

Aug.

- 3) 斎藤三郎, 藤井裕二, 高岩文雄, 秋山暢丈. スギ花粉症治療米の安全性の評価－健康ニホンザルを用いた検討－. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪. 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. 脳腫瘍局所療法の開発

1. 超音波による脳腫瘍への核酸デリバリーと中枢神経系細胞へ与える影響

超音波は物理的な音響外力を体深部まで伝達することができるため近年、診断目的の利用に加えて血栓や結石などの治療目的に用いられるようになってきている。本研究部も脳腫瘍に対して音響活性化物質との組みあわせで腫瘍細胞を局所で超音波のキャビテーション効果で破壊するシステムを開発してきている。さらに超音波は遺伝子や干渉 RNA など治療用の核酸を細胞内に導入することが可能なため、これまでの治療用のシステムに加えて有効性を上げるための核酸デリバリー法の開発も進めている。治療のためには中枢神経系に 300～500kHz と比較的長い波長の超音波が用いられるが実は超音波が中枢神経系の細胞に与える影響についてはあまり知られていない。中枢神経系は精神や言語、四肢の動きなど人間らしさとしての重要な役割を担当する臓器であり、また一旦障害を受けると再生が難しいため安全性の担保が必要である。そこで本年度、超音波が中枢神経系細胞へ与える影響を遺伝子転写の変化を指標にして包括的に調査した。その結果、星状膠細胞では超音波を照射すると mRNA の転写は増大し、特に核酸やタンパク質合成酵素や核内の転写因子、細胞内シグナル系、その他の遺伝子の転写が亢進、小膠細胞ではインターロイキンやケモカイン受容体の発現の上昇を認めた。また神経幹細胞についても転写産物の量の変動をマイクロアレイによるパステュー解析で比較した。

2. 脳腫瘍細胞での corticotropin-releasing factor (CRF) 受容体および CRF 類似ペプチドの発現

以上のように中枢神経系への超音波照射で発現する遺伝子を網羅的に解析したところ、脳腫瘍細胞から corticotropin-releasing factor (CRF) 受容体および CRF 類似ペプチドが産生されていることが判明した。そこでヒト神経膠芽腫 5 種、ラット 3 種の細胞株を用いてそれぞれの因子がどの程度、転写されているかを半定量 PCR 法で測定した。その結果、転写量自体にはどの因子も細胞株による大きな違いがなく、CRF 類似ペプチドのなかではウロコルチ

ンIIの産生が最も高いことが示された。一方、受容体はヒトと異なりラットでは発現していないものが多かった。これらの因子の転写は細胞の増殖シグナルによる影響を受けず、また細胞障害、特に放射線の照射や抗癌剤テモゾロミドの影響もほとんど受けないことが確認された。

II. 心筋細胞の酸化ストレスとウロコルチンの作用

心筋の病的ストレスとして酸化ストレスが存在するが、これまでの検討において、ウロコルチンIの添加が、心筋の酸化ストレスの抑制に作用することが証明された。本年度は、特にその作用の確認を行うべく、ウロコルチンIのHL-1心筋細胞培養系への添加のみならず、内因性のウロコルチンIのノックダウンを使用して酸化ストレスとウロコルチンIの作用を確認した。その結果、ウロコルチンIのノックダウンにより、HL-1心筋細胞における酸化ストレスの増強がみられ、ウロコルチンIの抗酸化作用を裏付ける結果となった。さらにウロコルチンI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を構築してニコチンによる酸化ストレスとの関係を検討した結果、ニコチン刺激によりウロコルチンIのプロモーター活性の増強がみられ、ニコチンによる酸化ストレスへの応答にウロコルチンIが関与しているものと考えられ、今後も検討を継続していく予定である。

III. 甲状腺癌細胞株に発現する糖鎖構造の検討

本研究は、甲状腺癌を特異的に認識するIgM抗体(JT95抗体)と半導体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いる。今年度は、JT抗体の認識に関与する糖鎖構造を推定するため、乳頭癌2種(K1, IHH4)、未分化癌3種(SW1736, 8305C, 及び8505C)を用いて、糖鎖に特異性のあるタンパク質であるレクチンとの反応を検討した。

レクチンを使った解析からは、SW1736細胞株が多くの糖鎖タンパク質を発現し、培養液中に分泌していることが示唆された。SW1736細胞の培地はDatura stramonium (DSA), Sambucus sieboldiana (SSA), 及びAgaricus bisporus (ABA)の値が高く、O型、N型両方の糖鎖構造の発現・分泌が示唆されると共に、SSAの値からは α 2-6構造のシ

アル酸の発現が示唆された。細胞可溶化物は、DSA, SSA, ABA, 及びMaackia amurensis (MAM)の値が他の細胞株に比べて高く培養液に分泌されていた糖鎖構造に加えて、 α 2-3構造のシアル酸の発現が示唆された。本年度の検討結果からは、他の細胞株では培地中への糖鎖分泌はほとんど検出できなかった。しかしながら、細胞可溶化物からはレクチンの反応が検出されており、IHH4細胞では、DSAやSSAの値が高く、8305CやK1細胞では、ABAとSSAが高い傾向が見られた。

本検討で用いた細胞株の可溶化物において、SW1736とIHH4の両細胞株のDSAの値が、他のレクチンの値に比べて高い点で共通している。これらの細胞株は、浸潤能も他の2種類に比べて高いことから、DSAが認識する糖鎖構造が浸潤能に影響を与えている可能性が示唆された。今後、DSAが認識した糖鎖構造の詳細な解析を進める。また、JT抗体の認識する抗原の糖鎖構造を、同様にレクチン解析することで、本検討結果との整合性を確かめる。

「点検・評価」

1. 研究

分子細胞生物学は、ヒトを構成する細胞に焦点を当てて、遺伝子の転写や発現調節、高分子核酸やタンパクの測定、分子の可視化などの手法を用いて医学研究を行なっている。本年度も次世代シーケンサーやマイクロアレイなどの手法を導入し、新たな側面からの研究を行った。流行りの研究を取り入れることに専念している訳ではないが研究方法の進歩により我々の分野は網羅的な解析に頼る部分が増えている。情報をどのように処理していくかについて日頃から点検を行なっている。また本年度は、産学連携を促進する展示会でアカデミックフォーラムを主催するなど研究の社会還元を行なったことが評価できる点である。

2. 教育

教育についても本年度も学部および大学院教育に積極的に参加した。学部では免疫学、ウイルス学を始めとした講義や実習を担当し、医学英語専門文献抄読、症候学演習や研究室配属などの参加型演習の教育に積極的に応募して教育を進めている。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、選択カリキュラムでも社会人枠の大学院生を指導している。学生や大学院生からのフィードバックは概ね良好である。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Watanabe M, Akiyama N, Manome Y, Hasegawa N. Spontaneous mutant ICR kuru2 might be another shaker-2 deaf mouse. *In Vivo* 2012; 26(5) : 787-91.
- 2) Kamada M, Ikeda K, Fujioka K, Akiyama N, Akiyoshi K, Inoue Y, Hanada S, Yamamoto K, Tojo Y, Manome Y. Expression of mRNAs of urocortin and corticotropin-releasing factor receptors in malignant glioma cell lines. *Anticancer Res* 2012; 32(12) : 5299-308.
- 3) Fujioka K, Arakawa E, Kita J, Aoyama Y, Manome Y, Ikeda K, Yamamoto K. Detection of aeromonas hydrophila in liquid media by volatile production similarity patterns, using a FF-2A electronic nose. *Sensors (Basel)* 2013; 13(1) : 736-45.
- 4) Hanada S, Fujioka K, Futamura S, Manabe N, Hoshino A, Yamamoto K. Evaluation of anti-inflammatory drug-conjugated silicon quantum dots: their cytotoxicity and biological effect. *Int J Mol Sci* 2013; 14(1) : 1323-34.
- 5) 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. *ACTH RELATED PEPTIDES* 2012; 23 : 8-9.
- 6) Fujioka K, Hanada S, Inoue Y, Shiraiishi K, Kanaya F, Manome Y. Evaluation of nanotoxic effects on brain using in vitro models. *AATEX* 2012; 17(Suppl.) : 156.
- 7) Maruoka Y, Kanaya F, Hoshino A, Iimura T, Imai H, Otsuka R, Ueha S, Fujioka K, Katsuragawa Y, Shimbo T, Mimori A, Yamazaki T, Manome Y, Moriyama K, Omura K, Matsushima K, Yamamoto K. Study of osteo/chondropenia caused by impaired chemokine receptor and for progressive/idiopathic condylar resorption. *日顎変形会誌* 2012; 22(補冊) : S15-22.

II. 総説

- 1) Ikeda K, Fujioka K, Manome Y, Tojo K. Clinical perspectives of urocortin and related agents for the treatment of cardiovascular disease. *Int J Endocrinol* 2012; 2012 : 198628.
- 2) Ikeda K, Fujioka K, Manome Y, Tojo K. Suppression of aldosterone synthesis and secretion by Ca^{2+} channel antagonists. *Int J Endocrinol* 2012; 2012 : 519467.

III. 学会発表

- 1) 池田恵一, 馬目佳信, 東條克能. Urocortin I の心

筋細胞における抗酸化作用の検討. 第85回日本内分泌学会学術総会. 名古屋, 4月. [日内分泌会誌 2012; 88(1) : 349]

- 2) Ikeda K, Fujioka K, Claycomb WC (LSU Health Science Center), Manome Y, Tojo K. Anit-oxidative actions of Urocortin on HL-1 cardiomyocytes. the ISE/ECE 2012 (15th International Congress of Endocrinology/14th European Congress of Endocrinology). Florence, May.
- 3) Manome Y, Akiyoshi K, Kamada M, Fujioka K, Ikeda K, Watanabe M. Deletion of the motor domain of myoXV is responsive for mutant Kuru2 mouse that demonstrates hearing impairment and abnormal behaviors. 第11回 CBSM 2012 (11th Conference for BioSignal and Medicine). 志摩, 9月.
- 4) Kamada M, Ikeda K, Akiyoshi K, Fujioka K, Manome Y. Evaluation of the small-molecule release from the central nervous system cells by therapeutic insonation. 第11回 CBSM 2012 (11th Conference for BioSignal and Medicine). 志摩, 9月.
- 5) Akiyoshi K, Kamada M, Fujioka K, Ikeda K, Manome Y. Detection of KRAS mutations in colorectal cancer. 第11回 CBSM 2012 (11th Conference for BioSignal and Medicine). 志摩, 9月.
- 6) 池田恵一, 藤岡宏樹, 東條克能, 馬目佳信. Urocortin I の心筋細胞における抗酸化作用の検討. 第11回 CBSM 2012 (11th Conference for BioSignal and Medicine). 志摩, 9月.
- 7) 藤岡宏樹, 池田恵一, 馬目佳信. ナノ粒子が与える神経幹細胞への影響評価. 第11回 CBSM 2012 (11th Conference for BioSignal and Medicine). 志摩, 9月.
- 8) Fujioka K, Hanada S, Inoue Y, Kanaya F, Shiraiishi K, Manome Y. Evaluation of nanotoxic effects using in vitro central nerve models. *Nanotoxicology* 2012 (6th International Conference of Nanotoxicology). Beijing, Sept.
- 9) Somua H, Manome Y, Hori H. Genetic analysis of individuals of genus *Nycticebus* kept in zoo at Singapore. *ASZWM (Asian Society for Zoo and Wildlife Medicine)* 2012. Bangkok, Oct.
- 10) Hori H, Somura H, Manome Y, Ratanakorn P. Analysis of individuals of genus *Nycticebus* in Japanese zoos. *ASZWM (Asian Society for Zoo and Wildlife Medicine)* 2012. Bangkok, Oct.
- 11) 池田恵一, 藤岡宏樹, 東條克能, 馬目佳信. Urocortin I の心筋細胞における抗酸化作用の検討. 第129回成医会総会. 東京, 10月.
- 12) Fujioka K, Hanada S, Inoue Y, Kanaya F, Shiraiishi K, Manome Y. Highly concentrated silica nanoparti-

cles affect the activities of neural stem cell line. *Nano-safe* 2012. Grenoble, Nov.

- 13) 藤岡宏樹, 池田恵一, 武山 浩, 馬目佳信. 蛍光を使った甲状腺癌細胞検出法の開発と応用. 第 55 回日本甲状腺学会学術集会. 福岡, 11 月.
- 14) 藤岡宏樹, 花田三四郎, 井上由理子, 白石貢一, 叶谷文秀, 馬目佳信. ナノマテリアルが脳に与える影響評価法の開発. 日本動物実験代替法学会第 25 回大会. 東京, 12 月.
- 15) 高槻七生, 釘崎愛理, 栗山千秋, 藤岡宏樹, 鎌田美乃里, 池田恵一, 馬目佳信. 香料成分が与える皮膚細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ調節効果. 日本食品科学工学会平成 25 年度関東支部大会. 東京, 3 月.
- 16) 栗山千秋, 釘崎愛理, 高槻七生, 鎌田美乃里, 池田恵一, 馬目佳信, 藤岡宏樹. 匂い装置によるコーヒーの気相成分プロファイリングの試み. 日本食品科学工学会平成 25 年度関東支部大会. 東京, 3 月.
- 17) Ikeda K, Fujioka K, Manome Y, Tojo K. Pharmacological effects of urocortins on nicotine-induced oxidative stress to HL-1 cardiomyocytes. 第 86 回日本薬理学会年報. 福岡, 3 月. [J Pharmcol Sci 2013; 121(Suppl1) : 85P]

プロジェクト研究部

腎臓再生研究室

室長：横尾 隆 腎臓再生医療

教育・研究概要

我々は将来的なヒト臨床応用可能な腎臓再生を目指しているが、今年度はその基盤研究として、マウスおよびラットを用いた小動物のエリスロポエチン (EPO) 産生組織を新規発生させる事を目的とした。つまり①発達過程にある胎仔の後腎を移植する小動物モデルを用いて、異種動物間移植での EPO 産生組織の再生が可能であるか検討し、②ラットおよびマウスを用いた EPO 産生組織再生医療の基盤研究を行い、③自殺誘導遺伝子 (ER-E2F1) 搭載トランスジェニックマウスの後腎を足場として用いることにより、EPO 産生細胞・組織が発達継続する過程において不必要となる異種部分を排除し、目的とする EPO 産生組織再生させた。

I. 体細胞ニッチ法による自己 EPO 産生細胞の樹立

ラットにマウス後腎を移植し、免疫抑制剤 (FK506) 投与下に発生を継続させる。發育した後腎の EPO 産生能を血清の ELISA 法および、抽出 mRNA の qPCR によって反定量化して確認した。また EPO がホスト由来か、ドナー由来かを種特異的プライマーを用いて確認した。さらに骨髓移植実験により骨髓由来か迷入血管内皮由来かを確認した。

発達過程にある胎仔の後腎を移植するラット・マウス小動物モデルを用いて、①異種動物間移植をおこなった後腎においても EPO 産生能を維持しており、またその EPO 産生細胞の起源は後腎ドナーの動物種ではなく、レシピエント動物種が起源である事を示した。②Tie2-EGFP マウス, VEcad-EGFP マウスなど、血管内皮に EGFP を発現するマウスを作成し、それらマウスの骨髓を移植した '骨髓のみトランスジェニック' となった骨髓移植後マウスをレシピエント動物とし、ワイルドタイプ・マウスの胎仔後腎をレシピエント動物大網部に移植し、発達継続させて EPO 産生細胞がレシピエントの骨髓由来であるか、血管内皮細胞由来であるかを検討し、その結果、骨髓を起源としている事を示し、さらにその細胞は間葉系幹細胞 (MSC) を起源としている可能性がある事を示した。③自殺誘導遺伝子 (ER-E2F1) 搭載トランスジェニックマウスの後腎を足