

enough to confine the Cd and Se atoms in the fixed space and site, and then the structure of CdSe QDs was maintained well. Furthermore, even the photostability of silica encapsulated CdSe QDs was stronger than that of the organic dye (Rhodamine 560) as the PL intensity of Rhodamine 560 gradually decreased under illuminating. This has also been confirmed for ZnS coated CdSe QDs [13].

4. Conclusions

Silica shell has produced around CdSe cores by a slow deposition of silica solute while being transferred to ethanol in the presence of MPS. The successful passivation of the surface states of colloidal CdSe QDs has been confirmed from the photo-oxidation and -illumination experiments and the TEM images. Moreover, the promotion of the photoluminescence intensity has been observed after passivating the CdSe cores.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge Welfare Department of Japanese government for its support in research fund.

References

- [1] D.L. Klein, R. Roth, A.K.L. Lim, A.P. Alivisatos, P.L. McEuen, *Nature* 389 (1997) 699.
- [2] A. Henglein, *Chem. Rev.* 89 (1989) 1861.
- [3] W.L. Wilson, P.F. Szajowski, L.E. Brus, *Science* 262 (1993) 1242.
- [4] P. Mulvaney, L.M. Liz-Marzán, M. Giersig, T. Ung, *J. Mater. Chem.* 10 (2000) 1259.
- [5] L.M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* 12 (1996) 4329.
- [6] T. Li, J. Moon, A.A. Morrone, J.J. Mecholsky, D.R. Talham, J.H. Adair, *Langmuir* 15 (1999) 4328.
- [7] M.A. Correa-Duarte, M. Giersig, L.M. Liz-Marzán, *Chem. Phys. Lett.* 286 (1998) 497.
- [8] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 8706.
- [9] J.E.B. Katari, V.L. Colvin, A.P. Alivisatos, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 4109.
- [10] S. Gorer, G. Hodes, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 5338.
- [11] E. Lifshitz, I. Dag, I. Litvin, G. Hodes, S. Gorer, R. Reisfeld, M. Zelner, H. Miuti, *Chem. Phys. Lett.* 288 (1998) 188.
- [12] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Science* 281 (1998) 2013.
- [13] W.C.W. Chan, S. Nie, *Science* 281 (1998) 2016.
- [14] X. Peng, M.C. Schlamp, A.V. Kadanich, A.P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 7019.
- [15] S. Liu, H. Guo, Z. Zhang, R. Li, W. Chen, Z. Wang, *Phys. E* 8 (2000) 174.
- [16] B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F.V. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F. Jensen, M.G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 9463.
- [17] L. Xu, K. Chen, J. Zhu, H. Chen, H. Huang, J. Xu, X. Huang, *Superlattice Microstruct.* 29 (2001) 67.
- [18] S.K. Bera, S. Chaudhuri, R.P. Gupta, A.K. Pal, *Thin Solid Films* 382 (2001) 86.
- [19] R.M. Langford, M.J. Lee, S.W. Wright, C.P. Judge, R.J. Chater, T.J. Tate, *J. Electr. Mater.* 30 (2001) 925.
- [20] H. Karl, W. Hipp, I. Großhans, B. Stritzker, *Mater. Sci. Eng. C* 19 (2002) 55.
- [21] Y. Ma, M. Li, H.M. El-hair, Y. Zhang, L. Xu, X. Huang, K. Chen, *Phys. E* 15 (2002) 48–52.
- [22] A.L. Rogach, D. Nagesha, J.W. Ostrander, M. Giersig, N.A. Kotov, *Chem. Mater.* 12 (2000) 2676.
- [23] T. Dannhauser, M. O'Neil, K. Johansson, D. Whitten, G. McLendon, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 6074.
- [24] M. Gao, S. Kirstein, H. Möhwald, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 8360.
- [25] D.V. Talapin, A.L. Rogach, I. Mekis, S. Haubold, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, *Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects* 202 (2002) 145.
- [26] P. Reiss, S. Carayon, J. Bleuse, A. Pron, *Synth. Met.* 139 (2003) 649.
- [27] L. Spanhel, M. Haase, H. Weller, A. Henglein, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5649.

別冊・医学のあゆみ

乳腺疾患

— state of arts

<http://www.ishiyaku.co.jp/>

●編集

伊藤 良則 (癌研究会附属病院 化学療法科)

戸井 雅和 (東京都立駒込病院 外科, 臨床試験科)



医歯薬出版株式会社

MRIによる乳癌診断 および臨床利用

MRI for breast cancer diagnosis and clinical application

Key Sentence

- ① MRIは整形外科領域や脳神経外科領域において診断法の地位を確立している。
- ② 乳癌外科領域においても癌診断、病巣の広がり診断の有用性が認められつつある。

MRIが登場してから20年以上が過ぎた。当初は診断に耐えうる精細な画像を得ることが難しかったが、高磁場装置、新たな撮像・画像処理法などの登場により著しく進歩し、1つの画像検査法としての地位を確立したといえる。MRIの特徴は、優れた組織コントラスト、および任意の方向から撮像可能なことにあり、その特徴を生かした検査対象および使用方法が定まってきた感がある。

MRIは、乳腺腫瘍の有無、良悪性の鑑別および乳癌病巣の広がり診断において、その有用性が指摘されている。特に任意の方向からの撮像は病巣の広がり診断に有益である。断層画像撮影できる装置として他にX線CTがある。近年の三次元再構築技術の進歩によりMRI同様広がり診断が可能となってきたが、取得パラメータや造影剤の組織移行性の違いから診断特性にはそれぞれ特色がある。

乳房温存療法における局初再発は切除断端に近接するEIC (extended intra-ductal component) の存在や切除断端の有無が有意な要素とされ、再発の抑制には手術時の十分な断端コントロールが必要である^{1,2)}。したがって、乳房温存手術に際し、術前の病巣広がり評価がきわめて重要である。近年、術前にX線CTやMRIによる乳癌の病巣広がり評価が行われ、乳房温存療法に活用されつつある。

本稿ではMRIによる乳癌病巣評価において有用性の評価が定まりつつある撮像法について解説したい。

Ⅲ 乳腺MRIのパラメータ、撮像法

乳房MRI撮像でより高いコントラストを得るための装置の工夫として乳房専用の表面コイルを用いる撮像があげられる。われわれは表面コイルを用いて乳房

全体を撮像するために腹臥位で撮像しているが、仰臥位でも撮像可能である。この場合は良好に描出できる範囲はやや限定されるものの、手術時の姿勢により近い体勢での病巣分布像の取得が可能となる。

MRIのパラメータは基本的にT1強調画像およびT2強調画像であるが、近年脂肪抑制撮像法などが考案され、特に脂肪と腫瘍性病変とのコントラストが付きやすくなった。また、高分解能撮像、全乳房または両側乳房を含めての大容量撮像、そして脂肪抑制のような撮像方法によって小病変や多中心性病変検出の感度を向上させることが可能である。しかし、これらの方法は撮像に時間がかかることが欠点である。

通常、腫瘍検出には造影剤を用いる方法が行われる。つまりMRIによる腫瘍の良悪性鑑別診断を血管新生の大小、言い換えれば血流の多寡および造影剤の組織移行性の大小の区別で行う。一般に乳癌は血流が豊富であるため造影早期からよく描出され、特にほぼ全ての浸潤癌が造影効果を示す³⁻⁵⁾。良性腫瘍は相対的に血流に乏しいため造影効果が小さい。しかし、良性病変にも造影剤によって強い増強効果を示すものがあり、その場合、擬陽性となりやすい。MRIによる悪性診断の特異度は37～97%とやや低いことが報告されている^{3,6-9)}。しかし、MRIの計測法に工夫を加えることで特異度は改善可能である。後述するが、造影剤を用いた造影効果の経時変化を観察することで良悪性の判別を行う。

なお、マンモグラフィ、X線CTによって検出可能な石灰化はMRIでは完全に無信号であるためこういった部分については検出できない。腫瘍組織部分のみ検出可能である。

Ⅳ 乳腺における診断

1. 腫瘍性病変の検出

先にも述べたように腫瘍性病変は主に造影剤を用いた撮像で質的診断がなされる。腫瘍性病変は一般に造影剤による造影効果が得られ、良悪性鑑別のため、通常は造影剤を投与した後、1分以内間隔をあけて2回スキャンし、造影効果の経時変化を比較する。一般に悪性病変は血管の分布が豊富であり、造影剤投与後1回目の撮像から強く造影されることが多いが、良性病変は血流が相対的に小さいことから、造影効果が得られるまでの時間が悪性病変に比べて長い傾向があり、2回目の撮像で造影効果がよりはっきりすることが多い。その際、撮像時間間隔制限のため画像の空間分解能はやや犠牲となる。

2. 乳癌病巣の広がり

MRIによる乳癌原発病変の描出はGd-DTPAを用いた造影効果によって得られる。わが国の乳癌診療ガイドラインによれば、MRIによる乳癌原発病変の広

武田元博, 大内憲明 / 東北大学大学院医学系研究科 外科
病態学講座 腫瘍外科学分野

Motohiro TAKEDA and Noriaki ORUCHI

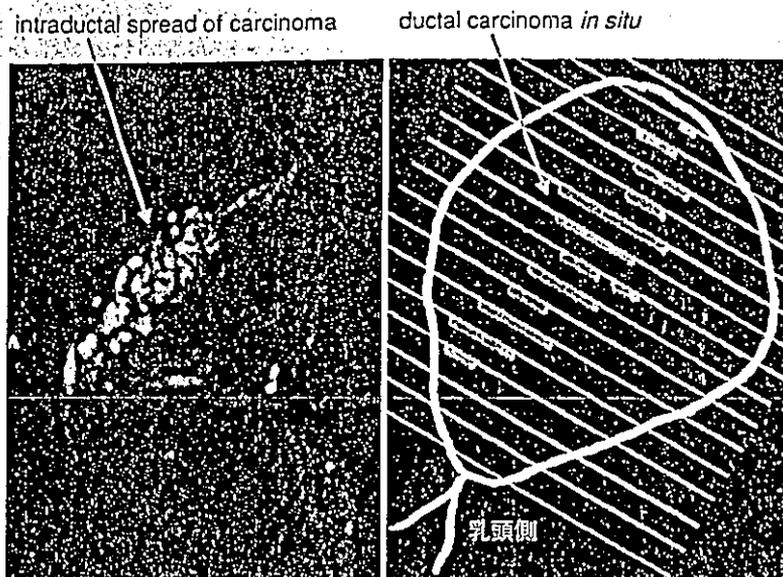


図1 MRIで広がり診断が正確に行われた症例

がり診断は推奨レベルCにとどまっている¹⁰⁾。その理由として一般に有用性はある程度認められているものの、画像診断そのものがRCTに向いていないためエビデンスの高い臨床研究が行われていないことがあげられる。

乳房温存手術は乳癌の外科的治療法として既に定着している。1999年に日本乳癌学会・学術委員会ガイドライン作成小委員会が定めた乳房温存療法ガイドラインでは腫瘍径3 cm以下が乳房温存手術の適応となる。しかし、近年、X線CTおよびMRIなど、画像診断技術の進歩とそれらを利用した広がり診断により、外科手術における断端のコントロールが容易になってきた。実際、著者らの施設でもMRIの導入によってそれまで断端の陽性率が20%近くあったものを10%台に低下させることができた。最近ではX線CTの導入によってさらに断端陽性率が低下し、10%前後となった。そのため、最近、著者らはこの基準にこだわらず、X線CT、MRIなどで腫瘍の広がりが限定されていると判断でき、患者が希望すればT3症例でも乳房温存手術を行ってよいと考えている。

図1は著者らが撮像した乳癌病巣のMRI像と実際の手術で得られた標本の5 mmごとのスライスから再構成した病巣マッピングとの対比である。DCIS症例であったが、良好に病巣の広がりが検出されている。一般にMRIの乳癌の広がり検出感度は95～100%と高い⁵⁾が、その中で乳管内進展に関しては検出感度が低い。著者らの自験例では高度乳管内進展の検出感度は70%程度にとどまる。MRI上腫瘍の広がりが限局すると思われた症例でも術中迅速病理診断や永久標本の病理診断において断端陽性となる場合があるが、その多くは乳管内進展によるものである。そのような

症例の乳管内進展病巣は組織学的悪性度の低いものが比較的多い。それらの病変が描出されにくい原因として、乳管内病変は血管新生が乏しいため造影効果が得られにくいことが考えられる。

おわりに

MRIを用いた乳癌診断は下記の事項を守って行うことで高い病変検出率を得ることが可能であり、温存手術の際、正確な広がり診断に有用と考える。

- ①高い信号強度を保ち、十分な空間分解能を得るために表面コイルを使用する。
- ②Gd等の造影剤は腫瘍検出感度を上げるために使用する。
- ③乳腺腫瘍の良悪性鑑別のため、画像は血管新生増強に基づいた早期の選択造影効果を得るべく造影剤投与後数分以内に撮像しなければならない。

なお、乳癌検診へのMRIの導入はcost benefitの点から推奨されない。今後、エビデンスレベルの向上につながる臨床研究が期待される。

謝辞：MRI画像を提供して下さった石田孝宣先生（東北大学・腫瘍外科）に深謝します。

文献

- 1) Amano, G. et al. : *Breast Cancer Res. Treat.*, 60(1) : 43-55, 2000.
- 2) Park, C.C. et al. : *J. Clin. Oncol.*, 18(8) : 1668-1675, 2000.
- 3) Rahbar, G. et al. : *Radiology*, 213(3) : 889-894, 1999.
- 4) Orel, S.G. et al. : *Radiology*, 190(2) : 485-493, 1994.
- 5) Esserman, L. et al. : *J. Clin. Oncol.*, 17(1) : 110-119,

- 1999.
- 6) Gribbestad, I.S. : *Acta Oncol.*, 31(8) : 833-842, 1992.
 - 7) Flickinger, F.W. : *Magn. Reson. Imaging*, 11(5) : 617-620, 1993.
 - 8) Rubens, D. : *Am. J. Roentgenol.*, 157(2) : 267-270, 1991.
 - 9) Boetes, C. : *Radiology*, 193(3) : 777-781, 1994.
 - 10) 高嶋成光・他 : 科学的根拠に基づく乳がん診療ガイドライン作成に関する研究. 平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金医療技術評価総合研究事業 (H14-医療-064) 研究報告書, 2003, pp.66-68.

* * *

クラスター利用ナノ医療

Nanomedicine Utilizing Clustered-based Materials

大内 憲明¹・武田 元博¹・川添 良幸²・佐竹 正延³・粕谷 厚生⁴
Noriaki Ohuchi¹, Motohiro Takeda¹, Yoshiyuki Kawazoe²,
Masanobu Satake³ and Atsuo Kasuya⁴

Mass production of size-selected stable nanostructures and their aggregates or modifications is an important milestone in the development of future medical devices.

Nanomedicine is an application of nanotechnology to the diagnosis and treatment of disease in the human body. This discipline is in its infancy. It has the potential to change medical science dramatically in the 21st century. In this review we describe areas of the research related to clustered-based materials for future medical applications. We also discuss the future innovation in cancer imaging by synthesizing novel diagnostic agents with nanoparticles, which may serve as fundamentally new materials controllable for medical purposes.

1. はじめに

ナノテクノロジーという用語が一般化したのは、2000年1月に当時のクリントン米国大統領が将来の重要技術を確認するため、ホワイトハウスでNational Nanotechnology Initiativeを発表したことに始まる。そこでの重要なポイントは、現在のサブミクロンに達したシリコン技術には近々その終焉が来る、そのため、従来のサイズを小さくしていく技術ではなく、原子・分子の特性を基礎としてその組合せによって、指先に乗るチップ中に図書館全体の所蔵物を書き込めるような超高密度デバイスなどを実現しなければならない、ということである。ナノテクノロジーは、このようにいまだ実現していないナノメートルレベルの物質を扱う、将来とも飛躍的に発展するであろう高度情報化社会に対応していくための技術である。そのため、現状より多少改良しただけの「偽物のナノテクノロジー」が横行するようになったことは憂うべき実態である。そこでは、従来のバルク物質の性質以上のものは期待できない。

一方、「本物のナノテクノロジー」は、1ナノメートルの大きさの物質を基礎とする。フラーレンやナノチュー

ブは実にその大きさをしている。多くの分子のサイズも同様である。この大きさの物質になると、電子1個ずつが明らかに現れる量子力学効果が重要になり、従来の技術とは質的に異なる有用な物性を実現できる可能性がある。

2. クラスターに対する第一原理計算

実験以前に新物質の構造と物性を予言することを可能とするのが、第一原理計算である。そこでは、クーロン相互作用する電子と原子核からなる多体系に対する量子力学の方程式を数値的に解くことにより、経験に基づくパラメーターを一切使わずに「計算機の中で」新物質を合成できる。特にナノメートルサイズの原子集合体であるクラスターに関しては、この方法はきわめて強力である。すなわち、数十原子からなるクラスターに関しては、標準理論である局所密度近似を適用して現在のスーパーコンピュータの能力を最大限に活用すれば、その構造を完全に予言することができる。また、基底状態の電子状態からは磁性、励起状態の計算からは発光波長などが予測できる。

¹ 東北大学大学院医学系研究科外科病態学講座
(〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1)

¹ Graduate School of Medicine, Tohoku University
1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574

² 東北大学金属材料研究所

² Institute for Materials Research, Tohoku University

³ 東北大学加齢医学研究所

³ Institute for Differentiation, Aging and Cancer, Tohoku University

⁴ 東北大学学際科学研究センター

⁴ Center for Interdisciplinary Research, Tohoku University

Received 4 April, 2003

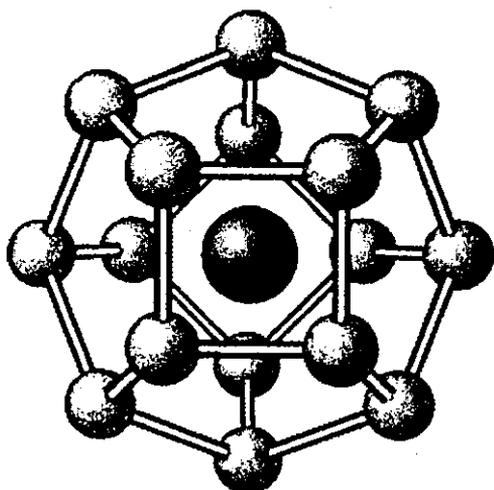


図1 シリコンフラレン Silicon Fullerene 中央にチタンTiを内包する

われわれは、2元系クラスターを対象としたコンビナトリアル計算機実験を多数行い、その中で、金属原子を内包した十数個のシリコン原子からなるクラスターがきわめて対称性の良い構造を取ることを理論的に予言した^{1,2)}。図1に示すこのクラスターは、その対称性からシリコンフラレンと呼ばれるようになった。その後、中嶋・茅グループによる実験的な確認も行われた³⁾。今後は、それらを基盤として種々の物質との組合せを行うことにより一層好ましい物性を有する新物質を創製できるものと期待されている。このクラスターには、エネルギー的に安定なものが存在することが理論的に予測されているので、大量合成が可能ならずである。特に、可視光を発する物質が予言されており、さまざまな光学応用が考えられる。また、これらのクラスターは、炭素の作るフラレンやナノチューブとは異なって容易に結合するため、種々の新構造体を構築することが可能であるというより一層の自由度を有している新物質である。

3. クラスター利用ナノ医療

ナノテクノロジーは従来の機械製造技術の延長であるミクロンオーダーのマイクロマシンと呼ばれるような装置製造技術と異なり、分子レベルの制御技術であり、この技術によってできた機能性パーティクル、もしくは装置は、特に医療分野において従来不可能とされ、未来の夢として考えられてきたことを現実のものとする可能性を秘めている。新たな構造の分子は特異な構造と機能を併せ持つことが多く、クラスターを利用するナノ医療の実用化に向けた検討が始まっている。

クラスターは元来、さまざまな結合力によって形成された複数の原子や分子の集合体を意味する。結合する原子や分子の種類によりファンデルワールス、金属、およ

び無機化合物クラスターに分類され、さらに構造により層状化合物の層間に分子が取り込まれた積層型クラスター、3次元結晶格子中に分子が取り込まれた包接型クラスターなどに分類される。ナノテクノロジーはこれらのクラスター構造を積極的に制御することによって目的とする機能を獲得する。特に1980年代から1990年代に発見されたフラレンネットワークは籠状、円筒状または円錐状ときわめて特異な構造を持つことから、医療を始めとして多岐にわたる応用が大きく期待されている^{4,5)}。

一方、遷移元素の組合せによる半導体ナノクラスターには蛍光特性を示すものがあり、これらはQuantum Dots (QD) と呼ばれ、近年新たな蛍光マーカーとして脚光を浴びている。そしてQDを用いて多くの応用方法が検討されはじめており、すでに一部実用化に向けた具体的検討がなされ始めている⁶⁾。

医療は診断と治療に大別される。診断はさらに体内診断と体外診断に分けられる。ナノテクノロジー臨床応用の多くは実験と臨床試験の容易さから体外診断から先に研究が進められている。したがって現在の研究成果のほとんどが遺伝子診断のマーカーを始めとした体外診断である。しかしナノテクノロジーの成果とその恩恵はもちろんそのような狭い範囲にとどまることなく、疾患の体内診断というに及ばず、根本的な治療にも及ぶことが期待される。

ナノテクノロジーの発展とその応用は世界的に見てもまだ端緒についたばかりであり、特に医療への応用は今後、安全性の確保とともにさらに大きく進歩し、ゲノム科学の研究がそうであるように、ナノテクノロジー科学を診断・治療に生かす手段として医学における主要な研究分野となり、かつ大きな産業分野に成長することは疑う余地がない。

本稿では現在、世界で取り組まれているナノクラスターを中心としたナノパーティクルの医療応用とわれわれが現在取り組んでいるナノパーティクル創造とその医療応用への試みについて述べる。

3.1 フラレンネットワークの作製と利用

3.1.1 カーボンフラレン

カーボンクラスターの1種である、カーボンフラレンネットワークのとり構造としては、これまでC₆₀、C₇₀のサッカーボール構造と、ネットワークが円筒あるいは円錐状になった角状構造の2種類が知られていて、C₆₀、C₇₀は1985年にKrotoとSmalley⁴⁾、カーボンナノチューブは1991年にIijima⁵⁾らによって発見された。Krotoらは発見時にさまざまな原子の内包化により多様な応用が期待できること、実際に酸素原子やランタン原子が内包できることについて述べているが、事実それらの特異な構造はその後、金属原子を内包できることが証明されてきた⁷⁾。そしてそれらの結果を基に新たな応用を視野に入れた研究が急速に展開されつつある。

現在、C60 および C70 はインターネットを通じて販売されており、応用研究が広がる下地が整ってきた。医療応用の検討はまだ始まったばかりであるが、フラーレン利用の第1歩としてフラーレンをコーティングしたボーリングボールが作製されている。今後の応用がもっとも期待されるナノクラスターの1つである。

3.1.2 カーボンナノチューブ

1991年Iijimaらによって発見された⁵⁾。単層もしくは多層のグラファイトネットワークである。現在、原子間力顕微鏡の先端チップに利用され、その性能を飛躍的に向上させた。その分解能はいまや数nmに達している。カーボンナノチューブも今後、ナノエレクトロニクスを始めとした医療応用が期待されるナノクラスターの1つである。

3.1.3 シリコンフラーレン

シリコンフラーレンは単体で存在することはできず、金属を内包する状態で存在する。シリコンには、十量体以上で対称性のよいクラスターは存在しないとされてきた。2章でも述べられたように、2001年に第一原理に基づいてスーパーコンピュータを用いて行った計算によって、金属原子を内包させると、フラーレン型のきわめて対称性のよいクラスターが精製できることがKumar, Kawazoeらによって理論的に初めて示された^{1,2)} (図1)。そして2002年には早くもその存在が実験的にOhara, Nakajimaらによって実証された³⁾。カーボンフラーレン同様、安定なケージ構造を取っていることから人体においても安定と考えられ、今後の幅広い応用が期待される。

3.2 半導体量子ドットの作製と利用：CdSe (カドミウム・セレンアイド)

現在もっとも多く作られている半導体クラスターの1つで、従来の蛍光色素にない3つの優れた蛍光特性をもつ⁷⁾ (図2)。第1に、従来の蛍光色素が特定波長の光エネルギーを吸収して励起され、特定波長の蛍光を放出するのに比べてQDはある一定以上の光エネルギーはすべて吸収した上で励起状態になり、基底状態に戻る時は単一波長の蛍光のみ発するのである。そのため容易に励起され、その効率は従来の蛍光色素の20~30倍に達する。第2に、材料が無機物であることから有機系の蛍光色素に比べてきわめて高い耐光性を有することである。したがって繰り返しての励起光照射に耐えうることからより広い範囲の応用が考えられる。第3に、同じ材料でも粒径を変えるだけで蛍光波長を自在に変化させることが可能である(図3)。したがって蛍光波長の異なる粒子を簡単に作るができる。すでにQuantum Dot社 (<http://www.qdots.com>) からQuantum Dot (QD) が製品化され、今年からインターネットを通じて販売されている。今後、さまざまな角度からの応用が期待されている。

応用例を以下にあげる。

1) Avidin-conjugated QD

AvidinでコーティングしたQDにbiotin化したHER2抗体を結合させ、腫瘍細胞の認識に用いる。HER2抗体trastuzumabは乳癌細胞表面に発現することの多いHER2タンパクに対する抗腫瘍抗体である。実際にWuらは*in vitro*ではあるが、乳癌培養細胞表面に特的に発現する抗原HER2蛋白にたいするモノクローナル抗体trastuzumabをQDでラベルして認識することに成功している⁸⁾。

2) DNA 特定領域標識QDを用いた遺伝子診断

DNAの特定領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の標識QDを用いて、効率の高い遺伝子診断に利用する。

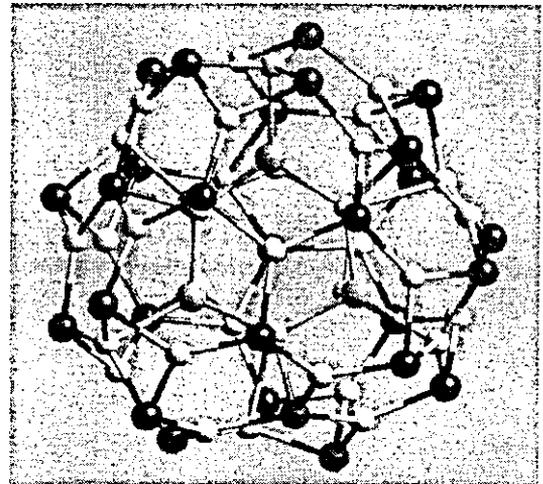


図2 カドミウムセレンアイドのクラスター構造
II-VI族半導体 (直径1.5 nm)、溶液法で作製

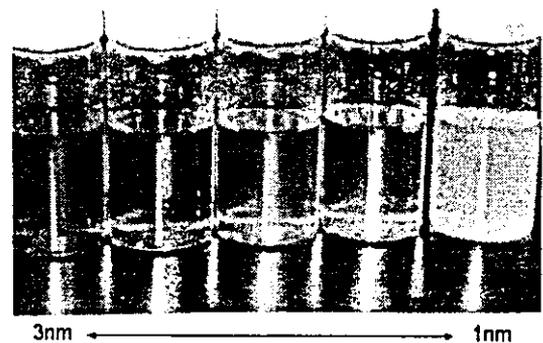


図3 カドミウムセレンアイド(CdSe)のクラスターの粒径の違いによる波長変化

3.3 ナノ磁性ビーズの作製と利用

元々はナノサイズ磁性ビーズにアビジンコーティングしたものを細胞の分別に用いるものとして、1970年代後半から研究が始まり、1993年ころからMACS (Magnetic Cell Sorting) Beadsが市販されている。これは初めにアビジンコーティングした磁性を帯びた直径約50 nmのナノサイズビーズにビオチン結合モノクローナル抗体を結合させた試薬を作製する。マーキングした抗原を標的細胞の表面抗原に結合させ、磁気かけた細い流路を通して目的の細胞を分取する方法またはマーキングしていないほうを分取するのが原法の利用法である。

最近では体外診断にとどまらず、生体内のマーキングに磁性ビーズを用いる応用法が考案され、実用に向けた研究が進められている。すなわち病変部の抗原(疾患に特異的な細胞表面膜タンパク等)を認識する抗体に磁性粒子を結合させ、高感度な装置(SQUID等)を用いて認識する方法である。この方法によれば、高感度な装置を要するものの、有害な蛍光マーカー、重金属等を使用することなく検査可能である。

3.4 その他コーティングビーズの作製と利用

コーティングビーズはセンシングマテリアルとコーティングマテリアルの選択によって無限の組合せ、応用範囲が考えられ、現在もっとも容易に研究を進めることのできるテーマといえる。化学的に安定であることが要求される材料としてはガラス、シリカ、金等が候補として挙げられる。下記に現在試みられているビーズとその応用について述べる。またリポソームも広義のナノカプセルということができ、これはすでに薬剤のDDSに応用するべく臨床試験が始まっているものがある。

3.4.1 シリカコーティング蛍光ナノビーズ

現在われわれはシリカコーティングしたラテックス蛍光ビーズの臨床応用に取り組んでいる。その1つがセンチネルリンパ節生検である。

従来、癌の手術は原発病巣の手術による切除のみでな



図4 シリカコーティング蛍光ナノビーズを用いたセンチネルリンパ節計測
ラットはエーテル麻酔下に足背に蛍光ナノビーズを皮下注射し、鼠径部の蛍光計測を行った

く病巣領域から流れ出るリンパ流の領域のリンパ節も切除(リンパ節郭清)することが多い。センチネルリンパ節生検は、原発病巣から最初に到達するリンパ節を病理検査することで、その癌がリンパ節転移を起こしているかどうか検査する方法である。もしその部に転移が認められなければ、その先のリンパ節郭清は省略できる。これによって患者の身体的負担を減らし、癌の進行度に応じたオーダーメイド治療が可能となる。従来の方法は高感度であるが使用施設が限定されるラジオアイソトープ(RI)法と、感度が低く体外からの検出が困難な色素法の2種類であるが、高効率なナノ蛍光ビーズと高感度な装置を用いることで検出可能と考えている(図4)。

3.4.2 コーティングナノシェル of DDS への応用

金でコーティングしたナノビーズで、腫瘍部位に到達させ、組織深達性の高い近赤外線照射によって加熱させることで局所的温熱療法が可能となる。

薬剤内包リポソームや表面を抗体でコーティングしたナノサイズビーズ、およびポリマービーズ等を目的とする病変部に集中的に送り込み、高い治療効果を得る方法である。このナノシェルを温度感受性ポリマーで作って薬剤を内包させれば、近赤外線を照射したときだけ薬剤を放出させることが可能である。

3.4.3 ナノサイズデンドリマーの医療応用

これは有機デンドリマーと呼ばれ、1980年代 Tomalia によって初めて合成され、多数の枝が球から突き出た、いがぐり状を呈するその特異な構造から医療応用、特にDDSの担体としての利用が期待される物質の1つである⁹⁾。サイズはタンパク質とほぼ同等である。特色としては外界との接触面積が非常に大きく、デンドリマーの枝々の間には莫大な空間が存在するため、その間に薬剤を内包させれば、病変部までの薬剤担体として利用可能となる。

3.5 ナノサイズ電気回路

ナノクラスターを用いたナノデバイスとして、また今後ナノテクノロジーの医療応用を語る上で外すことのできないものがナノエレクトロニクスである。電気回路のナノサイズ化は、幅広い電子デバイスの体内移植を加速化し、医療に多大な恩恵を与えることが期待されるからである。従来心臓ペースメーカーが体内移植電子デバイスのもっとも古典的なものであるが、現在人工心臓¹⁰⁾やFES¹¹⁾を始めとして体内移植が試みられている電子デバイスは数多い。これらの電子デバイスの小型化とともに、新たな治療用電子デバイスの開発も期待される。それは体内治療用ロボットともいべきものである。消化管や体腔内に入り込んだ小さな治療用ロボットが手術を代行する日がやってくるかもしれない。

現在電子回路の小型化は驚くべきレベルに達している、マイクロプロセッサの素子は1ミクロン程度まで小

型化している。しかし現在の写真技術を応用したリソグラフィによるシリコンチップ製造技術では小型化の限界にぶつかりつつあり、さらに1/10以下の大きさにするのは困難と考えられる。ナノテクノロジーによる電気回路の小型化が大きく期待されている所以である。

したがって今後、電子素子を分子レベルで研究する動きがますます盛んになると考えられる。通常電気回路は電子素子とそれをつなぐ導線を組み合わせて機能させる構造をとるが、ナノテクノロジーによって生み出される電子素子の候補としては分子クラスター、カーボンナノチューブ等が、導線の候補としてはインジウムリン線、カーボンナノチューブ等がそれぞれ挙げられる。現在のところ、いずれの電子素子、導線もまだ実験の域を出ておらず、素子として利用できることはわかっても合成の段階で収量、素子同士の結合等問題が山積し、実用化へはほど遠い状態である。しかしながら、これらの問題も今後急速に解決していくことが予想される。

4. 結語

原子・分子レベルで機能性デバイスを創製するナノテクノロジーは、ナノパーティクルばかりでなくコンピュータを始めとした電子機器、合成化学の分野に至るまで新たな変革を起こそうとしている。これは21世紀の産業革命ともいふべき劇的な変化になると予測される。その中でナノテクノロジーの医療応用は今まさに始まろうとするところであり、これまで述べたように、その発展による恩恵は医療の中でも狭い範囲にとどまらず、診断・治療に波及し、医療全体に大きな変革をもたらすであろう。

ナノテクノロジーのうちで今後の発展を考える上で特筆すべきは、スーパーコンピュータを用いた分子設計による、従来存在しないとされてきたクラスターまたは分子構造の予測と、分子設計に基づく効率的な有用分子構造の創製、およびクラスター構造の設計である。これは今後ナノテクノロジーの医療応用における新薬の創成を考えた場合、従来からのある程度偶然に得られた、または低い確率でしか作り出し得なかった物質ではなく、新規の有用な分子構造を飛躍的に効率よく生成することができることを意味する。したがって、ナノテクノロジーばかりでなく科学全体の発展を飛躍的に加速すると予測

される。効率よい分子設計はここで述べたナノカプセルやナノクラスターの設計にとどまらず、新薬の創製に大きな力を発揮するに違いない。これにより、今まで人類が100年以上かけて培ってきた化学合成の手法を一新し、有用な構造を持つ新薬がこれまで以上に急速かつ大量に作り出されることが期待される。

ナノテクノロジーを利用した化学合成法は新薬創製にとどまらず、新しい、脱シリコン電子回路の創造にも大きな力を発揮し、ナノ電子回路の出現による電子産業の革命にも寄与するに違いない。

また近い未来においても新たな多機能のセンシングナノカプセルの登場は診断面を中心に医療に多大な貢献をすることが期待される。

参考文献

- 1) V. Kumar and Y. Kawazoe: *Phys. Rev. Lett.*, **87**, 045503 (2001)
- 2) V. Kumar and Y. Kawazoe: *Phys. Rev.*, **B65**, 073404 (2002)
- 3) M. Ohara, K. Koyasu, A. Nakajima and K. Kaya: *Chem. Phys. Lett.*, **371**, 490 (2003)
- 4) H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl and R. E. Smalley: *Nature*, **318**, 162 (1985)
- 5) S. Iijima: *ibid.*, **354**, 56 (1991)
- 6) L. P. Kouwenhoven, T. H. Oosterkamp, M. W. S. Danoesastro, M. Eto, D. G. Austing, T. Honda and S. Tarucha: *Science*, **278**, 1788 (1997)
- 7) T. Ohtsuki, K. Masumoto, K. Ohno, Y. Maruyama, Y. Kawazoe, K. Sueki and K. Kikuchi: *Physical Review Letters*, **21**; **77**, 3522 (1996)
- 8) X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale and M. P. Bruchez: *Nat Biotechnol.*, **21**, 41 (2003)
- 9) L. Tomalia: *Bioconjug Chem*, **1**, 305 (1990)
- 10) T. Yambe, Y. Abe, T. Isoyama, K. Tabayashi, S. Nanka, K. Imachi and S. Nitta: *Biomed Pharmacother*, **56** Suppl 2, 364s (2002)
- 11) Y. Handa, N. Hoshimiya, Y. Iguchi and T. Oda: *IEEE Trans Biomed Eng*, **36**, 705 (1989)

Extended Abstracts for
the 33rd International Symposium of
the Princess Takamatu Cancer Research Fund

**Innovative Achievements
in Cancer Imaging**

November 12-14, 2002

Tokyo, Japan

Edited by **Pablo R. Ros**
Tadao Kakizoe
Yuji Itai
Noriyuki Moriyama

Princess Takamatsu Cancer Research Fund

ADVANCES IN DIAGNOSIS OF BREAST CANCER: MAMMOGRAPHY FOR SCREENING AND MRI FOR BREAST-CONSERVING SURGERY

Noriaki Ohuchi, Takanori Ishida, Koji Ohnuki and Motohiro Takeda
Division of Surgical Oncology, Graduate School of Medicine, Tohoku University
1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574, Japan
(noriakio@mail.cc.tohoku.ac.jp)

Introduction

Breast cancer superseded gastric cancer as the leading incident in Japan in 1994; the age standardized incidence rate to the world population raised from 17.0 in 1975 to 30.1 in 1996 per 100,000, and 9,652 women died of breast cancer in 2001. As incidence of breast cancer became the leading neoplasm, innovation in breast imaging has evolved an important issue in the lights of mortality reduction by screening as well as quality of life of the patients receiving treatment.

Advances in diagnosis: Early detection using screening mammography

In Japan under the Health and Medical Service Law for the Elderly clinical breast examination (CBE) was introduced into public health services without any evidence on its effectiveness in 1987. It was based on the presumption that any early detection is always beneficial. Our recent case control study has demonstrated that CBE lacks effectiveness, although it might be effective in an asymptomatic women¹⁾.

To establish mammography screening, the Grant-in-aid for Cancer Research "Quality control of breast cancer screening with mammography" was organized in 1995. The essential issues were analyzed including sensitivity, cost-effectiveness to create new guideline. The experience of the Miyagi Trial helped to shape the planned national guideline. An improved detection rate was obtained, as compared to that by CBE alone. The false negative rate was 2.8%, lower than those of HIP and BCDDP in USA, indicating an improved sensitivity and effectiveness of mammography screening in Japan²⁾.

Since 1997, we moved on to establish nationwide screening system. We performed

quality assessment of mammography, and generated training programs for photographers and interpreting physicians. We should know that surgeons, gynecologists other than radiologists have been involved in the CBE program. Therefore, it was essential to design an education program before starting mammography screening. Interpreting physicians were required to have adequate levels of sensitivity and specificity for imaging categorization. We drafted the Japanese guidelines for quality assurance, leading the Ministry of Health and Welfare to change the national guideline to include mammography for women aged 50 and over in 2000.

Because breast cancer incidence rate is highest at their forties, and mortality rate is highest at their fifties, recruitment of women aged under 49 remains a big challenge. Remarkable progress in imaging technologies has contributed to an improvement in the usefulness of mammography screening. It is therefore possible that the past randomized mammography trials targeted women aged 40-49 might have underestimated the effectiveness³⁾. We evaluated the performance parameters including recall rate, detection rate, and sensitivity of screening mammography with CBE in women aged 40-49, and compared the data with those obtained from screening in women aged 50-69. From 1995 to 1998 we gave one-view (MLO) mammography for breast cancer screening to 15,271 subjects aged 40-49 and 17,755 subjects aged 50-69 in Miyagi prefecture.

The recall rate, detection rate and sensitivity for women aged 40-49 were 10.4%, 0.20% and 93.8%, respectively. The data for women aged 50-69 were 7.2%, 0.21% and 95.0%. The recall rate for women aged 40-49 was higher than that of women aged 50-69, but the sensitivities and detection rates were almost equal. Node-negative rate in women aged 40-49 and those aged 50-69 were 80% and 84%. These data suggest that mammography screening with CBE may be an appropriate modality for women aged 40-49, although strict quality control should be required to optimize the recall rate in women aged forties who have higher breast tissue density than women aged fifties.

Advances in MRI for breast conserving surgery

Magnetic resonance imaging (MRI) for breast cancer diagnosis has been utilized prior to surgery. We have recently analyzed the radiologic-pathologic correlations regarding three-D cancer extension on the basis of detailed histopathologic analyses by sub-serial sectionings of the specimens. MRI correlated more faithfully with pathological findings as compared to the conventional mammography and ultrasonography, indicating that the 3-D MRI was more appropriate to estimate carcinoma distribution prior to surgery⁴⁾.

We have developed a novel breast-conserving surgery consisting of quadrantectomy and immediate volume replacement using lateral tissue-flap (LTF)⁵⁾. The quadrantectomy

Table 1. Comparison of the data provided by mammography-combined screening with CBE alone

	Mammography + CBE	CBE alone
Subjects	12,515	50,105
Recall rate	3.58%	4.47%
Cancers detected	35	44
Detection rate	0.28%	0.09%
False negatives	1	8
Sensitivity	97.2%	84.6%
Positive predictive value	7.8%	2.0%

(December, 1989 to June, 1992, Miyagi Cancer Society)

Table 2. Comparison of the data of mammography-combined screening according to age groups

	40-49 years old	50-69 years old
Subjects	15,271	17,755
Recall rate	10.4%	7.2%
Cancers detected	30	38
Detection rate	0.20%	0.21%
False negatives	2	2
Sensitivity	93.8%	95.0%
Specificity	89.8%	93.0%
Positive predictive value	1.6%	3.0%

(April, 1995 to March, 1998, Miyagi Cancer Society)

was employed on the basis of segmental anatomy of duct-lobular system in which breast carcinoma originates⁶⁾. Excellent cosmetic outcome as well as local control have been obtained. The principle of the surgery is to obtain negative surgical margins; quadrantectomy is a radical procedure in the sense that it aims at removal of all the carcinoma cells of the primary tumor. Our strategy is to identify patients in whom irradiation might be safely omitted after breast-conserving surgery.

Discussion

Since 1894 when Halsted reported a radical procedure, mastectomy has been employed as a standard operation over the century. However, the concept shifted to limited surgery, because of great change in the characteristics of patient population. Better education, more extensive information, refined diagnostic tools, and expanding screening campaigns all contribute to earlier detection of breast cancer. Breast conserving therapy becomes an important issue in the light of QOL. It is essential for surgeons and radiologists to understand origin and extending pattern of breast cancer, and make the surgical margin negative. The quadrant distribution of breast cancers influences extent of excision

Table 3. Evaluation of effectiveness for breast cancer screening in Japan (October, 2001, the Research Group supported by the Ministry of Health, Welfare and Labour)

Screening modality	Strength of recommendation*		Quality of evidence**
CBE alone	All ages	1-c	3
CBE with mammography	50y +	1-a	1
	40-49y	1-b	1
CBE with ultrasound	All ages	II	None

***Strength of recommendations**

I-a: Good evidence to support the recommendation specifically considered in a periodic health examination. I-b: Fair evidence to support the recommendation specifically considered in a periodic health examination. I-c: Fair evidence to support the recommendation excluded from a periodic health examination. I-d: Good evidence to support the recommendation excluded from a periodic health examination.

II: Insufficient evidence to recommend for or against the inclusion of the condition.

****Quality of evidence**

1: RCT, 2: Control trial without randomization, 3: Cohort or Case control study, 4: Ecological, time series study, 5: Others

and may predict pattern of recurrence when tumor clearance is incomplete even if radiation is applied as an adjuvant therapy. Surgery should reduce the chance of local recurrence.

The role of radiologists becomes more important in diagnosis and treatment of breast cancer. Especially, the great contribution will be required for the radiologists into mammography screening in terms of quality control as experienced in western countries.

References

1. Kanemura S, Tsuji I, Ohuchi N, et al. A Case control study on the effectiveness of breast cancer screening by clinical breast examination in Japan. *Jpn J Cancer Res*, 90: pp. 607-613, 1999
2. Ohuchi N, Yoshida K, Kimura M, et al. Comparison of false negative rates among breast cancer screening modalities with or without mammography: Miyagi trial. *Jpn J Cancer Res*, 86: pp. 501-506, 1995
3. Olsen O, Gotzsche PC. Cochrane review on screening for breast cancer with mammography. *Lancet*, 358:pp. 1340-1342, 2001
4. Amano G, Ohuchi N, Ishibashi T, et al. Correlation of three-dimensional magnetic resonance imaging with meticulous histopathologic map concerning carcinoma extension in 58 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 60:pp. 43-55, 2000
5. Ohuchi N. Breast-conserving surgery for invasive cancer: A principle based on seg-

- mental anatomy. *Tohoku J Exp Med*, 188: pp. 103-118, 1999
6. Ohuchi N, Furuta A and Mori S. Management of ductal carcinoma in situ with nipple discharge: intraductal spreading of carcinoma is unfavorable pathologic factor for breast conserving surgery. *Cancer*, 74:pp. 1294-1302, 1994



Dr. Noriaki Ohuchi, M.D., Ph.D.

1978-1980	Surgical residency
1980-1984	Postgraduate student, Tohoku University
1984-1986	Visiting Fellow, NCI, NIH, USA
1987-1995	Assistant Professor, Tohoku University
1995-1999	Associate Professor, Tohoku University
1999-	Professor, Division of Surgical Oncology, Graduate School of Medicine, Tohoku University

Specialty and Present Interest:

Surgical oncology, Genetics, Cancer screening, Bio-nanotechnology

Filamin A-Bound PEBP2 β /CBF β Is Retained in the Cytoplasm and Prevented from Functioning as a Partner of the Runx1 Transcription Factor

Naomi Yoshida,¹ Takehiro Ogata,¹ Kenji Tanabe,¹ Songhua Li,¹ Megumi Nakazato,¹ Kazuyoshi Kohu,¹ Toshiro Takafuta,² Sandor Shapiro,³ Yasutaka Ohta,⁴ Masanobu Satake,¹ and Toshio Watanabe^{1*}

Department of Molecular Immunology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai,¹ and Hematology and Clinical Immunology, Nishi-Kobe Medical Center, Kobe,² Japan; Department of Physiology, Jefferson Medical College, Philadelphia, Pennsylvania³; and Hematology Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts⁴

Received 6 May 2004/Returned for modification 2 July 2004/Accepted 26 October 2004

The heterodimeric transcription factor PEBP2/CBF is composed of a DNA-binding subunit, called Runx1, and a non-DNA-binding subunit, called PEBP2 β /CBF β . The Runx1 protein is detected exclusively in the nuclei of most cells and tissues, whereas PEBP2 β is located in the cytoplasm. We addressed the mechanism by which PEBP2 β localizes to the cytoplasm and found that it is associated with filamin A, an actin-binding protein. Filamin A retains PEBP2 β in the cytoplasm, thereby hindering its engagement as a Runx1 partner. The interaction with filamin A is mediated by a region within PEBP2 β that includes amino acid residues 68 to 93. The deletion of this region or the repression of filamin A enables PEBP2 β to translocate to the nucleus. Based on these observations, we propose that PEBP2 β has two distinct domains, a newly defined regulatory domain that interacts with filamin A and the previously identified Runx1-binding domain.

The heterodimeric transcription factor PEBP2/CBF is composed of the DNA-binding protein Runx1/AML1 and the non-DNA-binding protein PEBP2 β /CBF β . The Runt domain, which is conserved among Runx family proteins, is responsible not only for the DNA-binding activity of Runx1, but also for its ability to dimerize with PEBP2 β . Nuclear magnetic resonance and X-ray diffraction studies have allowed the determination of the three-dimensional structure of the Runt domain of Runx1 as well as the three-dimensional structures of PEBP2 β and the heterodimer formed by both subunits (4, 9, 12, 21, 30, 36). These analyses showed that when it dimerizes with PEBP2 β , the stabilized Runx1 protein can bind both the major and minor grooves of DNA (30). PEBP2 β alone does not interact with DNA but enhances the DNA-binding activity of Runx1. Furthermore, *Runx1* and *PEBP2 β* homozygous knockout mice exhibit identical phenotypes, with a failure of hematopoietic stem cell development during embryogenesis. This finding provides genetic evidence that dimer formation between Runx1 and PEBP2 β is vitally important for transcription factor activity (22, 24, 25, 28, 34, 35).

In humans, both *Runx1* and *PEBP2 β* are frequently targeted in leukemia-associated chromosomal abnormalities such as the t(8; 21) and inv translocations (16), which generate chimeric transcription factors that interfere with or abolish the transcriptional activity of endogenous PEBP2/CBF. For example, the inv (16)-derived PEBP2 β -SMMHC protein consists of an

amino-terminal fusion of the PEBP2 β heterodimerization domain to the carboxy-terminal coiled-coil region of the smooth muscle myosin heavy chain.

In addition, while PEBP2/CBF was originally characterized as a transcriptional activator, recent studies have demonstrated that it can also function as a repressor, depending on the enhancer or promoter sequences it binds to and on the cofactors it interacts with. An interaction with p300/CBP or mSin3A converts Runx1 into an activator or a repressor, respectively (16, 19). Other factors such as YAP, Ear-2, ALY, Ets-1, MOZ, and Groucho/TLE also interact with Runx1 and modulate its activity (2, 5, 10, 13, 15, 17, 18, 37, 38). On the other hand, no such cofactors or modulators have been reported for PEBP2 β .

Although the structure and functions of the PEBP2/CBF transcription factor have been extensively studied, little is known about how its activity is influenced by the subcellular localization of its constituent subunits. The Runx1 protein possesses nuclear localization signals and is found exclusively in the nucleus, whereas PEBP2 β is located in the cytoplasm in most cells and tissues examined thus far (14, 32). The ability of Runx1 to bring PEBP2 β into the nucleus has been demonstrated (1, 31). On the other hand, the mechanism that localizes PEBP2 β to the cytoplasm is not known. We previously reported that cytoplasmic PEBP2 β has a weak affinity for a cytoskeletal structure, namely, F-actin on stress fibers (32). We also observed that PEBP2 β is located on or near the Z-line of muscle fibers, where many actin-associated proteins are abundant (7). Moreover, we found that the leukemogenic chimeric protein PEBP2 β -SMMHC disorganizes cytoplasmic stress fibers and that the PEBP2 β portion of this protein is necessary for interference (33). Based on these observations, we pro-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Immunology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai 980-8575, Japan. Phone: 81(22) 717-8478. Fax: 81(22) 717-8482. E-mail: watanabe@idac.tohoku.ac.jp.

posed that PEBP2 β interacts with actin-associated proteins and that this interaction determines the cytoplasmic localization of PEBP2 β (32, 33).

In the present study, we show that filamin A binds PEBP2 β and retains it in the cytoplasm, thereby preventing it from acting as a partner for the Runx1 transcription factor. When filamin A is absent, PEBP2 β moves into the nucleus and enhances Runx1-dependent transcription.

MATERIALS AND METHODS

Yeast two-hybrid screening. The Matchmaker Two-Hybrid System 3 (Clontech) was used according to the instructions in the manufacturer's manual. A bait plasmid was constructed by inserting the mouse *PEBP2 β* cDNA next to the GAL4 DNA-binding domain of the vector pGBKT7. cDNA libraries prepared from 11- or 17-day-old mouse embryos were fused to the GAL4 DNA activation domain of the vector pGAD10 and used as prey plasmids. AH109 cells were used as host cells. Plasmid DNAs were recovered from positive colonies and sequenced by use of an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

Plasmid construction. A c-Myc or hemagglutinin (HA) tag was fused to the amino or carboxy terminus of filamin A-C, PEBP2 β , or Runx1, as indicated in the text, by a PCR-based method. Carboxy-terminal deletion mutants of PEBP2 β were constructed by PCRs using the common sense primer 5'-CGGAATTCACCATGCCGCGCGTCGCCCGG-3' and the following antisense primers: 5'-GGAATTCCTACTGCTGAGACAGATTGGTTC-3' for β AC67, 5'-GGAATTCCTACTGCTGCTTCTCTCTC-3' for β AC94, and 5'-GGAATTCCTACTGGCTCGCTCCTCATC-3' for β AC133.

For preparation of an internal deletion mutant, β AC68-93, the following primers were used in appropriate combinations for two successive rounds of PCR: 5'-AAGGTATACTTGAAGGCTCCCATG-3', 5'-CCAATCTGTCTCTCCAG AAGGTATACT-3', and 5'-CAAGAAGACAGCAAGACCCTAGGAATTC G-3'. All cDNAs were subcloned into the mammalian expression vector pCAGGS-neo.

Cell culture. HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum. M2 and A7 cells were cultured in minimal essential medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 8% (vol/vol) newborn calf serum and 2% (vol/vol) fetal bovine serum (8). G418 (Sigma) was added to A7 cells at 0.3 mg/ml.

siRNA-mediated repression of filamin A. Five RNA oligonucleotides (iGENE) were synthesized by use of the following sense and antisense oligonucleotides: for filaminA-1499, 5'-CAGCUGACUUAAGGUGUACACAAA-3' and 5'-UUUGUGUACACCUUGAAGUCAGCUG-3'; for filaminA-4566, 5'-AGUACUGUAUGGAGAUGAAGAGGUA-3' and 5'-UACCUUUAUCUC CAUACAGUACU-3'; for filaminA-5792, 5'-ACUACAGCAUUCUAGUCAAG UACAA-3' and 5'-UUUUAUCUUGACUAGAAUGCUGUAGU-3'; for filaminA-6911, 5'-ACUACGAAGUCUCAGUCAAGUUCAA-3' and 5'-UUGAACUUGA CUGAGACUUCGUAGU-3'; for filaminA-7140, 5'-CACAGAAUUGACCAA GAUAAGUUAU-3' and 5'-AUACUUAUCUUGGUCAAUUCUGUG-3'; and for the luciferase control, 5'-CAUCACGUAACGCGGAUUCUGCA-3' and 5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGUGAUGU-3'. Small interfering RNAs (siRNAs) were introduced into HeLa cells by the use of Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Inc.). The cells were processed for immunological detection 72 h after transfection.

Immunoprecipitation and immunoblot analysis. Expression vectors harboring Myc-tagged filamin A-C and HA-tagged PEBP2 β were cotransfected into HeLa cells by use of the Effectene reagent (Qiagen). Twenty-four hours after transfection, the cells were lysed with a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (vol/vol) Nonidet P-40, and a mixture of protease inhibitors (Complete; Roche Molecular Biochemicals). If the lysate was to be incubated with an anti-human filamin A monoclonal antibody (Chemicon), the cells were lysed with a buffer consisting of 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (vol/vol) Triton X-100, 10% (vol/vol) glycerol, 2 mM dithiothreitol, and a mixture of protease inhibitors. The cell lysates were incubated with the anti-c-Myc 9E10 antibody (Sigma), the anti-HA 3F10 antibody (Roche Molecular Biochemicals), or an anti-filamin A antibody, and the immunoprecipitates were adsorbed to protein G-Sepharose beads. The beads were washed five times with a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (vol/vol) Nonidet P-40, and a mixture of protease inhibitors or, in the case of anti-filamin A precipitates, with a buffer consisting of 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (vol/vol) Triton X-100, 10% (vol/vol) glycerol, 2 mM dithiothreitol, and a mixture of protease

inhibitors. Proteins were eluted by boiling the beads in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer, electrophoresed in an SDS-polyacrylamide gel, and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. Immunodetection of membrane-bound proteins was performed with the anti-HA 3F10, anti-c-Myc 9E10, or anti-PEBP2 β antibody (6), and products were visualized by use of the ECL Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech).

Cells subjected to siRNA analysis were lysed in a urea-Triton buffer, and immunoblot analyses were performed as previously described (7). The antibodies used were an anti-human filamin A antibody, a murine anti- β -actin monoclonal antibody (Sigma), and a peroxidase-conjugated goat antibody to mouse immunoglobulin G (IgG) (Cappel Products).

Immunofluorescence analysis. Cells grown on coverslips were transfected with expression plasmids. Twenty-four hours later, the cells were fixed with 2% (wt/vol) paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% (vol/vol) Triton X-100, and blocked with 1% (wt/vol) bovine serum albumin in phosphate-buffered saline. Signals were detected by an indirect immunofluorescence technique using anti-HA 3F10 as a primary antibody and Cy3-conjugated goat anti-rat IgG (Chemicon) as a secondary antibody or using anti-c-Myc 9E10 or an anti-human filamin A antibody as a primary antibody and Alexa fluor 488-goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) as a secondary antibody. Cells were viewed with a confocal laser scanning microscope (LSM410 or LSM 5 PASCAL; Zeiss).

Reporter gene assay. Runx1 and PEBP2 β expression plasmids were cotransfected with the reporter plasmid pM-CSF-R-luc (39) by use of the Effectene reagent. pRSV- β -GAL was transfected together with the reporter plasmid as an internal control, and its activity was used to normalize transfection efficiencies. Twenty-four hours after transfection, the cells were lysed in a lysis buffer (Promega), and the luciferase activities in lysates were measured by use of a luciferase assay system (Promega) and a Luminescencer-JNR AB-2100 instrument (Bio-Instrument). β -Galactosidase activity was assayed by the use of chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (Roche Molecular Biochemicals) as a substrate. Each assay was performed at least three times. In each case, a siRNA for filamin A or a *filaminA* cDNA was introduced into HeLa or M2 cells, respectively. The cells were incubated for 24 h and then transfected with the expression plasmids for Runx1 and PEBP2 β together with the pM-CSF-R-luc reporter and the pRL-TK vector (Promega) as an internal control.

RESULTS

Identification of filamin A as a novel PEBP2 β -interacting protein. To identify molecules that interact with PEBP2 β , we employed a yeast two-hybrid screening system. cDNAs derived from murine embryos were used as preys, and *PEBP2 β* was used as a bait. We screened nine million yeast transformants by an interaction trap strategy and obtained 110 colonies that were positive for growth on both histidine and adenine. Many of the cDNAs thus isolated corresponded to *Runx* genes. In addition, one clone that carried a portion of the cytoskeletal gene *filaminA* (also known as *ABP-280*) was identified. The region of *filaminA* that was recovered as a *PEBP2 β* -interacting sequence consisted of the extreme carboxy terminus and the adjacent hinge 2 domain (Fig. 1A). This region is hereafter referred to as filamin A-C.

We next examined whether the PEBP2 β protein interacts with filamin A in mammalian cells by transiently expressing Myc-tagged filamin A-C and HA-tagged PEBP2 β in HeLa cells. As shown in Fig. 1B, PEBP2 β was coimmunoprecipitated with filamin A-C from HeLa cell lysates when the two proteins were introduced by cotransfection. Similarly, filamin A-C was coimmunoprecipitated with PEBP2 β (data not shown). Since HeLa cells express both the PEBP2 β and filamin A proteins endogenously, their possible interaction was also examined. As shown in Fig. 1C, PEBP2 β was coimmunoprecipitated with the intact filamin A molecule. These data indicate that PEBP2 β forms a complex with filamin A in HeLa cells and that this is true not only for the exogenously introduced proteins, but also for those expressed endogenously.

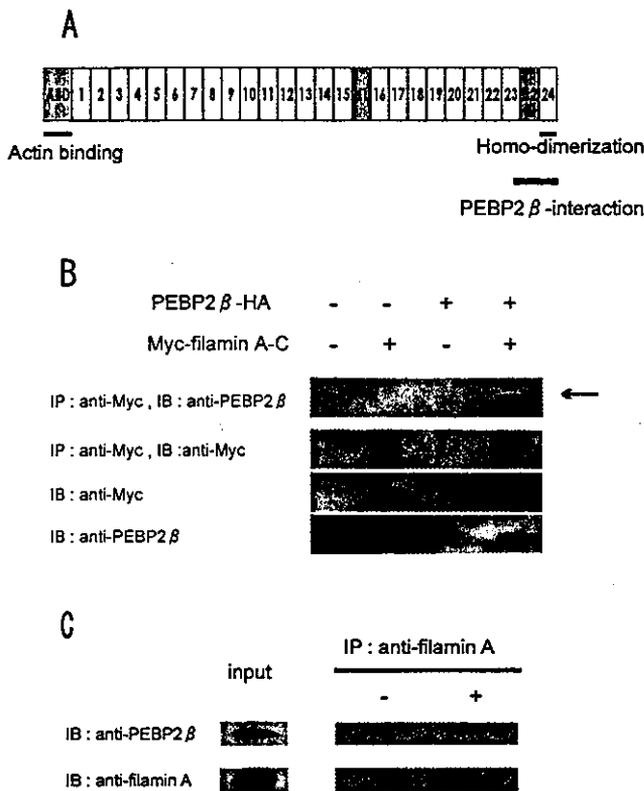


FIG. 1. Interaction of PEBP2 β with filamin A. (A) Schematic diagram of structure of filamin A. The actin binding and homodimerization domains are located at the extreme amino- and carboxy-terminal ends, respectively. The repetitive domains are numbered. H represents a hinge region. A fragment of filamin A obtained in the yeast two-hybrid screening assay contained the PEBP2 β -interacting region and is termed filamin A-C. (B) HeLa cells were transfected with the indicated combinations of expression plasmids, and cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-Myc antibody. Precipitates were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to immunoblot (IB) analysis with the indicated antibodies. An aliquot of lysate was directly immunoblotted without immunoprecipitation to evaluate the level of protein expression. (C) Lysates of untransfected HeLa cells were immunoprecipitated (IP) with or without an anti-filamin A antibody. Precipitates were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to immunoblot (IB) analysis with the indicated antibodies. An aliquot of lysate was directly immunoblotted without immunoprecipitation to evaluate the level of protein expression (input).

The central region of PEBP2 β is necessary for interaction with filamin A-C and for cytoplasmic localization. To determine which region of PEBP2 β is responsible for its interaction with filamin A, we generated a series of carboxy-terminal deletion mutants. Figure 2A illustrates the relationship between each deletion derivative and the known substructures of PEBP2 β . The 141-amino-acid (aa) amino-terminal region of PEBP2 β is composed of four α helices, seven β strands, and six loop structures. Since three isoforms of the PEBP2 β protein share the 133 amino-terminal amino acids, we constructed a derivative lacking the carboxy-terminal region ($\beta\Delta$ C133) by truncating the protein at residue 134. The $\beta\Delta$ C94 derivative lacked the β 5-L5 region, one of the Runt-interacting domains. The $\beta\Delta$ C67 construct possessed only the 67 amino-terminal

amino acids, and the $\beta\Delta$ 68-93 construct retained all of the Runt-interacting domains (β 1-L1, L2- β 3, α 1, β 3, and β 5-L5) but lacked the L3- β 4-L4 region.

By using a yeast two-hybrid system, we found that the $\beta\Delta$ C133 and $\beta\Delta$ C94 derivatives, as well as full-length PEBP2 β , interacted with filamin A-C (Fig. 2B). We could not, however, assess the binding ability of the $\beta\Delta$ C67 construct, since cells containing this construct alone were able to grow on selection medium. Notably, the internal deletion construct, $\beta\Delta$ 68-93, did not interact with filamin A-C. Thus, the region of aa 68 to 93 of PEBP2 β is necessary for its interaction with filamin A.

We next examined the effect of carboxy-terminal deletions on the subcellular localization of PEBP2 β . Each plasmid was transfected into HeLa cells, and the expression of transduced proteins as well as of endogenous filamin A was monitored by double immunofluorescence staining (Fig. 3). While full-length PEBP2 β and the $\beta\Delta$ C133 and $\beta\Delta$ C94 proteins were all located in the cytoplasm, the $\beta\Delta$ C67 and $\beta\Delta$ 68-93 proteins were both found in the nucleus. Thus, the region of aa 68 to 93 is necessary for the cytoplasmic localization of PEBP2 β , since constructs that lack this region move into the nucleus.

PEBP2 β is located in the nuclei of filamin A-deficient cells. We reasoned that filamin A functions to retain PEBP2 β in the cytoplasm. Therefore, we predicted that in its absence, full-length PEBP2 β would not stay in the cytoplasm but would instead move into the nucleus. To test this idea, we performed experiments with a filamin A-deficient human melanoma cell line, M2, and a subline, A7, which was obtained by stably transfecting M2 cells with a human filamin A cDNA (8). A plasmid bearing full-length PEBP2 β was transfected into these cells, and the expression of transduced protein as well as of endogenous filamin A was monitored by immunofluorescence (Fig. 4). PEBP2 β was detected in the nuclei of filamin A-deficient M2 cells but in the cytoplasm of filamin A-expressing A7 cells. We also examined the effects of carboxy-terminal deletions on the subcellular localization of PEBP2 β in M2 and A7 cells. In filamin A-expressing A7 cells, while the full-length PEBP2 β , $\beta\Delta$ C133, and $\beta\Delta$ C94 proteins were all located in the cytoplasm, the $\beta\Delta$ C67 and $\beta\Delta$ 68-93 proteins were both found in the nucleus. On the other hand, in filamin A-deficient M2 cells, the full-length PEBP2 β , as well as all carboxy-terminal deletion mutants, was located in the nucleus (data not shown).

To confirm these results, we next determined whether the repression of filamin A by the siRNA method influences the subcellular localization of PEBP2 β in HeLa cells. Since the same results were obtained for five different siRNAs synthesized as described in Materials and Methods, we present here representative results obtained with the siRNA filaminA-7140. A luciferase siRNA was used as a negative control. We found by immunoblot analysis (Fig. 5A) that the level of filamin A in cells treated with the filaminA-7140 siRNA was 1/10 that in luciferase siRNA-treated cells. We determined the localization of PEBP2 β in these cells by immunofluorescence staining (Fig. 5B) and found the protein in the nuclei of filamin A-repressed cells but in the cytoplasm of control filamin A-expressing cells.

These data indicate that filamin A sequesters the PEBP2 β protein in the cytoplasm and that in its absence, PEBP2 β moves into the nucleus.

Runx1 colocalizes with PEBP2 β in the nuclei of filamin A-deficient cells. We next examined whether the reported ac-

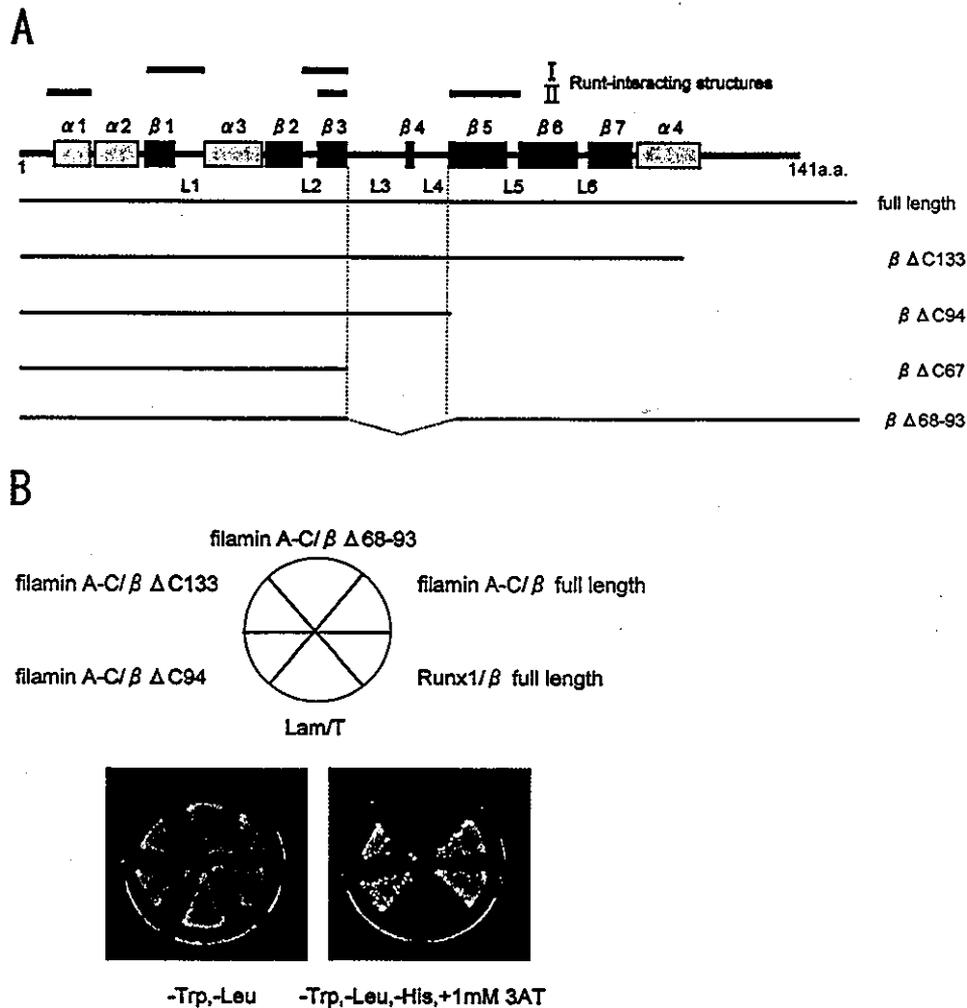


FIG. 2. Mapping of the filamin A-interacting domain of PEBP2 β by yeast two-hybrid analysis. (A) Schematic diagram of domain structures found in the PEBP2 β protein and description of carboxy-terminal deletion mutants of PEBP2 β . α , β , and L represent α helices, β strands, and loops, respectively. The thick lines at the top indicate areas I and II of the Runt-interacting region (30). (B) PEBP2 β and its deletion mutants were tested for the ability to interact with filamin A-C. Yeast cells were transformed with the indicated combinations of plasmids and grown on nonselective (-Trp, -Leu) and selective (-Trp, -Leu, -His, 1 mM 3-amino-1,2,4-triazole) media. Lamin/large T antigen and Runx1/PEBP2 β served as negative and positive controls, respectively.

tivity of Runx1 to bring PEBP2 β into the nucleus is affected by the presence of filamin A. Plasmids expressing PEBP2 β and Runx1 were cotransfected into the M2 and A7 cell lines, and the transduced proteins were detected by double immunofluorescence (Fig. 6A). Runx1 colocalized with PEBP2 β in the nuclei of filamin A-deficient M2 cells. In addition, PEBP2 β was coimmunoprecipitated with Runx1 from cotransfected M2 cell lysates (data not shown). In contrast, although Runx1 was found in the nuclei of filamin A-expressing A7 cells, PEBP2 β was found in the cytoplasm. These data suggest that the presence of filamin A prevents Runx1 from translocating PEBP2 β into the nucleus. On the other hand, filamin A did not have an effect on the subcellular localization of Runx1, which was localized to the nuclei of both M2 and A7 cells.

PEBP2 β has been reported to be capable of stabilizing the Runx1 protein, which is rather unstable by itself, by forming a heterodimer (11). We examined the protein level of Runx1 in the presence or absence of PEBP2 β by using A7 and M2 cells.

As shown in Fig. 6B, the band intensities of Runx1 detected by immunoblotting were roughly equal in both PEBP2 β -expressing and non-PEBP2 β -expressing A7 cells (compare lanes 2 and 3). In contrast, the cotransfection of PEBP2 β significantly increased the band intensity of Runx1 in M2 cells (compare lanes 5 and 6). Therefore, in the nuclei of filamin A-deficient M2 cells, where the two proteins are colocalized, PEBP2 β appears to increase the stability of Runx1.

The transcriptional activity of PEBP2/CBF is enhanced in filamin A-deficient cells. Filamin A may affect the extent of PEBP2/CBF transcriptional activity by controlling the subcellular localization of PEBP2 β . In order to assess this idea, we transfected M2 and A7 cells with an M-CSF-R-luc reporter, which allowed the contribution of PEBP2 β to the transcriptional activity of the PEBP2/CBF heterodimer to be measured (39). As seen in Fig. 7A, the transfection of PEBP2 β in addition to Runx1 caused a sixfold increase in luciferase activity in M2 cells compared to that in cells transfected solely with