変異も検出できていない。また、中性子線0.6 Gy照射後2週間目の甲状腺でも、突然変異変異は検出されなかった(Mutat. Res. 2010)。

表2 ヒト甲状腺移植マウスに原子炉中性子線0.2 Gy 6回(7日間隔)照射後のがん関連遺伝子変異*

	Dose	Months after transplantation	p53	K-ras	c-kit	β -catenin	RET	Bak*	BRAF
1	0.2 Gy x 6	5	none	none	none	none	none	none	none
2	0.2 Gy x 6	5	none	none	none	none	none	none	none
3	0.2 Gy x 6	5	none	none	none	none	none	none	none
4	0.2 Gy x 6	12	none	none	none	none	none	none	none
5	0.2 Gy x 6	12	none	none	none	none	none	none	none
6	0.2 Gy x 6	8	none	none	none	none	none	none	none
7	0.2 Gy x 6	7	none	none	none	none	none	none	none
8	0.2 Gy x 6	7	none	none	none	none	none	none	none
9	0.2 Gy x 6	9	none	none	none	none	none	none	none
10	0.2 Gy x 6	13	none	none	none	none	none	none	none
11	0.2 Gy x 6	13	none	none	none	none	none	none	none
12	0	10	none	none	none	none	none	none	none

*28 GCC>GTC (Ala > Val) in the original thyroid tissue

また、SCIDマウスに移植した大腸がん等については研究代表者報告書に記載した。きれいに継代維持保存できた。

D. 考察

今後、移植継代維持できたヒト腫瘍はがん関連遺伝子の変異を調査する。

E. 結論

一般外科採取ヒト組織に対し、がん関連遺伝子の高感度検索法の応用が可能である。

F. 健康危険情報

特記すべきことはなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. Mutat Res., 696,107-113 2010

野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤 哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価 (2009年度ワーキンググループ活動報告)。Space Utiliz Res. 26: 249-251 2010.

2. 学会発表

H Nakajima, T Saito, KG Yeliseeva, H Ryo, T Hongyo, Y, Yamaguchi, NA Kartel, EV Krupnova, V Trusova, AM, Voitovich, VS Piskunov, TP Smirnova, EI Anisimova, V. Afonin, T Todo, T Nomura. Ecological decrease, biological concentration and genome stress of radionuclides in plants and animals after Chernobyl catastrophe. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), Firenze – Italy, August 20-25, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：特になし

前立腺腫瘍、前立腺肥大組織の移植維持系の確立

研究分担者 野々村祝夫 大阪大学 准教授

研究要旨：前立腺がんの臨床知見から悪性化に対するマクロファージ活性の関与について調査したところ、強い相関がみられた。この知見をもとにマクロファージ機能の低下した SCID マウスへの移植が成功の継代維持のキーポイントになる可能性があるため適切な前立腺がん症例を選択し移植に用いる。

A. 研究目的

ヒト前立腺がんは、通常のSCIDマウスやヌードマウスでは、移植後、増殖し難い。その原因について臨床的知見を得るとともに、SCIDマウスへの移植、継代維持のための適切な前立腺肥大組織、がん組織を選択し、前立腺疾患治療薬の効果と安全性に資する。

B. 研究方法

前立腺がん、前立腺肥大手術臨床例について、前立腺および周辺組織の生体内での環境（免疫、ホルモン等）を臨床医学的に調査し、前立腺がんの発生、増殖に関与する因子を究明するとともに、得られた知見をもとにSCIDマウスへの移植に適切な前立腺がん、前立腺肥大組織を選択する。

（倫理面への配慮）ヒト前立腺組織採取に当たっては、診断と治療に影響を与えない範囲での組織の利用とし、大阪大学医学部における臨床研究倫理審査委員会での承認を受けた上で採取組織の利用を行った。医薬基盤研究所においても研究総括代表者・野村が別記の如く倫理委員会および動物実験委員会の承認を得て移植を行っている。

C. 研究結果

前立腺がん組織周囲への自然免疫関連細胞の浸潤は、癌細胞の増殖や癌の進展に深く関わっている事が最近示唆されている。前立腺癌の予後規定因子に関する研究で、免疫系細胞に関する研究は少ない。腫瘍周囲に浸潤する自然免疫細胞には、mast cell, tumor associated macrophage, macrophage scavenger receptor (MSR)-positive cellなどがある。このうち、MSR-positive cellの腫瘍周囲への浸潤が少ないほど予後不良の傾向を示すことが明らかになった。MSR-positive cellは癌細胞の進展に対して抑制的に作用している可能性が示唆された。

また、前立腺癌の診断には、必ず前立腺の組織検査としての前立腺生検が必要である。ところが、前立腺生検による診断効率はきわめて悪く、また一旦生検で「癌無し」と診断されても、false negativeや腫瘍マーカーの上昇により再生検が

必要となる事が少なくない。現在、患者に再生検を積極的に勧める有効な指標は無く、PSAという腫瘍マーカーの上昇にもっぱら依存している。この研究では、初回生検時に「癌無し」と診断されても、その生検組織内にmacrophage scavenger receptor (MSR)-positive cellの浸潤が少なければ、再生検で「癌あり」となる可能性が高くなることを示した。すなわち、前立腺組織へのmacrophage scavenger receptor (MSR)-positive cellの浸潤は、癌の発生や増殖に対して抑制的に働いている可能性がこの研究で示唆された。これらの臨床知見に基づく前立腺がん症例1例と前立腺肥大症例2例の切除を行い、医薬基盤研究所においてsuper SCIDマウスへの移植のため譲渡した。ラストステロンの付加が有効のように思われた。

D. 考察

移植した前立腺がん組織が組織形態を維持しえたのは、採取した癌組織がホルモン抵抗性癌であったため、男性ホルモン値が低くても影響が無かったことと、マクロファージ活性化の低下したSCIDマウスへの移植のためと考えられる。肥大症組織が変性を示したのは、移植マウスの男性ホルモン値が不足したためと考えられた。

E. 結論

前立腺癌に対する前立腺全摘除術後の再発危険因子として、腫瘍マーカーであるPSA値や組織学的悪性度以外のものについては報告は少ない。手術の際に切除した骨盤内リンパ節組織中のVEGF(vascular endothelial cell growth factor)の発現を調べたところ、発現陽性症例では有意に高い再発率を認めた。同様に、前立腺全摘除術後の再発危険因子に関する研究として、診断時に採取した前立腺生検組織中に存在するMSR(macrophage scavenger receptor)陽性の炎症細胞数が少ない症例では予後不良であることが明らかとなった。マクロファージの関連が強く示唆された。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文 (4)

Nonomura N, Takayama H, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Nakai Y, Nakayama M, Tsujimura A, Nishimura K, Aozasa K, Okuyama A. Decreased infiltration of macrophage scavenger receptor-positive cells in initial negative biopsy specimens is correlated with positive repeat biopsies of the prostate. *Cancer Sci.* 2010. in press

Takayama H, Nishimura K, Tsujimura A, Nakai Y, Nakayama M, Aozasa K, Okuyama A, Nonomura N. Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation. *J Urol.* 181(4): 1894-1900, 2009.

Fujita K, Nakayama M, Nakai Y, Takayama H, Nishimura K, Ujike T, Nishimura K, Aozasa K, Okuyama A, Nonomura N. Vascular endothelial growth factor receptor 1 expression in pelvic lymph nodes predicts the risk of cancer progression after radical prostatectomy. *Cancer Sci.* 100(6):1047-1050. 2009.

Takayama H, Nonomura N, Nishimura K, Oka D, Shiba M, Nakai Y, Nakayama M, Tsujimura A, Aozasa K, Okuyama A. Decreased immunostaining for macrophage scavenger receptor is associated with poor prognosis of prostate cancer. *BJU Int.* 103(4):470-474. 2008.

2. 学会発表

英文 (1)

Masashi Nakayama, Kazutoshi Fujita, Atsunari Kawashima, Masatoshi Mukai, Akira Nagahara, Yasutomo Nakai, Hitoshi Takayama, Kazuo Nishimura, Katsuyuki Aozasa, Akihiko Okuyama, Norio Nonomura. Vegfr1 expression in pelvic lymph nodes predicts the risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. 99th Annual Meeting, The Journal of Urology, Chicago, April 26, 2009 (Vol. 181, Issue 4, Supplement, Page 99)

和文 (1)

高山仁志、野々村祝夫、河嶋厚成、向井雅俊、永原 啓、芝 政宏、岡 大三、中井 康友、中山雅志、井上 均、西村和郎、奥山明彦
初回生検陰性標本におけるMacrophage Scavenger Receptor (MSR)とTumor-associated Macrophage (TAM)の再生検指標の可能性の検討。第97回日本

泌尿器科学会総会、岡山市。 2009年4月19日
J Urol 181(suppl 4) 99, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし