

分子細胞生物学研究部

教授：馬目 佳信 分子細胞生物学・脳神経科学

教育・研究概要

I. 脳腫瘍のセラグノーシスシステムの開発

脳腫瘍、特にグリオーマは予後不良の疾患で、医学の進歩とともに様々な補助療法が行われているが、いまだに予後の改善は得られていない。この疾患に対し音響エネルギーを用いた治療法の開発を行っている。超音波は外部から体内深部に物理的エネルギーを安全に与えることができる優れた道具である。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ってキャビテーション効果で細胞の膜を効果的に穿孔し腫瘍を破壊することが可能である。またマイクロバブルは超音波診断剤としても利用できるためグリオーマに対して治療（セラピー）と診断（ディアグノーシス）とを同時に行なうことができるシステムの開発を進めている。本年度、このシステムの試作機を完成させることができた。超音波診断デバイスには日立メディコ社製 EUB6500 を利用し、治療用トランスデューサー 4 は独自に開発し診断用デバイスと組み合わせた。この装置では周波数 500kHz、連続波を 0 - 3 W/cm² の超音波強度で照射することが可能である。一方マイクロバブル存在下 210kHz、2.61W/cm² の超音波強度で時間依存性に脳腫瘍の治療効果が増大することが判明しており、この条件で動物実験で有意に生存が延長することを確認した。

II. 3次元培養による脳腫瘍細胞株の比較

腫瘍細胞を生体内に近い条件で培養するために3次元培養を開発した。3次元で培養することにより超音波などが脳腫瘍組織に与える影響を把握することができる。これまでに生体適合性が高く組織に吸収されるゼラチン担体を利用した培養を行って脳腫瘍細胞の微細形態変化について観測してきた。形態変化が起きる時、細胞膜からの情報が重要であると考へ TGF- β /SMAD 系、マトリクスメタロプロテナーゼ系等の遺伝子発現に注目した。RT-PCR法でこれらの遺伝子の発現を調べたところ最終的に発現の相違を認めたのは TGF- β 、ALK5、ALK1、Smad 2、Smad 4、MMP-2、p38MAPK の 7 つであった。このうち ALK5、Smad 2、Smad 4 の 3 つの遺伝子では発現は大きく異なっており 3次元培養

で発現はかなり抑制されていた。これに対して TGF- β 、ALK5、MMP-2、p38MAPK では発現の差は前者ほど著明ではなかった。これらはいずれも 3次元培養で発現が低下しており各シグナルの関与する信号がどのような変化を起こすのかについての網羅的解析の必要性が示唆されている。またインスリンや各種成長因子で PI3K の活性化が起こると Akt がリン酸化を受けて NO 産生や細胞の増殖、グリコーゲンの合成や細胞の成長・生き残りなどに影響を及ぼす。RT-PCR法で Akt の転写自体にはほとんど差を認めなかったようにウエスタンブロットでも 3次元培養でタンパク量そのものの変化は認められなかった。しかしリン酸化について調べると 3次元培養では Akt のリン酸化が強く確認された。また増殖シグナルでも 3次元培養では U118MG など分散して増殖する細胞では PDGFA の発現が A172、KNS42 など集塊形成するものに対して 10 倍以上発現が高くなっていることが判った。

III. 蛍光ナノ粒子による甲状腺癌抗原の検出

本研究は、東京慈恵医大・外科学講座の武山らが 1996 年に樹立した、ヒト甲状腺癌に対する特異抗体 (JT95 抗体) に対し、高輝度ナノ粒子 (QD) を組み合わせた検出系を構築することで、癌抗原特異的シグナルの増強、診断への応用に向けた最適条件の確立を目的としている。

これまでの研究で、我々は IgM 抗体である JT95 抗体と QD の直接結合によって、簡便な甲状腺癌抗原の検出法の構築に成功している。しかしながら、現行法では、結合率が 10% 未満であることから、診断コストが高くなるというデメリットがあった。現在、結合方法の改良を進めている。本年度は、低コスト化を考慮に入れ、抗マウス IgM 抗体、及び半導体ナノ粒子を組み合わせた三段階反応による検出法の構築、並びに感度の増強を試みた。

細胞染色において、QD は現行の有機色素 phycoerythrin (PE) と同様に検出に用いることができた。また、利点として、PE に比べて検出波長の幅が小さいことから、特に二重染色の際に有効であることがわかった。Western blotting 法では、有機色素の diaminobenzidine に比べて、バンドが見えやすくなること、ELISA 様法では、これまでに報告されていた酵素法による検出に比べて、約 7 倍、感度が増強されることがわかった。今後は、本研究成果をもとに臨床に応用できるよう精度を高めていきたい。

「点検・評価」

脳腫瘍の診断治療について、超音波では病変をリアルタイムに確認することができるため他の診断機器では不可能な、治療を行いながら迅速に結果を診断するすなわち「セラグノーシス」というあたらしいコンセプトを確立することができる。これは音響診断治療学の中でも1つの領域を形成しつつあり、本学では急性期脳梗塞血栓溶解治療の分野と共に研究が進んでいる分野である。脳腫瘍、特にグリオーマはセラグノーシスの対象として最も実用化が期待できる悪性腫瘍であり今後技術開発をさらに進めていく予定である。またセラグノーシスの音響エネルギー照射実験の条件決めのために研究が進められた脳腫瘍の3次元培養法では脳腫瘍の形態だけではなく遺伝子の発現までこの培養で異なってくるのが分かった。培養方法が確立したため他の組織への応用についても調べていきたい。その他本研究部の研究として、大学院生が行っている脳腫瘍や糖尿病性腎症に対するRhoキナーゼの抑制の効果やスローロリス属の遺伝子解析が進んでいる。特にグリオーマでのRhoキナーゼの抑制ではアイソフォームにより細胞周期への影響が異なることやニトロソウレア系抗がん剤への感受性を変化させるなどの結果が得られており脳腫瘍治療戦略への新たな道筋となることが期待される。またスローロリス属は東南アジアから密輸による乱獲により絶滅も危惧されているがミトコンドリア12S, 16S, COXの領域の配列から種の同定を行っている。5つの種から特異なDNA塩基配列を同定したため来年度、日本の動物園の全個体の調査を行う予定である。

また、甲状腺癌抗原のナノ粒子を用いた検出研究に関しては、癌抗原特異的IgM抗体を直接使用する方法について、適した条件を見出し、論文として発表することにつながった。今後は、IgMを分解して用いた場合や、IgG化を行った場合に、感度や精度が上昇するかなどを検討し、最適な条件を見つけ、臨床応用に繋げたいと考えている。

研究業績

I. 原著論文

1) Funamizu N, Okamoto A, Kamata Y, Misawa T, Uwagata T, Gocho T, Yanaga K, Manome Y. Is the resistance of gemcitabine for pancreatic cancer settled only by overexpression of deoxycytidine kinase? *Oncol Rep* 2010; 23(2): 471-5.

2) Manome Y, Mizuno S, Akiyama N, Fujioka K, Saito H, Hataba Y, Kobayashi T, Watanabe M. Three-dimensional cell culture of glioma and morphological comparison of four different human cell lines. *Anti-cancer Res* 2010; 30(2): 383-90.

3) Fujioka K, Manabe N, Nomura M, Watanabe M, Takeyama H, Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K, Manome Y. Detection of thyroid carcinoma antigen with quantum dots and monoclonal IgM antibody (JT-95) systems. *Journal of Nanomaterials* 2010; 2010: 937684.

4) Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, Fujioka K, Lim T, Yamamoto K, Northcote P, Tilley R. Chemical reactions on surface molecules attached to silicon quantum dots. *J Am Chem Soc* 2010; 132(1): 248-53.

5) Prabakar S, Shiohara A, Hanada S, Fujioka K, Yamamoto K, Tilley R. Size controlled synthesis of germanium nanocrystals with hydride reducing agents and their biological applications. *Chemistry of Materials* 2010; 22(2): 482-6.

6) Sudoh K, Hirakuri K, Fujioka K, Manabe N, Yamamoto K. Nanocrystalline diamond particles dispersed by solutions. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* 2009; 34(2): 313-6.

7) Fujioka K, Futamura Y, Shiohara T, Hoshino A, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K. Amino acid synthesis in a supercritical carbon dioxide - water system. *Int J Mol Sci* 2009; 10(6): 2722-32.

8) Fujioka K, Arakawa E, Kita J, Aoyama Y, Okuda T, Manome Y, Yamamoto K. Combination of real-value smell and metaphor expression aids yeast detection. *PLoS One* 2009; 4(11): e7939.

III. 学会発表

1) 馬目佳信. (特別企画: 基礎技術研究会共催セッション) 脳腫瘍治療における超音波分子生物学的技術. 日本超音波医学会関東甲信越地方第21回学術集会. 11月, 東京.

2) Inaba N, Ishizawa S, Kimura M, Watanabe M, Shibasaki T, Manome Y. Different roles of ROCK isoform in malignant glioma cells. The 15th Annual Meeting 2009, Japan Society of Gene Therapy. Suita, July.

3) 馬目佳信, 小林寿光, 幡場良明, 渡辺美智子. 三次元培養脳腫瘍細胞の形態学的変化. 日本顕微鏡学会第65回学術講演会. 仙台, 5月. [顕微鏡 2009; 44 (Suppl. 1): 120]

4) 馬目佳信. (冠ワークショップ「総合画像研究支援(IIRS)」: 微細形態科学研究装置共同利用ネットワークの発足にあたり) 基幹施設の紹介4. 日本顕微鏡学会第65回学術講演会. 仙台, 5月. [顕微鏡 2009;

44 (Suppl. 1): 40]

- 5) 藤岡宏樹, 星野昭義, 真鍋法義, 花田三四郎, 昼岡正樹, 佐藤慶介, Tilley RD, 平栗健二, 山本健二, 馬目佳信. 蛍光ナノ粒子 QD を使った医療応用. 第 8 回 Cell Biology Summer Meeting 2009. つくば, 7 月.
- 6) Fujioka K, Futamura Y, Shiohara T, Hoshino A, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K. Amino acid synthesis and polymerization in a supercritical carbon dioxide - water system. Supergreen 2009. Sendai, Oct.

V. その他

1) 米国 NCBI 遺伝子バンク (GenBank) 登録核酸配列

- ① LOCUS: GQ449391. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus pygmaeus* D-loop, complete sequence; PRI 27-SEP-2009.
- ② LOCUS: GQ449390. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus menagensis* D-loop, complete sequence; PRI 27-SEP-2009.
- ③ LOCUS: GQ449389. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus javanicus* D-loop, complete sequence; PRI 27-SEP-2009.
- ④ LOCUS: GQ449388. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus coucang* D-loop, complete sequence; PRI 27-SEP-2009.
- ⑤ LOCUS: GQ449387. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus bengalensis* D-loop, complete sequence; PRI 22-SEP-2009.
- ⑥ LOCUS: GQ259903. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus javanicus* cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; PRI 22-JUL-2009.
- ⑦ LOCUS: GQ259902. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus pygmaeus* cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; PRI 22-JUL-2009.
- ⑧ LOCUS: GQ259901. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus menagensis* cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; PRI 22-JUL-2009.
- ⑨ LOCUS: GQ259900. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus coucang* cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; PRI 22-JUL-2009.
- ⑩ LOCUS: GQ253662. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus coucang* isolate 035 16S ribosomal RNA gene, complete sequence; PRI 18-JUL-2009.
- ⑪ LOCUS: GQ253661. Somura H, Hori H, Wa-

tanabe M, Manome Y. *Nycticebus menagensis* isolate 014 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; PRI 18-JUL-2009.

- ⑫ LOCUS: GQ253660. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus javanicus* isolate 036 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; PRI 18-JUL-2009.
- ⑬ LOCUS: GQ259899. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus bengalensis* cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; PRI 17-JUL-2009.
- ⑭ LOCUS: GQ253664. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus menagensis* isolate 014 16S ribosomal RNA gene, complete sequence; PRI 15-JUL-2009.
- ⑮ LOCUS: GQ253663. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus javanicus* isolate 036 16S ribosomal RNA gene, complete sequence; PRI 15-JUL-2009.
- ⑯ LOCUS: GQ253659. Somura H, Hori H, Watanabe M, Manome Y. *Nycticebus coucang* isolate 035 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; PRI 13-JUL-2009.