

9月. [アレルギー 2006; 55(8-9): S5-3]

2) 三好康介¹⁾, 田中宏幸¹⁾, 高橋 剛¹⁾, 若原恵子¹⁾, 広瀬 泉¹⁾, 出原賢治 (佐賀大学), 斎藤三郎, McKenzie Andrew NJ (MRC Lab), 稲垣直樹¹⁾, 永井博式¹⁾ (岐阜薬科大). グニ抗原誘発マウス気道炎症におけるTh2 サイトカインの意義(2). 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 9月. [アレルギー 2006; 55(8-9): 386]

3) 佐藤哲夫, 勝沼俊雄, 長井俊樹, 上出良一, 中川秀巳, 秋山暢丈, 斎藤三郎, 永田欽也(BML). 喘息およびアトピー性皮膚炎患者j末梢血単核球のIL-31産生能と血清IgE値. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 9月. [アレルギー 2006; 55(8-9): 401]

分子細胞生物学研究部

部長・助教授:	馬目 佳信	分子細胞生物学, ウィルス学, 脳神経科学
助教授:	小幡 徹	生化学, 内分泌学, 機器分析
助教授:	佐々木博之	細胞生物学, 微細形態学
講師:	渡辺美智子	細胞生物学

研究概要

I. 脳腫瘍への音響化学療法の適用

超音波を利用して細胞膜に穿孔することにより遺伝子などを投与する音響ベクター法の開発をこれまでに行ってきたがマイクロバブルなど音響化学物質と組み合わせることによりキャビテーションの発生効率を上げることが可能である。本年度、細胞や動物を利用して音響化学療法の最適化を行った。音響化学療法は音響ベクター法と異なり組換え遺伝子の作製などが必要なく手軽に実施することができるという利点を有する。脳では音響化学物質を直接腫瘍内に投与することができるため音響化学療法が特に有効な組織と思われた。

II. 脳腫瘍に対する局所療法用薬剤含有シートの開発

脳腫瘍局所療法のためのアドリアマイシン含有ポリマーシートを作製し動物モデルで効果を確認した。シートは徐放性で組織適合・分解作用があった。電子顕微鏡を用いてシートの構造を明らかにし報告した。

III. ソフトイオン化法質量分析を用いた定量法の問題点

近年の質量分析システムの発達は、田中・Fenn等のノーベル賞受賞で示されるソフトイオン化法に依るところが多い。その結果GCMSでは出来なかった巨大蛋白や糖、核酸などの難揮発性物質の質量分析が簡単に行えるようになり、プロテオームやメタボロームといった分野への応用が盛んになった。それにつれて、それら物質の定量もソフトイオン化法で行われるようになってきた。しかし、定量に用いるソフトイオン化法には落とし穴があることを指摘し、その検証と問題点を明らかにした。

それは質量分析での定量法の基本である同位体希

積法で、ソフトイオン化法においては重水素標識が不安定であることを示した。

IV. エンドトキシン高感度定量法の開発と臨床測定

臨床検査医学的にはエンドトキシン測定は、確立された方法として普通に行われているが、実際には臨床と結びつくような結果が出ず、臨床診断上余り役に立っていないというのが実情である。

その原理を検討する内、新しい画期的な測定方法を発見し、臨床測定法として開発を行った。その結果、高感度かつ迅速なエンドトキシン測定法が確立された。それを用いて様々な臨床試料の測定を行い、エンドトキシン値を指標とした新たな臨床像が明らかにされつつある。例えば健康人ボランティアの血中エンドトキシンレベル (0.073 ± 0.038 pg/mL, $N=7$) を、明らかにしたことである。この値は従来法で測ることは不可能であった。またこのことは敗血症などの発症に至る境界が存在することを意味し、臨床像の新たな見方を提案することとなった。

V. 細胞間接着装置タイトジャンクションの機能解析

タイトジャンクション (TJ) は単純上皮において水、イオンの細胞間透過性をコントロールする接着装置である。皮膚においてもその存在については知られているが機能については十分に解明されていない。そこで今年度は、ヒトケラチノサイト (NHEK) を用いて TJ 関連分子の局在性と細胞間バリアの関連性について検討を行った。NHEK を高カルシウム (1.3 mM) 培地で培養し分化誘導すると、クローディン-1、オクルーディン、ZO-1 が細胞膜に局在し、それに伴い transepithelial electrical resistance (TER) が上昇した。このとき TJ ストランドが強固に形成されていることをフリーズフラクチャーにより確認した。TJ 関連分子クローディン-1 およびオクルーディンそれぞれについて siRNA を行ったところ TER の低下が認められ、特にクローディン-1 の siRNA によりオクルーディンの細胞膜への局在が阻害された。以上より細胞間バリアの構築に TJ 関連因子の発現および局在性が影響することが明らかとなった。

VI. 三次元培養システムによる脳腫瘍細胞の特性評価

グリオーマは日本における原発性脳腫瘍の約 1/4 を占めるが、その治療法・薬剤の開発にはヒトグリ

オーマ細胞株が用いられ、単層 2 次元 (2-D) 培養下での評価実験が行われている。しかし、脳腫瘍細胞が持つ悪性度・薬剤抵抗性等の変化を検討するには 3 次元 (3-D) 培養システムが重要と考え、4 種類のヒトグリオーマ細胞株を用いて 3-D 培養を行い、培養後の変化を走査型・透過型電子顕微鏡により検討した。その結果ヒトグリオーマ細胞は通常の 2-D 培養では各細胞株間の変化は確認できないが、3-D 培養を行うと著しい形態変化が確認できた。さらにそれらは 1) 個々の細胞体が判別困難なアグリゲート型集塊、2) 細胞個々が独立したスフェロイド型集塊、および 3) 播種のような独立増殖型集塊の 3 種に大別できる事が明らかとなった。

「点検・評価」

音響化学物質には様々なものが知られているが超音波造影剤として知られているバブル製剤を用いることにより、超音波強度の変化と合わせて脳腫瘍の診断と治療を同時に行うことができる (セラグノース)。セラグノースは超音波照射・診断装置を用いることによって実現が可能でありこの技術に強い本学が優位に立って研究をすすめることのできる分野であると思われた。一方、音響化学療法は正常組織に対しても障害を与えてしまうため照射野を制御する技術開発も必要であることが明らかになった。

薬剤含有シートは当初超音波照射により薬剤が放出されるシステムを目指していたが達成が困難であった。しかし開発過程で薬剤とポリマーの比を工夫することにより徐放作用が得られることが判明し直接脳腫瘍への局所投与へ応用可能であることが判明した。

またソフトイオン化法の問題点に関する検討は、現在世界的にルーチンに行われているソフトイオン化法の定量測定に警鐘を鳴らすものと思われる。

さらにエンドトキシン測定法の開発は、その及ぼす影響は大きく、評価はこれからであろうが、近い将来に従来の測定法と置き換わるものになると思われる。また健康人から敗血症ショックの状態まで連続してつながる血中エンドトキシン値が、今後「健康人という定義」を問い直し、新たな敗血症の臨床指標として重要な位置を占めるものと思われる。

その他、走査型・透過型電子顕微鏡を用いた 3 次元システム培養法の開発は、今後脳腫瘍細胞に対する治療法・薬剤の開発を目的とした基礎実験に大きく貢献する可能性を示した。研究対象とするグリオーマ (神経膠腫) は生命中枢である脳幹部に発生する腫瘍であるため、腫瘍の増大は直接生命に危険

を及ぼす。しかし有効な治療法が無いため、5年生存率もきわめて低く現在最も治療法の開発が必要とされる疾患の一つである。立体3次元培養を行うことで従来の2次元単層培養では知ることの出来なかった個々の細胞株が持つ特性を明らかにし、各細胞間の差異を分類することが出来た。今後、がん関連遺伝子の発現解析およびシグナル伝達系の解析等を予定しており、脳腫瘍の制御機構解明のための重要な基礎データとなる。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Manome Y, Kobayashi T, Mori M, Suzuki R, Funamizu N, Akiyama N, Inoue S, Tabata Y, Watanabe M. Local delivery of doxorubicin for malignant glioma by a biodegradable PLGA polymer sheet. *Anticancer Res* 2006; 26: 3317-26.
- 2) Watanabe M, Akiyama N, Sekine H, Mori M, Manome M. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase as a protective effect of nicaraven in ionizing radiation- and ara-c-induced cell death. *Anticancer Res* 2006; 26: 3421-28.
- 3) Kojima H, Iida M, Yaguchi Y, Suzuki R, Hayashi N, Moriyama H, Manome Y. Enhancement of cisplatin sensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck transfected with a survivin antisense gene. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132: 682-5.
- 4) Sakamoto Y, Mashiko K, Obata T, Matsumoto H, Hara Y, Kutsukata N, Yamamoto Y. Clinical responses and improvement of some laboratory parameters following polymyxin B-immobilized fiber treatment in septic shock. *ASAIO J* 2007; 53 (5): 646-50.
- 5) Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Sachiko Tsukita, Mikio Furuse, Tsukita S. ZO-1 and/or ZO-2 determine whether and where claudins are polymerized into tight junction strands. *Cell* 2006; 126: 741-54.
- 6) Mimori-Kiyosue Y, Grigoriev I, Sasaki H, Matsui C, Akhmanova A, Tsukita S, Vorobiev I. Mammalian CLASPs are required for mitotic spindle organization and kinetochore alignment. *Genes Cells* 2006; 11: 845-57.
- 7) Sano K, Sasaki H, Shiba K. Utilization of the pleiotropy of a peptidic aptamer to fabricate heterogeneous nanodot-containing multilayer nanostructures. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 1717-22.

III. 学会発表

- 1) Watanabe M, Manome Y. (Invited speaker) Aberrant glycosylation of fibronectin in human species and possible application to orangutan. Joint Seminar of Collaborative Research on Orangutan in Thailand. Salaya, Feb.
- 2) Manome Y, Watanabe M. (Invited speaker) Establishment of ELISA kits for zoonotic infections of Orangutan—A proposal: survey of the antibody titers to pathogenic agents to Orangutan—. Joint Seminar of Collaborative Research on Orangutan in Thailand. Salaya, Feb.
- 3) 馬目佳信. (指定講演)中枢神経系に対する超音波遺伝子治療の現状と展望. 栓子研究会サテライト公開シンポジウム. 京都, 11月.
- 4) 鈴木理恵, 渡辺美智子, 小島博己, 森山 寛, 馬目佳信. 中耳真珠種の成因の解明に向けて—上皮細胞および上皮細胞のストレス応答について—. 第123回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2006; 121(6): 285-6]
- 5) Watanabe M, Hataba Y, Manome Y. Morphology of human brain tumor in three-dimensional cell culture. The 16th International Microscopy Congress. Sapporo, Sept.
- 6) Manome Y, Takeyama H, Abe Y, Koga T, Watanabe M. Diagnostic and therapeutic application of monoclonal antibody recognizing glycosylated fibronectin. Cell Biology Summer Meeting 2006. Hakone, July.
- 7) 鈴木理恵, 渡辺美智子, 小島博己, 森山 寛, 馬目佳信. 中耳真珠腫の成因の解明に向けて—中耳粘膜のストレス応答について—. Cell Biology Summer Meeting 2006. 箱根, 7月.
- 8) 石澤 将, 馬目佳信, 渡辺美智子, 宇都宮一典, 田嶋尚子. 糖尿病性腎症発症機転における Rho/Rho キナーゼ系シグナルの機構. Cell Biology Summer Meeting 2006. 箱根, 7月.
- 9) 船水尚武, 渡辺美智子, 馬目佳信. 膀胱癌細胞への遺伝子導入による抗癌剤感受性変化の検討. Cell Biology Summer Meeting 2006. 箱根, 7月.
- 10) 渡辺美智子, 武山 浩, 丸山一雄, 馬目佳信. 抗体をキャリアとしたバブルリポソームによる腫瘍ターゲティング. Cell Biology Summer Meeting 2006. 箱根, 7月.
- 11) Obata T, Nomura M, Tomaru K, Kase Y. Stable and convenient assay for lipid mediator assay by LC/MS/MS. 17th International Mass Spectrometry Conference. Prague, Aug.
- 12) 阪本雄一郎, 益子邦洋, 松本 尚, 原義 明, 朽方

規喜, 武井謙吉, 富田祥輝, 小幡 徹, 山本保博 (日本医大). (シンポジウム) 各種メディエーター (anandamide, 2-AG, HMBG-1, PAI-1 等) 値の変動から見た敗血症性ショック症例における PMX-DHP の効果判定についての検討. 第 11 回エンドトキシン血症救命治療研究会. 東京, 2月.

- 13) 小幡 徹, 野村真弓, 斉藤敬太, 岩井健一, 岡本靖久, 鹿瀬陽一, 瀧浪将典. エンドトキシンの新しい高感度測定法開発. 第 11 回エンドトキシン血症救命治療研究会. 東京, 2月.
- 14) 斉藤敬太, 小幡 徹, 野村真弓, 都丸慶子, 岩井健一, 岡本靖久, 鹿瀬陽一, 瀧浪将典. 実験的敗血症モデルにおける COX-2 の意味について. 第 11 回エンドトキシン血症救命治療研究会. 東京, 2月.
- 15) 鹿瀬陽一, 小幡 徹, 野村真弓, 斉藤敬太, 岩井健一, 岡本靖久, 瀧浪将典. 新しいエンドトキシン高感度測定法を用いた臨床試料の測定. 第 11 回エンドトキシン血症救命治療研究会. 東京, 2月.
- 16) Kase Y, Obata T. Removing endocannabinoids and reducing oxidative stress with polymyxin-immobilized fibers in patients with specific shock. 27th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine. Brussels, Mar. [Crit Care 2007; 11(Suppl 2) : 119]
- 17) Sakamoto Y, Mashiko K, Obata T, Yamamoto Y (Nihon Medical Univ). Mechanism and effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber columns for removing mediators (HMBG-1, 2-arachidonoyl glycerol, anandamide, PAI-1, protein C and IL-6) in septic shock patients. 27th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine. Brussels, Mar. [Crit Care 2007; 11(Suppl 2) : 117]
- 18) 佐々木博之. (招待講演) 酢酸ウラン代替染色法. 第 103 回電子顕微鏡技術研究会. 東京, 4月.
- 19) 荒井久子, 菊地恵美, 斉藤英希, 佐々木博之. 酢酸ウラン代替染色法の検討 (III). 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 22 回学術講演会. 浜松, 5月.
- 20) Ito Y, Kurosawa M, Kuroda K, Yamamoto T, Sasaki H. Occludin and claudin-1 participate the formation of epidermal tight junction and the barrier function in human keratinocytes. American Society for Cell Biology, 46th Annual Meeting. San Diego, Dec.

分子神経生物学研究部・器官発生研究室

講師: 岡部 正隆 解剖学・発生学

研究概要

器官発生研究室は 2005 年 2 月に分子神経生物学研究部に設立された。本年 4 月より木村巧研究技術員が配属された。今年度は以下の研究活動を行った。

I. 脊椎動物の肺の起源に関する研究

陸上脊椎動物と魚類には内部が空気で満たされた器官, 肺とウキブクロが存在する。肺もウキブクロも消化管の一部が突出したものであり, 二つはこれまで相同器官であると考えられてきた。他方で, 肺は対になった構造であるのに対し, ウキブクロは単一の袋である。肺は消化管の腹側から突出するのに対し, ウキブクロは背側から突出する, などの重要な相違点も存在する。内臓器官は化石として残らないため, 古典的な古生物学ではこれらの器官の相同性を十分に明らかにすることはできていない。我々は比較分子発生学の手法を用いてこの問題にアプローチしている。我々はまずアフリカツメガエル, オーストラリアハイギョ, ポリプテルス, ゼブラフィッシュの肺・ウキブクロにおける遺伝子発現を比較した。その結果, 陸上脊椎動物の肺の発生に中心的役割を果たすことが知られている 3 つの遺伝子, TBX4, FGF10, NKX2.1 がゼブラフィッシュのウキブクロの発生においても発現していることがわかった。また, アンチセンスオリゴを用いた FGF10 の機能阻害は, ゼブラフィッシュのウキブクロ発生を阻害することもわかった。これらのことから, 肺とウキブクロの発生には共通した分子が使われていることがわかった。このことは, 二つの器官の原型となる器官が, 陸上脊椎動物と魚類の共通祖先においてすでに存在し, 肺とウキブクロが実際に相同器官であることを強く示唆している。

II. アポトーシスが誘導する代償性細胞増殖

再生能力を持った組織において偶発的な細胞死が起こると, 生き残った細胞は損失を埋め合わせるために代償性の増殖を行う。例えば, ショウジョウバエの翅成虫原基の半分以上の細胞にアポトーシスを誘導しても, 代償性細胞増殖により最終的に正しい大きさ形態を持った翅が発生する。アポトーシス誘導シグナルの存在下でエフェクター・カスパーゼを阻害し, 翅原基の細胞を“死にかけ”にすると,