

海外出張報告書

2017年8月31日

出張者氏名	谷 理香
所 属	医学部医学科組織発生学教室
出張期間	2017年6月24日～7月23日
出張先	イタリア トリエステ大学
目 的	共同研究

内 容

1. はじめに

チオプリン製剤はクローン病、潰瘍性大腸炎等の治療に有効な免疫抑制剤であるが、深刻な膵臓に関わる副作用を起すことでも知られている。チオプリン製剤を投与されたクローン病患者の5%が膵炎を起こすという報告もある。しかしながら、この副作用が起きる機構は未だに解明されておらず、副作用を防ぐための手立てや診断に用いるイオマーカもない。

トリエステ大学ではチオプリン製剤が副作用を起す機構を細胞レベルから明らかにする研究に取り組んでいる。iPS細胞を使って個々の患者の膵臓外分泌部の細胞を分化誘導し、その細胞に対しチオプリン製剤を投与し影響を評価し、治療に役立てることを目指している。iPS細胞を利用するのは個々の被検者の膵臓細胞を入手が困難であるためであり、また薬が副作用を起す機構を解明する手段としても有効なだけでなく、個々の患者が副作用を起すか否かを事前に判定する手段としても期待できるからである。

信州大学医学部組織発生学教室では膵外分泌細胞の分化誘導など iPS 細胞の応用に取り組んできた。この相補的な関係から、トリエステ大学と組織発生学教室は、膵外分泌細胞を軸として、薬物動態、多能性幹細胞、癌細胞に視点をあて基礎、応用に関わる共同研究を開始した。筆者は、1年次より、組織発生学教室でヒト iPS 細胞研究にたずさわって、この共同研究の一部に関わってきた。

一方、信州大学バイオメディカル研究所はグローバル化戦略として国際共同研究の構築に力を注いできた。今回、バイオメディカル研究所の海外研修企画の一環として、筆者はトリエステ大学に1カ月（6月24日～7月23日）滞在する機会を得、上記研究の予備的実験を実施した。以下その結果を報告する。

2. 実験方法

iPS細胞を利用した細胞毒性評価に向けた予備的実験として、iPS細胞の代わりに膵癌細胞 (PANC-1)を用いた細胞毒性評価実験と、iPS細胞の薬剤に対する感受性評価のための

最適な細胞濃度を探索する実験を実施した。

2.1 肝臓 代謝の影響評価実験

チオプリン製剤が肝臓で代謝された後、膵臓にどのような影響を与えるかを見るための予備的実験として以下の手順で実験を行った。

手順1) PANC-1 培地で肝細胞を培養*

手順2) NaOH 単体と NaOH を溶媒とした AZA、6 MP を投与

手順3) 4 8 時間後に培地を採集し、冷凍保存

手順4) PANC-1 培地で培養した PANC-1 を 9 6 well プレートに継代する (2 枚) *

手順5) 冷凍保存した培地と PANC-1 培地を用いて培地交換する

手順6) 培地交換後、経過時間を変えて (2 4 時間、4 8 時間、7 2 時間、9 6 時間) MTT assay、NBT assay を行う

*手順1) で PANC-1 培地を利用したのは、肝細胞の培地を利用すると PANC-1 細胞に影響してしまうが、PANC-1 培地が肝細胞には影響しないためである。

*手順4) では MTT assay、NBT assay のために2枚のプレートを作成した。MTT assay は 5000c/100 μ l/well、NBT assay は 10000c/100 μ l/well の濃度で作成した。

2.2 iPS 細胞 薬剤の感受性評価のための予備実験

iPS 細胞を用いて薬剤の影響を調べる際に MTT assay、Sulforhodamine assay を行うため、それぞれに最適な細胞濃度を決定するための予備的実験を以下の手順で行った。

手順1) iPS 細胞を単一細胞になるように剥離

手順2) 9 6 well プレートに下図1のように異なる濃度で培養

手順3) 4 8 時間後に MTT assay、Sulforhodamine assay を行う

培地 100 μ l/well					細胞数	
					1000	
					5000	
					10000	
					20000	
					50000	
					100000	

図1. MTT assay、NBT assay のための iPS 細胞の 96well プレート

3. 実験結果

3.1 肝臓 代謝の影響評価実験の結果

MTT assay の結果は、PANC-1 培地で培地交換したものは、いずれの時間でも細胞活性は高値を示したが、肝細胞を経由した培地ではチオプリン製剤、NaOH ともに低値を示した。

NBT assay の結果は以下の表2のようになった。全ての場合で、活性酸素は低値を示した。

3.2 iPS 細胞 薬剤の感受性評価のための予備実験

MTT assay の結果は、一回目はクラスターが多く、2回目と3回目では単一細胞が得られたが、細胞生存率の値に大きな差異はなかった。細胞数 10000/100 μ l を境に細胞生存率は下がった。

Sulforhodamine assay の結果は、MTT assay と同様に1回目はクラスターが多く、2回目と3回目では単一細胞が得られたが、細胞生存率に大きな差異はなかった。細胞数 10000/100 μ l を境に、細胞生存率は下がった。

4. 考察

4.1 肝臓 代謝の影響評価実験について

上記の実験ではチオプリン製剤の肝臓代謝による細胞活性への影響を評価することはできなかった。コントロールとしてNaOHを単体で投与した培地とチオプリン製剤を投与した2種類の培地のいずれにおいても細胞活性が低値を示したことから、細胞活性が低値を示したのはチオプリン製剤によるものではないと考える。肝細胞を経由した培地に共通して含まれるNaOHによるものか、肝細胞を48時間培養したことによる、培地の栄養不足によるものではないかと考える。肝臓の代謝の影響を評価するためには、肝細胞を48時間培養したP後のANC-1培地と、通常のPANC-1培地とにおいてPANC-1細胞の細胞活性を比較することにより肝細胞の培養による培地への影響を調べ、上記の実験で低値を示した原因を決定する必要がある。

活性酸素については、全ての場合で低値を示したことから、膵臓細胞では活性酸素は発生していないと考える。

膵臓細胞は、増殖が早く、iPS細胞に比べて培地交換の頻度が少ないため培養が容易であるが、薬剤から受ける影響を膵臓細胞と同様に考えることはできない。予備の実験としては有効であるものの、その結果をもって膵臓細胞への影響とみなすことは適切でないと考える。

4.2 iPS 細胞 薬剤の感受性評価のための予備実験について

上記の結果で、MTT assay、Sulforhodamine assay において最も細胞生存率が高い濃度は10000/100 μ l/wellであった。細胞数が10000/100 μ lを超えると、プレートに接着する細胞の数が減少し、細胞数 100000/100 μ l では、ほとんど接着しなかった。このことか

ら、薬剤の感受性評価のために行う MTT assay、Sulforhodamine assay における iPS 細胞の最適濃度は細胞数 10000/100 μ l/well と決定した。

現在行っている剥離法では、iPS 細胞を単一細胞に完全に分離させることは困難であった。

単一細胞の iPS 細胞を実験に使用するために、新たな剥離法に変える可能性がある。

単一細胞に分離することで、iPS 細胞に変化が生じないかを調べるために PCR を行う予定である。滞在中に、RNA、DNA の抽出まで行った。

5. おわりに

トリエステ大学での自主研究では細胞培養の技術の幅を広げることができた。信州大学では、細胞培養を中心に学んでいたが、トリエステ大学では培養した細胞を薬剤の感受性評価に利用するという段階を学んだ。信州大学では、iPS 細胞の肝細胞への分化誘導と、その遺伝子発現を調べるための RT-PCR を行っていた。トリエステ大学では、iPS 細胞、肝細胞、肝癌細胞を使用し、薬剤を投与し、肝臓代謝の影響を再現するための実験や、細胞活性、活性酸素について評価するための assay の方法を習得することができた。さらに、著者の実験には含まれないが、細菌の有無を調べるための PCR やその他の消化管細胞の培養を経験することができた。短期間ではあるものの、一連の実験を行い、新たな技術を習得し、培養細胞を使った実験の構築を学ぶことができ、有意義な研修であった。