

「放射線耐性生物における耐性機構の解析」については、研究対象としてクマムシを扱う方法を確立し、いくつかの実験条件が決定された。これらを踏まえて今後さらに研究を進展させることができると思われる。「放射線測定法の開発」については、シリコーン・オイルのシンチレータ溶媒としての有用性を確認し、液体シンチレーション・スペクトロメトリーの国際学会、および成医会において発表を行った。引き続き詳細な検討を行い、データをまとめ論文として発表する予定である。「日常生活用品の放射化分析」については、日本放射化学会において発表を行い、放射化分析法の応用例としての評価が得られた。

3. 教育

放射線障害防止法に基づく教育訓練を年10回実施し98名が受講した。施設管理部署の一次立入者を対象とした教育訓練を年度初めに3回実施し15名が受講した。大学院共通カリキュラムにおいてRI基礎技術の取得を目的とした1コース3日間の実習を行い、2コース5名が受講した。研究室配属学生2講座6名が3週間の実習を行った。

研究業績

Ⅲ. 学会発表

- 1) 進士ひとみ, 田島亜紀子, 岩瀬忠行, 吉沢幸夫, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌の接着因子FnBPAおよびFnBPBの宿主細胞侵入性およびin vivo感染の成立における役割. 第83回日本細菌学会総会. 横浜, 3月. [日細菌誌 2010; 65(1): 124]
- 2) 箕輪はるか, 吉沢幸夫, 瀧上誠. 透明なセラミックを用いた炭素14のチェレンコフ光測定. 第46回アイソトープ・放射線研究発表会. 東京, 7月.

Ⅳ. 著書

- 1) Minowa H, Yoshizawa Y, Takiue M. Cherenkov counting of carbon-14 using a translucent ceramic with high refractive index. In: Eikenberg J, Jaggi M, Beer H, Baehrl H editors. LSC2008 Proceedings of International Conference on Advances in Liquid Scintillation Spectrometry. Tucson:University of Arizona, 2009. p.119-23.

共用研究施設

教授: 馬目 佳信	分子細胞生物学・脳神経科学
准教授: 佐々木博之	細胞生物学・形態学
准教授: 岩本 武夫	生化学・生物物理学・機器分析化学

教育・研究概要

本施設は本年度(平成21年4月1日)、学内の研究の振興をより深めるために総合医科学研究センターの中に新設された。施設を利用するために2つの制度が設けられている。

1. 一般研究員制度

この制度は主に学内研究者を対象とし、年度毎に登録することで共焦点レーザー顕微鏡, 光学顕微鏡, 電子顕微鏡および各試料作製機器, HPLC, 核酸増幅装置など、様々な装置を自由に利用できる制度である。機器の整備・点検はスタッフにより確実に行われるため、いつでも安心して装置・機器を利用できる。またこの制度は単に装置・機器等が利用可能な場を提供するだけでなく、研究者に形態学的、生化学的なアプローチについて具体的なアドバイスや技術的な指導も必要があれば行なう。

2. 受託業務制度

研究の飛躍的な進展に伴い解析するハード/ソフトいずれの技術も同様に高度化し、専門的な生物学的観察が可能となった。しかし、それに伴って解析する技術もハイテク化されたため、様々な機器の使用には専門的な知識が要求される。受託業務制度では、時間と余裕のない研究者のために、専門性と習熟が必要な機器については施設のスタッフが業務として、透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡の試料作製, 観察, 撮影記録, や高速液体クロマト(HPLC)による試料の測定や各種の質量分析などを行っている。この制度の利用により研究の推進・能率化を図ることができる。

制度を運用するための規定が制定され、6月1日から施設が稼働した。また本施設では学内の研究支援だけでなく独自の技術開発も行っている。

Ⅰ. 蛍光ナノ粒子を利用したバイオイメーキング・微量計測

本学で開発されたモノクローナル抗体, JT95は分化型甲状腺がんの特異的に発現する抗原を認識する。この抗体の甲状腺がん血清診断等への利用のため

め、蛍光ナノ粒子を抗体に結合した。結合した抗体を甲状腺がんと反応させると蛍光顕微鏡で抗原の局在を可視化することができた。また従来、酵素抗体法で行っていた抗原定量も蛍光測定によって可能となり感度の向上も見られた。

II. 細胞間接着装置タイトジャンクションの機能解析

重層扁平上皮組織におけるタイトジャンクション(TJ)の機能について検討している。今年度も、ヒト三次元培養皮膚を用いてTJと細胞間バリアおよびTJと細胞極性形成の関連性について検討を行った。ヒト三次元培養皮膚は生体における皮膚と同様に角化層、顆粒層、および有棘層に分化した形態を示す。その中で、TJ関連分子であるクローディン-1、オクルーディンおよびZO-1は顆粒層細胞膜に限局している事を確認し、この三次元培養皮膚に対してカプリン酸(C10)処理を行うと、細胞間バリア機能が破綻することは既に報告した。このC10処理によりTJが崩壊した顆粒層細胞層や角質層では、カルシウムイオンの濃度勾配が破綻する事をイオンキャプチャー電子顕微鏡法により確認した。以上のことより、ヒト三次元培養皮膚においても、細胞内外におけるイオンの分布にTJ関連分子の発現、局在およびTJ構築が重要であることが明らかとなった。

細胞間接着は炎症反応抑制、あるいは皮膚生体防御機構において重要な役割を果たしていると考えられている。タイトジャンクションを含めた細胞間接着の制御機構の理解は、炎症やがんの予防や診断や治療方法の開発や創薬、あるいは皮膚を対象とした機能的化粧品素材探索にもつながると考えている。これらの応用的な研究も含めて、TJ機能の解明について今後も継続していきたいと考える。

III. *In Vitro* で角膜上皮を透過しドラッグデリバリーするチャンネル形成ペプチド(NC-1059)の機能解析

この研究のゴールは合成ペプチド(NC-1059)の投与により治療薬の角膜上皮における透過性が増すかどうかを確認することである。形質転換させた人角膜上皮細胞をこの研究のために最適化し培養を行った。培養細胞が密集した単分子層を形成しているか経上皮の電気抵抗を測定し確認を行った。この単分子層をUssingフラックスチャンバーに取り付け、電気的なパラメータの測定を行い、溶質の流動性は蛍光ラベルした化合物を用いて定量的に検討し

た。UssingフラックスチャンバーにNC-1059を加えると、濃度依存的に短絡電流は増加し、経上皮の導電率は増加した。NC-1059の経上皮の電気抵抗に対する効果は可逆的でもあった。傍細胞の透過性とそのサイズを調べるためにFITCで蛍光ラベルした10~70KDaのデキストランを用いた。デキストランはNC-1059を加えたときのみ角膜単分子層を透過した。また低分子量のフルオレセイン誘導体を使い透過性の動態を解析した。その結果NC-1059(100 μ M)を測定前5分間暴露すると、30~90分後にフルオレセイン誘導体の最大透過性を示した。典型的な薬剤のメトトレキサートもNC-1059で透過性の増加を示した。

「点検・評価」

規定が作成され6月1日より施行、本年度の登録者は52人、受託件数は微細形態学研究関連135件、生化学関連306件であった。本年度は施設がオープンしたばかりであり、実際に効率の良い運用が危ぶまれたが大きな混乱なく制度を運営できるようになったのでスタッフ一同安堵している。また使い勝手などについて利用者の評判も悪くないとの感触を得ている。専門のスタッフによるメンテナンス等がしっかりと行えたためと思われた。一方、施設の設備やスペース、使用できる機器について、総合医科学研究センターの組織変更に伴って撤去されるものや大学でのリース契約が切れるものなどがあり、どの器械が将来も安心して使用できるのかなど今後の研究計画に影響を与えかねない部分はまだ判然としておらず混乱を来しているため今後、きちんとした整備計画を行っていく必要がある。これについては整備が終わり次第、使用できる機器の写真や説明をイントラネットのホームページに掲載するなどを予定しておりさらに有効に利用していただくための施設の紹介や広報で見える形にしていくことを計画中である。

細胞間接着は、炎症反応抑制、がんの転移抑制あるいは皮膚生体防御機構においても一定の重要な役割を果たしている。タイトジャンクションを含めた細胞間接着の制御機構の理解は、炎症やがんの予防・診断・治療方法の開発および創薬、あるいは皮膚を対象とした機能的化粧品素材探索にもつながると考えている。これらの応用的な研究は、産学協同のプロジェクトとして幾つかの企業との共同で遂行しつつあり、今後も継続していきたいと考える。

NC-1059ペプチドは傍細胞経路に一時的に影響を及ぼすことによって、培養角膜上皮細胞単分子層

での薬剤などの透過性が増強されることが明らかとなった。このようにNC-1059は眼病用薬剤のアクセラレーターと効果を高める治療補助剤として開発有用な化合物である。デザインしたペプチドNC-1059に関して、アメリカで特許を取得した。

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. *Anticancer Res.* 2010; 30(2) : 383-90.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Kubo A¹⁾, Nagao K¹⁾, Yokouchi M¹⁾, Sasaki H, Amagai M¹⁾(¹Keio Univ.). External antigen uptake by Langerhans cells with recognition of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med* 2009; 206(13) : 2937-46.
- 6) Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Hoshina T, Kusakari Y, Komukai K, Sasaki H, Hongo K, Kurihara S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca²⁺ leak in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(1) : 87-92.
- 7) Konishi H¹⁾, Kikuchi S¹⁾, Ochiai T¹⁾, Ikoma H¹⁾, Kubota T¹⁾, Ichikawa D¹⁾, Fujiwara H¹⁾, Okamoto K¹⁾, Sakakura C¹⁾, Sonoyama T¹⁾, Kokuba Y¹⁾, Sasaki H, Matsui T¹⁾, Otsuji E¹⁾(¹Kyoto Pref. Univ. Med.). Latrunculin A has a string anticancer effect in a peritoneal dissemination model of human gastric cancer in mice. *Anticancer Res* 2009; 29(6) : 2091-7.
- 8) Kuroda S¹⁾, Kurasawa M¹⁾, Mizukoshi K¹⁾, Maeda T¹⁾, Yamamoto T¹⁾, Oba A¹⁾(¹Pola Chem. Ind.), Sasaki H. Epidermal tight junction: The master skin barrier regulator. *IFSCC Magazine* 2009; 2: 87-91.
- 9) Kurasawa M¹⁾, Kuroda S¹⁾, Kida N¹⁾, Murata M, Oba A¹⁾, Yamamoto T¹⁾(¹Pola Chem. Ind.), Sasaki H. Regulation of tight junction permeability by sodium caprate in human keratinocytes and reconstructed Epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381(2) : 171-5.
- 10) Martin J, Malreddy P¹⁾, Iwamoto T, Freeman L¹⁾, Davidson H¹⁾, Tomich J¹⁾, Schultz B¹⁾(¹Kansas State Univ.). NC-1059: A channel-forming peptide that modulates drug delivery across in vitro corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(7) : 3337-45.

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) 佐々木博之, 河井まりこ¹⁾, 山本敏男¹⁾(¹岡山大学)。ヒト口腔粘膜上皮の細胞間バリアにおける Tight junction の役割について。第19回口腔粘膜学会。葉山，6月。
- 6) Seki K, Sasaki H. Actin filaments (F-actin) of cultured fibroblast is concerned with the ingestion of *Staphylococcus aureus*. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. Kyoto, July.
- 7) Kurasawa M¹⁾, Kuroda S¹⁾, Kida N¹⁾, Yamamoto T¹⁾, Oba A¹⁾(¹Pola Chem. Ind.), Sasaki H. Regulation of epidermal tight junction permeability by an absorption enhancer, sodium caprate. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. Kyoto, July.
- 8) Maeda T¹⁾, Kuroda S¹⁾, Kurasawa M¹⁾, Oba A¹⁾, Yamamoto T¹⁾(¹Pola Chem. Ind.), Sasaki H. Epidermal tight junction maintains calcium distribution in

human reconstructed epidermis and regulates the epidermal differentiation. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. Kyoto, July.

- 9) Kubo A¹⁾, Nagao K¹⁾, Yokouchi M¹⁾, Sasaki H, Amagai M¹⁾(¹Keio Univ.). 3D visualization of epidermal tight junction unveiled trans-tight junction antigen uptake activity of epidermal Langerhans cells. The 39th Annual European Society for Dermatological Research Meeting. Budapest, Sept.
- 10) Sasaki H. Epidermal tight junction: The master skin barrier regulator. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology. Kobe, Sept.
- 11) Arai H, Kikuchi E, Murata, M, Saito, H, Seki, K, Sasaki H. Hematoxylin as an alternative staining solution to uranyl acetate for transmission electron microscopy. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology. Kobe, Sept.
- 12) Seki K, Sasaki H. Staphylococcus aureus in exponential phase acts on the formation of infectious foci in mouse kidney. The 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Diego, Dec.
- 13) Gudlur S¹⁾, Hiromasa Y¹⁾, Iwamoto T, Tomich J¹⁾(¹Kansas State Univ.). Branched, amphipathic peptides that self assemble into nanovesicles. Biophysical Society 54th Annual Meeting. San Francisco, Feb.

V. その他

- 1) Tomich J (Kansas State Univ.), Iwamoto T. Peptide-enhanced corneal drug delivery. US Patent, 2009, US 7592341B2.

寄付講座部門

遺伝病（ライソゾーム病）研究講座

- 主任研究者：衛藤 義勝 小児科学, 遺伝病, 遺伝子治療
(教授)
- 専任研究者：樋口 孝 (ポストドクトラルフェロー)
- 兼任研究者：井田 博幸 小児科学, 遺伝病
(小児科講座教授)
- 兼任研究者：大橋 十也 小児科学, 遺伝病, 遺伝子治療
(DNA医学研究所教授)
- 兼任研究者：小林 博司 小児科学, 遺伝病, 遺伝子治療
(DNA医学研究所講師)
- 兼任研究者：小林 正之 小児科学, 遺伝病, 新生児
(小児科講座講師)

教育・研究概要

I. ライソゾーム病患者のスクリーニング法の検討

乾燥濾紙血を用いて、全国患者からのファブリ病、ポンペ病、ムコ多糖症Ⅰ型、Ⅱ型の患者スクリーニングを施行し、ポンペ病、ファブリ病など十数名を見出している。スクリーニングの対象としては

1. 腎透析センター約1,500名近くの慢性透析患者をスクリーニング、陽性患者を10名近く見出している。今後更に全国からの透析施設からの依頼を受けファブリ病患者のハイリスクスクリーニングを継続検討している。

2. 筋ジストロフィー患者施設150名内2名のファブリ病患者を見出している。又偽陽性患者5名を見出し、現在確定診断中、今後更に全国レベルで、肢体型筋ジストロフィー症のポンペ病ハイリスクスクリーニングを継続研究している。

3. 東北地方でのファブリ病、ポンペ病、ムコ多糖症のハイリスクスクリーニングを施行し、ポンペ病患者1名、ファブリ病患者陽性例5名を検討中である。

現在東北地方は人口800万に対してのライソゾーム病は余りに数が人口あたり少ない。上述したライソゾーム病患者の早期診断、治療に結びつけ検討している。

4. 全国医療施設からの診断要請を行い、ファブリ病、ポンペ病、先天性ムコ多糖症など十数名を白血球で診断している。全国の未治療患者を診断し、酵素治療、或いは低分子製剤での治療を開始する。

II. ライソゾーム病患者病態の検討

特にゴーシェ病、ファブリ病、ポンペ病、ムコ多