

201207012B

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23-24年度 総合研究報告書

研究代表者 吉田 東歩

平成25(2013)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23-24年度 総合研究報告書

研究代表者 吉田 東歩

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 11

III. 研究成果の刊行物・別刷..... 12

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 30,002 件の分譲依頼を受け、80,128 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、医療機関から提供された新鮮組織を約 180 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、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。

医薬品等の研究開発に必要なとされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含む HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付けで(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。国内でヒト組織バンクの統廃合の例はない。ヒト組織バンクの保管試料の移管及びヒト試料の供給事業の移管について HS 振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した。また、移管後の運営を見据え、バイオハザード対策、提供された試料に対して、連結不可能匿名化を連結可能匿名化に変更することの可否についても HS 振興財団の倫理審査委員会および資源供給審査委員会において検討した。

2 新鮮組織から細胞の調製

新鮮組織からの細胞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系癌手術で摘出された内臓脂肪組織(腸間膜、大網)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)、梅毒菌の否定試験を検討した。滑膜細胞については TNF- α など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、関節リウマチ関連遺伝子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開発

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 法を用いて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脂肪前駆細胞を無血清培養し、分化条件を検討した。また、ヒト正常間葉系幹細胞の 38 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。肝伊東細胞株 LI90 の機能・性状について検討した。筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発研究には L6 細胞、RD 細胞、ヒト筋芽細胞を用いた。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

ヒト初代培養細胞等、温度変化による死滅や性状の変化を起こす試料を安定的に輸送するための 5°C、32°C 輸送容器を試作し、国内で出荷先や季節を変えて実送試験を行い、性能を検証した。5°C 設定時には予め-14°C 程度に冷却した保冷剤 CV-2 500 g(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 5 個(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。

海外輸送用として、上記 5°C 輸送容器の耐久性、操作性を高めた改良型を試作し、様々な温度環境にて、温度制御能力を検証した。定温環境下で輸送された細胞の品質を評価するため、ラット臍島の遺伝子マーカーについて DNA アレイ、リアルタイム PCR にて解析した。

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。研究分担者の佐藤貴繁、平、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な加工処理済み試料も利用希望が高かった。組織アレイの供給について組織アレイ作製の受託を請け負うベンチャー企業と協議した。組織アレイは作製技術の開発とともに的確な医療情報に基づく組織選択が重要である。今後、医療機関の病理部門、組織アレイ作製の受託を請け負うベンチャー企業と連携し、ヒト組織バンクとして組織アレイの譲渡が可能な態勢作りを目指す。

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。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、膵臓を新鮮組織として供給可能とし、譲渡を開始した。平成23、24年度のバンクに提供された組織は72試料であり、組織の種類は、滑膜(非癌部位)46試料、大腸(癌/非癌部位ペア)4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、膵臓(癌と非癌部位の混在組織)1試料であった。提供者(72名)の内訳は、男性22%、女性78%、提供者の年齢の範囲は21~87歳で平均年齢は67歳であった。女性の罹患率が高い関節リウマチ患者あるいは変形性関節症患者からの滑膜の提供例が多数を占めたことから女性の比率が高まった。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5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。

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、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。

ヒト組織バンクを含む HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付で(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。ヒト組織バンクについては、保管している凍結試料、固定試料、組織から調製した細胞等加工試料の 217 試料の移管及びヒト試料の供給事業の移管について HS 振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した。両倫理審査委員会で審議の結果、移管することが承認された。承認理由として、保管試料は連結不可能匿名化された試料であること、試料及び事業の移管は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿った処置であること、HS ヒト組織バンクと(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクが同等であること、HS 研究資源バンク・ヒト組織バンク担当者が引き続き当該業務を担当することで業務の継続性が確保される、等である。

今回、新鮮組織の取り扱いに焦点をあて、既知あるいは未知の病原性因子を含む可能性のある新鮮ヒト組織を安全に取り扱う上の標準作業手順書を作成した。また、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の改正に伴い、ヒト組織バンクで今後、連結可能な状態で供給することの是非について検討した。研究利用する立場からは、連結可能にすることで臨床情報や追跡情報の追加が可能となり、試料の有用性が増す。しかし、患者にインフォームド・コンセントを実施する際に、連結可能なことの説明を十分に行い、理解を得ることの困難性も議論された。

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 18 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、18 ロットの凍結細胞チューブ 1,080 本を得た。内臓脂肪前駆細胞については 13 名から提供された内臓脂肪から 10 例において細胞が調製でき、10 ロット 263 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 7 例であった。人工関節置換手術による摘出が 16 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 14 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 2 名で、平均年齢は 71 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 7.1g 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 60 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、大網)が提供された手術(全 10 例)は、腸間膜脂肪組織が提供された症例は 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。大網脂肪組織が提供された症例は胃癌手術の 1 例であった。提供者は男性 8 名、女性 2 名で、平均年齢は 67 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 2 名いた。BMI 値は肥満とされる 24 以上が 3 名、やせすぎとされる 20 以下が 3 名で BMI の平均値は 22 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 3.7g 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 26 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。細胞の機能的性状もチェックし、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)を陽性対照に用い、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。同様に HCV、HIV の検出系として、HCV ゲノム DNA、HIV ゲノム DNA の塩基配列を基にした合成 DNA を陽性対照に用い、HCV 用、HIV 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。HS ヒト組織バンクで調製した 2 種類のヒト滑膜細胞について、cDNA 試料を用いて検出実験を行った結果、HCV ゲノム、HIV ゲノムは検出されなかった。梅毒菌感染否定用としては、市販のキットを用いたリアルタイム PCR による同様の検出系において、陽性反応を確認し利用可能であることを確認した。

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。関節リウマチ患者の滑膜組織より調製した滑膜細胞の TNF- α による炎症反応性を関節リウマチ関連遺伝子(48 遺伝子)に関して調べ、変形性関節症患者由来の滑膜細胞と比較した。関節リウマチ由来では TNF- α 添加時に、CD80、IL-1 α 、IL-15、MMP-1、MMP-3、MMP-8、TLR2 等について mRNA 発現量の明確な増加が認められた。特に IL-1 α は顕著な発現増加を示した。変形性関節症患者由来の滑膜細胞では TNF- α 添加時に IL-15、MMP-1、TLR-2 について mRNA 発現量の増加が認められ、関節リウマチ由来と同様の傾向を示したが、MMP-3、MMP-8 については発現増加の程度が小さい傾向を示した。また HLA-DQ、HLA-DR、TLR3~TLR9 については、関節リウマチ患者由来滑膜細胞と変形性関節症患者由来滑膜細胞、共に大きな発現変動は観察されなかった。また、両細胞共に発現量が大きく減少する遺伝子は認められなかった。

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。

滑膜細胞、脂肪前駆細胞について間葉系幹細胞の性状を調べた。両細胞について細胞免疫染色法により間葉系幹細胞マーカー及び多能性マーカーの mRNA レベルでの発現解析を行った。その結果、CD105、CD29、CD90 の発現、CD11b、CD48 の非発現(或いは明確な発現非検出)が認められ、様々な細胞への分化能を持つことが知られている骨髄由来間葉系幹細胞と同様な発現パターンを示した。また、4 種類の多能性マーカーについても発現が認められた。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。

無血清培養法に関しては、ヒト脂肪前駆細胞の無血清培養と分化誘導を試みた。脂肪細胞分化は認められるものの、従来の血清を含む培地による分化誘導能と比較した結果、さらなる条件検討が必要であることが明らかとなった。

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 TERT 遺伝子導入不死化ヒト間葉系幹細胞株 11 種の、合計 38 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。

伊東細胞は脂肪肝、繊維肝、肝硬変等の疾患にかかわる細胞であり、重要な創薬ターゲットのひとつである。ヒト正常伊東細胞 LI90 株の細胞特異的マーカーの発現、脂肪滴の蓄積、TGF- β による活性化等の性状を検証した。LI90 細胞を α -smooth muscle actin (SMA)抗体により免疫蛍光染色すると、

一部に SMA 陽性の細胞が確認された。また、デキサメサゾン、IBMX、インドメタシン、インシュリン処理により、微細ではあるが対照よりも増大した脂肪滴が誘導された。

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。ヒト正常筋芽細胞を分化誘導処理すると、7 日目までには筋管様の構造の形成がみられた。馬血清 10%の処理においては、細胞が増殖したが、1%では増殖は抑えられた。また、dexamethasone, EGF は細胞の状態を良好にしたが、分化誘導には影響しないように思われた。いずれの処理においても、10 mM LiCl の添加は、myosin heavy chain 陽性の細胞の割合を高めた。

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 \pm 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。国内で出荷先や季節を変えて実送試験を行い、性能を検証した。5℃用輸送容器および 32℃用輸送容器では四季を通して、いずれの地域でも定温が保たれ、非凍結細胞の定温輸送に問題がないことが確認できた。

海外輸送用として、上記 5℃輸送容器の耐久性、

操作性を高めた改良型を試作し、様々な温度環境にて、温度制御能力を検証した。試作容器で輸送を想定した期間中に温度の上昇が認められた。定温が保たれた時間は 30 分~3 日間で、輸入に最低限必要な 4 日間に至らなかった。梱包した状態を詳細に確認したところ、ヒーターの温度センサー埋め込み位置と保冷剤が直接接触していた可能性が判明した。このため、センサーが輸送箱の実温度よりも低い温度を感知して通電し、ヒーターを過剰に作動させた可能性を疑い、低温輸送容器の壁面厚、蓋の形状および梱包方法に改良を加えた。しかし、根本的な改善はみられず、現在、さらに原因究明調査を継続中である。

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 492 試料受け入れ、51 研究機関へ 606 試料を譲渡した(一部は、受け入れた試料を分割し、譲渡を行った)。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。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。

また、バンクの運営形態についても検討し、医薬品等の研究開発に必要とされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含む HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付で(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。HS 振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した結果、移管が承認された。国内のヒト組織バンクの統廃合の例はない。米国では、10 年間利用されなかったヒト組織は、廃棄、保管継続あるいは外部機関へ移管するルールがある。今後、ヒト組織バンクの統廃合で、貴重なヒト組織が失われないよう、インフォームド・コンセントの修正、ルール作りが必要であろう。また、今後は、ヒト組織バンク間で共通の処理法や品質管理法の標準作業手順書を作成し、これに従って調製したヒト組織を収集、保管すべきである。

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。

ヒト試料の品質管理では、病原性ウイルス等の感染否定試験が重要である。今回、リアルタイム PCR 法による HCV 及び HIV 検出系について検討し、HBV 検出系と同程度の高感度な(検出限界;陽性対照 DNA 0.01 pg)試験系を設定した。両系共に、ウイルスゲノムの有無を迅速に判定可能である。今後、検出用試料の調製に関しては、ウイルス陽性細胞等を陽性対照に用いた検討を行う。また、当バンク保有の資源化されたヒト由来の滑膜細胞及び脂肪前駆細胞、及び B 細胞株等について、ウイルス感染否定試験を順次実施し、高品質化を図る予定である。

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。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。分化した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。続いて、無血清培地によるヒト脂肪前駆細胞の培養を検討した結果、生理的インスリン濃度環境下および無血清培養環境下、いずれにおいてもヒト組織由来細胞の脂肪分化を確認することができた。特にヒト皮下脂肪細胞の生理的インスリン濃度環境下では分化効率が高かったが、他の3条件では分化効率が劣った。今後さらに検討を加えることにより分化効率を改善できる可能性が十分にあると考えられる。

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38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。今回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。

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。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のエピ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の作用をミミック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。

肝伊東細胞の培養法および性状の検討に関しては、ヒト肝伊東細胞株LI90が α -smooth muscle actinを発現していることが確認された。この結果は、LI90細胞が活性化した肝伊東細胞としての性質を持つことを保証するものである。活性化した肝伊東細胞は肝硬変をはじめとする肝疾患において重要な役割をはたすことから、本成果は、創薬研究におけるLI90細胞の有用性を高める付加価値となった。また、LI90細胞に対して脂肪滴を誘導する検討においては、脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導と同様の手法によって脂肪滴の出現をみた。この結果は、伊東細胞が脂肪前駆細胞と類似した機構によって脂肪滴を形成することを示唆している。脂肪肝では伊東細胞にも中性脂肪が蓄積することが知られており、本成果は脂肪肝等の肝疾患への創薬研究へのLI90細胞の利用に役立つものと思われる。

温度調節機能を待たせた輸送容器の開発に関しては、国内用の32 $^{\circ}$ C輸送容器について平成23年度に試作した仕様で定温が保てることが実際の輸送試験で確認できた。5 $^{\circ}$ C輸送容器では夏季の高温の影響を受けることが判明したが、保冷剤の数を増やすことで、定温が保たれていることが確認できた。また、電池ボックス連結により厳寒期や翌日到着が難しい地域にも容易に対応が可能となった。今後も継続的に実地データを蓄積し、将来的には非凍結細胞のみならず、移植用組織運搬やiPS細胞などから分化した細胞の輸送など応用範囲を広げていきたいと考えている。

海外用では今回の検討では至適条件の確立には至らなかった。保温性改善の目的で肉厚にするために外寸を大きくしたことにより電池・ヒーター・保冷剤の容積バランスが崩れたと推測され、至適条件を確立するためには詳細な条件検討が必要と考えられた。

定温輸送細胞の品質評価系のモデルとして選定した腓島29遺伝子、外分泌細胞11遺伝子の有効性を証明するためには、年間を通して様々な気温環境下で、幅広いエリアへの実送試験データの蓄積が必要である。また、遺伝子発現解析データとグルコース刺激によるインスリン分泌試験との相関を確認する研究も必要である。今後も継続的にこれらのデータの蓄積、輸送容器やその使用手順の改良を行いたい。

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。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、膵臓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。

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、迅速かつ高感度なHBV、HCV、HIV否定試験系を設定した。バンクで調製した新鮮組織由来細胞の機能的性状を精査するためにリアルタイムPCR法を用いたmRNAの発現解析により、滑膜細胞に関しては、TNF- α による反応性を関節リウマチ関連48遺伝子について調べ、関節リウマチの病態をある程度反映する有用な知見を得た。間葉系幹細胞としての滑膜細胞及び脂肪前駆細胞の分化能に関する発現解析により、これらの細胞が多能性を有することが推測された。これらの資源の再生医療研究における利用が可能と考えられた。

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38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。ヒト正常伊東細胞LI90の細胞特異的マーカーの発現、脂肪滴の蓄積、TGF- β による活性化等の性状を検証し、LI90細胞の品質を保証することができた。

温度調節機能を待たせた輸送等の開発に関しては、生体機能を維持した初代細胞を多くの研究者に提供する事を目的として、非凍結状態での細胞輸送技術の確立を試みた。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を用い、国内で出荷先や季節を変えて実送試験を行い、性能を検証した。5°C用輸送容器および32°C用輸送容器では四季を通して、いずれの地域でも定温が保たれ、非凍結細胞の定温輸送に問題がないことが確認できた。海外輸送用として、上記5°C輸送容器の耐久性、操作性を高めた改良型を試作し、様々な温度環境にて、温度制御能力を検証した。温度制御能において、まだ十分な結果は得られず、今後の改良が必要である。今回開発した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。

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ー関節リウマチ患者由来滑膜細胞についてー、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」ー手術摘出組織および組織由来細胞の研究利用ー、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

II 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉田 東歩	ヒト組織バンク	Medical Technology	39(6)	518-519	2011
小阪 拓男	研究利用のためのヒト 組織及び細胞の供給	臨床薬理	43(2)	89-90	2012

「ヒト組織バンク」を知っていますか？

ヒト組織バンクとは？

一般に「ヒト組織バンク」とよばれるものには、皮膚バンクなど移植を目的とした医療用バンクと、研究用のヒト組織を提供するバンクがある。本稿では、研究用ヒト組織バンクを紹介する。

病気の原因の解明、診断、治療法の開発、薬の有効性や安全性の研究には、ヒト組織が不可欠である。アメリカでは、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各地にあり、組織から細胞などに加工する企業も存在する。ヨーロッパでは動物愛護運動が盛んで、動物の代わりにヒト組織を用いた実験法の開発が進んでいる。日本でも、研究用ヒト組織の需要が高まり、国の倫理指針も整備されたので、2001年、国内初の公共的ヒト組織バンクがヒューマンサイエンス（以下HS）研究資源バンク内に設立された。現在、HSヒト組織バンクは国内の12医療機関と提携し、患者から提供していただいた組織を、医学・薬学分野の研究者に譲渡している¹⁾。最近では、神奈川県立がんセンターなど国内の数カ所の医療機関にヒト組織バンクが設立され、難病・再生医療の研究や薬の開発に活用されている。

手術摘出組織の提供

日本では、法令により移植不適合臓器の研究利用が不可能なため、手術で摘出された組織が研究用として提供されている。手術摘出組織は病理部門で診断に用いられるが、その残った部分を患者の同意を得て提供していただいている。

医療機関では、インフォームド・コンセントの取得、組織の摘出、保存処理、提供者の診療情報の提供、匿名化などの業務が行われている（図1）。自分の生命や健康が危機に瀕している手術前の患者やその家族に対するインフォームド・コンセントには、十分な配慮が求められる。善意で提供していただいた組織を有効に研究利用するため

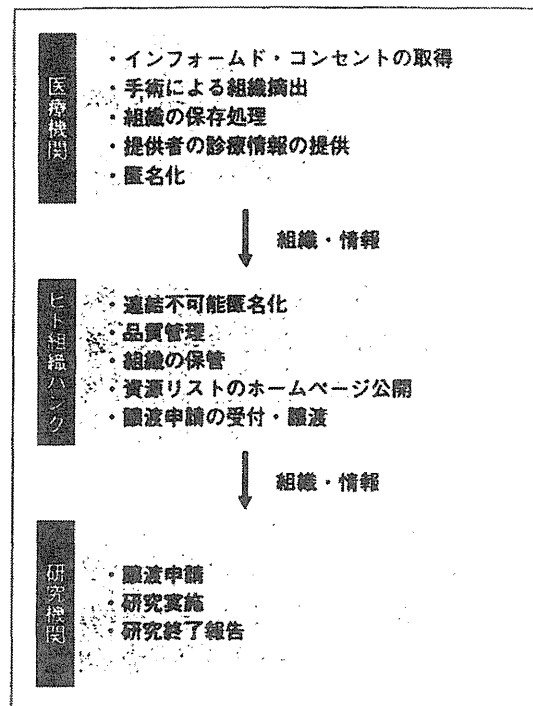


図1 ヒト組織バンク業務の流れ

には、組織の変性を抑えた状態で処理、運搬することが必要である。未来の医療のため、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協力していただいている。また、医療機関、ヒト組織バンク、研究機関に設置された倫理委員会では、患者に不利益はないか、研究が適正に行われているかなどの厳重なチェックが行われる。

ヒト組織の研究利用

提供される組織は、癌手術で摘出された組織が多く、胃、食道、大腸、肝、皮膚などの癌部位とその周辺の非癌部位、その他は内臓脂肪、滑膜などで、平均の組織量は約2gである。保存状態から凍結、固定、新鮮（冷蔵）の3種類に分類される。凍結組織は、摘出後に急速凍結された組織で、

譲渡先の研究機関において DNA, RNA, 蛋白質が抽出され、生化学的・分子生物学的研究に利用されている。凍結肝組織からは、ミクロソームが調製され、薬物代謝活性の研究に利用されている。固定組織は、ホルマリン固定したパラフィンブロックで、組織・形態学的な研究だけでなく、遺伝子発現の解析にも利用されている。新鮮組織は、「生きた」状態の細胞を研究利用したいという要望に応えるため、摘出後数時間以内に冷蔵状態で研究機関まで届けている。

現在、HS ヒト組織バンクでは、皮膚、滑膜、内臓脂肪、大腸、胃が譲渡可能である。皮膚は培養皮膚の作製や薬物代謝研究、滑膜は関節リウマチ薬の薬理学研究や滑膜細胞の増殖制御研究、内臓脂肪は脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化調節機構の研究、大腸・胃は癌研究の目的で利用されている²⁾。また、最近、バンクにて新鮮組織から細胞を調製し、譲渡する業務も始めた³⁾。

患者の善意に基づく無償の提供である手術摘出組織を研究者に譲渡し、医療の進歩に貢献することがヒト組織バンクの使命である。このヒト組織バンクの活動を医療機関で働く方々に理解していただき、広く国民の協力が得られるようになることを目指したい。

文献/URL

- 1) 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団：http://www.jhsf.or.jp/index_b.html
- 2) 吉田東歩：ヒト組織バンクから供給される手術摘出組織の研究利用。日本薬理学雑誌, 134: 315~319, 2009.
- 3) Kasamatsu, A., Satoh, M., Yoshida, T., Kosaka, T.: Response of human fibroblasts-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis to inflammatory stimulation: quality control findings. *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 29: 167~172, 2010.

●解説 吉田東歩

(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
ヒューマンサイエンス研究資源バンク所長)

イヌ・ネコ咬傷と *Capnocytophaga canimorsus* 感染症

はじめに

ペットフード協会の統計(2009年)によると、少子化やペットブームの影響もあり、イヌ・ネコの飼育総数は、2,200万頭(イヌ:約1,200万頭、ネコ:約1,000万頭)と増加し、15歳以下の子ども人口(1,700万人)を大きくこえた。これらイヌ・ネコの多くは室内飼育され、ヒトと密に生活するようになり、動物からの感染が問題となってきた。

イヌ・ネコ咬傷

玄関先でイヌを飼育していた1970年代には、咬傷事故は年間17,000件であった。室内飼育が進み、1990年以降は咬傷事故は減少したが、それでも年間6,000件を下限に推移している。イヌによる咬傷事故が発生した場合、飼い主は翌日までに最寄りの保健所に届け、ヒトを咬んだイヌを獣医

師に受診させ狂犬病の鑑定を受けさせなければならない。このような行政指導により、イヌでは咬傷事故件数を把握しているが、全数把握ではなく、届け出た飼い主のみの数である。しかし、ネコの咬傷事故統計数は不明である。

イヌ・ネコ咬傷による感染症として、パスツレラ菌、バルトネラ菌、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌、破傷風なども問題となる。

Capnocytophaga canimorsus 感染症

Capnocytophaga 属菌は通性嫌気性グラム陰性桿菌で、ヒトやイヌ(92%)・ネコ(86%)の口腔内に常在する。ヒトでは、歯周病関連菌として、日和見的に全身感染を起こすことが知られている。獣医学領域では、動物に症状がなく、比較的新しい菌なのでなじみが薄い。ヒトへはイヌ・ネコの咬傷や搔傷により感染し、きわめてまれに重篤例

(記録) 第 32 回 日本臨床薬理学会年会 2011 年 12 月 1~3 日 浜松
シンポジウム 2: ヒト組織を用いた臨床薬理学研究の発展

3. 研究利用のためのヒト組織及び細胞の供給

小 阪 拓 男*

1. はじめに

ヒューマンサイエンス研究資源バンク (HS バンク) はヒューマンサイエンス振興財団によって運営されており、大阪府泉南市の関西空港の対岸にある。HS バンクは、1995 年 10 月に開設され、細胞、遺伝子などを収集、品質管理し、産学官の研究者に分譲する業務を行ってきた。HS ヒト組織バンクは、ヒト組織を研究用として譲渡する国内自給型の非営利・公共的なヒト組織バンクとしてスタートした。現在、国内の 14 の医療機関と提携し、対象とするのは「外科手術で摘出された病変組織と付随する正常組織」で、通常は検査、診断に不要で廃棄される組織を研究用に提供いただいている。また倫理面の配慮としては、ヒト組織バンクへ研究利用のために組織を提供することについての、提供者のインフォームドコンセントを取得し、個人情報保護のためにバンクにて連結不可能匿名化を行う。また、医療機関、研究機関、HS 財団のそれぞれの倫理委員会において審査を行い、研究機関へ譲渡する。

2. ヒト組織バンクから譲渡可能な試料

ヒト組織バンクから譲渡する試料には、凍結組織、固定組織、新鮮組織、加工組織がある。組織の種類としては、肝臓、胃、大腸、甲状腺等の癌および非癌部位がある。凍結肝組織や加工試料の肝細胞や、肝ミクロソームは、薬物代謝研究等へ利用される。加工試料の口蓋扁桃リンパ組織およびリンパ球は、免疫研究等に多用されている。また新鮮組織として、大腸、胃、食道、膵臓の癌部位と非癌部位および、滑膜、皮膚、内臓脂肪があり細胞の生理学的研究に利用されている。その他、新鮮滑膜組織や脂肪組織からバンクで細胞調製した滑膜細胞と脂肪前駆細胞がある。近年は、新鮮組織と新鮮組織より調製した細胞の利用希望が増えており、譲渡に力を入れている。

3. 新鮮組織の譲渡

新鮮組織は 2006 年より譲渡を開始している。新鮮組織

は、医療機関からバンクに提供予定日時の連絡が入ると、複数の研究機関とマッチングを行い、譲渡先の研究機関に提供予定日時の連絡をする。バンク担当者は、診療情報を入力して連結不可能匿名化を行い、データシートを作成する。譲渡日となる手術日には、摘出された組織を可能な限り速やかに、冷蔵状態でデータシートとともに研究機関へ輸送する。

滑膜は、関節リウマチ患者あるいは対照となる変形性関節症患者の人工関節置換手術等の整形外科手術において摘出され、関節リウマチに関する研究等に利用される。正常皮膚は乳癌手術等で摘出され、培養皮膚の再生医療研究等に利用される。また最近、良性腫瘍摘出手術で摘出される正常皮膚も譲渡可能となった。大腸、胃等の癌部位および非癌部位は、消化器系癌手術で摘出され、癌の研究等に多用されている。内臓脂肪は、消化器系癌手術で摘出された腸管膜脂肪組織等で、糖尿病等の生活習慣病の研究に利用される。また最近分娩時に摘出される臍帯組織も譲渡可能となり、血管内皮細胞等の分離源としての利用が期待される。これらの新鮮組織について、2006 年 9 月の譲渡開始から 2011 年 10 月までに医療機関より供給された新鮮組織の組織量は 1~10 g で、複数の医療機関から合計 114 例の組織が提供され、15 の研究機関へ譲渡した。消化器系の癌組織が多く利用されている。また最近は関節リウマチの研究用として関節リウマチ患者由来滑膜組織および対照となる変形性関節症患者由来滑膜組織の利用が増加している。

4. 新鮮組織から調製した培養細胞の品質管理

「新鮮組織から調製した培養細胞」の研究機関への譲渡を 2009 年より開始した。医療機関から供給された内臓脂肪、滑膜組織をヒト組織バンクに受け入れ、組織より細胞を分散して細胞培養を行い、プログラミングフリーザーにより緩慢凍結し保存する。この凍結細胞を再培養後に、生細胞数、形態、増殖性、継代数などの一般的性状検査に加え機能的な性状検査を行う。マイコプラズマ等の微生物汚染のないことを確認した後、研究機関へ譲渡する。脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化能を調べた結果、Oil red-O で染色される脂肪滴をもつ脂肪細胞へと分化する細胞を認め

* 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンク
〒590-0535 泉南市りんくう南浜 2-11

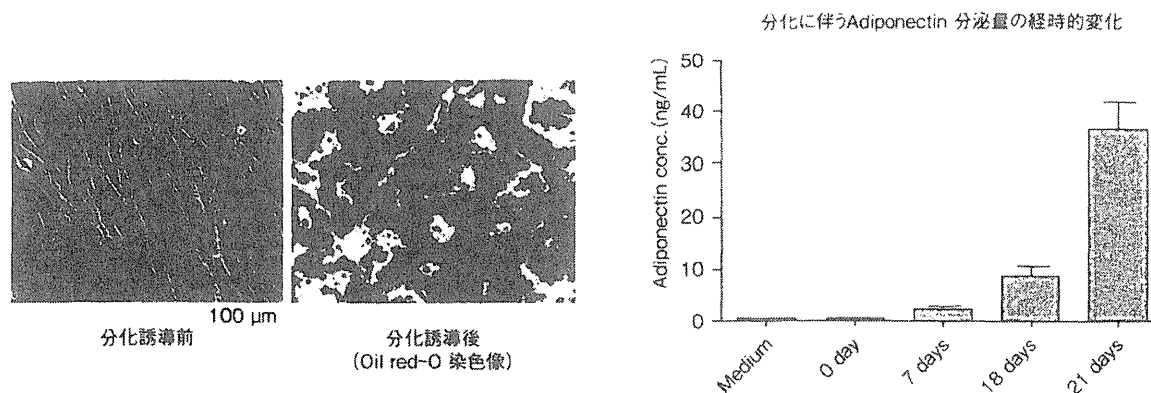


Fig. 1 脂肪前駆細胞の分化誘導と Adiponectin の産生

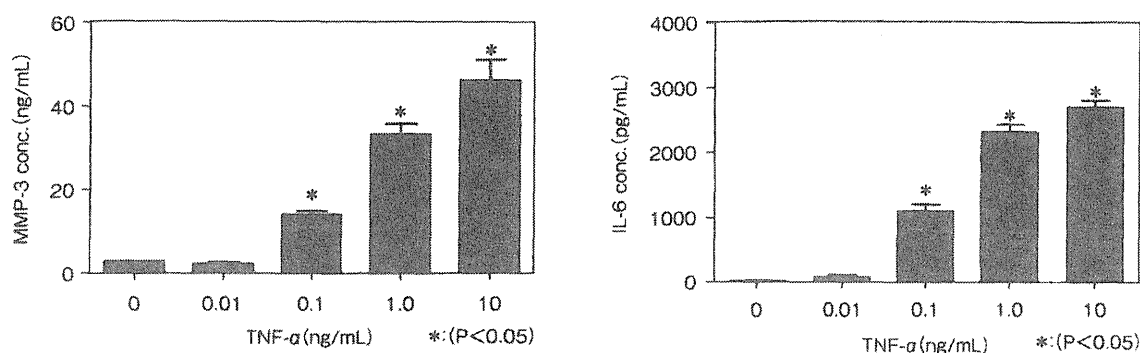


Fig. 2 TNF-α の MMP-3, IL-6 産生への効果

た。分化誘導に伴い、培養上清中への Adiponectin の分泌量が増加し、脂肪細胞の機能を有すると思われた (Fig. 1)。本細胞は、脂肪滴および Adiponectin の産生を指標として、糖尿病、肥満等の生活習慣病に対する創薬研究に利用可能であると考えられる。また、脂肪前駆細胞は CD105 陽性で間葉系幹細胞 (MSC) としての性状も知られていることから骨芽細胞への分化能についても調べた結果、分化誘導 3 週間後にはアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性陽性の骨芽細胞へと分化する細胞を認めた。本細胞は再生医療研究の材料となる MSC のソースとして利用可能と思われる。現在譲渡可能な脂肪前駆細胞は 9 ロットあり、ホームページで公開して譲渡を受け付けている。また最近、糖尿病患者由来の細胞 1 ロットが譲渡可能になった。現在、複数の研究機関へ譲渡している。

関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の機能的性状として、炎症反応性について調べている。炎症性サイトカイン TNF-α を細胞培養系に添加して、培養上清中の MMP-3 と IL-6 の産生を調べた結果、TNF-α の濃度依存的に MMP-3 と IL-6 の産生が促進され、炎症性反応を指標とした抗リウマチ薬の研究開発に利用可能と思われた (Fig. 2)。また、滑膜細胞は CD105 陽性で MSC としての性状も報告されていることから、分化能について検討した。脂肪細胞と骨

芽細胞へ分化させた結果、分化誘導 2 週間後に脂肪滴を含む脂肪細胞へ良好に分化する細胞を認めた。また分化誘導 3 週間後に ALP 活性陽性で、アリザリンレッドで染色される骨芽細胞へと分化する細胞も観察された。本滑膜細胞は脂肪細胞あるいは骨芽細胞へ分化する細胞を含むことがわかり、再生医療研究の材料となる MSC のソースとして利用可能と考えている。現在譲渡可能な関節リウマチ患者由来の滑膜細胞は 13 ロットあり、ホームページで公開し譲渡を受け付けている。また関節リウマチの対照となる変形性関節症患者由来の滑膜細胞が、最近譲渡可能となった。滑膜細胞は現在、複数の研究機関に譲渡しているが、さらに利用希望が増加している。

5. 今後の展望

今後は医療機関と連携をさらに強めて、種類、量、情報のより充実した高品質な組織を提供していただけるように努める。また外部の研究機関との共同研究等により、高度な組織保存、加工技術、品質管理法の開発を行う。そして試料をタイムリーに譲渡するために輸送法を検討する。また新鮮組織から調製する細胞の種類と機能的解析を充実させ、学会、セミナー等により広報し、創薬研究だけでなく再生医療研究への利用を推進していきたい。

