

Institute for Innovative NanoBio
Drug Discovery and Development



平成23年度 革新的ナノバイオ創薬研究拠点 活動報告書

革新的ナノバイオ創薬研究の推進
—国立・私立大学間 薬工連携プロジェクト—



目 次

■ はじめに

■ 事業概要

■ 活動成果

1. 連携支援ユニット
2. 先進ナノバイオ研究ユニット
3. 薬物送達研究班
4. 医薬創出研究班

■ シンポジウム

『第3回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム』

平成 23 年度

革新的ナノバイオ創薬研究拠点 活動報告書

はじめに

京都大学-立命館大学の国立私立大学連携や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の推進を目的として、革新的ナノバイオ創薬研究拠点が設立されてから3年が終了致しました。



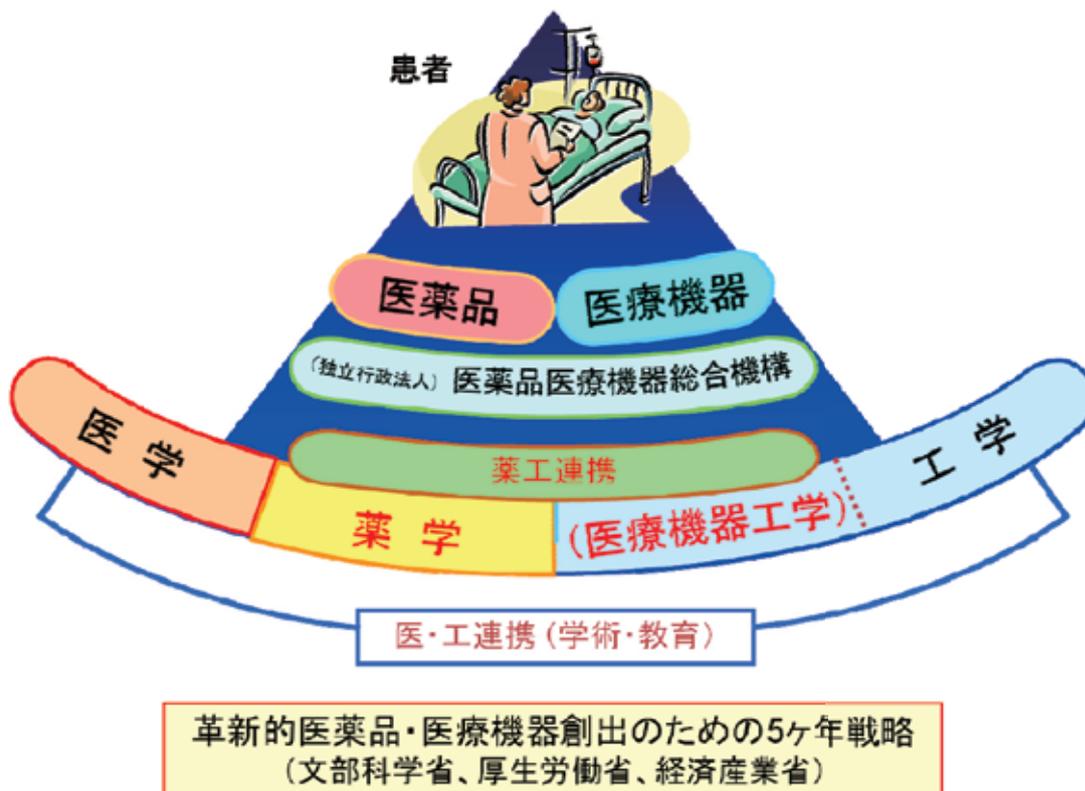
本拠点に所属する京都大学薬学研究科、ウイルス研究所、立命館大学理工学部の3機関の研究者によって推進される研究プロジェクトにおいては、癌などの難治性疾患の克服を可能にするナノバイオ創薬技術の開発ならびに革新的な治療システムの開発を推進してまいりました。その中で、京都大学-立命館大学の研究者が参加する共同研究がいくつか立ち上がり、その結果、学術論文の共同執筆、特許の共同出願など着実に成果もあがってきています。また、薬学研究科において若手研究者を対象とした拠点研究推進のためのプロジェクトを選定し、革新的なナノバイオ創薬技術の開発を遂行する若手研究者支援も継続的に取り組んでおります。さらに、研究活動を広く社会に発信する事を目的に、平成24年3月に拠点主催の「第3回ナノバイオ創薬研究シンポジウム」を開催致しました。

ここに平成23年度の活動状況と研究業績をまとめました。本拠点事業の運営に際し、お世話になりましたご関係の皆様には厚くお礼を申し上げますと共に、今後とも本拠点の発展に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
(京都大学大学院薬学研究科長)

■ 組織の構成

拠点の組織体制は大きく、薬工連携の推進を担当する教員と連携を側面より支援するシニア・リサーチ・フェローから構成される“連携支援ユニット”、新進気鋭の研究者を集め革新的な癌化学療法確立などを目指して遺伝子改変、有機合成化学、体内ロボット、ナノ素材などを駆使した創薬研究を推進する“先進ナノバイオ研究ユニット”、さらにそれぞれの連携機関の既設分野の教員が兼任で参加する“薬物送達研究班”と“医薬創出研究班”とから構成されます。



■ ユニット・研究班の役割

“連携支援ユニット”は、共同研究の推進とともに、戦略的な事業推進に向けて、大学間共同研究のマネジメント、産学連携、次世代ナノバイオ研究者の育成、革新的医薬品・医療機器の開発を担うグローバルリーダー養成教育などを担当します。また、拠点における研究成果を、企業参画により医薬品・医療機器の創出に迅速に展開する機能も担います。

“薬物送達研究班”と“医薬創出研究班”はそれぞれ主要課題として、立命館大学との連携による DDS 技術開発、また、ウイルス研究所や薬学研究科医薬創生情報科学専攻との連携による動物モデル評価系の構築や新規抗癌リード薬物の検索を担当します。

■ 運営体制

拠点長

佐治英郎（京都大学薬学研究科）

連携支援ユニット

土居孝行（京都大学大学院薬学研究科）

樋口ゆり子（京都大学大学院薬学研究科）

清水一憲（京都大学大学院薬学研究科）

先進ナノバイオ研究ユニット

高橋清大（京都大学大学院薬学研究科）

MIYAZATO Paola（京都大学大学院薬学研究科）

薬物送達研究班

橋田 充（京都大学大学院薬学研究科）

山下富義（京都大学大学院薬学研究科）

高倉喜信（京都大学大学院薬学研究科）

西川元也（京都大学大学院薬学研究科）

牧川方昭（立命館大学理工学部）

小西 聡（立命館大学理工学部）

野方 誠（立命館大学理工学部）

医薬創出研究班

掛谷秀昭（京都大学大学院薬学研究科）

服部 明（京都大学大学院薬学研究科）

松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所）

佐藤賢文（京都大学ウイルス研究所）

小柳義夫（京都大学ウイルス研究所）

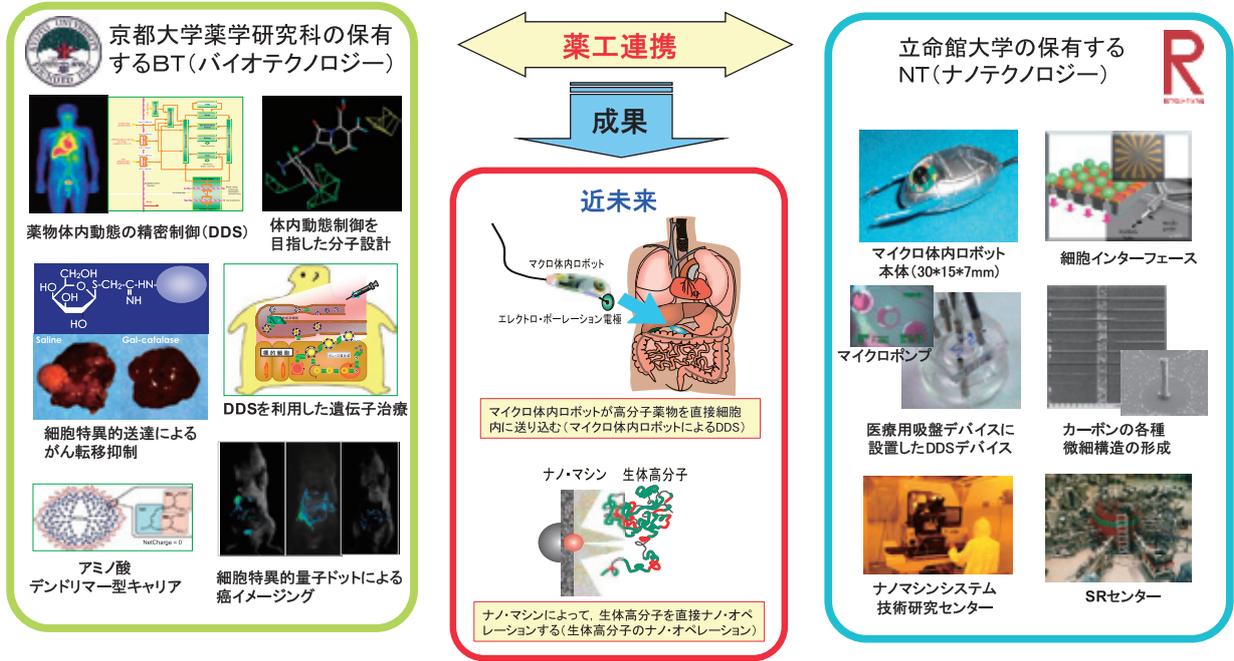


京都大学と立命館大学との連携協力

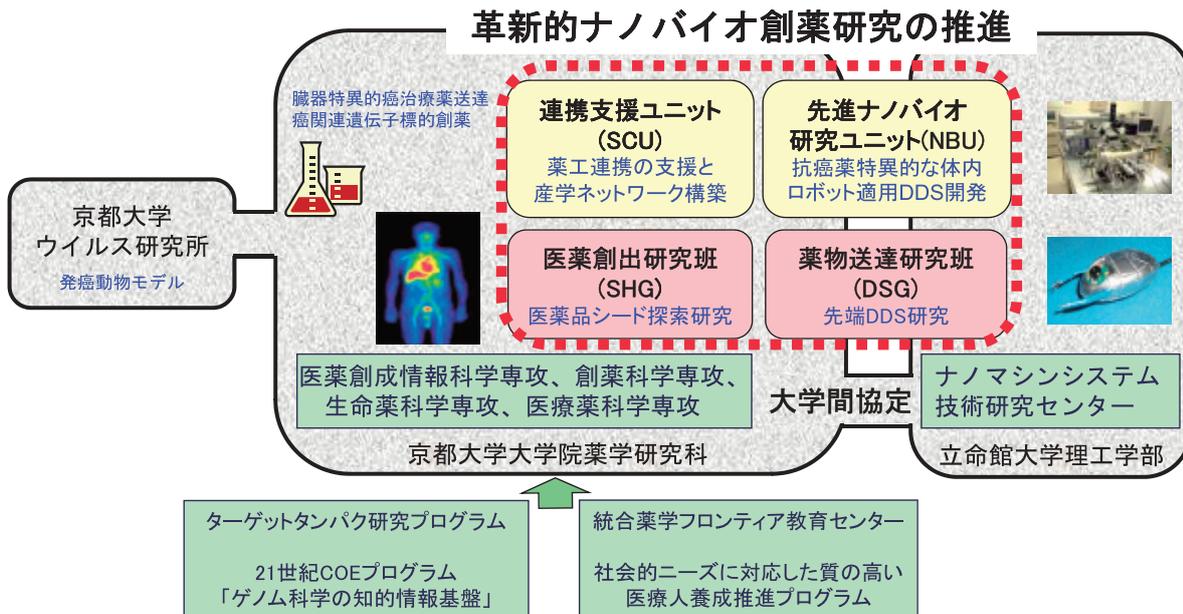
京都を代表する国私2校による協力融合・相互連携により、2校の学術交流を促進し、研究・教育内容の充実と学術・文化の発展および科学技術の高度化を追求する



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



革新的ナノバイオ創薬研究拠点の組織と活動



また、本拠点の概要および成果などの公開を目的に、本拠点の webpage を立ち上げ、関連する組織にトップページをリンクさせている。具体的には、シンポジウムの案内や、業績の公開などを行っている。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点ホームページ URL :

http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative_nanobio/

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

HOME 概要 メンバー 研究活動 お問い合わせ・アクセス

ごあいさつ

この度、京都大学大学院薬学研究科の附属施設として革新的ナノバイオ創薬研究拠点が新設されました。本拠点は、京都大学・立命館大学の国立私立大学連携や業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、革新的創薬研究の推進を目的として設置されたもので、癌などの難治性疾患の克服を可能とする治療薬、治療システムの開発を旨として、学際融合的研究の推進と最先端創薬科学の研究・教育体制の確立に取り組むと共に、近未来の薬物療法を担う医薬品や医療機器の開発をさらに加速しナノバイオ研究が重宝する確かな人材の育成を目指します。

京都大学大学院薬学研究科は、諸学間協力の場合と連携を遂げ、創造的な薬学の“創”と“療”の拠点を構築し、先端創薬科学・医療薬学研究所を設けて人材の育成と社会の発展に貢献することをミッションとしています。本拠点形成は革新的なナノバイオ創薬技術の開発を推進し、我が国の創薬研究に大きく貢献するものと考えます。

ご関係の皆様へ、今後とも本拠点の発展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 英樹
(京都大学大学院薬学研究科長)

Infomation

- 2012/04/04
メンバーを更新しました
- 2012/3/14
『[第三回ナノバイオ創薬研究シンポジウム](#)』を開催しました
- 2011/10/31
研究活動を更新しました
- 2011/06/24
メンバーを更新しました
- 2011/03/05
『[第二回ナノバイオ創薬研究シンポジウム](#)』を開催しました
- 2010/10/10
研究活動を更新しました
- 2010/06/10
清水茂教授が第28回日本DDS学会にて優秀発表者賞を受賞しました
- 2009/12/05
『[第一回ナノバイオ創薬研究シンポジウム](#)』を開催しました
- 2008/10/01
新メンバーを加えて組織が完成しました

Copyright (C) 2012 Institute for Innovative Nanobio Drug Discovery and Development, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, FRI. All Rights Reserved.

1. 連携支援ユニット

京都大学大学院薬学研究科 土居孝行
京都大学大学院薬学研究科 樋口ゆり子
京都大学大学院薬学研究科 清水一憲

2. 先進ナノバイオ研究ユニット

京都大学大学院薬学研究科 高橋清大

3. 薬物送達研究班

京都大学大学院薬学研究科 橋田 充
京都大学大学院薬学研究科 高倉喜信
立命館大学総合理工学研究機構 牧川方昭
立命館大学理工学部 小西 聡
立命館大学理工学部 野方 誠

拠点研究推進

京都大学大学院薬学研究科 加藤洋平
京都大学大学院薬学研究科 泉 安彦
京都大学大学院薬学研究科 中川貴之
京都大学大学院薬学研究科 西川元也
京都大学大学院薬学研究科 三宅 歩
京都大学大学院薬学研究科 矢野義明
京都大学大学院薬学研究科 天満 敬

4. 医薬創出研究班

京都大学大学院薬学研究科 掛谷秀昭

京都大学ウイルス研究所 松岡雅雄

京都大学ウイルス研究所 小柳義夫

拠点研究推進

京都大学大学院薬学研究科 伊藤美千穂

京都大学大学院薬学研究科 猪熊 翼

京都大学大学院薬学研究科 若林真樹

京都大学大学院薬学研究科 平澤 明

京都大学大学院薬学研究科 山口知宏

京都大学大学院薬学研究科 山岡庸介

京都大学大学院薬学研究科 山口賀章

京都大学大学院薬学研究科 西村慎一

平成 23 年度 革新的ナノバイオ創薬研究拠点における 活動報告



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

シニア・リサーチ・フェロー 土居孝行

平成 23 年度の成果について報告する。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点のミッションの一つである次世代ナノバイオの研究者育成・教育体制の確立について以下の活動を行った。

神経薬理分野のセミナーに参加し、コメントやアドバイスするなどをした。2 回生と 3 回生を対象とする生理学に関する講義および、学部 1 回生、院 1 回生を対象にした企業における医薬品研究開発のプロセスの概要および製薬企業が抱えている研究開発の問題点についての講義を行った。また、3 回生を対象とする医薬品開演習の企画・立案に参画するなどの教育活動も行った。

研究成果の産業界への技術移転について研究者と意見交換をおこない、その製品化についての興味の有無と評価とを企業に依頼する活動をおこなった。



生きたマウスの組織における蛍光高速イメージング

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

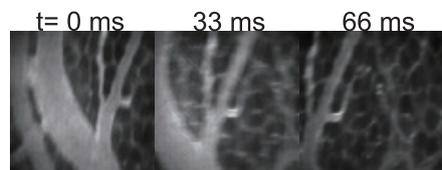
特定助教 樋口ゆり子



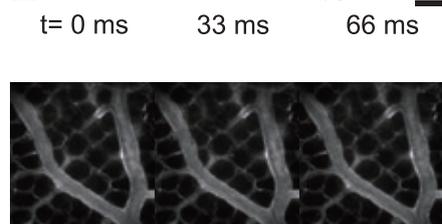
生体内における生命活動のプロセスを細胞や分子レベルで可視化することは、生物学的知見だけでなく疾患メカニズムの解明、治療法の開発において極めて有効な情報を提供することが期待される。特に、間葉系幹細胞、ES細胞や iPS 細胞などの細胞を利用した細胞治療では、生体内における細胞の挙動や分子シグナルが治療効果の重要な要素となるため、生体内における細胞、分子の挙動の評価が極めて重要である。生体内における細胞を追跡し可視化する方法には、MRI、PET、光イメージングなど様々な手法があり、それぞれに固有の特長を有するが、一細胞の挙動を可視化するには顕微鏡を用いた蛍光イメージングが有効であると考えられる。

我々は、立命館大学小西教授の研究室と共同で、組織とカバーガラスの間の空気を吸引によって陰圧にすることで、組織を固定することが可能な、組織吸引固定デバイスを開発した¹。このデバイスにより、肝臓や腸などの呼吸や消化に起因する臓器運動の影響を受ける臓器でも、ボンドなどで貼り付けることなく、臓器を固定し、観察できるようになった。

固定デバイス無し(マウスの腸)



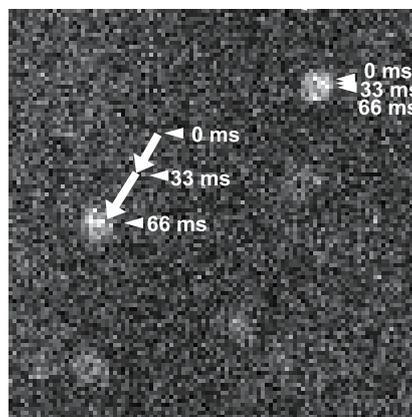
固定デバイス有り(マウスの腸)



本デバイスを用いれば、マウスの腹部に小さな

開口部を作成するだけで、簡単に組織の観察部位を倒立顕微鏡の対物レンズの視野内に固定することができるため、ほぼ全ての臓器を低侵襲に観察することが可能である。

我々は、蛍光標識したリポソームを調製し、マウスの尾静脈より投与後、このデバイスで固定した肝臓を観察したところリポソームが肝臓に流入し、広がる様子を撮影することができた。次に、マウスから採取した初代培養間葉系幹細胞を、我々が開発した PAMAM デンドリマー修飾量子ドットで蛍光標識し、静脈内投与後肝臓を観察すると、細胞がローリング、接着の様子をリアルタイムに撮影できた。さらに、蛍光標識された抗 CD45 抗体をマウスの尾静脈より投与後、肝臓や腸を観察すると、内在性の白血球の挙動を撮影することができた。



以上、本年は、組織固定デバイスを用いて、生きたマウスの各種臓器内における細胞や微粒子のリアルタイム撮影法を開発した。

1. K. Shimizu, Y. Higuchi, et al. Development of a suction device for stabilizing in vivo real-time imaging of murine tissues. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112(5) 508-510 (2011)

遺伝子・核酸・細胞治療への MEMS 技術の応用

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 清水一憲



私は連携支援ユニットの一員として京都大学薬学研究科と立命館大学工学部の連携を推進し、それぞれが保有するバイオテクノロジー技術と MEMS 技術の融合研究を進めている。本稿では3年目の成果と4年目への展望を示す。

2011年度(3年目)は、次の課題を中心に研究を進めた。

1, 生体組織吸引マイクロデバイスを用いた新規 *in vivo* ネイキッド核酸導入法の開発

2, リアルタイム *in vivo* 蛍光イメージングのためのマイクロデバイスの開発

以下にそれぞれの概要を報告する。

<1について>

In vivo 核酸導入法は、難治性疾患の遺伝子治療や動物個体レベルでの遺伝子機能解析などに利用が期待される重要な技術である。我々は生体臓器・組織への核酸導入法である組織押圧核酸導入法(押圧法) [1]に MEMS 技術を応用する研究を進めてきた[2]。その中で押圧法を基盤技術とし、臨床応用を視野に入れた新たな *in vivo* 核酸導入手法(吸引圧法)の開発に成功した(PCT/JP2011/062102)。吸引圧法により、プラスミド DNA や siRNA の導入が可能であった。また吸引圧法は腎臓、心臓、肝臓、脾臓に適用可能であった。吸引圧法に用いる生体組織吸引デバイスは、内視鏡に搭載することが可能であるため、内視鏡を利用した低侵襲な疾患治療に応用できると期待される。今後は吸引圧法による疾患治療応用と核酸導入メカニズムの解明を合わせて進めていく予定である。

<2について>

リアルタイム *in vivo* 蛍光イメージング技術は、生体内でのダイナミックで複雑な現象を分

子・細胞レベルで解明するために有効な技術である。しかしその手技は煩雑であり、観察を成功させるためには熟練した技術と経験が必要であった。特に、呼吸や拍動、蠕動などの生理学的な現象で常に動いている臓器・組織(肝臓、心臓、肺、腸など)の観察は非常に困難であった。そこで我々は動いている臓器・組織を観察するためのマイクロデバイスを開発した(特願2011-259007) [3]。本デバイスでは吸引圧を利用して、臓器・組織の動きを低減させることに成功した。今後は本デバイスの製品化も視野に入れ、研究を進めていく予定である。

その他にも動物代替創薬技術としての薬剤スクリーニングチップの開発や新たな細胞治療システムの開発も行っている。4年目となる2012年度は先に述べた課題とこれらの課題に精力的に取り組む予定である。

1. Mukai H, Kawakami S, Hashida M. Renal press-mediated transfection method for plasmid DNA and siRNA to the kidney. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 372:383-387, 2008
2. Shimizu, K., Kawakami, S., Hayashi, K., Mori, Y., Hashida, M., Konishi, S.: Implantable Pneumatically Actuated Microsystem for Renal Pressure-Mediated Transfection in Mice, *Journal of Controlled Release*, Accepted
3. Shimizu. K., Higuchi, Y., Kozu, Y., Hashida, M., Konishi, S.: Development of a Suction Device for Stabilizing *in vivo* Real-Time Imaging of Murine Tissues, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112 (5): 508-510, 2011

ウイルスセンサータンパク質 RIG-I の自己抑制ドメインの同定

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 高橋清大



本年度はウイルスセンサータンパク質 RIG-I の活性化機構の解明を目指し、研究を行った。我々の体は、ウイルスが持つ、特殊な構造を持つ RNA を『センサータンパク質』が認識する事で、ウイルス感染を認識する。これにより細胞はタンパク質相互作用を介したシグナル伝達を行うことで I 型インターフェロン (IFN) を誘導し、ウイルスを排除する。RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene I) はウイルス RNA を特異的に認識する事で I 型 IFN を誘導するセンサータンパク質として発見された。RIG-I は N 末端からシグナル伝達に必要な CARD (Caspase Recruitment Domain)、ヘリカーゼドメイン、RNA 結合に必要であるカルボキシ末端ドメイン (C-terminal domain : CTD) のドメインから構成されている。CARD は RIG-I においてシグナル伝達を行うドメインであり、下流の因子に対して CARD を提示することで I 型 IFN 誘導が促進される。ヘリカーゼドメインは ATPase 活性による構造変化を、CTD は RNA 結合を担うことが現在までの研究でわかっている。RIG-I による I 型 IFN の誘導は正常な細胞に対して悪影響を与える場合もあり、RIG-I は通常は I 型 IFN を誘導しないよう CARD の提示を抑える必要がある。本研究では、この抑制機構がいかんに行われるかの解明を目指した。

本研究では、RIG-I 抑制機構解明のアプローチの一つとして、RIG-I の中に新たな活性化の鍵となる領域を発見し、その機能解明を行った。これはヘリカーゼドメインと CTD の間に位置する領域であり、二次構造予測プログラムからは α ヘリックスに富んだ構造を持つことが予想される。この領域を細胞に一過性発現させると RIG-I の機能は優位に阻害され、ウイルス感染に際する I 型 IFN 誘導が抑制されることがわ

かった。また、 α ヘリックス構造を維持できないように変異を加えた RIG-I は細胞内で恒常的に活性化状態となり、自己抑制が働かなくなることがわかった。この知見から、我々はこの領域を自己抑制ドメインと名付けた。通常 RIG-I は 1) ウイルス RNA の CTD への結合、2) ヘリカーゼドメイン内の ATPase 活性による構造変化の誘導、3) CARD の提示が活性化のステップであると考えられている。しかしながら我々の作成した恒常活性化変異体は、RNA 結合能は保持しているが、ATPase 活性を介した構造変化を必要とせず CARD を提示し得ることがわかった。この結果から、RIG-I は自己抑制ドメインにより、CARD を介した下流へのシグナル伝達を阻害していること。また、ウイルス RNA 結合時の RIG-I の構造変化を司っていると考えられる。

最近、CTD を欠いた RIG-I の X 線結晶構造解析による立体構造が報告された。しかしながら、この構造からは自己抑制ドメインがいかんにして構造変化を抑制しているのか、説明できないことも多い。今後のより詳細な機構の解明を課題としたい。

Reference

1. Kageyama, M., Takahashi, K., Narita, R., Hirai, R., Yoneyama, M., Kato, H., & Fujita, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415 (1), 75-81 (Nov 11, 2011).

薬工連携に基づく新規薬物および遺伝子デリバリーシステムの構築

京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野

教授 橋田 充



遺伝子治療は癌や先天性疾患、生活習慣病等、様々な疾患に対して将来有望な治療法である。プラスミド DNA を用いた遺伝子導入法は、比較的免疫応答が低く安全性が高いが、遺伝子治療法を確立するためには、生体内の標的細胞に対して選択的かつ高効率な遺伝子発現を実現するためのキャリア開発が重要である。遺伝子発現の効率を左右する障壁の一つが、細胞膜を透過から細胞質への移行である。エンドサイトーシスで細胞内へ取り込まれたキャリアとプラスミド DNA の複合体の一部は、エンドソームから細胞質へ移行し、最終的には核内へ移行しタンパク質発現へと繋がる。しかしながら、一部はエンドソーム内への滞留により、遺伝子発現量が減少したり、エンドソーム内の Toll like receptor (TLR) を刺激し、炎症性サイトカインの産生に繋がることを、我々のグループも明らかにしてきた。

近年、我々は、糖修飾リポソームによる標的細胞選択的送達にソノポレーション法を融合することにより、*in vitro* および *in vivo* において遺伝子発現を増大させることが可能であることを報告してきた。しかし、その取り込みメカニズムや、遺伝子発現増強メカニズムについては不明であった。そこで、蛍光標識したプラスミド DNA と糖修飾バブルリポソームの複合体をマクロファージに取り込ませた後の細胞内分布を評価したところ、超音波照射がない場合は細胞内に顆粒状に分布し、エンドソーム内に滞留するが、超音波照射した場合はすぐに細胞質内に広がる様子が観察された。また、超音波照射しない場合と比較して超音波照射した場合は、マクロファージからの TNF α 産生量が有意に少なかった。これらの結果より、超音波照射により細胞質への移行が促進されること

が示唆された。また、プラスミド DNA と糖修飾バブルリポソームの複合体を細胞培養液に添加してから、0~30 分後に超音波照射した場合、5 分後に照射した時に遺伝子発現量が最大であった。さらに、0~10 分後に照射した場合、TNF α 産生量はほぼ同程度であったが、20, 30 分後に照射した場合はそれらに比べて有意に高かった。したがって、超音波照射には最適なタイミングがあり、細胞への添加から照射までの時間が長いとエンドサイトーシスを回避した細胞質への移行の効果が減少することが示唆された。

また、物理刺激を利用せずにエンドサイトーシスから細胞質への移行を促進する方法の開発も行った。バッファリング能を有するアミノ酸ヒスチジンは、エンドソーム内の低 pH 環境で、エンドソーム膜の透過性を促進することが期待される。そこで、ヒスチジンを末端に配したアミノ酸 dendron を合成し、生体親和性の高い遺伝子導入試薬として期待される一方で細胞膜透過性の低さが遺伝子発現効率の障害となるキトサンに修飾した。ヒスチジン修飾によりプラスミド DNA の細胞質への移行が促進され、遺伝子発現量も増大した。

References

1. Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes. *Biomaterials*. 32(20):4659-4669 (2011)
2. Chang KL, Higuchi Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Development of lysine-histidine dendron modified chitosan for improving transfection efficiency in HEK293 cells. 156(2):195-202 (2011)

インターフェロン遺伝子治療を目指したナノメディシンの設計 及び治療戦略の確立



京都大学大学院薬学研究科 病態情報薬学分野
教授 高倉喜信

インターフェロン (IFN) γ は、抗ウイルス作用や細胞増殖抑制作用、免疫調節作用などの生理活性を有することから、C型肝炎や種々の癌、さらにはアレルギー疾患治療への適用が期待されている。一方で、IFN γ の血中半減期は短いことから、これら慢性疾患への適用に際してはIFN γ を長期にわたって供給可能な投与方法・デバイスの開発が必須である。治療タンパク質をコードした遺伝子の導入は、治療効果の持続化が期待できる方法であり、これによるIFN γ の慢性疾患への適用が期待される。我々はこれまでに、IFN γ をコードしたプラスミドDNA (pDNA) の遺伝子導入により結腸癌細胞の肺および肝臓への転移が抑制可能であることを報告した (1)。また、pDNA中に多数存在する CpG モチーフを削減することで、pDNAからのIFN γ の飛躍的な持続化にも成功した (2-4)。

本研究では、IFN γ 遺伝子治療効果の増大を目的として、遺伝子導入後、体内で転写・翻訳されて産生されるIFN γ の体内動態を制御することによる治療効果の最適化について検討した。まず、分子量の増大によるIFN γ の腎糸球体ろ過の抑制ならびに血中滞留化を目的に、血中滞留性に優れ、有害な生理活性を持たないと想定されるマウス血清アルブミン (MSA) をキャリアとして選択し、IFN γ のC末端にMSAを融合したIFN γ -MSAを発現するpDNAを構築した。培養細胞の系において生物活性を評価したところ、IFN γ -MSAの生物活性はIFN γ と比較して約200分の1にまで低下した。ハイドロダイナミクス法により各pDNAをマウスに投与したところ、IFN γ -MSA融合タンパク質発現pDNAの投与により、持続的な血中濃度推移が得られた。薬動的解析の結果、

IFN γ -MSAの血中濃度-時間曲線下面積は、IFN γ と比較して約20倍に増大したものの、生物活性の低下を考慮したIFN γ 活性-時間曲線下面積は、MSAの融合化により約10分の1にまで低下した。一方、マウス結腸癌 colon26 細胞のマウス肺転移に対する効果を評価したところ、IFN γ -MSA遺伝子導入はIFN γ 遺伝子導入と同程度の抑制効果を示した。このことから、MSAとの融合は、IFN γ 活性を大幅に減弱するものの、体内動態の制御により高い抗腫瘍効果を得ることのできる有用な方法論になり得ることが示された (5)。

References

1. Kobayashi N, Kuramoto T, Chen S, Watanabe Y, Takakura Y. Mol Ther. 6:737-44, 2002.
2. Kawano H, Nishikawa M, Mitsui M, Takahashi Y, Kako K, Yamaoka K, Watanabe Y, Takakura Y. Int J Cancer 121:401-6, 2007.
3. Mitsui M, Nishikawa M, Zang L, Ando M, Hattori K, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. J Gene Med. 11:435-43, 2009.
4. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. J Immunol. 184:2729-35, 2010.
5. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. J Pharm Sci. 100: 2350-2357, 2011.

静電容量結合型電極による生体内電気信号の非接触導出のための条件

立命館大学理工学部 ロボティクス学科
教授 牧川方昭



衣服の上から心電図を計測する、ケージ内の動物の心電図を非接触に常時モニタするなど、生体内電気信号の非接触計測は臨床、研究に大きなメリットをもたらす。このような生体内電気信号の非接触計測手法に静電容量結合型電極がある。

これは、電気信号源の近くに置かれた金属表面には信号に依存した電気信号が発生するとコンデンサの原理を応用したもので、信号源と電極の間に形成されるコンデンサを介した信号導出となる。ただ、どの程度のコンデンサの容量が形成できれば、信号導出が可能か、の問題は明らかにされてこなかった。そこで本研究では、必要なコンデンサ容量の観点から、静電容量結合型電極を用いた生体電気信号導出の条件を検討した。

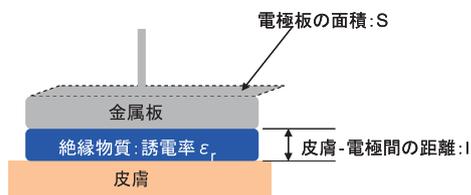


図 1. 皮膚 - 電極間のモデル

皮膚 - 電極間のモデルを図 1 に示す。 C_E を皮膚 - 電極間容量値、 ϵ_0 を真空の誘電率、 ϵ_r を綿の比誘電率、 S を電極板面積、 l を皮膚 - 電極間距離とすると、 C_E は式 1) で与えられる。

$$C_E = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{S}{l} \quad 1)$$

実験では、ヒトの心電図計測を対象に、静電容量結合型電極を用いた安静座位状態での心電図計測において、必要とされる皮膚 - 電極間容量値の検証を行った。被験者 5 名に安静座位状態をとらせ、信号電極を臀部、生体グラウンド電極を右手の甲に配置し、心電図の計測を行った。被験者の下肢着衣は、綿 100% 素材のズ

ボンおよび下着であり、ズボンと下着を合わせた厚さは 1 mm 程度であった。信号電極は銅板、生体グラウンド電極は皮膚電極を使用した。

図 1 に SN 比算出結果を示す。ここに、式 2) に示すように、SN 比とは、基線に重畳するノイズに比して、どの程度心電図の振幅が大きいことを示す。また、図中の横線は、心電図計測が可能であるか否かの閾値を示し、ここでは、経験値である 4dB を心電図計測の閾値とした。

$$SN \text{ 比} = 20 \log \left(\frac{|R \text{ 波ピーク値}| + |S \text{ 波ピーク値}|}{| \text{基線上限值} | + | \text{基線下限値} |} \right) \quad 2)$$

結果は、全被験者において、SN 比 4.0 dB 以上となる電極面積は $27 \times 27 \text{ mm}^2$ であった。

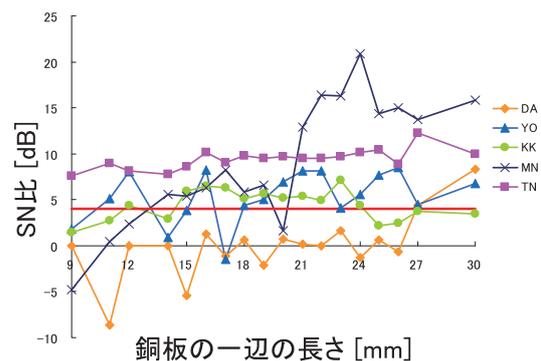


図 1. SN 比算出結果

以上の結果より、心電図計測が可能となる最小の電極面積と、ズボン布地の厚さ、同比誘電率から求めた最小の皮膚 - 電極間容量値は 20 pF であると考えられた。すなわち、静電容量結合型電極による心電図計測が可能となるためには、皮膚 - 電極間容量値は 20 pF 以上の大きさである必要があるとの結論である。

References

1. 平野滉二, 岡田志麻, 牧川方昭: 静電容量結合型電極を用いた自動車内での心電図計測, IT ヘルスケア, 6(1): 65-68, 2011

薬学・工学連携を通じたマイクロマシン・MEMS の DDS 応用

立命館大学理工学部 マイクロ機械システム工学科
教授 小西 聡



革新的なナノバイオ創薬研究拠点における薬工連携も3年を経、連携が定着し、研究内容の深化が進んできている。我々が専門とするマイクロマシン・MEMSは、工学的手法、ツールのスケールを従来よりさらに小さいほうに伸ばし、マイクロスケールまで拡張するという点で特徴をもつ。またナノテクノロジーとつながるメゾスコピックな領域を担うという重要な役割も期待できる。MEMSと呼ばれる半導体プロセスを援用してセンサやアクチュエータを実現する微細加工技術は、これまでのミニチュア技術を超えた機能集積も可能となる。我々は、立命館大学グローバルイノベーション研究機構(R-GIRO)により選定されたプロジェクト“MEMSとBMEのマルチスケールフュージョン研究”(代表:小西)にも掲げるように、低侵襲な手術ロボットから、バイオチップまでを俯瞰し、バイオメディカル分野と工学分野の革新的な関係構築を目指している。

本拠点の薬工連携においては、S³マイクロマシンの薬学分野への応用に取り組んできている。S³とは小さく(Small)、柔らかく(Soft)、安全な(Safe)の頭文字をとったものである。

具体的には、1) マイクロハンドやマイクロポンプなどで用いてきたマイクロバルーン技術[1]の組織押圧核酸導入技術への応用、2) 医療用MEMSデバイスの生体固定用に用いてきたマイクロ吸盤デバイス[2]の組織吸引核酸導入技術への応用、3) 同様にマイクロ吸盤デバイス[2]の組織観察への応用、4) マイクロカプセルロボット[3]のDDSへの応用、等が進んでいる。

いずれも薬工双方の有していたポテンシャルをうまく組み合わせることで構築した連携研究といえる。連携に関しては、京都大学特定助教兼

立命館大学 R-GIRO 客員研究員の清水氏が活躍して下さっている。

三年目となった本年度は、マルチスケールの観点からは大きめのサイズとなる、生体臓器・組織への核酸導入法である組織押圧および吸引核酸導入技術へのマイクロマシン・MEMS技術の応用研究について、生体適用対象が増え、医療への応用への知見をさらに得ることに成功している。医学系との連携も開始している。一方で、核酸導入メカニズムを解明するためのin vitro研究も進んできている。組織押圧現象を模擬するために複数バルーン構造を有したチップ上の模擬生体デバイスを用いたメカニズム解明の研究を推進中である。これらの成果は、生化学、バイオチップ関連で著名な国際会議μTAS2011(米国、シアトル)に採択され発表している。この他複数の国内会議等でも都度進捗の発表を実施してきている[2]。

本研究は、連携による保有ポテンシャルに新しい意義を与え、新しい試みを通して、革新性が高まる研究へとつながっている。現在推進中の研究内容をさらに深めながら、今後も精力的に研究を推進していく。

1. O. C. Jeong and S. Konishi: "All PDMS Pneumatic Microfinger with Bidirectional Motion and Its Application", *IEEE/ASME Journal of Microelectromechanical Systems*, Vol. 15, No. 4, pp. 896-902 (2006)
2. 小西 聡他, : "吸着固定機構による生体と診断・治療用デバイスとの相対位置確保に関する研究" *JJSCAS 日本コンピュータ外科学会誌*, Vol.11 No.2, pp59-64(2009)
3. H. KOGA, S.KONISHI et al., "CAPSULE MICROROBOT FOR TARGETTING IN MEDICAL DIAGNOSTIC TREATMENT", Th1D.003, *The 16th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers'11)*, China, Beijing, (2011.6.8)

生体組織を把持するための体内ロボットハンド

立命館大学理工学部 ロボティクス学科
准教授 野方 誠



現在、患者体内の診断、治療を低侵襲に行う医療装置として、体腔内に留置されているロボットを体外からの磁場印加により、自在に移動や回転をさせ、薬剤の注入、患部の切除や焼灼等の治療動作や検査動作を正確に実行することを目的として研究を進めている。患部への薬剤投与や治療する際、患部を把持するためには人間の手に相当する鉗子をロボットに搭載する必要がある。本研究では、高把持力を有する小形把持鉗子の設計と製作を行った。

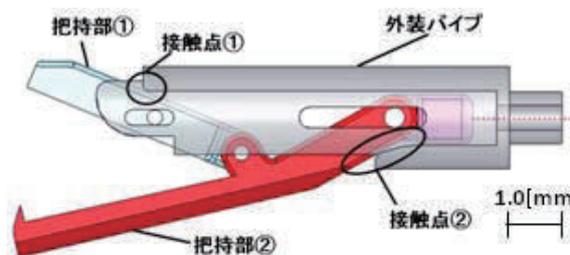
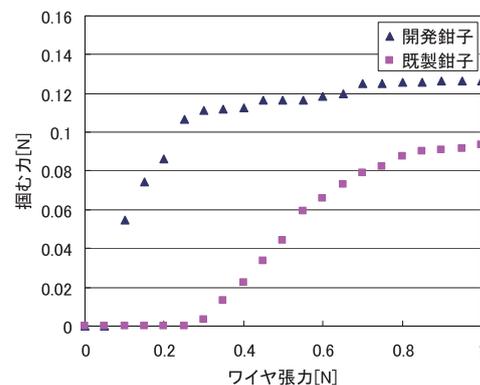


図1 高把持力を有する体内ロボット把持鉗子

図1に設計した把持鉗子を示す。本把持鉗子は、把持部が閉じた状態で、直径2.0[mm]、長さ10.4[mm]である。ワイヤで把持部②を引くことで接触点①では、2つの回転モーメントが生じる。1つは把持部①が外装パイプに接触した反力で生まれる回転モーメント。もう一方は各回転軸の回転モーメントである。接触点②では、上記の2つの力に加え、外装パイプが把持部②に接触することで生まれる回転モーメントが加わるので、更に掴む力は増加する。

試作した鉗子を用いて、把持力検証実験を行った。本実験の目的は、開発鉗子と既製の内視鏡用鉗子の掴む力の比較である。感圧導電性エラストマーセンサ(SFR-3-LT)を把持部で掴み、ワイヤとロードセル(LTS-1KA)を固定し、それ

を自動ステージ(SGSP20-35)で引くことで、掴む力を計測した。以下の図2に鉗子の開口角が19.2[deg]の時の実験結果を示す。



メンブレントラフィックによる細胞分裂制御機構の解明

京都大学大学院薬学研究科 生体情報制御学分野
助教 加藤洋平

リサイクリングエンドソームは細胞分裂前期から終期にかけて中心体を取り巻くようにクラスターを形成し、細胞質分裂時には細胞間橋とフレミングボディに集積する。このようなリサイクリングエンドソームの局在変化が担っている細胞分裂における役割や分子メカニズムには不明な点が多い。本年度は、共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージングを行い、微小管の重合阻害剤であるノコダゾール処理をしたときや、Dynamytin の過剰発

現によるダイニン・ダイナクチン複合体の形成を阻害したときのリサイクリングエンドソームの動態に対する影響を観察した。その結果、細胞分裂時におけるリサイクリングエンドソームの局在変化には微小管とモータータンパク質のダイニンが必要であることが明らかになった。今後は分裂期の細胞において、ダイニンによる輸送が優勢になるスイッチング機構について明らかにしたいと考えている。

黒質ドパミンニューロンによる線条体神経投射の再生に関する研究

京都大学大学院薬学研究科 薬品作用解析学分野
助教 泉 安彦

パーキンソン病で失われた黒質一線条体ドパミン神経投射を再生するために、ドパミンニューロンによる線条体神経支配を促進するインテグリン発現ベクターの作製を試みた。これまでに、細胞接着因子であるインテグリンの $\alpha 5$ および $\beta 1$ サブユニットが、ドパミン神経突起伸長に關与する重要なヘテロ二量体であることを見出した。そこで、マウス脳からインテグリン $\alpha 5$ および $\beta 1$ のcDNAを調製し、遺伝子発現ベクターに組み込んだ。トランスフェクト

を行い、タンパク発現を確認した。次に、マウス胚性幹（ES）細胞がSDIA（stromal cell-derived inducing activity）法によりドパミンニューロンへ分化することを確認した。現在、ES細胞に今回作製したインテグリン発現ベクターを導入し、過剰発現細胞を作製中である。今後、インテグリン発現ES細胞をドパミンニューロンに分化させ、パーキンソン病モデル動物に移植する予定である。

抗癌剤誘発末梢神経障害の分子メカニズム解明とその対処法の確立

京都大学大学院薬学研究科 生体機能解析学分野
准教授 中川 貴之

いくつかの抗癌剤はしびれや知覚障害などの末梢神経障害を誘発するが、特に白金製剤のオキサリプラチン（OHP）は、寒冷被爆で誘発される特徴的な急性末梢神経障害を誘発する。本研究において、OHP を投与した2時間後のマウスでは、触刺激に対する感受性に変化は認められなかったが、冷刺激に対する過敏応答が惹起された。この冷過敏応答は、TRPA1 阻害薬あるいはTRPA1 遺伝子欠損により阻害され、また、TRPA1 刺激薬で惹起される疼痛

様行動も増強された。また、培養後根神経節細胞を用いた *in vitro* 解析においても、OHP による TRPA1 の感受性増大が確認された。一方、TRPM8 や TRPV1 の発現や機能に変化はなく、また、シスプラチンやパクリタキセルでも認められなかった。本現象は、OHP に特徴的な急性末梢神経障害を表したものであると考えられ、その分子メカニズムの一部を明らかにすることができた。

癌免疫化学療法に資する抗癌剤徐放・アジュバントシステムの開発

京都大学大学院薬学研究科 病態情報薬学分野
准教授 西川元也

部分的に他のオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）と相補的な3本以上のODNを混合することで多足型構造DNA（polypodna）を作製した。免疫細胞に発現するTLR9のリガンドである非メチル化CpG配列（CpGモチーフ）を含むpolypodnaは、通常の1本鎖あるいは2本鎖CpGDNAと比較して、TLR9発現細胞への添加により有意に高いサイトカイン産生を誘導した。特に、pod数が6（hexapodna）または8（octapodna）が高い活性を示した。そこで、

hexapodnaを構成する各ODNの5'末端に突出性塩基配列を付加することでハイドロゲル用ODNを設計した。お互いに相補的な突出性塩基配列を有する2種類のhexapodnaを混合することで、注射投与可能なDNAハイドロゲルの開発に成功した。抗癌剤ドキソルビシンを結合したDNAハイドロゲルは、担癌マウスにおいて高い抗腫瘍効果を示し、癌治療用DDSとして有用であることが明らかとなった。

ドパミン作動性及びセロトニン作動性ニューロンの発生機構における Fgf シグナルの役割の解明と神経変性疾患治療への応用

京都大学大学院薬学研究科 遺伝子薬学分野
講師 三宅 歩

神経幹細胞の増殖・分化の制御機構の解明は、新規メカニズムによる治療薬や移植、再生などの治療法の開発につながる。そこで、本プロジェクトでは神経幹細胞からドパミン作動性及びセロトニン作動性ニューロンへの運命決定におけるゼブラフィッシュ Fgf19 及び Fgf22 の役割について検討した。その結果、ドパミン作動性ニューロンに関しては Fgf19 機能阻害胚では増加し、Fgf19 過剰発現胚では減少していた。このことは、ドパミン作動性ニューロン

への分化に対して Fgf19 は抑制的に作用していることを示している。一方、Fgf22 機能阻害胚ではドパミン作動性ニューロンとセロトニン作動性ニューロンの両方が減少しており、Fgf22 はこれらのニューロンの発生を促進していることが示された。したがって、ドパミン作動性及びセロトニン作動性ニューロンの発生に対して Fgf19 と Fgf22 は異なる作用を示すことが明らかとなった。

カチオン性膜透過ペプチドの細胞表面糖脂質との相互作用メカニズムの解明

京都大学大学院薬学研究科 薬品機能解析学分野
助教 矢野義明

細胞内を標的とする薬物キャリア分子としての有用性が注目される、抗菌性ペプチドを含む細胞膜透過性ペプチド(CPP)が細胞と相互作用する時の結合サイトの一つである、糖脂質ガングリオシドとの相互作用メカニズムを調べた。CPP として、F5W マガイニン 2 (MG2)を用いた。HeLa 細胞表面において、MG2 とガングリオシドの共局在を確認した。またリポソーム

を用いた実験から、ガングリオシドへの結合にはシアル酸部位が重要であることを明らかにした。約 4 分子のガングリオシド GM1(電荷-4)に対して 1 分子の MG2(正味電荷+4)が結合することから、MG2 は静電相互作用によりガングリオシドのクラスター形成を誘導していることが予想された。

核医学・光デュアルイメージング法によるナノ粒子／ナノキャリア体内動態の効率的評価法の構築

京都大学大学院薬学研究科 病態機能分析学分野
助教 天満 敬

ポリ乳酸系両親媒性ポリマーミセルであるラクトソームは Enhanced Permeability and Retention 効果に基づくがん病変への効率的な薬剤送達を可能とするナノキャリアとして注目されてきている。そこで私はがん病変への優れたターゲティング能を有するラクトソームを簡便・安全で汎用性の高いインビボ蛍光分子イメージングに応用することを計画し、ラクトソームの近赤外蛍光プローブ化を試みた。具体的には臨床診断に広く用いられているイン

ドシアニングリーンを母体化合物としてラクトソームへの安定的な内包に適した化合物の探索を行い、ラクトソームへの安定的な内包が可能で、かつ、ラクトソームプローブの蛍光特性をスイッチング可能な蛍光色素を見出した。一方でナノキャリアの定量的動態評価のため、核医学イメージング法の高い定量性に着目してナノキャリアの放射標識を行い、高い放射化学的純度での標識合成に成功した。



タンパク質-タンパク質相互作用を標的とした 創薬リード化合物探索系の開発

京都大学大学院薬学研究科 システムケモセラピー・制御分子学分野
教授 掛谷秀昭



低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) は、固形腫瘍内などの低酸素環境に曝されている細胞において特異的に活性化される転写因子であり、血管内皮増殖因子などをはじめとした様々な標的遺伝子の活性化を介して、低酸素状態にある固形腫瘍内などの腫瘍細胞の生存や悪性化に深く関与している。我々はこれまでに、HIF を標的とした抗がん剤リード化合物の開発を目指して、HIF の機能発現に必要な HIF の α サブユニットと β サブユニットのヘテロ二量体形成を標的とした低分子化合物の開発を目的に、サンゴ由来の蛍光タンパク質 Kusabira-Green (KG) を用いた二分子蛍光補完法による HIF 二量体形成能の評価系の構築を進めてきた。

昨年度までの解析の結果、KG の N 末端断片 (KGN) の N 末端側に HIF-1 α 断片を付加した融合タンパク質 (1 α -KGN) と KG の C 末端断片 (KGC) の C 末端側に HIF-1 β 断片を付加した融合タンパク質 (KGC-1 β) を CHO 細胞に発現させた場合に、HIF-1 のヘテロ二量体化に起因する KG タンパク質の蛍光が回復することを見出した。この時、1 α -KGN および KGC-1 β 各タンパク質発現プラスミドのトランスフェクションから 12 時間経過すると KG の蛍光像が観察され始めるが、24 時間後頃より各断片の過剰発現に起因すると考えられる非特異的な蛍光像が強く観察された。このことは、化合物スクリーニングの感度ならびに再現性を著しく低下させる原因となりうると考えられる。そこで、スクリーニング実施時の化合物添加から評価点までのスケジュールコントロールを容易にするため、テトラサイクロン誘導体ドキシサイクリン (Dox) による転写制御システム (Tet-off システム) の導入を試みた。

まず、1 α -KGN および KGC-1 β 各遺伝子をテトラサイクリン応答性プロモーターの下流に挿入した発現ベクターを構築した。さらに両遺伝子の安定導入細胞株を樹立することを考え、各ベクターの薬剤選択マーカーをゼオシンおよびハイグロマイシン B 耐性遺伝子へと置換した。作製した Dox 制御型 1 α -KGN および KGC-1 β 発現ベクターを CHO 細胞に導入すると、Dox 存在下では KG の蛍光は全く観察されなかったが、Dox 除去による 1 α -KGN および KGC-1 β の発現誘導開始から 12 時間後より KG の蛍光が観察された。また同様に Dox 制御下 (Dox 除去により発現誘導) で 1 α -KGN と KGC あるいは KGC-1 β と KGN の組み合わせで発現させた場合では、発現誘導後 24 時間経過しても KG の蛍光は観察されなかった。これらの結果は、Dox 制御によりスクリーニング系のバックグラウンドの低減ならびにタイムスケジュールコントロールが可能になったことを示している。

次に、スクリーニングの際の遺伝子導入効率のばらつき (実験毎の効率の差異および導入の均一性) を無くすため、Dox 制御型 1 α -KGN および KGC-1 β 発現ベクターを恒常的に保持する CHO 細胞株の樹立を行った。薬剤選択後、取得した 100 クローンから、Dox 除去により均一な KG 蛍光像を示すクローンを 3 株得た。今後は、取得した細胞株の KG 蛍光像が確かに HIF-1 の二量体化に依存しているかを確認し、その後、HIF-1 阻害化合物のスクリーニング・評価を行う予定である。

1) Ohno, Y., Hattori, A., Ueda, M., Kageyama, S., Yoshiki, T., Kakeya, H. FEBS J. 278: 4088-4099, 2011.

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病態形成機構

京都大学ウイルス研究所附属エイズ研究施設
教授 松岡雅雄



ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) はヒトで始めて発見されたレトロウイルスであり腫瘍 (成人 T 細胞白血病: ATL)、炎症性疾患 (HTLV-1 関連脊髄症: HAM など)、免疫不全を引き起こす。HTLV-1 が、このような異なる病態を引き起こす機構には不明な点が多く残されていたが、我々は HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子が HTLV-1 による病原性において重要であることを報告してきた。本研究では HBZ の HTLV-1 感染症の病態における役割を解析した。

1. HBZ による炎症誘導

HBZ トランスジェニックマウスの CD4 陽性 T リンパ球ではインターフェロンガンマの産生が亢進していた。HBZ は Foxp3 遺伝子の発現を誘導し、制御性 T リンパ球を誘導するが、その Foxp3 発現は不安定であり、Foxp3 陰性細胞へと変化することがある。この Foxp3 陰性細胞では IFN- γ の産生が亢進していた。このように HBZ は Foxp3 陰性細胞を増やし、炎症性サイトカインの産生を増加させることで炎症を引き起こしている可能性が示された。

2. HBZ による細胞性免疫障害

HTLV-1 キャリアでは細胞性免疫障害があることが知られているが、その原因は明らかではない。我々は HBZ が細胞性免疫不全の原因である可能性を考え、HBZ トランスジェニックマウスに単純ヘルペス 2 型、リステリア菌をチャレンジして解析を行った。HBZ トランスジェニックマウスではウイルス量、菌数の減少がコントロールと比較して遅延していた。HBZ トランスジェニックマウスでは CD4 陽性 T リンパ球において IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 の産生が抑制されており、細胞性免疫障害の原因の可能性

が考えられた。その機序を解析するために IFN- γ プロモーターに HBZ が及ぼす影響を解析したところ NFAT, AP-1 経路の抑制により IFN- γ プロモーター活性を減弱させることが明らかになった。このことから HBZ による NFAT, AP-1 経路の阻害による IFN- γ 産生抑制が HBZ による細胞性免疫障害の一因である可能性が示された。

3. HBZ による TGF- β 経路の活性化

HBZ が TGF- β 経路を活性化することを見出し、その機序として HBZ が Smad2/3、p300 と結合し転写を活性化することを見出した。HBZ による TGF- β /Smad 系の活性化により Foxp3 遺伝子の発現が誘導され、HBZ 発現細胞の多くが Foxp3 陽性細胞へとなったことから HTLV-1 感染細胞が Foxp3 陽性細胞に多く認められるのは HBZ の作用によるものであることが示唆された。

1. 結語

HBZ 遺伝子は全ての ATL、HTLV-1 感染者で発現しており、HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞の形質は HBZ によって賦与されていることが明らかとなった。また HBZ は HTLV-1 感染症の免疫不全、炎症も惹起しており、HTLV-1 感染症の病態において中心的な働きをしているものと考えられる。

References

1. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* 119: 434-44, 2012.
2. Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood* 118: 1865-1876, 2011.
3. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog* 7: e1001274, 2011.

単純ヘルペスウイルス感染抑制宿主因子に関する研究

京都大学ウイルス研究所 ウイルス病態研究領域
教授 小柳義夫



【目的と意義】単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus type 1 : HSV-1)は脳炎の原因ウイルスである。一方、APOBEC1(A1)は脂質代謝において必須分子である apoB100 の mRNA を小腸細胞で editing するシチジン脱アミノ酵素であり、生理活性制御分子である。ヘルペスウイルスに対する APOBEC 関連分子の作用はこれまで知られていなかった。本研究では、A1 の抗ヘルペス作用という新知見を得た。

【材料と方法】GFP 発現 HSV-1 を生後 14 日の Wister Hannover GALAS 哺乳ラットに脳注し、脳炎ラットモデルを作製した。A1 の発現を RNA-PCR 法と免疫染色法で解析した。また、HA タグ付加ラット A1 を恒常発現するウサギ皮膚細胞を作製し、この細胞における HSV-1 複製効率とウイルス遺伝子変異効率、A1 特異的 shRNA のそれらに対する影響を検討した。

【結果】

1) HSV-1 脳炎回復モデルの確立:HSV-1 接種群の約半数は致死性全脳炎を発症した。一方、残りの半数のラット群では一過性の片麻痺を発症したが、3 日後には症状が消失し、回復するものがみつかった。この回復ラット脳では GFP 陽性部は限定的であり、さらに血球細胞の浸潤もきわめて限定的であった。そして、麻痺が消失後 12 時間目をピークに、時間経過とともにウイルス感染領域 (GFP 陽性部) は減少していた。2)脳炎ラットにおける A1 の発現誘導:脳炎回復過程における細胞性因子の関与を検討するために、GFP 陽性部、そして、対照試料として非接種ラット脳の transcriptome 解析を行った。脳炎ラットに特異的発現増加分子として A1 (4 から 40 倍以上) を見出した。これは RNA-PCR 法によっても確認され、さらに HSV-1 感染神経細胞に A1 の明らかな発現増加

を免疫染色により確認した。3) A1 の抗ヘルペス作用とシチジン脱アミノ化:ラット A1 発現細胞における HSV-1 複製効率を検討した結果、それは A1 により強力に抑制されていたが、脱アミノ酵素活性部位変異体 E63A ではほとんど抑制されなかった。一方、抗ヘルペス作用は、A1 特異的 shRNA の導入細胞では観察されなくなった。次に感染後 UL54 遺伝子 (最初期遺伝子)、UL30 (早期遺伝子)、UL27 (後期遺伝子) それぞれのウイルス遺伝子の RNA レベルが抑制されるとともに、HSV DNA の複製レベルも低下していた。そして、UL54 DNA には非同義置換となる G→A あるいは C→T 塩基置換が有意に増えていた。一方、この置換は、acyclovir 処理による HSV-1 DNA 合成阻害下での RNA 産物には遺伝子変異はみられなくなることより、A1 の標的は DNA であることが強く示唆された。

【考察】

APOBEC 関連分子がヘルペスウイルスに対して抑制作用を有するというはじめての報告である。本研究は、脳炎という致死性疾患の最初期過程においてシチジン脱アミノ酵素がウイルス阻止機能を担うことを示す結果であり、治療学的意義も大きい。今後、この基礎知見を利用した治療法が考えられる。

【References】

1. Gee P, Ando Y, Kitayama H, Yamamoto SP, Kanemura Y, Ebina H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. J. Virol. 85(19), 9726-9736, 2011
2. Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An DS, Ito M, Koyanagi Y. J. Virol., 86(9), 5000-5013, 2012
3. Ebina H, Kanemura Y, Suzuki Y, Urata K, Koyanagi Y. Virology 427(1):44-50, 2012

生物有機化学を基盤とした新規抗癌剤候補化合物の探索研究

京都大学大学院薬学研究科 薬品資源学分野
准教授 伊藤美千穂

各種の揮発性テルペノイドは細胞毒性や抗菌活性を示すが、その活性の強弱は部分構造に大きく影響される。構造特異性の高いこれらの合成メカニズムは興味深く、本研究では、特にシソに含まれるモノテルペン成分の生合成関連酵素遺伝子をクローニングし、ゲラニオールシンターズとリナロールシンターズについて、両酵素の構造と触媒する反応の異同をドメインスワッピングとミュータジェネシスを組み合わせ合わせた手法で検討した。その結果、両酵素の

水酸基導入位置選択性は、C 末側に位置する、ある限られた領域の配列に大きく依存しており、このわずかなアミノ酸配列を交換することで水酸基導入位置が 100%変化することを見いだした。三次元立体構造予測モデル上でこれらの関連領域をみると、モノテルペン合成反応の中間体であるカルボカチオンの電荷移動に加え、活性ポケットの相対的な位置も重要であることが示唆された。

新規生物活性化合物ライブラリー構築を指向した生体分子修飾反応の開発

京都大学大学院薬学研究科 薬品分子化学分野
助教 猪熊 翼

ペプチド骨格に対する構成アミノ酸ユニットの修飾反応は新規生理活性化合物の創出において有用なプロセスである。以前我々は分子内に独自に開発したチオ尿素触媒を用いることで、 α 位にアミド骨格を有するN-アリアルイミンに対する有機ホウ酸試薬の1,2-付加反応が高立体選択的に進行することを見出している。今回我々は本反応プロセスをあらかじめペプチド骨格を有する化合物を基質として用いれば、ペプチド分子への異

常アミノ酸ユニットの導入プロセスへと展開できないかと考え検討を行った。その結果、様々なモノおよびジペプチド性化合物において本反応は良好に進行することを見出し、高いジアステレオ選択性で異常アミノ酸ユニットであるスチリルグリシンユニットを含むペプチド化合物へと導くことができた。本プロセスは新規生物活性物質候補品のライブラリーを構築する上で有用な手段になると期待される。

リン酸化プロテオミクスを用いた分子標的抗癌剤探索・評価系の構築

京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野
助教 若林 真樹

癌化した細胞において特定のタンパク質分子のリン酸化異常が観察されることはよく知られており、近年の抗癌剤治療においてはこのような分子に特異的に作用するよう設計された分子標的薬が主役を担いつつある。本研究では、高効率かつ高精度に効果的な新規分子標的抗癌剤を選出する評価系の開発を行った。まず、タンパク質リン酸化ネットワークの全容と、癌化・抗ガン活性に付随するリン酸化変動プロフ

ァイルを包括的に理解するため、既知の分子標的薬やキナーゼ阻害剤によるリン酸化プロファイルの変動情報を網羅的に取得し、この情報をもとに新規分子標的薬プロファイリングを精度よく行うためのリファレンスデータベースの構築を進めた。本データベースと分子標的薬候補化合物の活性を比較検証することで、化合物の標的分子や適応疾患の推定を行うことが可能となった。

蛋白質共役型受容体作動薬/拮抗薬の in silico 予測手法の確立

京都大学大学院薬学研究科 薬理ゲノミクス分野
准教授 平澤 明

受容体ホモロジーモデルに基づくドッキングシミュレーションを行い、得られた構造活性相関情報を元に GPR40 選択的アゴニストの探索を試みた。各種脂肪酸及び脂肪酸類縁体、新規合成化合物計 47 種類について測定し、ドッキングシミュレーションにより水素結合エネルギーを計算した。活性化の計測値と水素結合エネルギー間の相関を検討すると、高い相関があることが明らかになった。また、このモデル

を用いて特異的な化合物の探索を行い、GPR40 選択的アゴニスト候補として新規合成化合物 NCG75 を得ることができた。NCG75 は GPR40 を介する ERK リン酸化反応、細胞内 CA²⁺反応を選択的に惹起し、更に MIN6 細胞からのインスリン分泌を促進した。本研究で得られた GPR40 の構造活性相関情報は今後の GPR40 受容体選択的化合物の開発に極めて有益であると考えられる。

好熱性紅藻由来 P 糖タンパク質ホモログにおける多剤排出機構に関する研究

京都大学大学院薬学研究科 構造生物薬学分野
助教 山口 知宏

癌細胞の多剤耐性獲得の主要原因である P 糖タンパク質は、その多剤認識メカニズムの解明が強く求められている。本研究では、P 糖タンパク質ホモログである好熱性紅藻由来 ABC トランスポーターを用いて、基質との相互作用に重要なアミノ酸残基の同定を検討した。本研究室において 2.7 Å 分解能で決定された X 線結晶構造を用いて、ドッキングシミュレーションによる基質結合部位の探索を行った。基質との

相互作用が推測されるアミノ酸残基に対して部位特異的変異導入を行い、得られた変異体タンパク質を発現させた酵母を用いて、薬剤耐性試験による基質輸送活性測定を実施した。その結果、輸送活性に重要な複数の極性アミノ酸残基を同定できた。これらは、疎水性環境にある基質結合領域において、輸送基質の極性官能基と相互作用することが示唆される。

新規触媒系の開発と生理活性物質の合成

京都大学大学院薬学研究科 薬品合成化学分野
助教 山岡 庸介

新しい反応系の開発はより効率的な医薬品や生理活性物質の合成を可能とする。特に無駄な副生成物を生じない反応系の開発は、近年の環境への配慮（グリーンケミストリー）という観点から非常に重要である。本拠点の目標とする「癌治療などに焦点を当てた医薬品シーズの適合化研究」に貢献するため、申請者は生理活性物質に多く見られる複素環の簡便かつ環境調和型な合成法の検討を行った。すなわち完全

触媒的（無駄な試薬廃棄物を出さない）シリルエノールエーテル化と連続する求電子種との環化反応の研究を行った。しかし、現在のところシリルエノールエーテルとその加水分解体とのカップリングが主生成物であり、目的とする化合物の収率は低い。今後更なる反応検討条件の検討を行なっていく予定である。

時差消失マウスと超微量ナノ容量薬物投与方法による時差症候群改善薬の開発

京都大学大学院薬学研究科 システムバイオロジー分野
助教 山口 賀章

覚醒・活動・睡眠という生活リズムは、社会生活や個人の健康の基盤である。ところが、近年、経済のグローバル化にともない、交代性勤務、時差勤務、長時間労働に従事する人（シフトワーカー）が半数を超えた。彼らは、自然の昼夜とは異なったサイクルで生活するため、血圧、代謝、ホルモン分泌等の24時間リズムを司る概日時計システムが破綻の危機に陥っている。事実、シフトワーカーは、体内時計と生活リズムの乖離のため、全身倦怠感・内臓機能

失調を呈するのみならず、その労働効率は低下し、ヒューマンエラーによる労働災害は増大する等、問題は多い。よって近年、時差症候群の予防・治療に大きな関心が集まっている。私は、概日リズムの中核である視床下部の視交叉上核の分子研究から、時差環境下でも時差を全く生じないマウスを開発した。引き続きこのマウスと超微量ナノ容量薬物投与方法を利用して、時差症候群改善薬を開発したい。

低分子量化合物を用いた生体膜微小環境の構築・維持メカニズムの解析研究

京都大学大学院薬学研究科 システムケモセラピー・制御分子学分野
助教 西村 慎一

生体膜は均一な構造ではなく微小環境の集合体であり、そこでは効果的なシグナル伝達や細胞骨格調節が進行する。生体膜微小環境は癌などの疾患とも深い関連があり、創薬の観点からもその形成・維持機構の解明が望まれている。しかし微小環境の組成や構造、構築・維持のメカニズムの理解は、他の生体分子集合体に比べて進んでいるとはいえない。本研究では細胞膜ステロールの局在異常をきたす化合物の作用

機序解明を目的として、出芽酵母の変異株コレクションを用いて標的経路および標的遺伝子の探索を行った。すなわち800余りの変異株に対して目的化合物の感受性試験を行い、内膜輸送やエンドサイトーシスに関連する遺伝子変異が感受性を上昇させることを明らかとした。今後、標的分子の同定によって膜輸送と細胞膜ステロールの局在制御との関連が分子レベルで明らかになると期待できる。

第3回
ナノバイオ創薬研究
シンポジウム

2012年3月14日(水)
京都大学薬学部 記念講堂

第三回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム

プログラム

2012年3月14日(水)
京都大学薬学部記念講堂

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)

研究報告

座長 山下富義(京都大学大学院薬学研究科・准教授)

13:10~13:30 ウイルスセンサータンパク質 RIG-I の自己抑制ドメインの同定

高橋清大(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

13:30~13:50 低侵襲な in vivo 核酸デリバリーのためのマイクロマシン技術の応用

清水一憲(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

13:50~14:10 生きたマウスの組織内における細胞挙動の可視化

樋口ゆり子(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

14:10~14:20 休憩

講演

座長 高倉喜信(京都大学大学院薬学研究科・教授)

14:20~15:00 医用ロボティクスの薬学応用

野方 誠(立命館大学理工学部 准教授)

15:00~15:40 ウイルス感染時における自然免疫応答の誘導メカニズム

加藤博己(京都大学ウイルス研究所 准教授)

15:40~16:20 創薬ケミカルバイオロジー

掛谷秀昭(京都大学大学院薬学研究科 教授)

16:20~16:40 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)

16:40~17:30 1分子イメージング技術を使った生体分子機能解析

原田慶恵(京都大学物質-細胞統合システム拠点(iCeMS) 教授)

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

第三回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム

2012年3月14日に、京都大学薬学部記念講堂において、第3回ナノバイオ創薬研究シンポジウムが開催された。本シンポジウムを主催する革新的ナノバイオ創薬研究拠点は、2009年に京都大学—立命館大学の国立私立大学連携のもと、革新的創薬研究拠点の推進を目的として京都大学大学院薬学研究科に設立され、京都大学大学院薬学研究科がもつバイオテクノロジーや体内動態制御技術(DDS)と、立命館大学理工学部が持つマイクロマシン、ナノテクノロジー技術などの融合による新しい概念に基づくナノバイオ医療技術の開発を目標としている。さらに京都大学ウイルス研究所との連携により、がん等の難治性多因子疾患克服のための革新的創薬研究事業の展開を目指す。



拠点長 佐治英郎 教授

今回のシンポジウムは、拠点外から招聘した講師による特別講演、本拠点に参画する京都大学大学院薬学研究科、京都大学ウイルス研究所、立命館大学理工学部の3名の研究者による講演、そして、本拠点所属の若手教員による成果報告から構成されていた。本拠点の特長の一つでもある、「異分野融合による創薬研究の推進」がシンポジウムにも色濃く表れており、有機合成、タンパク質の構造解析、遺伝子・細胞、マイクロマシン、イメージングなど、ナノバイオ創薬を目指した幅広い分野の最新の知見を聞くことができた。参加者は約150名で、各講演後の質疑応答も時間が足りなくなるほどで、各トピックに対する関心の高さが伺われた。以下、本シンポジウムで講演された内容について簡単に紹介する。

特別講演として、京都大学物質—細胞統合システム拠点 原田慶恵 教授により、「1分子イメージング技術を使った生体分子機能解析」と題した講演が行われた。生命現象を理解する上で、個々の生体分子が細胞内でどのようなメカニズムで、どのような時間的、空間的な秩序で機能しているかを明らかにすることは極めて重要である。その方法として、光学顕微鏡を使って1分子の挙動を直接観察する方法が有効である。現在、1分子の挙動の可視化を目的とした、背景光を劇的に減少させたエバネッセント光を利用した光学顕微鏡が市販されているが、このエバネッセント光を利用した1分子イメージング法の開発に携わってこられたのが原田教授である。本講演では、1分子イメージングによるモータータンパク質キネシンが微小管に沿って動く



特別講演 原田慶恵 教授

様子や、RNA ポリメラーゼと lambda-phage DNA の相互作用、などの1分子の挙動の可視化について紹介された。また、DNA 複製・修復・組み換え機構の1分子レベルでの解明をめざした、DNA-タンパク質間、タンパク質-タンパク質間の相互作用の力学的測定についても紹介があった。最近は、共同研究を通じて、1分子イメージングの応用として温度感受性ポリマーを利用した細胞内の温度測定や、退色しない新規蛍光ナノ微粒子の開発も行われている。撮影法と標識法の両方の開発が進むことにより、1分子の動きを追跡するだけにとどまらず、pH や温度などの細胞内の微小環境の変化や分子の機能など、これまで得られなかった情報が得られるようになり、未知の世界が広がることが期待される。

薬学研究科 掛谷秀昭 教授からは、「創薬ケミカルバイオロジー」と題して、天然物化学を基軸としたケミカルバイオロジーの手法を用いた新規生理活性小分子の開拓に関する講演が行われた。微生物や薬用植物などの天然物から単離精製された化合物の構造解析を通して得られた生物活性物質の標的タンパク質や標的シグナルパスウェイを同定することにより、がんなどの多因子疾患の治療薬・予防薬となり得る分子標的薬の開発が可能となる。講演では、ストレプトミセス属放線菌が産生するトリプトペプチン A の立体配置の決定による新規 TGF- β シグナル伝達阻害剤への利用により、がんの発症や悪性化の抑制への可能性について紹介された。また、新薬開発に向けた、強力な抗酸化作用を有するショウガ科ウコンの主成分であるクルクミン類の効率的な合成経路確立や、血管新生阻害効果を有する糸状菌から産生されるエポキシキノール B の生合成経路の確立などの最近の知見についても紹介された。この様な、ケミカルバイオロジーとケミカルゲノミクスの両方からのアプローチは、強力な新薬候補となり得る「切れ味の鋭い生理活性小分子」の探索を大きく推進することが期待される。

立命館大学理工学部 野方 誠 准教授からは、「医用ロボティクスの薬学応用」と題し、体内を自由に動き治療や診断などの医療行為を行う小型ロボットの開発に向けた研究を紹介された。小型ロボットの治療や診断への利用は、外科処置による患者への負担軽減が期待できるが、これまで開発されてきた小型ロボットは、消化器官内での移動がほとんどであり、また、主な機能は画像撮影に限られていた。本講演では、体腔内の移動・回転などを、体外からの磁場により自在に操作することにより患部まで到達させ、さらに外部磁場を利用して診断・治療することを



掛谷秀昭 教授



野方 誠 准教授

目的とした小型体内ロボットの開発について紹介された。このロボットは、 $15 \times 30 \times 7$ (mm)の平らな楕円形の形状をしており、永久磁石ではなく磁性体と磁気式センサを搭載している。実際に、この小型ロボットをウサギの腹腔内に入れ、体外からのパルス磁場を操作することにより、最大 1cm 程度ずつ目的方向へ自由に移動させることが可能となった。現時点では、体腔内の移動の様子を撮影するため、映像を送るためのコードが接続されているが、将来的にはコードなしで移動させることが可能である。また、ロボットには2本の小さい腕がついており、この腕を外部磁場で動かすことにより、組織の採取、または薬物投与を制御することも可能である。

京都大学ウイルス研究所 加藤博己 准教授からは、「ウイルス感染時における自然免疫応答の誘導メカニズム」と題し、抗ウイルス自然免疫応答において I 型インターフェロンの産生を誘導する Toll 様受容体および RIG-I 様受容体に関する最新の知見が紹介された。細胞の表面には、ウイルスに特有の構造を有する RNA を認識する分子が発現しており、この認識を介して生体はウイルス感染を察知することが知られている。Toll 様受容体や RIG-I 様受容体は、ウイルス特有の二重鎖構造を持つ RNA との結合により I 型インターフェロンの産生を促してウイルスを撃退することが知られ、ここ 10 年ほどで急速に研究が進んできた。加藤准教授らは、RIG-I 様受容体の



加藤博己 准教授

のノックアウトマウスを用いた解析により、RIG-I 様受容体の中でも、RIG-I は短い二重鎖構造を持つ RNA を、MDA5 は長い二重鎖構造を持つ RNA を特異的に認識することを明らかにし、ウイルス由来の RNA の長さに応じて異なる RIG-I 様受容体が働くことを示した。また、一方で、ピーマンなど我々の身近にある食材にもウイルスと同様の RNA が含まれており、精製することで I 型インターフェロンを誘導可能な RNA が得られることを明らかにした。これら植物を摂取することで我々の体がウイルスに対する抵抗力を高めることが可能になるかもしれない。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点の清水一憲 特定助教からは、「低侵襲な *in vivo* 核酸デリバリーのためのマイクロマシン技術の応用」と題した研究成果が報告された。本研究拠点の立命館大学理工学部 小西研究室と京都大学大学院薬学研究科 橋田研究室の共同研究で、組織の目的部位に陰圧をかけることにより強力なメカニカルストレスを局所に与え、遺伝子を導入する方法が紹介された。清水助教はマウスに埋め込み可能な小型の吸引デバイスを作成し、直径 3 mm 程度の範囲にのみ陰圧をかけることが可能となった。マウスにプラスミド DNA を静脈内投与後、このデバイスを用いて肝臓、腎臓、脾臓、心臓の組織の局所にそれぞれ陰圧をかけると、その部位のみで遺伝子発現が認められた。また、肝臓では、ルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA とその発現を抑制する siRNA を同時に投与し、局所に陰圧をかけるとルシフェラーゼの発現が抑制されたことから、本法はオリゴヌクレオチド送達にも有効であることが示された。遺伝子導入キャリアを使わずに、組織の一部だけに遺伝子やオリゴオリゴヌクレオチドを導入可能な方法として応用が期待される。

樋口ゆり子 特定助教は、「生きたマウスの組織内における細胞挙動の可視化」と題して研究成果を報告した。近年、顕微鏡の開発が進み生きた細胞内の分子挙動を可視化する生細胞リアルタイムイメージングが可能になった。これを利用すれば、耳、皮膚、固形腫瘍などの一部の組織に関しては、生きたマウスの組織内を観察することが可能である。しかし、麻酔下でも呼吸など抑止できない臓器の動きの影響を受ける肺、肝臓、心臓、腸などに関しては、顕微鏡下でそのまま観察することは極めて困難である。そこで、小西研究室と共同で微弱な吸引で生きたマウスの組織をカバーガラスに固定するデバイスを開発し、生きたマウスの組織内における細胞挙動の蛍光リアルタイムイメージングを行った。蛍光色素を尾静脈内投与すると、血液中に蛍光シグナルが観察され、赤血球や白血球などの細胞が蛍光標識された細胞が非シグナル像として観察できた。また、蛍光標識した間葉系幹細胞を投与後、肝臓や腸を撮影すると個々の細胞が、ローリング、接着する様子が撮影でき、得られた画像から移動速度の算出も可能となった。蛍光標識抗体を投与することにより、内在性の標的細胞の挙動の可視化も可能である。

また、高橋清大 特定助教からは、「ウイルスセンサータンパク質 RIG-I の自己抑制ドメインの同定」と題し、RIG-I の活性化機構の解明を目的とした、RIG-I における活性化の鍵となる新領域の発見と構造解析によるアプローチによる解析に関して報告された。RIG-I はアミノ末端から CARD と呼ばれるドメイン、ヘリカーゼ様ドメイン、ウイルス RNA を特異的に結合するカルボキシ末端ドメインからなる。高橋助教らはホモロジー検索と、様々な変異体を用いて、ヘリカーゼ様ドメインとカルボキシ末端ドメインの間に、活性を抑制するドメインがあることを発見した。このドメインは RIG-I がウイルス感染に際してのみシグナル伝達を行うように活性を制御していることが明らかとなった。また、このドメインは α ヘリックスからなっており、ヘリックス構造を壊すような変異体を作成すると、抑制を失い、恒常的に I 型インターフェロンを誘導するようになった。この発見は、我々の体に人為的に I 型インターフェロンを誘導させることが可能であることを示した。

本研究拠点も設立以来 3 年を経過し、異分野融合研究もマイクロマシン技術と DDS 技術の融合など興味ある成果を生み出しつつある。今後のさらなる発展が期待される。



〒606-8501

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

京都市左京区吉田下阿達町 46-29

Tel: 075-753-9568

http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative_nanobio/index.html