

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. 超音波医療のための脳腫瘍への核酸デリバリーシステムの完成

神経膠芽腫は中枢神経系に発生する予後不良の悪性腫瘍である。この腫瘍は浸潤性に増殖するため、手術を行っても局所再発を繰り返す。中枢神経系では大人では神経細胞の分裂は稀なので、成人の頭蓋内で積極的に分裂している細胞は現実的に悪性腫瘍細胞と見なして治療の対象になり、さらにこの腫瘍は中枢神経系以外の組織への遠隔転移は非常に稀であるため効率的な腫瘍局所治療を開発することにより患者の長期生存が期待できる。これまで本研究部では超音波を用いた音響エネルギーにより限られた局所で腫瘍細胞を殺傷する音響化学療法を開発を進めてきた。現在この治療法を進展させ、効果を増強させるため、超音波を用いて核酸、特に干渉 RNA を脳腫瘍組織内に導入して治療する方法との併用療法を提案してきた。超音波は音の波動エネルギーを体の深部まで到達させることができる空気や骨以外の軟部組織では伝搬性に優れたツールであり、独自設計の 200~500kHz の超音波を頭蓋内に照射できるトランスデューサーを作製して核酸、特に RNA 干渉などを脳腫瘍の細胞内に導入する研究を進めている。本年度、脳腫瘍で遺伝子の転写が亢進している増殖シグナル、特に Rho-MAPK 経路および上皮増殖因子受容体 (EGFR) などを対象にした核酸デリバリーシステムを完成させた。その結局、最も効果が強く認められたものは Rho キナーゼアイソフォーム 1 (ROCK1) の RNA 干渉による変調であり、この核酸の導入により腫瘍細胞の増殖の抑制に加えて化学療法剤テモゾロミドとの併用効果を高め細胞周期を有意に変化させることができた。

II. 心筋細胞におけるストレス応答性ペプチドの役割

従来、心臓はポンプとしての役割が特に強調されてきたが、近年、心房性/脳性ナトリウム利尿ペプチド (ANP/BNP) などのペプチドが同定され、心臓が分泌能も持つことが明らかにされてきた。ウロコルチン (urocortin [Ucn]) は 1995 年に同定された、視床下部・下垂体・副腎系の cortico-tropin-releasing factor (CRF) と相同性を持つホルモンで、

CRH 受容体を介して対象となる器官に作用を及ぼすことが知られている。心筋細胞にも CRH 受容体が発現していることが報告されて以来、本研究部では CRH や Ucn が心筋細胞へ与える作用を検討している。このうち Ucn I および Ucn II は心筋細胞で産生されていることから、心筋細胞では受容体とリガンドの両方の発現が心筋の生理機能に関係していると考えられている。CRF はストレスを軽減するなどストレス反応に強く関わっていることから Ucn もストレス反応に関与すると思われる、薬剤、特にニコチンなど酸化ストレスを強く細胞に与える薬剤を用いて反応性を調べた。その結果、心筋は Ucn を産生し、心臓が受ける酸化ストレスを軽減していることが示された。この作用は CRF 受容体の中でも 2 型の受容体を介することも示唆された。心筋以外の細胞を用いて再現性を確かめながら作用の普遍性を明らかにしていく予定である。

III. 胃がん細胞での CRF 受容体および CRF 類似ペプチドの発現の検討

脳腫瘍が転写している産物の網羅的な解析を行った結果、脳腫瘍、特に神経膠芽腫細胞で corticotropin-releasing factor (CRF) の受容体等が発現していることが判明した。この事実から昨年度、脳腫瘍での CRF 受容体、およびリガンドとなる CRF 類似ペプチドの役割を調べてきたが、中枢神経系以外の細胞でも同様なペプチドの発現が観察されることが分かってきた。そこで中枢神経系とは無関係な上皮性の悪性腫瘍である胃がん細胞についても、腫瘍細胞での Ucn や受容体の役目を調べるため Ucn ファミリーの転写量を逆転写核酸増幅法 (RT-PCR) により測定した。ヒトおよびラットの神経膠細胞株の多くで Ucn I, II, III や CRF の 1 型受容体 (CRFR1), 2 型受容体 (CRFR2) の RNA が転写されているのと同様に、胃がん細胞 STKM-1 でも Ucn I, II, CRFR2 の発現が認められた。しかし脳腫瘍細胞と異なり、Ucn III や CRFR1 の転写は認められなかった。また転写は、血清添加による細胞増殖や抗がん剤による細胞障害の影響を受けず細胞内の発現量にもほとんど変化が認められないことが観察された。

IV. ヒト神経膠芽腫細胞を使用した CRF 類似ペプチド分泌機構の検討

Ucn I は、これまで生体のストレス応答機構において重要な役割を担っていることが報告されているが、その分泌機構については、報告がない。今回、

上記のように神経膠芽腫細胞においてCRF類似ペプチドのUcnが発現していることが同定されたため、神経膠芽腫細胞を用いて、その発現機構の検討を行った。まず、培養ヒト神経膠芽腫細胞(A172およびU138-MG細胞)においてUcn I, CRFR1およびCRFR2の免疫染色を行い、その発現を検討した。その結果、A172細胞においては、そのすべての発現を認めたが、U138-MGにおいては、CRFR1の発現が弱く、細胞による相違があることが明らかとなった。さらにUcn Iの分泌機構を検討するためにUcn I-蛍光タンパク融合タンパク発現プラスミドを構築してA172ヒト神経膠芽腫細胞に遺伝子導入した後、蛍光顕微鏡にてその追跡を行った。その結果、Ucn Iは、構成性の分泌経路により細胞外に分泌が行われ、刺激により、ゲノム領域へ直接の分泌刺激により合成されたUcn I mRNAの量が分泌量にそのまま反映されることが示唆された。

V. 中枢神経系に及ぼすナノ化学物質の影響を調べるための試験法の開発

ナノテクノロジーの進歩とともにナノ材料は日常のあらゆる分野で利用されてきている。しかし毒性に関しては研究の速度が追いついておらず、依然として解明されていない点も多い。特に化粧品など人体に直接使用する分野でもナノ材料は活用されているため、有害性が認められた場合は社会問題となる可能性がある。本研究部ではナノ材料の基本となるナノ粒子について中枢神経系への影響を明らかにする方法を新たに開発した。この方法はナノ粒子を投与して脳血液関門による*ex vivo*による評価により細胞に影響が及ぶナノ粒子の大きさ効果を調べ、ナノ粒子を直接投与して神経系となる細胞への影響を評価する方法である。我々はこの方法による結果を動物試験と比較することによって簡便かつ高精度に個体での毒性学的影響を予測することができる。神経幹細胞株を用いた毒性試験では、シリカ粒子やチタン粒子において特に50nmより小さい粒子において細胞内への取込みが多数認められ、ミトコンドリア活性への影響が高いことがわかり神経系への分化に影響を与えることが示唆されている結果を得た。また脳血液関門についてもこれ以下のサイズでナノ粒子が通過することが示されており、今後、粒子が中枢神経系に到達する経路や影響について遺伝子の発現を含めて検討を行う予定である。

「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、細胞での遺伝子の転写や発現調節、高分子核酸やタンパク測定、可視化などの研究を進めている。本年度も昨年度に引き続き次世代シーケンサーやマイクロアレイなどの比較的新しい研究手法を用いながら脳腫瘍やペプチドの解析を行った。しかし網羅的な解析に頼るばかりではなく、情報をどのように具体的に処理していくかについて日頃から気をつけるよう努力している。網羅的解析を行っている学外のグループや情報系の大学との共同研究が進んでいることが評価でき、学内の他部門での研究にも役立てることができると考えている。

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。学部では主に2年生、3年生を中心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も携わっている。特に研究室配属などでは配属された学生に学外での発表の機会を与え優秀賞を獲得するなど満足のいく成果が出せたと自負している。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Hoshino A, Hanada S¹⁾, Yamada H²⁾, Mii S³⁾, Takahashi M³⁾ (³Nagoya Univ), Mitarai S²⁾ (²Japan Anti-Tuberculosis Association), Yamamoto K¹⁾ (¹National Center for Global Health and Medicine), Manome Y. Mycobacterium tuberculosis escapes from the phagosomes of infected human osteoclasts, and reprograms osteoclast development via dysregulation of cytokines and chemokines. *Pathog Dis* 2013; 70(1): 28-39.
- 2) Fujioka K, Shimizu N (Institute of Statistical Mathematics), Manome Y, Ikeda K, Yamamoto K (National Center for Global Health and Medicine), Tomizawa Y (Tokyo Women's Medical Univ). Discrimination method of the volatiles from fresh mushrooms by an electronic nose using a trapping system and statistical standardization to reduce sensor value variation. *Sensors (Basel)* 2013; 13(11): 15532-48.
- 3) Akiyoshi K, Kamada M, Fujioka K, Ikeda K, Manome Y. Expression of mRNAs of Urocortin in the STKM-1 gastric cancer cell line. *Anticancer Res* 2013; 33(12): 5289-94.

- 4) Fujioka K, Oikawa T, Takeyama H, Usui R, Nomura M, Tomaru K, Ikeda K, Manome Y. Investigation of the biotinylation method for detecting thyroid carcinoma-specific IgM antibodies and the detectability of carcinoma cells. *Bioimages* 2013; 21 : 1-5.
- 5) Ishizawa S, Fujigasaki J, Kanazawa Y, Matoba K, Kawanami D, Yokota T, Iwamoto T, Tajima N, Manome Y, Utsunomiya K. Sphingosine-1-phosphate induces differentiation of cultured renal tubular epithelial cells under Rho kinase activation via S1P2 receptor. *Clin Exp Nephrol* 2014 Jan 25. [Epub ahead of print]
- 6) Hanada S¹⁾, Fujioka K, Inoue Y (Toho Univ), Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K¹⁾ (¹National Center for Global Health and Medicine). Cell-based *in vitro* blood-brain-barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification. *Int J Mol Sci* 2014; 15(2) : 1812-25.
- 7) Akiyoshi K, Kamada M, Akiyama N, Suzuki M, Watanabe M (Institute of DNA Sciences), Fujioka K, Ikeda K, Mizuno S (Harvard Medical School), Manome Y. Morphological study of cholangiocarcinoma cell line, TK with three-dimensional cell culture. *Mol Med Rep* 2014; 9(4) : 1359-64. Epub 2014 Feb 7.
- 8) 藤岡宏樹, 富澤康子 (東京女子医科大), 清水信夫 (統計数理研究所), 鎌田美乃里, 池田恵一, 山岡龍平 (十一房印刷工業), 山本健二 (国立国際医療研究センター), 馬目佳信. ワインの香りサンプルを学習させた人工鼻によるコーヒーの香り分析. *日味と匂会誌* 2013; 20(3) : 407-10.
- 9) 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. ナノマテリアルが与える脳への影響を評価するボトムアップモデルの開発. *ナノ学会会報* 2014; 12(2) : 57-61.
- 10) Hanada S¹⁾, Fujoka K, Inoue Y (Toho Univ), Kanaya F¹⁾, Manome Y, Yamamoto K¹⁾ (¹National Centre for Global Health and Medicine). Application of *in vitro* BBB model to measure permeability of nanoparticles. *J Phys Conf Ser* 2013; 429 : 012028.
- 11) 池田恵一, 藤岡宏樹, 馬目佳信, 東條克能. ニコチンの酸化作用に対する Urocortin I の心筋細胞における抗酸化作用. *ACTH RELATED PEPTIDES* 2013; 24 : 2-4.
- 12) Sato K¹⁾²⁾, Hirakuri K¹⁾ (¹Tokyo Denki Univ), Fujioka K, Manome Y, Sukegawa H²⁾, Iwai H²⁾, Fukata N²⁾ (²National Institute for Materials Science). Size-tunable magnetofluorescent nanoparticles as *in vivo* imaging. *MRS Proceedings* 2013; 1660.

Ⅲ. 学会発表

- 1) 池田恵一, 藤岡宏樹, 馬目佳信, 東條克能. (一般演題 ポスター: 脂質代謝・心血管内分泌 2) ニコチンの心筋細胞への酸化ストレスに対するウロコルチン I の作用. 第 86 回日本内分泌学会学術総会. 仙台, 4 月.
- 2) Maekawa T¹⁾, Aritomi S (Ajinomoto), Nakamura Y¹⁾, Ikeda K, Yoshimura M, Tojo K, Sasano H¹⁾ (¹Tohoku Univ). The expression of calcium channel subtypes in human normaladrenal and aldosterone-producing tumor. *ISARSH (International Symposium of Aldosterone and Related Substances in Hypertension)* 2013. Sendai, Apr.
- 3) 秋吉宏平, 鎌田美乃里, 渡邊美智子 (ディー・エス・エー研究所), 藤岡宏樹, 池田恵一, 馬目佳信. (細胞の電顕観察)胆管がん細胞株 TK の 3 次元培養の形態. 日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会. 吹田, 5 月.
- 4) Ikeda K, Fujioka K, Manome Y, Claycomb WC (Louisiana State Univ), Tojo K. Possible involvement of urocortin I on adaptation to nicotine-induced oxidative stress to HL-1 cardiomyocytes. *ENDO 2013 (Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo)*. San Francisco, June.
- 5) 藤岡宏樹, 栗山千秋, 鎌田美乃里, 池田恵一, 清水信夫, 山岡龍平, 山本健二, 富澤康子, 馬目佳信. 10 種類のセンサで多種類の匂いを表現することを目的としたソムリエ表現メソッドの開発. *12th Conference for BioSignal and Medicine (CBSM)*. 笛吹, 7 月.
- 6) 藤岡宏樹, 池田恵一, 鎌田美乃里, 秋吉宏平, 馬目佳信. 膀胱癌と正常膀胱上皮の代謝物を標的とした半導体センシングとメタボローム解析. *12th Conference for BioSignal and Medicine (CBSM)*. 笛吹, 7 月.
- 7) 藤岡宏樹, 富澤康子 (東京女子医科大), 清水信夫 (統計数理研究所), 鎌田美乃里, 池田恵一, 山本健二 (国立国際医療研究センター), 馬目佳信. (一般講演: 食品機能 (ゲノム・栄養・官能検査・抗菌)) 匂い分析装置によるコーヒープロファイリングと香料への類似度表現解析. 第 60 回記念大会日本食品科学工学会. 日野, 8 月.
- 8) 藤岡宏樹, 馬目佳信, 池田恵一, 武山 浩. (ポスター: 乳頭癌・基礎病理) レクチンを使った甲状腺癌細胞株の糖鎖解析. 第 46 回日本甲状腺外科学会学術集会. 名古屋, 9 月.
- 9) 藤岡宏樹, 富澤康子, 清水信夫, 栗山千秋, 鎌田美乃里, 池田恵一, 山岡龍平, 山本健二, 馬目佳信. ソムリエ表現法を使った匂いセンサーによるプロファイリング. 日本味と匂い学会第 47 回大会. 仙台, 9 月.
- 10) 鈴木涼子¹⁾, 佐藤慶介¹⁾, 平栗健二¹⁾ (¹東京電機大), 藤岡宏樹, 馬目佳信, 深田直樹 (物質・材料研究機構),

花田三四郎 (国立国際医療研究センター). (ポスター
ショートプレゼンテーション: 光源・回路・放電現象,
照明理論, 光関連材料デバイス) アルキル基修飾した
発光性シリコンナノ粒子の特性. 平成 25 年度 (第 46 回)
照明学会全国大会. 名古屋, 9 月.

- 11) 馬目佳信, 藤岡宏樹, 池田恵一, 武山 浩. (ポスター: 乳頭癌・基礎病理) 甲状腺乳頭癌に関連する糖鎖修飾型抗原の細胞内局在の検討. 第 46 回日本甲状腺外科学会学術集会. 名古屋, 9 月.
- 12) 藤岡宏樹, 清水信夫, 馬目佳信, 山本健二, 池田恵一, 鎌田美乃里, 富澤康子. 人工鼻による類似臭判別アルゴリズムの検討. 第 51 回日本人口臓器学会大会 (JSAO2013). 横浜, 9 月.
- 13) Fujioka K, Hanada S¹⁾, Inoue Y (Toho Univ), Shiraishi K, Manome Y, Kanaya F¹⁾ (¹National Center for Global Health and Medicine). (Health Effects and Toxicity-*In Vivo*) Bottom-up evaluation model for central nerve nanotoxicology. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. Nagoya, Oct.
- 14) 秋吉宏平, 鎌田美乃里, 藤岡宏樹, 池田恵一, 渡邊美智子, 馬目佳信. 胆管細胞癌細胞株の 3 次元培養. 第 130 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 15) Fujioka K, Hanada S, Inoue Y, Kanaya F, Shiraishi K, Yamamoto K, Manome Y. Bottom-up brain model for nano-brain toxicology assay. 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013). Kitakyushu, Nov.
- 16) 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と浸潤能の比較. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会. 和歌山, 11 月.
- 17) 池田恵一, 馬目佳信, 東條克能. (ポスター 5: 生理活性ペプチド) ニコチンによる酸化ストレス負荷条件下におけるウロコルチン I の病態生理的役割; HL-1 心筋細胞培養系による検討. 第 17 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 2013; 89(2): 749]
- 18) 神谷 育, 門沙央理, 三浦茉莉子, 鎌田美乃里, 池田恵一, 馬目佳信, 藤岡宏樹. (ポスター発表プログラム) 菓子由来の餡に含まれるポリフェノール量と抗酸化作用の検討. 平成 26 年度日本食品科学工学会関東支部大会・第 93 回日本栄養・食糧学会関東支部大会合同シンポジウム. 東京, 3 月.

V. その他

- 1) 藤岡宏樹, 清水信夫. 匂い分析装置の感知精度, 及び表現力向上のためのアルゴリズムの開発. 統計数理研究所・共同研究リポート 2014; 318: 1-30.

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

現在爆発的に増加を続ける腎不全は, 長期透析患者に対する著しい QOL 制限のみでなく, 1.4 兆円を超える透析医療費や, 透析患者の高齢化にともなう介護福祉の負担拡大が大きな社会問題となっている。現在透析患者は 30 万人を超えているが, その数は今後も爆発的に増加することが予想され近い将来透析に対する保健医療は破綻することが容易に想像されている。しかし現在腎機能を回復させる画期的かつ根本的な治療法はいまだ存在しない。当研究室はこの危機的状況を打開すべく, これまで不可能とされていた抜本的な腎不全治療開発研究の新世代を切り開くことを最終的な目的とする。我々はこれまで透析患者自身の細胞を利用して, 機能腎臓を患者体内に樹立するという独創的な観点に立って腎臓再生研究に取り組んできた。これまでの研究では, ラット胎仔の腎臓発生部位にヒト間葉系幹細胞を注入し, 胎仔体内で腎臓系譜に分化させることで腎臓原器を樹立することに成功した。この原器をさらに体網内に移植することにより血管系を獲得した成熟腎臓となり, 尿生成能を獲得するだけでなく, エリスロポエチンやレニン分泌といった腎臓内分泌機能も獲得させることに成功している。さらには, ヒトサイズの腎臓再生に挑戦するためブタ胎仔の子宮内操作により, 約 30 グラムの腎臓の再生に成功した。しかし現行のシステムでは, プログラムを用いる異種胎仔の腎臓が混入したヒト-異種動物のキメラ腎臓になってしまう。我々はこの問題に対し, アポトーシスを薬剤存在下で誘導する遺伝子を搭載したトランスジェニックマウス及びブタを作成したが, アポトーシスにより異種部分を排除するタイミングが非常に難しく, 腎機能の獲得に悪影響を及ぼすことが確認されている。そこでヒト臨床に応用するためには純粋ヒト腎臓の作成システムが必要となる。本年度は, 医工学技術, ブタの発生工学技術を統合し, 我々が独自に提唱する腎臓再生誘導法を実現化するための研究開発を開始した。

具体的には, 腎臓のみが欠損した遺伝子改変動物 (マウス, ブタ) の胎仔を作成し, 本来腎臓が出来るはずであった部分, つまり大きく開いた developmental niche に, 腎不全患者由来間葉系幹細胞, ま