

201108007A

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 23 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

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

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 23 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

平成 24 (2012) 年 5 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 ----- 1
研究代表者 後藤雄一

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 ----- 7
後藤雄一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所
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 ----- 9
西野一三 国立精神・神経医療研究センター神経研究所
3. 医療機関内ヒト組織採取・提供システムの検討 ----- 13
小林真一 昭和大学医学部薬理学
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 ----- 27
熊井俊夫 聖マリアンナ医科大学薬理学
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 ----- 31
大段秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科
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 ----- 37
橋本有弘 国立長寿医療研究センター研究所
7. 効率の良い初代ヒト培養細胞の不死化法の開発 ----- 43
清野 透 国立がん研究センター研究所

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 49

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 55

I. 総括研究報告

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

主任研究者 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1200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。さらに筋芽細胞からiPS細胞を樹立することに成功した。一方、肝組織、肝細胞については、聖マリアンナ大学、昭和大学、広島大学の3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。

分担研究者

- (1) 西野一三 国立精神・神経医療研究センター
- (2) 小林真一 昭和大学医学部薬理学
- (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

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（国立精神・神経医療研究センター、国立がん研究センター、国立長寿医療研究センター）

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) 筋芽細胞からのiPS細胞の樹立（国立精神・神経医療研究センター）

筋芽細胞に、山中4因子をレトロウイルス、センダイウイルス、エピソーマルベクターなどを用いて導入して、iPS細胞を樹立する。

- 4) 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、昭和大学、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。

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

昭和大学においては、分担研究者が異動したことに伴い、新たな共同研究機関として、肝組織材料の有効活用のシステムをさらに充実させる。

広島大学においては、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. 肝組織における薬物代謝酵素、トランスポーターの発現、機能解析（昭和大学、聖マリアンナ大学）

肝組織からmRNA, タンパクを調整し、DNA メチル化（聖マリアンナ医科大学）、CYP やトランスポーターのmRNA 発現、タンパク量を調べた。

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 23 年 12 月末現在で、総凍結筋は 12,743 検体に達した。2007 年、2008 年、2009 年、2010 年、2011 年の凍結筋検体増加数は、それぞれ 531 検体、542 検体、597 検体、636 検体、660 検体であった。新規検体数は、過去 5 年間毎年過去最高を記録しており、過去 2 年間は 600 検体を越えている。

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、その数は 1207 検体に達した。

また、本レポジトリの筋培養細胞を活用して、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療法開発研究も行われた。縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーは、1981 年に本レポジトリを活用し、世

界に先駆けて、その疾患概念が報告された疾患である。

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。

DMD 患者筋由来初代培養について、不死化後のフローサイトメトリーによる、筋細胞の純化を試みた。不死化された DMD1 培養細胞集団に含まれる NCAM 陽性細胞をフローサイトメトリー（第一回目）によって検出したところ、0.1%以下であることが明らかになった。そこで、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。

3) 筋芽細胞からの iPS 細胞の樹立

山中 4 因子を、レトロウイルスを用いた方法、エピソームベクターを用いた方法、センダイウイルスを用いた方法のいずれでも、筋芽細胞からの iPS 細胞の樹立に成功した。

4) 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。

昭和大学では、手術時に摘出された肝臓および小

腸のうち、以降の診療、診断に影響を及ぼさない範囲の部位を医学研究に広く利活用するための説明文書および同意書を作成した。同意説明文書には絵や図を適宜取り入れ、対象患者に理解しやすいよう配慮した。また、専門的な語句や内容は極力入れず、組織を用いた研究の必要性和組織の提供に限っての説明とし、医師の負担および術前の患者や家族への肉体的、精神的負担を可能な限り軽減できるよう考慮した。説明文書の作成は実際に説明を行う医師と協力して行った。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。

広島大学では、平成21年～23年で肝組織検体15例、肝細胞8例をHS財団(HSRRB)に提供した。

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、合計で8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。

今年度は「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を開始し、現時点では14症例が登録された。

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、筋芽細胞からのiPS細胞の樹立は研究成果である。

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最終年度である平成23年度において、セルソーターを用いる方法で純粋化に成功した。ただし、その手順が複雑で手間のかかることから、純水化すべき筋芽細胞を慎重に選ぶ必要が生じる。不死化細胞のパネルを作成するにはこの点の更なる改良を必要とする。

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としたが、現実には達成できていない。

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。HSRRB側も提供を希望する組織が、感染症のない症例かつHIV検査も行った症例しか受け入れない問題点がある。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。

一方で、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。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。

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。骨格筋に関しては、世界有数の数と質を兼ね備えた研究資源が確保できている。さらに限られた疾患ではあるが、不死化細胞やiPS細胞も確保できている。これらを広く研究者に提供することで世界の科学研究に貢献できるものと期待される。

また肝組織、肝細胞に関しては、本研究で構築された IC フォームや試料採取の手順の整備が、今後活用できる。そのノウハウを医薬基盤研究所や HS 財団が担うことが必要である。

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や iPS 細胞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る。平成 23 年度から動き始めた 6 ナショナルセンターバイオバンク連絡協議会の指導の下に、提供の重要性を重視した活動が望まれる。これにより、筋疾患に関しては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、オールジャパンとして試料を集める組織を構築することが不可欠であると考えられる。そのためにはナショナルセンター、大学などを巻き込んだ研究資源ネットワーク事業を立ち上げることが必要であろう。さらに HS 財団では取り扱われない肝癌などの感染組織の収集と利用などの研究者のニーズにあった試料採取と利用に最大限配慮してゆくことがヒューマン・リソースを用いた医学研究にとって重要である。

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。

研究者のニーズに合った科学的妥当性があるヒト研究資源を確保する事業は今後の医学研究において不可欠であり、薬物開発やバイオマーカー探索などで諸外国と先を争う競争においても我が国の研究基盤として最重要課題である。

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

Ⅱ. 分担研究報告

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

分担研究課題 神経筋疾患患者筋芽細胞の樹立と利用に関する研究

分担研究者 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 12 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 21 年末現在）ですでに 1104 検体となっていた。平成 23 年（1 月から 12 月まで）に 103 検体を追加し、総計 1207 検体となった。今年度は、筋芽細胞からの iPS 細胞の樹立の検討を行った。

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な保存・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、不死化、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。

また今年度は当センターに保存されている豊富な筋芽細胞から iPS 細胞を樹立できるかどうかを検討した。これにより、特に心筋病変を合併する筋疾患の心症状病態解明に寄与できるものと期待できる。

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. 筋芽細胞からの iPS 細胞樹立の試み

山中 4 因子をレトロウイルス、エピソーマルベクター、センダイウイルスを用いて、iPS 細胞を樹立できるかどうかを検討した。

（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。

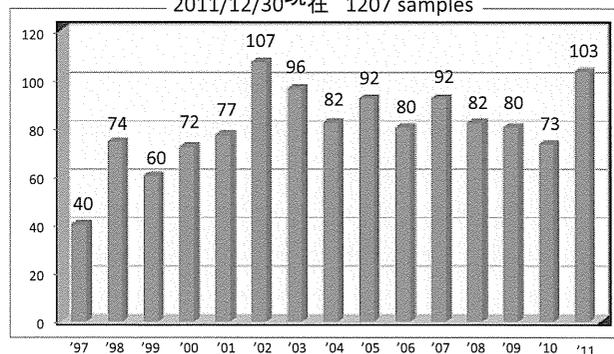
C. 研究結果

1. 筋芽細胞登録の推進と研究者への供与

平成 23 年 1 月～12 月までに新たに 103 検体の筋芽細胞の樹立を行った（総数で 1207 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

2011/12/30現在 1207 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。

ミトコンドリアミオパチーに関しては生化学

検査の必要性から培養細胞を樹立する頻度が高く、総数で 200 例近くまで達している。

保存されている筋芽細胞の内訳

筋ジストロフィ		286	
DMD	87	} Total 1207 (2011.12.31)	
BMD	39		
LGMD	69		
FCMD	19		
OPMD	11		
Others	61		
神経原性筋萎縮症		45	
ミトコンドリアミオパチー		198	
遠位型ミオパチー		33	
先天性ミオパチー		104	
その他		221	
診断不明		251	
未診断		69	

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）、Ducchnne 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）、ミトコンドリアミオパチー（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. 筋芽細胞からの iPS 細胞の樹立

山中 4 因子をレトロウィルスを用いた方法、エピソーマルベクターを用いた方法、センダイウィルスを用いた方法のいずれでも、筋芽細胞からの iPS 細胞の樹立に成功した。

D. 考察

筋芽細胞からの iPS 細胞の樹立によって、当センターに保存されている豊富な疾患の iPS 細胞が得られることになる。

この iPS 細胞を用いることで、1) 心筋細胞への分化を促し、その病態にせまることが可能になる可能性がある。また 2) すでに筋芽細胞から、脂肪細胞、骨細胞、軟膏細胞への分化誘導が可能なが明らかにされていることから、多くの筋ジストロフィーにおける骨格筋の消失と脂肪変性に対する新たな治療研究の研究資源になり得るものとして興味深い。

E. 結論

登録培養細胞の数は順調に伸び 1100 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、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
2. 学会発表
- 1) 後藤雄一：ミトコンドリア病。第 2 回遺伝カウンセリング研究会、相模原、7.17、2011
- 2) 後藤雄一：ミトコンドリア病の基礎と臨床。第 114 回日本小児科学会、東京、8.13、2011
- 3) Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS: Protein turnover in regulation of mitochondrial DNA copy number and gene expression. The eighth European Meeting on Mitochondrial Pathology, Zaragoza, Spain, 6.20-23, 2011
- 4) Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with the m.3302A>G mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep.4, 2011

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（創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業））
 分担研究報告書

分担研究課題名「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」

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 600 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 2011 年 12 月末までに 12743 検体となった。2011 年分の凍結筋増加数は 660 検体で、過去最高であった。1997 年より、培養筋の保存も開始し、2011 年 12 月末までに 1240 検体となった。2011 年の培養筋増加数は 103 検体であった。本レポジトリを活用し、多くの重要な研究成果が発表されてきている。平成 23 年では 32 報 (PubMed 掲載誌のみ・総説含む) の論文が発表され、医学の発展に大きな貢献をなした。特に、ミトコンドリア構造異常を伴う新たな先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子の同定は特筆に値する。また、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー患者由来の培養筋芽細胞を用いて、よりシアル化回復効果の高い合成糖を見出した。

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 (2011 年 11 月からはトランスレーショナル・メディカルセンター臨床開発部) 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。本筋レポジトリ活用の実態を明らかにし、その有用性を検討する。

B. 研究方法

筋レポジトリの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、

明らかにする。

(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・神経医療研究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、2011 年 12 月 31 日までの凍結筋総検体数は、12743 検体に達した。

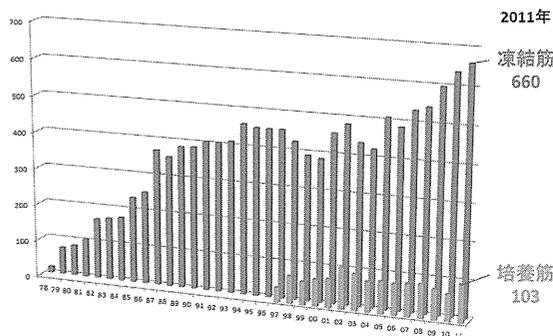
2007 年、2008 年、2009 年、2010 年、2011 年の凍結筋検体増加数は、それぞれ 531 検体、542 検体、597 検体、636 検体、660 検体であった。新規検体数は、過去 5 年間毎年過去最高を記録しており、過去 2

年間には 600 検体を越えている。



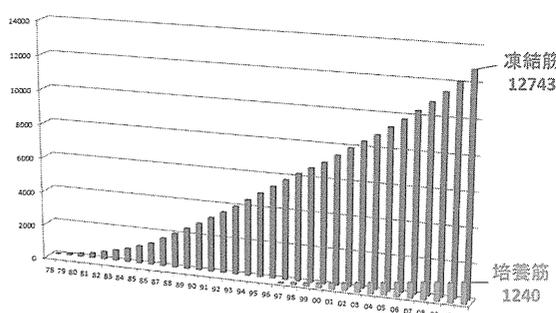
筋レポジトリー新規検体数

2011年12月31日現在



筋レポジトリー蓄積検体数

2011年12月31日現在



【レポジトリーの活用】本筋レポジトリー検体を活用した研究の論文発表数は、2011年一年間にPubMed掲載誌で32報であった（総説を含む）。

その中で、ミトコンドリア構造異常を伴う先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子同定が特筆に値する。本疾患は、1998年に本レポジトリーの中の4例について特異なミトコンドリア形態を呈する新たな先天性筋ジストロフィーとして報告されていたものである。今回、本疾患が骨格筋・心筋内でフォスファチジルコリン合成経路の最初の段階を触媒するコリンキナーゼβをコードする*CHKB*の機能喪失型変異によることが明らかとなった。

また、本レポジトリーの筋培養細胞を活用して、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療法開発研究も行われた。縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーは、

1981年に本レポジトリーを活用し、世界に先駆けて、その疾患概念が報告された疾患である。本疾患は、シアル酸合成経路の律速酵素をコードする*GNE*遺伝子変異を原因としており、そのため、患者は低シアル酸状態にある。国立精神・神経医療研究センターでは、これまでにモデルマウスの開発を経て、シアル酸またはその前駆体であるManNAcによる根本的治療開発の可能性を示してきた。しかし、単純なシアル酸やManNAcの投与では十分なシアル酸回復効果を得ることができないという問題点があった。そこで、本レポジトリー内の縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー患者由来の培養筋芽細胞を用いて、よりシアル酸増強効果の高い合成糖を探索した。その結果、ManNAcのアセチル化体が比較的低濃度で高いシアル酸増強効果を示すことが明らかとなった。

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。2011年を含め、5年連続で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。

【レポジトリーの活用】2011年にはPubMed掲載誌だけでも32報の論文が発表され、医学の発展への寄与は大きい。本報告書で事例として挙げたミトコンドリア構造異常を伴う先天性筋ジストロフィーや縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーなど、初期には、本レポジトリーを用いて、疾患概念が提唱された疾患である。一方、現在は、原因遺伝子同定や治療法開発にさらにレポジトリーが活用されている。すなわち、本筋レポジトリーは、文字通り、疾患概念の確立から、病因・

病態解明、さらには、治療法開発にまで広く活用されているということになる。

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。2011年を含め、5年連続で過去最高の新規検体数を記録し、更なる充実が図られた。

【レポジトリーの活用】疾患概念の確立から、病因・病態解明、さらには、治療法開発にまで広く活用されている実態が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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*. 69(6): 1005-1013, Jun, 2011.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 88(6): 845-851, Jun, 2011.

Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Karahashi M, Koumura T, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S, Sher RB, Nakagawa Y, Manfredi G, Goto YI, Cox GA, Nishino I: Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy. *Hum Mol Genet*. 20(19): 3841-3851, Oct, 2011.

Mitsuhashi S, Nishino I: Phospholipid synthetic defect and mitophagy in muscle disease. *Autophagy*. 7(24): 1559-1561, Dec, 2011.

Furusawa Y, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, Sakamoto C, Wakita M, Kobayashi Y, Fukumoto Y, Oya Y, Fukuda T, Sugie H, Hayashi YK, Nishino I, Nonaka I, Murata M: Effects of enzyme replacement therapy on five patients with advanced late-onset glycogen storage disease type II: a 2-year follow-up study. *J Inher Metab Dis*. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

なし

H. 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

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

「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」

分担研究課題名 医療機関内ヒト組織採取・提供システムの検討

研究分担者 小林 真一 昭和大学医学部薬理学（臨床薬理学部門）

研究要旨

これまで昭和大学では、肝癌患者より手術時に切除された肝組織の余剰部位を研究に有効利用するためのシステムを確立してきた。このシステムを拡充し、これら試料をさらに幅広い研究に利用できるようにするため、また、肝臓のみならず小腸を含めた他の組織についても同様に、本来廃棄される部位を研究に有効利用することを目的とし、説明文書および同意書を新たに作成した。また、得られた試料に付加価値をつけるため、薬物代謝酵素やトランスポーターの発現量および機能解析を行った。薬物代謝酵素は医薬品代謝に重要なCYP3A4、UGT1A1およびこれらの転写調節因子について検討した。また、薬物トランスポーターはhOAT2の発現量を検討した。その結果、いずれにおいても個人差が認められた。これら試料は研究者の目的に合わせて提供することが可能であり、利用価値が高いものと考ええる。本システムの確立により、ヒト組織を用いた研究が進み、日本人の疾患の原因解明や医学の発展に貢献し得るものと考ええる。

A. 研究目的

これまで多くの医学研究において、ヒトと動物には種差が存在することが明らかにされており、動物で得られたデータをヒトに外挿するのは容易ではないことが指摘されている。そのため、ヒト組織を用いた研究を行うことが重要であるが、我が国においては、移植不適合の肝組織を研究に用いることは法的に認められておらず、米国など海外から輸入し利用しているのが現状である。しかし、人種間では遺伝的因子、食事、生活環境などが異なることから、日本人の医療に貢献するためには、日本人の組織を用いた研究が必須である。これに対し、現在のところ、手術時

に摘出された組織の一部を用いることが唯一の手段となっている。

これまで昭和大学では、肝癌患者より手術時に切除された肝組織について、以降の診療、診断に影響を及ぼさない範囲の部位を研究に有効利用するためのシステムを確立してきた。これら試料を用いて薬物代謝酵素やトランスポーターの変動を検討し、肝臓癌患者に特有な遺伝子の変異および活性や機能の変化を見出している。また、平成12年より財団法人ヒューマンサイエンス振興財団への肝組織の提供も実施している。試料の採取に関しては外科および病院病理科の協力を得て組織的に行っている。

これら肝組織の利活用は上記の研究計画に対して倫理委員会の承認を得ており、余剰分の試料について、公共バンクへの提供を対象患者に説明し、同意を得ている。しかし、得られた試料をさらに有効利用するためには広い研究分野で使用可能にすることが必要である。その際に対象患者に説明する医師の負担や患者の不安、混乱を避けるためには、提供される試料を幅広い種々の研究に活用できるよう、より簡潔で理解しやすい同意説明文書を用いることが重要である。また、肝組織については既にシステムが安定的に機能しているが、医学・医療の発展のためには、肝臓のみならず小腸を含めた他の組織についても、手術時に得られ、廃棄されている部位を有効に活用することが必要であると考ええる。

そこで今回、本研究事業においては、手術時に摘出された肝臓、小腸などについて、これまでのシステムをさらに拡充させ、幅広い研究に有効利用するためのシステムを確立することを目的とした。また、学内のみならず、公共バンクへの提供も考慮し、各試料に付加価値をつけるため、薬物代謝酵素、トランスporterなどの発現や機能の解析を行った。本システムの確立により、ヒト組織を用いた研究がより活発に行われ、日本人の疾患の原因解明や医学の発展に貢献し得るものと考ええる。

B. 研究方法（倫理面の配慮含む）

1) ヒト組織提供に対する同意説明文書・同意書の作成

これまで我々は、肝部分切除術を受ける肝癌患者を対象に、肝臓癌と薬物代謝酵素、薬物トランスporterとの関連性について研究計画を説明し、同意が得られた場合には、

外科および病院病理科と連携して試料を採取し、研究を遂行してきた。そこで今回は、このシステムを利用し、特定の研究に限らずさらに幅広い研究分野でこれら貴重な試料を活用できるようにするため、また、肝臓のみならず小腸など他の組織に対しても同様のシステムを確立するため、同意説明文書および同意書を新たに作成した。ただし、試料の採取に対して対象患者に説明し同意を得るが、これらの試料を用いて新たに研究を行うときには、改めて研究計画書を作成して倫理委員会あるいはゲノム委員会に申請し、承認を得ることを前提とした。

倫理面への配慮

対象者本人（または代諾者）に同意説明文書を用いて説明し、十分納得したことを確認した後に文書による同意を得ることとする。研究への参加は、対象者あるいは代諾者の自由意思により決定され、同意しない場合においても治療内容を含め、いかなる不利益を被ることもないことを説明する。承諾を得た場合には、3枚複写式の同意書に署名をもらい、1枚は本人（代諾者）に渡し、1枚はカルテに添付、もう1枚は個人情報管理者が保管する。

個人情報は独立した移動電子媒体で保管する。また、各試料に対し、個人情報管理者より連結可能匿名化を行う。連結可能匿名化を必要とする理由は、同意した後の同意撤回に対応するためであり、提供者の意思を反映できる体制を最大限に維持するためである。また、試料の一部を公共バンクに提供する同意が得られた場合には、提供分については連結不可能匿名化を行う。しかし、公共のバンクへ提供した場合には、連結不可能匿名化を行うため、退院後は同意の撤回ができないこ

とを併せて説明する。

2) 薬物代謝酵素、トランスポーターの発現および機能解析

本研究では、現在、研究用試料として保存している肝試料に付加価値をつけるため、臨床において重要な薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現と機能を解析した。

①薬物代謝酵素

マイクロソーム画分は常法に従ってヘモグロビンを除去し、抽出した。蛋白量は Lowry 法により定量した。また、総チトクローム P450 (CYP) 含量は Omura と Sato の方法に従い測定した。

本研究では、多くの医薬品代謝に関与する CYP3A4、抱合反応に重要な UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT)、およびそれらの転写調節因子 (核内受容体) である CAR、PXR、RXR α 、GR に着目し、個体差について検討した。CYP3A4 活性はテストステロン 6 β 水酸化を指標に TLC 法で測定し、UGT1A1 活性はグルクロン酸を基質として比色定量した。また、mRNA 発現量は real-time PCR 法により GAPDH を指標として測定した。

また、CYP は δ -アミノレブリン酸合成酵素 (δ -ALA) により生合成され、ヘムオキシゲナーゼ (HO) により分解されることが明らかにされているため、これら2つの酵素 mRNA 発現量についても同様に検討を行った。

②薬物トランスポーター

医薬品の生体膜通過には有機陰イオン薬物トランスポーター (OAT [*SLC22A*]) が重要であるが、なかでもヒト型 OAT2 は、肝実質細胞の sinusoid 側膜に存在し、血中の医薬品を肝細胞内へ取り込む分子として重要な役割

を果たすと考えられている。そこで本研究では、hOAT2 (hOAT2 [*SLC22A7*]) mRNA 発現量について real-time PCR 法で検討した。

C. 研究結果

1) ヒト組織提供に対する同意説明文書・同意書の作成

手術時に摘出された肝臓および小腸のうち、以降の診療、診断に影響を及ぼさない範囲の部位を医学研究に広く利活用するための説明文書および同意書を作成した。同意説明文書には絵や図を適宜取り入れ、対象患者に理解しやすいよう配慮した。また、専門的な語句や内容は極力入れず、組織を用いた研究の必要性と組織の提供に限っての説明とし、医師の負担および術前の患者や家族への肉体的、精神的負担を可能な限り軽減できるよう考慮した。説明文書の作成は実際に説明を行う医師と協力して行った。

本研究に対して、現在、昭和大学医の倫理委員会に申請中である。

2) 薬物代謝酵素、トランスポーターの発現および機能解析

①薬物代謝酵素

今回、12名の患者より得られた肝試料を用いて薬物代謝酵素の個体差を検討した。その結果、患者間で総CYP含量は最大 10 倍程度の差異を示し、さらにCYP3A4 mRNA 発現量には最大約8倍程度の個人差が認められた。

また、転写調節因子 (核内受容体) の mRNA 発現量について検討した結果、総CYP含量が高くCYP3A4 mRNA 発現量が低い患者では、CAR, PXR, RXR α の発現量が低いことが明らかになった。一方、CYP含量が低くCYP3A4 mRNA 発現量も低い患者では、GR mRNA 発現量が高いことが示された。

そこでCYPの生合成に関与する δ -ALAと、分解に関与するHOのmRNA 発現量を検討したところ、 δ -ALA mRNA 発現が高い患者、あるいはHO mRNA 発現量が高い患者であっても、必ずしもCYP含量が高いわけではないことが明らかとなった。

②薬物トランスポーター

hOAT2 (hOAT2[*SLC22A7*] mRNA発現量について7名の患者より得られた肝試料を用いて検討した。その結果、最大約7倍程度の個人差が認められた。

D. 考察

本研究の目的をふまえ、肝および小腸試料の提供を受けるための同意説明文書、同意書の作成を行った。これまでの肝癌患者を対象に特定の研究に対して説明するのではなく、あらゆる医学研究に対して試料の提供をお願いすることが大きな違いであるが、専門的な内容や個々の使用目的に対する記載をなくしたため、以前のものとは比べてより簡単で理解しやすいものとなったと考える。一方で、試料を何に使われるかわからないといった不安や疑問を提供者に抱かせないよう、事前に十分な説明と理解を求めることが重要である。

ヒト試料に付加価値を付けるために、本研究では薬物代謝、トランスポーターのなかでも臨床において特に重要な CYP3A4、UGT1A1 および有機陰イオン薬物トランスポーター (hOAT2) に着目し、検討した。本研究のように、個々の患者より得られる試料を用いて多角的な検討を行った研究はほとんど報告されていない。従って、今後、これら試料毎の特徴を利用することで、それぞれの分野の研究者の目的に合わせたヒト試料を提供で

きると考える。

すなわち、

1. CYP やトランスポーター発現の個人差や発現調節機構を分子レベルで研究する良いツールとなる。
2. 遺伝子多型と発現量との関係が明らかになれば、そのパターンから各 CYP やトランスポーター発現量をある程度予測することができる。
3. 蛋白量・多型・mRNA 量・代謝活性（輸送活性）との関係を明らかにできる。
4. *Ex vivo* における輸送活性を測定すれば、体内での薬物輸送を mimic できる。など、研究範囲の拡大につなげることが期待できる。

また、今後、これまでの肝臓に加え、小腸や腎臓を有効に利活用することが可能になれば、研究試料として価値が高く、さらに医学の発展に貢献しうるものと考ええる。

E. 結論

本研究では、手術時に摘出された肝臓のみならず、小腸などの組織についても、これまでのヒト試料研究利用システムをさらに拡充させ、様々な研究に広く有効利用できるようにするため、新たに同意説明文書・同意書の作成を行った。

また、得られた試料に対し、臨床において重要な薬物代謝酵素および薬物トランスポーターに着目し、mRNA 発現および機能の解析を行った。その結果、これら試料の特徴を示す重要な付加価値を付けることができた。これにより、各研究者の目的に合わせた試料を提供することが可能であると考ええる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

手術をされる患者さんへ



この冊子は、昭和大学病院で手術をされる患者さんに手術で摘出された組織の一部を研究使用のためにご提供いただくための説明書です。これから説明する内容を十分に理解して、よくお考えになったうえでご提供いただけるかをあなたの自由な意思で判断してください。お断りになっても、そのために不利益を受けることは一切ありません。内容についてわからないことや不安に思うこと、お聞きになりたいことがありましたら、いつでも遠慮なくお尋ねください。

昭和大学病院