

1. 研究の必要性

☆あなたの組織は明日の医療に役立ちます

現在、病気の診断や治療薬など医療は少しずつ進歩しています。昔は治らなかった病気（結核など）が今では治るようになったり、安全に手術ができるようになったりしています。しかし、残念ながら治療法の見つからない病気も多くあり、苦しんでいる患者さんも大勢います。そのような病気を克服するためには、病気の原因を明らかにし、治療法を探し出すこと（医学研究）が必要なのです。つまり、医学研究とは今よりもっと優れた医療を患者さんに提供するために必要な仕事なのです。

[動物とヒトとはたくさんの違いがあります]

動物実験で効き目があった薬でも私たちヒトには効き目がなかったり、思わぬ副作用が現れたりすることがあります。そこで、新しい医療を、より安全に、より早く実現させるには、ヒトで起こることを予測することが必要となり、そのためにヒトの組織を用いた研究が行われています。例えば、ヒトの肝臓のごく一部を用いて、薬の分解しやすさや、飲み合わせの悪い薬があるかを予測したり、病気の組織を用いて、その病気の原因を調べるなど、ヒトの組織を用いた研究は医療の様々な手がかりを得るのに重要な役割を果たしています。

[日本人と外国人にも違いがあります]

最近、同じ人類でも日本人と白人では、目や皮膚の色が違うように、病気のかかりやすさや薬を分解する力に違いがあることがわかってきました。つまり、私たち日本人にあった、より良い医療を作るには、日本人の組織を用いた医学研究が必要なのです。

[ひとりひとりのヒトにも違いがあります]

同じ日本人でも、ひとりひとり顔が違うように、薬の効き方や副作用、病気のなりやすさが違います。この違いは体質と環境（生活習慣）で決まると考えられています。この体質を決めているのが遺伝子で、兄弟でも遺伝子に微妙な違いがあるため、違う体質を持つのです。この遺伝子の違いと体質の関係を明らかにできれば、遺伝子の違いごとに治療法や予防法、病気のなりやすさを見つけることが出来ると考えられています。このように、遺伝子の違いごとにタイプ分けして、ひとりひとりにあった医療（オーダーメイド医療）を行うことが世界中で目標とされ、そのための研究（遺伝子解析研究）が広く行われています。

2. 提供していただく組織

3. 組織の採取方法

☆研究のために余分に切除することは絶対にありません

この度、あなたの治療のために()の一部を手術によって摘出することは外科の先生より説明を受けたことと思います。

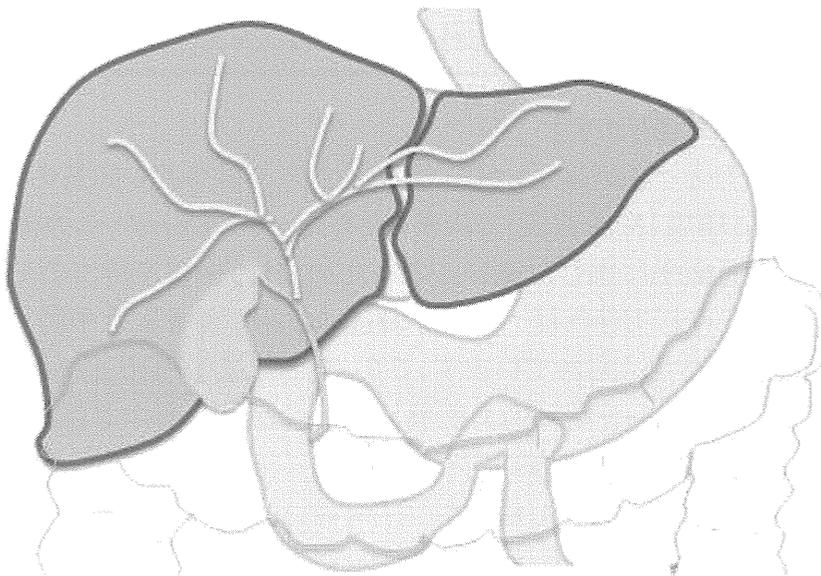
一般に手術では、病気の組織を完全に取り除くために、どうしてもまわりの正常な組織も一緒に切除する必要があります。このようにしないと目に見えない悪い細胞を取り残してしまう可能性があるからです。また栄養を運ぶ血管の位置との関係から、さらに大きく切除しなければならない場合もあります。

このようにして切除された組織のうち一部は、病気の組織を完全に取り除くことができたかどうかを顕微鏡で検査し、診断に役立っています。しかし、残りの部分はそのまま廃棄されていました。

そこで、今まででしたら廃棄されていた、あなたの組織の残りの部分を医学研究に使用させていただけないでしょうか。また、血液(5 mL)の提供もお願いします。

研究のために余分に切除することは絶対にありませんのでご安心ください。

切除する()の範囲



記載医師氏名:

4. 試料の使用方法

5. 試料の管理と保管

～昭和大学で行われている研究について

☆昭和大学ではヒト組織を用いた研究を数多く行なっています

昭和大学(以下、本学)では、手術で摘出された肝臓や小腸の廃棄される不用な部分を用いて、それぞれの患者さんが持っている薬を取り込み分解する力や薬の飲み合わせの悪さなどを調べています。そして、将来、一人一人の患者さんで薬の効きかたや、血液検査でもわかるようにしたいと考えています。

ご提供いただいた試料は昭和大学において適切に管理、保管いたします。

～公共のヒト組織バンクについて

☆貴重なヒト組織を厳重に管理し、適正に研究者に分配するシステムです

ヒト組織を用いた研究の重要性が増す一方で、提供していただいた組織を大切に保管し、研究者に公平・公正に分配するシステムが必要となりました。そこで、厚生労働省の管轄の下、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団により「ヒューマンサイエンス研究資源バンク」いわゆる公共のヒト組織バンクが設立されました。ここでは、手術をされた全国の多くの患者さんから提供されたヒト組織を一括して管理、保管、全国の研究者に公平・公正に分配しています。

昭和大学は、このヒト組織バンクへの組織提供医療機関の一つでもあります。

ヒューマンサイエンス研究資源バンクから依頼があった際に組織の一部を提供することがあります。

6. 倫理性の審査

☆倫理委員会の承認ののち、あなたの組織は研究に提供されます

本学やヒト組織バンク、または組織を使用する各研究施設に倫理委員会が設置されています。この委員会では組織提供者(あなた)の人権とプライバシーの保護に配慮がなされているか、研究所で組織が正しく有用に使われるかなどについて審査します。

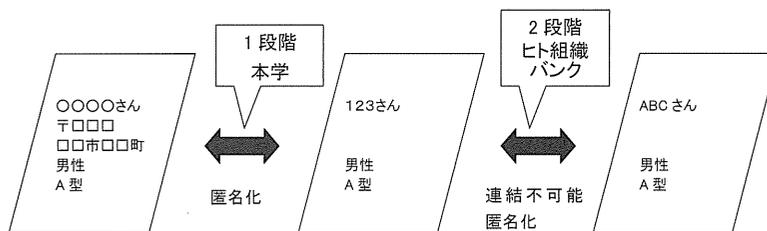
ご提供いただいた組織を用いて研究を始める際には、新たに倫理委員会の審査、承認を受けた後に行います。また、遺伝子を用いた研究を行う際には、ゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の審査、承認を受けます。

つまり、第三者により倫理性と科学性について承認されないと研究はできません。

7. プライバシーの保護

☆あなたのプライバシーは守ります

あなたのお名前やご住所などの個人情報とは2段階に記号化(1段階:本学の個人情報管理者*による「匿名化」、2段階:ヒト組織バンクでの「連結不可能匿名化」)され、外部に知られないように処理されます。但し、研究に必要な情報(「疾患」、「性別」、「年齢」、「血液型」、「喫煙歴」、「飲酒歴」、「ウイルス感染症に関する情報(C型肝炎、梅毒など代表的感染症の有無)」、「薬の服用歴」)は研究者に提示されることがあります。また研究発表に際してあなたのデータが提示されることがありますが、絶対にあなた個人を特定できることはありません。



*「個人情報管理者」

あなたのプライバシーを保護するために、あなたの名前などを記号化し、あなたの個人情報が外部に知られないように厳格に匿名化処理する者で、外科医、研究者とは異なる者です。

8. 個人の解析結果は原則的に開示しないこと

☆個人の解析結果は原則的に開示しません

この研究においては、あなたに直接有益な結果が出る可能性は高くはありません。また、あなたに解析結果を積極的に開示することは原則としてありません。ただし、重大な異常や薬物相互作用、有害作用との関係が見つかり、あなたがその結果を知ることが有益であると判断される場合に限り、主治医よりあなたに知らされます。この場合の説明は、あなたに対してのみ行い、たとえあなたの家族に対しても、また、あなたが試料提供者の代諾者である場合、提供者本人に対しても、あなたの承諾または依頼なしに結果を告げることは致しません。

9. 研究結果の公開

☆研究結果は公開されることがあります

あなたの協力によって得られた研究の成果は、提供者本人やその家族の氏名などが明らかにならないようにしたうえで、学会発表や学術雑誌およびデータベース上などで公に発表されることがあります。

10. 試料提供に伴う利益・不利益

☆試料を提供することにより不利益を被ることはありません

試料提供により行われる研究により、直接あなたに有益な情報をもたらす可能性は必ずしも高いものとは言い切れません。しかし、研究の結果、重大な異常や病気との関係が見つかることがあります。このようなときには、あなたがその結果を知ることが有益であると判断された場合に限り、主治医よりあなたに知らせることが可能です。なお、研究の成果は今後の医学の発展に寄与します。その結果、将来、あなたの病気の原因究明や、その治療などがより効果的に行われるようになるかもしれません。また、試料を提供することにより不利益を被ることはありません。

11. 自由意思による同意と同意とりやめの自由

☆本学の研究へのご協力についてはいつでもとりやめることができますが、ヒト組織バンクへのご協力については退院後はとりやめできません

あなたの組織をご提供いただけるかどうかについてよく考えていただき、あなた自身の自由な意思で決めてください。また、手術の前に同意された場合でも入院中は昭和大学病院内の部署であなたの組織を保存しておきますので、ご家族と相談するなど十分考えてから再検討していただき、取りやめることもできます。この場合、組織は責任をもって廃棄させていただきます。

また、本学の研究への提供は、退院後いつでも自由に同意を取りやめることができます。ただし、ヒト組織バンクへ提供した場合は前項6で説明しましたように、「連結不可能匿名化」により完全にあなたの組織とお名前は結びつかなくなっていますので、退院後は同意を取りやめることはできません。

もし、同意を取りやめたい場合には相談窓口()までご連絡ください。

12. 研究への参加を断っても診療上の不利益は受けないこと

☆研究への参加を断っても診療上の不利益は受けません

お断りになられたことで、あなたが不利益を受けることは一切ありません。

13. 研究にかかわる費用

☆あなたの組織をご提供いただいても、その分の費用はかかりません

あなたの手術等の医療費は通常健康保険制度に則って算定され、あなたの負担となります。また、あなたの組織と血液を研究のためにご提供いただくことは無償とさせていただきます。但し、摘出した組織の保存、さらに研究に使用するためにかかる経費はすべて研究者の負担とします。またヒト組織バンクに提供する場合も経費負担は研究者となります。

14. 知的財産権

☆経済的利益は研究機関や研究者に属します

あなたの組織を用いて行った研究により特許権、またそれを基にして経済的利益が生じる可能性があります。しかし、この権利は研究を行う研究機関や研究者に属し、あなたがこの権利をもつことはありません。

15. 質問の自由

☆いつでもご質問ください

以上の説明をお読みになり、また補足の説明をお聞きになり、何かご質問、心配ごとがございましたらいつでもお気軽にご相談ください。

昭和大学薬学部臨床薬学（担当：小林 靖奈） TEL:03-3784-8221

※平日 10 時より 17 時まで

16. 責任者、個人情報管理者、その他関連施設

◆昭和大学

東京都品川区旗の台 1-5-8

TEL：03-3784-8000

○研究責任者：医学部臨床薬理学 教授 小林 真一

○組織保管場所：医学部臨床薬理学（担当：西村 有希）

○個人情報管理者：

◆昭和大学病院

東京都品川区旗の台 1-5-8

TEL：03-3784-8000

○病院長 有賀 徹

○外科学 消化器・一般外科学部門 教授 村上 雅彦

○病理診断科

◆ヒューマンサイエンス研究資源バンク

大阪府泉南市りんくう南浜 2-11

TEL：0724-80-1670

同意書

昭和大学病院
病院長 有賀 徹 殿

研究課題名：手術時に摘出された肝臓・小腸組織の研究への利活用

下記の各項目について担当医師から前述の説明文により説明を受けました。また、本学で実施される研究、公共ヒト組織バンクへの提供についても、その違いを理解いたしました。

そこで、私の自由な意思により「手術で摘出される私の（ ）の一部と血液を研究に使用する」ことに同意いたします。

(説明を受け納得した項目の□をチェックしてください)

- | | |
|--|---|
| (1) <input type="checkbox"/> 研究の必要性 | (9) <input type="checkbox"/> 研究結果の公開 |
| (2) <input type="checkbox"/> 提供していただく組織 | (10) <input type="checkbox"/> 試料提供に伴う利益・不利益 |
| (3) <input type="checkbox"/> 組織の採取方法 | (11) <input type="checkbox"/> 自由意思による同意と同意とりやめの自由 |
| (4) <input type="checkbox"/> 試料の使用方法 | (12) <input type="checkbox"/> 研究への参加を断っても診療上の不利益は 受けないこと |
| (5) <input type="checkbox"/> 試料の管理と保管 | (13) <input type="checkbox"/> 研究に関わる費用 |
| (6) <input type="checkbox"/> 倫理性の審査 | (14) <input type="checkbox"/> 知的財産権 |
| (7) <input type="checkbox"/> プライバシーの保護 | (15) <input type="checkbox"/> 質問の自由 |
| (8) <input type="checkbox"/> 個人の解析結果は原則的に 開示しないこと | |

但し、提供先と研究内容については以下の☑の通りとさせていただきます。

◆提供先

- 本学の研究に使用することを了承します。
 公共のヒト組織バンクへ提供することを了承します。

◆研究内容

- 遺伝子解析の研究を行う場合があることを了承します。

同意日：平成 年 月 日

同意者署名 _____

代諾者署名 _____ 研究参加者との関係 _____

一時保管については了承しますが、提供先・研究内容については手術後に決定します。

同意日：平成 年 月 日

ご本人署名 _____

説明日：平成 年 月 日

説明者 _____

手術責任者 _____ 25

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 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 -

研究分担者 熊井 俊夫 聖マリアンナ医科大学大学院 遺伝子多型・機能解析学

研究要旨

ヒト組織を用いた研究は多岐にわたり、ヒト組織バンクの研究利用資源としての高度化が要求される。今回、学内ヒト組織バンク向けに保存されている肝臓組織の肝疾患別の酸化ストレス関連蛋白発現パターンの解析を行うとともに、薬物代謝酵素遺伝子発現に関与するDNAメチル化のパネル化解析の準備を開始し、今後本バンク内の肝臓組織を使用する研究者のための研究資源の高度化を行った。

A. 研究目的

ヒト組織の研究利用の重要性は広く認識されている。本邦では臓器移植法の問題もあり、その利用は手術などで摘出された組織のうち、病理検査で用いない部分を利用する他はない。これまでにヒト組織の研究利用は主に肝臓が中心でなされている。肝臓癌は再発が多く見られるがその理由については明らかではない。また最近各遺伝子発現には個人差のあることが明らかとなり、その原因の一つにDNAのメチル化が関与している事が示唆された。

聖マリアンナ医科大学（以下、本学）では2001年より学内ヒト組織バンクシステムを構築し、日本人の組織を研究利用するためのシステムを構築検討してきた。また日本人の組織を財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒト組織公共バンク(以下、HSRRB)へ効率的に提供することについても検討してきた。ヒト組織は本学生命倫理委員会の承認を

得た上で研究に利用している。本学大学病院において肝臓切除手術適応患者に十分に文書と口頭で説明後、文書同意を得て、手術時に摘出した病理検査に用いない肝臓組織の一部を研究用に採取している。

本学では2001年度よりヒト組織提供医療機関としての基組織盤整備事業(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団)を推進してきた。この事業により学内に保存されているヒト組織を研究資源としてさらに付加価値を高める必要がある。

原発性肝臓癌の癌再発の機序を探るために肝疾患別に非癌部についてプロテオミクス解析を行った。その結果、酸化ストレス関連蛋白発現が異なることが明らかとなったので、酸化ストレス関連蛋白とそのシグナル伝達系について検討した。また薬物代謝酵素のmRNA発現の個体差に関係すると思われるDNAメチル化のパネル化を行う準備を開始した。

B. 研究方法（倫理面の配慮含む）

（肝疾患別非癌部における蛋白発現の変化に対する検討）

本学大学病院にて、肝臓切除術施行予定の患者に、本研究について文書を用いて説明し、同意の得られた 22 名を対象とした。手術により摘出された組織のうち、非病変部位を直ちに液体窒素にて凍結し、実験に供するまで -80°C で保存した。肝組織より蛋白を抽出し、肝疾患別にプールサンプルについて Cy でラベル化を行った後 2 次元電気泳動を行った。発現に変化の見られたスポットを LC/MS/MS で質量解析を行って蛋白を同定した。その蛋白および関連蛋白についてウエスタンブロットにより蛋白発現の定量化を行った。

（DNA メチル化解析の検討の準備）

薬物代謝酵素遺伝子転写解析部位近傍の CpG アイランドについてデータベース解析を行い、候補領域を同定した。この領域について詳細な解析を行うためのプライマーを作成した。ヒト樹立肝細胞より genomicDNA を抽出しバイサルファイト処置後プライマーを用い増幅し、メチル化についてパイロシーシークエンサーで定量した。

（倫理面への配慮）

本学においては、倫理指針等のガイドラインに則した生命倫理委員会があり、本研究はその生命倫理委員会で審査、承認された。対象は治療目的で外科手術により事前に臨床研究コーディネーター(CRC)が十分な補助説明をした後、医師が文書同意を得た。患者の個人情報個人情報管理者を置き、連結可能または不可能匿名化処置を行い、個人情報の厳密な管理を行った。

C. 研究結果

1. 肝疾患別非癌部における蛋白発現の変化に対する検討

非 B 非 C 型肝細胞癌 (primary liver carcinoma, PLC) 群、転移肝臓癌 (metastatic liver carcinoma, MLC) 群及び良性肝腫瘍 (benign liver tumor, BLT) 群の非腫瘍部で癌現遺伝子の変動と酸化ストレス消去系 (カタラーゼ (catalase) とスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) 1, 2, およびグルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase 1, Gpx)) を比較した。PLC 群非癌部のカタラーゼ (catalase) とスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) 1 発現が MLC 群および BLT 群に比べ有意減少していた。一方、SOD2 と Gpx は PLC 群、MLC 群、BLT 群の間で有意差が見られなかった。また PLC 群で癌原遺伝子である RAS とそのシグナル伝達系である Akt が MLC 群および BLT 群に比べ有意上昇もしくは上昇傾向であった。

2. DNA メチル化解析の検討の準備

薬物代謝酵素 CYP2D6 素遺伝子転写解析部位近傍の CpG アイランドについてデータベース解析を行い、エクソン 1 の決失したバリエーションではエクソン 2 部分の CpG アイランドがメチル化に影響を与える可能性が示された。そこでこの領域を解析するためのプライマーを作成した。ヒト樹立肝細胞 Huh7 より genomicDNA を抽出しバイサルファイト処置後プライマーを用い増幅し、メチル化についてパイロシーシークエンサーで定量した。この領域では 40-50% メチル化が起きている検体が存在した。

D. 考察

今回原発性肝臓癌群の肝組織で転移性肝臓癌群、良性腫瘍群に比べ酸化ストレス消去

系が低下し、癌原遺伝子関連蛋白が上昇していた。肝細胞癌は手術で切除後もしばしば再発することが臨床上問題となっている。原発性肝臓癌非腫瘍部のプロテオミクス解析により酸化ストレス消去系蛋白発現の低下が明らかとなった。酸化ストレスは、体内の細胞内で種々の代謝活動の過程で生ずる反応性に富む活性酸素種(reactive oxygen species, ROS) が細胞内の抗酸化能を上回って種々の障害を起こすことをいう。この酸化ストレスが発癌に関与する可能性がいくつかの研究で示唆されている。今回原発性肝臓癌患者の非腫瘍部で酸化ストレスが亢進している可能性が高まったことから肝臓癌再発の新たな研究ターゲットになる可能性が考えられる。またヒト組織バンクの観点からは肝臓の非腫瘍部を研究に用いる際、ターゲットとする因子によっては原疾患別に分類して研究を行う必要があることが明らかとなった。日本人の肝臓における研究は今後のヒト組織を用いる研究にも価値のあるデータとなった。

各種薬物代謝酵素の mRNA 発現、蛋白発現について従来から本研究で個人差の大きいことを明らかにしてきた。この個人差の理由について今回 DNA メチル化による遺伝子発現の個人差に注目した。各薬物代謝酵素の DNA について CpG アイランドの存在をデータベースより検討した。その結果 CYP2D6 のエクソン 2 に CpG アイランドの存在が明らかとなった。しかもエクソン 2 から始まるバリエーションが存在すること、実際に培養細胞でメチル化を確認したところこの領域では 40-50%メチル化が起きている検体が存在した。このことは少なくとも CYP2D6 の mRNA 発現の個人差の原因の一つとして DNA のメチル化が関係している可能性がある。今後ヒ

ト組織バンクで保存している肝臓でメチル化のデータを検討、パネル化して資源の高度化をはかっていきたい。

E. 結論

学内ヒト組織バンク向けに保存されている肝臓組織について酸化ストレス消去系が低下して癌原遺伝子関連蛋白系が亢進していることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 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

「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 公的バンクへのヒト肝組織及び肝細胞提供システムの構築

研究分担者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨 人種間には多くの酵素発現パターンに差が存在することから、我が国でのヒト組織を用いた創薬研究には日本人の組織が必須である。研究資源としてのヒト組織の入手は手術摘出検体がふさわしいとの見解（厚生科学審議会答申「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」）、さらに遺伝子解析研究のガイドライン（三省合同ガイドライン；平成13年3月29日）が示されるなか、これらの見解、ガイドラインの整合性を踏まえたヒト組織提供システムおよび公共バンク構築のための倫理的問題、技術的問題について検討してきた。この分担研究ではこれまで行ってきた手術検体からの公的機関への肝組織提供（ヒト肝細胞・組織の公的資源化）の継続と、研究資源確保システムのモデル化と試料提供施設間のネットワーク化などを視野に入れた効率化、省力化について検討する。また、組織・細胞の取得から公共組織バンクを介した研究利用にまでに関わる倫理的、医療経済的問題についても検討を加える。

A. 研究目的

ヒト組織、特に肝組織・肝細胞に関する手術検体を適正に提供できるシステムの構築と適応の拡大、普遍化に向けた可能性、倫理的問題、技術的問題について検討する。

B. 研究方法（倫理面の配慮含む）

これまで正常ヒト肝細胞を利用した研究の経験を活かし、手術等で摘出されたヒト肝組織及び分離した肝細胞を、公的なヒト組織バンク（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、HSRRB）へ提供する基盤整備を行った。本研究でも同様にHSRRBへの組織提供を継続して行う。その上で下記の検討を行う。

1. 手術から得られた肝組織・肝細胞を、提供医療機関ごとに、組織採取から公共バン

クへの提供までのシステムを完成させる。

2. 研究資源としての付加価値を高める肝組織処理法などを検討する。

3. 公共ヒト組織バンクでは取り扱わない感染組織などについての特殊な試料提供や、稀な肝疾患症例の検体としての有用性についての情報等を発信する。

（倫理面への配慮）

尚、倫理面の配慮に関しては、広島大学病院の全入院患者を対象にした病理検体の研究・教育利用の理解と同意を得るシステム（包括的同意）の継続利用、HSRRBへの組織提供に関するヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に準じた倫理審査の承認、院

内病理医との連係を継続している。

C. 研究結果

1. HSRRBへの肝組織・細胞提供の継続
 転移性肝腫瘍HSRRB提供への承諾を得、肝組織及び肝細胞として提供可能であったヒト肝組織4検体を平成23年度の3年間で肝組織15例、肝細胞8例の臨床検体をHSRRBへ提供し、全国の研究者への利用に供した。

2. 稀少な肝癌症例（胆管細胞癌、混合型肝癌）からの細胞分離、培養の試み
 肝細胞癌に加えて胆管細胞癌、混合型肝癌の癌組織からの細胞分離を継続して行った。胆管細胞癌の手術検体からの培養は、症例によっては一定の成果を認めたが、継代培養には至らなかった。

3. 広島臨床腫瘍研究グループ(Hiroshima Study group of Clinical Oncology: HiSCO)の設立と臨床試験の開始
 悪性腫瘍に関する研究およびその成果の普及をはかることを目的として、広島大学消化器外科と県内関連施設（18施設）とが連携した臨床試験を立ち上げた。HiSCO-01試験として、「切除可能な大腸癌肝転移に対するXELOXとバ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。Primary endpoint（無増悪生存期間）、Secondary endpoint（生存期間、治療奏功期間、奏功率、有害事象など）に加え、付随研究として化学療法前と化学療法後の手術検体（癌部およびその周囲非癌部）の化学療法による癌細胞の分子生物学的解析や非癌部の化学療法による影響を免疫学・病理学的に解析する。

D. 考察

HSRRB への組織・細胞提供には、組織提供側の患者に対する倫理的配慮、臨床医の協力、看護師やCRC（臨床研究コーディネーター）などのサポートが必要である。現時点では残念ながらCRCの継続雇用をこの研究費だけでサポートすることは困難であった。同様に複数の施設で行う臨床試験は、基幹病院（大学病院など）だけでなく共同施設（連携病院）の協力と患者への十分なICが求められる。我々が作成した倫理審査様式、IC様式を共同施設で利用している。患者には治療とは異なる手術検体の研究利用に関するICを行い、十分な配慮を行うよう努めている。しかしながら全ての施設に臨床研究の重要性を説明できるCRCが配置されているわけではなく、一般病院でも手術検体の研究利用を行えるように新たなシステム（倫理的サポートを行える国をあげた細胞提供システム）を作ることが今後の課題と思われた。

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。特に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）のなされた体制を医療者側も整えておく必要がある。

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た。

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てきた。今後これまでに構築したシステムの適正化、普遍化を進め、一般の医療機関の医療従事者、治療対象となる患者に対し、手術検体の研究利用における重要性の理解と研究協力を得られよう努力する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) A huge metastatic liver tumor from leiomyosarcoma of the inferior vena cava: report of a case. Hashimoto M, Kobayashi T, Tashiro H, Amano H, Oshita A, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Aikata H, Chayama K, Fujii M, Arihiro K, Ohdan H. Surg Today. 2011. [Epub ahead of print]
 2) An Anti-Wnt5a Antibody Suppresses Metastasis of Gastric Cancer Cells in vivo by Inhibiting Receptor-Mediated Endocytosis. Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, Kikuchi

A. Mol Cancer Ther. 2011. [Epub ahead of print]

3) Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H. Transplantation. 2011; 92(5):575-580.

4) Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function. Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Doskali M, Tashiro H, Ohdan H. J Transplant. 2011. Epub.

5) Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. J Hepatol. 2012; (1):146-152.

6) Impact of Pegylated Interferon Therapy on Outcomes of Patients with Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma After Curative Hepatic Resection. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Ann Surg Oncol. 2011. [Epub ahead of print]

7) Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). Yanai H, Chiba S, Ban T, Nakaima Y, Onoe T, Honda K, Ohdan

- H, Taniguchi T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 12;108(28):11542-11547.
- 8) Long-term outcome of hepatic artery reconstruction during living-donor liver transplantation. Banshodani M, Tashiro H, Onoe T, Ide K, Ohdan H. Transplant Proc. 2011; 43(5):1720-1724.
- 9) Treatment strategy for early hepatocellular carcinomas: comparison of radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization and surgical resection. Tashiro H, Aikata H, Waki K, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. J Surg Oncol. 2011; 104(1):3-9.
- 10) Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP α capable of binding to human CD47. Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, Yang YG. Cell Transplant. 2011. [Epub ahead of print]
- 11) Significance of platelet count in the outcomes of hepatectomized patients with hepatocellular carcinoma exceeding the Milan criteria. Amano H, Tashiro H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Itamoto T, Asahara T, Ohdan H. J Gastrointest Surg. 2011;15(7):1173-1181.
- 12) Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. Kobayashi T, Itamoto T, Tashiro H, Amano H, Oshita A, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Ohdan H. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2011; 18(5):689-699.
- 13) Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. J Surg Res. 2011; 167(1):e29-37.
- 14) Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma classified as Child-Pugh class B. Kuroda S, Tashiro H, Kobayashi T, Oshita A, Amano H, Ohdan H. World J Surg. 2011; 35(4):834-841.
- 15) 肝癌再発予防. 小林剛, 大段秀樹. 外科治療2011; 105(5):467-474.
- 16) 肝疾患 肝移植. 尾上隆司, 大段秀樹. 消化器外科学レビュー2011; 2011:106-112.
- 17) 移植後治療. 井手健太郎, 大段秀樹. 腎と透析2011; 70(4):618-622.
- 18) 研究の新しい展開 慢性拒絶反応の成因と対策. 大段秀樹. 医学のあゆみ2011; 237(5):555-558.
- 19) 肝類洞内皮細胞による血液型糖鎖抗原認識B細胞の寛容化においてFas/Fas-ligand pathwayは主要な役割を果たさない. 五十嵐友香, 田澤宏文, 大段秀樹. ABO血液型不適合移植の新戦略-2011-. 2011; 38-43.
- 20) 広島大学におけるABO血液型不適合肝移植の現況とiNKT細胞制御による特異的減感作療法の可能性. 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. ABO血液型不適合移植の新戦略-2011-. 2011; 48-56.
- 21) 臓器移植におけるB細胞制御を目的とし

た免疫抑制法. 伊禮俊充, 田澤宏文, 大段秀樹. Organ Biology. 2011; 18(1)108-111.

22) 膵臓手術 慢性膵炎に対するFrey手術. 眞次康弘, 板本敏行, 石山宏平, 大段秀樹. 手術. 2011; 65 (10) 1489-1493.

23) 肝移植. 大段秀樹, 尾上隆司. 消化器外科学レビュー 最新主要文献と解説2011, 2011; 106-112.

24) ドナー特異的B細胞免疫応答の解析法. 大段秀樹. SURGERY FRONTIER. 2011; 18(4):79-83.

2. 学会発表

1) Ohdan H: Adoptive Immunotherapy for Inducing anti-HCC and anti-HCV Activity after Liver Transplantation. Lecture at Columbia University, Columbia Center for Translational Immunology, New York, 2011. 4. 28-29

2) 大段秀樹: 肝移植後の免疫制御戦略. 第9回広島消化器免疫研究会, 広島, 2011. 5. 26

3) 大段秀樹: 肝臓移植後の免疫モニタリングに基づく免疫抑制の最適化. 第28回日本TDM学会・学術大会, 広島, 2011. 6. 18-19

4) 大段秀樹: 臓器移植の近況 -広島大学病

院の肝移植-. 平成23年度 広仁会 関東甲信越地方会総会, 東京, 2011. 6. 19

5) 大段秀樹: 肝癌／肝炎の根治を目指した肝移植後の免疫細胞療法. 第39回幹細胞治療フォーラム, 東京, 2011. 7. 21

6) 大段秀樹: 免疫制御下での抗腫瘍療法について, 中外製薬株式会社 社内外部講師勉強会, 東京, 2011. 7. 29

7) 大段秀樹: 臓器移植におけるB細胞免疫応答の制御戦略, 第24回福島移植フォーラム, 福島, 2011. 7. 30

8) 大段秀樹: 広島大学病院における腎移植・肝移植の現状, 広島県病院薬剤師会呉支部研修会, 広島, 2011. 8. 4

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

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 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

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等の疾患筋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、セルソーターあるいは磁気ビーズ標識抗体法による細胞分画を用いることによって、0.01-0.1%しか含まれていない不死化筋細胞を純化する方法を確立した。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、純粋な不死化筋細胞を得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」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（倫理面の配慮含む）

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および国立長寿医療研究センターにおいて採取された正常筋組織に由来する初代培養細胞を、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。

セルソーターによる未分化筋細胞の分離

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。

磁気ビーズ標識抗体による未分化筋細胞の分離 培養細胞を、磁気ビーズ標識ヒト CD56 (NCAM) 抗体と 4°C で 15 分間反応後、洗浄し、強力な磁場においた Large cell column (ミルテニー社) に添加した。Flow-through を 4 回、計 5 回細胞懸濁液の添加操作を繰り返した。カラムを洗浄後、カラムを磁場から外し、細胞を回収した。

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°C 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。

(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。

C. 研究結果

筋細胞系譜マーカーに関する検討

デスミンは、ヒト筋芽細胞での発現レベルに幅があるため、抗体染色による検出では、デスミン弱陽性筋細胞と非筋細胞 (陰性細胞) との識別に注意を要する。

NCAM は、抗体染色による検出では、デスミンと同様に、弱陽性筋細胞と非筋細胞 (陰性細胞) との識別に注意を要する。弱陽性と陰性細胞の識別に関しては、蛍光強度の定量に基づくフローサイトメトリー解析が優れていた。

フローサイトメトリーを用いた不死化後筋

細胞純化の有効性の検討 ディシェンヌ型筋ジストロフィー筋由来初代培養細胞を不死化した。筋分化マーカーの抗体染色の結果、もともと筋細胞含有率が低いと予想された 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。

磁気ビーズ標識抗体による不死化筋細胞の純化 (モデル実験) GFP を発現する不死化ヒト筋細胞 Hu5KD3e8 を骨格筋由来不死化ヒト非筋細胞 Hu37KDmm と混合した後、磁気標識ヒト CD56 (NCAM) 抗体による筋細胞分離を行った。筋細胞 Hu5KD3e8 を 7.7%含むサンプルを用いたところ、1 回のカラム操作後、筋細胞の純度は 93%になった。筋細胞 Hu5KD3e8 を 1.0%含む細胞サンプルを用いたところ、1 回のカラム操作によって筋細胞の純度は 50%まで向上した。すなわち、磁

気ビーズ標識抗体による細胞分画を二度繰り返すことによって、筋細胞を1%しか含まない細胞集団からも、ほぼ完全に純化された筋細胞を分離することができることが示唆された。

磁気ビーズ標識抗体による不死化前筋細胞純化の有効性の検討

後期高齢者（82歳、女性）腹直筋由来初代培養（Hu46）における筋細胞の含有率は非常に低く、抗体染色から1-5%と推定されたため、磁気ビーズ標識抗体による細胞分画を2回行った。得られたNCAM陽性細胞に3遺伝子を導入し不死化した。フローサイトメトリーによってNCAM陽性細胞を検出したところ、筋細胞の純度は99.6%にまで達しており、不死化後に細胞を純化する必要はないと判断された。

不死化筋細胞のクローン化

複数回のフローサイトメトリーあるいは磁気ビーズ抗体法によって、ヒト未分化筋細胞を純度することは可能になったが、詳細な分子細胞生物学的解析をおこなうためにはクローン化した細胞を樹立する必要がある。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

DMD患者筋組織より分離樹立した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り、フローサイトメトリーの結果と一致した。

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、非筋細胞の排除（筋細胞の純化）に関しては、細胞クローニングという労力と時間がかかる方法に依存していた。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る場合は、低密度細胞培養法によって、不死化前に筋細胞のみをクローニングによって分離することができた。一方、ディシェンヌ型および福山型筋ジストロフィーでは、線維化・脂肪化が起きているため、初代培養に線維芽細胞などの非筋細胞が大量に混入することは避けられない。非筋細胞の割合が高い場合、クローニングによる筋細胞の分離は、非常に困難となる。また培養期間の延長に伴い、筋細胞の比率が低下することも観察されていた。

不死化前のクローン化による筋細胞の分離は、細胞状態が良好である場合にのみ可能であり、長期間凍結保存されている、既存の初代培養細胞サンプルに適用することは難しい。一方、筋細胞を純化することなしに不死化する場合、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。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少数しか含まれない筋細胞を分離し、純化することは、従来技術では困難であった。如何にして極めてわずかしか存在しない未分化筋細胞を分離するかという点は、大きな技術的課題であった。

我々は、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 DMD 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を明らかにした。この方法は、筋細胞をきわめ少数しか含まない培養から不死化筋細胞を樹立することを可能にする。実際、我々は、筋細胞を0.01%以下しか含まない初代培養を不死化した後、二回のフローサイトメトリーによって、筋細胞を完全に純化することに成功している。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。これは、我々の樹立した不死化法が、既存の筋細胞バンクに保存されている細胞の多くに適用できる可能性を示している。

さらに我々は、フローサイトメトリーにかわる簡便な筋細胞分離法として、磁気ビーズ標識抗体による細胞分離の有効性を確認した。従来、フローサイトメトリー法には、以下のような問題点があった。

- 1) 訓練を受けたオペレーターが必要。
- 2) 高額機器（セルソーター）が必要。
- 3) 細胞によっては、ソーティング操作によってダメージが大きい。

「磁気ビーズ標識抗体法」は、実験操作が簡便で、高額機器を必要とせず、操作時間が短いために細胞へのダメージが少ない、という利点を有する。一方で、フローサイトメトリーのように筋細胞の含有率および絶対数をリアルタイムでモニターすることは出来ないという欠点がある。我々は、フローサイトメトリー法の弱点を補う方法として、「磁気ビーズ標識抗体法」が有効であることを示した。

E. 結論

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することに成功した。さらに、筋細胞を0.1%しか含まない不死化細胞集団から不死化筋細胞のみを分離し、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、ほぼ確立できた。課題であった「筋細胞の純化」については、これまでに確立してきたフローサイトメトリー法に加えて、より簡便な「磁気ビーズ標識抗体法」によっても筋細胞が純化出来ることを示した。「磁気ビーズ標識抗体法」には、操作を自動化した装置が開発されており、細胞バンクの高度化を図る上でネックとなる筋細胞純化操作に必要な労力と時間に関する課題を克服できる可能性がある。

本研究により、筋細胞不死化工程は、大幅に簡便化・標準化された。これを基盤とすることによって、初代培養筋細胞の不死化工程をルーティン・ワーク化し、バンク事業担当機関への技術移転が可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2) 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*18:857-866.

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