

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（分担）研究報告書

コンパニオン診断薬の開発を支援する高度ヒト細胞資源の充実化に関する研究

分担研究者 村上 孝 高崎健康福祉大学

研究要旨：平成 25 年度では、ホタル由来ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現する細胞の作製に当たり、高力価組み換えレンチウイルスの至適作製条件を設定した。実際、乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する 6 種類のルシフェラーゼ発現がん細胞株を樹立し、JCRB 細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の発光細胞資源であり、ヒトがん細胞を標的とした創薬開発試験では *in vitro* から動物実験 (*in vivo*) まで共通した評価系となりうる。改変標的細胞の性質に依存した遺伝子導入の課題は残るものの、ルシフェラーゼ発光を基盤とした細胞資源の充実化と認知向上によりがん創薬の促進を図りたい。

研究分担者

村上 孝

高崎健康福祉大学薬学部 教授

診断薬の開発促進に貢献することを目的としている。

B. 研究方法

1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

食道癌、皮膚癌（有棘細胞癌）、肝細胞癌などの細胞株ソースは JCRB 細胞バンクから供与を受け、各細胞の至適培養条件にしたがって細胞培養を行なった。今回、ホタル由来ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現する細胞の作製に当たり、組み換えレンチウイルスの至適作製条件の検討を行った。pLVSIN-CMV-puro (TAKARA) plasmid に pGL3 (Promega) 由来のルシフェラーゼ (luc) cDNA を組み込んだ pLVSIN-luc を作製した (XhoI-XbaI 部位に挿入)。pLVSIN-luc 発現ベクターをレンチウイルス用パッケージング plasmid (Lenti-X HTX Packaging Mix) とともに 293T 細胞にトランスフェクションし、組み換えレンチウイルスを作製した (検討条件は後述)。その後、標的がん細胞株に感染させた後、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ発現細胞株を樹立した。

2) ルシフェラーゼ発現細胞株のルミネッセンス発光
ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株について限界希釈系列を作製し、細胞数 (10^1 - 10^5 個) と *in vitro* ルミネッセンス発光量を試験した。機器は PerkinElmer 社、ARVO Light (1420 Luminescence counter) を用いた。また既存 luc 発現細胞株を用い、*in vivo* luciferase imaging 可能な発光量を求めた。実際、既に樹立 (寄託) されているルシフェラーゼ発現乳がん細胞株 4T1-luc の発光量を指標に BALB/c マウスの乳腺同所性移植を行ない、移植部位と自然転移病巣 (肺、脳、骨) につき

A. 研究目的

ゲノム情報を起点にがん創薬を促進する動きが加速化している。実際、EGFR、BCR-ABL、HER2 などを標的分子とした治療薬の開発は一定の治療成果を納めている。このようなチロシンキナーゼや受容体変異に基づく「がん原性遺伝子」の再評価、並びに新たな発見を目的とした次世代型高速シーケンサーによるがんゲノム解析が世界規模で進行している (Nat Genet 2012: 27, 760; Nature 2013: 502, 333)。この計画は未だ途中ではあるものの、KRAS や EGFR などに代表される細胞がん化を運命付ける変異遺伝子を有するがんの割合は、高々 3 割程度と捉えられている。すなわち、残り 7 割を占める多くのがんでは、その決定的な遺伝子変異を持たない可能性が至適されている。このような背景の中、次世代のがん創薬を一層促進するためには、実質的な薬効評価を簡便に行なえる動物モデルの存在は欠かせない。特にヒトがん細胞を (重症) 免疫不全マウスに移植する異種移植モデルは前述の様々な薬効評価に欠かせないツールである。またがんのコンパニオン診断薬やバイオマーカーの開発では、適切な標的分子を発現する細胞資源や生体試料の採取が可能な小動物モデルが求められる。

本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光による生体内イメージング評価系が利用できるがん細胞資源の充実により、がん創薬ならびにコンパニオン

Caliper 社 IVIS®を用いてイメージング試験を行った。マウスへの細胞移植では Isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL)による吸入麻酔を行い、左単径部乳腺に細胞接種を行った。微小転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を *ex vivo*に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

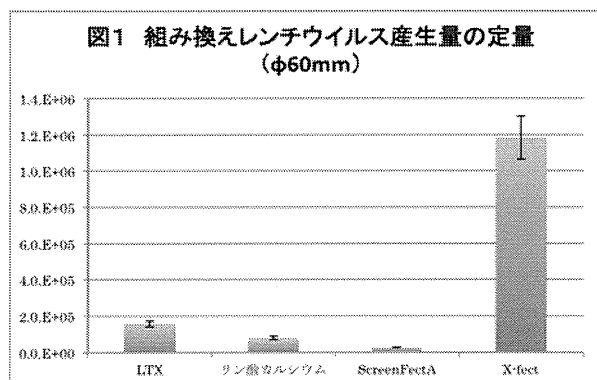
(倫理面への配慮)

本研究では、高崎健康福祉大学遺伝子組み換え実験安全委員会の指針にしたがい立案され、実験計画は同委員会の承認を得ている(承認番号:健大遺伝子第1102号)。また動物実験に関しても同大動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号:健大動物第1213号)。

C. 研究結果

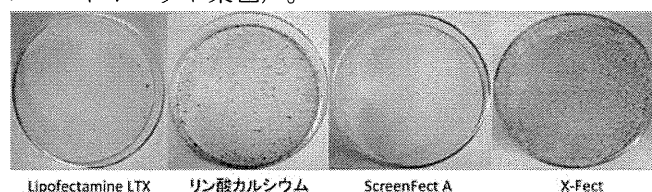
1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

効率的なルシフェラーゼ発光細胞を作製するためには、細胞周期(細胞分裂)に依存することなく導入遺伝子が発現する系が必要となる。その観点からレンチウイルスベクターの利用が優れている。そのため、本研究では新しく pLVSIN-CMV-puro (TAKARA) plasmidに pGL3 (Promega)由来のルシフェラーゼ (luc) を組み込んだ pLVSIN-luc を作製した。高力価の組み換えレンチウイルスを作製するため、パッケージング細胞293Tへの導入系を最適化した(径60mmシャーレ)。古典的なリン酸カルシウム法に加え、低毒性型リポフェクション試薬3種類 (ScreenFect A [和光純薬], Lipfectamine LTX [Life Technologies], Xfect [TaKaRa/Clontech]) について検討を行なった。各遺伝子導入方法(試薬)における個々の最適条件を luciferase assay により検討した後、それらについてウイルス産生量を qRT-PCR にて定量した(図1)。その結果、Xfect [TaKaRa/Clontech] を用いた方法で最も高い力価を得ることができた。



さらに遺伝子導入効率の評価には、pCAGGS-EGFP plasmidの導入(24時間後)によるGFP陽性率を測定した(Tali®イメージベースサイトメーターにて計測)。その結果、リポフェクション試薬3種類ではいずれもGFP陽性率はほぼ100%であり、試薬自体による毒性も観察されなかった(リン酸カルシウム法では細胞障害率が高く、約70%がトリパンブルー染色陽性であった)。実際、HCC-827ヒト肺がん細胞株を用いて、ピューロマイシン耐性コロニー形成数を測定したところ、概ね前述のウイルス産

生量に比例したコロニー数が得られた(次図:クリスタルバイオレット染色)。



これらの結果から、細胞改変に向けた組み換えレンチウイルスの作製にXfect [TaKaRa/Clontech]を用いることとした。当該システムを用い、本年度では利用可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株6種類を作製し、JCRB細胞バンクに寄託した(表1)。

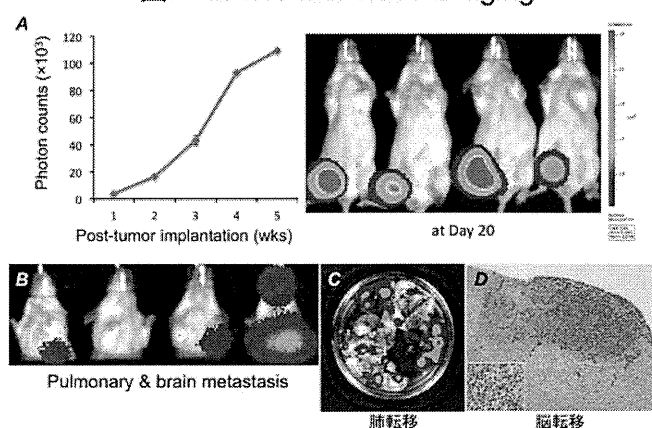
表1. JCRB 細胞バンクに寄託した発光がん細胞のリスト

由来組織	細胞株	Luc 発光
乳がん	SK-BR-3	Very Good
	MDA-MB-231	Good
食道がん	Ishikawa 3-H-12	Good
	TYUC-1	Very Good
皮膚がん	HSC-1	Very Good
	HSC-5	Very Good

2) ルシフェラーゼ発現細胞株のモデルマウスにおけるルミネッセンス発光

作製されたルシフェラーゼ発現がん細胞株の細胞数を 10^3 個- 10^5 個までの限界希釈系列を作製し、PerkinElmer社 ARVO Light (1420 Luminescence counter)を用いた発光量の測定を行った。 10^5 個細胞当たり10,000単位以上の高い発光を示すものを「very good」、10,000~3,000単位(/ 10^5 個)を「good」、10,000単位以下(/ 10^5 個)を「poor」とした。寄託細胞はすべて「good」以上のものとした(表1)。

図2 *In vivo* luciferase imaging



前述の *in vitro* で活性評価された数値が *in vivo* imaging 評価に耐えうるか否かを試験するため、既存の細胞株4T1-lucを用いて検討を行った。PerkinElmer社 ARVO Lightにおける4T1-luc細胞の発光値は約2,000単位/

10⁵個であった。この4T1-luc細胞（2X10⁵個）をBALB/cマウスの右単径部乳腺脂肪組織内に移植し、ルシフェラーゼ発光を経時的に評価した（図2）。その結果、約2,000単位/10⁵個程度で「good」と評価された発光輝度では、約4週間にわたり実質的な発光イメージ画像とともに定量的な腫瘍増大が観察された（図2A）。また、約3-4週目において血行性転移が観察され、肺および脳転移病巣を観察することができた（図2B）。これらの転移病巣は ex vivoに取り出したイメージング解析（図2C）や病理組織解析（図2D）においても確認することができた。しかしながら、原発部位（移植部位）における発光強度が増すにつれ、転移病巣は検出されにくいというIVIS®画像解析系の欠点が挙げられた。転移病巣の観察においては、原発部位を黒色布等で覆い、観察期間中決まったポジションを定める必要性があった。また、正面および背部からの撮影に位置によって検出される深部からの発光量が異なるため、評価において注意を払う必要があった。

D. 考察

生体内イメージング評価系の長所は使用する実験動物の数を大きく削減できることにある。とりわけ近年の生体内イメージング技術の発展は顕著である。がん創薬の薬効試験では、モデル動物体内での腫瘍動態をリアルタイムに把握し、評価することができる利点から、製薬業界においても汎用化されつつある。その際に、利用するイメージング用プローブはがん細胞の生存状態と相関するものでなければならない。各種生体内でのin vivoバイオイメージング方法について長所と短所を比較すると下表のようになる。

In Vivoバイオイメージング方法の比較

方法	レポーター	長所	短所
ルミネッセンス	ルシフェラーゼ	高感度、迅速、定量的に優れる	基質が必要
蛍光	GFPなど	基質が不要	バックが高い、定量性が低い(死細胞でも光る)
PET	-	糖代謝機能や血流、神経活動の観察が可能	陽電子放出核種の製造設備と投与が必要、遺伝子発現レベルとの相関研究
MRI	-	3次元解析、造影剤なしに血管の状態を観察可能	大がかりな装置が必要、遺伝子発現レベルでの観察不可

ルミネッセンス発光は生体透過性にも優れている

発光のプローブとして代表的なホタル由来ルシフェラーゼはATP要求性であり、細胞内ATPの状態を反映することから、細胞の生存状態とよく相関する。また発光波長は600nm付近と長波長側であるため生体透過性が高く、小動物を用いた画像解析に有利である。短所としては、発光には基質（ルシフェリン）投与が必要な点が挙げられる。これまでの試験経験では、マウス等の小動物を利用では、生体内の特定部位に基質が届かないことによる「発光しない」という問題は起きていない。生体表面に近い発光がより強く検出されること、黒色細胞（組織）では（発）光が吸収されてしまうため、検出感度が低くなることもある。また発光基質の性質としてセレンテラジンをを用いる必要のある

ルシフェラーゼでは、その基質特異性の違いから使い分けが易いように見える。しかし、セレンテラジン基質に由来する自家蛍光からシグナル/ノイズ比が低下してしまう欠点がある（必ずしも推奨できるものではない）。生命科学分野で多用されているGFPにおいては、細胞レベルでの個々の分子挙動を追跡する上では優れている。しかし、死細胞であっても緑色蛍光を発するため、薬効評価の観点では不向きである。またGFPは生体内イメージングにおいてもバックグラウンドが高くなるため、依然として創薬促進の用途ではルシフェラーゼに代表されるATP利用型の化学発光プローブが適している。

本年度プロジェクトにおいては、発現ベクターのシステムを至適化し、ルシフェラーゼ発光細胞を6種類登録することができた。その一方で、皮膚有棘細胞癌株HSC-5では、遺伝子導入後のピューロマシリン耐性細胞が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が存在した。そのためHSC-5-Lucは細胞クローンとして分取することとした。また、組み換えレンチウイルスはVSV-G（水泡性口内炎ウイルスのGタンパク質）をエンベロープにもつため、細胞種に関わらず感染が成立するものと考えられたが、腺癌に由来する食道がん細胞株KYAE-1は依然としてLuc改変が進まない状況にある。これまでの経験では、高分化型腺癌では難しい傾向にあることが判っている。細胞表面におけるVSV-G受容体（全ての細胞タイプに存在するリン脂質を認識）の性質や組み換えウイルスによる細胞毒性の可能性など検討課題が残った。現在、肝癌細胞に対するLuc改変需用があるため、引き続きHuh-7等を含む15種類の改変による細胞資源の充実化を進めて行きたい。

E. 結論

Luc発現改変がん細胞は、試験管内から動物実験までを一元的に評価できるため、がん創薬開発において有用な資源として期待されている。平成25年度では、乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する6種類のルシフェラーゼ(Luc)発現がん細胞株を樹立し、JCRB細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の細胞資源といえる。細胞改変における安定した遺伝子導入方法等には課題が残るものの、ルシフェラーゼ発光を基盤とした細胞資源の充実化を進めることによりがん創薬の促進を図りたい。

F. 健康危険情報

該当なし（省略）

G. 研究発表

1. 論文発表

- Morimura S, Sugaya M, Kai H, Miyagaki T, Asano Y, Tada Y, Kadono T, **Murakami T**, Sato S. Depsipeptide and roxithromycin inhibit proliferation of lymphoma cells by blocking ERK activation. *J Dermatol.* 2014; 41; 57-62.
- Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, **Murakami T**,

Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg*. 2013; 257: 542-7.

2. 学会発表

1. Matsui A, **Murakami T**, Ezaki T. Expression of CXCL17 in tumors promotes their progression by inducing CXCL17-responding CD11b⁺Gr-1^{high} cells. 5th International Meeting on Angiogenesis. Amsterdam, Netherlands, Mar. 12-14, 2014.
2. **Murakami T**. CXCL17 (DMC/VCC-1) expression by tumor cells recruits CD11b⁺Gr1^{high}F4/80⁻ cells and promotes tumor progression. Gradients and Signaling 2013. Okinawa Institute of Science and Technology Gradient University. Onna-son, Okinawa. Nov. 11-16, 2013.
3. 野口沙斗美、梶田昌裕、原田 忍、斎藤克代、**村上 孝**. 恒常的な上皮間葉転換刺激はマウス乳がん細胞株 4T1 の腫瘍進展を遅延させる. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日
4. 松居 彩、梶田昌裕、横尾英明、**村上 孝**. H-RAS^{G12V} 及び v-SRC による NIH3T3 細胞の形質転換とマウス個体内転移動態の特徴. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日.
5. 斎藤克代、舟山和夫、小林泰彦、**村上 孝**. 難治性がんに対するエピジェネティック制御と重粒子線感受性の増強. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日.
6. 松居 彩、森川俊一、**村上 孝**、江崎太一. 固形腫瘍における CXCL17 発現が及ぼす影響について. 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 栃木(自治医科大学)2014 年 3 月 27-29 日.
7. 手塚康裕、遠藤俊輔、松居 彩、佐藤篤子、斎藤克代、仙波憲太郎、高橋将文、**村上 孝**. インターフェロンλ 2 のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果. 第 54 回日本肺癌学会 東京 2013 年 11 月 21-22 日.
8. 佐々木和紀、湯田康勝、福岡勝志、西田志穂、林 譲、**村上 孝**、齋藤充生、大室 弘美. アトピー性皮膚炎患者への服薬やスキンケア等に関する情報提供のためのパンフレット作成を目的とした調査研究. 第 57 回日本薬学会関東支部会. 東京(帝京大学) 2013 年 10 月 26 日.
9. **Murakami T**, Matsui A, Hayashi M, Kajita M. *In vivo* metastatic behaviors of H-RAS (G12V)- and v-SRC-transformed NIH3T3 cells in athymic nude mice. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

10. Matsui A, **Murakami T**. CXCL17-responding neutrophil-like CD11b⁺Gr-1^{hi} cells promote tumor progression. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

11. Kajita M, **Murakami T**, Hayashi M. New methylated DNA biomarkers in circulating tumor genomes for the aggressive type of breast cancer cells. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

12. 斎藤克代、**村上 孝**. がん創薬を促進する発光ヒトがん細胞資源の開発とその利用方法. 第 8 回日本分子イメージング学会総会学術集会 横浜 2013 年 5 月 30-31 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
3. その他
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）
分担研究報告書

細胞資源におけるウイルス検出法開発に関する研究

分担研究者：清水 則夫 東京医科歯科大学 准教授

研究要旨

医薬品開発や再生医療研究を効率良く実施するためにはヒト培養細胞研究資源の有効活用が必要であり、培養細胞資源の品質が研究の質に直結するため、その品質管理の徹底が極めて重要である。特に研究用培養細胞資源への微生物汚染は不正確な実験結果を生む主要な原因であり、その対策として微生物汚染の有無を簡便・安価にチェックできる検査系の確立が求められる。本研究では、これまでに開発した網羅的ウイルス検査系を簡便に実施することを目指し、検査に使用する試薬を酵素も含めすべて乾燥・固化することにより作業者に起因する問題の低減と、随時検査を実施できる体制を構築することを目的に研究を行った。その結果、PCR 検査系において、性能を劣化させずに使用するすべての試薬を乾燥・固化する手法の開発に成功した。現在、性能を維持したまま安定に保存できる期間の検討と RT-PCR 検査系への応用を目指した研究を続けている。

A. : 研究目的

体性幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医療研究・医薬品開発が加速されていることに伴い、ヒト培養細胞研究資源の重要性が著しく増しており、実際、再生医療の研究に用いる多分化能を持ったヒト由来培養細胞のバンクへの寄託は増加傾向にある。今後、再生医療研究の質を高めるためには、ヒト培養細胞研究資源の品質管理法を確立し、研究に使用する培養細胞の品質管理を徹底することが極めて重要である。実際、培養細胞に微生物が持続感染すると、細胞の性質・増殖性、遺伝子発現パターン、動物に接種した際の細胞の挙動や動物の反応などに大きく影響する可能性があるため、細菌・真菌・マイコプラズマ・ウイルスの汚染状況に関

する情報は非常に重要である。さらに、近年、外国に細胞を出荷する際には、ウイルス・マイコプラズマ汚染状況に関する情報の添付を求められる事が多く、今後その必要性が増していくと予想される。

培養細胞に持続的に感染し、検出が難しい微生物として、特にウイルスとマイコプラズマが重要である。我々はこれまでに、マルチプレックス PCR 法を応用した網羅的ウイルス検査法を作成し、培養細胞資源のウイルス検査に応用し成果をあげてきた。本研究では、ウイルスの網羅的検査を簡便・迅速に実施するための研究開発を目的に研究を行い、具体的には使用する検査試薬をすべて乾燥・固化することにより、

必要なときに随時検査できる体制を構築することのための研究開発を実施した。そのようなあらかじめセットアップした Ready-to-Use の試薬（以下 RU 試薬と記載）が実用化すれば、随時ウイルス検査を実施できるとともに、作業者による試薬の取り違い・試薬の入れ忘れ・ペーティングミスによる試薬添加量の不安定性などの検査データが変動する可能性を低減し、安定した検査結果を得ることが可能になるとともに検査の自動化が非常に容易になる。なお、予備的な検討では、DNA ウイルスの検出を行う PCR 検査系と RNA ウイルスの検出を行う RT-PCR 検査系では試薬の作成法を変える等の調整が必要なことが示唆されたため、今回は DNA ウイルス検査を RU 試薬を用いて実施するための研究開発を行った。

B： 研究方法

1. 検査対象ウイルス

以下の DNA ウイルスを検査対象とした。

HSV1, 2, VZV, EBV, CMV, HHV6, 7, 8, BKV, JCV, ADV, EBV, PVB19

2. 増幅領域とプライマー・プローブ配列

GAPDH

F-tgtgctcccactcctgatttc

R-cctagtcccagggtttgatt

6FAM-aaaagagctaggaaggacaggcaacttggc-iowaBl
ack

HSV1/2

HSVF-cgcatcaagaccactcctc

HSVR2-GTCAGCTCGTGRTTCTG

HSV1-Cy5-tggcaacgggcccac-iowaBK

HSV2-6FAM-cggcgatgccccag-iowaBK

VZV

VZVF-tcactaccagtcatttctatccatctg

VZVR-gaaaacccaaaccgttctcgag

HEX-tgtctttcacggaggcaaacacgt-iowaBK

CMV

CMV4F-tcgcgcccgaagagg

CMV4R-cggccggattgtggatt

Cy5-caccgacgaggattccgacaacg-iowaBK

EBV (BMRF1 gene)

EBVF-ctgggcaaggagctgtttg

EBVR-ggccgcttgtaaaattgca

6FAM-ctcggctgtggagcaggctt-iowaBK

HHV6

HHV62F-gaagcagcaatcgcaacaca

HHV62R-acaacatgtaactcgggtgtacggt

Cy5-aaccctgctgcccgtccc-iowaBK

HHV7

HHV7F-cggaagtcactggagtaatgacaa

HHV7R-ccaatcctccgaaaccgat

HEX-ctcgcagattgcttggccatg-iowaBK

HHV8

HHV82F-cctgtcctctgtgtcccat

HHV82R-atcgttgctatttctttttgccc

HEX-cggcgctcagacattctcacaacc-iowaBK

ADV

ADVF-gacatgacttttgaggtgga

ADVR-tcgatgacgccgctg

6FAM-cccattgagagccccaccct-BHQ

PVB19

B19F-gggtttaagcacaagYagtaaaaga

B19R-cggYaaactccttgaaaatg

6FAM-cagctgcccctgtgg-MGB

BKV, JCV

F-ggaaagtctttaggtcttctacctt

BKVR-gatgaagatttattygccatgarg

JCVR-gaagacctgtttgccatgaaga

6FAM-atcactggcaaacat-MGB

HBV

F- gtggtgacttctctcaattttctag

R- ggacaMacgggcaacatacct

6FAM- tgctcgccgctttt –MGB

3. RU 試薬の作成

Primer.probe mix	2.7µl
Trehalose	3.0µl
X10 Buffer	1.7µl
100mM dNTP	0.17µl
Taq (1.5U)	0.6µl
Water	0.83µl

(primer.probe mix は、下記の各 well の検査項目に対応した primer と probe の混合物) 上記の試薬(合計 20µl)を 8 well strip の各 well に添加し、減圧遠心法により乾燥・固化した。8 well strip の各 well の検査対象項目は以下の通り。

1. GAPDH, 2. HSV1, HSV2, HHV7, 3. BKV, JCV, 4. EBV, VZV, 5. HHV6, PVB19, HHV8, 6. ADV, 7. CMV, HBV, 8. 予備

RU 試薬の保存安定性におよぼす Trehalose の影響を調べる目的で、Trehalose を上記の分量で添加した RU 試薬 Strip と Trehalose の代わりに水を 3.0µl 添加した RU 試薬 Strip の 2 種類を作成した。

作成した RU 試薬 Strip は、暗所・室温で保存した。

4. 検査実施

各検査項目に対するスタンダード、あるいは検査対象ウイルス陰性が確認されている試験細胞株の DNA300ng に各検査項目に対するスタンダードを添加した試験検体を RU 試薬 (8 well strip) の各 well に添加した。ピペティングを 10 回行って RU 試薬を完全に溶かし、シールを貼った後リアルタイム PCR 機 (CFX96: Bio-rad) にセットし、PCR 反応・結果解析を行った。

5. PCR 反応条件

Denature	95°C	10 sec
PCR	95°C	5 sec
	60°C	30 sec
	(45 cycle)	

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要な研究は行なわなかった。

C: 結果

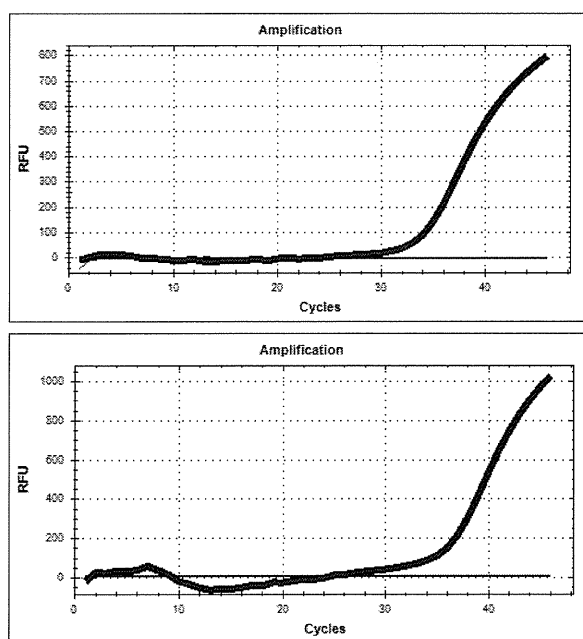
1. 安定化剤の性能評価

今回使用したウイルス検査系はこれまでの実験により 10 copies/reaction の感度を持つことが確認されている。RU 試薬を作成する際に安定化剤として Trehalose を加えた場合と加えなかった場合の保存安定性を作成後 1 ヶ月の段階で比べた。RU 試薬は暗所・室温で保存した。サンプルには検査項目の合成スタンダード (50 copies/reaction) を使用し各 well に添加したところ、Trehalose を加えなかった場合はすべての検査項目に関し陽性シグナルが検出されなかったが、Trehalose を加えた場合にはすべての検査項目から陽性シグナルが検出され、核酸増幅酵素を含めた試薬の保存に対する Trehalose 添加の効果が確認された。

2. RU 試薬の保存期間の検討

1 の実験で Trehalose の効果が確認されたため、Trehalose を添加した検査 Strip の保存期間と性能の劣化を検討する目的で実験を行った。実験は RU 試薬を作成後暗所・室温で保存し、1 ヶ月毎に合成スタンダード (50 copies/reaction) を含む試験サンプルを用いた検出操作を行う方法で実施した。その結果、6 ヶ月目の時点で問題なく増幅することが確認され、少なくとも 3 ヶ月間の保存は問題ないこ

とが確認された（下図を参照）。



図の説明：RU 試薬を作成した直後に検出操作を行った場合（上）と作成 6 ヶ月後に検出操作を行った場合（下）の比較検討結果（代表例として GAPDH スタンダードの検出を例示）。

3. 保存後の検出感度の検討

2の実験から6ヶ月間RU試薬を保存しても安定であるとの結果が得られたため、各検査項目の検出感度の測定を行った。その結果、EBVを除く他の検査項目はすべて10 copies / reactionの感度で検出できることが可能だった。EBVに関しては10 copiesのスタンダードが検出される場合と検出されない場合があった。

D: 考察

1. RU検査試薬の作成にはTrehaloseの使用が有効であり、作成したRU試薬は暗所・室温で保存することが可能であり、検査が必要な際に随時実施することができるとともに、作業者に起因するミスを大幅に低減できるため、検査結果の信頼性が非常に増すと考えられる。

2. 今回GAPDHと13種ウイルスの合計14

項目のRU試薬を作成し、6ヶ月保存後の検出感度を検討したところ、EBV以外の検査項目に関しては感度低下が認められなかった。EBVに関しては検査結果が不安定だったが、EBVの検査系は用時調製試薬を用いた際にも検出感度付近での安定性に欠ける場合もあるため、今回の実験で示された不安定性が試薬の長期保存に起因するかどうかは今後の検討課題である。

3. まだ予備的な検討段階だが、RNAウイルスの検出に使用するRT-PCR関連試薬をすべて乾燥・固化して長期保存することには成功していない。その理由は明らかではないが、RT反応に使用する酵素（Reverse Transcriptase）の保存安定性に問題がある可能性がある。解決法として添加する酵素量やトレハロースの増量が有効である可能性を示す予備的検討結果も得られているため、今後RU試薬の作成条件を検討してこれらの問題を解決していきたい。この取り組みは、上記のEBV検出の不安定性解消にもつながる可能性もあると考えている。

E: 結論

研究の質を担保するためには、使用する培養細胞資源の品質管理の徹底が極めて重要である。研究用培養細胞資源への微生物汚染は不正確な実験結果を生む主要な原因であり、その対策として微生物汚染の有無を簡便・安価にチェックできる検査系の確立が求められる。本研究では、これまでに開発した網羅的ウイルス検査系を簡便に実施することを目指し、検査に使用する試薬を酵素も含めすべて乾燥・固化することにより、検査の簡便化と作業者に起因する問題の低減することを目的に研究を行った。その結果、性能を劣化させずにPCR反応に使用するすべての試薬を乾燥・固化する手法の開発に成功した。現在、保存期間の検討とRT-PCR検

査への応用に関する研究を続けている。

F: 健康危険情報

事例無し

G: 研究発表

論文発表

- 1) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 324, 190-194(2013)
- 2) Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ.: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood* 121: 4512-4520(2013)
- 3) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N.: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration*, [Epub ahead of print] (2013)
- 4) Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in

patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*. 52(2):201-11 (2013)

著書

1. 北條浩彦、清水則夫(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ. 北條浩彦編 「基本編—原理と基本知識—リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー/プローブの設計手順 ②マルチプレックスの場合」 p72-74 羊土社, 2013
2. 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ. 北條浩彦編 「実践編—プロトコールを中心に—IV章 遺伝子量解析 15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」 p192-202 羊土社, 2013

国内学会発表

1. 今留謙一 松田剛 川野布由子 千葉佑規乃 新井文子 中澤温子 伊藤守 清水則夫 藤原成悦 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究 日本ウイルス学会 11 月神戸
2. 清水則夫 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 9 月 (東京)

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）
分担研究報告書

マイコプラズマ検査法に関する研究

研究分担者 原澤 亮 特定非営利活動法人いわて野生生物疾病研究センター 理事長
(岩手大学 名誉教授)

研究要旨

ヘモプラズマは哺乳動物を宿主とするマイコプラズマの一群で、赤血球に寄生して増し、感染動物に溶血性貧血を引き起すことが知られている。ヘモプラズマはこれまでの報告で述べたとおり、試験管内での人工培養に成功していないため、16S リボソーム RNA 遺伝子、16S-23S リボソーム RNA 遺伝子間スペーサー領域などの塩基配列に基づいて分類・同定が行われている。このほか、RNase P RNA 遺伝子も菌種に固有の塩基配列をもつことから、分類・同定に利用されている。本研究ではウシに感染するヘモプラズマ菌種について、RNase P RNA 遺伝子の構造を評価するための基盤となる調査研究を実施した。その結果、RNase P RNA 分子の P12 ヘリックス領域に想定される二次構造がヘモプラズマ菌種に固有の回文様塩基配列を呈することを示し明し、分類・同定のための根拠となることを明らかにした。

A. 研究目的

ヘモプラズマにはかつてリケッチア目アナプラズマ科のヘモバルトネラ属あるいはエペリスロゾン属に属していた菌種のほか、新たに発見された菌種が含まれている。これらヘモプラズマ菌種はいずれも、試験管内での人工培養が成功しないため性状解析ならびに分類学的な検討が遅れている。そのため、菌種の分類・同定は 16S リボソーム RNA 遺伝子、16S-23S リボソーム RNA 遺伝子間スペーサー領域あるいは RNase P RNA 遺伝子の塩基配列相同性に基づいて行われている。RNase P RNA は、触媒活性を有する RNA 分子のひとつで、バクテリア、

アーキア、ユーカリアを含むすべての生物に共通に検出されている。原核生物の RNase P RNA はリボザイムであり、tRNA 分子の 5'側を切り離して、tRNA 分子を成熟、完成させる機能をもっている。バクテリアの RNase P RNA は、特異ドメインと触媒ドメインからなり、二次構造の違いからグラム陰性菌のものは A 型、陽性菌のものは B 型に分けられている。マイコプラズマの RNase P RNA は、グラム陽性菌と同じ B 型を呈している。マイコプラズマは細胞壁を欠くため、グラム染色では陰性に染まるが、分類学的にはグラム陽性菌の仲間である。本研究ではウシに感染するヘモプ

ラズマ菌種を対象に PCR 法により、RNase P RNA 遺伝子を検索し、その塩基配列から想定される二次構造を指標に、菌種の同定が可能かを検討した。

B. 研究方法

岩手大学農学部附属牧場で飼育されている黒毛和牛 20 頭から採取した全血 (EDTA 添加) を材料として、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。DNA を被検サンプルとして、ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子を標的とした PCR を以下のとおり試みた。ウシのヘモプラズマ *M. wenyonii* の RNase P RNA 遺伝子の塩基配列に基づいて設計した Forward プライマー: 5'-AGTCTGAGATGACTRTAGTG-3' (*M. wenyonii* RNase P RNA 遺伝子の 1~20 番目の塩基配列に相当) および Reverse プライマー: 5'-TRCTTGMGGGGTTTGC-3' (*M. wenyonii* RNase P RNA 遺伝子の 170~189 番目の塩基配列に相当) を用い、サーマルサイクラー Dice (タカラバイオ社) によりエンドポイント PCR を行った。増幅された DNA 分子を、さらに NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel 社) により精製し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いてその塩基配列を決定した。

C. 研究結果

ウシには 2 種類のヘモプラズマ *M. wenyonii* および '*Candidatus M.*

haemobos' が感染することが知られているが、今回の PCR では、*M. wenyonii* の RNase P RNA 遺伝子のみが増幅できた。検出された RNase P RNA 遺伝子の一次構造は既知の *M. wenyonii* の配列と同一であり、その二次構造を推定したところ、P12 ヘリックスにおける終末ループの 4 塩基配列 GAAA が保存されていることが判明した (図 1)。

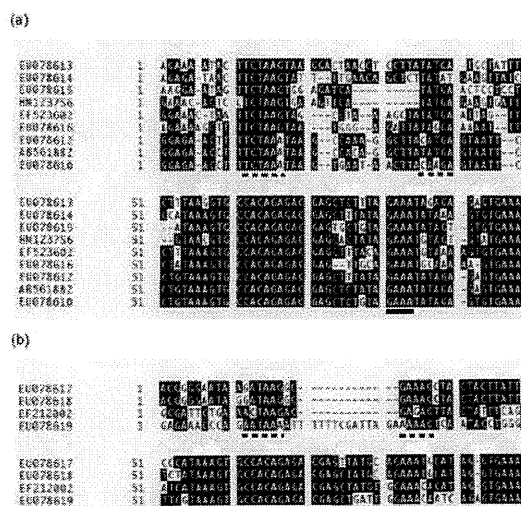


図 1) ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子の整列比較。配列名は塩基配列のアクセッション番号により示した。上段 (a) はエペリスロゾン群、下段 (b) ヘモバルトネラ群を示す。4 塩基配列 GAAA に下線を引いた。

P12 ヘリックスを形成するステム領域の多くは 7 塩基対からなっており、菌種に固有の配列であることが明らかになった。しかも、P12 ヘリックスにみられる回文様塩基置換がヘモプラズマ菌種に固有のパターンを示すことを見いだした (図 2)。

また、P10.1 ヘリックスの典型的な 11 塩基配列 (5'-TCTAAG----TATGA-3') は、エ

ペリスロゾーン群のヘモプラズマでよく保存されていた。

AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
G A	G A	G A	G A	G A	G A	G A
A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-G	T-A
A-T	A-T	G-T	T-G	A-T	A-T	G-T
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
T-A	T-G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	A-T	G-T
5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-T-G-3'
haemominutum	ovis	wenyoni	haemolamae	haemocervae	aoti	kahanei
[-5.40]	[-3.60]	[-4.20]	[-4.20]	[-7.20]	[-4.20]	[0.00]
AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
G A	G A	G A	G A	G A	G A	G A
A-T	A-T	A-T	A-T	G-C	G-C	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G	T-A	T-A	T-A
A-T	G-C	G-C	T-A	T-A	A-T	A-T
T-A	T-A	A-T	A-T	A-T	G-C	G-C
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
5'-T-A-3'	5'-G A-3'	5'-T-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'
suis	haematoparvum	haemofelis	haemocanis	turicensis	coccoides	
[-3.90]	[-5.20]	[-7.60]	[-9.70]	[-7.50]	[-6.90]	

図2) ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子の P12 ヘリックス領域に想定される二次構造。鍵括弧内は計算上の自由エネルギー値 (Kcal/mol)。

D. 考察

RNase P RNA 分子の P12 ヘリックスのステム領域にみられる塩基置換は、二次構造を維持するように相補的に起きていることから、これを回文様塩基置換 (palindromic nucleotide substitution) と名付けた。この回文様塩基置換がヘモプラズマ菌種に固有の配列であることから、菌種の同定に有用であると考えられた。つまり、従来分類・同定法は、一次構造の比較に基づく系統樹により行われていたが、P12 ヘリックス領域の回文様塩基置換に基づく方法によると、系統樹の作製が不要となり、二次構造の比較により一義的に同定できることになる。例えば、*M. haemofelis* と *M. haemocanis* は、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の系統樹だけでは、両者を区別することができないが、RNase P RNA 分子の P12

ヘリックス領域の回文様塩基置換の配列の違いから直ちに鑑別同定が可能である。

また、想定される二次構造の自由エネルギーは負の値をとり、P12 ヘリックス領域が安定なステム・ループ構造を呈することが示唆された。

B 型の RNase P RNA 分子における P12 ヘリックス領域の GAAA 4 塩基は、同分子の P10.1 ヘリックスにある特定の 11 塩基からなるレセプターと親和性をもつことが知られている。したがって、P12 ヘリックス領域における塩基置換は、P10.1 ヘリックス領域における塩基置換と連動して起きることが想定される。点変異は無秩序に発生するが、これらの領域における変異は二次構造を保つように制御されていることが示唆された。換言すれば、致死変異となる点変異は、観察されることがない。つまり、RNase P RNA 分子の二次構造を構成する回文様相補配列において観察される点変異は、バイアスを受けた結果として、生き残ったものと考えられる。

E. 結論

住血マイコプラズマはヒトを含む多くの哺乳動物から検出されている、感染性貧血の病因微生物であり、細胞培養に用いるウシ血清のもとになる、ウシ胎児血液を汚染することから、警戒を要する汚染因子と考えられる。試験管内培養ができないことから、遺伝子レベルでの同定・分類に依拠せざるをえない。本研究により、RNase P RNA の二次構造から、菌種の同定が可能で

あることが示唆された。

F. 健康危険情報

動物のヘモプラズマのうち、ヒツジおよびブタのヘモプラズマがヒトへ感染することが海外で報告されていて、人獣共通病原体として認識されるようになってきた。また、ヒト固有のヘモプラズマが近年知られるようになってきている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Iso, T., Suzuki, J., Sasaoka, F., Sashida, H., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., and Harasawa, R. 2013. Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Vet. Microbiol.* 163: 184-189.

Giangaspero, M., Orusa, R., Savini, G., Di Genaro, A., Osawa, T., and Harasawa, R. 2013. Serological survey to determine the occurrence of *Blue tongue virus*, *Bovine leukemia virus* and *Herpesvirus* infections in the Japanese small ruminant population from northern districts. *Clin. Microbiol.* 2: 104-109.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Numerical taxonomy of the genus *Pestivirus*: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *J. Virol.*

Methods 192: 59-67.

Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Hirata, T., and Harasawa, R. 2013. Two genotypes among ‘*Candidatus* *Mycoplasma haemobos*’ strains based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 361-364.

Fujihara, M., Wakita, J., Kondoh, D., Matsushita, M., and Harasawa, R. 2013. Effects of urea on length distribution and morphology of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* cells. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7: 1780-1786.

Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Nagai, K., Fujita, H., Kadosaka, T., Ando, S., and Harasawa, R. 2013. Two clusters among *Mycoplasma haemomuris* strains, defined by the 16S-23S rRNA intergenic transcribed sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 643-648.

Giangaspero, M., Bonfini, B., Orura, R., Savini, G., Osawa, T., and Harasawa, R. 2013. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetti*, *Brucella* spp., *Leptospirosis*, and *Orf virus* among sheep from northern districts

of Japan. J. Vet. Med. Sci. 75: 679-684.

Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Kobayashi, S., Furuhashi, K., and Harasawa R. 2013. Detection of hemotropic mycoplasmas in free-living brown sewer rats (*Rattus norvegicus*). J. Vet. Med. Sci. 75: 979-983.

Fujihara, M., Kondoh, M., and Harasawa, R. 2013. The bacterial cell division protein FtsZ forms rings in swarmer cells of *Proteus mirabilis*. Ann. Microbiol. 63: 399-401.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Palindromic nucleotide substitutions: A new software for pestivirus genotyping. Int. Res. J. Biochem. Bioinf. 3: 52-63.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Palindromic nucleotide substitutions software version 2.0. Genotyping based on the secondary structure alignment in the 5' untranslated region of *Pestivirus* RNA. J. Bioinf. Intell. Control 2: 40-64.

Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., Harasawa, T. 2013. Prevalence of antibodies against *Parainfluenza virus* type 3, *Respiratory syncytial virus* and bovine *Herpesvirus* type 1 in sheep from northern prefectures of Japan. Vet. Ital. 49: 285-289.

Mitsui, T., Fujihara, M., and Harasawa, R. 2013. Salivary nitrate and nitrite may have antimicrobial effects on *Desulfovibrio* species. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77: 2489-2491.

2. 学会発表

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新鮮組織・細胞の供給システムの整備及び

ヒト新鮮組織を用いた高品質細胞調製の検討

所 属 (独)医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部
研究分担者 吉田 東歩、小阪拓男

研究要旨 (財)ヒューマンサイエンス振興財団からヒト組織バンク事業が(独)医薬基盤研究所に移管された。(独)医薬基盤研究所においてヒト組織バンク事業を運営することについて倫理審査委員会にて検証し、承認された。医薬基盤研究所において新たに効率的なヒト新鮮組織・細胞の供給システムを整備・構築した。医療機関からの新鮮組織の受入れ、及び新規分譲申請について倫理審査委員会にて事前審査し、産学官の研究機関へ分譲を開始した。また需要に応じて供給可能な新鮮組織及び組織より調製した細胞の資源化及び拡充を検討した。調製した細胞については一般的性状を確認し、高品質化の検討を進めた。

A. 研究目的

医学・創薬研究には、疾患・病態を反映したヒト組織や対照となる正常組織が必須の材料となるが、欧米と異なり日本では医療機関から研究用ヒト組織の入手は極めて困難な状況にあり、研究用ヒト組織は主に手術摘出組織に限定される。このような状況下で 2001 年より(財)ヒューマンサイエンス振興財団において国内で初めてとなる、研究用ヒト組織バンク事業が開始され、手術摘出組織の研究資源化に取り組み、ヒト組織由来試料の研究利用を推進してきた。そして昨年 4 月に本事業は厚生労働省の方針により、効率化を図るため(独)医薬基盤研究所に移管され、ヒト組織を一般の研究機関へ分譲する事業を開始した。産学官の研究者の利用が可能であり、ヒト組織由来試料の研究利用をさらに推進させることが可能となった。また、国の研究倫理指針に基づき、適正なルールに従ってヒト組織を供給するバンク事業を充実させることは、国内のヒト組織利用環境を向上させ、創薬及び再生医療研究における研基盤を整備するために重要である。

今年度の研究では、ヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所において引き継いで実施し、発展させるために、ヒト新鮮組織及びヒト組織より調製した細胞の供給システムを再構築し、効率的な分譲体制を整

備し、確立する。そして可能な限り早期に研究機関へ分譲を再開する。そのために医療機関からの組織供給、ヒト組織バンクへの組織受け入れ、研究機関への分譲について実施体制を整える。またこれらの分譲体制に関しては、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて検証する。また需要に応じた新鮮組織の安定供給を図るため提携先の医療機関との連携を強化する。新鮮組織より調製した細胞の供給についても拡充を図る。調製した細胞については、高品質化のため発現解析等により細胞特異的な機能解析を進め、利用価値の高い情報を得ることを検討する。

B. 研究方法

1) 新鮮組織の供給体制の整備

今回の研究では、(財)ヒューマンサイエンス振興財団から移管されたヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクにおいて引き続き実施するために、ヒト新鮮組織及び新鮮組織より調製した細胞の供給システムを再構築し、効率的な分譲体制を整備した。そして早期に研究機関への分譲を再開した。医薬基盤研究所においてヒト組織バンクの運営細則等の規定を検討し、設定した。これに従い、分譲申請の受理から組織受け入れ、分譲実施に至

るまでのヒト組織バンク内の諸手続きを検討し、必要書式を整備した。

提携先の医療機関からの組織供給に関しては、提供先を(財)ヒューマンサイエンス振興財団から(独)医薬基盤研究所へ変更し、承継のための契約を締結した。インフォームド・コンセントにおいても、組織提供先の変更に関して内容を検討した。また組織の受入れ時に入手する医療機関からの提供通知書等の様式を整備した。

研究機関からの医薬基盤研究所・ヒト組織バンクへの分譲申請時には、研究機関内倫理審査の結果について確認した。また(財)ヒューマンサイエンス振興財団から分譲中の研究機関への分譲継続及び研究期間延長申請等について倫理審査を検討した。

医薬基盤研究所ヒト組織バンクで取り扱う対象は、手術摘出組織の病変部位とその周辺の正常部位で、病理診断に不要とされ、本来廃棄される組織とした。提供者は、重篤な疾病の原因となる病原体として梅毒、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エイズウイルスが陰性であることを条件に受け入れた。

実際に分譲に際しては、新鮮組織の場合は、事前に承認された範囲の事例のみ供給を実施し、事後に倫理審査委員会で事例報告した。供給に際して、手術の一週間程度前に医療機関から提供情報を入手し、複数の研究機関とマッチングを行い、分譲先を決定した。分譲日には、バンク担当者が医療機関でヒト組織を受け取り、連結不可能匿名化処理を行った上、診療情報を記載したデータシートと伴に研究機関まで組織を冷蔵輸送した。

また需要状況に応じた新鮮組織の供給を図るために、旧(財)ヒューマンサイエンス振興財団ヒト組織バンクでのニーズ調査及び医薬基盤研究所への分譲申請状況を基にして分譲の対象となる組織を検討した。新鮮組織の供給を安定化するため、提携先の医療機関との連絡を密にして連携を強化した。今後も需要も見込まれる試料については、新たな入手先を検討した。

ヒト組織バンクへ受け入れた新鮮組織より調製した細胞供給の拡充についても検討した。調製した細胞については、一般的性状確認に加えて高品質化のため発現解析等により細胞特異的な機能解析を進め、利用価値の高い情報を得ることを検討した。

2) 新鮮組織から細胞の調製

滑膜細胞は以下の方法にて調製した。関節リウマチ患者及び変形性関節症患者の人工関節置換手術で摘出された滑膜組織を Hanks' balanced salt solution で数回洗い、脂肪及び腱組織を取り除いた後、1 mg/ml コラゲナーゼ I を含む D-MEM 培地(50

$\mu\text{g/ml}$ カナマイシン、 $0.25\ \mu\text{g/ml}$ アンフォテリシン B 含有)中にて 37°C 、2 時間処理を行った。分散処理後の組織を $250\ \mu\text{m}$ ナイロンフィルターでろ過し、細胞塊を取り除き、遠心後、沈殿した滑膜細胞を採取した。滑膜細胞は 10% 牛胎児血清を含む D-MEM 培地($50\ \mu\text{g/ml}$ カナマイシン、 $0.25\ \mu\text{g/ml}$ アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C で培養した。継代には 0.25% トリプシン- 0.02% EDTA を用いた。1 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、細胞凍結保存液(十慈フィールド製、セルバンカー)に懸濁し(約 5×10^5 cells/ml/チューブ)、プラグラミング・フリーザーにて緩慢凍結($1^\circ\text{C}/\text{分}$)し、液体窒素タンクの気相(-160°C)にて保存した。

3) 新鮮組織から調製した細胞の高品質化の検討ー滑膜細胞の炎症反応性の検証及び発現解析ー

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

デキサメタゾンによる TNF- α の効果抑制試験時には、関節リウマチ由来の滑膜細胞に TNF- α (10ng/ml) 添加と同時にデキサメタゾン($100\ \mu\text{M}$)を同時添加し 24 時間培養した細胞について上記と同様に解析した。

幹細胞関連遺伝子の発現解析は、関節リウマチ由来の滑膜細胞より調製した cDNA を試料とし、TaqMan Gene Signature Plate (96 well Stem Cell Array plate, ABI)を用いて上記と同じ PCR 条件にて行った。

(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。医薬基盤研究所ヒト組織バンクにおいては、ヒト試料の取扱いに関しては上記の指針に従

い、試料ごとに医薬基盤研究所・研究倫理審査委員会において承認を受けて実施した。

また、ヒト試料の提供医療機関、供給を受ける研究機関においても機関内倫理審査委員会でそれぞれ承認を受けた。医薬基盤研究所ヒト組織バンクで取り扱う対象は、外科手術等で摘出され、診断などに不要と判断された組織またはその組織に由来する試料とした。これらのヒト試料は、医薬基盤研究所ヒト組織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のための手続きを厳正に行った。

C. 研究結果

1) 新鮮組織の供給システムの整備

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ヒューマンサイエンス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・JCR B生物資源バンクに移管された。ヒト組織バンクについては、保管していた凍結試料、固定試料、組織から調製した細胞等の加工試料の 217 試料及びヒト試料供給事業の(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクへの移管についてヒューマンサイエンス振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議し、承認された。ヒューマンサイエンス・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は準拠する国の研究倫理指針、運営方法、インフォームド・コンセント等において同等であり、両者とも非営利・公共的な研究資源バンクであること、ヒューマンサイエンス・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ことも考慮され、移管が承認された。

今年度の研究では、(財)ヒューマンサイエンス振興財団から移管されたヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所において引き続き運営するために、ヒト新鮮組織及び細胞の供給システムを再構築した。移管された凍結組織、固定組織等のヒト試料は、適正に保管し分譲可能な状態とした。

これらのヒト試料の効率的な分譲体制を早期に整備し、分譲中及び新規分譲申請予定の研究機関の研究に支障が出ないように可能な限り早期に研究機関への分譲を再開できるように努めた。その結果、約 4 か月の整備期間の後、効率的な運営体制を構築し、分譲業務を再開することができた。そのために医療機関からの組織供給、ヒト組織バンクへの組織受け入れ、連結不可能匿名化処理、研究機関への分譲について、実施体制を整えた。またこれらの分譲体制に関しては、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて事前に検証し、承認を得た。

提携先の医療機関の承継のために、組織提供先の(財)ヒューマンサイエンス振興財団から(独)医薬基盤研究所への変更およびインフォームド・コンセントの提供先の変更について医療機関と協議し、(独)医薬基盤研究所との間に組織提供の承継に関する新たな契約を取り交わし、継続した組織提供を可能とした。インフォームド・コンセントでは、組織が医薬基盤研究所ヒト組織バンクに提供され、研究利用されることについての同意を得た。また組織の受入れ時に入手する医療機関からの提供通知書及び受領書を整備した。各医療機関の外科からは消化器系手術時に摘出される組織、整形外科から人工関節置換手術等で摘出される組織の提供を可能とした。

また、医薬基盤研究所ヒト組織バンクの運営細則及び内規を検討して作成した。これに従い分譲申請の受理から組織受け入れから分譲実施に至るまでのヒト組織バンク内の諸手続きを定め、連絡経路、実施作業を設定して業務を分担し、作業の効率化を図った。具体的には分譲申請受付、倫理委員会への申請対応、組織の受け取り及び研究機関への輸送、医療機関への組織提供に対する対価の支払い、研究機関への実費相当額の請求等の各作業において業務を分担し、倫理審査委員会事務局、事務担当部門と連携して実施環境を整えた。以上の諸手続きについてヒト組織バンク標準作業手順書を検討し、順次作成中である。分譲申請関係の書式として、分譲申請書、送付書、受領書、請求書等の必要書式の記載内容等について詳細に検討を重ね整備した。また従来郵送で対応していた書類のやり取りを可能な限り電子メール或いは直接的に行うことにした。医療機関担当医への受領書の送付、会計担当者への請求案内は必要書類のファイルをメール添付で送付することにした。また研究機関への組織受け渡し時には、その場で受領書を頂いた。このように業務の効率化を図ることにより、迅速かつ円滑な新たな分譲実施体制を確立した。

研究機関から医薬基盤研究所・ヒト組織バンクへの分譲申請に際しては、研究機関内倫理審査承認結果を、承認書の写しにより確認した。また(財)ヒューマンサイエンス振興財団からの分譲継続中の研究機関については、(財)ヒューマンサイエンス振興財団・倫理審査委員会にて承認済みの研究内容は継続承認されるが、分譲申請先を医薬基盤研究所へ変更する必要があるため、改めて研究機関内での倫理承認を得ることを説明して承諾を得た。

分譲体制の整備後、今年度は医薬基盤研へ初めて 4 件の新規分譲申請を受け付け、基盤研研究倫理審査委員会にて審査され、すべて承認された。申請試料は、新鮮組織の滑膜組織、小腸組織、内臓脂

肪組織及び凍結滑膜細胞であった。小腸組織については、これまでに医療機関からの提供が可能となっていたが、分譲申請は初めてであった。分譲中の滑膜細胞についての追加分譲申請及び、研究期間延長に伴う6件の分譲継続申請については、迅速審査により承認された。

2) 新鮮組織の分譲

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、関西、関東地区の二つの提携医療機関の外科と整形外科からの提供の継続を可能とし、定期的に組織提供予定に関する情報を入手し、研究機関とのマッチングが成立して提供される組織については、分譲までに提供通知書により提供者情報を入手した。平成25年度にヒト組織バンクに提供された新鮮組織は20試料であり、このうち滑膜組織4試料は研究機関とのマッチングが不成立となった事例で、バンク内で細胞調製に使用した。他の16試料(滑膜組織4試料; 関節リウマチ1例、変形性関節症3例、大腸組織2試料、小腸組織7試料、内臓脂肪組織3試料)は、研究機関に安定的に供給した(2-3例/月)。滑膜組織は、すべて人工膝関節手術により摘出された病変部位であった。大腸組織、小腸組織、内臓脂肪組織はいずれも消化器系の癌手術時に摘出され廃棄される正常部位であった。手術の種類は大腸癌(S状結腸癌、上行結腸癌、横行結腸癌、直腸癌)、胃癌、膵臓癌、十二指腸乳頭部癌であった。

提供者(20名)の内訳は、滑膜組織は、女性の罹患率が高い関節リウマチ患者或いは変形性関節症患者からの提供のため、8例すべてが女性であった。正常大腸組織、正常小腸組織、正常内臓脂肪組織の提供者は、女性が7例、男性が5例であった。提供者の年齢の範囲は52~84歳で平均年齢は約70歳であった。組織摘出処理後に冷蔵保存液に浸漬するまでの時間は、滑膜組織の場合1~2時間以内、大腸、小腸、内臓脂肪組織の場合は10分から1時間以内であった。

提供された組織量は、滑膜組織が約10g、小腸組織が、約10~30g、大腸組織が約5~10g、脂肪組織が約10~30gであった。脂肪組織の提供量は、過去の事例(1~5g)と比べると多量であり、利用者の要望に概ね応えられた。大腸組織の量も以前より多量に提供を受けた。

滑膜組織は主に関節リウマチの研究に、大腸、小腸組織は薬物の安全性研究等に、内臓脂肪組織は再生医療の基礎研究に利用された。

すべての提供者については梅毒、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エイズウイルスが陰性であることを提供通知書及び電子メール情報により、事前に確認し、組織を受け入れた。

今年度は新規に小腸組織を供給可能とし、分譲を開始した。小腸組織については、医療機関の協力を得て、対象となる癌手術の症例により十二指腸、空腸、回腸の各部位の供給が可能となり、小腸組織の中でも研究目的に合致した有用な部位の提供を実施できた。また小腸の各部位摘出時の手術法に関する情報も入手し、有用な情報として分譲先に伝えた。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が、小腸組織については自己消化が速く組織が変性しやすいために、提供までの時間は特に注意を払う必要があった。自己消化をできるだけ防ぐためにプロテアーゼインヒビターを含む保存液(HBSS、DMEM)及び組織移植時の組織輸送用に開発された保存液(Custodil HTK Solution)等を検討し、目的の実験に使用しうる良好な結果を得た。小腸組織の場合、摘出されて輸送し、研究利用されるまでの時間はおよそ5~6時間で、小腸由来の膜調製及び薬理学実験が可能であった。

関節リウマチ由来滑膜組織については、生物学的製剤の使用歴がない或いは疾患活動性が中程度以上という希望条件のある申請例があった。薬歴は通常は分譲前に入手する提供通知書より確認するが、それよりも前にメール等で医療機関からこのような情報を得て、利用者に伝えことができ、円滑なマッチングが行えた。

また分譲資源の拡充を図るため、需要の大きい肝臓由利試料の入手について検討した。新たな入手源として生体肝移植手術において摘出される部位について医療機関と協議し、提供者の同意が得られる症例の場合には、ドナー及びレシピエント由来の新鮮肝組織、凍結肝細胞について、ヒト組織バンクへ提供可能であることが分かった。

2) 新鮮組織から細胞の調製

医薬基盤研究所において新鮮滑膜組織から滑膜細胞、脂肪前駆細胞を調製し、凍結チューブで分譲するシステムについて、新鮮組織の場合と同様の手続により整備した。本年度は滑膜細胞については関節リウマチ及び変形性関節症由来の新鮮滑膜組織より各2ロット計4ロット分を調製し、分譲可能な資源とした。用いた症例は関節リウマチ由来滑膜1例(70歳代)、悪性関節リウマチ及び全身性エリテマトーデス(SLE)合併症1例(50歳代)、変形性関節症2

例(いずれも70歳代)ですべて女性由来であった。これら4症例は整形外科にて人工関節置換手術で摘出された膝滑膜組織であった。いずれの症例も手術摘出後ヒト組織バンクに3時間以内に冷蔵状態で受け入れ、組織分散(約3時間)及び培養(1~2週間、継代数1)した。その結果、関節リウマチ滑膜組織1例より、 8.0×10^5 cells/tubeの凍結チューブを80本、関節リウマチ及びSLE合併症滑膜組織1例より 7.0×10^5 cells/tubeの凍結チューブを85本、変形性関節症2例より其々 7.0×10^5 cells/tubeの凍結チューブを55本と 5.5×10^5 cells/tubeの凍結チューブを35本調製した。液体窒素中で保存した滑膜細胞凍結チューブの解凍後の生存率は90%以上であり、再培養可能であった。細胞の形態は繊維芽様であることを確認した。細胞マーカーとしてCD105及びVimentinの発現を細胞免疫染色により確認した。また、微生物汚染検査(細菌、真菌、マイコプラズマ)については陰性を確認した。以上のような一般的性状検査の結果、品質上問題がないことを確認した後、医薬基盤研究所JCRB生物資源バンクホームページ及び関連学会等でロット情報を公開した。

平成24年度までに調製したロットも含め、分譲用凍結細胞は、滑膜細胞(22ロット;関節リウマチ由来13ロット、変形性関節症由来9ロット)、脂肪前駆細胞(11ロット;非糖尿病由来9ロット、糖尿病由来2ロット)となった。今年度は3件計24本の滑膜細胞凍結チューブを分譲し、関節リウマチ関連の研究に利用された。

3) 新鮮組織から調製した細胞の高品質化

滑膜細胞において炎症反応性の検証及び発現プロフィール解析、分化能解析等を検討中であり、今年度は途中経過について報告する。品質管理における一般的性状検査の一項目として実施する細胞マーカーCD105、Vimentinの発現確認は、従来より細胞免疫染色により行っているが、リアルタイムRT-PCRによるmRNA発現解析においても迅速かつ詳細な確認を可能とし、検査効率及び精度を向上させた。このような一般的性状検査に加えて高品質化を図るために、機能的性状検査の一項目として、滑膜細胞において

は、炎症反応性を検証してきた。

これまでに関節リウマチ由来及び対照となる滑膜細胞において、TNF- α 添加時の関節リウマチ関連遺伝子のmRNA発現変動について調べ、MMP-3及びIL-6について明瞭な発現上昇を認め、培養上清のELISAにより蛋白質レベルでも発現増加を確認した。今回この炎症反応性を検証するために、関節リウマチ治療薬として使用される免疫抑制剤デキサメタゾンによる抑制効果を予備的に検討した。関節リウマチ由来の滑膜細胞にTNF- α 添加とデキサメタゾンを同時添加して培養(24well培養系)した場合の効果について調べた結果、TNF- α によるMMP-3 mRNA発現上昇に対して顕著な抑制効果が検出された。また96well培養系によっても、同様の効果が認められた。IL-6に対しても同様に抑制効果を検討中である。

また発現亢進を確認したMMP-3及びIL-6の他に、顕著な発現増加を示す遺伝子として、MMP-1、MMP-8、IL-15、IL-1 α 、CD40、TLR-1、TLR-2等が認められた。これらの中で自然免疫に関与するTLR分子に焦点をあて、細胞内での発現及び機能について検討している。予備実験の結果、滑膜細胞においてTLR-1、TLR-2が其々のリガンドと作用しIL-6等のサイトカインの発現を増加させることを確認した。

また新鮮組織より調製した細胞の高品質化のための一環として細胞に特徴的な発現プロフィールの解析を検討している。滑膜細胞においてはこれまでにその機能的性状として炎症関連の遺伝子の発現状態及び炎症性サイトカインに対する反応性を確認している。滑膜細胞は、このように機能的に分化した細胞としての性状を示す一方で、多種類の細胞への分化能をもつ間葉系幹細胞としての性状を示すことが明らかになっていることから、幹細胞としての性状を調べるために関連遺伝子の発現状態を解析中である。これまでに96well発現アレイ解析により、POU5F1(Oct-4)、Sox-2、Nanog等の多能性マーカーや、LAMA(ラミニン)Type1コラーゲン(COL1A1)、フィブロネクチン(FN1)細胞外マトリックス成分等のmRNA発現を確認している(表参照)。現在、これまでに調製した各ロットについて発現の有無と程度を引き続き解析中である。

Target Name	mRNA発現	Target Name	mRNA発現
ACTC1	ND	GCG	ND
AFP	ND	GCM	ND
BXDC2	+	GDF3	ND
CD34	+	GFAP	ND
CD9	+	GRB7	ND
CDH5	ND	HBB	ND
CDX2	ND	HBZ	ND
CGB	+	MNX1	ND
COL1A1	+	IAPP	ND
COL2A1	ND	IFITM1	+
COMMD3	+	IFITM2	+
CRABP2	+	IL6ST	+
CTNNB1	+	IGF2BP2	+
DDX4	ND	INS	ND
DES	+	PDX1	ND
DNMT3B	+	ISL1	ND
LEFTY2	+	KIT	+
EEF1A1	+	KRT1	ND
EOMES1	+	LAMA1	+
FGF4	ND	LAMB1	+
FGF	ND	LAMC1	+
FLT1	+	LEFTY1	ND
FN1	+	LIFR	ND
FOXA2	ND	LIN28	ND
FOXD3	+	MYF5	ND
GABRB3	+	MYOD1	ND
GAL	ND	NANOG	+
GATA4	ND	NES	+
GATA6	+	NEUROD1	ND
GBX2	ND	NODAL	ND
NOG	ND	SERPINA1	+
NPPA	ND	SFRP2	+
NR5A2	ND	SOX17	+
NR6A1	+	SOX2	+
OLIG2	ND	SYCP3	+
PAX4	ND	SYP	+
PAX6	ND	T	ND
PECAM1	+	TAT	ND
PODXL	+	TDGF1	+
POU5F1	+	TERT	ND
PTEN	+	TFCP2L1	+
PTF1A	ND	TH	ND
RAF1	+	UTF1	ND
REST	+	WT1	ND
RUNX2	+	XIST	+
SEMA3A	+	ZFP42	ND

D. 考察

1) 新鮮組織の供給システムの整備

(財)ヒューマンサイエンス振興財団からヒト組織バンク事業及び保管試料が予定通り(独)医薬基盤研究所に移管された。(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクにおいてヒト組織バンク事業を運営することについては、非営利な公的バンクとしての同等性の観点から倫理審査委員会にて審査され、問題なく承認された。医薬基盤研究所において新たにヒト新鮮組織及び新鮮組織より調製した細胞の安定的な供給システムを整備・構築するために、基本的には(財)ヒューマンサイエンス振興財団における運営形態を基にし、(独)医薬基盤研究所での難病バンク事業の仕組み及び倫理審査制度に整合させるようにして、難病バンク担当者、倫理審査事務局、会計課等の関連部門の協力も得て迅速に効率的な分譲体制を整えることができた。また医療機関からの組織供給の承継のために必要となる契約締結については、(独)医薬基盤研究所が公的な研究機関であることから、円滑に協議が進められた。提携先の医療機関からの新鮮組織の受入れ、及び新規分譲申請につい

ては、倫理審査委員会にて事前審査し、産学官の研究機関の研究利用に対して大きな支障のないように早期に分譲を再開できた。今回構築したこのような分譲体制は、今年度の新規分譲申請に対応した分譲実施業務において円滑に機能したことから、効率的で有効なシステムであることが検証された。今後はこのシステムを基盤として維持しながら、必要な点は改良、補完することにより、さらに倫理面等も含めて効率化を検討する。

医薬基盤研究所における分譲体制の整備後に、受け付けた4件の新規分譲申請に関する倫理審査については、いずれも大きな問題なく承認され、速やかに分譲が実施された。分譲申請から初回の分譲の実施までの期間は、2～3ヶ月であり、比較的迅速な対応が可能であった。供給可能であった小腸組織を医薬基盤研究所において新規に分譲でき、確かな需要が確認されたことにより、今後の利用増加も期待される。

医薬基盤研の研究倫理審査委員会は定期的開催されるため、利用者には開催予定を連絡し、申請時期を検討して頂いた。また医療機関の担当医とは、随時の連絡が可能な状態を確保し、分譲承認後にタイムリーに提供情報入手し、円滑なマッチングを可能とした。また研究計画に変更のない、分譲中の凍結細胞についての追加分譲申請及び研究期間延長等の延長申請については、軽微な変更申請として迅速審査により承認された。このようにヒト組織の分譲関連の申請に対する倫理審査体制及び連絡体制は有効に機能したと考えられる。

分譲を実施した新鮮組織及凍結細胞の各事例、及び細胞調製事例については、年度末にまとめて倫理審査委員会にて報告する予定である。

今年度は、組織提供に際して医療機関との協力体制の強化により、バンク及び利用者が必要な情報を可能な限り早期に入手し、効率的なマッチングを可能とした。このように、通常入手する提供通知書に記載される以外の有用情報についても柔軟に入手することは円滑に分譲を進めるために重要であった。

最近のヒト試料の申請状況からみると、これまで利用の多かった癌組織については、潜在的ニーズはあるが利用の減少傾向が認められる。一方正常組織に関しては、小腸組織、大腸組織、脂肪組織等について新規な申請が増加しており、組織の需要に変化が認められる。正常組織は大腸、小腸組織等では薬剤の副作用を調べるための毒性評価を目的とした研究に利用されており、さらには腸管免疫研究への利用も期待される。また小腸由来細胞の調製用素材としても有用と思われ、利用価値の高い組織として資源化について検討する。また今回分譲した内臓脂肪組