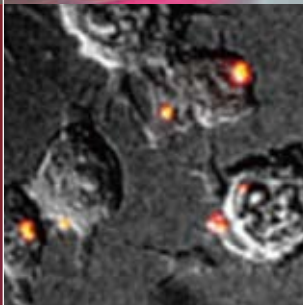




第2回 ナノバイオ創薬研究 シンポジウム



2011年3月5日(土)

京都大学薬学部 記念講堂

第2回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム

2011年3月5日(土) 京都大学薬学部記念講堂

プログラム

ご挨拶

13:00~13:10 佐治英郎(京都大学大学院薬学研究科 研究科長)

講演

座長 高倉喜信(京都大学大学院薬学研究科・教授)

13:10~13:40 細胞性 HIV 抑制因子

小柳義夫(京都大学ウイルス研究所 教授)

13:40~14:10 生体医工学の薬学応用について

牧川方昭(立命館大学理工学部 教授)

研究報告

座長 西川元也(京都大学大学院薬学研究科・准教授)

14:10~14:25 マイクロマシンを用いた核酸デリバリー技術の開発

清水一憲(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

14:25~14:40 カイコ β GRP の β 1,3-グルカン認識機構の解明とその応用

高橋清大(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

14:40~15:00 休憩

座長 山下富義(京都大学大学院薬学研究科・准教授)

15:00~15:15 腎炎治療分子標的医薬の開発

武井義則(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

15:00~15:30 視交叉上核における、概日リズム調節因子解明による

創薬ターゲットの同定

松尾雅博(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

15:30~15:45 有用化合物の創製を指向した微生物二次代謝産物の生合成研究

林 豊(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

15:45~16:00 分子イメージング法を用いた DDS への応用に関する研究

木村寛之(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

16:00~16:15 幹細胞の蛍光標識法の開発と in vivo イメージングへの応用

樋口ゆり子(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

16:15~16:30 休憩

特別講演

座長 橋田 充(京都大学大学院薬学研究科・教授)

16:30~17:10 移植幹細胞の生死と遊走を追跡するための水溶性 MRI 造影剤の開発

山岡哲二(国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部 部長)

懇親会 17:30~19:00 (京都大学薬学研究科 オープンカンファレンス)

主催: 京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点

協賛: 立命館大学 立命館グローバル・イノベーション研究機構

「第2回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム」にご参加を賜わり、ありがとうございます。

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点は、京都大学-立命館大学の国立私立大学連携のもとに、薬工連携によるバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合を基盤とした革新的創薬研究の推進を目的として、平成22年4月に設立されました。この拠点では、京都大学薬学研究科、ウイルス研究所、立命館大学理工学部の協力を得て、拠点プロジェクトを推進する専任の若手教員、シニアリサーチフェローおよびそれぞれの連携機関の既設分野から兼任で参加する教員が、「連携支援ユニット」、「先進ナノバイオ研究ユニット」、「薬物送達研究班」、および「医薬創出研究班」の4つのグループに分かれ、相互の連携のもとに総合的に研究を進めております。

本シンポジウムでは、国立循環器病センター研究所生体医工学部 部長の山岡哲二先生に「移植幹細胞の生死と遊走を追跡するための水溶性MRI造影剤の開発」についての特別講演をいただくとともに、ウイルス研究所、立命館大学から参画を得ている兼任教員からの報告、さらに本拠点専任の7名の特定助教からの2年間の研究成果の報告を企画しています。

京都大学大学院薬学研究科は、先端的創薬科学・医療薬学研究の推進による人類の健康と社会の発展への貢献を目指しています。この理念のもと、本拠点も益々発展し、今後の創薬研究に貢献できるよう努めて参りますので、今後とも本拠点の活動にご理解とご支援を賜りますようお願い申し上げます。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点 拠点長
佐治 英郎
(京都大学薬学研究科長)

細胞性 HIV 抑制因子

京都大学ウイルス研究所

教授 小柳 義夫

全世界における HIV 感染者数はサハラ以南のアフリカ諸国を中心に約 3300 万人にも及び、2009 年だけでもエイズ関連死者数は 180 万人にものぼると推測されている。着目すべきは、世界の新規感染者数は減少してきたが、日本のそれは、依然増加傾向にある。そして、抗エイズ薬の多剤併用療法 (HAART) の進歩により治療成績は格段に進歩したが、未だその完全治癒は望めない。ところで、最近の研究からヒトは細胞内に HIV-1 に対して抑制的に働く分子群を有することがわかってきた。その抑制因子 APOBEC3 (A3) と tetherin について紹介する。A3G は HIV 粒子に取り込まれ、標的細胞内で合成されるマイナス鎖 cDNA の C を U に変え、dsDNA の G→A 変異に帰結させる分子である。他の A3 蛋白 (A3B, A3C, A3DE, A3F) にも同様の機能があるが、HIV-1 は Vif 蛋白を合成させ、A3F, A3G をプロテアソームで分解し、粒子への取り込みを阻害することにより効率的なウイルス増殖が可能ながことが *in vitro* の実験からかわっていた。しかしながら、生体内での役割についてはいまだ不明であるので、ヒト血液を有するヒト化マウス使って、Vif を有する野生型 HIV-1 の *in vivo* における A3 蛋白群の効果を検討したところ、感染後のウイルス DNA にきわめて高頻度の G→A 変異が確認された。そして A3G は GG→AG を、A3B と A3F は GA→AA に変異させる指向性があることから、G→A 変異隣接配列を検討したところ、下流の 1 塩基のみに G または A が顕著に確認され、さらに時に同一指向性が同一クローンに見出された。すなわち G→A 変異の大部分は A3 分子群により引き起こされたと強く示唆され、特に stop codon を誘発していた。以上の結果より、生体内では A3 は Vif を有する HIV であっても G→A 変異を導入し、複製を負に制御していることがわかった。次に tetherin の解析を行った。この蛋白は HIV 粒子の細胞外放出を抑制する宿主因子であり、HIV-1 は Vpu 蛋白をコードして、その活性を拮抗し、効率良く増殖する。その拮抗作用の分子機序を明らかにするために、新規の相互作用測定系を構築し、ヒト tetherin の膜貫通領域(TM)が Vpu との結合に唯一必須な領域であること、変異体解析により I34、L37 および L41 が相互作用とともに Vpu 反応性の決定基であることを見出した。ところが、これら 3 アミノ酸は Vpu 抵抗性のサル tetherin TM においても保存され、一方、上流に 2 アミノ酸欠損があった。サルの tetherin にこの 2 アミノ酸挿入により Vpu 結合能が付与されること、また別のアミノ酸置換により Vpu に対する感受性も付与できた。次に、脂質二重膜におけるそれぞれの tetherin の TM の立体構造予測を分子動力学計算法により解析したところ、ヒトの tetherin では同定した 3 ア

ミノ酸が単一ヘリックス面に集積するが、サルのそれは散逸することが分かった。すなわち、この3アミノ酸は相互作用に重要であり、その立体的な配置が Vpu に対する相互作用および反応性を決定することがわかった。Vpu による tetherin の拮抗活性は、その TM 内の3次構造に HIV-1 が適応進化したことを示唆している。



小柳義夫

京都大学ウイルス研究所 ウイルス病態研究領域
教授

医学博士（京都大学）

【略 歴】

昭和 56 年 熊本大学医学部卒業
昭和 61 年 京都大学大学院医学研究科 博士課程修了
昭和 61 年 米国 UCLA 医学部研究員
平成 2 年 東京医科歯科大学医学部助手
平成 6 年 東京医科歯科大学医学部助教授
平成 11 年 東北大学医学系研究科教授
平成 16 年 京都大学ウイルス研究所教授
現在に至る

【研究分野】

ウイルス学、感染免疫学

【研究活動】

日本ウイルス理事（2006-2010）、日本エイズ学会 理事（2000-2008）
第 22 回日本エイズ学会学術集会会長（2008 年）
Virus Genes（アジア地区編集長）
Exp. Biol. Med. Editorial Board (Royal Society of Medicine)

MEMO

生体医工学の薬学応用について

立命館大学理工学部
教授 牧川 方昭

診療技術の一層の進展を求めた“医工連携”の試みは多く、生体医工学として確立しつつあるが、“薬工連携”は新しい。本稿では著者の研究の内、薬工連携に資すると思われる2つの技術を紹介する。

第1は、神経束の電気刺激技術である。図1に示すように、神経束表面に複数の電極を設置し、神経内の1点の電流密度が上昇するように短時間に電流方向を切り替えることで、特定の神経のみを発火させることができる。この技術をマイクロ体内ロボットに装備する、あるいは体表面にマルチ電極を設置することにより、体内患部の細胞に核酸医薬などを強制導入させるためのエレクトロ・ポレーションとして機能させることが可能となる。

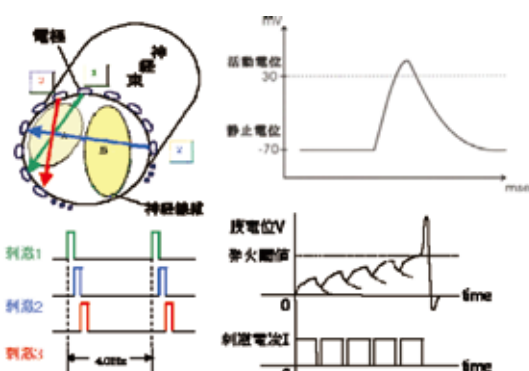


図1. マルチ神経束電極による電気刺激

第2は、日常生活における生体信号・身体活動のモニタ技術である。現在の薬物療法は定期的な来院時の診断によっており、日常生活における体調に応じた投薬計画などのきめ細かい薬物療法は実施されていない。例えば、慢性関節リウマチ患者に対するステロイド、消炎鎮痛剤の処方、日常生活における患者の行動パターンに応じることによって、更に効果を上げることを明らかにしている。日常生活における生体信号、身体活動の長期モニタによって、薬物療法を更に効果的に実施することが可能であるだけでなく、薬物効果の長期評価へも応用が可能である。現在、マイクロプロセッサ技術は年々進化を遂げており、処理スピードが高く、消費電力が少ないプロセッサも登場している。先に我々は、マイクロプロセッサシステム、センサ、無線通信モジュール、経皮充電回路など、生体信号の計測に必要な一切の要素を一体化した体内コンピュータシステムを開発し、動物実験でその有効性を確認したが、体内での薬物動態を長期にわたって詳細にモニタしうる体内ラボも可能であると考えている。

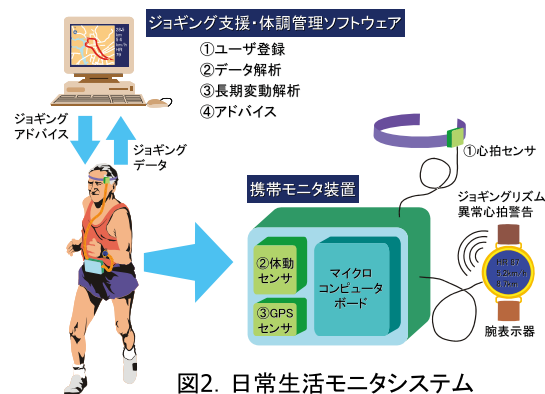


図2. 日常生活モニタシステム



牧川 方昭
立命館大学 理工学部 ロボティクス学科
教授
工学博士（大阪大学）

【略 歴】

昭和 50 年 大阪大学基礎工学部生物工学科卒業
昭和 57 年 大阪大学大学院基礎工学研究科博士課程後期課程単位修得退学
昭和 57 年 滋賀医科大学医学部整形外科助手
昭和 61 年 国立循環器病センター研究所研究機器管理室研究員
平成 2 年 大阪大学基礎工学部生物工学科助教授
平成 8 年 立命館大学理工学部ロボティクス学科教授
現在に至る

【研究分野】

生体工学、バイオメカニクス、医療情報学

【研究活動】

日本生体医工学会 理事、日本セーフティプロモーション学会 理事、バイオメカニズム学会 評議員、システム制御情報学会 評議員、計測自動制御学会ライフサイエンス技術専門委員会 主査、日本医療情報学会・電子情報通信学会・IEEE 会員、
文部科学省地域イノベーションクラスタープログラム（グローバル型） 研究統括

マイクロマシンを用いた核酸デリバリー技術の開発

京都大学大学院薬学研究科
革新的ナノバイオ創薬研究拠点
特定助教 清水 一憲
(兼：立命館大学 R-GIRO 客員研究員)

革新的ナノバイオ創薬研究拠点では京都大学-立命館大学の国立私立大学連携を軸に薬工連携によるバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合などを基盤とした革新的創薬研究を推進している（HPより一部改変）。私は連携支援ユニットに属しており、京都大学薬学研究科と立命館大学理工学部との連携研究を精力的に推進している。本講演では、連携研究の一つとして進めているマイクロマシンを利用した *in vivo* 核酸デリバリー技術の開発について現在の進捗を紹介する。

in vivo 核酸デリバリー技術は、生体内の目的組織や臓器の細胞の遺伝子発現をコントロールするための技術である。安全で簡便な *in vivo* 核酸デリバリー技術を開発することで、難治性疾患治療を目指した遺伝子治療法の開発や動物個体レベルでの遺伝子機能解析技術の開発の早期実現が期待される。現在までに様々な *in vivo* 核酸デリバリー技術が報告されているが、特にネイキッド核酸を用いた手法は安全性、簡便性の双方で優れていると考えられる。近年、本拠点のメンバーである橋田教授のグループにより *in vivo* ネイキッド核酸デリバリー技術である組織押圧核酸導入法（押圧法）が開発された（1－3）。現在、我々は低侵襲な *in vivo* 核酸デリバリーの実現を目指し、押圧法にマイクロマシン技術（MEMS）を応用する研究を進めている。同じく本拠点のメンバーでありMEMSを専門とする小西連携教授と密に協力し研究を進めることで非常に興味深い成果が出つつある（4）。本講演ではその最新の成果を紹介したい。

- (1) Biochem.Biophys.Res.Comm., vol.372, pp.383-387, 2008.
- (2) Human Gene Therapy, vol.20, pp.1157-1167, 2009.
- (3) Biological & Pharmaceutical Bulletin, vol.33, pp.1627-1632, 2010.
- (4) Proc.IEEE MEMS 2011, pp.181-184, 2011.

カイコ β GRP の β 1,3-グルカン認識機構の解明とその応用

京都大学大学院薬学研究科
革新的ナノバイオ創薬研究拠点
特定助教 高橋 清大

生体にはウイルスやバクテリア、真菌等の感染に際し、これらを異物と認識し排除する機構が存在し、自然免疫と呼ばれる。自然免疫の特徴は、宿主のレセプタータンパク質が異物に特徴的な『非自己』の分子を特異的に認識する点にある。これはウイルスであれば、ゲノムの核酸や複製の際に見られる二重鎖 RNA であり、バクテリアであればリポ多糖などである。異物が真菌であった場合はその細胞壁に存在する β 1, 3-グルカンが認識される。本研究では、自然免疫におけるレセプターの異物特異性に着目し、バイオセンサーとしての応用を模索する。

我々はカイコに存在する β 1, 3-グルカンを認識するタンパク質 β GRP (β 1, 3-glucan recognition protein)に着目した。 β GRP はその N 末端のドメインを用いて真菌由来の β 1, 3-グルカンを認識する。本研究ではこのドメインの構造を NMR により決定した。同時に変異体を用いた結合実験から、このドメインが親水性アミノ酸に富んだ面を用い、 β 1, 3-グルカンと結合する事を明らかにした。また、 β GRP は一本鎖の β 1, 3-グルカンとは結合せず、三重らせん構造を持つ β 1, 3-グルカンとのみ結合する事が明らかとなった。

次に、これまでに得られた知見を元に、新規の組換えタンパク質のアフィニティー精製システム (GRP システム) を開発した。アフィニティー精製システムは GST (Glutathione s-transferase) や MBP (Maltose Binding Protein) 等の融合タンパク質を用いられる方法がよく知られているが、GRP システムにはこれらと比べて複数の利点がある。一点目に、 β GRP の β 1, 3-glucan 結合ドメイン (GRP-tag) は分子量 10kDa 程度であり、GST や MBP と比べると数倍小さく融合タンパク質発現において高い収量を期待できる。二点目に GST タグや MBP タグを用いた精製には高価なアフィニティー担体が必要となるが、本研究で用いる β 1, 3-glucan(カードラン)は食品等にも用いられ極めて安価な点にある。実際に本システムを用い、我々は RIG-I (106 kDa) の融合タンパク質を大腸菌において発現することを確認した。GST-tag と比較したところ、GRP-tag は同等の精製度を示しながらも、3 倍程度高い収量を示した。また、GRP-tag を除去し精製した RIG-I がその機能である RNA 結合能、ATPase 活性を示す事がわかった。GST-tag の場合では、RIG-I は凝集してしまい活性を測れなかった事からも、GRP システムはタンパク質発現、精製における有用性が期待される。

腎炎治療分子標的医薬の開発

京都大学大学院薬学研究科
革新的ナノバイオ創薬研究拠点
特定助教 武井 義則

我が国における腎疾患患者は、透析導入以前の約25万人と透析患者の23万人からなり、毎年約3万4千人が透析治療へ新規導入されています。腎炎は積極的な早期治療により腎不全への進展を遅延または抑止できることから、その早期発見・早期治療が最も重要ですが、現在腎炎の薬物治療は免疫抑制剤による炎症抑制が主であり、未だ根本的な治療法を欠いています。また、QOL(Quality of Life)や、現在1兆円を超える医療財政という観点からも効果的な腎炎治療法の開発が望まれています。

我々は以前、動物病態モデルの発現プロファイル解析に基づく多因子疾患の病態・治療関連遺伝子解析の手法を腎炎の創薬、新規治療法開発に応用し、腎炎治療標的分子である蛋白質リン酸化酵素 CK2(カゼインキナーゼ 2)を見いだしました。CK2 の発現量は、腎炎にともなう糸球体傷害と密接に関連して著しく増大しました。腎炎モデルラットを用いて天然物由来の CK2 阻害薬の投与を検討した所、著明な腎機能、腎臓障害の改善がみられる一方で、精巣アポトーシス反応増強が観察されました。この副作用は、CK2 阻害薬が腎炎で誘導された CK2 活性サブユニット α だけでなく、精巣に発現しているもう一つの CK2 活性サブユニット α' をも阻害してしまう事で引き起こされる事を明らかにしました。

精巣毒性の回避を目的として、 α 、 α' の2種のアイソザイムの構造生物情報に基づき *in silico* で低分子化合物の分子設計、ドッキング実験、フォーカスライブラリー合成、HTS 活性評価系によるスクリーニングを行い、候補化合物の選択を行ってきました。その結果、既存の CK2 阻害薬より効果の高い新規薬剤の開発に成功しましたが、アイソザイム選択性は見られませんでした。

α 型選択的阻害剤の開発と平行して、RNA 干渉を利用した方法を検討しました。 α 、 α' 二種のアイソザイムそれぞれ特異的に RNA 干渉を引き起こす短鎖 RNA を設計し、その RNA 干渉能を、腎臓細胞の初代培養系で検証しました。現在、その短鎖 RNA を腎炎モデルラットに導入し、その影響を解析しています。これらの取り組みから、副作用の無い腎炎治療薬候補が近い将来開発できると期待しています。

視交叉上核における、概日リズム調節因子解明による 創薬ターゲットの同定

京都大学大学院薬学研究科
革新的ナノバイオ創薬研究拠点
特定助教 松尾 雅博

生体時計の異常で生じる概日リズム睡眠障害は、社会のグローバル化・24 時間化に伴い増加しており、生活習慣病やうつ病などとの関連も明らかにされている。このため、その病態解明および治療法開発が急務となっている。

生体時計の中心は視床下部の視交叉上核に存在し、全身を調律している。視交叉上核には、時計遺伝子群が構成する約 24 時間周期の転写・翻訳のフィードバックループ(コアループ)が存在しており、これが生体時計の本体と考えられている。さらに、視交叉上核は網膜からの投射を受けており、網膜で受容された光刺激は視交叉上核で複数の時計遺伝子の転写誘導を引き起こす。これにより生体時計の位相が変更され、環境時刻と生体時計が一致する仕組みとなっている。しかし、光刺激による無秩序な位相変更は、生体時計の環境時刻への同調に悪影響を及ぼすため、位相変更は量的に調節されている。このような精緻な生体時計の位相変更には、細胞内シグナル伝達系調節分子による制御が重要であると考えられている。

カルシウムシグナルは、光刺激による時計遺伝子の転写誘導に重要な働きをしている。このことから、我々は概日リズム睡眠障害治療薬の標的分子となり得る分子として、視交叉上核に発現するカルシウムシグナル関連分子の発現を調査した。この結果、カルシウムシグナル抑制機能がある分子 X が視交叉上核で強く発現されていることを見出した。

分子 X の視交叉上核神経細胞における機能を調べるため、分子 X のノックアウトマウスを用いた実験を行ったところ、分子 X の欠如により体内時計の光刺激に対する位相変更量が増大されることが明らかとなった。さらに、視交叉上核の神経細胞におけるカルシウム動態を、ミセル化した細胞内カルシウム指示薬を用いて調査した。この結果、分子 X の欠損により、脱分極刺激後の視交叉上核神経細胞内でカルシウムシグナルが増強されることが明らかにできた。

以上から、分子 X により視交叉上核神経細胞内でカルシウムシグナルが制御されており、これにより体内時計の位相変更量が制御されていることが明らかとなった。これにより、視交叉上核に発現するカルシウムシグナル関連分子を標的とすることで、体内時計の調節に役立つ可能性が示された。

有用化合物の創製を指向した微生物二次代謝産物の生合成研究

京都大学大学院薬学研究科
革新的ナノバイオ創薬研究拠点
特定助教 林 豊

微生物が生産する天然物は、医薬品をはじめとする有用物質の探索源、供給源として最も有望視されている天然資源の1つであり、抗生物質、抗がん剤、酵素阻害物質など様々な生理活性物質として利用されている。これら天然生理活性物質は、特異で多様な構造を持つものが多いことから、その生合成に関与する酵素群も種々の反応を触媒すると推定される。従って、それら生合成酵素の多様性を利用した有用物質の生産や、酵素遺伝子を組み合わせたコンビナトリアル生合成による新たな生理活性を有するオリジナリティーの高い新規化合物の創製研究は、学術面、応用面でも大変意義深い分野である。

このような背景下、我々は、Azaspirene¹⁾ や Epoxyquinol A²⁾ の様な微生物（糸状菌、放線菌など）が生産する新しい血管新生阻害化合物の生合成研究を行っている。そこで、コンビナトリアル的手法を基盤とした、新規骨格を有する抗がん剤リード化合物の効率的創製法の確立を目的として、先ず始めに、糸状菌や放線菌が二次代謝産物として生産する血管新生阻害化合物の生合成遺伝子クラスターの取得を試みた。

生合成遺伝子群を取得する方法としては、1. 各化合物の生合成欠損株の取得と相補遺伝子の取得、2. 酵素を精製しアミノ酸配列を決定後、reverse genetics 法で取得する方法、3. 目的酵素が持つと予想されるアミノ酸の保存配列を利用し、hybridization や PCR で取得する方法などが考えられる。しかし、これまでの天然生理活性物質の生合成研究から、微生物二次代謝産物の生合成酵素をコードする遺伝子群は、ほとんどの場合、染色体上にクラスターとして存在することが明らかになってきている。そこで、本研究では hybridization や PCR によって取得する戦略をとった。

現在、ゲノム情報が公開されている微生物の遺伝情報を基に、プライマーを設計し、各化合物の部分骨格の生合成に関与する遺伝子断片を PCR によって取得した。次いで周辺領域を探索することで目的とする遺伝子クラスターを見出した。

本発表では、今回取得した遺伝子クラスターの解析結果について報告する。

参考文献

- (1) Y. Asami et al. *Org. Lett.*, 4, 2845-2848 (2002).
- (2) H. Kakeya et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 3496-3497 (2002).

分子イメージング法を用いた DDS への応用に関する研究

京都大学大学院薬学研究科
革新的ナノバイオ創薬研究拠点
特定助教 木村 寛之

ナノテクノロジー領域から創出されたナノ材料を、DDS の分野に応用する試みが広く展開されている。すなわち、ナノ材料を薬物の徐放化・長寿命化・吸収促進・ターゲティングなどに活用し、薬物の機能や動態を精密に制御することを目的とした DDS 製剤の開発が精力的に行われている。この動態制御は特にがん治療の領域で大きく注目されており、薬物を効率的にがんへ送達するための手段の構築が非常に重要な研究テーマである。

一方、分子イメージング技術は組織/細胞レベルにおいて生化学的・分子生物学的なプロセスの可視化を可能とし、基礎研究・臨床研究・創薬研究などへの応用が期待されている。その中でも陽電子断層撮像法 (PET) は、生体内の標的分子に特異的に結合する化合物を陽電子放出核種 (PET 核種) にて標識し、これを生体に投与後、撮像する非侵襲的分子イメージング技術である。PET の特長として高い定量性を有するため、目的の部位に到達した薬物量を *in vivo* にて評価できる。すなわち、DDS 製剤に PET 核種を導入し、その体内動態を *in vivo* で追跡、定量化することにより、開発のより初期段階における簡便な評価が可能となる。これは DDS 研究において PET が候補化合物の探索やリード化合物の最適化に非常に有益な情報を提供しうることを意味するものである。このように、分子イメージング技術と DDS 技術の融合が今後の医薬品開発において非常に有用であると考えられる。

そこで本研究では、DDS 製剤の ^{18}F 標識化を行う目的で、蛋白質、高分子などの標識試薬として広く用いられている $[\text{F}^{18}]\text{SFB}$ (N-succinimidyl 4- $[\text{F}^{18}]\text{fluorobenzoate}$) の短時間合成法の確立と自動合成化を検討した。放射性物質を扱う反応では、用いる溶液量が微量であることから通常のバッチ合成法では限界があると考え、ナノ・マイクロ加工技術に着目し、マイクロリアクターを利用した合成反応とナノデバイスの構築を行った。種々反応条件を検討した結果、従来法では 1 時間以上必要であった合成時間が、マイクロリアクターを用いた **one-flow** 合成法では、合成時間 7 分で目的の $[\text{F}^{18}]\text{SFB}$ が得られ、短時間合成が可能であることが明らかとなった。マイクロリアクターを用いた **one-flow** 合成法の有効性が示されたことから、次にマイクロ合成技術を基盤とした $[\text{F}^{18}]\text{SFB}$ 自動合成装置の開発を行った。まず、装置を 4 つのユニット (^{18}F 濃縮ユニット、 $[\text{F}^{18}]\text{SFB}$ 合成ユニット、 $[\text{F}^{18}]\text{SFB}$ 精製ユニット、蛋白質、高分子標識ユニット) に分割し、自動合成ユニット等基盤技術を確立した。最終的に、全てのユニットを組み合わせた自動合成装置トータルシステムを構築し、 $[\text{F}^{18}]\text{SFB}$ の高効率合成を達成した。

幹細胞の蛍光標識法の開発と in vivo イメージングへの応用

京都大学大学院薬学研究科
革新的ナノバイオ創薬研究拠点
特定助教 樋口ゆり子

採取した細胞に対して、増殖、分化などのプロセッシングを行った後、体内へ投与することにより治療を行う、輸血、造血幹細胞移植、細胞免疫療法、再生治療などの治療法を総じて細胞治療という。細胞治療に利用される細胞には、今後治療への応用が期待されるものも含めると、免疫細胞、樹状細胞、幹細胞、ES 細胞や iPS 細胞などがある。中でも間葉系幹細胞は、骨髄や脂肪から採取可能で、自家移植できることから免疫拒絶を回避できる特長を有し、既に心機能回復、炎症治療、骨再生などに対しヒトにおいて治療効果があることが報告されている。しかしながら、従来の医薬品と異なり、生きた細胞による治療メカニズムは複雑であるため、治療メカニズムを明らかにし、治療法を確立するためには、生体内における幹細胞挙動を追跡し、治療効果との関係を明確にすることが必要である。

我々はこれまでに、蛍光強度が高く、励起光に対して退色しにくい量子ドットを用いた間葉系幹細胞の蛍光標識を目的に、多数のアミノ基を有する PAMAM デンドリマーを量子ドットに修飾し、間葉系幹細胞への取り込み増大により効率よく蛍光標識させることができた。同時に、PAMAM デンドリマーの有する強い buffering 能により、エンドサイトーシスを介した取り込み後のエンドソームからの脱出を促進させ、エンドソーム内における pH 低下が原因となり引き起こされる量子ドットの蛍光強度の減衰を抑制させ、細胞内における蛍光強度の維持時間を延長することができた。さらに、PAMAM 修飾量子ドットを用いて蛍光標識された初代培養間葉系幹細胞をマウスへ投与後、観察できる時間を延長させることができた。そこで、次に、間葉系幹細胞を分化後も長時間追跡する事を目的に、トランスポゾンを用いて蛍光タンパク質の発現配列を、マウスより採取した初代培養幹細胞のゲノム DNA に組込むことにより分化後も蛍光タンパク質を発現する間葉系幹細胞を構築した。一方、これらの蛍光標識された幹細胞の体内挙動の可視化を目的に、in vivo 高速リアルタイムイメージングを可能にする共焦点レーザー顕微鏡のセットアップを行い、強い励起光の照射を最小限に抑え、1 フレームあたり凡そ 30msec での撮影が可能になった。さらに、マウス腹部に作成した小さな開口部にカバーガラスを接着させることにより、組織内における細胞挙動の可視化が可能になった。本発表では、初代培養間葉系幹細胞の生体内での挙動の可視化を目的とした長期蛍光標識法の開発に加え、in vivo 高速リアルタイム観察によるマウス組織内における細胞挙動の観察に関する成果を報告させていただく。

MEMO

移植幹細胞の生死と遊走を追跡するための水溶性 MRI 造影剤の開発

国立循環器病研究センター研究所
生体医工学部 部長 山岡 哲二

近年、スキャホールドを用いない再生医療戦略、すなわち細胞移植の臨床研究が大きく進歩している。これまでに150件以上の細胞移植療法の治験・臨床研究が実施され、2006年にはヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針も施行された。一方で、幹細胞移植療法による組織再生や機能改善のメカニズムは明らかになっておらず、幹細胞分化が関与する直接効果かパラクライン効果かの議論が続いている。

私達の研究グループでは、2007年から厚生労働科学研究費補助金(ナノメディシン)の助成のもと、移植生体内生細胞のMRIトラッキング技術を開発してきた。移植幹細胞の生存期間や生体内動態挙動を解明することは、上述のメカニズム解明のみならず細胞移植療法のEBM構築のためにも重要である。我々は、細胞膜と相互作用しない水溶性キャリアーに対してガドリニウム錯体を導入した水溶性MRI造影剤を開発し、さらに、その造影剤をエレクトロポレーション法により細胞内に低毒性で送達することに成功した。導入された水溶性Gd造影剤は、細胞質のみに長期間安定に存在し、細胞の増殖や機能発現を妨げないのみならず、幹細胞の分化能力にも影響しないことを実証することができた。

さらに特筆すべきポイントは、細胞が死滅した際に、細胞外に漏洩したこの水溶性造影剤は、周囲組織に取り込まれることなく、血中移行を介して排泄されることである。このことにより、観察されるMRIコントラストは、生存している移植細胞のみに由来するものであり、換言すれば、移植した幹細胞の生死のイメージングが可能である。従来から使用されている磁気微粒子(SPIO)は、幹細胞に貪食させることで細胞を標識していることもあって、細胞内に安定に滞留できないこと、さらに、細胞外へと排除された後には、その場に滞留したり、マクロファージに貪食されたりするなどの欠点が指摘されている。今回の水溶性造影剤システムにより、このような微粒子上細胞標識システムの欠点を大きく改善することができた。このMRI造影剤を導入した 2×10^7 個のラット血管内皮前駆細胞(EPC細胞)を、大腿動静脈を切除した下肢虚血ラットへ移植し、移植細胞の分布を3次元再構築ソフトにより詳細に解析したところ、下肢虚血モデルラットでは、EPCsが虚血領域へと遊走することが確認された。一方、正常ラットでは高い頻度で速やかに細胞が死に至ることが示された。虚血部位に於いて如何なるシグナルが移植細胞の生存期間の延長や遊走に関与しているかなど、疾患の程度と移植細胞の機能発現の関係を今後明らかにしたい。



山岡哲二

独立行政法人国立循環器病研究センター研究所
生体医工学部

部長

京大博士（工学）

【略 歴】

昭和 61 年 京都大学工学部高分子学科卒業
 平成 3 年 京都大学大学院工学研究科博士後期課程指導認定退学
 平成 3 年 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員
 （国立循環器病センター研究所 実験治療開発部）
 平成 4 年 京都工芸繊維大学繊維学部高分子化学科助手
 平成 7 年 京都工芸繊維大学繊維学部高分子化学科講師
 （平成 8 年 マサチューセッツ州立大学高分子学専攻・在外研究員）
 平成 14 年 京都工芸繊維大学繊維学部高分子化学科助教授
 平成 16 年 国立循環器病センター研究所生体工学部部長
 平成 23 年 （独）国立循環器病研究センター研究所生体医工学部部長
 現在に至る

【研究分野】

遺伝子導入、生体吸収性人工臓器、再生医療、イメージング

【賞 罰】

平成 7 年 高分子研究奨励賞（高分子学会）
 平成 14 年 日本バイオマテリアル学会科学奨励賞
 「ポリ乳酸系機能性共重合体の開発とインプラント材料としての応用」
 平成 22 年 日本バイオマテリアル学会賞
 「水溶性ポリマーの分子特性解明によるバイオマテリアル科学の創生」

発行：平成 23 年 3 月 5 日

編集：京都大学大学院薬学研究科

革新的ナノバイオ創薬研究拠点