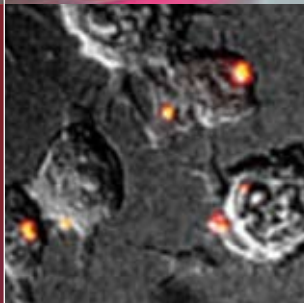




第3回 ナノバイオ創薬研究 シンポジウム



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

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)

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)

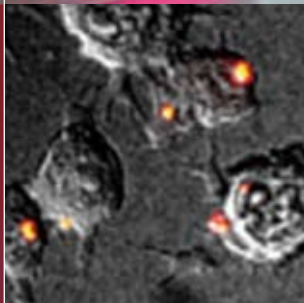
懇親会 17:30 ~ 19:00 (京都大学薬学研究科 オープンカンファレンス)

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機構



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3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。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点は、平成22年4月に、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、今年で3年目を迎えました。本拠点では、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、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、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、京都大学物質-細胞統合システム拠点(iCeMS)の原田慶恵先生に「1分子イメージング技術を使った生体分子機能解析」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特定助教から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)

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

我々の体はウイルス感染に際し、免疫機構を用いてウイルスの排除を行う。ウイルス感染現象は、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、生体によって発見される。その結果、細胞内シグナル伝達が行われ、抗ウイルス作用を持つサイトカインの一種である I 型インターフェロン (IFN) が誘導され、ウイルスの排除が開始される。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。RIG-I は通常は I 型 IFN を誘導しないよう活性を抑えており、ウイルス RNA がある場合にのみ結合し、構造変化することで CARD ドメインを露出する。その結果、CARD ドメインを介したシグナル伝達が行われ、I 型 IFN を誘導する。本研究では、この RIG-I の活性化機構の解明を目的としている。

本研究では、RIG-I 活性化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、その役割の解析を行った。これまでの研究では、RIG-I はカルボキシ末端に Regulatory Domain (RD) が存在し、この領域が RIG-I の下流へのシグナル伝達を抑制している事が報告されていた。この領域は CTD を含む、アミノ酸 735-925 の領域である。我々は各種変異体を用いて、この領域が CTD を含まないより小さいアミノ酸領域 747-801 に絞り込めることを明らかにし、自己抑制ドメインと名づけた。この自己抑制ドメインは、ヘリカーゼと CTD を結ぶリンカー領域であり、二次構造予測により ヘリックスで構成されていることが予測された。この領域に変異を加えヘリックス構造を壊した RIG-I は、細胞中でウイルス感染の刺激なしに I 型 IFN を誘導する。また、詳細な解析により、この変異体は、活性化体への構造変化に必要な ATP の加水分解を必要とせず、恒常的に CARD ドメインを露出する事で活性を持つことが示された。この結果から、リンカードメインが構造変化を抑制する事で、RIG-I は活性化を制御していることが明らかとなった。本報告では、最近公開された RIG-I の X 線結晶構造についても触れ、リンカードメインの働きについて考察を述べる。

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

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薬学研究科と立命館大学理工学部の連携による革新的創薬研究を推進している。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 (MEMS) 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、本拠点の橋田教授らにより *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)。我々の研究グループでは押圧法にマイクロマシン技術を応用する研究を進め、マウス体内埋め込み式押圧法用 MEMS システムの開発に成功した (4)。さらに臨床応用を視野に入れ、押圧法を基盤技術とする、低侵襲な *in vivo* 核酸デリバリーが可能となる新手法の開発を行った。本講演ではその最新の成果を紹介したい。

- (1) H. Mukai et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., vol.372, pp.383-387, 2008.
- (2) H. Mukai et al., Hum. Gene Ther., vol.20, pp.1157-1167, 2009.
- (3) H. Mukai et al., Biol. Pharm. Bull., vol.33, pp.1627-1632, 2010.
- (4) K. Shimizu et al., J. Control. Release, in press

生きたマウスの組織内における細胞挙動の可視化

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

間葉系幹細胞、ES 細胞や iPS 細胞など、細胞治療に用いることが可能な細胞の種類が増えると共に、治療可能な対象疾患も広がり、これまで治療困難であった難治性疾患の治療が可能になることが期待されている。近年、間葉系幹細胞を脳疾患や心疾患の患者に投与すると、症状の改善が認められることが報告されている。しかしながら、治療メカニズムは未だ不明な点が多く、効果的な治療法を開発するためには、投与した細胞の挙動を内在性の細胞と区別して評価できるシステムが必要である。我々は、幹細胞の体内挙動を追跡する方法として、生体内の細胞挙動を 1 個の細胞に対して可視化できる点において蛍光イメージングが有効であると考えている。

これまで、量子ドットや、transposon を用いた蛍光タンパク質のゲノム DNA への組み込みを利用した、マウス骨髄由来間葉系幹細胞の蛍光修飾について報告してきた。次に、我々は、蛍光修飾された間葉系幹細胞を用いて、生きたマウスの組織内における投与された細胞挙動の評価法の開発を行った。撮影技術の進展により、生きた細胞をリアルタイムで高速撮影する生細胞リアルタイムイメージングが可能になった。この技術を応用し、耳、脳、癌組織、脂肪組織など臓器運動の影響を受けない組織では、生きたマウスの組織内を比較的簡単に観察する事が可能であった。しかし、たとえ麻酔下であっても、呼吸、消化、などの生命維持に不可欠な臓器の運動は止めることはできず、これらの運動は顕微鏡での観察を困難にする。そこで、我々は、革新的ナノバイオ創薬研究拠点において、立命館大学 小西研究室と共同で、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、組織を固定する事が可能な、組織吸引固定デバイスを作成した。本デバイスは、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。さらに、吸引の on/off により組織の観察部位を非侵襲的に自由に何度でも変更することが可能である。我々は、このデバイスを利用し、生きたマウスの肝臓や腸におけるリポソームや間葉系幹細胞の挙動をリアルタイムに観察することに成功した。また、蛍光標識された抗体を用いることで、内在性の細胞である白血球の挙動の可視化も可能になった。さらに、血管内の血流を流れる速度や、血管内皮細胞上をローリングする速度の算出をすることができた。

本講演では、生きたマウスにおける分子や細胞の *in vivo* リアルタイムイメージングに関する最近の知見を紹介する。

MEMO

医用ロボティクスの薬学応用

立命館大学理工学部ロボティクス学科

准教授 野方 誠

体中を動きながら医療行為を行う様々な小形ロボットが提案・開発されているが、消化器官内での移動がほとんどであり、画像撮影に限られているのに対し、体腔内に体内ロボットを留置して体外から磁場によって自在に移動や回転させて患部まで到達させ、同じく外部磁場で診断治療することを目的として研究を進めている。

体内ロボットとして、生体内の移動方法やロボットの形状及び駆動システムの仕様を決定するための実験プロトタイプ（モデル1）と、それに基づき設計され生体内移動環境や内蔵カメラによる撮影状況を調査する臨床プロトタイプ（モデル2，図1）が製作した。モデル1は外径10[mm]のカプセル型であるのに対し、モデル2は15×30×7[mm]の平らな形状であるため、腹壁と臓器の間の移動に適している。両モデルとも撮影のためのCCD イメージセンサ（株式会社アールエフ）、磁力の発生のための磁性体、モデルの位置と姿勢を計測するための磁気式センサ（Microbird, Ascension 製）を内蔵している。永久磁石を搭載していないことを付け加えておく。映像の無線送信機能が搭載されていないため、現時点では有線接続されている。これら体内ロボットを腹腔内で移動させるための駆動コントロールシステムを図2に示す。磁場を発生する装置（マグネットフォース株式会社製の着磁電源を流用）は、ソレノイドと着磁電源で構成され、最大0.5 [T]のインパルス磁場を発生できる。印加した磁場及びモデルにかかる力は、測定試験より磁性体2[g]に最大で300[gf]である。さらに3 軸電動ステージ（シグマ光機製）を追加し指示した方向へ移動させる磁場ベクトルの位置にロボットが配置されるようにステージで被検体ごと移動し、パルス磁場を印加してロボットが体内を動く。この手順を繰り返すことで、図3のようにロボットを腹腔胸腔内の任意位置に進めることが可能である。

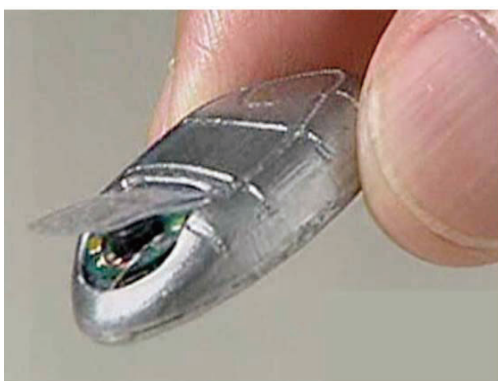


図1 試作された体内ロボット（モデル2）

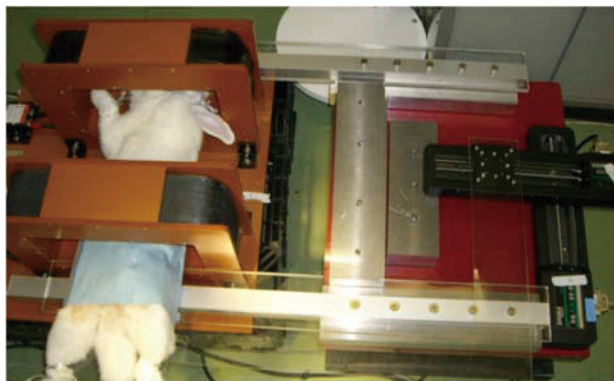


図2 体内ロボットの腹腔内移動システム

生体内の移動実験でモデル1の内蔵カメラにより撮影された画像を図4に、モデル2の腹腔内での様子を示すレントゲン写真に移動軌跡を重ねたものを図5に示す。モデルの位置やケーブルの形状、内蔵カメラの撮影画像より、腹壁に沿って肝臓や横隔膜付近まで移動したことを確認されている。特にモデル2は平らな形状にしたために、腹壁に沿って小腸との間をスムーズに通過することができている。ロボットの移動距離や移動速度は、1回の磁場印加で最大1[cm]程度の移動を確認した。しかしながら、進行方向正面にあった肝臓付近に引っかかりが見られることから、磁場の印加方向を3次元で正確に制御する必要性を感じる。移動実験と同時に臓器間の移動摩擦は計測の結果、40～120[μ N]であった。通過する経路により値は変動するが、いずれも発生磁力の最大値以下であった。現在、生体計測機能、薬液運搬機能を搭載したロボットを研究開発し、薬治療機能の実装を目指している。

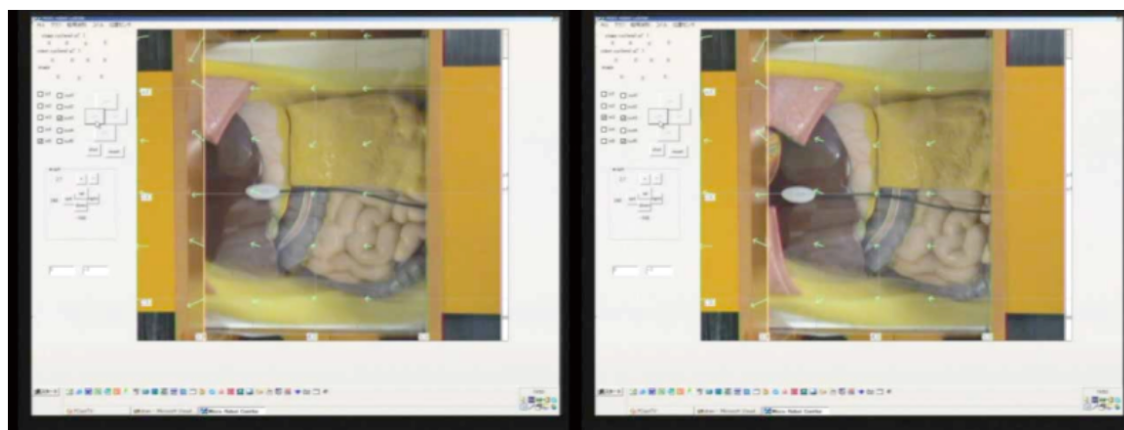


図3 ステージと磁場印加によるロボットの移動

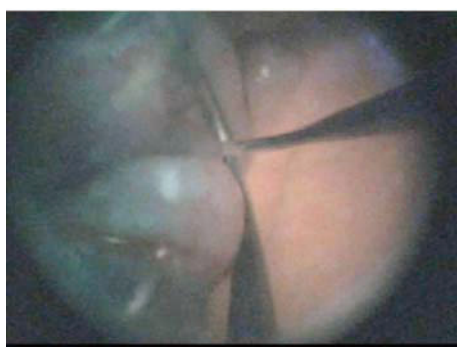


図4 体内ロボットのカメラからの映像

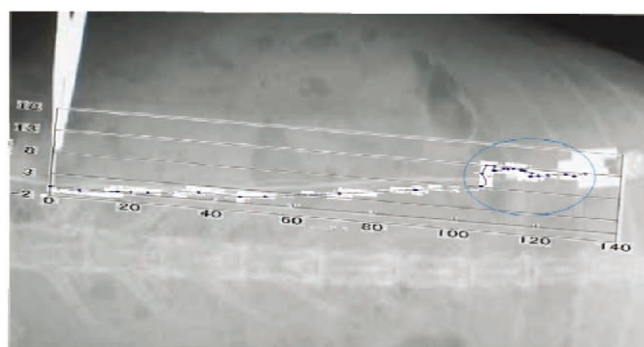


図5 腹腔内の体内ロボットとその移動軌跡 (X線)



野方 誠

立命館大学 理工学部 ロボティクス学科

准教授

博士（工学）（名古屋大学）

【略 歴】

- 1998 年 名古屋大学工学研究科 博士後期課程修了（マイクロシステム工学専攻）
- 1998 年 日本学術振興会未来開拓学術推進プロジェクト特別研究員
- 2001 年 名古屋大学助手
- 2002 年 立命館大学助教授
- 2007 年 立命館大学准教授 現在に至る
- 2007 年 スイス連邦工科大学ローザンヌ校（EPFL）客員教授
- 2009 年 京都大学大学院 連携准教授

【研究分野】

医用ロボティクス

【研究活動】

- 日本ロボット学会，日本機械学会，日本コンピュータ外科学会 評議員
- 日本ロボット学会論文賞（2000），日本コンピュータ外科学会論文賞（2011）

MEMO

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

京都大学ウイルス研究所
准教授 加藤 博己

哺乳動物においてウイルスが感染すると、まず自然免疫応答が惹起される。この自然免疫はウイルスの感染を早急に感知しその増殖を抑えるとともに、特異性や持続性の高い獲得免疫の活性化を誘導する。この抗ウイルス自然免疫応答において重要な役割を担うのが I 型インターフェロン(interferon: IFN)である。IFN はウイルス複製を *inetrfere* する因子として同定され、そのレセプターを介して感染細胞やその周囲の細胞にインターフェロン誘導性の抗ウイルス遺伝子群の発現を促すことが知られている。

最近、ウイルス核酸を認識し I 型インターフェロンの産生を誘導するウイルスセンサー分子として 2 つの受容体群が同定された。細胞外にてウイルス核酸を認識する Toll 様受容体(Toll-like receptors: TLRs)、および細胞内に侵入したウイルスの核酸を検知する RIG-I 様受容体(RIG-I like receptors: RLRs)である。

本講演では、これら 2 つのウイルス認識機構が、生体内においてどのように抗ウイルス IFN 応答を惹起するかに関して概説するとともに、特に RLRs に関する最近の知見を紹介したい。



加藤 博己
京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学分野
准教授
医学博士（大阪大学）

【略 歴】

平成 15 年	東京大学農学部卒業
平成 20 年	大阪大学大学院医学研究科 博士課程修了
平成 20～22 年	マサチューセッツ医科大学 研究員 （学振研究員）
平成 22 年	京都大学ウイルス研究所 准教授 現在に至る

【研究分野】

自然免疫学、ウイルス学

創薬ケミカルバイオロジー

京都大学大学院薬学研究科

教授 掛谷 秀昭

近年、ゲノム科学の勃興を契機に様々なアプローチによって、がんをはじめとした様々な多因子疾患の治療薬・予防薬の開発のための分子標的探索が行われているが、切れ味の鋭い生物活性物質（生物活性小分子）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は、創薬標的を見出すことにも繋がる。この方法論は、生物活性物質のケミカルバイオロジー研究の機軸の1つであり、微生物や薬用植物などの天然資源は、合成化合物と並んで、生物活性物質探索研究のための重要な資源である。これまでに、免疫抑制剤 FK506(タクロリムス)や抗がん剤タキソール(パクリタキセル)などをはじめとしたブロックバスター的な生物活性物質は人類の福祉に貢献してきたのみならず、学際領域であるケミカルバイオロジーの発展にも大きく貢献している。

我々の研究グループでは、微生物代謝産物、漢方・薬用植物、海洋無脊椎動物、機能性食品などを探索資源とした“ものとり研究（単離精製・構造解析研究）”と“ものづくり研究（合成研究・代謝工学研究）”を基盤とし、創薬を指向した“創薬ケミカルバイオロジー”研究を展開し、創薬科学分野に貢献することを目指している。これらの研究・方法論は、本プロジェクト「革新的ナノバイオ創薬研究」の課題でもあるがんなどの難治性多因子疾患の克服にも大いに貢献することを期待している。

本シンポジウムにおいては、がんの発症・悪性化などと深い関連がある TGF- β (transforming growth factor- β) によって活性化される細胞内情報伝達系、ならびに血管新生過程に関連する細胞内情報伝達系を阻害する生物活性物質に関する最近の成果などを中心に紹介する。



掛谷 秀昭

京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学専攻

システムケモセラピー（制御分子学）分野

教授

博士（工学）（慶應義塾大学）

【略 歴】

平成元年 慶應義塾大学理工学部化学科卒業
平成 6 年 慶應義塾大学大学院理工学研究科 生体医工学専攻 博士課程修了
平成 6 年 理化学研究所 抗生物質研究室・研究員
平成 10 年 マサチューセッツ工科大学・客員研究員
平成 15 年 理化学研究所 抗生物質研究室・副主任研究員，
ケミカルバイオロジー研究推進グループ チームリーダー（兼任）
平成 19 年 京都大学大学院薬学研究科・教授 現在に至る

【研究分野】

ケミカルバイオロジー，天然物化学，メディシナルケミストリー

【研究活動】

日本薬学会・代議員，日本薬学会近畿支部・幹事，日本薬学会生薬天然物部会・常任世話人，日本生薬学会・幹事，日本がん分子標的治療学会・評議員，日本ケミカルバイオロジー学会・世話人

Editorial Board (Chem. Pharm. Bull., Biol. Pharm. Bull.)

Editorial Board (Oncol. Res.)

がん分子標的治療研究会・奨励賞(1999)，日本農芸化学奨励賞(2002)，

住木・梅澤記念賞(2006)

1 分子イメージング技術を使った生体分子機能解析

京都大学物質-細胞統合システム拠点

教授 原田 慶恵

個々の生体分子がどのようなメカニズムで機能しているのか、また、それらが生体内でどのような時間的、空間的秩序で機能しているのかを明らかにすることが生命現象の理解には重要である。最も直接的なアプローチは、生体分子が機能している様子を実際に観察する方法である。水溶液中で機能する生体分子の観察には一般的には光学顕微鏡が使われる。しかし、可視光を用いる光学顕微鏡の空間分解能は数百ナノメートルなので、大きさがわずか数ナノメートルから数十ナノメートル程度しかない生体分子を直接見ることはできない。そこで、我々は見たい分子に様々な目印をつけて、それを手がかりに分子の働く様子を観察している。目印は大きく分類して2種類ある。1つは光学顕微鏡で簡単に観察できる大きな目印（たとえば直径1マイクロメートルのプラスチックビーズ）を結合して観察する方法である。大きな目印は観察が容易であることや、小さな動きを増幅させて見ることが出来る利点がある。また、見るだけではなく、光ピンセットという方法を使ってビーズを捕まえることで、分子を好きな場所に移動させることや、タンパク質分子のナノメートルの動きを計測したり、タンパク質分子が出すピコニュートンの力を測定することができる。しかし、大きな目印はタンパク質分子の機能を阻害する可能性があることや、見ている現象が1分子のタンパク質分子によるものであるかを証明することが難しいなどの難点がある。もう一つの方法は蛍光色素分子や蛍光性の粒子など、光る目印を結合させて観察する方法である。17年前に我々は、背景光を劇的に減少させるエバネッセント照明を組み込んだ蛍光顕微鏡と高感度カメラを使って、水溶液中の個々の蛍光色素分子の可視化に初めて成功した。我々はこれらの方法を使って、これまでに1分子酵素反応の観察や個々のタンパク質分子の動きの観察などをはじめ、様々な1分子イメージング実験を行ってきた。現在では、各顕微鏡会社からエバネッセント照明を組み込んだ1分子イメージング蛍光顕微鏡が市販されており、比較的容易に蛍光1分子観察ができるようになってきている。また、高感度カメラの性能の飛躍的な向上によって、速い動きをきれいな像として観察できるようになってきた。本講演では、1分子イメージングや1分子操作の技術について簡単に説明するとともに、大きな目印や光る目印を使って我々がこれまでに行ったいくつかの実験について紹介する。さらに、現在開発中の新しい技術についても簡単紹介する予定である。



原田 慶恵
京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点
教授
工学博士（大阪大学）

【略 歴】

昭和 57 年	茨城大学理学部卒業
昭和 63 年	大阪大学大学院基礎工学研究科 博士課程修了
昭和 63 年	日本学術振興会特別研究員
平成 2 年	大阪大学基礎工学部教務職員
平成 4 年	新技術事業団柳田生体運動子プロジェクト研究員
平成 10 年	慶應義塾大学理工学部専任講師
平成 12 年	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員
平成 20 年	京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点 教授 現在に至る

【研究分野】

生物物理学

【研究活動】

日本生物物理学会 副会長、日本学術会議連携会員
井上研究奨励賞受賞（1991）、第 1 回大学婦人協会守田科学研究奨励賞受賞（1999）

発行：平成 24 年 3 月 14 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