

わっていると思われるが、応用研究を進展させるためには、臨床系大学院学生や研究員を獲得することが必要と思われた。

教育の面では、当研究室の専任教員2名で研究室配属、選択実習、免疫学実習などの実習教育や講義を担当している。学生の心に火を付けるような講義ならびに実習の質を高める努力が必要と思われた。さらに、教育と研究を両立させながら成果を発表に導けるかが今年度も大きな課題として残った。様々な課題に挑戦するのは素晴らしいことではあるが、成果をまとめるための課題を絞ることも重要であると思われた。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Watanabe M, Fujioka K, Akiyama N, Takeyama H, Manabe N, Yamamoto K, Manome Y. Conjugation of quantum dots and JT95 IgM monoclonal antibody for thyroid carcinoma without abolishing the specificity and activity of the antibody. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2011; 10(1): 30-5.
- 2) Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155 (Suppl.1): 27-33.

### III. 学会発表

- 1) 斎藤三郎. (シンポジウム: スギ花粉症に関する最新治療-病態から治療まで-) スギ花粉症治療薬の有効性評価-スギ花粉症ニホンザルを用いた経口摂取による検討-. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会. 千葉, 5月.
- 2) 斎藤三郎, 小澤 仁, 今井 透, 遠藤朝彦. 都内に飛散したスギ花粉の免疫学的性状. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 11月.
- 3) 斎藤三郎, 秋山暢丈. 外来抗原によるB細胞トランスの誘導. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉, 11月.

## 分子細胞生物学研究部

教授: 馬目 佳信 分子細胞生物学・神経科学

### 教育・研究概要

#### I. 超音波による脳腫瘍局所療法の開発

##### 1. 脳腫瘍への核酸デリバリー

本研究部では脳腫瘍治療の新規システム, 特に超音波を用いた音響化学療法の開発を行っており, マイクロバブルなど音響化学活性化剤の存在下で選択的照射部位に局所でキャビテーションを発生させ, 細胞膜を破壊, 脳腫瘍細胞を死滅させるシステムを作製して改良を行ってきた。また, この装置の治療効果を更に増強させるために, 核酸分子も前後で局所にデリバリーさせる研究も行なっている。核酸分子を腫瘍組織内に誘導するためには超音波が有効であることをこれまでに示し, 核酸の細胞内へのデリバリーが発生する具体的な照射条件を決定してきたが, 本年度, さらにナノマテリアルと結合させることにより導入効率を上げることが可能であることを示した。

##### 2. RNA 干渉による細胞増殖シグナルのノックダウン

脳腫瘍への核酸デリバリー研究の過程で, 脳腫瘍ではいくつか特徴的な増殖細胞内カスケード分子の発現の亢進や低下が認められることを示してきたが, この遺伝子転写のパターンは脳腫瘍のみに限らず胃がん等, 他の腫瘍でも類似していることが判明した。これまでに ROCK など G タンパク関連タンパクを RNA 干渉によりノックダウンすると, 細胞の増殖能および抗悪性腫瘍薬への感受性に変化が認められることを報告したが, その効果を上皮増殖因子受容体 (EGFR) の抑制や, 腫瘍抑制因子 PTEN の過剰発現と比較した。その結果, どの方法でも細胞増殖を抑制する効果が認められたが, 細胞周期への影響は方法毎に異なることが分かり, ROCK のアイソフォーム 2 の抑制および PTEN の導入が強い腫瘍抑制効果, 抗悪性腫瘍薬への感受性増強作用を持つことが判った。この成果は直接, 腫瘍への核酸デリバリーのターゲットの核酸の選定に役に立つため, 腫瘍の種類を変えていくとともに他のより効果的な細胞内分子の探索を続けていく。

#### II. 光触媒によるウイルス, 真菌への不活化効果の検討

酸化チタンを介した光触媒では照射による活性化

で活性酸素等を放出するため匂い分子などの分解が起こることは良く知られている。この光触媒効果についてブラックライトを用いて比較的強力に誘導できる条件を得たため、匂いや感染防止の対策が求められている病室や動物実験を行う研究設備からの要求に応えることが可能である。本年度、光触媒のウイルスや真菌に対する効果についても検討した。その結果、ウイルスでは15分の照射で感染能を90%以上低下させることが測定され、真菌でも60分照射で同程度コロニー形成率を低下させることが判明した。以上より光触媒は匂いなど低分子の分解のみならず、微生物に対しても不活化作用が認められることが示された。

### Ⅲ. 心筋細胞におけるウロコルチンの酸化作用の検討

心房性・脳性ナトリウム利尿ペプチドなど、心疾患においては、様々な病的ストレスに対する保護物質が臨床に应用されている。そのような物質のなかで、心筋細胞に対して様々な機序による細胞保護作用が報告されているウロコルチンを用いて、心筋細胞への病的ストレスによる発現調節の検討を行い、これまでにウロコルチンIについては、酸化ストレスが、その発現に関与していると考えられた。酸化ストレスは、心疾患においては重要な病因の一つであり、心筋細胞においてウロコルチンIがその酸化ストレスからの保護作用を有するのであれば、将来の心疾患の治療において重要な意義を示唆するものとなる。このため本年度は、心筋細胞に対して酸化ストレスを与えるものとしてニコチンを用いて検討を行った。その結果、ウロコルチンIは、心筋細胞株であるHL-1心筋細胞に対し、ニコチンの酸化作用を抑制する働きを有することが示され、ニコチンによる有害作用を抑制する可能性が示唆された。

### Ⅳ. 蛍光ナノ粒子を用いた甲状腺癌の新規診断法の開発

本研究は、甲状腺癌を特異的に認識するIgM抗体(JT95抗体)とナノ粒子を組み合わせることで、癌抗原の検出感度を飛躍的に高め、血液検査による甲状腺癌の診断法の開発、及び穿刺吸引細胞診の更なる精度向上を目的としている。将来的に、患者サンプルによる診断試験を行ない、臨床における有用性を検証、患者負担の少ない腫瘍検査法を開発する事を目指してきた。今年度は、ナノ粒子を使って効果的な検出を行なうため、その前段階である(1)JT95抗体の認識効率向上に向けた検討、(2)サンド

イッチELISA法を使った抗原検出法の構築、及び(3)抗原糖鎖構造の推定について検討を行なった。(1)認識効率の向上に向けた検討では、スパーサー付きのビオチンをJT95抗体へ導入すると共に、ビオチン化反応比を詳細に検討し、高効率のビオチン化条件を見出した。(2)抗原検出法の構築では、JT95抗体と種々のファイブロネクチン(癌胎児性ファイブロネクチン、血漿ファイブロネクチン、または細胞型ファイブロネクチン)を認識する抗体を組み合わせたサンドイッチELISA法を検討し、JT95抗体同士を組み合わせる手法が最も抗原の検出に適していることを見出した。(3)抗原糖鎖構造の推定では、甲状腺未分化癌細胞(SW1736)の可溶化物から糖鎖を単離し質量分析を行なった。その結果、alpha 2-6/2-3のシアル酸構造が多く検出されており、JT95抗体がこれらの糖鎖構造を認識している可能性が示唆された。

現在、これらの研究成果を用いた臨床研究が進められており、血液からの抗原検出法の精度を検討している。今後、ELISA法による検出とナノ粒子による検出とを比較し、精度・感度を検証、より良い腫瘍検査法の構築を進めていく。

### 「点検・評価」

#### 1. 研究

本研究部は、遺伝子の転写や発現調節、高分子核酸やタンパクの測定、分子の可視化など、分子生物的手法を利用してヒト生体の最小の構成単位である細胞を解析することにより医学上の問題を解決する研究を進めている。そのために新規技術の取り込みや新たな開発が有用であり、これまであまり利用が進んでこなかった超音波を利用する治療法の開発や、光触媒、匂いなどの拡散小分子のパターン認識の研究を積極的に行なっている。開発研究が多いのはこのためである。脳腫瘍治療法の開発については本年度も具体的な核酸のデリバリーのシステム開発が進んでおり研究が現在集約しつつある。今後、さらに技術で組み合わせることで効果が相乗的に加速されよう。

心筋のウロコルチン研究では、種々の心血管作動物質による有害作用の軽減を有する候補物質としての位置づけで、その作用機序のメカニズムの解明の研究に重点を置いて研究を行っている。今後、ウロコルチンのプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドなども併用し、ストレス刺激とウロコルチン発現調節の検討も含めて研究を進めていく予定である。

甲状腺癌の研究では、甲状腺癌に特異性のある IgM 抗体に対して、ピオチン化反応の最適化を行い、抗原検出法の高感度化に成功した。今年度から、同成果を用いた血液検査、及び組織切片染色の臨床研究が進められており、実用化に向けて検証を行っている。

また本研究部は本学のスーパー特区事業も分担しているが、この研究では脳梗塞に対して超音波による超急性期の血栓溶解療法を狙っている。この際、中枢神経系はヒトの精神活動や言語、四肢の運動や感覚をつかさどる重要な組織であり治療には厳密な安全性が要求される。治療のための強度の超音波照射が中枢神経に於いてどのような影響を与えるのかについて転写される網羅的な遺伝子の測定を進めた。この方法はスーパー特区以外の様々な事業に応用が可能である。

## 2. 教育

教育において、本研究部では本年度も学部および大学院教育に積極的に参加している。学部では免疫学、ウイルス学などの講義や臨床基礎医学の実習を担当し、症候学演習や研究室配属などの参加演習型の教育や指導を行っている。大学院では形態学やバイオインフォマティクスなど共通カリキュラムの演習を担当していて、選択カリキュラムについても社会人枠の学生を指導している。学生や大学院生からのフィードバックは良好であり、研究成果も大学や社会へ還元している。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Takeyama H, Kyoda S, Okamoto T, Manome Y, Watanabe M, Kinoshita S, Uchida K, Sakamoto A, Morikawa T. The expression of sialic fibronectin correlates with lymph node metastasis of thyroid malignant neoplasms. *Anticancer Res* 2011; 31(4): 1395-8.
- 2) Inaba N, Kimura M, Fujioka K, Ikeda K, Somura H, Akiyoshi K, Inoue Y, Nomura M, Saito Y, Saito H, Manome Y. The effect of PTEN on proliferation and drug-, and radiosensitivity in malignant glioma cells. *Anticancer Res* 2011; 31(5): 1653-8.
- 3) Inaba N, Fujioka K, Saito H, Kimura M, Ikeda K, Inoue Y, Ishizawa S, Manome Y. Down-regulation of EGFR prolonged cell growth of glioma but did not increase the sensitivity to temozolomide. *Anticancer Res* 2011; 31(10): 3253-8.
- 4) Takeyama H, Shimada T, Manome Y, Uchida K,

Morikawa T. Detection of micrometastatic cells in peripheral blood and bone marrow fluid of stage I-III Japanese breast cancer patients and transition following anti-cancer drug treatment. *Breast J* 2012; 18(1): 85-7.

- 5) Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Fujioka K, Manome Y, Sukegawa H, Iwai H, Fukata N. Size-tunable silicon/iron oxide hybrid nanoparticles with fluorescence, superparamagnetism and biocompatibility. *J Am Chem Soc* 2011; 133(46): 18626-33.
- 6) Funamizu N, Kamata Y, Misawa T, Uwagawa T, Lacy CR, Yanaga K, Manome Y. Hydroxyurea decreases gemcitabine resistance in pancreatic carcinoma cells with highly expressed ribonucleotide reductase. *Pancreas* 2012; 41(1): 107-13.
- 7) Ikeda K, Saito T, Tojo K. Efonidipine, a Ca (2+) -channel blocker, enhances the production of dehydroepiandrosterone sulfate in NCI-H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224(4): 263-271.
- 8) Fujoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe N, Yamamoto K, Manome Y. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. *J Phys Conf Ser* 2011; 304: 012042.

### III. 学会発表

- 1) 池田恵一, 東條克能, 馬目佳信. 心筋細胞へのストレスによる urocortin の発現調節. 第 84 回日本内分泌学会学術総会. 神戸, 4 月. [日内分泌会誌 2011; 87(1): 357]
- 2) Ikeda K, Isaka T, Hayashi T, Sakamoto M, Sakamoto N, Tojo K. Suppression of the plasma concentration of aldosterone and plasminogen activator inhibitor type 1 by azelnidipine in the hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *ENDO 2011: the Endocrine Society 93rd Annual Meeting*. Boston, June.
- 3) Inoue Y, Aoyagi R, Kawashima T, Murakami K, Tkayanagi M, Fujioka K, Manome Y, Sugiyama H, Sato F. Homer1a regulates the activity-induced remodeling of synaptic structures in cultured hippocampal neurons. 10th Anniversary Conference for BioSignal and Medicine (CBSM 2011). Karuizawa, June.
- 4) 池田恵一, 藤岡宏樹, 東條克能, 馬目佳信. ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬による steroid 合成酵素発現への影響. 10th Anniversary Conference for BioSignal and medicine (CBSM 2011). 軽井沢, 6 月.

- 5) Fujioka K, Watanabe M, Takeyama H, Manome Y. Biochemical application of thyroid carcinoma specific antibody (JT95). 10th Anniversary Conference for BioSignal and Medicine (CBSM 2011). Karuizawa, June.
- 6) Akiyoshi K, Fujioka K, Ikeda K, Inoue Y, Inaba N, Manome Y. Effect of modulations of intracellular signals on sensitivity to antineoplastic agent. 10th Anniversary Conference for BioSignal and Medicine (CBSM 2011). Karuizawa, June.
- 7) Somura H, Manome Y, Nakamura M, Hori H. Identification by sequence analysis of mitochondrial DNAs of cytochrome oxidase subunit 1 (COI) regions in slow lorises (genus *nycticebus*) in zoos. 19th SEAZA (South East Asian Zoos Association) Annual Conference 2011. Pattaya, Sept.
- 8) Fujioka K, Hanada S, Sato K, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manome Y, Kanaya F, Inoue Y, Yamamoto K. Silicon nanocrystal' potential effective mechanisms on cells. International Conference on "Biological Responses to Nanoscale Particles". Essen, Sept.
- 9) Marunoka Y, Kanaya F, Hoshino A, Iimura T, Imai H, Otsuka R, Uehas S, Fujioka K, Katsuragawa Y, Shimbo T, Mimori A, Yamazaki T, Manome Y, Omura K, Moriyama K, Matsushima K, Yamamoto K, Research Group for the Establishment of Diagnostic Criteria and Standardized Effective Treatment Guidelines for Progressive Condylar Resorption. Study of the relations between progressive/idiopathic condylar resorption and impaired bone/cartilage metabolism caused by chemokine receptor disorder. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. Santiago, Nov.
- 10) 藤岡宏樹, 池田恵一, 武山 浩, 馬目佳信. 甲状腺癌細胞株の糖鎖構造の解析. 第 54 回日本甲状腺学会学術集会. 大阪, 11 月. [日内分泌会誌 2011; 87(2): 540]
- 11) 池田恵一, 中尾一和 (京都大学), 馬目佳信, 東條克能. 心筋細胞における proopiomelanocortin の発現についての検討. 第 15 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 大阪, 11 月. [日内分泌会誌 2011; 87(2): 774]
- 12) 北山信介, 馬目佳信, 船水尚武. 光触媒による微生物および真菌殺菌能力の検討. 第 47 回日本実験動物環境研究会平成 23 年度総会. 東京, 12 月.
- 13) 横須賀忍, 佐藤慶介, 藤岡宏樹, 馬目佳信, 深田直樹, 平栗健二, 加藤佳祐. ウェットプロセスにより作製したシリコンナノ粒子の生体適合性評価. 第 59 回応用物理学関係連合講演会. 東京, 3 月.
- 14) 池田恵一, 藤岡宏樹, 馬目佳信, 東條克能. Urocortin の心筋細胞における抗酸化作用の作用機序に関する検討. 第 23 回間脳・下垂体・副腎系研究会. 東京, 3 月.