

201009012A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野村 大成

平成23（2011）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 -----	11
小原有弘	
3. 呼吸器疾患移植組織と免疫機能の解析 -----	15
立花 功	
4. 消化器等一般外科手術組織の移植系の確立 -----	17
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 -----	19
野々村祝夫	
6. 婦人科腫瘍、胎児組織の移植維持系の確立 -----	21
榎本隆之	
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 -----	33

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、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によるヒト臨床がん、疾患組織等の継代維持と再生可能な形での凍結保存基盤技術の確立を目的とし、（1）ヒト組織長期維持に最適のSCIDマウスを開発・使用、（2）20年間継代維持凍結保存してきたヒト腫瘍組織の再移植と再生可能な形での凍結保存を22年度までに完成、（3）未成功の前立腺がん、GIST等、新たなヒト臨床腫瘍組織の継代維持、再生可能な形での凍結保存、（4）ヒト培養がん細胞と臨床がん移植組織の創薬に向けた優位性、（5）ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持と褐色脂肪組織など新たなヒト資源の開発とその特性の究明を計り、ヒトがんと正常組織の総括的ヒト組織維持システムの基盤技術を23年度までに完成させる。20年以上にわたり世界をリードしてきた基盤研究の将来でのデータベース化等への発展を期するものであり、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性の研究、環境有害物質の人体影響評価に用いられ、国民の健康と医療・福祉に大きく貢献する。

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・
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な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, 1990, 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）。500回以上にわたり、ヒト脳組織を除く正常組織、前がん組織、がん組織の維持を行った。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、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によるヒト臨床がん、疾患組織等の継代維持と再生可能な形での凍結保存基盤技術の確立を目的とし、

(1) ヒト組織長期維持に最適の SCID マウスを開発・使用、

(2) 20 年間継代維持凍結保存してきたヒト腫瘍組織の再移植と再生可能な形での凍結保存を 22 年度までに完成、

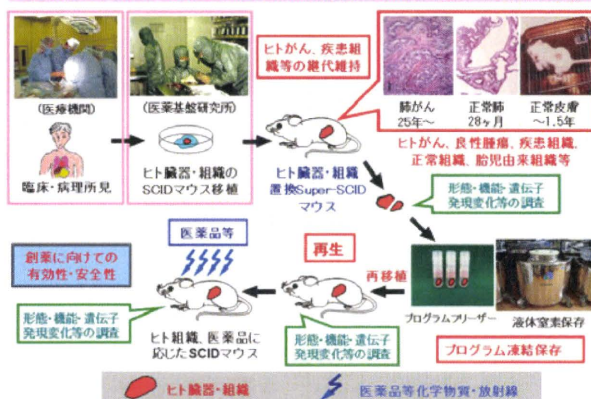
(3) 未成功の前立腺がん、GIST 等、新たなヒト臨床腫瘍組織の継代維持、再生可能な形での凍結保存、

(4) ヒト培養がん細胞と臨床がん移植組織の創薬に向けた優位性、

(5) ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持と褐色脂肪組織など新たなヒト資源の開発とその特性の究明を計り、

ヒトがんと正常組織の総括的ヒト組織維持システムの基盤技術を 23 年度までに完成させる。20 年以上にわたり世界をリードしてきた基盤研究の将来でのデータベース化等への発展を期するものであり、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性の研究、環境有害物質の人体影響評価に用いられ、国民の健康と医療・福祉に大きく貢献する (図 1)。

図 1
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
ヒト臨床がん、疾患組織等の継代維持・凍結保存・再生技術の確立とデータベースの構築



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^l*, *W* 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。がんの進展をフォローするため、SCID マウス血中 PSA の微量測定法を完成させるとともに (野村、野々村)、自然遠隔転移を確認するため、マイクロサテライト解析法を開発する (梁、野村)。

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ルシフェラーゼ標識培養細胞 (腫瘍、骨髄細胞等) 株の確立 (小原) を行うと共に、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)、肺組織、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、医薬基盤研究所および医療機関の倫理委員会の承認をえている。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。

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；

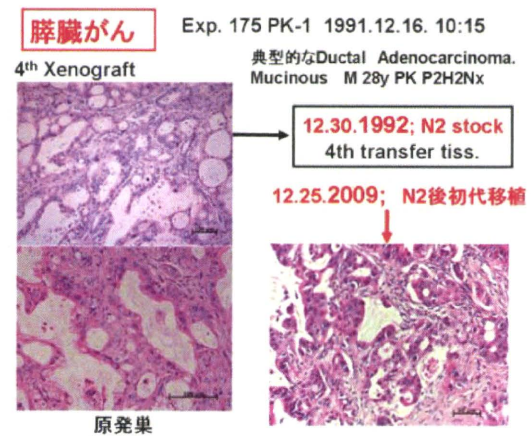
C.B17-*scid* [原種]、C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備し、*bg^l*, *W* 導入を行った(野村)。GFP を導入し、近交化を行った(野村)。

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、頭頸部腫瘍等に加え、膵臓がん等について実施成功し、当所計画通りにほぼ終了した(野村)。ヒト膵臓がんも21年度報告書に示した他のがん組織と同様に、移植後および凍結保存再生後もその組織形

態は移植前、凍結保存前の組織形態と比べて変化はない(図2)。

図2



3. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；

平成22年度に新規ヒト腫瘍150症例をSCIDマウスに移植した(野村、研究協力者;吉留、鳥、坂巻)。すでに20症例は継代維持に出来る。今まで移植が極めて困難であったヒト前立腺癌(睾丸転移巣)を適切なSCIDマウスに移植することによりSCIDマウス皮下で増殖するようになり、継代維持に成功している(野村、野々村)(図3)。また、胃がん(スキルス)、膵臓がん等にSCIDマウスに移植することにより、遠隔転移するものも見つかった(図4)。従って、前立腺がん、前立腺肥大組織の進展をフォローするために、SCIDマウス血中PSAの微量測定法の開発が必要となった。また、SCIDマウスでの遠隔転移を客観的に迅速に検出することが必要である。

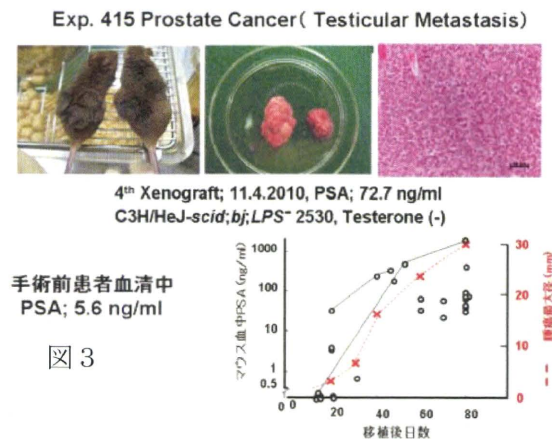
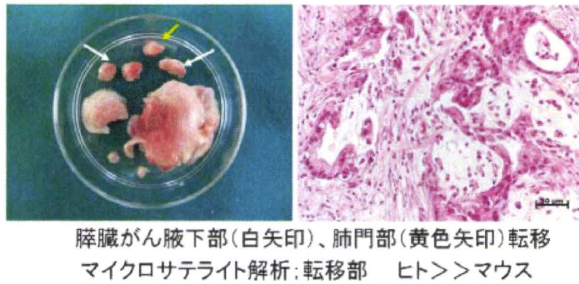


図3

図 4



1) P S A微量測定 (基礎編);

KAIWOOD CHR-110R Chromogenic Reader、PSA Test Cassette を用いヒトおよびマウス血清 100 μ l 中のヒト PSA 測定を行った。

(1) 試料

- ・イノテック PSA 標準液 (0、4、10、22.5、45、95ng/ml)
- ・PBS
- ・阪大病院患者既知 PSA 血清 25 検体
- ・ヒト O 血清 (女性血清)
- ・マウス O 血清 (SCID マウス血清)

(2) 測定時間の設定

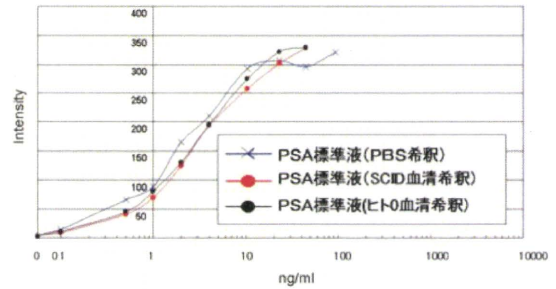
サンプル 100 μ l チャージより測定までの時間 (1、2、3、4、5、6、7、10) を変え、各資料で Intensity を測定したところ、標準液、PBS を用いた場合、サンプル液が C ラインまで到達まで 5 分弱を要するため、それまでの測定値は無意味。5 分以降も経時的に Intensity は増加するし、時間を決めて測定してもデータは不安定であった。粘張なヒト血清では、5 分では C ラインまで到達しない。従って、ヒト O 血清 (女性) でも 5、6 分まで、高値を示す。10 分で確実に O を示す。標準 PSA 液をヒト血清で希釈した場合でも、10 分で安定した結果が得られた。

(3) 検量曲線

PSA 標準液を PBS 希釈した場合、ヒト O 血清で希釈した場合、マウス血清で希釈した場合の量効果曲線を作成した。図 5 に示したとおり、PSA 量に比例して、Intensity は上昇し、きれいな検量曲線が得られた。PBS 希釈と粘張な血清とは少しずれがある。マウス血清、ヒト血清中の PSA 値は同一曲線を描いた。信頼性のある測定結果を示した。患者高 PSA 血清 2 検体のヒト O 血清希釈による検量曲線を作成し、その結果を図 5 に示した。PSA 量に比例して、Intensity は上昇し、き

れいな検量曲線が得られた。

図 5



以上の結果から、本装置を用いることにより、ヒト血中 PSA 値を正確に測定できることが判明した (0.1~100ng/ml)。0.5~20ng/ml の間は、ほぼ直線である。高値 PSA 血清に関しては、希釈法により測定が可能である。

2) P S A微量測定 (応用編);

(1) 試料

- ・病院臨床検査部測定患者血清
- ・病院臨床検査部測定装置、BECKMAN COULER, Inc. UniCel DxI 800 immunoassay system 測定試薬が同じく BECKMAN COULER, Inc. Hybritech[®]; PSA Test。
- ・P S A 標準液 (イノテック) ヒト O 血清希釈液

(2) 測定; KAIWOOD PSA Test Cassette を用い、P S A 標準液で確認したところ、同一値が得られたので、病院大型機器により測定済みの患者血清を本装置と本カセットにて測定した。分担研究者・野々村の報告書に示すように、P S A 標準血清を用い描いた検量曲線では 100ng/ml 以下ではよく一致しているが、高値では検量曲線から大きく外れるものがあり、大型機器による測定の精度を疑わざるを得ない結果となった (分担研究報告書・野々村、参照)。

3) 前立腺がん移植 SCID マウス血中 P S A 値の変動と腫瘍増殖

図 3 に示した如く、移植後 3-4 ヶ月で巨大な腫瘍を形成するようになった。血中 P S A 値も腫瘍の大きさに比例して高値を示した。手術前の患者血中 P S A 値は 5.6ng/ml であったが、数ヶ月で 1000 近い P S A 値を示すものもあった。

4) ヒト移植がんの遠隔転移

ヒト組織を移植した際に、マウス腫瘍が誘

発されることが稀にある。特にマウス白血病が誘発される。ヒトがん、マウスがんの識別には、免疫学的手法を用いてきた（野村）。最近、マイクロサテライト解析法により迅速、客観的に識別できるように設定した。この方法は、移植腫瘍の遠隔転移を確認する有効な手段でもある（梁、野村）。マイクロサテライト解析法詳細は、分担研究者・梁が本報告書に記載している。図4にも示したように、膵臓がんの一つに、腋下部、肺門部に転移しやすいものがある。マイクロサテライト解析により、ヒトDNA由来であることが分かった（詳細は、分担研究報告書・梁の表参照）。

4. 培養細胞移植

資源部細胞バンクにおいて、ルシフェラーゼ標識したヒト培養細胞の維持と遺伝子、微生物汚染のないヒトがん培養細胞（腫瘍、骨髄細胞等）を選別保存した（詳細は、分担研究報告書・小原に記載）。

5. ヒト正常組織・細胞の長期維持

ヒト正常組織（甲状腺、肺、皮、膚等）、胎児由来組織（皮膚、肺、脂肪等）の継代移植と常備に継続して努めている（野村、本行、立花、榎本）。

がんの化学療法、放射線療法の最も深刻な副作用は周辺正常組織への損傷である。特に、肺繊維症は致死的副作用であり、未だ、その発症メカニズムは不明で治療手段は防護以外にはない。肺がんの手術治療の際、治療上やむを得ず切除される周辺組織を倫理委員会の承認を得て SCID マウスに皮下移植し、確実に肺繊維症を誘発することが分かっているX線を移植肺組織に照射（がん患者治療に用いるのと同じスケジュール；2 Gy 週 2 回）した。この肺繊維症研究・治療モデルの詳細は、本行の分担報告書に記載した（野村、本行、立花）。

また、ヒト脂肪組織（成人皮下脂肪、腹腔内脂肪、胎児由来脂肪）の長期継代維持を継続して行っている（野村、榎本、研究協力者；堀家-吉田）。22年度新規移植症例のうち、継代維持が可能になった胃がん、膵臓がん、大腸がん、甲状腺がん等についても永久保存を図っている（野村、研究協力者；時田）。

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、移植による形態変化はみられず、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の変化についても、継代移植、N₂保存→再移植による遺伝子発現の変化がほとんどみられず、ヒトがんを生きたまま永久保存することに成功している（野村、梁、研究協力者；足立、時田）。22年度新規移植症例のうち、継代維持が可能になった胃がん、膵臓がん、大腸がん、甲状腺がん等についても形態および遺伝子発現解析を図っている。

以上の如く、当初予定通りの成果が得られた。

D. 考察

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、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であることを22年度新規継代維持したヒトがんにおいても確立したといえる。

E. 結論

本研究では、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によるヒト臨床がん、疾患組織等の継代維持と再生可能な形での凍結保存基盤技術の確立を目的とし、（1）ヒト組織長期維持に最適のSCIDマウスの開発・使用、（2）20年間継代維持凍結保存してきたヒト腫瘍組織の再移植と再生可能な形での凍結保存を22年度までに完成、（3）未成功の前立腺がん、GIST等、新たなヒト臨床腫瘍組織の継代維持、再生可能な形での凍結保存、（4）ヒト培養がん細胞と臨床がん移植組織の創薬に向けた優位性、（5）ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持

と褐色脂肪組織など新たなヒト資源の開発を行い、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性の研究、環境有害物質の人体影響評価システムの構築を当初計画どおりに実施し、成果を得た。

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

- 1) Taisei Nomura. Biological Consequence and Health Concern from Low Dose and Low Dose Rate Radiations in Mice and Humans. Health Physics., 100: 266-268, 2011.
- 2) Iwamori M, Iwamori Y, Adachi S, Nomura T. Excretion into feces of asialo GM1 in the murine digestive tract and Lactobacillus johnsonii exhibiting binding ability toward asialo GM1. A possible role of epithelial glycolipids in the discharge of intestinal bacteria. Glycoconj. J. 28: 21-30, 2011.
- 3) A. Yogo, T. Maeda, T. Hori, H. Sakaki, K. Ogura, M. Nishiuchi, A. Sagisaka, H. Kiriya, H. Okada, S. Kanazawa, T. Shimomura, Y. Nakai, M. Tanoue, F. Sasao, P. R. Bolton, M. Murakami, T. Nomura, S. Kawanishi, and K. Kondo. Measurement of relative biological effectiveness of protons in human cancer cells using a laser-driven quasimonoeenergetic proton beamline. Applied Physics Letters, 98 53701, 2011.
- 4) Nomura T. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. Astana: Eurasian National University Press. In: Bersimbay RI, Au W, eds. Genome-environment interactions and genetic toxicology. 15th Alexander Hollaender Course; 2010; 19-23.
- 5) 野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、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、若命浩二 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究、Space Util. Res., 27: 107-110, 2011.

2. 学会発表

- 1) Nomura T. Carcinogenicity of Urethane (Ethyl Carbamate) in Mice And Humans. 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Dec.15-18, 2010. Pattaya, Thailand.
- 2) Nomura T. Biological Consequences and Health Risk from Low and Low Dose Rate Radiation Exposures in Mice and Humans. LOWRAD 2010, Dec. 13-15, 2010, Barcelona, Spain.
- 3) Nomura T. The use of Active Hexose Co-related Compound in the Treatment of Head & Neck Cancer Patients. The 18th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine. July 24-25, 2010. Sapporo, Japan.
- 4) Nomura T. Biological Consequences and Health Concern from Low Dose and Low Dose Rate Radiations in Mice and Human Tissues. International workshop "Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation" May 3-5, 2010. Richland, USA.

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

研究分担者 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：ヒト正常組織およびがん組織は Super-SCID マウスへの移植によっても形態・機能に加え遺伝子発現がよく維持されていることを、マイクロアレイを用い証明してきた。本年度は、マイクロサテライト解析法を用いることにより、ヒトがんの SCID マウスでの増殖と遠隔転移を迅速、かつ容易に証明する手法を開発した。

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 ELISA 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（Cancer Lett., 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形態、機能の変化に加え、マイクロアレイを用い遺伝子発現の面からも感度よく、より詳細な変化を検出できることを証明した（Mutat. Res., 2010）。

癌の致死要因の最も多くを占めるのは転移である。Super SCID マウスのもう一つの特徴は、ヒト悪性腫瘍が自然遠隔転移することである。ヒトがんの SCID マウス体内での遠隔転移を迅速、客観的に証明するためのマイクロサテライト解析法を完成させ、創薬のための前臨床試験、経過観察の資する。

B. 研究方法

材料：ヒト胃がん（スキルス）およびすい臓がん、SCID マウスに移植後、遠隔転移をおこすものを用いた。

方法：

1. マイクロサテライト解析法

ヒトマイクロサテライト遺伝子座は、D21S11 と ACTBP2 を、マウスマイクロサテライト遺伝子座に D12Mit136 と pul 67 を用いた。蛍光ラベルされたプライマーを用意し（Applied Biosystems）、SCID マウス移植がんの移植腫瘍そのものおよび転移組織 DNA を template として、

4 種遺伝子座を PCR 法で、増殖する。得られた PCR 産物を、キャピラリー電気泳動にかけ（Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystems）Fragment analysis ソフト（GeneMapper, Applied Biosystems）で、それぞれの遺伝子座の長さや産物量を、PCR 産物を解析することで行う。これらマイクロサテライト座のプライマー配列は、D21S11 は、GTGAGTCAATCCCCAAG と GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC、ACTBP2 は、ACATCTCCCCTACCGCTATA と AATCTGGGCGACAAGAGTGA である。D12Mit136 は、TTTAATTTGAGTGGGTTTGGC と TTGCTACATGTACACTGATCTCCA（tailed-Applied Biosystems）、pul67 については、未発表のため記述を避ける。PCR 反応は、マウス、ヒトそれぞれについて 2 種のプライマーを混ぜて同時に行った（duplex PCR）。Annealing 温度に関しては、マウスは 50°C、ヒトは 62°C に設定した。

2. ヒトがん移植 SCID マウスでの遠隔転移巣におけるマウス由来細胞の量的解析（簡易 Quantitative PCR 法）

ヒトがんの SCID マウスでの遠隔転移巣では、マウス組織中でヒトがん細胞が増殖維持されるため、マウス組織中にヒトがん組織が混雑する状態になる。マウス細胞の混合比を調べるために、ヒトとマウスのマイクロサテライトをそれぞれ、ACTBP2 と pul67 の 1 種類にし、後者の Annealing 温度を 58°C にした。ヒト、マウスの正常組織から DNA（標準 DNA）を抽出し、PCR 反応のサイクル数を一定にし、template DNA（標準）の量を変えて PCR 反応を行う。それぞれの template DNA 量に対して、得られる PCR 産物量の蛍光の強さが、解析（GeneMapper）により得られる。従って、それぞれの template DNA 量と

対する PCR 産物量とで、標準曲線を得ることができる。転移巢 DNA の template を 10ng に、サイクル数も上記と同じに設定し、得られた PCR 産物量と標準曲線から、template DNA 量中のヒトとマウスの DNA 量のおよその比を得る。

(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。手術時等で採取されるヒトがん組織の譲渡に関しては、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。

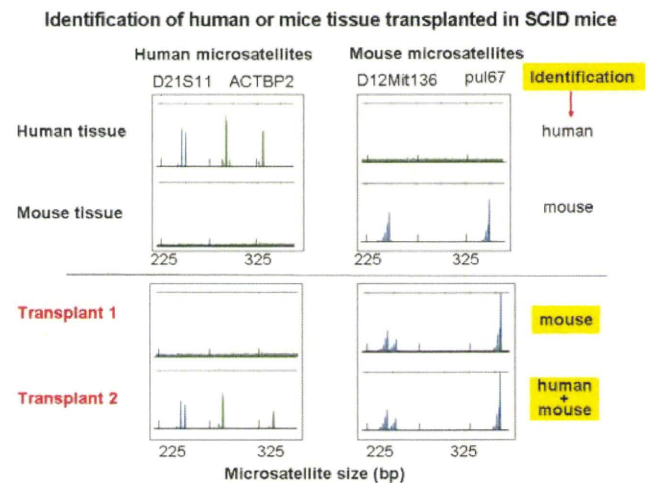
動物実験に関しは、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、研究をおこなっている。梁(分担者)は、これらの申請課題(代表:野村)での研究従事者に含まれている。

C. 研究結果

1、ヒトがん移植マウスで増殖した組織の由来の判別

ヒトがん移植マウスでは、移植したがん組織は、ほぼ増殖する。増殖組織がヒト由来であることを迅速に調べるために、マイクロサテライト解析法で調べた。マイクロサテライトはヒトゲノム上の 10,000 箇所に位置しており、2~6 塩基対が約 100 コピーからなる短い配列である。短い遺伝子座であるため、PCR 法で増幅可能である。マイクロサテライトは、普通はヒト、マウスに特異的である。用いたマイクロサテライト D21S11 と ACTBP2 は、ヒト組織に、D12Mit136 と pul67 は、マウス組織に特異性を示した。従って、移植がん組織について、移植 1 は、マウス組織であり、移植 2 は、ヒトとマウスの組織が混在していることを判別した(図 1)。

図 1



2、ヒト胃がん(スキルス)、すい臓がん移植 SCID マウスでの自然遠隔転移。

SCID マウスでは、移植ヒトがんはよく自然遠隔転移をおこす。SCID マウス中で増殖した組織が、ヒト由来の転移がん組織なのか、単なるマウス腫瘍であるか形態学的には判別しにくい場合がある。この場合、迅速に検定する必要がある。また、ヒト組織とマウス組織の混合型の場合、それらのおよその比を得ることが望ましい。そこで、マイクロサテライトの PCR 産物の量と、PCR 反応で用いる template DNA 量との相関関係から目的とする組織中のおよそのヒト、マウス組織の「比」を求める方法を開発した。方法で記した如く、ヒトおよびマウスの組織(標準組織)からの DNA(標準組織 DNA)による PCR 産物の解析から、template DNA 量と、PCR 産物の量に直線的相関関係が得られた(図 2)。PCR 産物の量は、PCR 産物の蛍光の強度、つまり、図 1 の例では、最も高いピークの高さ(GeneMapper による解析で数値化される)で表すことができる。この曲線を標準曲線とし、遠隔転移がん組織 DNA の一定量を template としたとき、得られた PCR 産物の量を標準曲線にあてはめ、混合型組織中の、ヒト由来、マウス由来の template 量を求めた。それぞれ求めた template 量により、およその「比」を決めた。ヒト胃がん(スキルス)、すい臓がん移植 SCID マウスでの自然遠隔転移組織でのヒト由来およびマウス由来組織を、同割合(=)、ヒトがマウスより多い(>)、ほとんどヒト(>>)、で表した(表 1、2)。遠隔転移がんは、いずれも、マウス由来でなく、ヒト胃がん(スキルス)、すい臓がんの転移であったことが判明した。マウス組織へのヒトがん組織の侵入、転移であることから、当然のことながらマウス DNA の混入がいずれの

例でも認められた。混入量は、胃がんスキルスについては、ヒト組織と同程度がほとんどであり、膵臓がんの場合は、混入量は少なかった。それぞれのがんの性質を反映していると思われる。

図2 Standard curves for the amounts of PCR products vs. amounts of template in human (ACTBP2) and mouse (pul67) microsatellites.

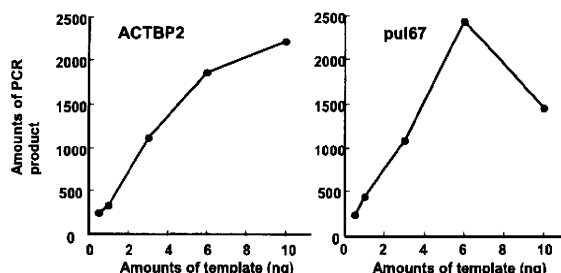


表1 ヒト胃がん（スキルス）移植マウス中の腫瘍部および転移部での由来組織の割合

移植代数	腫瘍・転移部位	組織量割合*
2代目1	腫瘍部 2228	H+, M+
2代目2	腫瘍部 2231	H+, M+
2代目3	腫瘍部 2243	H > M
2代目4	転移部腫瘍の移植 2239	H = M
2代目4	肺転移部腫瘍の移植 2245	H = M
2代目5	肺転移部腫瘍の移植 2240	H = M
4代目1	腫瘍部 2238	H = M
4代目2	腫瘍部 2241	H > M
4代目2	右腋下部転移 2246	H = M
4代目3	腫瘍部 2242	H = M
4代目3	肺門部転移 2244	H = M
5代目1	腫瘍部 2265	H = M

*H; Human, M; , Mouse. H+, M+は量的割合を調べていない、+; 有。

表2 ヒト膵臓がん移植マウス中の腫瘍部および転移部での由来組織の割合

移植代数	腫瘍・転移部位	組織量割合*
初代1	腫瘍部-1 2235	H > M
初代1	腫瘍部-2 2236	H > M
初代1	肺門部転移 2234	H = M
初代1	腸間膜転移 2237	H > M
2代目1	腸間膜転移 2272	H >> M
2代目1	右腋下部転移2273	H > M

*H; Human, M; , Mouse. H+, M+は量的割合を調べていない、+; 有。

D. 考察

Super SCID マウスでは、ヒト悪性腫瘍が自然遠

隔転移する。ヒト胃がん（スキルス）、すい臓がん移植 SCID マウスについても自然遠隔転移と思われる組織がみとめられた。ヒトがん組織が転移したものをしらべるには、これまで組織標本による病理学的判別で行ってきたが、労力と時間がかかる上に微量ながん組織は見逃されやすい。迅速、かつ正確、客観的な方法の確立が必要となった。マイクロサテライト座は種特異的であるため、この性質を応用し、由来組織の判別に用いた。ヒトおよびマウスのマイクロサテライト座をPCR法により増幅し解析することで、転移とされる組織の由来が質的に判別可能となり、さらに、組織のおよその量比も、2,3日の短時間で判定できる方法が確立された。この方法は、DNA量を判定の基準としているが、がん組織はしばしば染色体数の増減、LOH等がみられるので、DNA量と細胞数は正確には一致しない可能性がある。また、量的PCR法ではないので、組織比の正確性には欠けるが、迅速に行うことが利点である。

E. 結論

ヒトがん移植 Super-SCID マウスでの自然遠隔転移組織が、ヒト由来組織であることを証明する迅速、かつ容易な方法を確立した。ヒトおよびマウス特異的のマイクロサテライト座を、PCR法で増幅し、PCR産物を質、量的に解析することで、転移組織中のマウス組織のおよその割合を判定する方法である。全工程は、2,3日程度のため、迅速に、組織の由来判別が可能である。

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

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、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、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究。Space Utiliz Res. 27: 107-110, 2011.

2. 学会発表

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、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、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究（2010年度ワーキンググループ

活動報告)。相模原、2011.1.26。

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：ヒト腫瘍細胞は in vitro において抗がん剤などの初期薬剤開発に欠かせない研究ツールとなっているが、in vivo で検証試験をするためのツールが最適化されていないのが現状である。本研究では、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行った。また、ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株についても同様に、担がんマウス作成の準備を行った。今後これらの資源を創薬モデルマウス作成ツールとして研究者に供給することを目指す。

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検討した。また、ルシフェラーゼを安定発現させたヒト由来腫瘍細胞を細胞バンクとしてコレクションし、これらを用いた SCID マウスでの担がんモデルマウス作成を開始し、これらの評価試験系開発を行う。

B. 研究方法

1. 細胞培養

JCRB1379:MKN45-Luc は RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum、JCRB1375:Hs578T-Luc は Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 0.01 mg/ml bovine insulin and 10% fetal bovine serum、JCRB1373:BT-549-Luc は RPMI 1640 medium with 0.023 IU/ml insulin and 10% fetal bovine serum、JCRB1372:MCF-7-Luc は Eagle's minimal essential medium with 10% fetal bovine serum, non-essential amino acids, 1.5g/L NaHCO₃, 1 mM Na-pyruvate and 10 ug/ml insulin にて培養を行った。このうち担がんマウス作成のため

増殖させた MKN45-Luc 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、培養条件の検討ならびに細胞資源化（研究者へ分譲できる細胞の準備）を行った。

C. 研究結果

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。

JCRB1379:MKN45-Luc

62 歳女性より樹立された低分化型充実型腺癌由来、CEA 高産生株であり、胃がん細胞株として、がん転移、抗がん剤スクリーニングなど in vitro 研究ツールとして汎用されている。今回寄託された本細胞は品質管理の過程においてマイコプラズマ汚染が検出され、マイコプラズマ除去を行った。

JCRB1375:Hs578T-Luc

74 歳女性より樹立された乳がん細胞株であり、がん転移、抗がん剤スクリーニングなど in vitro 研究ツールとして汎用されている。今回寄託された本細胞は品質管理の過程においてマイコプラズマ汚染が検出され、マイコプラズマ除去を行った。

JCRB1373:BT-549-Luc

72歳女性より樹立された乳がん細胞株であり、抗がん剤スクリーニングなど *in vitro* 研究ツールとして汎用されている。

JCRB1372:MCF-7-Luc

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。

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、胃がん、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。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。また、本研究において見られたマイコプラズマ汚染に関しても研究の再現性・信頼性にとって非常に重要なものであり、これらを除去した細胞を研究者普及させることが非常に重要であると考えられる。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. 健康危険情報

適用なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. Dirks WG, Macleod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H. *Int J Cancer*. 126:303-4, 2010
- (2) Cell line misidentification: the beginning of the end. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. *Nat Rev Cancer*. 10(6):441-8, 2010.
- (3) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. *Int J Cancer*. 127(1): 1-8, 2010.
- (4) Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, Macleod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 46(9):727-32(2010).
- (5) Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. *Int J Dev Biol*. (2011, Feb. E-published).

2. 学会発表

マイコプラズマ汚染の現状と論文投稿における国際動向、小原有弘、古江楠田美保、第83回日本組織培養学会5月(岡山)

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

Table 1 ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株一覧

	Cell lines	Cell No.	Cell Name		Cell lines	Cell No.	Cell Name
Human	Gastric cancer				Renal cancer		
1	MKN-45	NIHS0634	MKN-45-Luc	37	786-0	NIHS0651	786-0-Luc
2	IM95	NIHS0712	IM95/CMV-Luc	38	A498	NIHS0652	A498-Luc
3	KATO III	NIHS0713	KATO III/CMV-Luc	39	CAKI-1	NIHS0653	CAki-1-Luc
4	MKN-1	NIHS0720	MKN-1/CMV-Luc	40	G401	NIHS0654	G-401-Luc
5	MKN-7	NIHS0721	MKN-7/CMV-Luc		Prostate cancer		
6	MKN-74	NIHS0722	MKN-74/CMV-Luc	41	DU-145	NIHS0655	DU-145-Luc
7	NUGC-3	NIHS0731	NUGC-3-Luc	42	PC-3	NIHS0656	PC-3-Luc
	Breast cancer				Leukemia		
8	MDA-MB-231	NIHS0635	MDA-MB-231-Luc	43	K-562	NIHS0657	K562-Luc
9	HS578T	NIHS0636	HS578T-Luc		Lung cancer		
10	BT-549	NIHS0637	BT-549-Luc	44	NCI-H460	NIHS0658	NCI-H460-Luc
11	MCF7	NIHS0638	MCF-7-Luc	45	A549	NIHS0659	A549-Luc
12	T-47D	NIHS0639	T-47D-Luc	46	HCC-827	NIHS0709	HCC-827-Luc
13	BT-20	NIHS0700	BT-20/CMV-Luc	47	HLC-1	NIHS0711	HLC-1-Luc
14	BT-474	NIHS0701	BT-474/CMV-Luc	48	NCI-H1650	NIHS0723	NCI-H1650-Luc
15	HCC-1419	NIHS0706	HCC-1419-Luc	49	NCI-H1975	NIHS0724	NCI-H1975-Luc
16	HCC-1937	NIHS0707	HCC-1937/CMV-Luc	50	NCI-H2009	NIHS0725	NCI-H2009-Luc
17	HCC-1954	NIHS0708	HCC-1954-Luc	51	NCI-H2228	NIHS0726	NCI-H2228-Luc
18	MDA-MB-361	NIHS0718	MDA-MB-361-Luc#1	52	NCI-H23	NIHS0727	NCI-H23-Luc
19	MDA-MB-435	NIHS0719	MDA-MB-435-Luc#1	53	NCI-H441	NIHS0728	NCI-H441/CMV-Luc
20	SK-BR-3	NIHS0735	SK-BR-3-Luc	54	NCI-H650	NIHS0729	NCI-H650-Luc
	Melanoma			55	RERF-LC-KJ	NIHS0733	RERF-LC-KJ/CMV-Luc
21	SK-MEL-2	NIHS0640	SK-MEL-2-Luc		Ovarian cancer		
22	SK-MEL-28	NIHS0641	SK-MEL-28-Luc	56	OVCAR-3	NIHS0732	OVCAR-3/CMV-Luc
23	COLO 679	NIHS0642	COLO679-Luc	57	SK-OV-3	NIHS0736	SK-OV-3/CMV-Luc
24	Mewo	NIHS0643	Mewo-Luc	58	SK-OV-3	NIHS0737	SK-OV-3-Luc
25	MM-RU	NIHS0644	MM-RU-Luc		Pancreas Cancer		
26	G361	NIHS0705	G361/CMV-Luc	59	AsPC-1	NIHS0697	AsPC-1/CMV-Luc
	CNS cancer			60	BxPC-3	NIHS0702	BxPC-3-Luc#2
27	U251MG	NIHS0645	U-251 MG-Luc	61	KP1-NL	NIHS0714	KP1-NL-Luc#2
	Colon cancer			62	KP-2	NIHS0715	KP-2/CMV-Luc
28	HT-29	NIHS0646	HT-29-Luc	63	KP-3L	NIHS0716	KP-3L-Luc#5
29	KM12	NIHS0647	KM12-Luc		Breast Cancer		
30	SW620	NIHS0648	SW620-Luc		4T1-Luc	NIHS0696	4T1-Luc
31	HCT-116 clone #2	NIHS0649	HCT-116 clone#2-Luc	Mouse			
32	DLD-1 clone #1	NIHS0650	DLD-1 clone#1-Luc		Melanoma		
33	COLO 205	NIHS0703	COLO 205/CMV-Luc	65	B16-F0	NIHS0698	B16-F0-Luc
34	HCT-15	NIHS0710	HCT-15-Luc#1	66	B16F10	NIHS0699	B16F10-Luc 1#3
35	LoVo	NIHS0717	LoVo-Luc#2		Colon Cancer		
36	SW-480	NIHS0738	SW-480/CMV-Luc	67	Colon26	NIHS0704	Colon26-Luc
				68	Fetus fibroblast		
					NIH3T3/ATCC	NIHS0730	NIH3T3/ATCC/CMV-Luc

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：昨年度は、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の炎症予防的に働くことを見出した。今回、CD9 が抗癌剤治療後の小細胞肺癌に強く発現し、細胞を強く基質に接着させることを見出した。CD9 の機能を抑制すると癌細胞はアポトーシスを起こし、CD9 は小細胞肺癌の抗癌剤耐性に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

肺癌の 15 % をしめる小細胞肺癌は、悪性度が強く予後が悪い。抗癌剤によく反応するが高率に再発し、早期に所属リンパ節や遠隔臓器に転移を起こす。本研究では、そのメカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

抗癌剤治療前後の小細胞肺癌患者の原発巣および転移巣から標本を作成し、CD9 で染色した。また小細胞肺癌培養株を抗癌剤で処理し、CD9 の発現と細胞接着を観察した。さらに CD9 の抗体および siRNA で処理し、癌細胞のアポトーシスを評価した。

C. 研究結果

CD9 は再発小細胞肺癌に強く発現しており、抗癌剤治療前の小細胞肺癌にはほとんど発現していなかった。培養株をシスプラチンとエトポシドで処理すると CD9 の発現が増強し、細胞はフィブロネクチンに強く接着し運動が低下した。抗癌剤に耐性化した培養株を CD9 の抗体および siRNA で処理すると、アポトーシスが誘導された。

D. 考察

小細胞肺癌は抗癌剤に一旦は強く反応して縮小するが、高率に再発し予後が悪い。そのメカニズムは不明であったが、われわれの研究結果は、テトラスパニン CD9 の発現が抗癌剤耐性を誘導することを示唆し、CD9 が新たな治療標的となる可能性が出てきた。今後は 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 は小細胞肺癌の抗癌剤耐

性に寄与する。

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

Kohmo S, Kijima T, Otani Y, Mori M, Minami T, Takahashi R, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Goya S, Yoshida M, Kumagai T, Tachibana I, Yokota S, Kawase I. Cell surface tetraspanin CD9 mediates chemoresistance in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 70:8025-8035, 2010.

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

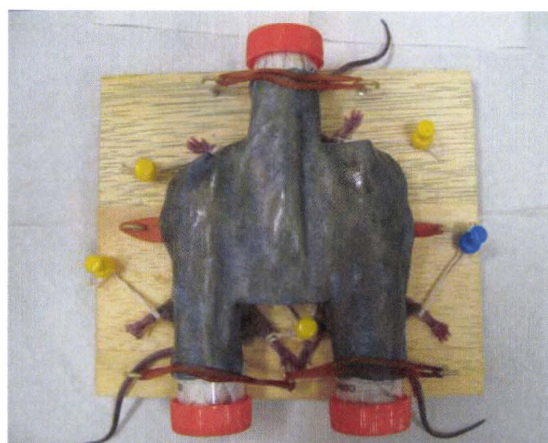
研究要旨：消化器がん研究のため、各種消化器がん手術症例より 22 年度は胃がん、肝がんの適応症例を選択するとともに、化学療法、放射線治療の際の正常組織への副作用について調査するため SCID マウスへ移植したヒト肺組織への影響研究を開始した。

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症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、化学療法、放射線療法の周辺正常組織への障害を把握するため SCID マウスへ移植したヒト組織への影響検索システムを構築する。

B. 研究方法

消化器一般外科組織のうち本年度は胃がん、肝がん組織から SCID マウスへの移植に適切な組織の選択を行った。また、野村らの改良した Super-SCID マウスに肺がん手術治療の種やむをえず摘出された周辺正常肺組織を左右下肢に皮下移植し、移植 1 週間後より X 線 2 Gy を週 2 回計 20 Gy 照射した。X 線照射は、X 線発生装置 HITACHI MBR-1520R (150KeV, 20mA, 0.5Al+0.2Cu, 49cm) を用い、線量率 1.03 Gy/分で下図に示すように Isoflurane 麻酔科で移植部位以外を鉛板で被い照射した。



(倫理面への配慮)

研究に際し、治療上やむをえず摘出された組織片をインフォームドコンセントを得たうえで、移植に用いるため、患者に危害が及ぶことはなかった。

本研究におけるヒト組織の 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。手術時等で採取されるヒトがん組織および周辺組織の譲渡に関しては、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。本行（分担者）は、これらの申請課題（代表；野村）の研究従事者として承認されている。

C. 研究結果

SCID マウスに移植した胃がんについては研究代表者報告書に記載した。多くは、3-6 ヶ月後に腫瘍を形成した。特に、スキルスは増殖が早く、きれいに継代維持保存でき、遠隔転移も認められた。肝がんは、非 B、非 C 症例のみを対象にした。

ヒト肺組織への放射線照射による副作用の検出システムに関しては、肺がん患者 2 症例から得られた周辺肺組織片 16 個のうち 12 片を SCID マウス 8 匹の左右下肢皮下に移植した。そのうち 6 匹に対し、X 線を週 2 回 2 Gy 5 週間計 20 Gy

を照射した。非照射対照群はヒト肺組織4片をSCIDマウス2匹の左右下肢皮下に移植したものをを用いた。Isoflurane 麻酔器を用い全てを無菌箱の中で麻酔下で行ったため、固定によるマウスへの苦痛は最小限に抑えることができた。照射組織の解析は現在進行中である。露出した左右下肢と尾には照射群のみに皮膚の糜爛と潰瘍が認められた。マウス組織への影響についても解析中である。

D. 考察

移植継代維持できた胃癌に関しては、がん関連遺伝子の変異を調査する。また、ヒト正常肺への制癌剤、放射線の副作用（繊維化など）は治療上深刻な問題であり、インパクトは大きい。

E. 結論

消化器がん研究のため、各種消化器がん手術症例より22年度は胃癌、肝がんの適応症例を選択し、研究代表者により継代維持がなされた。化学療法、放射線治療の際の正常組織への副作用について調査するためSCIDマウスへ移植したヒト肺組織への影響研究システムを作成した。

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

Nakajima Hiroo, Ozaki Kiyokazu, Hongyo Tadashi, Narama Isao, Todo Takeshi, A rapid and easy method for the qualitative detection of intracellular deposition of inhaled nanoparticles, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine (2011) ;xx:1-7, doi:10.1016/j.nano.2011.02.004.

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、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、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究。Space Util. Res. 27: 107-110 2011.

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