

よるアフィニティー精製も試みる。

## E. 結論

本研究により、シュガーチップが、難治てんかん発症に連動した発現を示す内在性レクチンの検出を可能にした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Inoue M, Kato K, Matsubashi H, Kizuka Y, Kawasaki T, and Oka S. Distributions of glucuronyltransferases, GlcAT-P and GlcAT-S, and their target substrate, the HNK-1 carbohydrate epitope in the adult mouse brain with or without a targeted deletion of the GlcAT-P gene., *Brain Res* (2007) 1179:1-15.
- 2) Kato K. (2007) Glycobiological approach to understanding neural plasticity *Trends in glycoscience and glycotecchnology* 19(106)97-110.

### 2. 学会発表 (シンポジウムなど)

- 1) Kato K., Yamada S., Miyamoto K., Kuwamura M., Okada T., Osuka S., Itohara S., Endo S., and Hirabayashi Y. シアル酸転移酵素(ST3Gal IV) 遺伝子欠損マウスにおける神経機能における解析 (Analysis of brain function on the adult mouse with ST3Gal IV deficiency) BMB2007 (12月11日～15日) 2007年12月14日 (金) パシフィコ横浜・第3会場
- 2) 加藤啓子 In vivo 脳内における薬剤効果の査定方法の開発と応用 *BioJapan2007* 2007. 9.19-21 パシフィコ横浜
- 3) 加藤啓子・宮本佳苗・桑村充・岡田利也・大須賀壮・糸原重義・遠藤昌吾・平林義雄 神経機能におけるシアル酸転移酵素(ST3Gal IV) 遺伝子欠損の影響 第27回日本糖質学会 平成19年8月1-3日福岡
- 4) 加藤啓子「てんかん等の脳疾患とモデル動物」第6回大阪府立大学獣医学専攻・大阪府立成人病センター 場所：大阪府立成人病センター 本館5階会議室 2007年6月11日 (月)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 特願2008-9479 出願日：2008.1.18 名称：てんかんの診断、処置または予防用組成物
- 2) 特願2008-23135 出願日：2008.2.2 名称： $\alpha$  2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) 欠損非ヒト動物およびそれを用いたスクリーニング方法

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 (研究に関する新聞記事等) なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」

平成19年度分担研究報告書

糖鎖チップを用いた早期がん診断マーカー測定系の確立

分担研究者 奥 直人 静岡県立大学薬学部・教授

研究要旨

腫瘍の早期発見には、早期がん診断マーカーの探索が求められている。腫瘍マーカーの多くは糖鎖抗原由来であり、生体内におけるがん化の過程において糖鎖の果たす役割は大きい。そこで糖鎖チップを用いて早期がんにおける診断マーカーを探索し、測定系を確立することを試みた。実験では3種類の腫瘍細胞を用いて担がんマウスを作製し、その血清からアルブミンを除去し、シュガーチップによる探索を試みた。低速限外濾過法により、ほぼ完全にアルブミン除去できることが明らかとなったが、シュガーチップによる特定マーカーの発見には至らなかった。今回、低分子画分は除去されており、がん細胞特有の糖鎖に対する抗体分子、あるいはがん細胞や新生血管からシェディングしてくる糖鎖結合たんぱく質のなかに、バイオマーカーとなるような量的に多いタンパク質分子は見いだせないと考えられる。一方、我々はがんの増殖や血行性転移に必須である血管新生に着目し、プロテオミクス解析を用いて、腫瘍血管新生により新たに発現するタンパク質、発現が大きく上昇するタンパク質、細胞表面への局在が変わるタンパク質などを見出すことにより、新たなバイオマーカーの探索を試みた。その結果、BiP タンパク質を見出し、血管新生に及ぼす作用を解析し、標的分子としての応用を試みた。

A. 研究目的

がんは1981年以来、我が国の死因別死亡率の一位を占める疾患である。がんの撲滅には治療法もさることながら早期発見が鍵を握る。そのため、より早くがんの診断が行えるバイオマーカーの探索研究が盛んにおこなわれている。がんの診断、治療経過のモニタリングや再発スクリーニングを目的として種々の腫瘍マーカーが用いられており、安価でありかつ低侵襲性であるといった点から、臨床で幅広く使用されてきた。しかし、一部の腫瘍マーカーは、呼吸器疾患や子宮内膜症、自己免疫疾患などの良性疾患と喫煙などの生活習慣で測定値が上昇する場合があること、また早期がんでは腫瘍マーカーの値が上昇しないことが知られており、現在臨床で使用されている腫瘍マーカーをがんの早期発見に適応するのは困難である。そこで簡便かつハイスルー

ットな早期がん発見システムを確立することが望まれる。

現在、使用されている腫瘍マーカーは、その多くが糖鎖に由来するものであり、代表的ながん関連糖鎖抗原である sialyl Lewis x (sLe<sup>x</sup>) は、糖転移酵素の欠損に伴い、大腸がんや胃がん由来がん細胞膜上に過剰に蓄積することが報告されてきた。sLe<sup>x</sup> は血管内皮細胞上に発現している E-セレクトインのリガンドであり、sLe<sup>x</sup> を発現したがん細胞は E-セレクトインとの結合を介して血管内皮細胞に接着し、転移巣を形成する。また、N-アセチルグルコサミン転移酵素 GnT-V 欠損マウスを用いた実験においてがん転移が抑制されることや、高転移性のがんでは GnT-V 活性が上昇していることが報告されており、特定の糖鎖ががんの転移・浸潤において促進的に関与していることが考えられる。また、糖鎖と血管新生における関わりも明らかとなっており、がん化と

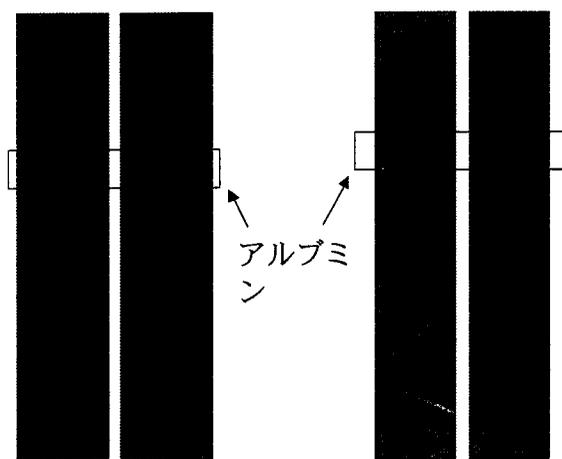
糖鎖の関連性は大きいと考えられる。生体内における糖鎖の果たす役割については未だ不明な点も多い。そこで、がん罹患時における血中物質-糖鎖間相互作用を検出化することを目的とし、糖鎖との相互作用の検出化が可能である糖鎖チップを用いて解析を試みた。また、プロテオーム解析を用いた新規血管新生関連分子の探索をおこなった。

## B. 研究方法

### 各種担がんマウスアルブミン除去血清中タンパク質の調製

細胞としては、Tn 抗原を発現しているヒト乳がん細胞である MCF-7 細胞、マウス黒色腫細胞である B16BL6 細胞およびマウス大腸がん細胞である Colon26-NL17 細胞を用いた。各種がん細胞を同系マウスの右腹側部に担がんし、がんの長径が約 1 cm に達したところで血清を回収し、コントロールとして同系マウスの血清も回収した。

アルブミン除去方法については免疫グロブリンなどの高分子量タンパクについて網羅的に解析するため、限外ろ過を用いた。検討の結果、高濃度の血清サンプルを高速で遠心し限外ろ過を行うことにより、血清中の何らかの成分が限外ろ過膜に目詰まりを起こし、アルブミン除去効率が低下していたことが判明した。したがって、回収した血清を十分に希釈し、低速遠心による限外ろ過を複数回行ったところ、効率よくアルブミンを除去することに成功した。



左から、前回未処理血清、前回精製法の血清、今回未処理血清、今回精製法（低速遠心濾過）の血清サンプル

### 担がんマウス血清中タンパク質-糖鎖間相互作用の解析

今回調製法により精製した血清サンプルは効率よくアルブミンが除去されていることに加え、サンプル中に占める高分子量タンパク質の割合が著しく上昇していることから、これらの血清中高分子量タンパク質-糖鎖間の相互作用が SPR 測定によって、より明確に解析できる可能性が示唆された。そこで次に、各種がん細胞担がんマウス血清を本調製法により精製し、Multi-SPR 測定による血清中タンパク質-糖鎖間相互作用の網羅的解析を行った。測定は n=3 で行った。

### 新生血管のプロテオーム解析

一方、バイオマーカーの探索として、プロテオーム解析を用いた新規血管新生関連分子の探索をおこなった。新生血管モデルとしてがん細胞培養上清 (Conditioned Medium) または血管新生において中心的な役割を担っている血管内皮増殖因子 (VEGF) で刺激したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いた。すなわち、それぞれのモデルにおいて未刺激の HUVECs と刺激後の HUVECs を用いて、蛍光ディフュージョン二次元電気泳動法 (2D-DIGE) によるプロテオーム解析を行った。

## C. 研究結果

これまでに、がん関連糖鎖抗原である Tn 抗原 (GalNAc( $\alpha$ 1-6)Glc) を発現しているヒト乳がん細胞 MCF-7 担がんマウスを作成し、Multi-SPR 測定によって担がんマウス血清中タンパク質-糖鎖間相互作用の網羅的解析を行い、以下の 5 種類 (Glc( $\beta$ 1-3)Glc、Glc( $\beta$ 1-3)Glc、Glc( $\beta$ 1-4)Glc、Man( $\alpha$ 1-2)Man など) の糖鎖について、正常マウス血清と比較して担がんマウス血清中タンパク質の糖鎖結合活性が極めて微量ではあるが低下する傾向が観察された旨を報告した。なお、糖鎖結合活性が低下した糖鎖のうち、Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ 1-6)Glc (T antigen), Gal( $\beta$ 1-4)[Fc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc (Lewis X) はがん関連糖鎖抗原として知られているものであった。

前回測定に用いた血清サンプルはアルブミン除去の操作を行っていたものの、SDS-PAGE によって確認したところ、大部分のアルブミンが残存していたことから、これらの血清中タンパク質-糖鎖間相互作用はアルブミンの

非特異的な吸着による影響を受けていた可能性が示唆された。したがって、今回は前回得られた、担がんマウス血清中タンパク質-糖鎖間相互作用変化のより明確な解析を目的として、アルブミン除去効率に優れたサンプル調製法を検討し、確立した方法によって調製した各種担がんマウス血清サンプルについて、Multi-SPR 装置を用いて再度血清中タンパク質-糖鎖間相互作用の網羅的解析を行った。

残念ながら、今回の測定において正常および担がんマウス血清中にチップ上の糖鎖と特異的な結合を示すタンパク質は認められなかった。これは、前回測定時の結果がアルブミンの非特異的な吸着による影響を受けていた可能性を示唆するものである。また、血清中タンパク質-糖鎖間の相互作用が認められなかった原因としては、精製した血清サンプル中に糖鎖と相互作用を示すタンパク質が存在しない、あるいはそのようなタンパク質は存在するが極めて微量であるため検出されないといったことが考えられる。

次にプロテオーム解析の結果について述べる。がん細胞培養上清として3種類のがん細胞を用いた、いずれも発現変動するタンパク質が同定されたが、そのパターンはがん細胞の種類によりかなりの変動を見せた。HT1080細胞培養上清を用いた詳細な検討から、29種類の変動タンパク質を同定した。また VEGF モデルにおいて 72 種類の発現変動タンパク質の同定に成功した。これらをその機能別に分類すると分子シャペロン、解糖系酵素、タンパク質合成・分解に関する分子、細胞骨格調節因子群などが多く見出された。同定されたタンパク質の中で最も大きな発現増加がみられたタンパク質として BiP が見出された。BiP は GRP78 としても知られる分子シャペロンの 1 種であり、小胞体ストレス反応において重要な役割を担っていることが明らかとなっている。しかしながら血管新生との関連性についてはほとんど明らかとされていない。そこで BiP に着目し、機能解析を行った。

BiP と血管新生との関連性を解明するため、まず BiP に対する siRNA を構築し、RNAi 用いて BiP をノックダウンした際の、血管新生情報伝達に及ぼす影響について検討したところ、BiP のノックダウンにより VEGF シグナリングを抑制し、細胞増殖を抑制することを見

出した。これらを反映して、BiP をノックダウンした際には、VEGF の刺激による HUVECs の増殖が抑制された。近年、一部のがん細胞などの細胞膜表面に BiP が発現していることが明らかとされ、注目されている。そこで VEGF 活性化内皮細胞における BiP の膜表面上の発現について検討した。その結果、VEGF 刺激により BiP は内皮細胞膜表面上での発現が増加することを明らかにした。

#### D. 考察

糖鎖解析技術の進歩に伴い、病態時における糖鎖の生体内挙動および相互作用を示すタンパクの存在が明らかにされてきた。がん罹患時には、特定の糖転移酵素が欠損し、sialyl Lewis x を代表とした特定の糖鎖ががん細胞膜上に蓄積されることがわかっており、血中において過剰発現した糖鎖はがん関連糖鎖抗原と呼ばれ、がんスクリーニングの指標やがん治療後の予後の評価系として用いられている。しかし、がんの早期段階ではその発現が上昇しないため、がんの早期診断マーカーとしては適用できないことが問題となっている。早期がん診断マーカーの開発は、がん死亡率低下や医療費削減などに結びつくことから、バイオマーカーを探索し、その測定方法を確立することの意義は大きい。今回、糖鎖を認識するタンパク質マーカーの検索を行ったが、高感度で得られるタンパク質は見いだせなかった。

一方、我々はグライコミクスより先行するプロテオミクスを用いて腫瘍新生血管に発現する特定タンパク質の解析を進めており、変動が大きいタンパク質を同定してきた。これらの中には糖タンパク質も含まれるため、シュガーチップの使用法を工夫すれば、有効なバイオマーカーの探索を行える可能性もあり、今後の検討課題である。

#### E. 結論

腫瘍のバイオマーカーとして、シュガーチップを用いてがん細胞特有の糖鎖に対する抗体分子やがん細胞からシェディングしてくる糖鎖結合たんぱく質を見出すことを試みたが、バイオマーカーとなるような量的に多いタンパク質分子を得るには至らなかった。しかしながら、実験の過程で、低速限外濾過法によ

りほぼ完全にアルブミン除去できることが明らかとなり、今後の血清サンプル調製に役立つノウハウが得られた。またプロテオーム解析で見いだされた BiP は新しい治療標的としても有効であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yonezawa, S., Asai, T. and Oku, N.: Effective tumor regression by antineovascular therapy in hypovascular orthotopic pancreatic tumor model. *J. Control. Release*, 118, 303-309 (2007).
- 2) Ichikawa, K., Urakami, T., Yonezawa, S., Miyauchi, H., Shimizu, K., Asai, T. and Oku, N.: Enhanced desensitization efficacy by liposomal conjugation of a specific antigen. *Int. J. Pharm.*, 336, 391-395 (2007).
- 3) Fuse, C., Ishida, Y., Hikita, T., Asai, T. and Oku, N.: Junctional adhesion molecule-C promotes metastatic potential of HT1080 human fibrosarcoma. *J. Biol. Chem.*, 282, 8276-8283 (2007).
- 4) Katanasaka, Y., Asai, T., Naitou, H., Ohashi, N. and Oku, N.: proteomic characterization of angiogenic endothelial cells stimulated with cancer cell-conditioned medium. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 2300-2307 (2007).
- 5) Urakami, T., Akai, S., Katayama, Y., Harada, N., Tsukada, H., and Oku, N. Novel amphiphilic probes for [18F]-radiolabeling preformed liposomes and determination of liposomal trafficking by positron emission tomography. *J. Med. Chem.* 50, 6454-6457 (2007).
- 6) Shimizu, K., Sawazaki, Y., Tanaka, T., Asai, T., and Oku, N.: Chronopharmacological cancer treatment with angiogenic vessel-targeted liposomal drug. *Biol. Pharm. Bull.* 31(1)95-98 (2008).

### 2. 学会発表 (シンポジウムなど)

- 1) 奥 直人、市川早苗、浦上武雄、米澤 正、宮内春奈、清水広介、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志：抗原特異的薬物送達技術、Reverse-Targeting DDS (RT-DDS)。第 23 回日本 DDS 学会 2007 年 6 月 14 日 熊本
- 2) 宮内春奈、市川早苗、浦上武雄、米澤 正、清水広介、浅井知浩、奥 直人： Reverse Targeting-DDS(RT-DDS) を用いた抗原特異

的免疫システムの制御。第 23 回日本 DDS 学会 2007 年 6 月 14 日 熊本

- 3) 浦上武雄、赤井周司、片山百合恵、原田典弘、塚田秀夫、奥 直人： ポジトロン断層診断(PET)を用いたリポソーム製剤の非侵襲的リアルタイムイメージング解析技術の開発。第 23 回日本 DDS 学会 2007 年 6 月 14 日 熊本
- 4) 今中宏真、清水広介、小出裕之、浅井知浩、牧野武利、奥 直人： 植物ステロールリポソームの経口投与による癌転移抑制効果について。第 23 回日本 DDS 学会 2007 年 6 月 15 日 熊本
- 5) 小出裕之、今中宏真、清水広介、浅井知浩、牧野武利、奥 直人： シトステロールの腸管での機能解明。第 23 回日本 DDS 学会 2007 年 6 月 15 日 熊本
- 6) 清水広介、宮澤壮一郎、刀坂泰史、浅井知浩、久保直樹、秋田倫幸、丸田福門、宮川眞一、田中俊樹、奥 直人： 標的化リポソームを用いた胃がん由来腹膜播種性転移がんに対する治療。第 23 回日本 DDS 学会 2007 年 6 月 15 日 熊本
- 7) 奥 直人： リポソーム DDS のがん治療への応用。第 25 回物性物理化学研究会。2007 年 6 月 22 日 京都
- 8) Haruna Miyauchi, Kanae Ichikawa, Takeo Urakami, Sei Yonezawa, Kosuke Shimizu, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Tomohiro Asai, Naoto Oku: Antigen-conjugated liposomes enhanced hyposensitization immune therapy with extra-low doses. 34<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 2007 年 7 月 9 日 Long Beach, CA, USA.
- 9) Takeo Urakami, Shuji Akai, Yurie Katayama, Norihiro Harada, Hideo Tsukada, Naoto Oku: New technology for non-invasive real-time imaging of liposome by positron-emission tomography. 34<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 2007 年 7 月 9 日 Long Beach, CA, USA.
- 10) Yasufumi Katanasaka, Tomohiro Asai, Hirotaka Naitou, Norio Ohashi, Naoto Oku: Analysis of BiP protein as a targeting molecule to tumor endothelium for drug delivery system. 34<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 2007 年 7 月 10 日 Long Beach, CA, USA.783.

- 11) Hiromasa Imanaka, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Atsushi Ishikado, Taketoshi Makino, Naoto Oku: Chemoprevention of tumor metastasis by liposomal beta-sitosterol intake. 34<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 2007年7月9日 Long Beach, CA, USA.
- 12) 梅本拓也、角田優花、浅井知浩、出羽毅久、南後 守、奥 直人：新規ポリカチオンリポソームを用いた遺伝子デリバリーシステムの開発。第16回 DDSカンファレンス 2007年7月14日 静岡
- 13) Norihiro Harada, Takeo Urakami, Shuji Akai, Naoto Oku, Hideo Tsukada: Novel [<sup>18</sup>F]labeled probes to evaluate pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipid formulations in vivo with positron emission tomography (PET). Seventh Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry. 2007年9月27日 京都
- 14) Takeo Urakami, Shuji Akai, Yurie Katayama, Mina Yamashita, Norihiko Harada, Hideo Tsukada, Naoto Oku: A Novel Positron-labeling System for Accelerating the Development of Nanomedicines through Micro-dosing tests. Seventh Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry. 2007年9月27日 京都
- 15) Naoto Oku: Application of antineovascular therapy with liposomal DDS on orthotopic pancreatic tumor model. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2007年10月5日 横浜
- 16) 奥 直人、清水広介、清水直美、塚田秀夫：がんの実験的移転に及ぼす長期カテキン摂取の効果。第2回 食品薬学シンポジウム 2007年10月18日 静岡
- 17) Fumika Kan, Haruna Tamano, Hiromasa Itoh, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Preferential dysfunction in the hippocampus in zinc deficiency. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity 2007年10月25日 Crete, Greece
- 18) Mika Kawamura, Haruna Tamano, Hiromasa Itoh, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Increase in depression-like behavior of young rats during zinc deficiency. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity 2007年10月25日 Crete, Greece
- 19) Shingo Kanno, Naomi Sakurada, Akira Minami, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Unique response of extracellular zinc in the ventral hippocampus against novelty. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity 2007年10月25日 Crete, Greece
- 20) Atsushi Takeda, Sayuri Fuke, Naomi Sakurada, Akira Minami, and Naoto Oku: Involvement of zinc in synaptic plasticity and neurodegeneration in the hippocampus via crosstalk with calcium. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity 2007年10月25日 Crete, Greece
- 21) Haruna Tamano, Kan Fumika, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Enhancement of Aggressive Behavior of Young Mice Induced with Social Isolation in Zinc Deficiency. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity 2007年10月25日 Crete, Greece
- 22) Takeo Urakami, Akira T. Kawaguchi, Shuji Akai, Kentaro Hatanaka, Norihiro Harada, Hideo Tsukada, Naoto Oku: Non-invasive real-time imaging of lipid nanoparticles using PET. 2007 JSAO-IFAO Joint Congress. 2007年10月30日大阪
- 23) 鶴田 敦、見城江利也、浅井知浩、前田典之、奥 直人：核酸医薬創成に向けた新規 siRNA 搭載技術の開発。第29回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2007年11月27日仙台
- 24) Hiromichi Imanaka, Hiroyuki Koide, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Naomi Kinouchi Shimizu, Atsushi Ishikado, Taketoshi Makino, and Naoto Oku: Orally Administered Liposomal  $\beta$ -Sitosterol Exerts an Antimetastatic Effect and Enhances NK Activity via IL-12 and IL-18 Induction in the Small Intestine. International Liposome Society 2007 Annual Meeting 2007年12月8日 London, UK.
- 25) Hiroyuki Koide, Kentaro Hatanaka, Atsushi Tsuruta, Tomohiro Asai, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Naoto Oku: T cell-independent B cell response induces accelerated blood clearance phenomenon caused by a repeated injection of PEGylated liposomes. International Liposome Society 2007 Annual Meeting 2007年12月8日 London, UK.

- 26) Atsushi Tsuruta, Eriya Kenjo, Kentaro Hatanaka, Tomohiro Asai, Noriyuki Maeda and Naoto Oku: Development of Novel Engineering Technology for Preparing Liposomal siRNA. International Liposome Society 2007 Annual Meeting 2007年12月8日 London, UK.
- 27) 宮内春奈、市川香苗、米澤 正、浦上武雄、清水広介、浅井知浩、奥 直人：抗原特異的薬物送達技術，Reverse-Targeting DDS (RT-DDS)を用いた免疫システムの制御. 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 2007年12月12日横浜
- 28) 刀坂泰史、浅井知浩、内藤博敬、大橋典男、奥 直人：BiP protein による VEGF-MAPK シグナルの制御第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 2007年12月14日横浜
- 29) 片山百合恵、浦上武雄、赤井周司、山下美菜、原田典弘、塚田秀夫、奥直人：ナノキャリア製剤開発のための新技術：体内動態の PET イメージング解析. 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 2007年12月14日横浜

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」

平成19年度分担研究報告書

ウイルス感染症(ATL)への応用：糖鎖を標的とした成人T細胞白血病の  
新規治療法開発

分担研究者 有馬直道 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

成人T細胞白血病(ATL)細胞膜に発現する糖鎖を認識する抗体を作製し、新規診断治療法の開発を行う事を目的とし、ATL細胞であるS1TFをマウスに免疫し、抗S1TFハイブリドーマを作製し、糖鎖を認識する抗体について検討し、A19-5とA12-3クロンを得た。ともに、S1TFと著明に結合するが、正常ヒト末梢単核球分画との結合性については、A19-5はCD4T細胞およびCD8T細胞とはわずかな結合性が見られるのみであったが、CD14陽性細胞とは強い結合を示した。A12-3は全ての分画の細胞と結合した。糖鎖との結合性については、ともにmannose糖、Glc糖、sialyl酸と結合活性を示した。A19-5の結合する膜抗原は免疫沈降法により分子量4万のあたりに泳動された。ATLに対する抗体療法としては、検討した全てのATL細胞株にA19-5が結合したこと、患者末梢血中のATL細胞の約50%前後が結合したことなどより、抗体療法の候補として、さらなる検討を行う予定である。

A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)は鹿児島を中心に、宮崎、長崎に多発している白血病であり、日本全体では年間に1000人が死亡する極めて治療困難な白血病/リンパ腫である。本疾患は、一旦発症すると従来の抗がん剤による治療には極めて抵抗性であり、現在もっとも優れているというわれるLSGプロトコールでも5年生存率は約17%と極めて低い状況である。従って、いわゆる抗がん剤ではない、それ以外の作用機序による治療薬の開発が急務と成っている。一方、近年の白血病/リンパ腫の一部病型において、細胞膜抗原を標的とした抗体療法(リツキシマブなど)が成功し、他の造血器腫瘍でも抗体療法の開発がおこなわれるようになった。本研究では、ATL細胞に特異的に発現するであ

ろう糖鎖に対する抗体を開発し、新しい診断治療法の開発を目指すものである。

B. 研究方法

ATL患者白血病細胞由来の細胞株S1TFをBalb/cマウスに免疫、常法によりハイブリドーマを得た。増殖して来た細胞をクロン化し、S1TFと染色するクロンを間接免疫蛍光法により48株選択した。

各培養上清を隅田らが開発した表面プラズモン共鳴法(SPR法)による糖鎖チップを用いて糖鎖結合能を検討した。今回の糖鎖チップでは同時に37種類の糖鎖結合物質の活性が検出可能である。なお培養上清中のマウス抗体はmouse monoclonal isotyping kit(MMT1, Serotec LTD)を用いてアイソタイプを検討した。種々の細胞との

結合活性についてはフローサイトメトリー法で検討した。A19-5の結合する膜抗原分子量については、免疫沈降法によりSDS-PAGEで分離し銀染色で検討した。

### C. 研究結果

A19-5 抗体は検討した全ての ATL 細胞株 (S1TF, S1T, Su9T01, K3T, F6T) と著明に結合した。急性リンパ性白血病株の Jurkat, Molt4 では一部もしくは殆ど結合しなかった。骨髄性白血病細胞株 KG1 とも殆ど結合しなかった。ATL 患者試料では、急性型患者と慢性型の患者で30~40%前後の CD4 陽性細胞が結合した。

SPR 法では、A19-5 および A12-3 抗体いずれも、GlcA $\beta$ 1-6Glc-mono と Man $\alpha$ 1-2Man-mono, Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc-mono と結合した。免疫沈降法では、A19-5 抗体により分子量4万前後にバンドが泳動された。

### D. 考察

本研究では48個のハイブリドーマ上清から結合する細胞の特性により、抗体療法の候補として、A19-5を選出した。本抗体の正常のT細胞への結合は極めて少なく、また部分的ではあるが患者ATL細胞には十分結合する活性があり、現時点では抗体療法の候補足り得るものと考えている。

抗原については、現時点でマンノース糖、グルクロン酸糖およびシアル酸に対して結合性がみられ、また免疫沈降法では分子量4万前後にバンドとして泳動された。以上より、A19-5抗体は分子量4万の糖蛋白上の、糖とペプチドとの移行部を認識しているとも考えられる。または、蛋白に対する抗体が、これらの糖にクロスして反応するという可能性も否定はできない。いずれにしても、蛋白を同

定することが、これらの課題を解決に繋がるものと考えられる。現在、この蛋白の同定に向けて準備中である。

### E. 結論

抗 S1TF ハイブリドーマで且つ糖鎖を認識する抗体として A19-5 クロンを得た。A19-5 は細胞株では ATL 細胞株に結合し、他の白血病細胞株とは結合性が少なかった。ATL 患者の CD4T 細胞に対して、30~40%の細胞と結合したが、正常の T 細胞との結合性は極めて低かった。

糖鎖結合性は、マンノース糖、グルクロン酸糖、シアル酸糖と結合性をしめした。免疫沈降法では分子量約4万であった。ATL の抗体療法の候補としてさらに検討する必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Akimoto M, Kozako T, Sawada T, Matsushita K, Ozaki A, Hamada H, Kawada H, Yoshimitsu M, Tokunaga M, Haraguchi H, Uozumi K, Arima N, and Tei C. Anti-HTLV-1 Tax Antibody and Tax-specific Cytotoxic T Lymphocyte are Associated with a Reduction in HTLV-1 Proviral Load in Asymptomatic Carriers. *Journal of Medical Virology*, 79:977-986, 2007.
2. Arimura K, Arima N, Matsushita K, Akimoto M, Park C-Y, Uozumi K, and Tei C. High incidence of morphological myelodysplasia and aototic bone marrow cells in Behcet's disease. *Journal of Clinical Immunology, Journal of Clinical Immunology*, 27:145-151, 2007
3. Owatari S, Uozumi K, Haraguchi K, Ohno N, Tokunaga M, Tokunaga M, Suzuki S, Hanada S, Arima N. A new cytogenetic abnormality,

t(2;7)(33;q36), in acute promyelocytic leukemia.  
Cancer Genetics and Cytogenetics, 174, 71-74,  
2007

4. Akimoto M, Matsushita K, Suruga Y, Aoki N,  
Oaki A, Uozumi K, Tei C, Arima N.  
Clinical manifestations of human T lymphotropic  
virus type I-infected patients with systemic lupus  
erythematosus. Journal of Rheumatology, 34:1841-  
1848, 2007.

5. Ozaki A, Arima N, Matsushita K, Uozumi K,  
Akimoto M, Hamada H, Kawada H, Hourai S,  
Tanaka Y, and Tei C. Cyclosporin A inhibits  
HTLV-1 Tax expression and shows anti-tumor  
effects in combination with VP-16. Journal of  
Medical Virology vol 79, 1906-1913, 2007.

## 2. 学会発表 (シンポジウムなど)

Kozako, T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I,  
Horai S, Akimoto M, Kawada H, Suruga Y,  
Hamada H, Aoki N, Matsushita K, Suzuki S, Uozumi  
K, Arima N. CTL exhaustion in persistent  
HTLV-1 infection and ATLL is restored through  
PD-1/PD-L1 pathway.

49<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual  
Meeting. (Atlanta), December, 2007

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

リンパ系腫瘍性疾患治療剤 (03P015) : 出  
願中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他 (研究に関する新聞記事等)

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」  
平成19年度分担研究報告書

多チャンネル同時計測型局在プラズモン共鳴測定装置の開発

分担研究者 小川智央 (株)モリテックス グライコムクス研究所 研究員

### 概要

光ファイバ技術を応用した局在プラズモン共鳴(LPR)測定装置の試作機を開発した。この装置は生体分子のアフィニティ測定を簡易に行うことを目的とする。抗原抗体反応等のアフィニティ測定を行うバイオセンサとしては、表面プラズモン共鳴(SPR)測定装置が知られている。一般に SPR は大掛かりな光学系と高価なプリズムを必要とし、比較的大型な装置となる。そこで我々は、東京工業大学の梶川助教授の協力を得て、金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴(LPR)効果と光ファイバ技術を応用したバイオセンサの開発を開始した。LPR では従来の SPR よりも測定光学系を小さくすることができ、小型の簡易測定装置が実現可能となる。この装置は SPR と同様に金表面の屈折率変化を測定するため、無修飾のサンプルを用いて、抗原抗体のアフィニティ測定などの用途に用いることができる。また、ファイバの先端で測定を行うためセンシング部が小さく、数 $\mu$ Lといった微量サンプルの測定も可能である。

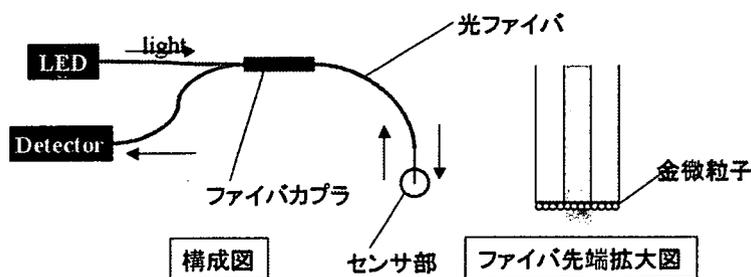


図1 LPR センサの概略図

ファイバ型 LPR 測定装置の構成を図 1 に示した。光源として LED、検出器としてフォトダイオードを用い、光源から光ファイバに入射した光がファイバカプラを通過してセンサ部に到達し、金微粒子に光が照射される。金微粒子により散乱された光は再びファイバからファイバカプラを通り、光検出器によりその強度が測定される。センサファイバ先端には粒径 40nm の金ナノ粒子が固定化され、この粒子に糖鎖リガンドを修飾することによってシュガーチップセンサファイバを作製する。

### 目的

昨年度作製した 8ch 型の LPR 装置を用いた多種類の糖鎖リガンドによる多チャンネル同時測定を行うことを目的として、タンパク質及びウイルスの測定を行った。

## 結果・考察

### センシング部の検討

本年度は、昨年度作製した 8ch 型 LPR 装置 (図 1 a) を用いて全ての測定を行った。このセンシング部は 8 本の独立したファイバを操作する必要があるため、煩雑であるという問題点がある。そこで、センシング部をまとめて操作するためにバンドル状の光ファイバであるイメージガイド (図 1 b)、光ファイバを石英ガラスで挟んだ構造を持つファイバアレイ (図 1 c) を用いることを検討した。

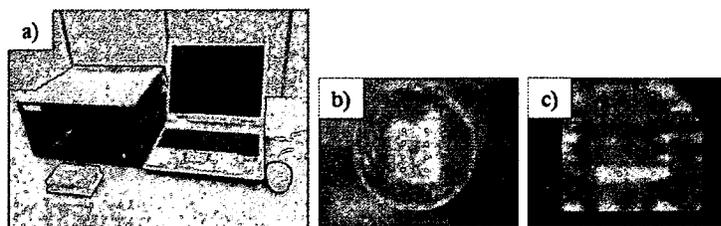


図 1 a) 8ch 型 LPR 装置、b) イメージガイド、c) ファイバアレイ

その結果、イメージガイドにおいては装置側のファイバとファイバ径が異なることに起因する 40%近い光量損失が見られ、さらにファイバ間でクロストークが 1%あることなどから、この測定用途には適さないことが分かった。ファイバアレイにおいては、光量のロス及びクロストークは起こらず、測定時の取り扱いも容易なことから、本用途に適していると判断した。実際の測定では独立したファイバを用いた結果よりばらつきの少ない安定した結果が得られていることから、測定結果の安定性向上にも寄与するものと考えている。ファイバアレイ上のファイバそれぞれに別のリガンドを固定する方法としては、スポットティング方式を検討している。

### 8ch 型 LPR 装置を用いた糖鎖-タンパク質測定

センシング用光ファイバ(バラの 8 本のファイバ)に 8 種類の糖鎖リガンド複合体 (図 3) を修飾して光ファイバ型シュガーチップを作製し、糖鎖を認識するタンパク質であるレクチン 6 種類 (RCA120, Con A, LOTUS, Jacalin, UEA-1, WGA) の測定を行った。ここではその一例として、 $\beta$ -Galactose 認識レクチンである RCA120 の測定結果を図 4 に示した。

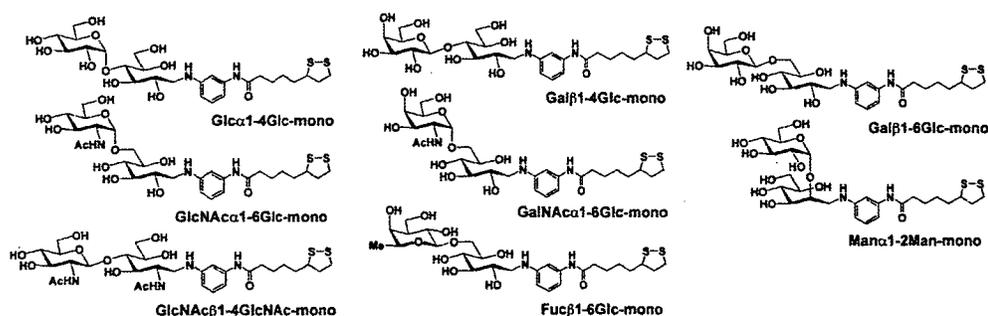


図 3 タンパク質測定に用いた 8 種類の糖鎖リガンド複合体

RCA120 [ $\beta$ -Gal, 120 kDa (4)]

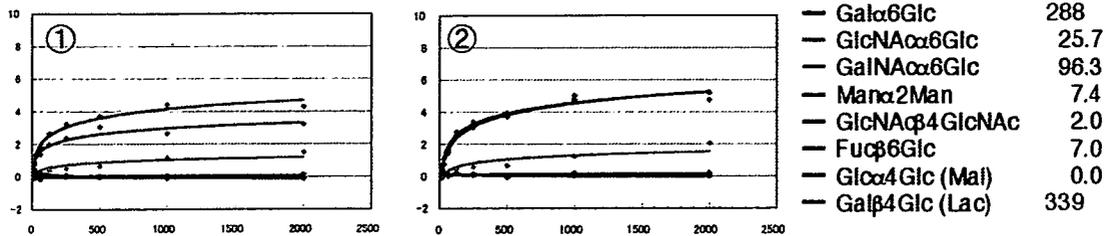


図4 糖鎖リガンドとレクチン(RCA120)のアフィニティ測定結果

測定は 2 回行い (①、②)、グラフの横軸に測定したタンパク質の濃度、縦軸に変化率(%)をとり、結合曲線を描いた。図 4 の右にはそれぞれのチャンネルにつけた糖鎖リガンドの種類、参考データとして SPR 測定により得られた糖鎖リガンドと RCA120 との結合強度値を示した。これらの結果より、まだ測定によるバラつきはあるものの、得られる結果自体は SPR の測定結果と同等であることが分かった。

8ch 型 LPR 装置を用いた糖鎖-ウイルス測定

センシング用光ファイバ(バラの 8 本のファイバ)にインフルエンザウイルスが認識する 8 種類の糖鎖リガンド複合体 (図 5) を修飾して光ファイバ型シュガーチップを作製し、A 型インフルエンザウイルス 3 種類の測定を行った。その一例として Duck(H3N2)株の測定結果を図 6 に示した。サンプル溶液は 100  $\mu$ L、ウイルス濃度は 25HAU、50HAU、100HAU の 3 条件で測定を行った。その結果、SPR で同様の測定をした結果と比較してシグナルが小さい、バラつきが大きいという結果となった。今回の測定では良好な結果が得られなかったが、これはサンプル溶液の攪拌を行っていないこと、センシング部の構造がバラのファイバであること、金ナノ粒子の物性による検出感度の問題など、複合的な要因によるものと考えられ、今後測定方法をウイルス測定に適した条件に改良することにより、より良好な結果が得られると考えられる。

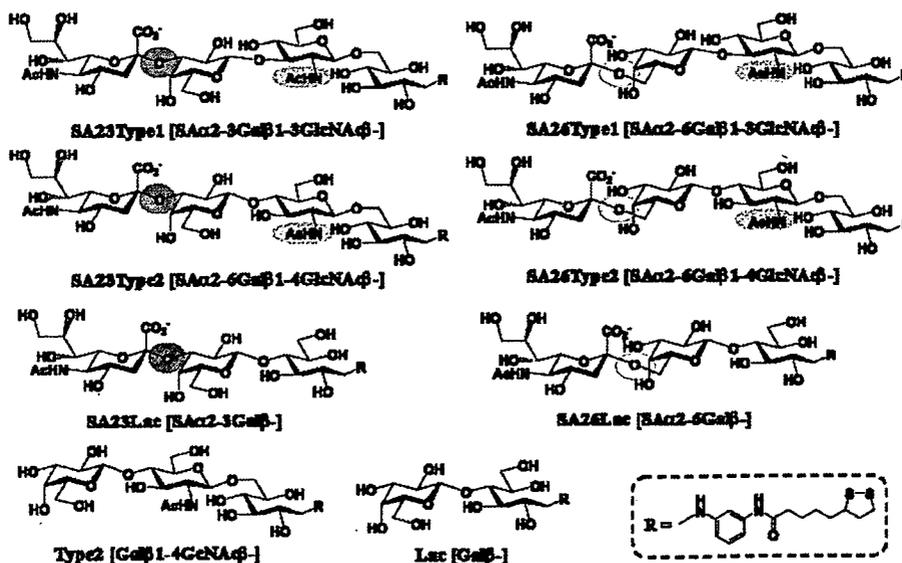


図5 ウィルス測定に用いた 8 種類の糖鎖リガンド複合体

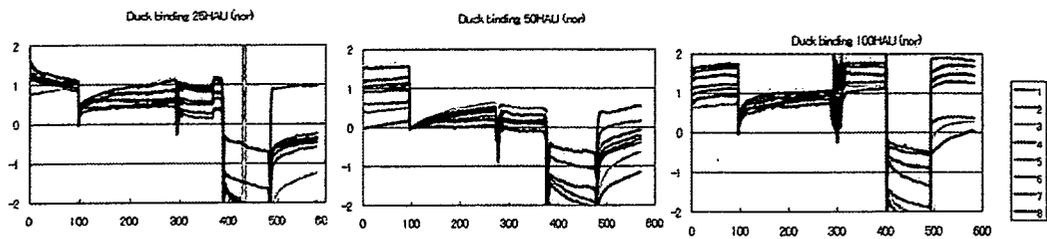


図6 糖鎖リガンドによるウィルスの測定結果(一例)

#### まとめ

8ch 型 LPR 装置と、糖鎖リガンド複合体を固定化した光ファイバ型シュガーチップを用いて、タンパク質及びウィルスの多チャンネル同時測定を行った。その結果、タンパク質測定では SPR と同レベルの測定ができることが示された。ウィルス測定では SPR より劣る結果となったが、今後の改良により同等の測定ができることが期待される。

#### 知的所有権の出願・登録状況等

特になし。

研 究 成 果 の 刊 行 に 関 す る 一 覧 表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
隅田泰生	糖鎖アレイ	伊藤嘉浩	マイクロアレイ・バイオチップの最新技術、第12章	(株) シーエムシー	東京都	2007	253-259
Ando, T., Imamura, A., Ishida, H. and Kiso, M.	Synthesis of glycolipids	J. P. Kamerling	Comprehensive Glycoscience	Elsevier	Oxford	2007	797-813

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Hashimoto, M. Furuyashiki, R. Kaseya, Y. Fukada, M. Akimaru, K. Aoyama, T. Okuno, T. Tamura, T. Kirikae, F. Kirikae, N. Eiraku, H. Morioka, Y. Fujimoto, K. Fukase, K. Takashige, Y. Moriya, S. Kusumoto, Y. Suda	Evidence of immunostimulating lipoprotein co-existing in natural lipoteichoic acid fraction	<i>Infect. Immun.</i>	75,4	1926-1932	2007
Y. Fujimoto, M. Iwata, N. Imakita, A. Shimoyama, Y. Suda, S. Kusumoto, K. Fukase	Synthesis of immunoregulatory Helicobacter pylori lipopolysaccharide partial structures	<i>Tetrahedron Lett.</i>	48	6577-6581	2007
H.Kariya, A. Kiyohara, S. Masuda, Y. Yoshihara, M. Ueno, M. Hashimoto, Y. Suda	Biological roles of carboxymethyl-chitin associated for the growth factor production	<i>J. Biomed. Mater. Res.</i>	83A	58-63	2007
M. Hashimoto, K. Takashige, M. Furuyashiki, K. Yoshidome, R. Sano, Y. Kawamura, S. Ijichi, H. Morioka, H. Koide, N. Oku, Y. Moriya, S. Kusumoto, Y. Suda	Enhancement of antitumor activity of OK-432 (Picibanil) by Triton X-114 phase partitioning	<i>International Immunopharmacology</i>	8	12-19	2008
N. Sasaki, K. Okishio, K. Ui-Tei, K. Saigo, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, T. Nishimura, Y. Suda, M. Hayasaka, K. Hanaoka, S. Hitoshi, K. Ikenaka, and S. Nishihara	Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells	<i>J. Biol. Chem.</i>			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Wakao, A. Saito, K. Ohishi, Y. Kishimoto, T. Nishimura, M. Sobel, Y. Suda	Sugar Chips Immobilized with Synthetic Sulfated Disaccharides of Heparin/Heparan Sulfate Partial Structure	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>			in press
S. Nakamura-Tsuruta, Y. Kishimoto, T. Nishimura and Y. Suda	One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar-immobilized Gold Nano-Particles (SGNPs)	<i>Journal of Biochemistry</i>			in press
Takahashi R, Ishihara H, Takahashi K, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Katagiri H, Oka Y.	Efficient and controlled gene expression in mouse pancreatic islets by arterial delivery of tetracycline- inducible adenoviral vectors	<i>J. Mol. Endocrinol.</i>	38	127-36	2007
Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Sasano H, Nakauchi H, Oka Y, Katagiri H.	Bone Marrow (BM) Transplantation Promotes Beta Cell Regeneration after Acute Injury through BM Cell Mobilization	<i>Endocrinology</i>	148	2006-15	2007
Yamada T, Katagiri H.	Avenues of Communication between the Brain and Tissues/Organs Involved in Energy Homeostasis	<i>Endocrine J</i>	54	497-505	2007
Katagiri H, Yamada T, Oka Y.	Adiposity and Cardiovascular Disorders: Disturbance of the Regulatory System Consisting of Humoral and Neuronal Signals	<i>Circ Res</i>	101	27-39	2007
Ono H, Sakoda H, Fujishiro M, Anai M, Kushiyaama A, Fukushima Y, Katagiri H, Ogihara T, Oka Y, Kamata H, Horike N, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T	Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP) induces AKT activation, thereby enhancing anti-apoptotic, glycogen synthetic and glucose uptake pathways	<i>Am J Physiol Cell Physiol</i>	293	C1576-85	2007
Yamada T, Imai J, Ishigaki Y, Hinokio Y, Oka Y, Katagiri H.	Possible relevance of HLA-DRB1*0403 haplotype in insulin autoimmune syndrome induced by $\alpha$ -lipoic acid, used as a dietary supplement	<i>Diabetes Care</i>	30	e131	2007
Yamada T, Oka Y, Katagiri H	Communications between the Brain and Peripheral Tissues/Organs Involved in Energy Homeostasis -Potential Therapeutic Targets for Obesity and Metabolic syndrome	<i>Pharmacol Ther</i>	117	188-98	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okimoto H, Ishigaki Y, Koiwa Y, Hinikio Y, Ogiwara T, Suzuki S, <b>Katagiri H.</b> , Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, Oka Y	A novel method for evaluating human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes	<i>Atherosclerosis</i>	196	391-7	2008
Nedachi T, Kadotani A, Ariga M, <b>Katagiri H</b> , Kanzaki M	Ambient Glucose Levels Qualify the Potency of Insulin Myogenic Actions by Regulating SIRT1 and FoxO3a in C2C12 myocytes	<i>Am J Physiol Endocrinol Metab.</i>			in press
Ariga M, Nedachi T, <b>Katagiri H</b> , Kanzaki M	Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes	<i>J Biol Chem.</i>			in press
Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, <b>Katagiri H</b> , Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N, Oka Y	ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic Beta Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress	<i>Cell Metab.</i>			in press
Fujikawa, K., <b>Ishida, H.</b> and Kiso, M.	Synthesis of ganglioside GM3 analog carrying phytoceramide by employing intramolecular glycosylation as a key reaction	<i>Carbohydr. Res.</i>			2008, submitted
Imamura, A., Yoshikawa, T., Komori, T., Ando, M., Ando, H., Wakao, M., Suda, Y., <b>Ishida, H.</b> , Kiso, M.	Design and synthesis of versatile ganglioside probes for carbohydrate microarrays	<i>Glycoconjugate J.</i>			2008, in press
Imamura, A., Ando, H., <b>Ishida, H.</b> , Kiso, M.	DTBS(di-tert-butylsilylene)-directed $\alpha$ -galactosylation for the synthesis of biologically relevant glycans	<i>Current Organic Chem.</i>			2008, in press
Yoshikawa, T., Kato, Y., Yuki, N., Yabe, T., <b>Ishida, H.</b> and Kiso, M.	A highly efficient construction of GM1 epitope tetrasaccharide and its conjugation with KLH	<i>Glycoconjugate J.</i>			2008, in press
Komori, T., Ando, T., Imamura, A., Li, Y.-T., <b>Ishida, H.</b> and Kiso, M.	Design and efficient synthesis of novel GM2 analogues with respect to the elucidation of the function of GM2 activator	<i>Glycoconjugate J.</i>			2008, in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Magesh, S., Moriya, S., Suzuki, T., Miyagi, T., <b>Ishida, H.</b> and Kiso, M.	Design, synthesis, and biological evaluation of human sialidase inhibitors. Part 1: Selective inhibitors of lysosomal sialidase (NEU1)	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> ,	18	532-537	2008
Yoon, S.-J., Ikeda, S., Sadilek, M., Hakomori, S., <b>Ishida, H.</b> and Kiso, M.:	Self-recognition of N-linked glycans with multivalent GlcNAc, determined as ceramide mimetic conjugate	<i>Glycobiology</i>	17	1007-1014	2007
Ishibashi, Y., Nakasone, T., Kiyohara, M., Horibata, Y., Sakaguchi, K., Hijikata, A., Ichinose, S., Omori, A., Yasui, Y., Imamura, A., <b>Ishida, H.</b> , Kiso, M., Okino, N. and Ito, M.	A novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides	<i>J. Biol. Chem.</i>	282(15)	11386-11396	2007
Yu, J., Sawada, T., Adachi, T., Gao, X., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., <b>Ishida, H.</b> , Kiso, M. and Tsubata, T	Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	360	759-764	2007
Sawada, T., Hasimoto, T., Nakano, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kawaoka, Y., <b>Ishida, H.</b> and Kiso, M.	Influenza viral hemagglutinin complicated shape is advantageous to its binding affinity for sialosaccharide receptor	Biochem. Biophys. Res. Commun.	355	6-9	2007
Takaku, H., Ishida, H.-K., Fujita, M., Inazu, T., <b>Ishida, H.</b> and Kiso, M.	A chemical synthesis of GlcNAc $\beta$ (1-4)GlcUA-UDP to elucidate to catalytic mechanism of hyaluronic acid synthesis (HAS)	<i>Synlett</i>	5	818-820	2007
Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Kaseya, R., Fukuda, Y., Akimaru, M., Aoyama, K., <b>Okuno, T.</b> , Tamura, T., Kirikae, T., Kirikae, F., Eiraku, N., Morioka, H., Fujimoto, Y., Fukase, K., Takashige, K., Moriya, Y., Kusumoto, S., Suda Y	Evidence of immunostimulating lipoprotein existing in the natural lipoteichoic acid fraction.	<i>Infect. Immun.</i>	75	1926-1932	2007
Otani, N. and <b>Okuno, T</b>	Human herpesvirus 6 infection of CD4(+) T-Cell subsets.	<i>Microbiol Immunol.</i>	51	993-1001	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue M, Kato K, Matsuhashi H, Kizuka Y, Kawasaki T, and Oka S.	Distributions of glucuronyltransferases, GlcAT-P and GlcAT-S, and their target substrate, the HNK-1 carbohydrate epitope in the adult mouse brain with or without a targeted deletion of the GlcAT-P gene	<i>Brain Res</i>	1179	1-15	2007
Kato K.	Glycobiological approach to understanding neural plasticity	<i>Trends in glycoscience and glycotechnology</i>	19	97-110	2007
Yonezawa, S., Asai, T. and Oku, N.	Effective tumor regression by antineovascular therapy in hypovascular orthotopic pancreatic tumor model	<i>J.Control. Release</i>	118	303-309	2007
Ichikawa, K., Urakami, T., Yonezawa, S., Miyauchi, H., Shimizu, K., Asai, T. and Oku, N.	Enhanced desensitization efficacy by liposomal conjugation of a specific antigen	<i>Int.J.Pharm.</i>	336	391-395	2007
Fuse, C., Ishida, Y., Hikita, T., Asai, T. and Oku, N.	Junctional adhesion molecule-C promotes metastatic potential of HT1080 human fibrosarcoma	<i>J. Biol. Chem.</i>	282	8276-8283	2007
Katanasaka, Y., Asai, T., Naitou, H., Ohashi, N. and Oku, N.	Proteomic characterization of angiogenic endothelial cells stimulated with cancer cell-conditioned medium	<i>Biol.Pharm.Bull.</i>	30	2300-2307	2007
Shimizu, K., Sawazaki, Y., Tanaka, T., Asai, T., and Oku, N.	Chronopharmacological cancer treatment with angiogenic vessel-targeted liposomal drug	<i>Biol.Pharm.Bull.</i>	31	95-98	2008
Urakami, T., Akai, S., Katayama, Y., Harada, N., Tsukada, H., and Oku, N.	Novel amphiphilic probes for [ <sup>18</sup> F]-radiolabeling preformed liposomes and determination of liposomal trafficking by positron emission tomography	<i>J.Med.Chem.</i>	50	6454-6457	2007
Asai, T., Yonezawa, S., and Oku, N.	Tumor angiogenesis-targeted liposome	<i>Mebio Oncology</i>	4	48-57	2007
Urakami, T. Oku, N	Current status of siRNA drug delivery technology and siRNA	<i>Open Drug Delivery Rev.</i>	1	1-7	2007
Urakami T. and Oku, N.	Imaging technology for the research and the development of DDS nanocarriers and nanomedicines	<i>Drug Delivery System</i>	23	40-48	2008