

## 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：岩本 武夫 生化学・分子生物物理  
 准教授：立花 利公 微細形態学

### 教育・研究概要

#### I. 甲状腺がん特異抗体を用いたがん抗原の検出

東京慈恵会医科大学外科学講座武山 浩らが作成したモノクローナル抗体はヒト甲状腺乳頭がんを特異的に認識し、組織染色において乳頭がんの部位の同定に役立つことが知られている。また血液などにも抗原が存在するため、サンドイッチ酵素抗体法によって甲状腺疾患にかかった患者からの抗原の定量が可能である。現在、倫理委員会の認可を得て患者検体が集められており血漿中での抗原の定量を行っている。実際には腫瘍が小さいと血漿中の抗原量も少なくなることが予測されるため、測定の高感度化が抗体の活用の鍵となる。これまで以上の手法の簡便化、高感度化を目指して、磁気ビーズを使った方法や免疫クロマト法のアッセイ系を計画している。

#### II. スローロリス属のミトコンドリアゲノム解析

東南アジアに生息するスローロリス属 (*Nycticebus*) はペットなどの目的で国際間取引が盛んにおこなわれていたが、希少動物のため2007年6月にCITES I類に指定され商業ベースでの国際取引が全面的に禁止となった。しかし違法取引は現在も続けられているのが現状であり、成田空港などで違法個体が押収されている。スローロリス属には5種が存在するが、種間で外見上の特徴が類似している個体も多く、本研究部では環境庁および警視庁の要請を受け国内で飼育中の個体について遺伝子解析を行って種の同定法の確立を行ってきた。これまでにミトコンドリアDNAの3つの領域について各種の特徴を明らかにし、依頼を受けて日本動物園水族館協会に加盟している施設全てのスローロリスの個体について種の調査を行ってきた。本年度は別途、ベンガルスローロリスのミトコンドリアの全遺伝子配列を決定した。この結果、従来の押収個体の種の鑑別を行ってきた領域以外のミトコンドリアの遺伝子領域も比較のために利用できるようになった。

#### III. 種類の異なる経過をたどったヒト甲状腺乳頭癌から得られた細胞株の機能的解析

甲状腺乳頭癌は最も頻繁に生じる腫瘍で、これら

の腫瘍の遺伝子発現や細胞分裂、細胞分化などを研究するためには、それらの細胞株が必要である。今回異なる経過をたどった3人の患者さんから3種類の甲状腺乳頭癌の細胞株が得られた。

第一の細胞株は38歳の女性からのもので、この細胞株はlysosomeをあまり持たない上皮細胞で、敷石上に細胞が配列するtypeのものである。この細胞株はTSHやGHあるいはIGF-Iの刺激によってフリー-thyroxine (fT4) と thyroglobulin (Tg) の分泌が促進された。

第二の細胞株は22歳の女性からのもので、甲状腺乳頭癌の転移が認められたものである。この細胞株は小型の上皮細胞からなり、lysosomeがよく観察されている。この細胞株はTSHやGHあるいはIGF-Iの刺激によってfT4とTgの分泌が若干促進された。

第三の細胞株は85歳男性からのもので、先端肥大症を伴う甲状腺乳頭癌で、リンパ節への転移が認められている。この細胞株は小型の上皮細胞でlysosomeをたくさん観察された。この細胞株はGHあるいはIGF-Iの刺激によってfT4とTgの分泌が明らかに促進された。

これらの3種類の甲状腺乳頭癌から得られた細胞株は今後の甲状腺癌の*in vitro*での研究に有意義な細胞株だと思われる。

#### IV. 分枝構造を持つ両親媒性ペプチド・カプセルの生物物理学的な特徴

分枝構造の両親媒性のペプチド・カプセル(BAPCs)は2つの分枝構造を持つペプチド配列(FLIVI)<sub>2</sub>-K-KKKKと(FLIVIGSII)<sub>2</sub>-K-KKKKの等モルで形成されるナノサイズのペプチド・球体で、水溶液中では二分子層を自己組織化し溶質を取り込むことができるポリカチオン・カプセルである。これを4℃で保管すると自己会合により特定のナノサイズカプセルが維持されることを見出した。さらにこのシステムにおいても同様にリン脂質膜の押し出し形成でみられる会合、融合、溶質の取り込みやサイズ変更が可能かどうかのそれらの特性を検証した。検証の結果、多くの特性は脂質ベシクルのものと同様であったが、ペプチド・カプセルはより強靱であることが判明した。次にBAPCsの安定性、封入サイズの限界、細胞に加えた時のローカライゼーション、維持力について検討を行った。BAPCsはエンドサイトーシスによる輸送によらず、確実に培養上皮細胞に取り込まれ、核周囲領域に溜まり、見かけ上分解することなく残存していることを見出した。

次に放射性核種を発するアルファ粒子を BAPCs で封入し、これらのカプセルからの粒子の漏れについて検診を行った。その結果、粒子の漏れは確認されず、また細胞に取り込まれから長期間細胞内で保持されることも確認した。現在この BAPCs の臨床応用への可能性を探索中である。

## 「点検・評価」

### 1. 全体点検・評価

本年度の登録者は108人(うち医師・研究者83人)、受託件数は微細形態学研究関連139件、生化学関連22件であった。施設の登録者の数は本年度も増加し、これまでの最高を記録した。大学院の講義や実習で、施設を利用して演習を行っているので大学院生をはじめとした若い先生方の利用も増え続けている。次世代シークエンサーや各種顕微鏡、質量分析装置など多くの大型機器について、偏りなく幅広く利用されているので、特定の研究ではなく大学全体で研究が推進されていることがうかがわれる。機器は精密な機能を持つ者も多いため、研究が安心して進められるように今後とも対応していきたい。

### 2. 個別研究についての点検・評価

抗体による甲状腺がんの診断について、乳頭がんについては他のがんで知られるようないわゆる腫瘍マーカーが存在しないため、抗体の存在は早期診断やスクリーニングに役に立つ可能性がある。またスローロリスのゲノム解析は東南アジアでの絶滅危惧種の違法取引を抑制させる効果があるため、今後とも社会貢献の一環として本研究施設で進めていく予定である。

3種類の甲状腺乳頭癌から得られた細胞株は今後の甲状腺癌の *in vitro* での研究に有意義な細胞株だと思われる。

細胞内への薬物導入剤として開発したペプチドでできたナノカプセルは、エンドサイトーシスによらず取り込まれるユニークなものである。従来のリポソームよりも安定性が高くこれらの利点を生かせるような BAPCs の臨床応用への可能性を探索する予定である。

## 研究業績

### I. 原著論文

1) Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol* 2013; 195(8): 1645-55.

2) Hanada S<sup>1</sup>, Fujoka K, Inoue Y (Toho Univ), Kanaya F<sup>1</sup>, Manome Y, Yamamoto K<sup>1</sup> (<sup>1</sup>National Centre for Global Health and Medicine). Application of *in vitro* BBB model to measure permeability of nanoparticles. *J Phys Conf Ser* 2013; 429: 012028.

3) Kamata Y, Kuhara A, Iwamoto T, Hayashi K, Koido S, Kimura T, Egawa S, Homma S. Identification of HLA class I-binding peptides derived from unique cancer-associated proteins by mass spectrometric analysis. *Anticancer Res* 2013; 33(5): 1853-9.

4) Hoshino A, Hanada S<sup>1</sup>, Yamada H<sup>2</sup>, Mii S<sup>3</sup>, Takahashi M<sup>3</sup> (<sup>3</sup>Nagoya Univ), Mitarai S<sup>2</sup> (<sup>2</sup>Japan Anti-Tuberculosis Association), Yamamoto K<sup>1</sup> (<sup>1</sup>National 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* 2014; 70(1): 28-39.

5) 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.

6) Sukthankar P<sup>1</sup>, Gudlur S<sup>1</sup>, Avila LA<sup>1</sup>, Whitaker SK<sup>1</sup>, Katz BB<sup>1</sup>, Hiromasa Y<sup>1</sup>, Gao J<sup>1</sup>, Thapa P<sup>2</sup>, Moore D<sup>2</sup> (<sup>2</sup>Kansas Univ), Iwamoto T, Chen J<sup>1</sup>, Tomich JM<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Kansas State Univ). Branched oligopeptides form nanocapsules with lipid vesicle characteristics. *Langmuir* 2013; 29 (47): 14648-54.

7) 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.

8) Dairaku T<sup>1</sup>, Iwamoto T, Nishimura M<sup>1</sup>, Endo M<sup>1</sup>, Ohashi T, Eto Y<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Southern TOHOKU Research Institute for Neuroscience). A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab* 2013; 111(2): 193-6.

9) 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.

- 10) Ishizawa S, Takahashi-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. *Clinical and Experimental Nephrology* 2014 Jan 25. [Epub ahead of print]
- 11) Hanada S<sup>1)</sup>, Fujioka K, Inoue Y (Toho Univ), Kanaya F<sup>1)</sup>, Manome Y, Yamamoto K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>National 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.
- 12) 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.
- 13) 藤岡宏樹, 富澤康子 (東京女子医科大学), 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. *日本味と匂学会誌* 2013; 20(3) : 407-10.
- 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.
- ### Ⅲ. 学会発表
- 1) 池田恵一, 藤岡宏樹, 馬目佳信, 東條克能. 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) 秋吉宏平, 鎌田美乃里, 渡邊美智子 (ディー・エヌ・エー研究所), 藤岡宏樹, 池田恵一, 馬目佳信. (学術講演会発表: 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.
- 3) Ikeda K, Tojo K, Fujioka K, Manome Y, Claycomb WC (Louisiana State Univ). Possible involvement of urocortin I on adaptation of the nicotine-induced oxidative stress to HL-1 cardiomyocytes. ENDO 2013 (The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo). San Francisco, June.
- 4) 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. CBSM 2013 (12th Conference for BioSignal and Medicine). 笛吹, 7 月.
- 5) 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. CBSM 2013 (12th Conference for BioSignal and Medicine). 笛吹, 7 月.
- 6) 藤岡宏樹, 富澤康子 (東京女子医科大学), 清水信夫 (統計数理研究所), 栗山千秋, 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. 匂い分析装置によるコーヒーのプロファイリングと類似度解析. 日本食品科学工学会第 60 回記念大会. 日野, 8 月.
- 7) 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. 日本味と匂学会第 47 回大会. 仙台, 9 月.
- 8) 鈴木涼子<sup>1)</sup>, 佐藤慶介<sup>1)</sup>, 平栗健二<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>東京電気大), 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.
- 9) 馬目佳信, 藤岡宏樹, 池田恵一, 武山 浩. (一般ポスター: 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.
- 10) 藤岡宏樹, 池田恵一, 馬目佳信, 武山 浩. (一般ポスター: 乳頭癌・基礎病理) レクチンを使った甲状腺株の糖鎖解析. 第 46 回日本甲状腺外科学会学術集会. 名古屋, 9 月.
- 11) 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. 日本人工臓器学会第 51 回大会. 横浜, 9 月.
- 12) 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 回成医学会総会. 東京, 10 月.
- 13) 櫻井 進 (河野臨床医学研究所), 岩本武夫. (セッション 5 : 細菌毒素) 生体分子相互作用解析法 (SPR 法) を用いた黄色ブドウ球菌性表皮剥脱素と受容体ゲングリオシドの結合解析. 第 96 回日本細菌学会関東支部総会. 東京, 10 月.
- 14) 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.
- 15) Nakagomi M<sup>1)</sup>, Shudo K<sup>1)</sup>, Sakamoto S<sup>1)</sup>, Handa

H<sup>1</sup>), Iwamoto T, Matsuura T<sup>1</sup>) (<sup>1</sup>Research Foundation Itsuu Laboratory). Novel aromatic carboxylic acid inhibits luciferase enzymatic activity in mammalian cells by acylation of an active regulatory lysine residue. 58th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Francisco, Feb.

- 16) 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) 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証. 日本栄養・食糧学会関東支部第93回シンポジウム・日本食品科学工学会平成26年度関東支部大会. 東京, 3月.

## V. その他

- 1) 馬目佳信. 准看護師試験全科総まとめカード UP-DATED 2013: 感染と予防 01-08. 看学生 2013: 61(9): 15-16.

## アレルギー学研究講座

教授: 渡邊 直熙 寄生虫感染防御とアレルギーの機序

教授: 斎藤 博久 (兼任) アレルギーの機序

### 教育・研究概要

#### I. 小形条虫の再感染防御

小形条虫は世界で多くの感染者をみる人体寄生虫として知られるが, マウスにも感染する。小形条虫の虫卵をマウスに経口感染させると, 短期間に虫卵再感染防御が成立し, さらに数ヶ月後の再感染も完全に防御される。前者は自然免疫により, 後者は獲得免疫による防御と考えられる。とりわけ注目されるのは自然免疫による虫卵再感染防御で, 初感染24時間後には防御が誘導され, 36時間後には1隻の寄生も許さない強い防御となる。この知見をもとに自然免疫に限定した解析を可能とする実験系を確立した。虫卵の初感染を皮下または腹腔にした場合は経口による再感染への防御が起らないことから, 消化管での免疫誘導が必須である。防御の特異性を調べるため, 3種の消化管寄生線虫のいずれかを感染させたマウスに小形条虫の虫卵を経口感染させた。各線虫感染は小形条虫の虫卵感染を部分的にしか防御できず, 小形条虫の虫卵で誘導される防御とは異なる機序と考えられる。防御を担う細胞として, NK細胞, NKT細胞, 好塩基球, CD8<sup>+</sup>細胞は否定されたが, CD4<sup>+</sup>T細胞の関与が示唆された。T細胞の活性化には抗原刺激に加えて補助分子からの刺激が求められる。虫卵再感染防御発現には主要な補助分子であるCD80とCD86からの刺激は不要だが, ICOSLからの刺激が必要である。これらの結果から消化管で惹起される虫卵再感染防御を主導する新たな自然免疫系の細胞の存在が示唆されるが, その詳細を解明するためのさらなる解析が求められる。

#### II. IgE産生量規定遺伝子と感染防御

IgE産生量規定遺伝子のもとでマウスはIgE高応答性と低応答性に分けられる。このIgE産生能と旋毛虫感染防御との関係を検討した。旋毛虫感染マウスではIgE依存性の防御が知られている。旋毛虫を感染させたIgE高応答性マウスのIgE抗体の作用を人為的に阻害すると防御能が低下した。一方, IgE低応答性マウスで同様の実験を行っても防御能は低下しなかった。この結果はIgE産生量規定遺伝子が旋毛虫の感染防御をも支配していることを示