

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共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 を含む D-MEM 培地(50

µg/ml カナマイシン、0.25 µg/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 µm 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 µg/ml カナマイシン、0.25 µg/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。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 × 10⁵ cells/ml/チューブ)、プログラミング・フリーザーにて緩慢凍結(1 °C/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 - 滑膜細胞の炎症反応性の検証及び発現解析 -

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 µl, TaqMan Gene Expression Assay (human MMP-3 或いは human IL-6 用) 1 µl, TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 µl, 大塚蒸留水 8 µl。反応条件: 95 °C、20 秒 (95 °C、1 秒 60 °C、20 秒) × 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 µM)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・ICRB 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来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例より各々 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ァイル解析、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、CD40、TLR-1、TLR-2等が認められた。これらの中で自然免疫に關与する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ァイ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	+
COMM3	+	IFITM2	+
CRABP2	+	IL6ST	+
CTNNA1	+	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を入手し、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び凍結細胞の各事例、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

織は、再生医療研究の基礎研究として体性幹細胞を調製するための素材として利用され、良好な結果が得られており、組織の質、量ともに十分に研究目的を満たすものであったと考えられる。内臓脂肪組織は従来の生活習慣病研究への利用も含めて重要な研究資源として利用を促進していく。また、最近体性幹細胞のソースとして有用性が見出された皮下脂肪組織の資源化についても検討する。

滑膜組織については、関節リウマチ及び変形性関節症由来の組織を分譲中であるが、関節リウマチの症例については、生物学的製剤による治療が進んだことから、対象となる人工関節手術例が減少しているため、提供例が減少傾向にある。関節リウマチ由来滑膜組織の需要は依然として大きく、今後対応が必要である。一方、変形性関節症由来の組織は主に関節リウマチ由来組織の対照として利用されているが、症例数が多く十分な供給が見込めるため、変形性関節症に関する基礎研究等への利用促進を検討する。また、関節炎等の疾病以外での交通事故やスポーツ時の傷害等の手術時に摘出される正常滑膜組織は、疾患対照組織或いは幹細胞の調製素材として利用価値が大きいと推測され、提携先の医療機関からの受入れの可能性について検討する。

新鮮組織より調製した滑膜細胞は分譲開始当初から主に関節リウマチに対する創薬研究に利用されてきたが、最近はこの細胞が、間葉系幹細胞として脂肪細胞や骨芽細胞への分化能を示すことから、細胞分化の研究にも利用され始めた。一方、変形性関節症由来の滑膜細胞はこれまで関節リウマチ研究において対照として利用されてきたが、昨年度は、変形性関節症に対する創薬関連の基礎研究に利用された。本疾患は原因不明で、現在の高齢化社会において患者数は数千万人と推定され、原因究明及び治療薬開発が望まれており、そのための研究資源として今後有用性が増すことが期待される。滑膜細胞は分譲開始から年々利用が増加しており、今後も利用拡大が見込まれる。また、今年度調製した自己免疫疾患 SLE を合併した関節リウマチ由来の滑膜細胞は、原因不明の難病である本疾患の研究にも利用可能な貴重な研究資源になると考えられる。

また、今回実施している発現プロファイル解析等の有用情報を付加することにより高品質化を図り、利用を促進していく。現在分譲可能な凍結細胞は、滑膜細胞と脂肪前駆細胞であるが、需要の大きい細胞試料を拡充するため、今後も細胞調製に関する最新情報の収集に努めるとともに、技術レベルの向上を図り、小腸、膵臓、皮膚等の新鮮組織より調製した正常細胞の資源化を検討する必要がある。

また分譲資源の拡充を図るため、薬物代謝研究や

肝臓癌等の研究分野において需要の大きい肝臓由来試料については、分譲していた凍結肝細胞が在庫切れとなったこともあり、新たな入手源を検討した。正常肝組織は、肝臓癌手術時に付随して摘出されるが、肝臓癌の症例は、肝炎ウイルス(HBV,HCV)が原因となる場合が多いため、組織の受入れが難しい。また過去に大腸癌等の転移性の肝臓癌手術或いはNASH(非アルコール性脂肪肝)等の手術由来の組織の分譲例はあるが、例数が非常に少なく、供給が難しい状態である。そこで今回、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を重ね、公的なヒト組織バンクを介した一般的な研究利用の可能性について検討した。その結果、ドナー及びレシピエント由来の新鮮肝組織及びこれより調製し、保管された凍結肝細胞について、ヒト組織バンクへの提供及び研究利用に関する提供者の同意が得られる症例の場合には、提供可能であることを確認した。今後も倫理面も含めて検討を進める予定である。

2)新鮮組織からの細胞調製及び高品質化

今回滑膜細胞においてTNF- α による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の効果を予備検討し、MMP-3 mRNAの発現に対する抑制効果が認められたことから、この反応がステロイドにより抑制される免疫反応であることが示唆された。この効果は96well培養系でも検出可能であったことから、本細胞はTNF- α の作用を制御する化合物のスクリーニングの構築にも利用可能と考えられる。このような情報は、創薬利用の観点から有用な情報となるため、提供情報として活用する。

滑膜細胞において自然免疫において機能するTLR-1及びTLR-2のmRNA発現し、予備検討により各リガンドの作用が検出された。今後もさらに検討が必要であるが、ヒト新鮮滑膜組織より調製した滑膜細胞が、マクロファージ等の免疫系の細胞に発現するTLR分子を発現し機能することが推定される。文献的にも、関節リウマチ由来滑膜細胞においてTNF- α 添加時にTLR-2のmRNA発現が増加することから、関節リウマチの炎症拡大に寄与することが示唆されており、詳細に解析を進めている。

滑膜細胞の間葉系幹細胞としての性状に関する情報としては、幹細胞関連遺伝子のmRNA発現プロファイルを解析中であり、複数の多能性マーカーの発現を認めている。このような発現情報は非発現情報も含めて、目的とする分化研究に利用可能かどうかを判断する場合に有用となる。骨髄由来等の一般的な間葉系幹細胞の発現状態とも比較検討し、本細胞の発現プロファイルを付加情報として公開し、再生

医療分野等において分化研究における利用を促進するために活用する。

これまで当バンクで新鮮組織より調製した滑膜細胞及び脂肪前駆細胞については、間葉系幹細胞の性状として、通常の分化誘導法により脂肪細胞及び骨芽細胞へと分化することを確認している。特に滑膜細胞は、分化細胞の性状としての炎症反応性を示す他に分化能を示すことは興味深く、多能性マーカーの発現も認められることから、脂肪細胞や骨芽細胞以外の細胞へも分化しうることが推定される。今後は軟骨細胞、神経細胞等の他の細胞への分化能についても検討を要する。

E. 結論

(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(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。同研究所において新たに効率的な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・構築した。医療機関からの新鮮組織の受入れ、及び分譲申請について倫理審査委員会にて事前審査し、早期に産学官の研究機関へ分譲を再開した。分譲資源の拡充のため、需要に応じた新規な新鮮組織として小腸組織の分譲を開始した。関節リウマチ由来新鮮滑膜組織より効率的に細胞調製を行い、高品質化を図るため機能的性状として炎症反応性について詳細な解析を実施中である。さらに間葉系幹細胞としての性状確認のため、遺伝子発現プロファイルの解析を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
5th ANRRC International Meeting 2013

G. 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