

201107013A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業 創薬バイオマーカー探索研究事業

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織
及びヒト組織由来細胞の供給・品質の向上に関する研究

(H23-バイオ-指定-007)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 東歩

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業 創薬バイオマーカー探索研究事業

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織
及びヒト組織由来細胞の供給・品質の向上に関する研究

(H23-バイオ-指定-007)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 東歩

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織及びヒト組織由来細胞の 供給・品質の向上に関する研究.....	1
吉田 東歩	

II. 分担研究報告書

1. 新鮮組織・細胞の供給システムの整備・新鮮組織から 細胞を効率よく調製する方法の検討.....	9
吉田 東歩	
2. 細胞の高品質化の検討.....	15
佐藤 元信	
3. 無血清培養法等の新規培養技術の開発.....	21
佐藤 貴繁	
4. 温度調整機能・圧力調整機能を持たせた保存容器・輸送容器等の開発.....	28
清水 恭子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	35
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	36
----------------------	----

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織及び ヒト組織由来細胞の供給・品質の向上に関する研究

所 属 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
研究資源バンク
研究代表者 吉田 東歩

研究要旨 創薬研究に役立つ国内自給型のヒト組織バンク事業を効率的に運用するため、組織の採取、輸送、保管、細胞調製、品質管理などについて技術開発を行った。ヒト組織・細胞を高品質で提供するための技術開発として、無血清培養法等新規培養技術および輸送・保存容器を開発した。

A. 研究目的

ヒューマンサイエンス(HS)研究資源バンクは、国内の研究機関や医療機関から収集した細胞株、遺伝子クローン、日本人由来 B 細胞株・DNA、ヒト組織を保管、増幅、品質管理を行い、産学官の研究者に分譲している。1995 年の設立以来、国内外の研究者から 27,996 件の分譲依頼を受け、74,674 試料を分譲した。

日本ではヒト試料の研究利用が立ち遅れており、国内製薬企業ではヒト試料を用いた研究は欧米に設立した子会社や海外の研究受託会社に委託する例が多い。米国では、移植不適合臓器を研究利用するためのヒト組織バンクが約 30 年前から活動しており、欧州では、約 200 施設が参加するヒト組織バンクのネットワーク BBMRI が EU の資金で運営されている。近年、アジアでもシンガポール、中国、台湾などでヒト組織バンクが設立されている。国内でも、最近、SCCRE、神奈川がん臨床研究・情報機構にヒト組織バンクが設立されたが、会員制であり、試料も凍結試料に限定している。バイオマーカー探索研究のコンソーシアム、産官学連携組織でヒト試料が収集されているが、他の研究目的や他機関での利用が出来ず、せっかく収集した試料が廃棄されることも多い。2008 年国際移植学会でイスタンブール宣言が採択され、移植用臓器は自国内での自給自足の方向性が明示された。研究用ヒト組織についても、輸入が困難になる可能性があり、国内医療機関で採取されたヒト組織の研究利用の要請が今後高まることが予想される。

創薬シーズとなるバイオマーカーを発見し、知的財産を確保するためには、ヒト試料を収集し、供給する国内自給型のバンク事業を整備することが不可欠である。HS 研究資源バンクは、厚生科学審議会答申を受け、2001 年に国内初のヒト組織バンクを開設し、2007 年からは、国内の他機関では実施されていない新鮮組織の供給事業を開始した。外科手術で摘出された余剰組織の提供を受け、冷蔵状態で研究機関に届けている。現在までに、医療機関から提供された新鮮組織を約 150 件研究機関に譲渡した実績がある。さらに、組織から調製した細胞の供給事業も開始した。

本研究は、(1)創薬バイオマーカー探索研究においてニーズの高い試料の充実、(2)疾患・病態を反映したヒト組織や対照となる正常組織を、新鮮組織として供給するシステムの整備、(3)高品質が保証される試料の加工技術の開発、(4)新規培養技術、(5)保存・輸送方法の開発、を通じてヒト組織・細胞の供給体制の確立と拡大を行い、我が国におけるヒト試料利用環境を整備することにより、効率的な創薬研究・医薬品開発の促進に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

1 新鮮組織・細胞の供給システムの整備

研究者へのニーズ調査として、使用目的、利用希望の高い組織・細胞の種類、必要量、試料数、摘出後の処理法、提供者の診療情報などについて聞き取り調査を行った。ニーズの高い項目について提供

医療機関と協議した上で、試料と付随情報の充実を図った。新鮮組織の場合、手術直後にバンクに提供されるため、患者や試料に関する情報の選別、患者が試料をバンクに提供する意思を撤回する場合の期限など HS 倫理審査委員会において、倫理的、科学的な面から検証した。バイオマーカー探索研究には、患者の診療情報が必須であり、医療機関の協力を得て、出来るだけ詳細な情報提供をお願いした。新鮮組織の保存性・輸送法の検討として、平成 23 年度に医療機関から提供された新鮮組織 50 試料について輸送後の組織の状態、利用結果を「ヒト組織受領書」および利用者からの聞き取り調査に基づき検証した。

2 新鮮組織から細胞の調製

新鮮組織から細胞の調製の検討には滑膜細胞と脂肪前駆細胞を用いた。滑膜細胞は関節リウマチあるいは変形性関節症患者の人工関節置換手術、手関節形成手術で摘出された滑膜組織を用い、脂肪前駆細胞は消化器癌手術で摘出された内臓脂肪組織(腸間膜)を用いて調製した。各組織をコラゲナーゼ処理で分散し、10%牛胎児血清を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、5%CO₂、37°C で培養した。継代には 0.25%トリプシン-0.02%EDTA を用いた。滑膜細胞は 1 回継代後、脂肪前駆細胞は 3 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、緩慢凍結(1°C/分)後、液体窒素タンクの気相(-160°C)にて保存した。

3 細胞の高品質化の検討

新鮮組織から調製した細胞についてリアルタイム PCR 法により各種ウイルス(HBV、HCV、HIV)の否定試験を検討した。滑膜細胞については TNF- α 等の炎症性サイトカインに対する反応性について、MMP-3、IL-6 等の産生を指標として解析した。脂肪前駆細胞については脂肪細胞への分化誘導時の脂肪細胞特異的蛋白質の発現を解析した。滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討については、各細胞に分化誘導処理を行い、脂肪細胞や骨芽細胞の分化マーカーを調べた。

4 無血清培養法等の新規培養技術の関与

ラットの脂肪組織由来の幹細胞の分化条件の検討では、Sprague-Dawley ラットの脂肪組織から継代操作により組織幹細胞を調製した。分化性状の解析にはリアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現を調べた。HS 研究資源バンクに保管されているヒト正常間葉系幹細胞の 27 種類(国立成育医療研究センター・梅澤明弘らの研究グループによって寄託)について、

間葉系幹細胞の骨芽細胞あるいは脂肪細胞への分化能を検証した。筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発研究には HS 研究資源バンクの保存株 L6 細胞、RD 細胞を用いた。分化誘導は低濃度の馬血清と様々な濃度の LiCl の継続処理または前処理によって検討した。

5 保存容器・輸送容器等の開発

保存容器・輸送容器等の開発にはラットの初代心筋細胞、初代肝細胞および臍島を用い、各細胞の保管温度の違いによる細胞品質を比較した。設定保管温度は 4°C、14°C、32°C または 37°C の 3 温度帯とした。細胞の品質評価法は、心筋細胞は各温度で 1 日から 4 日静置した後、形状、生存率、拍動の観察、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析実験を行った。肝細胞は各温度で 1 日静置後、肝細胞用培養メディアウムで培養し、形態観察、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析実験を行った。臍島は各温度で 1 日から 4 日静置した後、形状、生存率、グルコース応答性試験およびリアルタイム PCR による遺伝子発現解析実験を行った。

5°C および 32°C 輸送容器を試作し温度制御能力を検証した。電池ボックスを接続した定温輸送容器を、レジヤ用のコールドボックスに設置した。その際、5°C 設定時には予め-14°C 程度に冷却した保冷剤 CV-2 500g、(玉井化成)、32°C 設定時には、37°C にて加熱した水溶性蓄熱材パッサーモ P-32 500g (玉井化成)を、定温容器周辺に設置し、各々の低温輸送箱の温度センサーが設定温度以下になった場合、自動的に内部に仕込んだ面状ヒーターに自動的に通電され、加熱されるよう設定した。設定が完了した輸送容器は、50°C~-10°C の範囲で温度が変化するように設定したプログラマブル恒温器に保管し、各所の温度変化を記録した。

細胞保存容器については、創価大学の清水らが開発した容器を供与頂き、検討に使用した。心筋細胞、臍島を一定圧力に加圧後、定温環境下で保管し、生細胞率および機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施した。研究代表者吉田及び研究分担者佐藤元信が所属する HS 研究資源バンクにおいては、ヒト試料の取扱いに関しては HS 振興財団・倫理審査委員会に諮り、試料ごとに上記の指針を踏まえた上での承認をうけて実施した。また、ヒト試料の提供医療機関、供給を受ける研究機関でも機関内倫理審査委員会で承認を受けて実施した。HS 研究資源バンク

で取り扱う対象は、外科手術等で摘出され、診断などに不要と判断された組織またはその組織に由来する試料である。これらのヒト試料は、HS 研究資源バンクに提供することについて提供者への十分な説明と同意のもとに、連結不可能匿名化などの個人情報保護に係る手続きを厳重に行った上で国内の 14 医療機関から提供された。研究分担者佐藤貴繁及び清水が所属する株式会社プライマリーセルにおいては、親会社であるコスモ・バイオ株式会社において、コスモ・バイオグループ生命倫理委員会に諮り、上記指針を踏まえて承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1 新鮮組織の供給システムの整備

創薬研究に利用するヒト組織・細胞についてのニーズ調査では、企業の研究部門別でニーズが異なっていた。探索スクリーニング部門、薬効評価部門、診断薬部門では、広範囲の組織の癌、病態、正常部位の利用希望があり、安全性部門、薬物動態部門では肝、小腸、腎臓の組織の正常部位、特に肝細胞やミクロソームが必要とされている。製剤部門では、経皮吸収試験用の皮膚・粘膜の正常部位が必要とされている。研究用ヒト組織・細胞の入手に際し、製薬企業が希望する要件は、多種類が供給可能、1ロット当たりの量が多い、高品質、付帯情報が充実、入手手続きが簡単、低コスト、利用実績が多い、が挙げられた。海外からの輸入が困難な非凍結新鮮組織(癌を含む各種疾患及び正常組織)は国内バンクに期待する声が多かった。また、新鮮組織そのままの供給でなく、細胞分離や組織アレイの作製など創薬研究に直ぐに利用できるように加工処理済み試料も利用希望が高かった。

平成 23 年度、関西、関東地区の提携医療機関 4 施設から提供された新鮮組織(内臓脂肪、滑膜、皮膚、大腸、胃)を安定的に供給した(4-5 例/月)。新鮮組織の供給では摘出から譲渡までの時間ができるだけ短いことが望まれる。平成 23 年度、新たに 2 医療機関(福井県、埼玉県)から新鮮組織の提供が可能となり、また、新規に変形性関節症患者由来の滑膜組織、良性腫瘍患者由来の皮膚組織、臍帯組織を新鮮組織として供給可能とし、譲渡を開始した。平成 23 年度のバンクに提供された組織は 50 試料であり、組織の種類は、滑膜(非癌部位)26 試料、大腸(癌/非癌部位ペア)3 試料、胃(癌/非癌部位ペア)6 試料、食道(癌/非癌部位ペア)1 試料、内臓脂肪(腸間膜、非癌部位)2 試料、皮膚(非癌部位)8 試料、臍帯組織(非癌部位)4 試料であった。提

供者(50名)の内訳は、男性 24%、女性 76%、提供者の年齢の範囲は 21~87 歳で平均年齢は 66 歳であった。組織摘出後、組織を冷蔵処理までの時間は、1 時間以内が 95%を占めた。提供された組織量の平均値は約4グラムであり、米国で研究利用されている移植不適合臓器と異なり、手術摘出組織の提供量は少なかった。

新鮮組織の場合、医療機関からバンクへの提供が手術直後に実施されるので、提供の意志の撤回は手術前までとなる。新鮮組織の提供についてHS財団倫理審査委員会において検証し、インフォームド・コンセント文書の中で同意の撤回の時期を手術前までとの説明文を加えた。分娩時に提供される臍帯組織の場合のインフォームド・コンセント文書については、出産を控えた両親に対して適切と考えられる平易な説明文書を医療機関と協議の上作成した。

今回、バイオマーカー探索研究に必須な患者の診療情報をリストアップし、医療行為に支障をきたさない範囲で、提供可能か否かを医療機関と協議した。その結果、平成 23 年度から以下の診療情報の提供が可能となった。内臓脂肪の提供の場合は、糖尿病など生活習慣病、BMI 値、空腹時血糖値、HbA1c 値、血中トリグリセリド値、LDL-コレステロール値。癌手術に伴う癌部位、非癌部位の提供の場合は、癌の組織型分類、バイオマーカー。滑膜の提供の場合は、生物学製剤の使用、バイオマーカー。

手術摘出組織は医療機関において、1時間以内で洗浄および保存液への浸漬が行われた。利用者から提出された「ヒト組織受領書」の記載項目である「組織の状態」によると平成 23 年度に譲渡された 50 試料は「良好」または「問題なし」であった。輸送方法として、皮膚(8試料)と滑膜(1 試料)については、宅配便を用いて冷蔵状態にて約1日以内で運送した。残りの 41 試料については組織を氷の入った保冷容器に収納し、1~5時間以内で輸送した。いずれも、輸送中の冷蔵状態は保持されており、破損などの品質劣化は認められなかった。

2 新鮮組織から効率よく細胞を調製する方法

新鮮組織から滑膜細胞、脂肪前駆細胞を調製し、凍結チューブで譲渡するシステムを整えた。滑膜細胞については 17 名から提供された滑膜組織から調製し、全例において細胞が調製でき、17 ロットの凍結細胞チューブ 1,030 本を得た。内臓脂肪前駆細胞については 12 名から提供された内臓脂肪から 9 例において細胞が調製でき、9 ロット 243 本の細胞チューブを得た。

使用した滑膜は関節リウマチ患者由来が 11 例、

変形性関節症患者由来が 6 例であった。人工関節置換手術による摘出が 15 例、手関節形成手術による摘出が 2 例で、滑膜の部位は膝関節 13 例、手関節 2 例、足関節 1 例、股関節 1 例であった。提供者は女性 16 名、男性 1 名で、平均年齢は 72 歳(年齢の範囲は 60~84 歳)であった。提供された組織量は 1.0g~25g の範囲で平均重量が 6.9g であった。3回の継代後、約 5×10^5 /ml/チューブの凍結チューブを平均で 61 本/ロット作製し、譲渡用試料として凍結保存した。

使用した内臓脂肪(腸間膜)が提供された手術(全 9 例)は、S状結腸癌手術が 3 例、上行結腸癌手術が 3 例、直腸癌、横行結腸癌、食道癌手術による摘出がそれぞれ 1 例であった。提供者は男性 7 名、女性 2 名で、平均年齢は 68 歳(年齢の範囲は 41~83 歳)で、糖尿病に罹患している提供者が 1 名いた。BMI 値は肥満とされる 24 以上が 2 名、やせすぎとされる 20 以下が 3 名で BMI の平均値は 21 であった。提供された組織量は 0.5~8g の範囲で平均重量が 3.3g であった。1 回の継代後、約 2.6×10^5 /ml/チューブの凍結チューブを平均で 24 本/ロット作製し、譲渡用試料として凍結保存した。

滑膜細胞、脂肪前駆細胞とも解凍後の生細胞率は全ロットで 90%以上であり、再培養可能であった。微生物(真菌、細菌、マイコプラズマ)の否定試験においても陰性であった。細胞の機能性状もチェックし、品質上問題がないため、HS 研究資源バンクホームページなどで譲渡開始を広報し、譲渡を始めた。

3 細胞の高品質化の検討

ヒト由来細胞のウイルス否定試験として、リアルタイム PCR 法による検出系を検討した。HBV ウイルスの検出系として、遺伝子バンク保有の HBV ゲノム DNA をもつクローン(VG023)を陽性対照に使い、HBV ウイルス用の TaqMan Gene Expression Assay により、リアルタイム PCR を行った結果、良好な陽性反応が検出された。次に実際にヒト由来試料として当バンク保有のヒト不死化 B 細胞株 3 株(PSC2038, PSC2040, PSC2049)について、精製 DNA を用いて検出実験を行った結果、HBV ゲノムは検出されなかった。

関節リウマチ患者の滑膜組織より調製した滑膜細胞の機能的性状として、炎症反応性について調べた。各種濃度の炎症性サイトカイン TNF- α を培養系に添加して、培養上清中の MMP-3 と IL-6 の産生を ELISA により測定した結果、TNF- α の濃度依存的に MMP-3 及び IL-6 量の増加が認められた。現在譲渡可能な関節リウマチ患者由来の 11 ロット及び変形性関節症患者由来の 6 ロットの滑膜細胞についても同

様の炎症反応性を確認した。この反応性について、mRNA 発現レベルの変化に関してリアルタイム PCR で解析した結果、TNF- α 刺激時に MMP-3 及び IL-6 の mRNA 量の明確な上昇効果が認められたことから、この反応性は転写促進によることが判明した。

内臓脂肪組織より調製した脂肪前駆細胞は、分化誘導により、oil-red O により赤く染色される脂肪滴をもつ脂肪細胞へと分化することが確認された。分化誘導時の培養上清中の Adiponectin 量を ELISA により調べた結果、分化に伴い Adiponectin の分泌増加傾向が認められた。現在譲渡可能な 9 ロット及び新規に調製した糖尿病由来の 1 ロットについても同様の結果を確認した。この変化に関して、リアルタイム PCR を用いた mRNA 発現解析の結果、Adiponectin mRNA の発現は、分化誘導しない細胞では認められないが、分化した脂肪細胞において、発現誘導が認められ、分化に伴う Adiponectin の産生量の増加は転写促進によるものであることが示された。

関節リウマチ患者由来滑膜細胞は、細胞免疫染色解析により間葉系幹細胞のマーカーとされる CD105 及び Vimentin 陽性を示した。滑膜細胞を分化誘導することにより oil-red O により赤く染色される脂肪細胞及びアルカリフォスファターゼ活性陽性の骨芽細胞へと良好に分化する細胞が認められた。また分化した脂肪細胞において Adiponectin の産生を認めた。変形性関節症患者由来滑膜細胞についても検討し、同様の結果を得た。また脂肪前駆細胞も、細胞免疫染色により、CD105 及び Vimentin 陽性を示し、分化誘導によりアルカリフォスファターゼ活性陽性の骨芽細胞へと分化する細胞を確認した。糖尿病患者由来の 1 ロットについても、同様の結果を確認した。

4 無血清培養法等の新規培養技術の開発

脂肪組織由来の幹細胞を継代操作により調製する方法を確立した。ラット脂肪組織より、成熟脂肪細胞を除いた細胞群を採取し、そのまま培養した細胞群および2回継代後の細胞群より RNA サンプルを作成した。リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、幹細胞のマーカーである CD29 の発現量が継代を行っていない細胞群と比較しての発現量が高くなっていった。別の幹細胞のマーカーである CD73、幹細胞のネガティブマーカーである CD31 や CD45 の発現量の結果からも継代を行っていない細胞群と比較して2回継代した細胞群で幹細胞が多く含まれることが判った。次にこの細胞群の分化能を確認した。細胞群を脂肪細胞へ分化を引き起こす強制分化剤を添加せずに培養した場合、脂肪細胞が認められなかった。一方、2回継代した細胞群を

脂肪細胞へ分化を引き起こす強制分化剤を添加して培養した場合、脂肪細胞への分化が認められた。

HS 研究資源バンクに保管している間葉系幹細胞について分化能の検証を行った。検討した間葉系幹細胞は、過剰指から採取された細胞 18 株(内、骨髄由来 3 株、骨由来 3 株、軟骨由来 1 株、骨膜由来 1 株、皮膚由来 1 株)、胎盤から採取された細胞 9 株の、合計 27 株である。β-グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾンによる骨芽細胞への分化誘導した結果、胎盤由来の 2 細胞(PL505、PL518)を除く 23 細胞で分化が確認できた。脂肪細胞への分化は、デキサメサゾン、IBMX、インドメタシン、インスリンにより誘導し、全細胞で確認できた。

筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系を開発するため、HS 研究資源バンクで保管している 2 種類の筋芽細胞(L6 細胞、RD細胞)を用いて検討した。L6 細胞に対して、0.1 - 1.0%の低血清下、2 - 10 mM LiCl の前処理を 1 - 7 日間行った。LiCl 処理濃度に依存して細胞増殖は抑制された。前処理後、低血清で培養することにより、自発収縮する多核融合細胞に分化した。免疫蛍光染色により、これらの多核融合細胞にはミオシン重鎖蛋白が認められた。また処理によってはサルコメア構造も観察された。これらの結果から、誘導された細胞は横紋筋細胞と考えられた。自発収縮する横紋筋が効率よく分化した処理の組合せは、10 mM LiCl、4 - 7 日の前処理と 1.0% 血清処理の組合せ、5 - 7 mM LiCl、7 日の前処理と 1.0% 血清処理の組合せであった。LiCl 処理しない培養においては、低血清処理により融合多核細胞の出現は認められたものの、自発収縮は全くみられなかった。RD 細胞では 10% ウシ胎児血清下、20 mM LiCl による 2 日間の前処理を行った後、LiCl を除いてさらに 5 日間培養することにより筋細胞特異的なミオシン重鎖蛋白、中間径フィラメントのデスミンを発現する細胞の割合が対照より高くなることを認めた。

5 保存容器・輸送容器等の開発

ラット初代心筋細胞を用いて保存の至適温度の検討した結果、4℃であることが判った。定温輸送容器を試作し、5℃用で 24 時間~4 日程度、32℃用は 24 時間~3 日程度の期間、設定温度±2.5℃を維持することが可能となった。外気温度を 6 時間毎に +40℃から-10℃に変化させた際の定温容器内部温度変化を調べた結果、32℃設定の場合約 48 時間後、5℃設定の場合で約 54 時間後に電池が消耗し、定温機能が劣化する様子が観察された。一方、設計上は外箱に設置している蓄熱材・保冷材の容量の加減や電池容量を上げる事が可能であり、これにより長時間の定温維持が可能であることが推測された。これに

より国内では調達が困難な組織や細胞を海外から輸入などが可能になることが示唆された。実際の細胞や組織の搬送を想定して、戸外静置、車中静置、倉庫静置、トラック便輸送、航空便輸送を連続して行い、その間の 5℃定温輸送容器内部の温度を連続計測した。このように、不規則に外気温が変化し、かつ風や床からの熱伝導などが様々に変化する環境下でも 4 日間以上定温性能を維持することができた。

細胞加圧容器での細胞の保存性を検討した。高圧保存容器内の細胞に対して、1.5Mpa または 3.0Mpa の圧力をかけ、4℃に高圧保存容器を 4 日から 8 日間静置した。その後、トリパンプルーを使用して細胞の生存率を測定した。ラット初代心筋細胞に関して、1.5Mpa の圧力下で 4 日間保存した場合、生存率は約 50%であった。さらに培養プレートに播種したところ、心筋細胞の拍動を確認することが出来た。次に保存期間を 8 日間に設定して検討を行った。その結果、1.5Mpa の圧力下では、生存率が 20%にまで低下してしまい、圧力をかけていない場合と同程度の生存率であった。そこで、3.0Mpa の圧力や細胞保護効果が知られているトレハロースとの組み合わせについても検討したが、いずれも 30%未満であり、圧力をかけていない場合と比較して、有為な差は認められなかった。ラット初代心筋細胞に関しては、1.5Mpa または 3.0Mpa の圧力保存で 4 日後は生存率が 40%程度であり、8 日後では、20%未満に低下し、いずれの場合も圧力をかけていない場合と比較して、有為な差は認められなかった。

D. 考察

国内自給型のヒト組織バンク事業は国内初の試みであり、HS 財団倫理審査委員会の審議に基づいて慎重に業務を進めた。10 年余りの実績として、14 医療機関から手術摘出組織を 529 試料受け入れ、41 研究機関へ 491 試料を譲渡した。大きなトラブルはなかったが、譲渡は当初の想定数(年間 100 試料)を大きく下回った。この理由は研究機関が望むバンクに対するニーズと現状が乖離しているためと考えられた。本研究においては、ヒト組織・細胞に対する研究者のニーズ調査を行い、多様なニーズがあることが分かった。しかし、手術摘出組織をソースとする国内のヒト組織バンクではこれらの要求の全てに応えることは困難で、研究者は海外からの輸入に頼らざるをえない。一方、海外からの輸入が困難な非凍結新鮮組織(癌を含む各種疾患及び正常組織)は国内バンクに期待する声が大かった。培養細胞の調製用としては少量の組織量でも可能なことから、HS ヒト組織バンクでは

新鮮組織の供給に注力することとした。

欧米では組織から細胞を調製し、供給する企業が存在するが、国内には無い。国内で細胞を供給する事業を開始するためには、組織量の少ない手術摘出組織から効率よく細胞を調製するための技術開発が必要となる。また欧米で細胞調製用として利用される移植不適合臓器と手術摘出組織は摘出前後の処理法が異なるため、調製した細胞の性状が異なる可能性がある。研究資源バンクから供給される細胞は厳密な品質検査(形態、増殖能、解凍後の生存率、細胞マーカー、細菌・真菌・マイコプラズマ汚染否定試験、クロスコンタミネーション否定試験、ウイルスチェック)が実施されている。新鮮組織から調製した細胞についても、同様の品質管理検査を行い、問題ないことを検証した。

関節リウマチ或いは変形性関節症患者由来の滑膜組織より調製した滑膜細胞において、炎症性サイトカイン TNF- α を培養系に添加して、MMP-3 及び IL-6 の産生量を調べた結果、濃度依存的な MMP-3 及び IL-6 の産生促進効果が認められ、炎症反応性を保持していることが明らかとなった。この反応性に関して高精度な mRNA 発現解析を行い、蛋白質レベルの反応性が、転写レベルで制御されていることを明らかにした。調製した滑膜細胞は、関節リウマチ患者の滑膜で生じる炎症反応をある程度反映していることが示唆され、炎症性反応を指標とした抗リウマチ薬の研究開発等に利用可能と考えられた。また変形性関節症患者由来の滑膜細胞は、関節リウマチ研究における対照としての利用だけでなく、原因が明確でない本疾患解明のための基礎研究等への利用が期待される。調製した脂肪前駆細胞において認められた、脂肪細胞への分化に伴う Adiponectin 分泌量の増加は転写レベルでの発現誘導により生じることが明らかとなった。Adiponectin は脂肪細胞の分泌ホルモンの一種で、血糖降下作用等様々な生理活性をもつことが知られている。本細胞は脂肪滴を有するという形態的特徴だけでなく機能的にも分化していることが示唆され、糖尿病、肥満等の生活習慣病研究への幅広い利用が考えられる。

バンクで調製した滑膜細胞は、脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能をもつ細胞を含むことが明らかとなり、再生医療研究のための基礎実験等における細胞のソースとして利用可能と思われる。滑膜細胞はまた軟骨細胞へ分化することが良く知られており、組織幹細胞のソースとして関節損傷に対する再生医療研究における臨床試験が進められている。バンクの滑膜細胞についても軟骨細胞等の他の有用な細胞への分化能を検討し、付加価値を高めてゆくことが再生医療研究における利用促進のために必要であ

る。

これまでに(株)プライマリーセルは、世界で初めてラット腸間膜脂肪組織から調製した前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞にまで分化誘導する新規培養法を確立している。本研究では、このノウハウを元に、ラット腸間膜内臓脂肪組織およびラット皮下組織より、成熟脂肪細胞を除いた細胞群を得た。この細胞群には、幹細胞の他に、脂肪細胞への分化能を高く有する前駆脂肪細胞やマクロファージも多く含まれている。そこで、数回の継代を行ったところ、脂肪細胞特異的マーカーの発現量が顕著に低下し、一方で幹細胞特異的マーカーの発現が増加した。従って、前駆脂肪細胞の割合が十分に低く、幹細胞を主とした細胞群を確立する事が出来たと考えられる。幹細胞の確認を含めて、得られた細胞を強制分化剤により脂肪細胞へ分化させる事が可能であるか確認した。その結果、得られた細胞が分化能を保有している事が確認された。今後は、さらなる検証として、得られた幹細胞を別の骨髄細胞へ分化させる系を検討し、多分化能を維持している事を確認する予定である。また従来の幹細胞の培養には、主に血清含有の培地が用いられている。得られた幹細胞を無血清条件下で脂肪細胞へ分化させる事を試みた。その結果、基礎培地と添加試薬の再検討により、ラット脂肪組織由来の幹細胞を無血清培地にて、脂肪細胞へ分化させることに成功した。今後は、本検討で得られたノウハウをヒトの細胞へ応用したい。

ヒューマンサイエンス研究資源バンクに登録されている 27 種類のヒト正常系幹細胞の分化能を検証し、ほぼ全ての細胞において骨芽細胞への分化能、脂肪細胞への分化能が確認できた。これらの細胞の分化能は細胞採取機関である国立成育医療研究センターでは確認されていなかったため、本研究で得られた成果は細胞研究利用者への重要な情報となる。本年度の研究で用いた分化誘導条件は、いずれもほぼ確立された手法であるが、ひとつの問題として、基本培地が血清を含んでいることが挙げられる。ヒト間葉系幹細胞を用いた創薬、再生医療研究には、無血清、成分既知の培地や、改善された分化誘導法が求められている。今年度の従来法を用いた分化誘導検証結果を土台として、次年度は無血清培地等の開発、分化誘導法の改善を計り、ヒト間葉系幹細胞の創薬研究への価値を高めたい。

塩化リチウム処理により、ラット筋芽細胞 L6、ヒト横紋筋肉腫細胞株 RD において横紋筋分化が促進されることを認めた。さらに L6 細胞においては、自律収縮する横紋筋が容易に誘導可能であり、非常に効率のよい分化誘導法であることを認めた。Wnt は、レセプターである Frizzled を介して disheveled 蛋白をリ

ン酸化し、リン酸化された disheveled が Axin 複合体を介して GSK-3 β による β -catenin のユビキチン化を阻害することにより細胞内 β -カテニンのプールを増大することにより作用を及ぼす。塩化リチウムは GSK-3 β の阻害剤であり、Wnt の作用をミックスすることが知られている。本研究の結果は、ラット筋芽細胞 L6 やヒト横紋筋肉腫 RD において Wnt によるシグナル伝達経路が横紋筋の分化に関与することを示唆している。本成果は、一般的な細胞株と塩化リチウム処理という簡便かつ効率的な分化誘導法を提供することにより、分化した横紋筋を用いた創薬研究に貢献すると思われる。課題として、ヒト正常細胞を用いた効率的な横紋筋の誘導が挙げられる。今後は間葉系幹細胞、ヒト正常筋芽細胞などの細胞からの誘導についても検討したい。

E. 結論

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、関西、関東地区の提携医療機関 4 施設から提供された新鮮組織(内臓脂肪、滑膜、皮膚、大腸、胃)を安定的に供給した。平成 23 年度、新たに 2 医療機関(福井県、埼玉県)から新鮮組織の提供が可能となり、新規に変形性関節症患者由来の滑膜組織、良性腫瘍患者由来の皮膚組織、臍帯組織を新鮮組織として供給できるようにした。患者が試料をバンクに提供する意思を撤回する場合の期限など HS 倫理審査委員会において検証し、臍帯の提供時のインフォームド・コンセント説明文書等を作成した。バイオマーカー探索研究に必須な患者の臨床情報について、医療機関の協力を得て、詳細な情報提供が得られるようになった。

新鮮組織から細胞を効率よく調製する方法の検討に関しては、これまでの関節リウマチ患者由来の滑膜組織からの滑膜細胞の調製に加えて、新たに変形性関節症患者由来の滑膜組織からの滑膜細胞の調製を開始し、計 7 例について実施した。医療機関から摘出組織の状態に関して入手した詳細な情報をもとに、滑膜部分のみを従来よりも効率よく分離細胞調製することができた。調製細胞の一般的性状は、関節リウマチ患者由来の滑膜細胞と同等であり、研究資源化が可能であることを確認した。

細胞の高品質化の検討に関しては、新鮮組織より調製した細胞或いはヒト由来細胞株についてのウイルス等の否定試験系としてリアルタイム PCR 法を検討し、迅速かつ高精度の HBV 否定試験系を設定した。またバンクで新鮮組織から調製した細胞の機能的性状を精査するためにリアルタイム PCR 法による mRNA の発現解析を可能とした。滑膜細胞の機能的性状に関しては、炎症性サイトカイン TNF- α による

反応性が転写レベルで制御されていることをリアルタイム PCR 解析により明確にした。また間葉系幹細胞としての性状解析により、譲渡用の滑膜細胞及び脂肪前駆細胞が、脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能を有することが判明した。これらの細胞の再生医療研究への利用が望まれる。

無血清培養法等の新規培養技術の開発に関して、ラットの脂肪組織由来の幹細胞を用いた検討を行った。脂肪組織由来より採取した細胞を数回継代することで、脂肪細胞特異的マーカーの遺伝子発現が減少すること、および間葉系幹細胞の特異的マーカーの遺伝子発現が増加する事をリアルタイム PCR 法と FACS により確認した。この細胞を用いて、無血清培地の検討を行ったところ、細胞の接着および増殖が確認され、さらに脂肪細胞へ分化させる事に成功した。なお、無血清培地では、培養プレートへのコートが必要であった。今後は、軟骨細胞、骨芽細胞への分化を試み、最終的にはヒト細胞へ応用する予定である。培養技術の開発に関しては、ヒト正常間葉系幹細胞 27 株につき骨芽細胞、脂肪細胞への分化能の検討を行い、幹細胞としての性質が保証されることを確認した。また、Wnt 経路を活性化することによる効率の良い横紋筋への分化誘導法を開発中であり、横紋筋を用いたアッセイ系などへの応用が期待される。

定温輸送容器等の開発に関しては、5 $^{\circ}$ C 用で 24 時間~4 日程度、32 $^{\circ}$ C 用は 24 時間~3 日程度の期間、設定温度 \pm 2.5 $^{\circ}$ C を維持することが可能となった。細胞は環境温度の影響を極めて受けやすいため、従来輸送時の温度変動によって引き起こされる細胞品質変化は対処不可能なものとされてきた。そのため、一般に流通可能な細胞は凍結細胞に限られる場合が多く、創薬研究の進展を阻害する一因であった。今回我々が開発した、乾電池で駆動が可能な定温輸送システムは、従来流通が不可能であった生細胞の輸送を可能とするものである。これにより、ごく一部の限られた施設でしか使用が叶わなかった細胞類も、今後は広範囲での使用が可能とできる可能性がある。なお、実装試験は出荷地域や季節変動に大きな影響を受けるために、今後四季を通じての継続的な実送試験が必要と思われる。また、ラット臍帯を用いた検討では、圧力負荷によって、グルコース応答性が向上した。これは、細胞の輸送のみならずヒト臍帯の移植にも応用可能な結果であると考えられる。いかなる機構により圧力が臍帯機能の改善に寄与したのか、今後さらなる検討を行いたい。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべき事項はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

吉田東歩、ヒト組織バンク、**Medical Technology**、(2011), 39: 518-519

小阪拓男、研究利用のためのヒト組織及び細胞の供給、*Jpn J Clin Pharmacol Ther* (2012), 43(2):89-90

2. 学会発表

大西-笠松 礼、小阪 拓男、佐藤 元信、吉田 東歩、手術摘出組織の研究利用－関節リウマチ患者由来滑膜細胞について－、日本組織培養学会・第84回大会、東京、2011年5月27日

小阪 拓男、研究利用のためのヒト組織及び細胞の供給、第32回臨床薬理学会、浜松、2011年

12月1日

小阪 拓男、佐藤 元信、吉田 東歩、「ヒト組織バンク」－手術摘出組織および組織由来細胞の研究利用－、第34回日本分子生物学会年会・ナショナル・バイオリソース・プロジェクト(NBRP) 展示、横浜、2011年12月13日～16日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

新鮮組織・細胞の供給システムの整備・ 新鮮組織から細胞を効率よく調製する方法の検討

所 属 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
研究資源バンク
研究代表者 吉田 東歩

研究要旨 新鮮組織・細胞の供給システムの整備のため、ニーズ調査を行い、少量の組織を高品質に保った状態で効率的に供給する方法を検討した。また倫理面を配慮の上、診療情報の提供を充実させた。滑膜組織から滑膜細胞、内臓脂肪組織から脂肪前駆細胞を効率よく調製する方法を確立した。

A. 研究目的

ヒューマンサイエンス(HS)研究資源バンクは、国内の研究機関や医療機関から収集した細胞株、遺伝子クローン、日本人由来 B 細胞株・DNA、ヒト組織の保管、増幅、品質管理を行い、産学官の研究者に分譲している。1995 年の設立以来、国内外の研究者から 27,996 件の分譲依頼を受け、74,674 試料を分譲した。

2001 年、国内自給型としては日本で初めてとなるヒト組織バンクをスタートし、手術摘出組織の研究資源化に取り組んできた。バイオマーカー探索研究を含む創薬研究には、疾患・病態を反映したヒト組織や対照となる正常組織が必須の材料となる。欧米では、移植不適合臓器を研究利用するためのヒト組織バンクや組織から細胞などに加工処理する企業が多数存在する。日本では医療機関から研究用ヒト組織の入手は極めて困難な状況にあり、主に手術摘出組織に限定されるため、得られる組織量は少ない。この限られた条件下で、ヒト組織を有効利用するための技術開発がバンク事業の利用拡大に必要である。また、国の倫理指針に基づき、適正なルールに従ってヒト組織を供給するバンク事業を充実させることは、我が国におけるヒト組織利用環境を向上させ、創薬の研究基盤の整備につながる。

今回の研究では、ヒト組織バンク事業を効率的に進めるための技術、特にヒト組織・細胞を高品質な状

態で供給するため、採取、保管、輸送、加工、品質管理に関する技術開発を行った。平成 23 年度は、バイオマーカー探索研究を含む創薬研究に必要とされる組織・細胞についてニーズ調査を行い、ニーズの高い試料についてヒト組織バンクで取り扱う対象になりうるか医療機関と協議した。また、バイオマーカー探索研究には、組織提供者である患者の診療情報が必須となる。連結不可能匿名化後、組織提供者の特定につながる情報を排除した上で、詳細な診療情報を添付することが、試料の有用性を高める。医療機関から提供可能な診療情報の充実を図るための検討を行った。ヒト組織を高品質な状態で供給するための保存・輸送法を検討し、手術摘出組織は提供される量が少ないため、効率よく新鮮組織から細胞に調製するための方法についても検討した。

B. 研究方法

1) ニーズ調査

創薬研究に利用するヒト組織・細胞について、HS 財団の一般事業委員会・研究資源委員会(製薬企業などの 14 社から構成)や各種学会・セミナーでの聞き取り調査、バンクへの問い合わせなどに基づきニーズを調査した。調査項目は、研究目的、ニーズの高い組織・細胞の種類、必要量、試料数、摘出後の処理法、提供者の診療情報などである。

2) 新鮮組織の供給体制

HS ヒト組織バンクで取り扱う対象は、手術摘出組織の病変部位(多くは癌)とその周辺の正常部位で、病理診断に不要とされ、本来廃棄(焼却)される組織とした。提供者は、重篤な疾病の原因となる病原体の感染について陽性でないことが条件で、梅毒、HBV、HCV、HIV が陰性であることを条件に受け入れた。

提供者へのインフォームド・コンセントでは、組織がHSヒト組織に提供され、様々な研究目的で産学官の研究者に譲渡されることを説明し、同意を得た。凍結組織、固定組織の場合、医療機関やバンクで保存が可能のため、HS 財団倫理審査委員会で試料ごとに個別審査を行い、承認後にバンクへの受け入れと研究機関へ譲渡を実施した。新鮮組織の場合は、事前審査で包括承認を得た上で、承認された範囲の事例のみ供給を実施し、事後に倫理審査委員会で事例報告した。供給に際して、手術数日前に医療機関から連絡を受け、バンクは複数の研究機関とマッチングを行い譲渡先を決めた。当日、バンク担当者が医療機関でヒト組織を受け取り、連結不可能匿名化処理を行った上、診療情報を記載したデータシートと一緒に研究機関まで組織を冷蔵輸送した。

3) 新鮮組織の輸送法、保存性

平成 23 年度に医療機関から提供された新鮮組織 50 試料について輸送後の組織の状態、利用結果を「ヒト組織受領書」および利用者からの聞き取り調査に基づき検証した。医療機関において、組織は摘出後、Hanks' balanced salt solution(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)で数回洗い、利用者が指定した各種保存液に浸漬し、冷蔵状態で輸送された。

輸送方法は次の2方法である。第1法は組織を浸漬したボトルを氷の入った保冷容器に収納し、バンク担当者が1~5時間以内で譲渡先に運送する。第2法は、宅配便を用いて約1日以内で譲渡先に運送する。輸送中の破損を防ぐため、組織は密閉性の高い収納ケースとアルミ製の外箱を用いた3重の包装とした。また、5°Cを長時間保持するため、氷は使用せず、-30°Cの保冷剤と5°Cの保冷剤(関東商事株式会社、商品名パーッサーモ)を組み合わせ使用した。

4) 新鮮組織から細胞の調製

滑膜細胞は以下の方法にて調製した。関節リウマチあるいは変形性関節症患者の人工関節置換手術、手関節形成手術で摘出された滑膜組織を Hanks' balanced salt solution で数回洗い、脂肪及び

腱組織を取り除いた後、1 mg/ml コラゲナーゼ I を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)中にて 37°C、2 時間処理を行った。分散処理後の組織を 250 μ m ナイロンフィルターでろ過し、細胞塊を取り除き、遠心後沈殿した滑膜細胞を採取した。滑膜細胞は 10%牛胎児血清を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、5%CO₂、37°C で培養した。継代には 0.25%トリプシン-0.02%EDTA を用いた。1 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、細胞凍結保存液(十慈フィールド製、セルバンカー)に懸濁し(約 5 x 10⁵ cells/ml/チューブ)、プラグラミング・フリーザーにて緩慢凍結(1°C/分)し、液体窒素タンクの気相(-160°C)にて保存した。

脂肪前駆細胞は以下の方法で調製した。消化器癌で摘出された内臓脂肪組織(腸間膜)を Hanks' balanced salt solution で数回洗い、眼科用ハサミで、血管や結合組織を取り除いた後、1mm 角に細切した。4 mg/ml コラゲナーゼ I を含む Phosphate-buffered saline 液(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B、10%牛血清アルブミン含有)中にて 37°C、振とう(80 サイクル/分)しながら細胞が分散するまで 30~60 分間処理した。分散処理後の組織を 250 μ m ナイロンフィルターでろ過し、細胞塊を取り除き、遠心後沈殿した脂肪前駆細胞を採取した。脂肪前駆細胞は 10%牛胎児血清を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、5%CO₂、37°C で培養した。継代には 0.25%トリプシン-0.02%EDTA を用いた。3 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、細胞凍結保存液(十慈フィールド製、セルバンカー)に懸濁し(約 5 x 10⁵ cells/ml/チューブ)、プラグラミング・フリーザーにて緩慢凍結(1°C/分)し、液体窒素タンクの気相(-160°C)にて保存した。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施した。ヒューマンサイエンス研究資源バンクにおいては、ヒト試料の取扱いに関してはヒューマンサイエンス振興財団・倫理審査委員会に諮り、試料ごとに上記の指針を踏まえた上での承認をうけて実施した。

また、ヒト試料の提供医療機関、供給を受ける研究機関でも機関内倫理審査委員会で承認を受けて実施した。ヒューマンサイエンス研究資源バンクで取り扱う対象は、外科手術等で摘出され、診断などに不要と判断された組織またはその組織に由来する試料とした。これらのヒト試料は、ヒューマンサイエンス研

究資源バンクに提供することについて提供者への十分な説明と同意のもとに、連結不可能匿名化などの個人情報保護に係る手続きを厳重に行った上で国内の医療機関から提供された。

C. 研究結果

1) ニーズ調査

創薬研究に利用するヒト組織・細胞についてのニーズ調査では、企業の研究部門別でニーズが異なった。探索スクリーニング部門、薬効評価部門、診断薬部門では、広範囲の組織の癌、病態、正常部位の利用希望があり、安全性部門、薬物動態部門では肝、小腸、腎臓の組織の正常部位、特に肝細胞やマイクロソームが必要とされている。製剤部門では、経皮吸収試験用の皮膚・粘膜の正常部位が必要とされている。研究用ヒト組織・細胞の入手に際し、製薬企業が希望する要件は、多種類が供給可能、1ロット当たりの量が多い、高品質、付帯情報が充実、入手手続きが簡単、低コスト、利用実績が多い、が挙げられた。

製薬企業では薬物代謝に関する人種差の研究ニーズはあるものの、特に日本人の組織の利用にこだわってはいない。わが国の場合、手術摘出組織がソースとなるが、これらは1回当たりの提供量が少なく、また、多ロットの入手が難しいことから、人種差よりも個体差が反映されると考えられ、製薬企業は研究利用に消極的であることも判った。また臨床試験を先ず米国で実施するケースも多いので、前臨床試験で必ずしも日本人由来肝組織や肝細胞・マイクロソームを使用する必要はないとの意見があった。

我が国でのヒト組織・細胞の研究利用に際しては、1998年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」により、組織提供医療機関での倫理委員会での審議以外に、仲介するバンクでの倫理審査委員会での審議及び研究機関における倫理審査委員会での審議を要するため、海外からのヒト組織入手に比べ、手続きに手間と時間がかかることも、国内のバンク利用が製薬企業において進まないことの一因となるとの意見があった。一方、海外からの輸入が困難な非凍結新鮮組織（癌を含む各種疾患及び正常組織）は国内バンクに期待する声が多かった。また、新鮮組織そのままの供給でなく、細胞分離や組織アレイの作製など創薬研究に直ぐに利用できるような加工処理済み試料も利用希望が高かった。

2) 新鮮組織の供給システムの整備

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、関西、関東地区の提携医療機関4施設から提供された新鮮組織（内臓脂肪、滑膜、皮膚、大腸、胃）を安定的に供給した（4-5例/月）。新鮮組織の供給では摘出から譲渡までの時間ができるだけ短いことが望まれる。平成23年度、新たに2医療機関（福井県、埼玉県）から新鮮組織の提供が可能となり、また、新規に変形性関節症患者由来の滑膜組織、良性腫瘍患者由来の皮膚組織、臍帯組織を新鮮組織として供給可能とし、譲渡を開始した。

平成23年度のバンクに提供された組織は50試料であり、組織の種類は、滑膜（非癌部位）26試料、大腸（癌/非癌部位ペア）3試料、胃（癌/非癌部位ペア）6試料、食道（癌/非癌部位ペア）1試料、内臓脂肪（腸間膜、非癌部位）2試料、皮膚（非癌部位）8試料、臍帯組織（非癌部位）4試料であった。提供者（50名）の内訳は、男性24%、女性76%で、女性の罹患率が高い変形性関節症あるいは関節リウマチ患者からの滑膜の提供例が提供数の約半数を占めたことから女性の比率が高まった。提供者の年齢の範囲は21~87歳で平均年齢は66歳であった。組織摘出後、組織を冷蔵処理までの時間は、1時間以内が95%を占めた。提供された組織量の平均値は約4グラムであり、米国で研究利用されている移植不適合臓器と異なり、手術摘出組織の提供量は少なかった。

3) 新鮮組織の提供についての倫理面の検証

医療機関では、凍結組織や固定組織の場合、患者が提供の同意を撤回することを可能性があることを想定し、手術成功後、退院をまってバンクへ提供する例が多い。医療機関にはできるだけ同意の撤回が可能な期間を長く確保したいという意思がある。新鮮組織の場合、医療機関からバンクへの提供が手術直後に実施されるので、提供の意志の撤回は手術前までとなる。新鮮組織の提供についてHS財団倫理審査委員会において検証し、インフォームド・コンセント文書の中で同意の撤回の時期を手術前までの説明文を加えた。分娩時に提供される臍帯組織の場合のインフォームド・コンセント文書については、出産を控えた両親に対して適切と考えられる平易な説明文書を医療機関と協議の上作成した。

4) 診療情報の提供

医療機関には提供者の診療情報などを記載した提供通知書の記載を依頼している。従来は以下の

診療情報について医療機関から情報の提供を受け、データシートとして利用者に提供してきた。1)患者背景(年齢、性別、人種、服薬情報、飲酒・喫煙歴、化学療法、放射線療法、免疫抑制療法、薬物中毒)、2)検査値(血液型、HBV 感染、HCV ウイルス感染、HIV 感染、梅毒感染、3)手術情報(手術診断名、部位、摘出組織、組織摘出時間)。今回、バイオマーカー探索研究に必須な患者の診療情報をリストアップし、医療行為に支障をきたさない範囲で、提供可能か否かを医療機関と協議した。その結果、平成 23 年度から以下の診療情報の提供が可能となった。内臓脂肪の提供の場合は、糖尿病など生活習慣病、BMI 値、空腹時血糖値、HbA1c 値、血中トリグリセリド値、LDL-コレステロール値。癌手術に伴う癌部位、非癌部位の提供の場合は、癌の組織型分類、バイオマーカー。滑膜の提供の場合は、生物学製剤の使用、バイオマーカー。

5)組織の保存・輸送方法

手術摘出組織は医療機関において、1時間以内で洗浄および保存液への浸漬が行われた。利用者から提出された「ヒト組織受領書」の記載項目である「組織の状態」によると平成 23 年度に譲渡された 50 試料は「良好」または「問題なし」であった。輸送方法として、皮膚(8 試料)と滑膜(1 試料)については、宅配便を用いて冷蔵状態にて約1日以内で運送した。残りの 41 試料については組織を氷の入った保冷容器に収納し、1~5 時間以内で輸送した。いずれも、輸送中の冷蔵状態は保持されており、破損などの品質劣化は認められなかった。良性腫瘍手術で摘出された皮膚(正常部位)の 2 例については、譲渡先で組織培養が行われ、約1週間で真菌感染のため使用不可になったとの報告を受けた。

6)細胞の調製

新鮮組織から滑膜細胞、脂肪前駆細胞を調製し、凍結チューブで譲渡するシステムを整えた。滑膜細胞については 17 名から提供された滑膜組織から調製し、全例において細胞が調製でき、17 ロットの凍結細胞チューブ 1,030 本を得た。内臓脂肪前駆細胞については 12 名から提供された内臓脂肪から 9 例において細胞が調製でき、9 ロット 243 本の細胞チューブを得た。3 例については、提供された組織量がいずれも 0.5g 以下であり、コラゲナーゼ処理、遠心後得られた細胞数が 2×10^5 個以下で増殖に至らなかった。なお、全例とも培養中での微生物汚染は認められなかった。

使用した滑膜は関節リウマチ患者由来が 11 例、変形性関節症患者由来が 6 例であった。人工関節

置換手術による摘出が 15 例、手関節形成手術による摘出が 2 例で、滑膜の部位は膝関節 13 例、手関節 2 例、足関節 1 例、股関節 1 例であった。提供者は女性 16 名、男性 1 名で、平均年齢は 72 歳(年齢の範囲は 60~84 歳)であった。提供された組織量は 1.0g ~25g の範囲で平均重量が 6.9g であった。3回の継代後、約 5×10^5 /ml/チューブの凍結チューブを平均で 61 本/ロット作製し、譲渡用試料として凍結保存した。

使用した内臓脂肪が提供された手術(全 9 例)は、S状結腸癌手術が 3 例、上行結腸癌手術が 3 例、直腸癌、横行結腸癌、食道癌手術による摘出がそれぞれ 1 例であった。提供者は男性 7 名、女性 2 名で、平均年齢は 68 歳(年齢の範囲は 41~83 歳)で、糖尿病に罹患している提供者が 1 名いた。BMI 値は肥満とされる 24 以上が 2 名、やせすぎとされる 20 以下が 3 名で BMI の平均値は 21 であった。内臓脂肪の部位は全例、腸間膜であった。提供された組織量は 0.5~8g の範囲で平均重量が 3.3g であった。1 回の継代後、約 2.6×10^5 /ml/チューブの凍結チューブを平均で 24 本/ロット作製し、譲渡用試料として凍結保存した。

滑膜細胞、脂肪前駆細胞とも解凍後の生細胞率は全ロットで 90%以上であり、再培養可能であった。微生物(真菌、細菌、マイコプラズマ)の否定試験においても陰性であった。細胞の機能性状もチェックし、品質上問題がないため、研究資源バンクホームページなどで譲渡開始を広報し、譲渡を始めた。

D. 考察

国内自給型のヒト組織バンク事業は国内初の試みであり、HS 財団倫理審査委員会の審議に基づいて慎重に業務を進めた。10 年余りの実績として、14 医療機関から手術摘出組織を 529 試料受け入れ、41 研究機関へ 491 試料を譲渡した。大きなトラブルはなかったが、譲渡は当初の想定数(年間 100 試料)を大きく下回った。この理由は研究機関が望むバンクに対するニーズと現状が乖離しているためと考えられた。本研究においては、ヒト組織・細胞に対する研究者のニーズ調査を行い、高品質のヒト組織・細胞を効率よく研究者に供給するためのシステムや技術について検討した。

ニーズ調査の結果、ヒト組織バンクに対して、研究者は広範囲の組織の癌、病態、正常部位を供給することを望み、安全性研究用の肝細胞やマイクロソームでは 1 ロットのスケールが大きいことも必須条件とした。手術摘出組織をソースとする国内のヒト組織バン

クではこれらの要求の全てに応えることは困難で、研究者は海外からの輸入に頼らざるをえない。一方、海外からの輸入が困難な非凍結新鮮組織(癌を含む各種疾患及び正常組織)は国内バンクに期待する声が多かった。培養細胞の調製用としては少量の組織量でも可能なことから、HS ヒト組織バンクでは新鮮組織の供給に注力することとした。さらに最近では次世代医療として注目される再生医療が徐々に実用化段階にシフトしつつあり、許認可のための試験環境の整備が急務と考えられている。ここでも、新鮮組織の供給体制の整備は必須である。また、2008年5月に開催された国際移植学会で「臓器取引に関するイスタンブール宣言」が採択され、移植用の臓器については自国内での自給自足の方向性が明示された。研究用ヒト組織についても、将来、海外からの輸入が困難になる可能性があり、国内医療機関で摘出されたヒト組織の収集・研究利用への要請が今後高まることが考えられる。

手術摘出組織の場合、形状、量、品質、処理方法などが試料ごとに異なり、実験者が求める均一性に欠ける。企業の研究所では、プロトコルが作りにくい系、研究結果やスケジュールの見えにくい系は受け入れられない傾向がある。新鮮組織そのままの供給でなく、細胞分離や組織アレイの作製など創薬研究に直ぐに利用できるような加工処理済み試料も利用希望が高かった。これらのニーズに応えるため、今回の研究において、滑膜細胞と脂肪前駆細胞をバンクで調製し、譲渡するための技術開発を行った。

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、関西、関東地区の提携医療機関4施設から提供された新鮮組織(内臓脂肪、滑膜、皮膚、大腸、胃)を安定的に供給した。運送の時間を短縮するためには、提供医療機関が各地に存在することが必要で、本年度からは福井県と埼玉県医療機関から提供が始まった。また、臍帯など新規に譲渡可能な組織を追加した。診療情報の提供を充実させ、新鮮組織の有用性を増加させ、新鮮組織の供給システムの整備を進めることができた。

HS ヒト組織バンクへ提供された組織量の平均値は約4グラムであり、米国で研究利用されている移植不適合臓器と異なり、手術摘出組織の提供量は少なかった。手術担当医が提供部位を決め、手術室近辺で冷蔵処理される例もある。提供には病理部門の協力が必要で、関東地区の医療機関の場合、病理医の協力(手術室に待機)を得ることにより、提供組織量が増加した例もあった。医師、病理医、臨床検査

技師、コーディネーターの方々にヒト組織バンク業務に対する理解を深め、協力を得られることにより、高品質の組織提供が可能となる。

今回、滑膜細胞と脂肪前駆細胞を少ない組織から効率よく調製する方法を確立した。欧米では組織から細胞を調製し、供給する企業が存在するが、国内には無い。国内で細胞を供給する事業を開始するためには、組織量の少ない手術摘出組織から効率よく細胞を調製するための技術開発が必要となる。また欧米で細胞調製用として利用される移植不適合臓器と手術摘出組織は摘出前後の処理法が異なるため、細胞の性状が異なる可能性がある。広く研究資源として供給するためには、高い品質をもつ細胞を調製する技術と品質管理法の開発が必要である。

E. 結論

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、関西、関東地区の提携医療機関4施設から提供された新鮮組織(内臓脂肪、滑膜、皮膚、大腸、胃)を安定的に供給した(4-5例/月)。平成23年度、新たに2医療機関(福井県、埼玉県)から新鮮組織の提供が可能となり、新規に変形性関節症患者由来の滑膜組織、良性腫瘍患者由来の皮膚組織、臍帯組織を新鮮組織として供給できるようにした。患者が試料をバンクに提供する意思を撤回する場合の期限などHS倫理審査委員会において検証し、臍帯の提供時のインフォームド・コンセント説明文書等を作成した。バイオマーカー探索研究に必要な患者の臨床情報について、医療機関の協力を得て、詳細な情報提供が得られるようになった。

新鮮組織から細胞を効率よく調製する方法の検討に関しては、これまでの関節リウマチ患者由来の滑膜組織からの滑膜細胞の調製に加えて、新たに変形性関節症患者由来の滑膜組織からの滑膜細胞の調製を開始し、計7例について実施した。医療機関から摘出組織の状態に関して入手した詳細な情報をもとに、滑膜部分のみを従来よりも効率よく分離し細胞調製することができた。調製細胞の一般的性状は、関節リウマチ患者由来の滑膜細胞と同等であり、研究資源化が可能であることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

吉田東歩、ヒト組織バンク、**Medical Technology**、(2011)、39: 518-519

2. 学会発表

大西-笠松 礼、小阪 拓男、佐藤 元信、吉田 東歩、手術摘出組織の研究利用－関節リウマチ患

者由来滑膜細胞について－日本組織培養学会・第 84 回大会、東京、2011 年 5 月 27 日

展示、横浜、2011 年 12 月 13 日～16 日

小阪 拓男、研究利用のためのヒト組織及び細胞の供給、第 32 回臨床薬理学会、浜松、2011 年 12 月 1 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

小阪 拓男、佐藤 元信、吉田 東歩、「ヒト組織バンク」－手術摘出組織および組織由来細胞の研究利用－、第 34 回日本分子生物学会年会・ナショナル・バイオリソース・プロジェクト (NBRP)

2. 実用新案登録
該当なし

細胞の高品質化の検討

所 属 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
研究資源バンク
研究分担者 佐藤 元信

研究要旨 研究資源バンクから供給するヒト細胞の高品質化を図るため、ウイルス否定試験の検討、滑膜細胞の炎症性サイトカイン反応性や脂肪前駆細胞の機能性状の解析、両細胞の間葉系幹細胞としての分化能確認等について研究した。

A. 研究目的

ヒト細胞は、創薬研究・医薬品開発の重要なツールである。本研究では、研究資源バンクが供給しているヒト細胞についてのウイルス等否定試験の検討、滑膜細胞・脂肪前駆細胞の機能的性状解析、分化能の検討などの多角的な研究を行い、バンクが供給するヒト細胞の品質の恒常性を保つと同時に、高品質化・付加情報を充実することにより、バイオマーカー探索研究をはじめとする我が国の創薬研究基盤を向上させることを目的とした。

1) ウイルス(HBV, HCV, HIV)及び梅毒否定試験

ヒト細胞を用いた研究においては、試料が病原体で汚染されていないことが要求される。バンクのヒト試料に関しては、提供者が重篤な病原体に感染していないことを医療機関で確認された試料を提供していただいている。本研究では、さらなる品質の向上のため、新鮮組織より調製した細胞或いはヒト由来細胞についてのウイルス等の否定試験系としてリアルタイム PCR 法の検討に着手した。今回はその中間報告で主に HBV 否定試験系について報告する。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

関節リウマチの臨床症状として関節滑膜の炎症が認められるが、その原因としてサイトカインによる炎症性反応の亢進、及び滑膜細胞の異常増殖等が示唆されている。本研究では当バンクで新鮮組織より調製した滑膜細胞において炎症性サイトカイン TNF- α に対する反応性について解析し、機能的性状に関する有用な情報を得た。今回はその中間報告である。

3) 脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導時の脂肪細胞特異的蛋白質発現解析

本研究では新鮮内臓組織より調製した脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を確認し、分化した細胞に特異な蛋白質として Adiponectin の産生について蛋白質レベルと遺伝子転写レベルにおいて検討した。また新規に糖尿病由来組織より調製した脂肪前駆細胞の性状についても検討した。今回の報告はその中間報告である。

4) 滑膜細胞及び脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討

滑膜細胞及び脂肪前駆細胞には、間葉系幹細胞の性状を示す細胞が存在することが知られており、再生医療のソースとして注目されている。そこで、バンク調製の滑膜細胞及び脂肪前駆細胞に関して、性状に関する付加情報を充実させるために、分化能について検討した。再生医療研究における組織由来間葉系幹細胞のソースとしての利用の可能性が考えられた。今回は検討結果についての中間報告である。

B. 研究方法

1) ウイルス(HBV, HCV, HIV)及び梅毒否定試験

HBV ウイルスの検出系として、リアルタイム PCR システム(StepOne Plus System, Presence/Absence Mode)を用いた。陽性対照には当バンク保有の HBV ゲノム DNA をもつプラスミド DNA (clone number : VG023)を用い、HBV ウイルス DNA 検出用のプロンプ/プライマーには TaqMan Gene Expression Assay (ABI) を用いた。PCR 反応は ABI 社のプロトコールに

従い、以下の条件で実施した。

反応組成: VG023 plasmid DNA 1 μ l (0.01 - 100 pg) 或いは sample DNA 1 μ l, TaqMan Gene Expression Assay (HBV 用) 1 μ l, TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μ l, 大塚蒸留水 8 μ l. 反応条件: 50°C, 2分 \rightarrow 95°C, 20秒 \rightarrow (95°C, 1秒 \rightarrow 60°C, 20秒) \times 40 サイクル、反応時間: 約 2 時間。ヒト不死化 B 細胞株 (PSC2038, PSC2040, PSC2049)由来のゲノム DNA は、譲渡用の精製 DNA を用いた。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

滑膜細胞を 24 時間通常培養後に無血清培地 (DMEM) と交換しさらに 24 時間培養した時点で、各種濃度の炎症性サイトカイン TNF- α (recombinant TNF- α , R&D Systems) を培養系に添加して、24 時間培養した。培養上清中の MMP-3 及び IL-6 量を ELISA (Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) により測定した。また細胞より総 RNA を抽出し (RNeasy Mini Kit, Qiagen)、逆転写反応により cDNA を合成してリアルタイム PCR 用の解析試料とした (Cell-to-Ct Kit, ABI)。リアルタイム PCR は以下の条件により実施した。リアルタイム PCR システム: StepOne Plus System, Quantitation-Comparative Mode。反応組成: cDNA 2 μ l, TaqMan Gene Expression Assay (human MMP-3 或いは human IL-6 用) 1 μ l, TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μ l, 大塚蒸留水 8 μ l. 反応条件: 95°C, 20秒 \rightarrow (95°C, 1秒 \rightarrow 60°C, 20秒) \times 40 サイクル、反応時間: 約 40 分。相対的 mRNA 発現量は human G3PDH を基準として求めた。

3) 脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導時の脂肪細胞特異的蛋白質発現解析

脂肪細胞への分化は 10%血清を含む PBM-2 培地 (Lonza) に 0.25 μ M デキサメサゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (IBMX), 0.1 mM インドメタシン、5 μ g/ml インスリン (ヒト・リコンビナント) を添加した培地で 3-4 日おきに培地交換しながら約 2 週間培養することにより実施した。脂肪細胞は、oil-red O で中性脂肪顆粒を染色することにより検出した。

脂肪細胞への分化誘導時の培養上清中の Adiponectin 量は ELISA (Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) により測定した。また細胞より総 RNA を抽出し (RNeasy Mini Kit, Qiagen)、逆転写反応により cDNA を合成して (Cell-to-Ct Kit, ABI) リアルタイム PCR 用の解析試料とした。リアルタイム PCR は以下の条件により実施した。リアルタイム PCR システム: StepOne Plus System, Quantitation-Comparative Mode。反応組成: cDNA 2 μ l, TaqMan Gene

Expression Assay (human MMP-3 或いは human IL-6 用) 1 μ l, TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μ l, 大塚蒸留水 8 μ l. 反応条件: 95°C, 20秒 \rightarrow (95°C, 1秒 \rightarrow 60°C, 20秒) \times 40 サイクル、反応時間: 約 40 分。相対的 mRNA 発現量は human G3PDH を基準として求めた。

4) 滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討

滑膜細胞についての脂肪細胞への分化誘導は、10%血清を含む DMEM に、0.25 μ M デキサメサゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (IBMX), 0.1 mM インドメタシン、5 μ g/ml インスリン (ヒト・リコンビナント) を添加した培地で 3-4 日おきに培地交換しながら約 2 週間培養することにより実施した。脂肪細胞は、oil-red O により中性脂肪顆粒を染色することにより検出した。

骨芽細胞への分化誘導に際しては、10%血清を含む DMEM に 10 mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml L-アスコルビン酸、0.1 μ M デキサメサゾン を添加した培地で 3-4 日おきに培地交換しながら約 3 週間培養することにより実施した。骨芽細胞分化の確認は、以下に示す、アルカリフォスファターゼ活性染色に従った。細胞を 4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で室温 5 分間固定、純水で洗い、0.25 mg/ml naphthol AS-BI phosphate, 0.25 mg/ml fast red violet LB salt in 0.1 M Tris buffer (pH 8.5) で室温、10 分間染色、水洗した。アルカリフォスファターゼ活性陽性細胞は赤く染色される。

(倫理面への配慮)

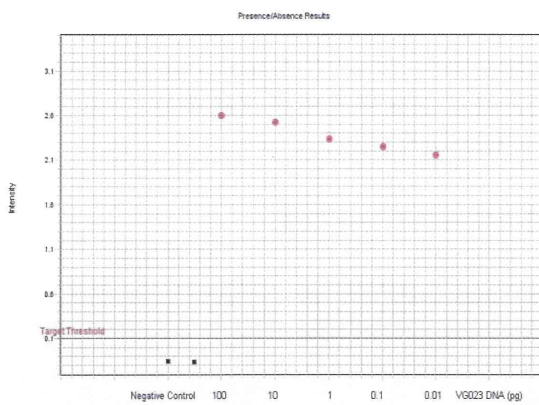
本研究はヒト由来細胞に関しては「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施する。研究代表者吉田及び研究分担者佐藤元信が所属するヒューマンサイエンス研究資源バンクにおいては、ヒト試料の取扱いに関してはヒューマンサイエンス振興財団・倫理審査委員会に諮り、試料ごとに上記の指針を踏まえた上での承認をうけて実施した。また、ヒト試料の提供医療機関、供給を受ける研究機関でも機関内倫理審査委員会で承認を受けて実施された。ヒューマンサイエンス研究資源バンクで取り扱う対象は、外科手術等で摘出され、診断などに不要と判断された組織またはその組織に由来する試料である。これらのヒト試料は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクに提供することについて提供者への十分な説明と同意のもとに、連結不可能匿名化などの個人情報保護に係る手続きを厳重に行った上で国内の 14 医療機関から提供された。

C. 研究結果

1) ウイルス(HBV, HCV, HIV)及び梅毒否定試験

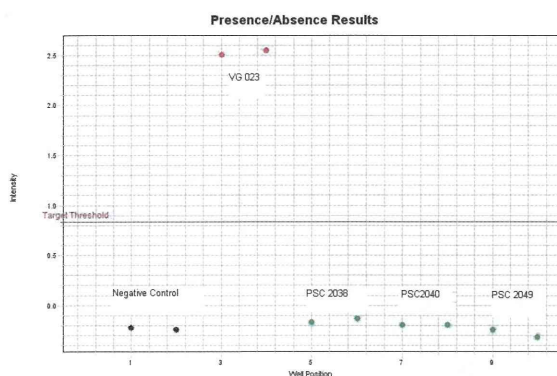
ヒト由来細胞のウイルス否定試験として、リアルタイム PCR 法による検出系を検討した。HBV ウイルスの検出系として、遺伝子バンク保有の HBV ゲノム DNA をもつクローン(VG023)を陽性対照に用い、HBV ウイルス用の TaqMan Gene Expression Assay により、リアルタイム PCR (StepOne Plus System, Presence/Absence Mode)を行った結果、良好な陽性反応が検出された(図 1)。VG023 の DNA 量は 0.01 から 100 pg までの範囲で Presence (赤○)と判定された。

【図 1】陽性対照実験



次に実際にヒト由来試料として当バンク保有のヒト不死化 B 細胞株 3 株 (PSC2038, PSC2040, PSC2049)について、精製 DNA を用いて検出実験を行った結果を示す(図 2)。陽性対照(VG023)の判定が Presence (赤○)となる測定条件下において、PSC 3 株 (緑○)はいずれも陰性対照 (黒○)と同様に Absence と判定され、HBV ゲノムは検出されなかった。以上のようにヒト不死化 B 細胞株 3 株について HBV ウイルスによる感染は否定された。

【図 2】HBV ウイルス感染否定試験

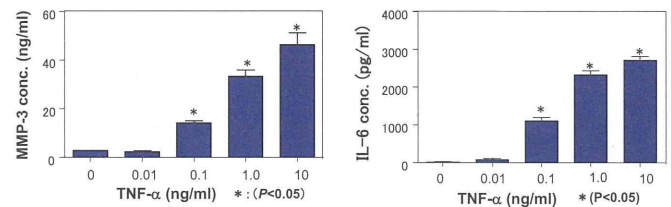


当バンクで新鮮組織から調製した滑膜細胞(計 17 ロット)及び脂肪前駆細胞(計 9 ロット)についても、ゲノム DNA を調製し、検討中である。梅毒菌感染否定用としても、同様の検出系を設定中であり、陽性対照実験において良好な結果を得ている。また HCV 及び HIV 感染否定試験としては、RNA 逆転写反応及び合成 DNA を陽性対照とするリアルタイム PCR による検出系の構築に着手した。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

関節リウマチ(RA)患者の滑膜組織より調製した滑膜細胞の機能的性状として、炎症反応性について調べた。各種濃度の炎症性サイトカイン TNF- α を培養系に添加して、培養上清中の MMP-3 と IL-6 の産生を ELISA により測定した結果、TNF- α の濃度依存的に MMP-3 及び IL-6 量の増加が認められた。代表的結果を以下に示す(図 3)。現在譲渡可能な関節リウマチ由来の 11 ロット及び変形性関節症患者由来の 6 ロットの滑膜細胞についても同様の炎症反応性を確認した。

【図 3】滑膜細胞における炎症反応



この反応性について、通常の RT-PCR 法による解析した結果、mRNA の転写レベルでの制御であることが推測された。そこでさらに mRNA 発現レベルの変化に関してリアルタイム PCR により詳しく解析した結果、TNF- α 刺激時に MMP-3 及び IL-6 の mRNA 量の明確な上昇効果が認められたことから、この反応性は転写促進によることが判明した(図 4)。

【図 4】炎症反応の転写レベルでの調節

