

201009011A

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・  
細胞バンクシステム利用促進に関する研究  
(H21-政策創薬-一般-008)

平成 22 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 23 (2011) 年 3 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・  
細胞バンクシステム利用促進に関する研究  
(H21-政策創薬-一般-008)

平成 22 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 23 (2011) 年 3 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	-----	7
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	-----	11
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	-----	14
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	-----	17
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	-----	23
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	-----	26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	33

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

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）

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。

研究分担者

- (1) 西野一三 国立精神・神経医療研究センター
- (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 国立長寿医療研究センター研究所
- (6) 清野 透 国立がん研究センター研究所

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・神経医療研究センター）の試料と情報の管理システム整備

国立精神・神経医療研究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。

- 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・神経医療研究センター)の試料と情報の管理システム整備

平成22年12月末現在で、総凍結筋は12,103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1104検体に達した。これらの試料を用いて、遠位型ミオパチー、ミトコンドリア病等の筋疾患の病態、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。病気により増殖率の低い症例においては、この不死化により生化学解析が可能となるなど、その有用性があきらかとなった。

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30例の肝、小腸組織が、学内に、そのうち18件がHSRRBへ提供された。本事業における同意取得率は86%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。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。また広島大学では、肝組織検体4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) 小腸組織での multidrug resistance protein1 (MDR-1) 遺伝子多型とトランスポーター活性の検討

MDR-1 遺伝子多型は-129T/CでT/Cヘテロが18%、T/Tが82%であった。1236T/CでT/Tが30%、C/Cが6%、T/Cが64%であった。

また小腸においてP糖蛋白トランスポーター活性には大きな個人差があり、最小で11.8(nmol・ATP/μgPgp/min)、最大で74.6(nmol・ATP/μgPgp/min)、平均35.5±5.7(nmol・ATP/μgPgp/min)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4検体をHS財団に提供した。また、広島臨床腫瘍研究グループを立ち上げ、18施設の協力のもとで、摘出肝組織の取り扱いに関する共通プロトコールを作成し、一般病院でも研究資源を供給するシステム作りの基盤を構築した。

### 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、③肝組織、肝細胞のHSバンクへの提供数の頭打ち、についてである。

①筋芽細胞の分譲については、非筋細胞(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ている。この点は、分担研究者の橋本が研究を継続し、不死化細胞でも非筋細胞と考えられる細胞の存在が確認でき、その除去方法について確定した方法が見いだされていない。この点はさらに検討を進めてゆく。②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。

③肝組織、肝細胞のHSバンクへの提供数が増加しない最大の理由は感染症の問題である。外科的に採取した組織から非がん部を選別しHSバンクに提供するにしても、多くの肝腫瘍症例においては患者が肝炎ウイルスに感染していることが多く、感染した組織を除外しているHSバンクへの提供ができない。

## 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できた。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. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表（分担報告書を参照）

1. 論文発表
2. 学会発表

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）  
分担研究報告書

神経筋疾患患者筋芽細胞の樹立と利用に関する研究

研究分担者 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・神経医療研究センター神経研究所及び病院において、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）に80検体、平成22年（1月から12月まで）には73検体を追加し、総計1104検体となった。p16/RB経路の不活化とテロメラゼの活性化によるミトコンドリア病筋芽細胞の不活化を行い、不活化の程度、分化能の検討を行った。

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・神経医療研究センターでは、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特性解析

昨年度に樹立されたミトコンドリア病不活化筋芽細胞株（3243変異、8993変異、欠失型）を対象とし、細胞増殖能、多分化能を評価すると同時に、ミトコンドリアDNAの挙動（変異率、コピー数）を解析する。

（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。

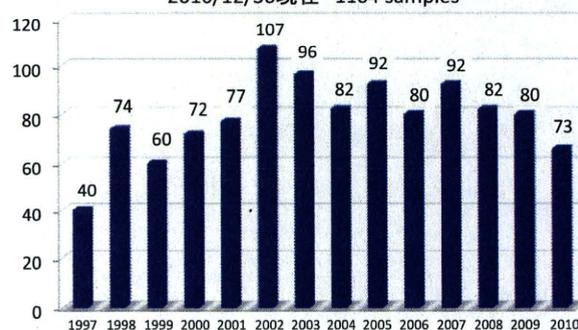
C. 研究結果

1. 筋芽細胞登録の推進と研究者への供与

平成22年1月～12月までに新たに73検体の筋芽細胞の樹立を行った（総数で1104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

2010/12/30現在 1104 samples



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	276	
DMD	83	Total 1104 (2010.12.31)
BMD	35	
LGMD	54	
FCMD	26	
OPMD	11	
Others	67	
神経原性筋萎縮症	31	
ミトコンドリアミオパチー	159	
遠位型ミオパチー	28	
先天性ミオパチー	133	
その他	196	
診断不明	239	
未診断	42	

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・神経医療研究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・神経医療研究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・神経医療研究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特性解析

樹立されたミトコンドリア病不死化筋芽細胞株は、変異ミトコンドリア DNA の種類（3243 変異、8993 変異、欠失型）に依存せず、細胞増殖能の改善を認め、筋管細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞への多分化能を有していた。さらに、これらの細胞株は、大量培養中においても不死化前の筋芽細胞がもつ固有のミトコンドリア DNA の性質（変異率、コピー数）を安定的に維持していた。

### D. 考察

樹立された不死化筋芽細胞株に対する一連の特性解析の結果から、本研究で用いた細胞の不死化技術が広範な神経筋疾患患者由来の筋芽細胞に適応可能であることが明らかとなった。一例として、ミトコンドリア病不死化筋芽細胞株の有用性について以下に述べる。

これまで、ある一定の割合以上の変異ミトコンドリア DNA を有する患者細胞は、ミトコンドリアのエネルギー代謝異常などの影響により細胞増殖能が著しく低下し、解析に供するための大量培養が事実上不可能であった。また、これらの細胞は、変異ミトコンドリア DNA の割合が培養中に変動しやすく、本来のミトコンドリア DNA の病的性質を維持しながら

の培養が困難であった。本研究で樹立された不死化筋芽細胞株は、筋芽細胞本来の多分化能を保持したまま細胞増殖能が改善し、大量培養中においても患者固有のミトコンドリア DNA の病的性質を安定的に維持していた。本技術により、種々のミトコンドリア病に対する患者細胞を用いた病因・病態解明研究への道が大きく拓かれたといえる。

### E. 結論

登録培養細胞の数は順調に伸び 1000 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疾患特異的 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。このような情報を研究者に広報して、共同研究を推進してゆくことが重要と考える。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degeneration of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18410-18415, 2010
- 2) Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino Y, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. *Ann Neurol* 68:845-854, 2010.

#### 2. 学会発表

- 1) 後藤雄一：ミトコンドリア病の病態・診断。ワークショップ「ミトコンドリア病」、第 113 回日本小児科学会総会、盛岡、4. 23, 2010
- 2) 新井ひでえ、田辺雄三、小俣卓、後藤雄一、三牧正和：基底核病変を認めた良性乳児型チトクローム c 酸化酵素欠損症と思われる姉弟例。第 52 回日本小児神経学会、福岡、5. 20, 2010
- 3) 後藤雄一：ミトコンドリア病、教育プログラム「難治性疾患のマネージメントと新規治療法の展望」、日本人類遺伝学会第 55 回大会、大宮、10. 30, 201
- 4) 永田有希、清野透、後藤雄一、橋本有弘：不死化ヒト筋細胞を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー

筋細胞の特性解析. 第33回日本分子生物学会年会、  
神戸、12.8, 2010

- 5) Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS: Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of TFAM. Gordon Research Conference - Mitochondria & Chloroplast, Lucca (Italy), 7.12, 2010
- 6) Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Nonaka I, Goto Y, Nishino. I: Mitochondrial dysfunction and mitophagy in muscle choline kinase beta defect. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, Fukuoka, 12.16, 2010
- 7) Goto Y. Whole mitochondrial DNA sequencing as a screening method of mitochondrial diseases. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and the 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (Jmit), Fukuoka, Japan, 12.18, 2010.

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）  
分担研究報告書

「筋レポジトリー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

独立行政法人

国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 部長

**研究要旨**

（独）国立精神・神経医療研究センターでは、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 22 年 12 月末までに 12103 となった。数年前より、培養筋の保存も開始し、平成 22 年 12 月末までに 1137 検体となった。本レポジトリーを活用し、多くの重要な研究成果が発表されてきている。

不死化筋芽細胞を用いた研究として、XMEA の病態解明に関する研究を行った。XMEA は V-ATPase の複合体形成に関わる分子のひとつ VMA21 の変異を原因とする自己貪食空胞性ミオパチーの一種である。VMA21 の変異と病態の関連はいまだ解明されていないため、本研究において XMEA 患者由来不死化細胞および生検筋を用い、その病態の詳細な解析を行った。培養細胞を用いた解析から、XMEA 細胞において細胞内 pH の上昇と、エンドサイトーシス後の小胞輸送の遅延が観察された。またグリコーゲンの蓄積が観察され、この蓄積は生検筋においても観察された。本研究結果から、XMEA では、VMA21 の変異により V-ATPase の活性低下がおり、細胞内 pH が上昇することで細胞内小胞輸送系が乱れることが病態に関与しているものと考えられた。

**A. 研究目的**

（独）国立精神・神経医療研究センターでは、DNA 診断・治療室を窓口として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ー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、特に不死化培養筋を用いた研究を施行すべく、XMEA (X-linked myopathy with excessive autophagy) の病態に関する研究を行った。XMEA は筋線維内に自己

貪食空胞が蓄積する遺伝性筋疾患のひとつであり、V-ATPase の複合体形成に関わる分子 VMA21 をコードする遺伝子の変異を原因とする。XMEA に特有な筋病理像として、細胞内に蓄積した空胞内に電子密度の高い比較的均一な顆粒状の内容物がみられること、筋線維の基底膜が重層化していることがあげられる。しかしながら、VMA21 の変異と病態の関連はいまだ解明されていない。そこで、我々は XMEA 患者由来不死化細胞および患者生検筋を用い、その病態の詳細な解析を行った。

## B. 研究方法

【筋レポジトリ】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。

【不死化筋細胞】XMEA 患者由来不死化筋芽細胞を用い、その細胞において、①ウエスタンブロットによる VMA21 の発現解析、②酸性度により蛍光波長の変化する Lysosensor を用いた細胞内 pH の測定、③蛍光標識されたリソソーム酵素の基質を用いた酵素活性の測定、④RI 標識タンパク質を用いたタンパク質分解効率の測定、⑤ビオチン標識トランスフェリンを用いた小胞輸送の測定、⑥電子顕微鏡による解析を行った。コントロール細胞として MELAS 及び RBM 患者由来不死化細胞を用い比較を行った。

さらに患者生検筋を用い、電子顕微鏡による解析、免疫染色による解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究に使用される全ての検体は、(独)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。

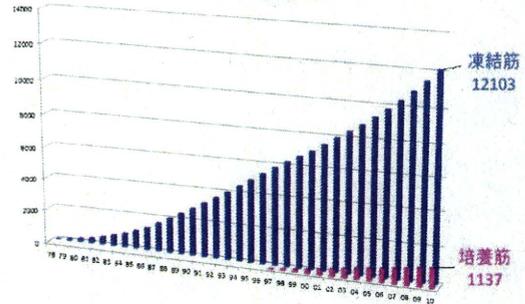
## C. 研究結果

【筋レポジトリ】凍結筋総検体数は、平成 22 年 12 月 31 日までの凍結筋総検体数は、12103 検体に達した。

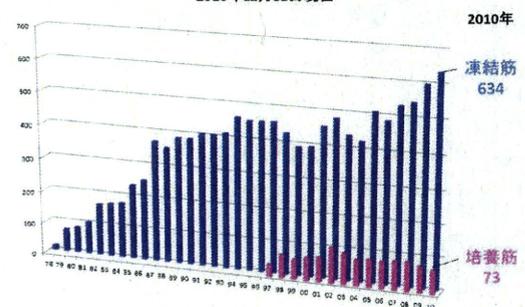
平成 18 年、19 年、20 年、21 年、22 年の凍結筋検体増加数は、それぞれ 483 検体、531 検体、543 検体、595 検体、634 検体であり、平成 22 年は初めて年間の新規検体数が 600 を超え、過去最高を記録した。



筋レポジトリ蓄積検体数  
2010年12月31日現在



筋レポジトリ新規検体数  
2010年12月31日現在



【不死化筋細胞】XMEA 患者由来不死化筋細胞において VMA21 タンパク質の発現はコントロール細胞と比較して約 30%に減少しており、細胞内 pH の有意な上昇が確認された。しかしながら、リソソーム酵素の活性、および長寿命タンパク質の分解効率において有意な差は確認されなかった。ビオチン標識トランスフェリン投与による、エンドサイトーシス後のタンパク質の挙動を経時的にウエスタンブロットで解析した結果、コントロール細胞と比較して XMEA 細胞では、トランスフェリンの発現低下が遅延しており、エンドサイトーシス系細胞内輸送に遅延があることが明らかになった。また、電子顕微鏡による解析から、XMEA 細胞において細胞内にグリコーゲン様の顆粒の蓄積が確認された。

培養細胞の結果をもとに、生検筋におけるグリコーゲンの蓄積を解析したとこ

ろ、筋細胞内にPAS陽性のグリコーゲンの顕著な蓄積を確認し、さらに電子顕微鏡による解析からXMEAに特有の電子密度の高い顆粒がグリコーゲンであることが示唆された。そこで生検骨格筋を用いてグルコースのトランスポーターであるGLUT4の発現を免疫染色により解析したところ、コントロール筋と比較して、筋細胞膜および筋細胞内に強い発現が確認された。さらに細胞内小胞輸送の制御分子Rabファミリーの1つRab7においてもGLUT4同様の変化が確認された。

#### D. 考察

【筋レポジトリー】（独）国立精神・神経医療研究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ーは、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ーである。平成22年は過去最高の新規検体数を記録し、レポジトリーの更なる充実が図られた。

【不死化筋細胞】V-ATPaseは、細胞内小胞膜上においてプロトンポンプとして働き、小胞内のpHを酸性にするという重要な働きを行っている。これまでの研究から、細胞内小胞輸送は小胞間のpHの濃度勾配に依存していることが知られており、V-ATPaseの阻害剤処理により細胞内の小胞輸送が乱れることが報告されている。V-ATPaseはV0,V1の2つのドメインにより構成され、それぞれのドメインは8個と6個の異なるサブユニットにより構成されている。XMEAの原因遺伝子であるVMA21は、酵母を用いた解析からV0ドメイン内のc"サブユニットのアセンブリーに重要な因子であることが明らかになっている。本研究においてXMEA細胞でpHの上昇がみられたことから、XMEA

では、VMA21の発現低下により、V-ATPaseのプロトンポンプとしての機能が低下していることが示唆された。さらにその活性低下が細胞内小胞輸送の遅延を引き起こし、患者筋においてGLUT4のリサイクリングが乱れグルコースの異常な取り込みの原因となり病態に関与することが示唆された。

#### E. 結論

【筋レポジトリー】（独）国立精神・神経医療研究センターのヒト骨格筋レポジトリーは、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。平成22年は過去最高の新規検体数を記録し、更なる充実が図られた。

【不死化筋細胞】本研究結果から、XMEAでは、VMA21の変異によりV-ATPaseの活性低下がおこり、細胞内pHが上昇することで細胞内小胞輸送系が乱れることが病態に関与しているものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T: Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. Nature 464: 1313-1319, Apr, 2010

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. Acta Neuropathol 119: 481-486, Apr, 2010

Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice A, Hattori N, Tsuji S: Mechanisms of Genomic Instabilities Underlying Two Common Fragile-Site-Associated Loci, PARK2 and DMD, in Germ Cell and Cancer Cell Lines. Am J Hum Genet 87: 75-89, Jul, 2010

Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Nishino I: Specific phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. J Cell Sci 123: 3893-3900, Nov, 2010

Liang WC, Nishino I: State of the art in muscle lipid diseases. Acta Myol 29: 351-356, Oct, 2010

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. Ann Neurol in press

## 2. 学会発表

Nishino I: Recent advance in congenital muscular dystrophy. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, 4.17, 2010

Nishino I: State of the art in muscle lipid diseases. World Federation of Neurology, XII

International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.19, 2010

Nishino I: Sialic acid supplementation for distal myopathy with rimmed vacuoles. Satellite Meeting XII International Congress on Neuromuscular Diseases, MUSCLE FATIGUE in NEUROMUSCULAR DISORDERS: Pathogenic Mechanisms and Treatment, Pisa, Italy, 7.23, 2010

Nishino I: Sweetening the therapy for distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010

## 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

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

所 属 聖マリアンナ医科大学医学部 薬理学  
研究者 小林 真一

### 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バンクを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。今年度はヒト組織数の充実に伴い疾患背景別の検体の提供も可能となり、資源としての価値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適したヒト組織バンキングに関する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動物種差のあることが知られており、ヒトにおける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な関わりがあ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り、その違いを調べるには、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薬物の生体内利用に大きく関わることが注目されている。

欧米では脳死患者から得られたヒト組織が移植不適合になり、商業ベースでも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、日本人の組織を用いるためには外科手術などで摘出された組織のうち、病理検査に用いない部分を利用す

る以外に方法がない。

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。

ヒト組織採取にあたっては外科学、病理学との連携がかかせない。学内のこれら部署が効率的に稼動することによりヒト組織バンクの効率的運用が可能となる。そしてこのヒト組織バンクのシステム効率化と資源のバリエーションの系統化がこれら組織を効率的に臨床研究に利用するバンクシステムの価値の向上にかかせない。そこで今回、今後のヒト組織バンクシステムの拡充へ向けての基盤整備を検討した。

## 分担研究報告書

### B. 研究方法

#### (本年度バンク事業)

本年度もあらかじめ文書と口頭で十分に説明し、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見直しを行った。

#### (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、本研究はその生命倫理委員会でも審査、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連結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30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18件であった。同意取得率は学内向け、HSRRBとも86%と同じであった。内訳は肝臓では転移性肝臓癌4例、

C型肝炎肝細胞癌10例、B型肝炎肝細胞癌1例、非感染性肝細胞癌3例、良性肝腫瘍1例、胆管癌9例、小腸では14例であった。この内HSRRBに提供可能なのは肝組織7例、小腸組織5例であった。

#### 2. 肝組織採取システムの効率化とHSRRBへの供給体制の拡充

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。

従来より外科学とHIV検査の実施について話し合いを行ってきた。その結果、本年度からすべての外科手術でHIV検査が行われるようになった。このためHSRRBへの供給可能な検体が増えたことが明らかとなった。

### D. 考察

本年度は30件のヒト組織のバンクへの提供があった。例年よりは件数としては少ない傾向にあったが、今後は件数の増加が見込まれると思われる。また、同意取得率もほぼ例年通りであった。この3年間の通算で肝臓組織が20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)のヒト肝臓が採取され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。臨床研究の大きな問題として疾患別の症例数をいかに集め

## 分担研究報告書

るかが重要である。このように各群のエントリーをより短時間に行えるシステムの整備により、より価値の高い研究が可能になった。本バンクは検体数の増大により、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。

問題点としてはこれまでと同様、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。

これまで 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た。しかしながら昨年度の研究で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。そこで外科学と話し合いを続けた結果、本年度から外科の手術で HIV 検査が行われるようになった。このため HSRRB へ供給可能な検体が増えた。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。今後はさらに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 に提供できる組織が増加することが示唆された。

### E. 結論

本年度は肝組織採取システムの効率的運営

のためのシステムの見直しを行った。また、これまで懸案であった HIV 検査が行われるようになり、今後 HSRRB に提供可能な検体の増加が見込まれるようになった。

### F. 研究発表

(誌上发表)

特になし

(学会発表)

特になし

### H. 知的所有権の出願・取得状況

特になし

## 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

所 属 聖マリアンナ医科大学大学院  
遺伝子多型・機能解析学

研究者 熊井俊夫

### 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トランスポーターの遺伝子多型とトランスポーター活性の解析を行い、遺伝子多型情報とトランスポーター活性情報のパネル化を検討することにより日本人小腸 P 糖蛋白での初めての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。最近小腸にも薬物トランスポーターが存在し、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

得た上で研究に利用している。本学大学病院において臍頭十二指腸切除手術適応患者に十分に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組織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。そこで今回、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、小腸における薬物トランスポーターの遺伝子多型とトランスポーター活性のパターンについて検討した。

## 分担研究報告書

### B. 研究方法

(小腸組織での multidrug resistance protein-1 (*MDR-1*)遺伝子多型とトランスポーター活性の検討)

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 21 名を対象とした。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 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。Genomic Prep™ cells and tissue DNA Isolation kit(GE Healthcare)を用いて DNA を抽出し、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。トランスポーター活性は P-グリコプロテインアッセイプラットフォーム (Pgp-Glo™ Assay System, Promega Co. Ltd. Madison, WI, USA)を用いて解析した。

(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で審査、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

今回の小腸における薬物トランスポーターの遺伝子多型に差が見られた。*MDR-1* 遺伝子多型は $129\text{T/C}$ で T/C ヘテロが 18%、T/T が 82%であった。 $1236\text{T/C}$ で T/T が 30%、C/C が 6%、T/C が 64%であった。 $2677\text{G/TA}$ は G/G が 18%、G/T が 35%、G/A が 12%、T/T が 12%、T/A が 23%であった。 $3435\text{C/T}$ は C/C が 18%、T/C が 59%、T/T が 23%であった。 $4036\text{A/G}$ は A/A が 42%、\*A/G が 47%、G/G が 1%であった。

小腸において P 糖蛋白トランスポーター活性には大きな個人差があり、最小で  $11.8(\text{nmol} \cdot \text{ATP}/\mu\text{gPgp}/\text{min})$ 、最大で  $74.6(\text{nmol} \cdot \text{ATP}/\mu\text{gPgp}/\text{min})$ 、平均  $35.5 \pm 5.7(\text{nmol} \cdot \text{ATP}/\mu\text{gPgp}/\text{min})$ であった。

### D. 考察

これまでも小腸において P 糖蛋白の発現についてはいくつかの報告がなされていた。しかしながら日本人の小腸で P 糖蛋白の発現の研究は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は $129\text{T/C}$ 、 $1236\text{T/C}$ 、 $2677\text{G/TA}$ 、 $3435\text{C/T}$ 、 $4036\text{A/G}$ はこれまでに肝臓などで報告されたパターンとほぼ一致していた。一方日本人小腸では P 糖蛋白トランスポーター活性に関し日本人での初めてのデータが明らかになった。P 糖蛋白トランスポーター活性には大きな個人差があり、最小で  $11.8(\text{nmol} \cdot \text{ATP}/\mu\text{gPgp}/\text{min})$ 、最大で  $74.6(\text{nmol} \cdot \text{ATP}/\mu\text{gPgp}/\text{min})$ であり最

## 分担研究報告書

大で 6.3 倍の開きがあった。なお平均  $35.5 \pm 5.7(\text{nmol} \cdot \text{ATP}/\mu\text{gPgp}/\text{min})$ であった。このデータは日本人における重要な結果といえる。P 糖蛋白トランスポーター活性はシクロスポリンなどの免疫抑制薬や薬物代謝酵素 CYP3A の関係する多くの薬物を基質として体外に薬物を排出することが良く知られている。小腸における初回通過効果でも無視できない役割を担っており、今回の結果は肝臓における発現パターンとは異なり、日本で初めてのデータと言える。

### 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 *MDR-1* の遺伝子多型をパネル化するとともに P 糖蛋白活性を明らかにした。

### F. 研究発表

1. 誌上発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）

（分担）研究報告書（平成22年度）

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  
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

研究分担者 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授 大段秀樹

**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殊な試料提供や、希少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4検体を平成22年度もHSRRBへ提供した。

2. 希少な肝癌症例（胆管細胞癌、混合型肝癌）からの細胞分離、培養の試み

肝細胞癌に加えて胆管細胞癌、混合型肝癌の癌組織からの細胞分離を継続して行った。胆管細胞癌の手術検体からの培養は、症例によっては一定の成果を認めたが、継代培養には至らなかった。今後、効率的な細胞採取法、長期培養法の確立を検討する。

3. 広島臨床腫瘍研究グループ(Hiroshima Study group of Clinical Oncology: HiSCO) の立ち上げ

悪性腫瘍に関する研究の進歩およびその成果の普及をはかることを目的として、広島大学消化器外科と県内関連施設（18施設）とが連携した臨床試験を立ち上げた。HiSCO-01試験として、「切除可能な大腸癌肝転移に対するXELOXとパベシツマブによる術前 vs. 術後化学療法の有効性に関する多施設共同ランダム化第Ⅱ/第Ⅲ相試験」の準備を進め、主要病院の倫理審査の承諾を受けて試験開始となった。現時点では3症例が登録された。