

Intraperitoneal distribution, sc tumor and lung metastasis of Mesothelioma (JMN-1B)

図 - 6

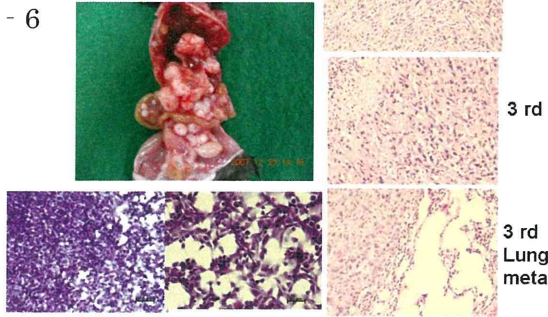
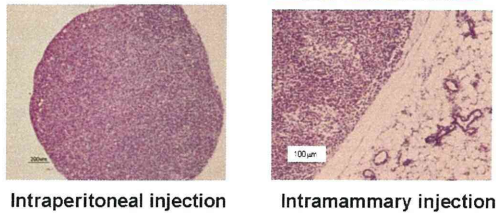


図 - 7

Breast Cancer Cell Line MCF-7



培養がん細胞は SCID へ移植すると容易に増殖する。腹腔内注入すると、腹瘤を形成し移植時の細胞数と移植・増殖した tumor nodule の数とにきれいな相関がみられた (図-8) ので、定量的制がん研究に用いられる。

図 - 8 Distribution of Intraperitoneally Injected Mesothelioma Cell Line JMN-1B

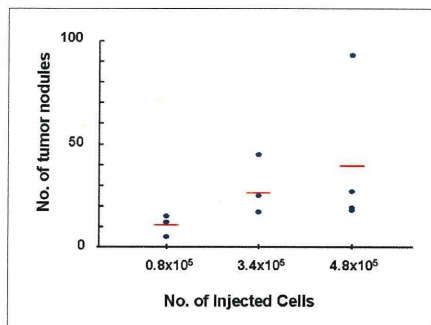
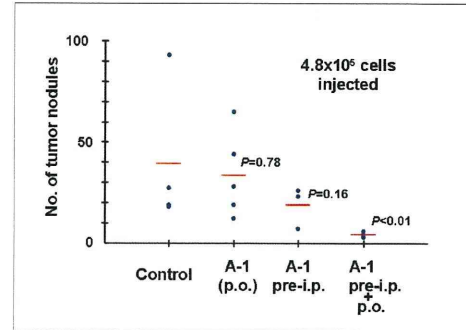


図-9 は、ヒト悪性腫瘍細胞 JMN-1B を SCID マウスに注入し、生理活性物質 (A) の効果を調べた実験で、tumor nodule 形成に抑制効果があることを示したモデル実験である (図-9)。(野村、立花、小原)。

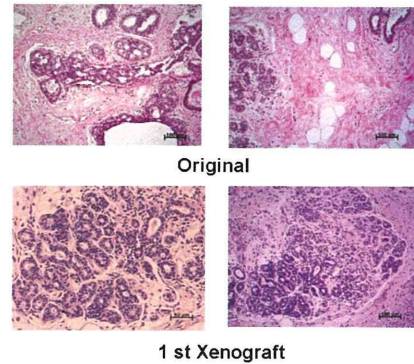
図 - 9 Inhibitory Effects of Biomodifier on the Development of Intraperitoneally Injected Mesothelioma Cell Line JMN-1B in SCID Mice



しかしながら、乳がんの例 (図-10 と 7) をみてほしい。培養乳がん細胞を SCID マウスに移植してもがん細胞の塊があるだけで、臨床例にみるようながん特有の構造を形成するわけでない。致命的な差といえる。

図 - 10

Breast Cancer



5. ヒト正常組織・細胞の長期維持；ヒト正常組織の移植リストを作成した。また、ヒト甲状腺組織 (バセドー病由来)、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ている ((図-11、12)野村、本行、立花、榎本)。

図 - 11

Normal Human Lung (from 11 weeks embryo)

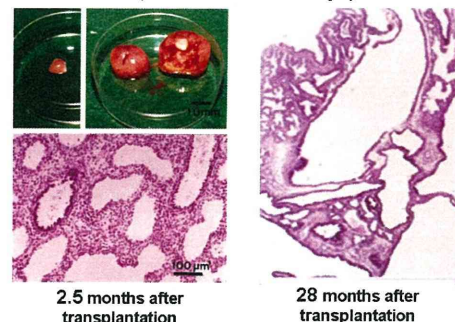
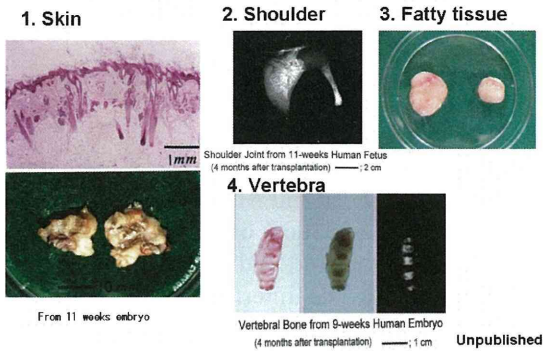
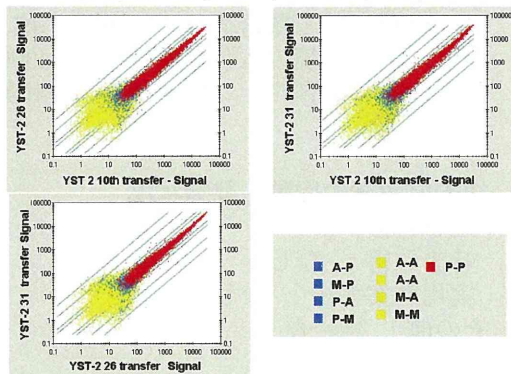


図 - 12 Development and Growth of Unidentified Human Embryonic Mass in SCID Mice



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、組織像には変化がないことを見出している。いくつかのヒトがんの例で示したごとく移植による形態変化はみられなかった (図-1, 2, 3)。より詳細な検証のため、マイクロアレイを用い、遺伝子発現の変化についても、移植 10, 26, 31 代目組織をそれぞれ比較したところ変化はなかった (図-13)。移植による形態および遺伝子発現の変化がほとんどみられず、かつ N₂ 保存・再移植によって、ヒト悪性腫瘍は SCID マウス中で増殖する。ヒトがんを生きたまま永久保存することができる (梁、野村)。

図 - 13 Subcutaneously Transplanted Yolk Sac Tumor



ヒト培養がん細胞の SCID マウス移植後の遺伝子発現の変化は初代で大きく以降大きな変化はなかった (図-14, 15)。

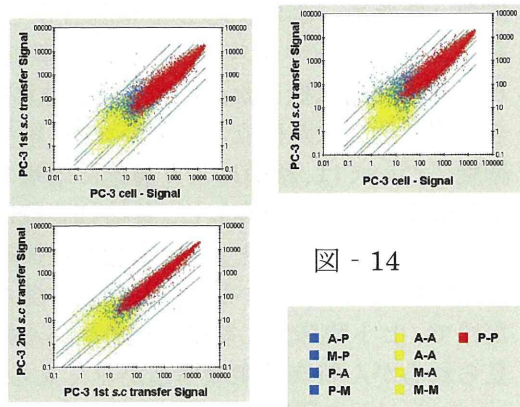


図 - 14

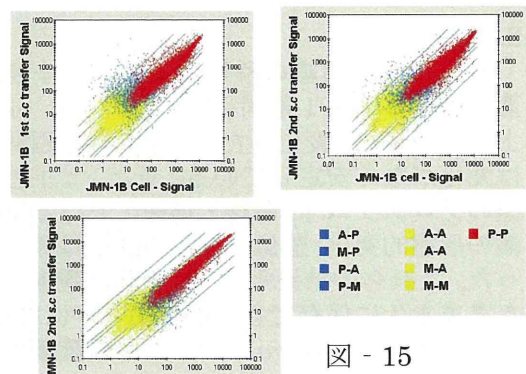


図 - 15

以上の如く、当初予定通りの成果が得られた。

D. 考察

SCID に移植した正常ヒト甲状腺組織の遺伝子発現への影響を調べるために、移植前組織と移植後組織の遺伝子発現を比較した。遺伝子発現に変化があったのは、約 1 週間目までにすぎず、その後 4 週間までは変化がなかった。発現に変化があった遺伝子は、移植したほとんどの組織で共通しており、細胞変性、再生に関するものであった。これらの結果から、遺伝子発現の変化は通常の現象であること、また移植後 1 週間までは、宿主である SCID マウスからの栄養や、酸素が不十分であるためと示唆された (梁分担報告書記載)。

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を既に証明している (Inohara, Nomura, et al, 1992, Fukuda, Nomura, et al, 1998 他)。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が確立したといえる。培養がん細胞については、移植により急速に増殖し巨大な腫瘍を形成し、転移もし、移植細胞数に応じて腫瘍を形成することから、定量的治療研究には大いに役立つ。しかし、がん細胞の塊があるだけで、ヒト臨床がん組織、移植後がん組織で見られるがん特有の組織構造が全く見られない。ヒトがんの研究、治療には適さないものとする。

E. 結論

ヒト甲状腺組織の移植による遺伝子発現の変化は、移植後1週間目では、約3% (4倍以上の発現変化) 変化したが、その後4週間までは変化がなく安定している。また、ヒト悪性腫瘍のプログラム N₂ 保存・移植における移植組織の形態的变化、遺伝子発現の影響は僅かであった。これらの結果から、ヒト悪性腫瘍を生きたまま永久に保存できる事が明らかになった。この成果は、*in vivo*でのヒト悪性腫瘍の資源化に大いに貢献できる。

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

- (1) Iwamori M., Shibagaki, T., Nakata, Y., Adachi, S., Nomura, T. Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross-reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli. J. Biochem. 146(2), 185-191, 2009.
- (2) M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. Radiat. Res. 173, 205-213, 2010.
- (3) Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. Mutat Res., 696,107-113 2010

- (4) 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、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、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価 (2009年度ワーキンググループ活動報告)。Space Utiliz Res. 26: 249-251, 2010.

2. 学会発表

- (1) Taisei Nomura. Dietary Modulation to Prevent Cancer and Malformation in Mice. In: Dietary Modulation of Xenobiotics Transport and Metabolism. 3rd Asian Pacific Regional Meeting of The International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Bangkok, Thailand, May 10-12, 2009.
- (2) Taisei Nomura. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. In: The 15th Alexander Hollaender Course; Genome-Environment Interactions and Genetic Toxicology, September 23 – 26/27, 2009, Astana, Kazakhstan.
- (3) Taisei Nomura. Differential Sensitivity of Mice and Human Tissues to Radiation Sources. In: HIBMC/PMRC Joint Meeting, Tatsuno, Hyogo, Dec. 15, 2009,.
- (4) H Nakajima, T Saito, KG Yeliseeva, H Ryo, T Hongyo, Y, Yamaguchi, NA Kartel, EV Krupnova, V Trusova, AM, Voitovich, VS Piskunov, TP Smirnova, EI Anisimova, V. Afonin, T Todo, T Nomura. Ecological decrease, biological concentration and genome stress of radionuclides in plants and animals after Chernobyl catastrophe. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 2009. 8. 20-25, Firenze – Italy.
- (5) 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、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、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価 (2009年度ワーキンググループ活動報告)。相模原、2010. 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 ヶ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, 1900, 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、

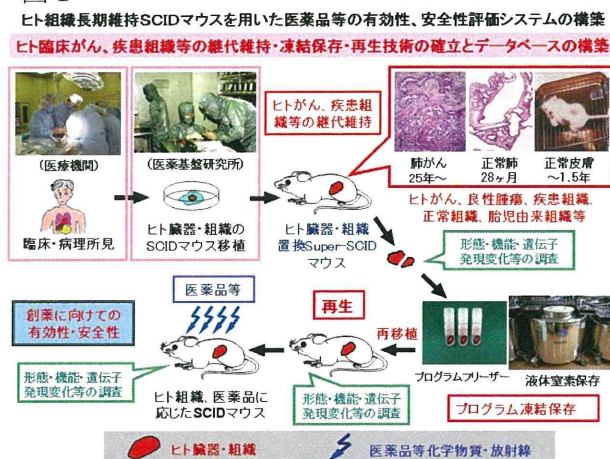
(3) 未成功の前立腺がん、GIST 等、新たなヒト臨床腫瘍組織の継代維持、再生可能な形での凍結保存、

(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



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。

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;

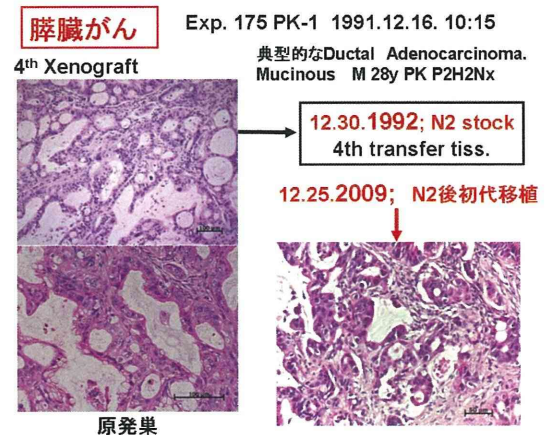
C. B17-*scid* [原種]、C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備し、*bg^l*, *W* 導入を行った(野村)。GFP を導入し、近交化を行った(野村)。

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。

Exp. 415 Prostate Cancer (Testicular Metastasis)



4th Xenograft; 11.4.2010, PSA; 72.7 ng/ml C3H/HeJ-*scid*; *bj*; LPS- 2530, Testosterone (-)

手術前患者血清中 PSA; 5.6 ng/ml

図 3

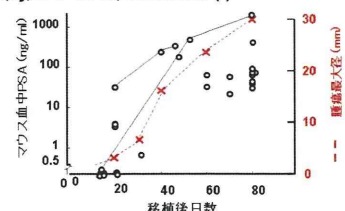
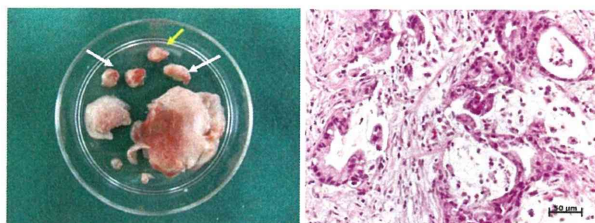


図 4



膀胱がん皮下部(白矢印)、肺門部(黄色矢印)転移
マイクロサテライト解析:転移部 ヒト>>マウス

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

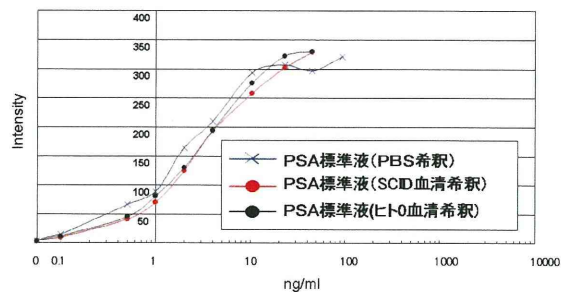
サンプル 100 μ l チャージより測定までの時間 (1, 2, 3, 4、5、6、7、10) を変え、各資料で Intensity を測定したところ、標準液、PBS を用いた場合、サンプル液が C ラインまで到達まで 5 分弱を要するため、それまでの測定値は無意味。5 分以降も経時的に Intensity は増加するし、時間を決めて測定してもデータは不安定であった。粘張なヒト血清では、5 分では C ラインまで到達しない。従って、ヒト O 血清 (女性) でも 5、6 分まで、高値を示す。10 分で確実に 0 を示す。標準 PSA 液をヒト血清で希釈した場合でも、10 分で安定した結果が得られた。

(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、ヒトがんを生きの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 保存から組織を起こし、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の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が確立したといえる。

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

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（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 ヶ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無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, 1900, 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。ヒトへ

ルペスウィルスのようにヒト皮膚のみを宿主とするウィ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最終年度 (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。

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^J*、*W* 導入マウス (野村ら、1993) も用意する (野村)。

2. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；各臓器に発生した原発腫瘍、転移性腫瘍の移植を継続して行う。特に 2 3 年度はこれまで移植を行っていなかった腎、腎盂、尿管、膀胱腫瘍を重点的に行う。また、国内外で移植に成功していない前立腺がん、GIST

(Gastro-intestinal Stromal cell Tumor；腸管間質細胞腫瘍) の移植系を確立する。

3. がんの浸潤、転移のフォロー；SCID マウス血中 PSA の微量測定法を用いるとともに

(野村、野々村)、ヒト腫瘍の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し、検出する (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) を行い、皮下、腹腔、当該臓器内移植を行うことにより、ヒトがん細胞の進展、転移能の *in vitro* 検出系を確立する。(小原、野村)。

5. ヒト正常組織・細胞の長期維持；ヒト甲状腺組織 (パセドー病由来)、肺組織、胎児由来組織 (皮膚、肺、脂肪等) 継代維持を行い、放射線照射、医薬品投与、短時間宇宙飛行実験にも備える (野村、梁、本行、立花、榎本)。

6. 移植ヒトがん組織中のウィルス検査；ヒト組織の医薬基盤研究所動物施設への導入に際しては、患者の手術前検査において、マイコプラズマ、肝炎 B, C 抗原、抗体、HIV、成人 T 細胞白血病、Wasserman 反応陰性の場合のみ許可される。それに加え、ヒトがん組織中のウィルス検査も行う (野村、梁、小原)。検査するウィルスの種類は、DNA ウィルス；CMV, EBV, HH6, HH7, BKV, JCV, ADV1, paboB19, HBV, HTLV1, HTLV2, HIV1, HIV2, HPV18, RNA ウィルス；HCV, RMRV である。ヒト移植 (-80° 凍結) より、DNA および RNA を同時に抽出する (AllPrep® DNA/RNA MiniKit, QIAGEN, Tokyo) し、TagMan Probe を使い、リアルタイム PCR 法 (DNA ウィルス) またはリアルタイム RT-PCR 法 (RNA ウィルス) により、各ウィルスの増幅を調べた。この時、GAPDH と β -actin を、DNA および RNA ウィルスそれぞれの、standard 遺伝子として用いた。Real time PCR は、GAPDH が 50 copies/500 ng genome DNA で、Real time RT-PCR は、 β -actin が 100 copies/100 ng Total RNA で増幅される条件下で行った。(小原、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]、原種由来の C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid*等マウスを常備し、*bg^l*、*W* 導入を行い C3H/HeJ-*scid*; *bg^l*、C57BL/6J-*scid*; *bg^l*、C57BL/6J-*scid*; *W* を作成し量産化を行った(野村)。

2. 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131症例を、23年度には新規ヒト腫瘍146症例を SCID マウスに移植した(野村、研究協力者;吉留、鳥、坂巻)。特に腎、尿管、膀胱腫瘍を主に行った。その成果は、図1に示した。移植したヒト組織の殆どは維持されるが、3-4カ月で消失する例が少数例でみられた。SCID マウスへの継代移植を行い2-3代継代しても増殖の遅いもの(継代移植後6-8ヵ月

たっても腫瘍が大きくなる)は中止し、6ヵ月以内に大きな腫瘍を形成するものを選び順次プログラムフリーザーにて凍結保存した。図2に示すように緩慢法(-0.1°C/min)では、20年前に凍結したヒトがん組織がもとのまま再生された。急速凍結法は、難移植性ヒト腫瘍には不向きであり消失した。

図1 Super-SCIDマウスへのヒトがん組織の移植、プログラム凍結・再移植

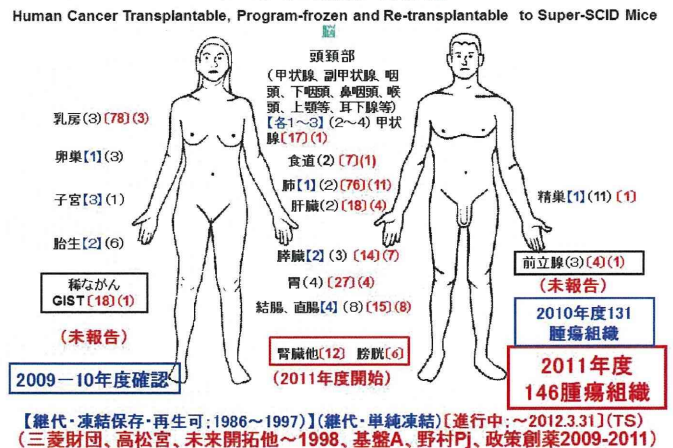


図2

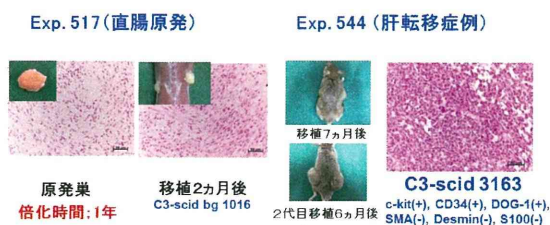
ヒト組織のプログラム凍結保存



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)(22年度報告)。移植後腫瘍が大きくなるにつれマウス血中のヒト PSA 濃度が増加している。また、これまで誰も移植継代維持に成功していない GIST は、倍加時間がヒト体内におけると同様に(遅いものは1年)極めてゆっくりであるが、転移症例では比較的早く増殖し、凍結保存に

も成功している (図 3)。

図 3 GIST(消化管間質性腫瘍)(希少がん)



3. がんの浸潤、転移のフォロー；

SCID マウス体内でのヒトがんの進展をフォローするのに P S A など特異的なマーカーがあると大いに役立つことは、これまでの報告書に記載した (野村、野々村、小原)。しかし、ヒトがん組織を移植した際に、局所的にマウス腫瘍が誘発されることが極く稀にある。ヒトがん、マウスがんの識別また、ヒトがんのマウス体内への浸潤、遠隔転移識別には、病理組織学的、免疫学的手に加え、より普遍的な手技が必要である。最近、マイクロサテライト解析法により迅速、客観的に識別することに成功した。マイクロサテライト変異検出法は、梁が確立し、22、23年度研究分担報告者に記載した。ヒトがん組織を継代、移植することにより巨大なヒト腫瘍を形成するが、がん種により周辺組織への浸潤に加えて、腋窩部、鼠蹊部、肺門部リンパ節、肺、肝等内臓に腫瘍を形成することがある。これがマウス由来かヒト由来か、病理組織診断に加え、客観的な証拠を得るのに用いた。病理学的にヒトがん組織の転移を疑っていた腫瘍は全てヒトマイクロサテライトパターンを示した。また、稀であるが、SCID マウスへのヒト腫瘍移植部位にマウス白血病が発生することもあるが、この場合も早急にヒト、マウス由来の診断を下すのに役立った。ヒト悪性腫瘍の内、悪性度の高い胃がん (スキルス) について、研究分担者の梁が詳細に 23 年度研究分担報告書に記載している。

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)。ルシフェラーゼ標識したこれらの細胞塊を SCID マウスに移植することにより、可視化し、トランスすることに成功した (小原)。

5. ヒト正常組織・細胞の長期維持

ヒト正常組織の移植に関しては、甲状腺組織、肺組織および胎芽組織を用いて行っている。特に、ヒト正常肺組織は、がん組織切除時に切除せねばならぬことが多く重点的に行った。甲状腺組織も同じである。これらヒト正常肺、甲状腺組織移植 SCID マウスに対し、放射線障害、宇宙環境 (放射線と重力) の影響を調査した (本行、梁、野村)。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)。

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

ヒトがん組織からの病原性ウイルス検出に関しては、ヒトへの感染を危惧されているものは、手術前に検査されており、陰性患者由来の組織のみ SCID マウスへの移植を行っているためか、継代維持している腫瘍組織 38 例からは病原性ウイルスは検出されなかった。但し、EBウイルスが調査した 38 症例の約 8 割に検出されている。日本人の 8 割が EBウイルス感染があるのも事実であり、更なる検討を要する。

D. 考察

ヒト悪性腫瘍に関しては、その特性に応じ適切な SCID マウスに移植することにより、継代維持、再生可能なたちでの永久凍結保存が可能であることが示された。しかも、マウス体内で、ヒト腫瘍の浸潤、遠隔転移もフォローすることができる。本研究を、全ての臓器腫瘍において確立するとともに、各ひと腫瘍の持つ病態 (形態、分子レベル) を併せることにより、医薬品等の有効性、安全性を評価する基盤となる。一方、正常、疾患組織の継代維持が可能なことから、放射線、環境有害物質の人体影響評価の基盤ともなる。

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) 各種ヒト腫瘍組織の再生可能な形での凍結保存、これまで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の成功、(3) ヒトがんの浸潤、遠隔転移の同定と解析、(4) ヒト培養がん細胞の in vivo 進展の分析、(5) ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持、(6) 移植ヒトがん組織でのウィルス検査について研究し、当初予定を大きく超える成果を得た。

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) Masao Iwamori, Akihiro Sakai, Norihito Minamimoto, Yuriko Iwamori, Kyoko Tanaka, Daisuke Aoki, Shigeki Adachi and Taisei Nomura. Characterization of novel glycolipid antigens with an α -galactose epitope in lactobacilli detected with rabbit anti-Lactobacillus antisera and occurrence of antibodies against them in human sera. *J. Biochem.* 150:515-523, 2011.
- 2) Miyake T, Ueda Y, Matsuzaki S, Miyatake T, Yoshino K, Fujita M, Nomura T, Enomoto T, Kimura T. CRABP1-reduced Expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 13:715-722, 2011.
- 3) Dillip Kumar Parida1, Koji Wakame, Taisei Nomura. Integrating Complimentary and Alternative Medicine in Form of Active Hexose Co-Related Compound (AHCC) in the Management of Head & Neck Cancer Patient. *International Journal of Clinical Medicine.* 2: 588-592, 2012.
- 4) 野村大成、足立成基、梁 治子、畑中英子、菊谷 理絵、時田偉子、堀家なな緒、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、D. K. Parida、R. I. Bersimbay. 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究；放射線晩発影響の防護。 *Space Util. Res.*, 28, 2012 (3月、in press).

2. 学会発表

- 1) Taisei Nomura, Hiroo Nakajima, Tadashi Hongyo, Rie Kikuya, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Yoriko Tokita, Eiko Hatanaka, Nanao Yoshida, D. K. Parida, Koji Wakame. Inhibition of Radiation Induced Late Effects (Congenital Malformations and Leukemia) by Active Hexose Correlated Compound, AHCC in Mice. 19th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, Sapporo, Oct. 15-16, 2011.
- 2) Taisei Nomura. Fukushima Nuclear Plants Accident: Radiation Effects on Human Health, “Philosophy on Safety and Conscience” in Japan. 19th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, Sapporo, Oct. 15-16, 2011.

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

(資料) 分担研究報告書

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。ヒト移植がん組織は、マウス体内で自然遠隔転移をするが、肉眼的転移判定が困難である。迅速、定量的方法を開発し、ほとんどの転移巣がヒト由来であることが判明した。

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 (Nomura, et al, 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調べることが可能になった。その中でも、甲状腺はヒト・動物の発達や成長に重要な内分泌器官の 1 つであり、放射線や内分泌かく乱物質に感受性が高い器官である。Super-SCID に移植した正常ヒト甲状腺の長期維持期間中（約 3 年）移植後約 1 週間目と比べ病理学的変化、マウス血清中のヒト甲状腺ホルモン (T3) 量の変化はほとんどみられず、甲状腺刺激ホルモン TSH によく反応していることがわかって (Fukuda, Nomura, et al, 1998)。

(1) 移植ヒト組織の遺伝子発現変化解析：

詳細な発現変化を検出するため、マイクロアレイを用い遺伝子発現の変化を調査する。

(2) 移植ヒト腫瘍のマウス体内での移植部腫瘍および自然遠隔部腫瘍の種由来判定法開発：

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確立し、創薬のための前臨床試験、経過観察の資源提供に役立てる。

B. 研究方法

(1) 移植ヒト組織の遺伝子発現変化解析：

1. 材料：ヒト甲状腺は、バセドウ氏病の患者（20 歳と 23 歳女性）より、美容上の理由で切除された甲状腺を共同研究者松塚博士（神戸、隈病院）より提供を受け用いた。これら患者の術前の甲状腺ホルモン値は正常範囲内であった。ヒト甲状腺移植と放射線照射：手術により切除されたヒト甲状腺（上述）を、高濃度抗生物質を含む生食中で 5-6mm 角に細かく切断し、Super-SCID（重度複合免疫不全）マウス（C57BL/6-*scid/scid*、または C.B17-*scid/scid*）の背中皮下に左右に 1 片ずつ移植した。ヒト甲状腺（20 歳女性）の SCID マウスへの移植前後の遺伝子発現変化を調べるために、移植後 1、2、3、4 週間目における遺伝子発現変化を調べた。

ヒト甲状腺（23 歳女性）の放射線照射は、移植マウスにガンマ線または中性子線を照射することで行った。中性子線照射は近畿大学原子力研究所原子炉 (URT-KINKI) でおこなった。照射野での 1W の出力における線量率は、中性子線とガンマ線がそれぞれ約 0.2 Gy/h である。実際マウスを用いての線量測定を行い確認した。ガンマ線照射は大阪大学医学部 Gammacell 40 Exactor の ¹³⁷Cs-ray による。線量率は、1.19 Gy/min である。合計 23 片の移植甲状腺は、0.2 Gy (4 片)、0.4 Gy (4 片) と 0.6 Gy (3 片) の中性子線を、1.0 Gy (4 片)、2.0 Gy (4 片) と 3.0 Gy (3 片) のガンマ線を照射した。8 片は非照射であり、非照射の同期の control として用いた。放射線照射は SCID マウスに移植後 1 日目に行い、2 週間後移植甲状腺をマウスより摘出した。

ヒト甲状腺における遺伝子発現レベルの変化は、非照射対照群については、移植前の甲状腺の発現レベルと比較し、照射群については、同期の非対照群と比較することで行った。遺伝子発現は GeneChip (HG-Focus Array; ヒト遺伝子 8500

個、Affymetrix Inc)を用いた。

2. 遺伝子発現の解析: SCID マウスより摘出したヒト甲状腺は、直ちに液体窒素で保存した。RNA 抽出は、液体窒素で保存したヒト甲状腺を液体窒素で凍結した金属ブロックで粉状にし (Cryopress, Microtec Co., Ltd), Trizol (Invitrogen) 中で homogenize したのち、抽出した。RNA 抽出から GeneChip 解析までは、Affymetrix 社のプロトコールに従って行った。発現解析は GeneChip operating software GCOS のより行った。

(2) 移植ヒト腫瘍のマウス体内での移植部腫瘍および自然遠隔部腫瘍の種由来判定法

1. 材料: SCID マウスに移植後のヒト胃がん (スキルス)、すい臓がんおよび前立腺がん等の、移植部腫瘍および自然遠隔部腫瘍を用いた。

2. マイクロサテライト解析法-定性的: 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は 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 マウス体内での移植部腫瘍および自然遠隔部腫瘍より DNA を抽出する。これらの 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と産物量を、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、TTTAATTTTGAGTGGGTTTG と TTGCTACATGTACTGATCTCCA (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。

3. マイクロサテライト解析法-定量的: マウス体内でヒトがん組織が増殖維持されるためにはマウスからの栄養源等が必要である。マウスの血管がヒト組織中に入り込んでいる状態になっている (組織像)。ヒト移植組織中または、転移

部腫瘍のマウス細胞の混合比を量的に調べるため、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 種類ずつにし、PCR の条件等を一定にして解析する。PCR の条件は、annealing 温度を、前者を 62°C、後者を 53°C に設定した。ヒト、マウスの正常組織から DNA (標準 DNA) を抽出し、template DNA (標準) の量 0.5-10ng の範囲で量をかえて PCR 反応のサイクル数を一定にし、PCR 反応を行う。それぞれの template DNA 量に対して、得られる PCR 産物量は、解析 (GeneMapper) 後、蛍光の強さ (例 図 4 のピークの高さ) として得られる。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。DNA 量を変えた標準 DNA と、10ng に設定した移植部腫瘍および転移巣 DNA を template に、同じ PCR 条件で、それぞれの template に対し、同時に PCR にかける。同 PCR 条件下で得られた被検体 DNA の 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。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) SCID 移植正常ヒト甲状腺組織の自然および、放射線照射による遺伝子発現への影響

1、ヒト甲状腺の移植による遺伝子発現の自然変化：

遺伝子発現の変化は、移植前組織の発現と比較すると、4倍以上の発現変化がみられた遺伝子数は数移植後1週間目で約3%であったが、2、3、4週間目ではそれ以上の変化はなかった(表-1、Mutat. Res, 2008)。これら変化のあった遺伝子は34遺伝子であり、ほとんどの非照射群に共通してみられ(図-1、Mutat. Res 2010)細胞の変性、再生に関する遺伝子であった。

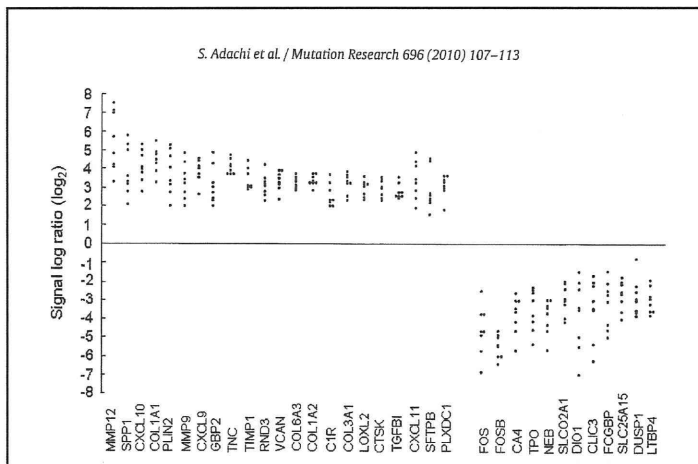
表 1 5

Changes in gene expression in the transplanted human thyroid tissues—comparison with surgically resected original thyroid tissue

Weeks after transplantation	No. of genes examined	Change in gene expression	
		Increase (> x4)	Decrease (< x(1/4))
1	8500	92	195
2	8500	88	138
3	8500	95	129
4	8500	87	127

Human thyroid tissues from a Graves' disease patient (20 years, female) were transplanted s. c. to SCID mice, and changes in gene expression (4-fold differences) were analyzed by GeneChip (Affymetrix HG Focus Array; 8500 genes).

図 1



2、移植したヒト甲状腺における放射線照射による遺伝子発現への影響：

遺伝子発現は、移植同時期の非照射対照群と比較すると、ガンマ線、中性子線照射とも、4倍以上の発現変化は、線量依存的に増加した(図-2、Mutat. Res 2010)。また中性子線照射はガンマ線照射に比べ、同じ線量当たりで約4.2倍の遺伝子発現変化をおこした。非照射群でみられたように照射群に共通してみられる4倍以上の遺伝子発現変化を示す遺伝子はほとんどなかった。しかし、ガンマ線3 Gy、中性子線0.4、0.6 Gyの高線量照射群では、14個の遺伝子のみが高線量群全ての甲状腺組織片に共通していた。これらの遺伝子は、変性と再生(8遺伝子、アポトーシス(3遺伝子)、転写因子(2遺伝子)

などであった(図-3、Mutat. Res 2010)。

図 2

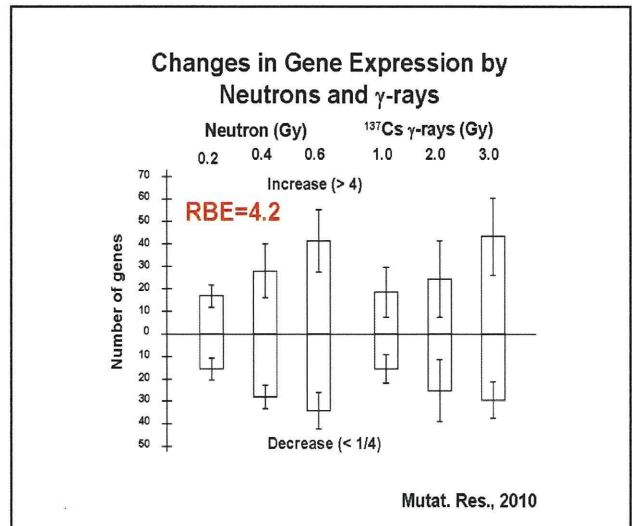
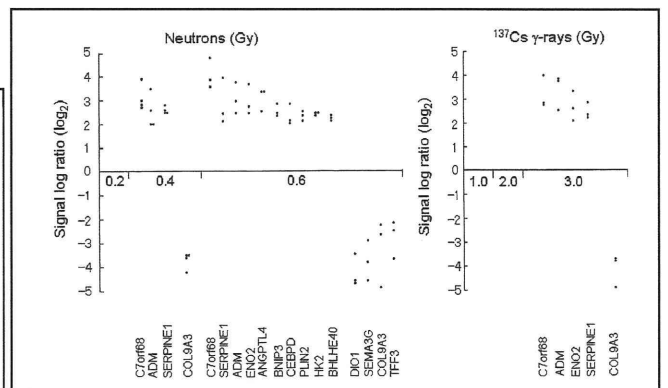


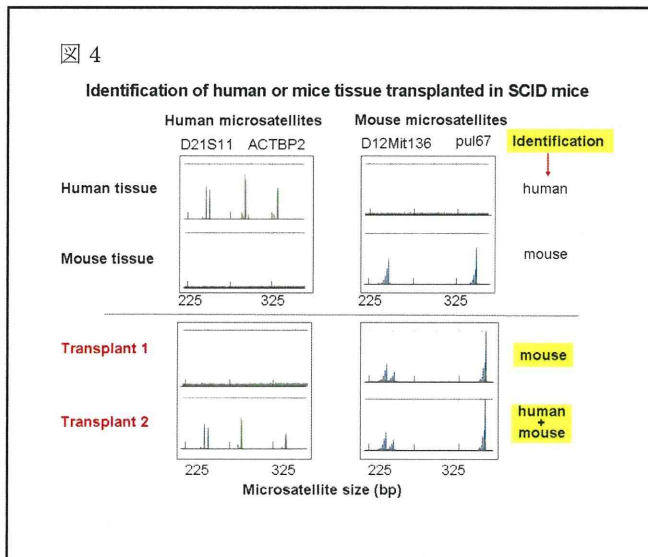
図 3



(2) 移植ヒト腫瘍のマウス体内での移植部腫瘍および自然遠隔部腫瘍の種由来判定法

1. 定性的解析

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が判別した(図4)。



組織について、DNA 量が、ヒトがマウスの 3 倍以下、1/3 以上：同割合 (=)、3 倍以上、5 倍以下：(>)、5 倍以上：(>>)、1/3 以下：(<)、1/3 以下：(<<) と、定義した (表 2、3、4)。遠隔転移がんは、いずれも、マウス由来腫瘍ではなく、ヒト胃癌 (スキルス)、すい臓がんそれぞれの転移巣であった。胃癌スキルスに関しては、15 例中すべての転移巣が、ヒト移植膵臓がんからの転移であった (表 2)。転移巣は、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 (表 2、3、4)。混入量は、移植後の 3 種の腫瘍について、移植部腫瘍、転移巣、にかかわらずヒト組織がマウス組織と同程度または、多い、がほとんどであった (表 2、3、4)。

2、定性的解析

1) 移植ヒト胃癌 (スキルス)、すい臓がんおよび前立腺がんのマウス体内での形成される腫瘍のヒト組織の割合。

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 (図 4 Transplant 2)、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ヒト、マウス組織のおよその「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 5)。PCR 産物の量は、PCR 産物の蛍光の強度、つまり、図 4 の例では、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。求めた template 量により、およその「比」を決めた。ヒト胃癌 (スキルス)、すい臓がん移植 SCID マウスでの腫瘍でのヒト由来およびマウス由来

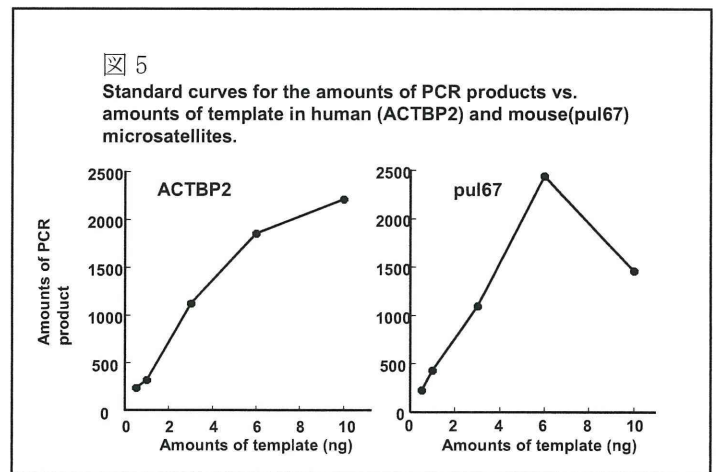


表 2：胃癌 (スキルス) 移植マウスにおける腫瘍部または転移部位での由来組織割合

移植代数	腫瘍/転移部位	組織量割合*
3 代目-1	腫瘍部 2481	H=M
3 代目-1	転移部 1 2482	H=M
3 代目-1	転移部 2 2483	H=M
4 代目-2	腫瘍部 2507	H>M
5 代目-3	腫瘍部 2629	H<<M
6 代目 4	転移部 2701	H=M
3 代目-5	転移部 2505	H=M
4 代目-6	腫瘍部 2583	H>M

4代目-6	転移部 2584	H>M
5代目-7	腫瘍部 2657	H>M
2代目-8	腫瘍部 2228	H+M+
2代目-39	腫瘍部 2231	H+M+
2代目-9	腫瘍部 2300	H>M
2代目-10	腫瘍部(biopsy) 2243	H>M
2代目-10	腫瘍部 2243	H>M
2代目-10	転移部 2324	H>>M
5代目-11	腫瘍部 2504	H=M
6代目-12	腫瘍部 2550	H>M
6代目-13	腫瘍部 2572	H>>M
6代目-14	腫瘍部 2585	H>>M
6代目-14	転移部 2586	H=M
6代目-15	腫瘍部 2699	H>M
5代目-16	腫瘍部 2561	H=M
7代目-17	腫瘍部 2592	H>M
7代目-17	転移部 2593	H=M
2代目-18	腫瘍部 2513	H>M
2代目-19	腫瘍部 2479	H=M
2代目-21	転移部 1より移植 2233	H+M+
2代目-22	転移部 2より移植 2239	H=M
2代目-22	転移部 3より移植 2245	H=M
2代目-23	転移部 4より移植 2240	H=M
4代目-24	腫瘍部 2295	H=M
4代目-24	転移部 2296	H=M
4代目-25	腫瘍部 2297	H=M
4代目-25	転移部 1 2298	H<M
4代目-25	転移部 2 2299	H=M
3代目-26	腫瘍部 2297	H>>M
4代目-27	腫瘍部 2242	H=M
4代目-27	転移部 2243	H=M
5代目-28	腫瘍部(biopsy) 2265	H=M
5代目-28	腫瘍部 2289	H=M
5代目-28	転移部 1 2290	H>M
5代目-28	転移部 2 2291	H>>M
5代目-28	後腹膜転移部 2292	H>M
6代目-29	腫瘍部;転移部 1より移植 2340	H>>M

6代目-29	転移部-2;転移部 1より移植 2342	H>>M
7代目-30	腫瘍部;転移部-転移部移植 2517	H>M
7代目-30	転移部;転移部-転移部移植 2518	H>M
8代目-31	腫瘍部;転移部-転移部-転移部移植 2573	H=M
6代目-32	腫瘍部 2306	H>M
5代目-33	腫瘍部 2293	H>>M
8代目-31	腫瘍部 2562	H>>M
8代目-32	転移部;転移部より移植 2567	H>>M
8代目-32	腫瘍部;転移部より移植 2568	H>>M
7代目-33	腫瘍部 2511	H>M
7代目-33	転移部 2512	H=M
8代目-34	腫瘍部 2569	H>>M
4代目-35	腫瘍部 2241	H>M
4代目-35	転移部 2246	H=M
4代目-36	腫瘍部 2238	H=M
3代目-37	腫瘍部 2627	H<M
3代目-20	腫瘍部-2代目 N2 保存より再移植 2538	H>M
3代目-20	転移部 1-2代目 N2 保存より再移植 2539	H>M
3代目-20	転移部 2-2代目 N2 保存より再移植 2540	H>M
3代目-37	腫瘍部-2代目 N2 保存より再移植 2627	H<M

*H; Human, M; Mouse H+M+;量的解析なし、+;有、-;無し

表3 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。