

#### D. 考察

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。HiSCO-01試験においても、今後症例数の蓄積とその解析から、CASHに関する新しい知見を報告できるように研究を進めていきたい。また、現時点では広島大学を中心とする関連施設に限定的に使用される研究試料を、将来的に公的資源化が可能となるか検討する。

近年ウイルス性肝炎を背景とした肝細胞癌症例から、糖尿病、自己免疫性疾患、またNASH (non alcoholic steato hepatitis) を背景とした肝細胞癌の発癌症例が増加している。当科でも肝細胞癌初回肝切除症例のうち非B非C肝細胞癌症例の比率が年々上昇する傾向にあり、平成21年では約23%を占めるまでになった。従来の、肝炎を背景とした肝細胞癌の発癌のメカニズムの解明、治療法の開発とは異なり、非B非C肝細胞癌症例の発癌のメカニズムの解明は未だ十分になされていない。非B非C肝細胞癌症例からの研究組織の提供は、病態解明に重要であり、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る。

術前感染症の評価は、HBs 抗原、HCV 抗体の精査が一般的であるが、今後手術によって摘出された組織の研究利用を普遍化するには、医療従事者、研究者の安全性を担保する観点からもHIV検査を標準化する必要がある。一方、組織提供する患者の立場から、HIV検査を一般化する場合の倫理的配慮 (HIV陽性と判明した場合の心身両面でのケア)、臨床試験コーディネーター(CRC)の導入、各病院施設の病理医との連携などが望まれており、一般病院でも手術検体を研究利用できるようにするための基盤整備が必要と思われる。

#### 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の拡大と提供組織の多様化を進める必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) H. Ohdan: Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. Clin Pharmacol Ther. 2010, 87(1):23-26
- 2) M. Yoshida, S. Ikeda, D. Sumitani, Y. Takakura, M. Yoshimitsu, M. Shimomura, M. Noma, M. Tokunaga, M. Okajima, H. Ohdan: Alterations in portal vein blood pH, hepatic functions, and hepatic histology in a porcine carbon dioxide pneumoperitoneum model. Surg Endosc. 2010, 24(7):1693-1700
- 3) H. Tahara, K. Ide, NB. Basnet, Y. Tanaka, H. Matsuda, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, H. Ohdan: Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. J Immunol. 2010, 184(6):3269-3275
- 4) M. Oda, K. Arihiro, T. Kataika, A. Osaki, T. Asahara, H. Ohdan: Comparison of immunohistochemistry assays and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for analyzing hormone receptor status in human breast carcinoma. Pathol Int. 2010, 60(4):305-315
- 5) H. Amano, H. Hino, C. Tateno, K. Emoto, Y. Imaoka, C. Yamasaki, T. Itamoto, H. Tashiro, T. Asahara, H. Ohdan, K. Yoshizato: Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. J Surg Res. 2011; Jan 7 [Epub ahead of print]
- 6) Y. Ushitora, H. Tashiro, S. Takahashi, H. Amano, A. Oshita, T. Kobayashi, K. Chayama, H. Ohdan: Splenectomy in Chronic Hepatic Disorders: Portal Vein Thrombosis and improvement of Liver Function. Dig Surg. 2011, 28(1):9-14
- 7) S. Kuroda, H. Tashiro, T. Kobayashi, A. Oshita, H. Amano, H. Ohdan: selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma classified as child-pugh class B. World J Surg. 2010,

[Ahead of print]

8) T. Kawaoka, N. Hiraga, S. Takahashi, S. Takaki, F. Mitsui, M. Tsuge, Y. Nagaoki, Y. Kimura, Y. Hashimoto, Y. Katamura, A. Hiramatsu, K. Waki, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, H. Tashiro, H. Ohdan, K. Chayama: Prolongation of interferon therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: analysis of predictive factors of sustained virological response, including amino acid sequence of the core and NS5A regions of hepatitis C virus. *Scand J Gastroenterol* 2010 Dec;45(12):1488-1496

9) 大段秀樹: ネオオーラル10年の歩み 解明されたシクロスポリンの新規作用 B-1細胞への分化抑制作用(解説).

今日の移植(0916-0094)23巻6号 Page722-728(2010.12)

10) 大段秀樹: 【肝胆膵薬物治療学の進歩 この30年】肝臓分野 肝移植 肝移植の免疫抑制療法におけるセルセプトの役割(解説/特集). 肝・胆・膵(0389-4991)61巻6号 Page1182-1187(2010.12)

11) 大段秀樹: 【抗体関連型拒絶反応の病理と臨床】B細胞lineageと抗体性拒絶反応の制御(解説/特集). 移植(0578-7947)45巻5号 Page434-440(2010.10)

12) 尾上隆司, 大段秀樹: T細胞の経口トランス誘導と肝類洞内皮細胞(解説). 臨床免疫・アレルギー科(1881-1930)54巻5号 Page604-612(2010.11)

13) 大段秀樹: 肝臓外科と肝内在免疫制御細胞(総説/抄録あり). *Minophagen Medical Review* (0388-4783)55巻3号 Page193-205(2010.09)

14) 野間翠, 大段秀樹: 肝移植後9年を経て発症した乳癌の1例(原著論文/症例報告/抄録あり). 乳癌の臨床(0911-2251)25巻4号 Page479-483(2010.08)

15) 山本英喜, 内田一徳, 大下彰彦, 小川喜輝, 春田直樹, 大段秀樹: 外観上傷のない腹腔鏡下胆嚢摘出術単孔式腹腔鏡下手術(解説). 広島医学(0367-5904)63巻7号 Page505-508(2010.07)

16) 大段秀樹: 肝臓移植の現況と展望. 日本外科系連合学会誌(0385-7883)35巻1号 Page109-110(2010.02)

17) 大段秀樹: 【Liver Transplant Frontier】

肝移植における免疫モニタリング. 今日の移植(0916-0094)23巻3号 Page363-369(2010.06)

18) 田代裕尊, 石山宏平, 大平真裕, 天野尋暢, 井手健太郎, 大下彰彦, 小林剛, 尾上隆司, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 浅原利正, 大段秀樹: 生体肝移植における術後感染症とドナー肝由来活性化natural killer細胞療法による感染予防対策(原著論文/抄録あり). 日本外科感染症学会雑誌(1349-5755)7巻2号 Page89-94(2010.04)

19) 大下彰彦, 大段秀樹: 救急外来当直医必携 救急・蘇生処置 輸血(緊急輸血)(解説/特集). 消化器外科(0387-2645)33巻5号 Page552-555(2010.06)

20) 大段秀樹, 尾上隆司, 番匠谷将孝: 肝移植. 消化器外科学レビュー2010 最新主要文献と解説 Page98-104(2010.04)

## 2. 学会発表

1) 田代裕尊, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 尾上隆司, 井手健太郎, 伊禮俊充, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 板本敏行, 浅原利正, 大段秀樹: (シンポジウム) 肝細胞癌に対する外科治療とその成績. 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010.4.8-10

2) 大下彰彦, 板本敏行, 天野尋暢, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 谷本新学, 小林剛, 田代裕尊, 大段秀樹: 当科における腹腔鏡下肝切除術の新たな手術手技とHCCに対する治療成績. 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010.4.8-10

3) 番匠谷将孝, 尾上隆司, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 梶谷桂子, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹: 肝類洞内皮細胞の抗原特異的免疫寛容誘導能～in vivoモデルでの解析～. 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010.4.8-10

4) 大段秀樹: (特別講演) 肝癌外科治療の現況と展望. 第11回東広島サイジェオンの会学術集会, 広島, 2010.4.19

5) H. Ohdan, M. Ohira, K. Ishiyama, Y. Tanaka, M. Doskali, Y. Igarashi, H. Tashiro, K. Chayama, T. Asahara: Adoptive Immunotherapy with Liver Allograft-Derived NK/NKTCells Promotes Host Innate Immunity and Has Anti-HCC, Anti-HCV, and Anti-Infectious Effects after Liver. American Transplant Congress 2010, San Diego(U.S.A.), 2010.5.1-5

6) Y. Tanaka, H. Tashiro, H. Ohdan: Optimization

of Immunosuppressive Therapy on the Basis of Immune Monitoring by a Multiparametric Mixed Lymphocyte Reaction Assay Reduces Infectious Complications and Mortality .

American Transplant Congress 2010, San Diego(U.S.A.), 2010.5.1-5

7) H. Tazawa, T. Irei, Y. Igarashi, Y. Tanaka, H. Tashiro, T. Asahara, H. Ohdan : Persistent Absence of B Cells with Receptors for Donor-Type Blood Group Antigens in ABO-Incompatible Liver Transplant Patients Treated with an Immunosuppressive Regimen Containing Rituximab and Calcineurin Inhibitors.

American Transplant Congress 2010, San Diego(U.S.A.), 2010.5.1-5

8) H. Tazawa, T. Irei, Y. Igarashi, H. Tashiro, H. Ohdan: Differential Susceptibility of B Cell Subpopulations to Proteasome Inhibition by Bortezomib Targets Both B-1-Like Blasts and Plasma Cells and Reduces the Anti-CD20 Antibody Level.

American Transplant Congress 2010, San Diego (U.S.A.), 2010.5.1-5

9) M. Banshodani, T. Onoe, M. Shishida, Y. Igarashi, Y. Tanaka, H. Ohdan : Allogeneic Liver Sinusoidal Endothelial Cells Negatively Regulate the Immune Response of Corresponding T Cells in a Liver Endothelium Repopulation Model.

American Transplant Congress 2010, San Diego (U.S.A.), 2010.5.1-5

10) 大段秀樹, 田代裕尊, 浅原利正, 茶山一彰 : (ワークショップ) 肝移植後における抗アロおよび抗HCV応答のクロストーク機構の解明と新規抗HCV療法への展開. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.5.27-28.

11) 番匠谷将孝, 尾上隆司, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹 : 肝類洞壁細胞 1 肝類洞内皮細胞の抗原特異的免疫寛容誘導能の解析. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.5.27-28.

12) 田代裕尊, 良雄一郎, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 相方浩, 高橋祥一, 茶山一彰, 浅原利正, 板本敏行, 大段秀樹 : 脾臓・PSE2慢性肝疾患に対する脾臓摘出術の効果と合併症. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.5.27-28

13) 伊禮俊充, 尾上隆司, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 堀田龍一, 太田浩司, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹 : 肝移植 1 重度肺内血流シャントを呈する肝肺症候群合併肝硬変に対する生体肝移植の適応. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.5.27-28

14) 尾上隆司, 大平真裕, 伊禮俊充, 井手健太郎, 田中友加, 五十嵐友香, Daskali Marlen, 田代裕尊, 大段秀樹 : 肝移植 2 ドナー肝由来活性化リンパ球移入を用いた肝移植後肝癌再発制御法の臨床評価. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.5.27-28

15) 田中友加, 田代裕尊, 大段秀樹 : 肝移植 2 肝臓移植後に生じる抗ドナー免疫応答はC型肝炎ウイルス増殖を抑制する. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.5.27-28

16) 大段秀樹 : Why does Enoxaparin become Standard of the VTE prevention? Actually with the current state \*undecided. vte protection network in Hiroshima DRAFT, 広島, 2010.6.16

17) 大段秀樹 : 移植後免疫療法における最新の進歩. 第55回(社)日本透析医学会学術集会・総会, 兵庫, 2010.6.18-20

18) 田中友加, 大段秀樹 : (シンポジウム) ドナー肝由来活性化NK/NKT細胞を用いた肝癌肝移植後の養子免疫療法. 第20回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 2010.6.26-27

19) 天野尋暢, 田澤宏文, 尾上隆司, 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 井手健太郎, 黒田慎太郎, 谷本新学, 高木慎太郎, 茶山一彰, 浅原利正, 大段秀樹 : (シンポジウム) 「手術手技(生体肝移植手術手技の標準化)～次世代への匠の技の継承～」. 第28回日本肝移植研究会, 広島 2010.7.1-2

20) 大下彰彦, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 田中友加, 尾上隆司, 井手健太郎, 田原裕之, 番匠谷将孝, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 浅原利正, 大段秀樹 : (シンポジウム) 当科におけるグラフト容量からみた生体肝移植ドナー術前評価の現状. 第28回日本肝移植研究会, 広島, 2010.7.1-2

21) 黒田慎太郎, 大平真裕, 石山宏平, 田中友加, 浅原利正, 茶山一彰, 大段秀樹 : child-pugh B 原発性肝細胞癌に対する肝切除・肝移植症例の検討. 第28回日本肝移植研究会, 広島,

2010. 7. 1-2

22) Doslali Marlen, 大平真裕, 石風呂実, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 田代裕尊, 堀口純, 茶山一彰, 大段秀樹 :

Possibility of adoptive immunotherapy with CD56+ propagated cells for inducing anti HCV activity. 第28回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2

23) Basnet Nabin, 伊禮俊充, 番匠谷将孝, 田中友加, 浅原利正, 大段秀樹 : Severe thrombocytopenia before transplantation predicts persistent thrombocytopenia in liver transplant recipients .

第28回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2

24) 五十嵐友香, 尾上隆司, 五十嵐友香, 田中友加, 田原裕之, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田澤宏文, 田代裕尊, 浅原利正, 大段秀樹 : 糖鎖抗原を表出した肝類洞内皮細胞はB細胞の抗体産生を抑制できる. 第28回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2

25) 番匠谷将孝, 田代裕尊, 井手健太郎, 尾上隆司, 伊禮俊充, 浅原利正, 大段秀樹 : 肝類洞内皮細胞の免疫寛容誘導能の解析～肝移植後の免疫寛容をめざした試み. 第28回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2

26) 田中友加, 田代裕尊, 黒田慎太郎, 天野尋暢, 大下彰彦, 谷本新学, 田澤宏文, 板本敏行, 大段秀樹 : 免疫モニタリング下至適免疫抑制療法は肝移植後合併症発症率を軽減するか. 第28回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2

27) 小林剛, 田代裕尊, 大下彰彦, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 板本敏行, 大段秀樹 : 大腸癌肝転移切除後の予後因子. 第46回日本肝癌研究会, 大阪, 2010. 7. 8-9

28) 天野尋暢, 田代裕尊, 大下彰彦, 小林剛, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 板本敏行, 大段秀樹 : 肝細胞癌初回肝切除後10年以上生存例の検討. 第46回日本肝癌研究会, 大阪, 2010. 7. 8-9

29) 大段秀樹 : 臓器移植の現状と課題. 第2回兵庫県腎移植推進懇親会, 兵庫, 2010. 7. 17

30) 大段秀樹 : 肝癌／肝炎に対する免疫細胞療法の可能性. 北陸Cancer Forum, 金沢, 2010. 7. 24

31) Y. Tanaka, H. Ohdan : Immune-monitoring in liver transplant patients by multiparameter mixed lymphocyte reaction assay using CFSE-labeling technique. 14TH INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 兵庫, 2010. 8. 22-27

32) 大段秀樹 : 外科と化学療法. 第18回日本外科

学会生涯教育セミナー (第85回中国四国外科学会総会・第15回中国四国内視鏡外科研究会), 香川, 2010. 9. 3 - 4

33) 大段秀樹 : CKDの治療と管理 up to date. 第2回広島腎移植検討会, 広島, 2010. 9. 30

34) 大段秀樹 : 腎移植の up-to-date. 第19回中国腎不全研究会, 広島, 2010. 11. 9

35) 谷本新学, 田代裕尊, 良雄一郎, 小川尚之, 黒田慎太郎, 小林剛, 宮田義浩, 大段秀樹 : 肝細胞癌に対する外科治療とその成績に対する肝移植療法の基礎的実験. 分子標的治療を応用した肝癌再発抑制の研究. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010. 9. 22-24

36) 大段秀樹 : 移植免疫. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20 - 22

37) 谷本新学, 田代裕尊, 良雄一郎, 小川尚之, 黒田慎太郎, 小林剛, 宮田義浩, 大段秀樹 : 肝細胞癌に対する外科治療とその成績に対する肝移植療法の基礎的実験 : 分子標的治療を応用した肝癌再発抑制の研究. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010. 9. 22-24

38) 大段秀樹 : 移植免疫 1. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

39) 大段秀樹 : ATC2010へのOutputとFeedback～慢性拒絶反応克服へのヒント～. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

40) 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 五十嵐友香, 田澤宏文, Doslali Marlen, Basnet Nabin, 田代裕尊, 大段秀樹 : 肝臓移植後における自然免疫細胞移入と獲得免疫抑制の最適化による生体防御能を保持した免疫抑制療法. 第46回日本移植学会総会 京都2010. 10. 20-22

41) 五十嵐友香, 伊禮俊充, 大段秀樹 : 糖鎖抗原を表出した肝類洞内皮細胞は、応答するB細胞を特異的に抑制する. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

42) 田澤宏文, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 田中友加, 尾上隆司, 井手健太郎, 田原裕之, 番匠谷将孝, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹 : 既存抗MHC抗体陽性同種移植、異種移植、血液型不適合移植におけるプロテアソーム阻害剤 (ボルテゾミブ) のB細胞に対する免疫抑制効果の検討. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20 - 22

43) 尾上隆司, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 堀田龍一, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹 : 生体部分肝移植における過小グラフト症候群に対するPGE1門脈注入療法の有用性の検討. 第46回日本移植学会総会,

京都, 2010. 10. 20-22

44) 田澤宏文, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 田中友加, 尾上隆司, 井出健太郎, 田原裕之, 番匠谷将孝, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹: 血液型不適合肝移植後の血液型抗原認識B細胞性免疫寛容の証明. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

45) 山下正博, 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 堀田龍一, 寺岡義布史, 平田文宏, 橋本慎二, 田代裕尊, 大段秀樹: 当院における高齢生体肝移植レシピエントの臨床的検討. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

46) 井手健太郎, 石田裕子, 田中友加, 尾上隆司, 五十嵐友香, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 田代裕尊, 大段秀樹: 胆汁中Fractalkine測定による肝移植後グラフトバイオマーカーの開発. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

47) 番匠谷将孝, 尾上隆司, 志々田将幸, 五十嵐友香, 田中友加, 田原裕之, 井手健太郎, 梶谷桂子, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 橋本慎二, 平田文宏, 田代裕尊, 大段秀樹: 肝類洞内皮細胞のアロ応答性T細胞制御能: in vivoモデルでの解明, 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

48) 田代裕尊, 良雄一郎, 小川尚之, 小林剛, 黒田慎太郎, 谷本新学, 浅原利正, 大段秀樹: 肝細胞癌に対する肝移植療法の基礎的実験: スフィンゴシン1ーリン酸 (S1P)受容体アゴニストによる肝癌再発抑制の研究. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

49) 堀田龍一, Doskali Marlen, 田中友加, 五十嵐友香, 橋本慎二, 平田文宏, 寺岡義布史, 山下正博, 田澤宏文, 番匠谷将孝, Basnet Nabin, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹: IL-2/OKT3刺激により活性化された抹消血由来CD56+細胞のHCV増殖抑制効果と抗腫瘍効果. 第46回日本移植学会総会. 京都, 2010. 10. 20-22

50) 大段秀樹: (イブニングセミナー) ATC2010へのOutputとFeedback~慢性拒絶反応克服へのヒント~. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22

51) 大下彰彦, 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 尾上隆司, 井出健太郎, 大段秀樹: (シンポジウム) 肝離断におけるデバイスの有効な利用法 -CUSAとBipolar coagulationを中心として-. 第36回広島肝胆膵外科手術研究会, 広島,

2010. 11. 9

52) 大段秀樹: 若手研究者におけるABO血液型不適合移植の基礎的研究. 第37回日本臓器保存生物医学会学術集会, 新潟, 2010. 11. 19

53) 黒田慎太郎, 田代裕尊, 五十嵐友香, 谷本新学, 大下彰彦, 小林剛, 天野尋暢, 楠部潤子, 大段秀樹: 脂肪肝における虚血再灌流障害の機序とその治療戦略. 第37回日本臓器保存生物医学会学術集会, 新潟, 2010. 11. 19

54) 大段秀樹: 生体肝移植の病理. 第2回広島臓器移植セミナー, 広島, 2010. 12. 8

55) 大段秀樹: 肝胆膵癌. 第5回Chugoku Oncology and DIF Conference (CODC), 広島, 2011. 1. 8

56) 大段秀樹: (シンポジウム) 免疫抑制剤最小化の末にいかにして免疫寛容は誘導されるか. 第44回日本臨床腎移植学会, 兵庫, 2011. 1. 26-28

57) 大段秀樹: (アナライザーセッション) ATC/ITCS 2010からの報告. 第44回日本臨床腎移植学会, 兵庫, 2011. 1. 26-28

58) 大下彰彦, 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 尾上隆司, 井出健太郎, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 高木慎太郎, 高橋祥一, 有廣光司, 茶山一彰, 大段秀樹: 生体肝移植における脂肪肝ドナーのダイエットの有用性. 第25回広島肝疾患ゼミナール, 広島, 2011. 2. 5

59) 黒田慎太郎, 田代裕尊, 藤國宣明, 楠部潤子, 田澤宏文, 谷本新学, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 番匠谷将孝, 井出健太郎, 尾上隆司, 大段秀樹: child-pugh B 原発性肝細胞癌に対する肝切除・肝移植症例の検討. 第25回広島肝疾患ゼミナール, 広島, 2011. 2. 5

60) 谷本新学, 田代裕尊, 相方浩, 安部智之, 楠部潤子, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 高橋祥一, 茶山一彰, 大段秀樹: C型慢性肝炎による肝細胞癌切除後のPEG-IFN療法による予後改善効果. 第25回広島肝疾患ゼミナール, 広島, 2011. 2. 5

61) 清水誠一, 田代裕尊, 尾上隆司, 井出健太郎, 大下彰彦, 菅野啓子, 三隅俊博, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 森本博司, 小林剛, 天野尋暢, 大段秀樹: 脳死肝移植の2例. 第25回広島肝疾患ゼミナール, 広島, 2011. 2. 5

62) 大段秀樹: 免疫療法の最適化による治療効果向上を目指して, 第8回日本免疫治療学研究会学術集会, 東京, 2011. 2. 26

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進（政策創薬総合研究事業）研究事業）分担研究報告書

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

研究分担者 橋本 有弘 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部長

**研究要旨** 私たちは、初代培養ヒト筋細胞を不死化する独自の技術を開発した。ディシェンヌ型および福山型筋ジストロフィーの患者由来初代培養筋細胞についても、正常筋細胞と同様に増殖・分化能を保持したまま不死化することに成功した。しかし、筋細胞の割合が低いという、大きな問題があった。我々は、セルソーターによる細胞分画と細胞クローニング技術を応用することによって、0.1%しか含まれていない不死化筋細胞を純化・クローン化することに成功した。すなわち、筋細胞の比率がきわめて少ない初代培養からも、不死化筋細胞を純化することが可能になった。疾患筋組織由来ヒト筋細胞から「不死化筋細胞クローン」を樹立する技術は、筋疾患の発症機序解明および治療法開発に大いに貢献することが期待できる。

A. 研究目的

ヒト初代培養筋細胞の増殖・分化能は、継代を繰り返すと著しく低下することが知られている。国立精神・神経疾患研究センターには、様々な神経筋疾患患者由来の初代培養筋細胞が保存されている。これらの1000例に達する初代培養ヒト筋細胞の中には、発症機構の不明な疾患や、他に報告例のない超希少疾患が含まれている。これらの細胞資源を不死化できれば、筋疾患由来細胞を広範に供給・利用することが可能になり、筋疾患研究の進展に大いに貢献するものと考えられる。本研究では、先行研究において確立したヒト初代培養筋細胞の不死化法を、疾患由来筋細胞に応用し、不死化筋細胞バンクを構築するために必要な基盤技術を確立する。

B. 研究方法

**細胞培養** 国立精神・神経疾患研究センターにおいて収集・保存されている初代培養ヒト筋細胞ライブラリーに含まれる、ディシェンヌ型筋ジストロフィーおよび福山型筋ジストロフィー患者由来筋細胞を、国立がんセンター研究 清野 透博士による遺伝子導入実験に供した。細胞培養液としては Primary

Myocytes Growth Medium (pmGM, Wada et al., 2002)を用いた。細胞培養ディッシュはI型コラーゲン・コート・ディッシュ(スミロン、c-1シャーレ、マルチウエル・プレート)を用いた。筋分化は、Primary Myocytes Differentiation Medium (pmDM, Wada et al., 2002)中で培養することによって誘導した。フローサイトメトリーによる細胞分画 培養細胞をNCAM抗体によって染色し、陽性細胞をセルソーターFACS AriaII (BD)によって同定し、分離した。免疫染色 細胞を4%パラフォルムアルデヒドで固定後、骨格筋最終分化マーカーであるmyosin heavy chain (MyHC)に対するモノクローナル抗体MF20と4℃で1-2晩反応させた。次に、Cy3標識抗マウスIgG抗体と反応させた。

C. 研究結果

不死化培養細胞における筋細胞の存在率の検討 昨年度不死化したディシェンヌ型筋ジストロフィー由来初代培養筋細胞3種のうち、もともと筋細胞含有率が低いと予想された登録番号01-536M(略称DMD1)について筋細胞の含有率を検討した。フローサイトメトリー(第一回目)によって不死化細胞集団中

の NCAM 陽性細胞を検出したところ、0.1%以下であることが明らかになった。

#### フローサイトメトリーによる不死化筋細胞の純化

フローサイトメトリー（一回目）によって、不死化後の培養細胞集団に 0.1%以下しか含まれていなかった NCAM 陽性細胞を分離した。およそ 1000 細胞を 96-well plate で培養し、24-well plate、6-well plate、90-mm ディッシュへと、順次継代し、培養スケールを拡大した。

拡大培養後、フローサイトメトリー（二回目）によって NCAM 陽性細胞を検出したところ、存在率は 47%であった。再びこの NCAM 陽性細胞を分離培養し、継代と拡大培養をおこなった。その後、フローサイトメトリー（三回目）によって NCAM 陽性細胞を検出したところ、筋細胞の純度は 97%にまで向上し、ほぼ筋細胞のみからなる細胞集団が得られた。

#### 不死化筋細胞のクローン化

2 回のフローサイトメトリーによって筋細胞の純度は 97%まで向上したが、詳細な分子細胞生物学的解析をおこなうためには細胞をクローン化する必要がある。そこで、セルソーターを用いて、NCAM 陽性細胞を 96-well plate の well に 1 細胞ずつ播種した。96-well plate から 24-well plate、6-well plate、90-mm ディッシュへと、順次培養スケールを拡大し、増殖がよく、形態的が compact なクローンを複数分離・樹立した。最終的に 4 クローンを解析対象とした。

#### DMD 患者由来不死化筋細胞クローンの分化能

DMD1 より分離樹立した 4 つの不死化筋細胞クローンを分化培地中で培養したところ、いずれのクローンも細胞融合し、筋管細胞を形成した。筋分化マーカーである MyHC の発現も確認された。また、いずれのクローンも全細胞がデスミン陽性であった。

#### (倫理面への配慮)

ヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を得、規定にしたがって実施した。

#### D. 考察

私たちは、先行研究において hTERT, cyclinD1, 変異 CDK4 の導入により、正常ヒト筋細胞を効率良く不死化する方法を確立した。しかし、正常筋組織および筋損傷の軽微な Leigh 脳症筋組織から分離した細胞を用いた場合は、非筋細胞の混在がほとんど認められないのに対し、ディシェンヌ型および福山型筋ジストロフィーでは、筋損傷が著しく、線維化も起こりがちであるため、線維芽細胞などの非筋細胞の混入は避けられない可能性が高いと考えられた。また培養期間の延長に伴い、筋細胞の比率低下も観察されていた。

正常筋組織および Leigh 脳症筋組織から分離した細胞については、まず、不死化前に筋細胞をクローニングによって分離してから、遺伝子導入を実施した。したがって、得られた不死化細胞は、初めからほぼ純化された筋細胞集団であり、さらに筋細胞を分離する必要はなかった。一方、筋細胞の比率が低い初代培養細胞集団の場合、不死化前に筋細胞をクローニングすることは難しい。一方、筋細胞を純化することなしに不死化する場合は、必然的に不死化後に筋細胞を分離し、純化する必要が生じる。不死化前のクローニングによる筋細胞の分離には、多大な労力を要するため、初代培養を直接不死化することの利点は大きい。しかし、不死化後の細胞集団から筋細胞を分離し、純化する方法は、これまで確立されていなかった。如何にしてわずかしか存在しない筋細胞を分離するかという点が大きな課題であった。

今回、セルソーターを用いたフローサイト

メトリーによって、わずか 0.1%しか含まれていなかった不死化ヒト筋細胞を純化し、最終的にはクローンとして分離樹立できることが明らかになった。この方法を用いることによって、きわめて少量の筋細胞しか含まない初代培養細胞集団からも、不死化筋細胞を分離し、樹立することが可能になった。

#### E. 結論

筋細胞を 0.1%しか含まない、ディシェンヌ型筋ジストロフィー患者筋組織から分離した初代培養細胞集団を不死化し、さらに不死化細胞集団に含まれる不死化筋細胞を分離・クローン化することに成功した。本研究の結果、筋細胞の含有率が低い初代培養から不死化筋細胞を分離・樹立する途が開かれた。筋細胞を識別するための適切な指標と効率よく分離するための方法が確立されたことにより、既存の初代培養細胞から不死化筋細胞を分離するための基盤は、ほぼ確立されたと言える。今後は、methods の簡便化を図り、初代培養筋細胞の不死化工程のルーティン・ワーク化とバンク事業担当機関への技術移転を実現することが必要である。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Suzuki, Y., Nakayama, K., **Hashimoto, N.** and Yazawa, I. (2010)

Proteolytic processing regulates pathological accumulation in dentatorubral-pallidoluysian atrophy

*FEBS J.* 27:4873-87.

2) Yanagisawa, M., Mukai, A., Shiomi, K., Song, Si-Y., and **Naohiro Hashimoto** (2011)

Community effect triggers terminal differentiation

of myogenic cells derived from muscle satellite cells by quenching Smad signaling  
*Exp.Cell Res.* 317: 221-233.

3) Shiomi, K., Kiyono, T., Okamura, K., Uezumi, M., Goto, Y., Yasumoto, S., Shimizu, S. and **Hashimoto, N** (2011)

Cdk4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential  
*Gene Therapy* (in press)

#### 2. 学会発表

1) 橋本有弘、柳澤美智子

第 43 回日本発生生物学会大会 2010 年 5 月  
京都

2) 橋本有弘、岡村菊夫、塩見浩介

泌尿器科再建再生研究会 2010 年 6 月 19 日  
札幌

3) 塩見浩介、橋本有弘

第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月  
神戸

他 3 題

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



「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」

-効率の良い初代ヒト培養細胞の不死化法の開発-

研究分担者 清野 透 国立がん研究センター研究所 ウイルス発がん研究分野

**研究要旨** 既に収集凍結保存されている先天性筋疾患筋生検由来の細胞から不死化ヒト筋芽細胞を樹立し細胞バンク化する方法論を確立するために、効率の良いヒト筋芽細胞不死化法ならびに細胞不死化における問題点の検討を進めた。変異CDK4、Cyclin D1とhTERTをレンチウイルスベクターにより初代培養細胞に導入した。高齢者由来の正常筋芽細胞でも若年者由来の筋芽細胞と同様遺伝子導入により倍加時間が短く容易に継代可能な延命（不死化）細胞が樹立できた。昨年度末に遺伝子導入した10症例の筋疾患患者の筋生検由来の初代培養細胞も遺伝子導入により容易に延命することができた。共同研究者らにより解析の進んでいる細胞では、延命（不死化）後の細胞集団中の筋芽細胞の含有率には検体間で大きな差があることが分かった。しかし、これは遺伝子導入前の細胞集団中の筋芽細胞の含有率を反映していると考えられた。筋芽細胞のバンク化には不死化細胞集団から筋芽細胞の濃縮あるいは純化が必要な検体もあることが示された。

A. 研究目的

ヒトの正常体細胞にはテロメア短縮による分裂寿命が存在するが、筋芽細胞を含むほとんどの細胞種ではそれ以前にもpRB経路の活性化による細胞老化（premature senescence）機構が存在する。そのためヒト正常体細胞を用いた研究において、十分量の細胞数を得、再現性あるデータを取るの是一般に困難である。特に稀少疾患である先天性筋疾患由来の生検試料は極めて貴重であり、本試料を出発点とした研究の進展のためには、筋芽細胞の不死化が極めて重要である。本研究では、筋芽細胞の簡便かつ安定した不死化法を確立することである。本研究

の成果は、筋疾患由来不死化筋芽細胞バンクに有効であり先天性筋疾患の発症機構、病態、治療法の開発などの研究促進が期待される。

B. 研究方法（倫理面の配慮含む）

正常筋芽細胞ならびに神経精神センサーで凍結保存されているDuchenne型筋ジストロフィーなど10症例の筋生検試料由来の初代培養細胞および高齢者と若年者の正常筋芽細胞を用いて遺伝子導入による延命（不死化）と延命細胞の研究における有用性を共同研究者に検討して貰った。初代培養細胞には筋芽細胞以外の細胞種や、分化能を失った細胞も混

在しているため、バンク化の前に筋芽細胞の濃縮あるいは純化のステップが必要である可能性が考えられる。今回は筋芽細胞を純化せず延命・不死化した細胞が研究材料として有用であるか、必要があれば不死化後に濃縮純化が可能かどうかを含め検討することとした。また、高齢者と若年者との間で分離できる筋芽細胞に質的な差があるか否かも検討するため不死化を試みた。不死化遺伝子として、p16INK4aに結合しない変異CDK4, Cyclin D1, hTERTを発現するレンチウイルスベクターを同時に初代培養細胞に感染導入した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞全般の不死化研究については、各施設の倫理委員会の承認ならびに国立がんセンター倫理審査委員会の承認(承認番号14-69)を得ている。

### C. 研究結果

高齢者と若年者の検体間で筋芽細胞の延命(不死化)効率に差は見られなかった。現在、延命(不死化)細胞の性質に差がないかを橋本らが検討中である。筋疾患患者の筋生検より得られた細胞のうちDuchenne型筋ジストロフィー3例、福山型筋ジストロフィー1例由来の筋芽細胞では延命(不死化)後の筋芽細胞の含有率が大きく異なることが橋本らにより示された。含有率の低い細胞でも細胞表面マーカーを指標に濃縮が可能であったとの報告を受けている。また、ミトコンドリア症由来の筋芽細胞では筋芽細胞は含まれているもののその含有率は極めて低く、延命細胞集団を使って解析できることは限られていることが示唆された。

### D. 考察

高齢者と若年者の検体間で筋芽細胞の延命(不死化)を試みる中でレンチウイルスベクターを同MOIで感染したにもかかわらず、一方で遺伝子導入効率が低く大部分の細胞は延命できなかった事例があった。遺伝子導入をやり直すことで延命(不死化)はできたが、現在のレンチウイルスベクターには薬剤耐性マーカーがないため、3つの遺伝子を低いMOIで確実に導入することは難しい。現時点ではMOI=3~5にすることで大部分の細胞に3つの遺伝子を導入させることができているが、GFPなど可視化できるレンチウイルスベクターを対照におくことが望ましい。昨年度までに、筋芽細胞では、変異CDK4+Cyclin D1+hTERTによる不死化が、優れており、Cyclin D1の恒常的発現も分化に悪影響を与えないことが示されている。これはCyclin D1が分化時に細胞内局在を変えるため核内でのCDK4活性が落ちるためと考えられる。これまでのところCyclin D1/CDK4の高発現により細胞周期回転は速く非常に扱いやすい細胞となる一方、pRB経路が不活化された結果、p53発現が増加してすることで正常2倍体の維持に貢献している可能性が示唆されている。しかし、解析法によっては変異CDK4+Cyclin D1の恒常的高発現が影響する可能性も考えられ導入遺伝子発現をtetON/OFFシステムなどにより調節できる系も必要かも知れない。

### E. 結論

正常筋芽細胞5例に加え、Duchenne型筋ジストロフィー、福山型筋ジストロフィー、ミトコンドリア症の他、超稀少

疾患3例の計10症例の筋生検試料由来の初代培養細胞に対して変異CDK4+Cyclin D1+hTERTによる延命(不死化)の有効性が示された。延命(不死化)された細胞の質については現在も共同研究者が解析中であるが、これまで解析が進んでいるものでは筋芽細胞の含有率が問題となる可能性が示唆された。これに関しては、橋本らが細胞表面マーカーによる筋芽細胞の濃縮法を見いだしており、手間はかかるものの細胞不死化後に筋芽細胞を濃縮(純化)するか、濃縮(純化)方を添付することで不死化細胞はバンク化するメリットが十分あることが示された。

本研究で開発された筋芽細胞不死化法は、筋疾患由来不死化筋芽細胞バンク設立において必須の技術であり、本研究によりその基盤が確立された。筋疾患由来不死化筋芽細胞バンクが設立されれば未知の先天性筋疾患の発症機構、病態、治療法の開発などの研究促進が期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究に用いる組換えレンチウイルスの使用にあたっては国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受け適切に取り扱っている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし(投稿準備中)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」 特願2010-184161 発明者：京哲、高倉正博、保野由紀子、井上正樹、清野透

2. 実用新案登録  
該当なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
後藤雄一	ミトコンドリア遺伝病		遺伝子診断学第2版	日本臨床社	東京	2010	27-32
後藤雄一	ミトコンドリア脳筋症	亀井正邦、高久史磨	今日の診断指針	医学書院	東京	2010	675-677
後藤雄一	ミトコンドリア病	勝沼俊雄ら	小児の治療指針	診断と治療社	東京	2010	776-778

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS	Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM).	PNAS	107	18410-18415	2010
Mimaki H, 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

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Hayashi YK</u> , Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, <u>Nishino I</u> , Tokuyama K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kawakami T	Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca <sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1	Nature	464	1313-1319	2010
<u>Tominaga K</u> , <u>Hayashi YK</u> , <u>Goto K</u> , <u>Minami N</u> , <u>Noguchi S</u> , <u>Nonaka I</u> , <u>Miki T</u> , <u>Nishino I</u>	Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology	Acta Neuropathol	119	481-486	2010
Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, <u>Minami N</u> , Smith DI, Lesage S, Aburatani H, <u>Nishino I</u> , 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	2010
<u>Mitsuhashi H</u> , <u>Hayashi YK</u> , <u>Matsuda C</u> , <u>Noguchi S</u> , <u>Nishino I</u>	Specific phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients	J Cell Sci	123	3893-3900	2010
<u>Liang WC</u> , <u>Nishino I</u>	State of the art in muscle lipid diseases	Acta Myol	29	351-356	2010
<u>Liang WC</u> , <u>Mitsuhashi H</u> , <u>Keduka E</u> , <u>Nonaka I</u> , <u>Noguchi S</u> , <u>Nishino I</u> , <u>Hayashi YK</u>	TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy	Ann Neurol		in press	

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T.Kawaoka, N.Hiraga, S.Takahashi, S.Takaki, F.Mitsui, M.Tsuge, Y.Nagaoki, Y.Kimura, Y.Hashimoto, Y.Katamura, A.Hiramatsu, K.Waki, M.Imamura, Y.Kawakami, H.Aikata, H.Tashiro, H.Ohdan, K.Chayama	Prolongation of Interferon therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: analysis of predictive factors of sustained virological response, including amino acid sequence of the core and NS5A regions of hepatitis C virus.	Scand J Gastroenterol	45(12)	1488-1496	2010
Y.Ushitora, H.Tashiro, S.Takahashi, H.Amano, A.Oshita, T.Kobayashi, K.Chayama, H.Ohdan	Splenectomy in Chronic Hepatic Disorders: Portal Vein Thrombosis and improvement of Liver Function.	Dig Surg	28(1)	9-14	2011
大段秀樹	ネオオーラル 10 年の歩み 解明されたシクロスポリンの新規作用 B-1 細胞への分化抑制作用(解説)	今日の移植 (0916-0094)	23巻6号	722-728	2010
大段秀樹	【肝胆臓薬物治療学の進歩この 30 年】 肝臓分野肝移植肝移植の免疫抑制療法におけるセルセプトの役割(解説/特集)	肝・胆・膵	61巻6号	1182-1187	2010
大段秀樹	【抗体関連型拒絶反応の病理と臨床】 B 細胞 lineage と抗体性拒絶反応の制御(解説/特集)	移植	45巻5号	434-440	2010
尾上隆司, 大段秀樹	T 細胞の経口トレランス誘導と肝臓洞内皮細胞(解説)	臨床免疫・アレルギー科	54巻5号	604-612	2010
大段秀樹	肝臓外科と肝内在免疫制御細胞(総説/抄録あり)	Minophagen Medical Review	55巻3号	193-205	2010
大段秀樹	肝臓移植の現況と展望	日本外科系	35巻1号	109-110	2010
大段秀樹	【Liver Transplant Frontier】 肝移植における免疫モニタリング	今日の移植	23巻3号	363-369	2010
大段秀樹, 尾上隆司, 番匠谷将孝	肝移植	消化器外科学レビュー 最新主要文献と解説		98-104	2010

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki, Y., Nakayama, K., Hashimoto, N. and Yazawa, I.	Proteolytic processing regulates pathological accumulation in dentatorubral-pallidoluysian atrophy	FEBS J	27	4873-87	2010
Yanagisawa, M., Mukai, A., Shiomi, K., Song, Si-Y., and Naohiro Hashimoto	Community effect triggers terminal differentiation of myogenic cells derived from muscle satellite cells by quenching Smad signaling	Exp. Cell Res.	317	221-233	2011

## 研究成果の刊行物・別刷（抜粋）



日本臨牀 68 卷 増刊号 8 (2010 年 8 月 20 日発行) 別刷

# 遺伝子診療学(第2版)

—遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望—

I. 遺伝子診断(Genetic Diagnosis) A. 総論  
遺伝子診療を理解するための遺伝医学の基礎

ミトコンドリア遺伝病

後藤雄一

## 遺伝子診療を理解するための遺伝医学の基礎

## ミトコンドリア遺伝病

Mitochondrial inherited diseases

後藤雄一

Key words : ミトコンドリア DNA, ヘテロプラスミー, ホモプラスミー

## はじめに

細胞内小器官であるミトコンドリアには核内に存在する核ゲノムと異なるゲノム(ミトコンドリアゲノム)が存在する。その核とは異なる特徴がミトコンドリアゲノムの変化で起きる病気の特徴の基盤になっている。ミトコンドリア病はミトコンドリア機能低下によって起きる病気の総称で、その原因は核ゲノムとミトコンドリアゲノムの両者の場合がある。ミトコンドリア病という用語が現在では一般的に使用されているのに対して、ミトコンドリア遺伝病はミトコンドリア病の中でも特にミトコンドリアDNA(mtDNA)の変化によって起きる病気を指す用語として使われることが多い。

したがって本稿では、ミトコンドリアDNAの特徴とその変化を中心に解説する。

## 1. ミトコンドリアDNAとは

## a. 構造と機能

ミトコンドリアDNAは、約16kbの環状二本鎖DNAであり、ミトコンドリア内でタンパクを合成するための2個のリボソームRNA(rRNA)、22個の転移RNAをコードしている(図1)。ミトコンドリアDNAの主要な働きは、電子伝達系酵素複合体群のサブユニットの一部を構成す

るタンパクを計13個コードしていることである(表1)。

ミトコンドリアDNAの転写はDループと呼ばれるところに幾つかの転写因子が結合して開始される。転写は両方向に進み、1つのRNA転写物にタンパクコード領域や転移RNAなどがつながって存在し(これをポリシストロニックな転写という)、次いで転移RNAのところではRNAが切断されて、メッセンジャーRNAと転移RNAが生成される仕組みになっている。

ミトコンドリアDNAの最大の特徴は、1つの細胞内に多数のコピーとして存在していることである(マルチコピー性)。1つの細胞に数十-数百個存在する個々のミトコンドリア内に、ミトコンドリアDNAは5-10個ずつ存在しているため、1細胞では数百-数千個も存在していることになる。

このマルチコピー性の性質は、ミトコンドリアDNAに変異がある場合に、すべてが変異型であるか、一部が変異型であるかの2つの異なった状態を引き起こす。すべてが変異型(もしくは野生型)である場合をホモプラスミー、一部が変異型の場合をヘテロプラスミーと呼び、病気の種類によってホモプラスミーのものとヘテロプラスミーのものがあり、それらが病気の特徴と密接にかかわることが明らかになってき

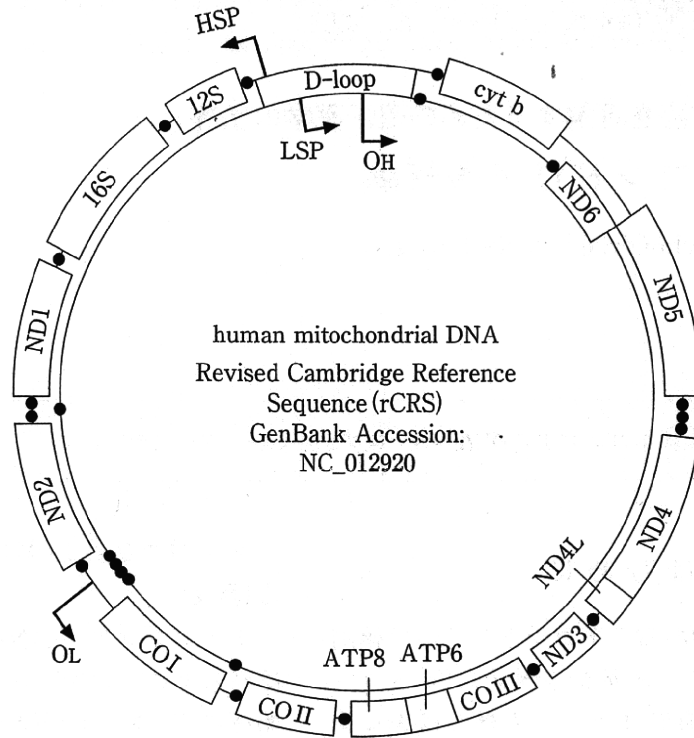


図1 ミトコンドリアDNAの構造

H鎖とL鎖の二本鎖環状構造をしており、13個のタンパク質、2個のリボソームRNA、22個の転移RNAをコードしている。OHとOLの2つの複製開始点が存在している。L鎖とH鎖の転写開始部位はDループと呼ばれるところにあり、それぞれの方向に転写が進む。

表1 電子伝達系酵素複合体の構成

複合体名	核DNA由来サブユニット	mtDNA由来サブユニット
複合体 I (NADH-CoQ oxidoreductase)	>36	7
複合体 II (succinate-CoQ oxidoreductase)	4	0
複合体 III (CoQ-cytochrome c oxidoreductase)	10	1
複合体 IV (cytochrome c oxidase)	10	3
複合体 V (ATP synthase)	13	2

ている。

**b. 母系遺伝様式**

細胞分裂の際に、細胞質にあるミトコンドリアは娘細胞に移行するが、どちらの娘細胞に移行するかはランダムである。1つのミトコンドリア内に野生型と変異型が混在している場合、娘細胞には親細胞に存在していたヘテロプラスミーの比率がそのまま伝わることにはならず、分裂を繰り返すたびに比率が異なってしまうことが予想される。このミトコンドリアDNAの

性質は、原則としてどの細胞も同じ変異をもっている核DNA変異の場合と大きく異なる点である。

また、未受精卵の細胞質には多数のミトコンドリア(とミトコンドリアDNA)が存在している。一方、精子由来のミトコンドリアは受精の際に卵に入っても排除される現象が知られている。したがって受精卵のミトコンドリアはすべて卵に由来することから、ミトコンドリアDNAも母からしか子に伝わらない。この性質

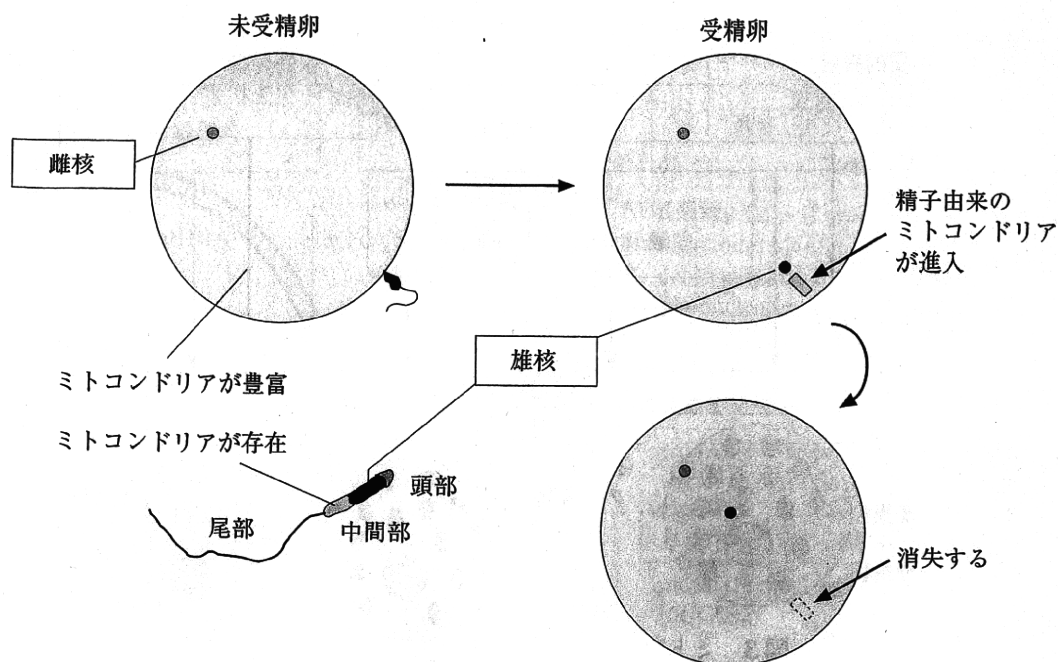


図2 母系遺伝の仕組み

(Kaneda H, et al: Proc Natl Acad Sci USA 92: 4542, 1995 より引用)

からミトコンドリアDNA変異で起きる病気は母から伝わる可能性があるが、父からは伝わらないことを意味する(図2)。

しかし実際の臨床においては、すべてのミトコンドリアDNA変異で起きる病気が母系遺伝ではなく、突然変異の場合や核DNA上の遺伝子変異、すなわちMendel遺伝の場合がある。

### c. 易変異性

核DNAに比べ、ミトコンドリアDNAは変異が起きやすく、核DNAに比較して5-10倍程度高いとされている。最近、がん細胞においてミトコンドリアDNA変異が多数報告されている。これらは母から受け継いだと考えられる血球細胞におけるミトコンドリアDNAとは異なる配列も有しているため後天的に起きたものと考えられる。しかし、これらの変異はホモプラスミーで認められることが多く、なぜ数百-数千コピーもあるミトコンドリアDNAがその細胞では一斉に変異型に変わるのかについては、その機序がよくわかっていない。

また、正常な働きをもつ細胞ではミトコンドリア同士が融合したり、分裂したりしていることが知られており、その融合、分裂にかかわる

因子の異常で起きる病気が明らかになってきた。すなわち、ミトコンドリアは互いに融合、分裂を行いながらミトコンドリアDNAの品質を保っている可能性が指摘されている。ミトコンドリア内に複数コピー存在するミトコンドリアDNA同士が組換えを起こすのか、他の別な機構で品質を保っているのかについて精力的な研究が行われている。

## 2. ミトコンドリアDNA異常の種類(図3)

### a. 量的変化による疾患

細胞に数千コピーも存在するミトコンドリアDNAの数が減少することが細胞機能に障害を与えていると考えられる病態が存在する。これをミトコンドリアDNA欠乏(枯渇)症候群(mitochondrial DNA depletion syndrome)という。病因としては、核DNA上に存在する主にミトコンドリアDNAの複製にかかわる因子の遺伝子変異が知られている(図4)。一方、後天的な原因として抗ウイルス剤(AIDSに対するAZTなど)によっても同様な病態が起きる。

臨床的には、新生児・乳児期に発症する全身性の症状の場合と筋、肝、腎などの臓器特異的