

関連会議

会議	日 時	場 所	参加グループ	主 題
1	平成 19 年 4 月 7 日	東京理科大	理科大・アロカ	バブル音響試験報告他
2	平成 19 年 5 月 25 日	東京理科大	理科大・アロカ	バブル安定性評価結果の検討
3	平成 19 年 6 月 14 日	慈恵医大	慈恵医大・理科大・アロカ、 東大	第 1 回班会議
4	平成 19 年 6 月 16 日	東京理科大	理科大・アロカ	蛍光リン脂質バブルの共焦点 レーザー顕微鏡観察結果他
5	平成 19 年 7 月 25 日	東京理科大	理科大・アロカ	高次高調波によるバブル検出 技術／重合性ジェミニ型陰 イオン界面活性剤による重合 バブル調整
6	平成 19 年 8 月 28 日	東京理科大	理科大・アロカ	超音波診断用微小気泡の調製と 物性
7	平成 19 年 9 月 25 日	東京理科大	理科大・アロカ	抗体標識バブルの生成実験 結果報告／Joint Molecular Imaging Conference 報告
8	平成 19 年 11 月 09 日	東京理科大	理科大・アロカ	抗原標識ビーズを用いた超音波に よる集積性確認実験結果
9	平成 19 年 11 月 13 日	慈恵医大	慈恵医大・理科大・アロカ、 東大、Dr. F. Braet	第 2 回班会議
10	平成 20 年 3 月 22 日	慈恵医大	慈恵医大・理科大・アロカ、 明治大、東大	第 3 回班会議

平成19年度厚生労働省研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究）大川班
－超音波分子イメージングプロジェクト－ 第1回会議

平成19年6月14日（火曜日）午後6時30分－8時00分
東京慈恵会医科大学・GH会議室

研究課題：ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発

1. 主任研究者・大川 清教授 挨拶
2. 予算配分および事務手続き上の留意点
3. 分子イメージング研究の現状について（アロカ株式会社・射谷和徳）
4. 超音波造影剤の開発状況について（東京理科大学・土屋好司）
5. CD147 関連研究の進行状況（東京慈恵会医科大学・大川 清）
6. バイオリアクターを用いた評価系（東京慈恵会医科大学・松浦知和）
7. その他

流動研究員：土屋好司（東京理科大学）

協力研究者：今野剛人（アロカ（株）研究所）、近藤保、坪根和幸、酒井俊郎（東京理科大学）、
朝倉正、青木勝彦、今津博雄、斉藤勝也、西岡真樹子、中田典生、瀬嵐康之、
間森 徹、上田 和（東京慈恵会医科大学）

大学院：永妻啓介、藤原和慶

目標

1. 抗CD147抗体ラベルマイクロ・ナノバブルの完成
2. 癌モデルでの集積性の証明と超音波での画像化
3. アプタマーの作成

平成20年度の新規申請（11月頃）

学会発表

1. 日本生体医工学会（射谷さん、仙台、5月）
2. 第2回日本分子イメージング学会（中田先生、福井、6月）
3. The Joint Molecular Imaging Conference（今野さん、USA、9月）
4. 色材協会創立80周年記念会議（土屋先生、東京、9月）
5. 第46回日本油化学会年会（藤原君、京都、9月）

平成 19 年度厚生労働省科学研究費補助金（医療機器開発推進事業：ナノメディシン研究）
ー超音波分子イメージングプロジェクトー 大川班 第 2 回会議

日時：平成 19 年 11 月 13 日火曜日 午後 2 時－午後 5 時

場所：東京慈恵会医科大学附属病院・中央棟 8 階会議室

研究課題：ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発

1. 挨拶（主任研究者：東京慈恵会医科大学・大川 清）
2. 事務連絡
3. 抗 CD147 抗体標識バブルの作製（東京理科大学・土屋好司、阿部正彦） 14:10-14:30
4. ナノバブルの高感度超音波検出法の検討（アロカ株式会社・今野剛人、射谷和徳）
14:30-14:50

コーヒーブレイク 14:50-15:10

5. 3 次元固形癌モデルを用いた造影超音波実験（東京理科大学・藤原和慶）
15:10-15:30

6. 話題提供

- ① シドニー大学でのマイクロ CT を用いた 3 次元固形癌モデルの解析
（東京慈恵会医科大学・永妻啓介） 15:30-15:50
- ② ナノゴールド粒子をラベルしたリポソームの開発（東京理科大学・酒井俊郎）
15:50-16:10
- ③ CD147 認識アプタマーの作製（東京慈恵会医科大学・青木勝彦） 16:10-16:30

7. 総合討論 16:30-17:00

情報交換会 17:00-18:30 (Wine & Cheese)

Filip Braet 博士セミナー 19:00-20:00 南講堂

From live cell imaging to advanced molecular microscopy techniques: bridging the temporal and spatial resolution gap.

平成 19 年度厚生労働省科学研究費補助金（医療機器開発推進事業：ナノメディシン研究）
－超音波分子イメージングプロジェクト－ 大川班 第 3 回会議

日時：平成 20 年 3 月 22 日 土曜日 午後 2 時－午後 5 時 30 分

場所：東京慈恵会医科大学・西講堂（正面玄関から右奥）

研究課題：ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発

1. 分子ターゲットとしての CD147（東京慈恵会医科大学・青木勝彦、朝倉正、大川清）
14:00-14:30
2. 抗体標識微小気泡の調製と超音波分子イメージング
（東京理科大学・藤原和慶、土屋好司、阿部正彦）
14:30-15:00
3. バブル高感度画像化技術の開発（アロカ株式会社研究所・今野剛人、射谷和徳）
15:00-15:30

- コーヒープレイク 15:30-15:40
4. 話題提供
CD147（basigin）のマウス組織内分布の免疫組織学的解析
東京大学・大学院農学生命科学研究科・日下部守昭 先生
15:40-16:00
5. 教育講演
造影超音波検査の現状と超音波分子イメージングへの期待
東京慈恵会医科大学・放射線科・中田典生 先生
16:00-16:30
6. 特別講演
演題：バイオナノマテリアルとしての高分子結合性ペプチドの開発
講演者：東京大学・先端科学技術研究センター・バイオナノマテリアル分野・准教授
芹沢 武 先生
司会：明治大学理工学部 相澤 守 先生
16:30-17:30

ご挨拶（主任研究者：東京慈恵会医科大学・大川 清）

情報交換会 18:00-20:30（芝パークホテル別館 2 階、アイビー）
電話 01-3433-4141

Ⅱ 分担研究報告

1. 超音波造影剤作成に向けた分子標的性向上に向けた研究 -----	69
分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授	
協力研究者 朝倉 正 東京慈恵会医科大学 講師	
協力研究者 青木勝彦 東京慈恵会医科大学 助教	
2. 細胞内在性 RNA アプタマーと -----	75
標的 RNA 結合タンパク質の相互作用の機能解析	
分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 教授	
流動研究員 堀谷 学 財団法人医療機器センター・東京慈恵会医科大学	
3. プタ腺を用いた膵組織に対する超音波内視鏡下 -----	78
Hot Saline 注入法 (E-Hot) の基礎的研究	
分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授	
協力研究者 今津博雄 東京慈恵会医科大学 講師	
4. 消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 -----	80
分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師	
5. 子宮頸部腫瘍における CD147 発現解析 -----	82
分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師	
協力研究者 上田 和 東京慈恵会医科大学 助教	
6. CD147 (basigin) のマウス組織内分布の免疫組織学的解析 -----	84
分担研究者 日下部守昭 財団法人動物繁殖研究所 主席研究員	
7. <i>In vitro</i> 三次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究 -----	87
分担研究者 相澤 守 明治大学理工学部 准教授	
8. X線マイクロ CT を用いた単分散リン脂質マイクロバブル及び -----	91
金ナノ粒子標識リポソームを還流した	
3次元培養モデルの微細形態の解析	
分担研究者 松浦知和 東京慈恵会医科大学 講師	
分担研究者 相澤 守 明治大学理工学部 准教授	
協力研究者 永妻啓介 東京慈恵会医科大学 大学院	
9. 抗 CD147 抗体標識微小気泡の調製およびその超音波分子イメージング ----	95
分担研究者 阿部正彦 東京理科大学理工学部 教授	
分担研究者 酒井秀樹 東京理科大学理工学部 准教授	
流動研究員 土屋好司 財団法人医療機器センター・東京理科大学	
10. 超音波分子イメージング装置に関する研究 -----	100
分担研究者 伊藤貴司 アロカ(株)研究所 主幹研究員	
分担研究者 射谷和徳 アロカ(株)研究所 主幹研究員	
11. 造影超音波検査の現状と超音波分子イメージングへの期待 -----	103
分担研究者 宮本幸夫 東京慈恵会医科大学 放射線科 准教授	
協力研究者 中田典夫 東京慈恵会医科大学 放射線科 講師	

1. 超音波造影剤作成に向けた分子標的性向上に向けた研究

分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授

協力研究者 朝倉 正 東京慈恵会医科大学 講師

協力研究者 青木勝彦 東京慈恵会医科大学 助教

本年度はマウス抗ヒトCD147モノクロン抗体に代わりより分子親和性の高い安定なCD147アプタマー開発を主実験の1つとし、その中から有望な塩基配列が獲得できる可能性が示された。また超音波造影に向けた抗CD147抗体のバブルへの標識の可能性を証明するために、抗体に代え蛍光タンパク質を標識して、バブルを可視化しバブルへの組み込み効率などを確認できた。また抗CD147抗体標識バブルの細胞表面の標的分子であるCD147分子への特異的な集積性を調べる目的で、抗CD147抗体標識リポソームを作製して、培養細胞への集積性と抗癌剤内封による分子標的の特異的抗腫瘍効果発現を調べ、抗CD147抗体標識リポソームは短時間の薬剤接触実験にも関わらずCD147発現腫瘍細胞に特異的に集積し、包含抗癌剤の抗腫瘍効果はCD147発現腫瘍細胞で特異的に高く今後の開発に向けた方向性が確認できた。

実験 1.

CD147 認識 RNA アプタマーの作成

A. 研究目的

CD147 の検出感度を向上させるために、Mab12C3 抗体よりも高親和性の RNA アプタマーを作成する。

B. 研究方法

1. RNA プールの作成

60 塩基のランダム配列の両端に特異的なプライマー配列を有する、3 種類の DNA プールを用意した。それぞれの DNA プールを鋳型として、in vitro 転写キット（DuraScribe T7 Transcription Kit, EPICENTRE Biotechnologies）を用いて RNA ライブラリーを合成した。ここで合成される RNA はピリミジン塩基の 2'水酸基がフッ素に置換された修飾型 RNA であり、RNase に対して抵抗性を示す。

2. アプタマーの選別

5×10^{14} 分子の RNA を初期プールとして、CD147 に結合するアプタマーの選別を行った。選別に使用したタンパク質は昨年度に作成した CD147 の細胞外ドメインとウサギ IgG の Fc 領域とのキメラタンパク質

（His タグ付き）である。このキメラタンパク質を Protein G Sepharose レジンおよび TALON レジンに結合させ、RNA プールの中から CD147 と結合するものを B/F 分離により選別した。また、キメラタンパク質を HRV C3 プロテアーゼで消化した後に CD147 の細胞外ドメインを精製し、それを NHS-activated Sepharose レジンに共有結合させたものも同様の選別に用いた。B/F 分離によって選別された RNA は逆転写され、それを鋳型とした PCR によって増幅される。増幅された DNA は in vitro 転写反応の鋳型となり、次世代の RNA プールが合成される。この RNA プールから再度 CD147 と結合するものを B/F 分離により選別した。このようなサイクルを 9 回繰り返した。選別に使用するレジンはサイクルごとに切り替えた。また、Fc 領域やレジンに対して結合する RNA 分子を排除するため、各サイクルでの CD147 を用いた選別の前に、Fc 領域のみをレジンに結合させたものでネガティブ選別を行った。

3. アプタマーのクローニング

9 サイクル後に CD147 を固定したレジンに結合していた RNA を逆転写し、それを鋳型として PCR を

行った。増幅した DNA 断片を TA クローニングにてプラスミドに挿入し、大腸菌へ形質転換した。シングルコロニーからプラスミドを回収し、個々のクローンに対して塩基配列を解読した。

C. 研究結果

9 サイクル目のポジティブ選択 (CD147 固定化レジン) とネガティブ選択 (Fc 固定化レジン) 由来の RNA を逆転写し、PCR を用いてそれぞれの増幅効率の違いを検討した。3 種類の DNA プールのうち、1 種類でポジティブ選択とネガティブ選択との間に PCR 増幅サイクル数の優位な差を認めた。(図 1)

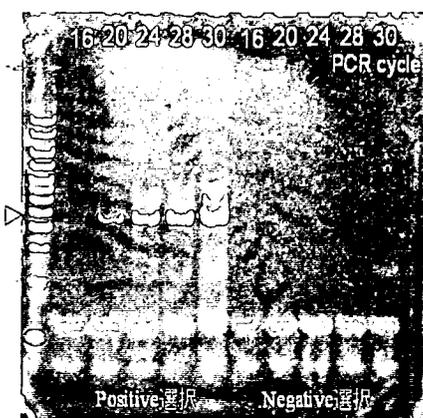


図1. レジンに結合したRNAiに対するRT-PCR

ポジティブ選択ではPCRによるDNAの増幅が観察されるが、ネガティブ選択では増幅が見られない。

ポジティブ選択で増幅された DNA 断片をクローニングし、187 個のクローンについて塩基配列を解読した。ClustalW にて系統樹を作成したところ、13 のファミリーに分類できた。(図 2)

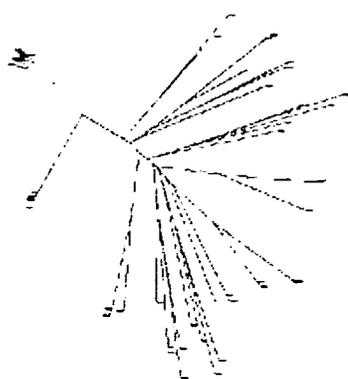


図2. ポジティブ選択によって得られたクローンの系統樹

187個のクローンは3のファミリーに分類された。

D. 考察

今年度の研究では、CD147 結合レジンと親和性のある RNA 集団から多数のクローンを取得することができた。現在、これらのクローンから合成した RNA と CD147 タンパク質との直接的な結合を、BIACORE を

用いて解析しているが、既に解析が終了した 5 つのクローンについては CD147 との結合は観察されなかった。今後は残りのクローンについて解析を行なっていく。CD147 タンパク質に対するアプタマーが得られた後は、そのアプタマーが癌細胞表面の CD147 を認識可能かどうか、さらなる解析を行なっていく必要がある。今回使用した CD147 タンパク質には成熟した糖鎖が付加されていないため、本研究から得られるアプタマーが細胞表面の CD147 を認識できないことも考えられる。そのような場合は成熟型の糖鎖を持つ CD147 を発現する細胞に対してアプタマーの取得を試みる必要があるだろう。

今年度の研究から、リコンビナントタンパク質に対するアプタマー取得に関する実験系の基盤が整備された。それにより、CD147 以外の分子を標的としたラベル化造影剤の開発への道が開けたという点で、本研究の結果は重要である。本研究は東京大学・医科学研究所・基礎医科学部門・遺伝子動態分野の中村義一教授と大内将司助教との共同研究により行われた。

E. 結論

リコンビナントタンパク質に対するアプタマー取得に関する実験系の基盤が整備され、CD147 固定化レジンに親和性を有する RNA 集団がクローニングされた。CD147 に対するアプタマーがこの集団内に含まれる可能性は高いと考えられる。今後は細胞表面に発現する成熟糖鎖結合型の CD147 に対するアプタマーの更なる検索を行なう必要がある。また、CD147 以外の標的タンパク質に対するアプタマーの取得も視野に入れる必要があると考えられる。

実験 2.

A. 研究目的

抗CD147抗体のバブルへの標識の可能性を証明するために、抗体に代え蛍光タンパク質を標識して、バブルを可視化することで確認する。なお本研究は東京理科大、アロカ研究所チームへの協力実験でありCの一部、D、E、Fの各項はそちらに記す。

B. 研究方法

1. 材料

Distearyl phosphatidylethanolamine-polyethylenglycol (DSPE-PEG)-maleimide (MW: 5kD)、DSPE-PEG-NHS (MW: 3kD)は日本油脂から購入した。GFP (recombinant His-tag-GFP)、抗CD147抗体 (Mab12C3, aCD147ab) は当研究室で調製した。

2. 蛍光タンパク質および抗体標識リン脂質の作製

(1) DSPE-PEG-GFP:

DSPE-PEG-maleimide 1 mg と GFP 1 mg を 300 μ l 0.1M KPB (pH 6.5)で室温、一昼夜反応させる。反応後、ゲルろ過 (Sephadex G-100) で DSPE-PEG-GFP と未反応の GFP を分取する。DSPE-PEG-GFP は void volume 直後に溶出され、その後 GFP が溶出される。

(2) DSPE-PEG-Keima-Red:

1 mg DSPE-PEG-NHS と 1 mg Keima-Red を 300 μ l 0.1M KPB (pH 8.0)で室温、一昼夜反応させる。反応後、ゲルろ過 (Sephadex G-100) で DSPE-PEG-Keima-Red と未反応の Keima-Red を分取する。DSPE-PEG-Keima-Red は void volume 直後に溶出され、その後 Keima-Red が溶出される。

(3) DSPE-PEG-aCD147ab:

1 mg DSPE-PEG-NHS と 1 mg aCD147ab を 300 μ l 0.1M KPB (pH 8.0)で室温、一昼夜反応させる。反応後、ゲルろ過 (Sephacryl S-300HR)で DSPE-PEG-aCD147ab と未反応の aCD147ab を分取する。DSPE-PEG-aCD147ab は void volume に、未反応の aCD147ab は void volume 直後に溶出される。

3. シクロアミロースバブルへの蛍光タンパク質および抗体の標識

30%グリセリン水溶液に、0.08mM シクロアミロース修飾界面活性剤、0.004mM 蛍光タンパク質または抗体標識リン脂質を混合し、内包ガス：六フッ化硫黄(SF₆)にてバブルを発生させる。

C. 研究結果

1. GFP 標識バブル

DSPE-PEG-GFP をバブルに標識し、共焦点レーザー顕微鏡で励起波長 475nm、蛍光波長 505nm で観察すると、バブルの像(図1)が認められたが、この蛍光は GFP 非標識バブルでも観察された。蛍光波長

スペクトルを調べると、励起光がバブルにより散乱し、その波長が 550nm 以上にまで及んでいることが判明した(図2)。そこで、励起波長と蛍光波長の差の著しく蛍光波長領域に散乱光の影響のない Keima-Red を用いて検討した。

2. Keima-Red 標識バブル

DSPE-PEG-Keima-Red をバブルに標識し、共焦点レーザー顕微鏡で励起波長 440nm、蛍光波長 620nm で観察すると、図3のように各断面でリング状のバブルの像が認められ、バブルにタンパク質を標識できることが確認された。

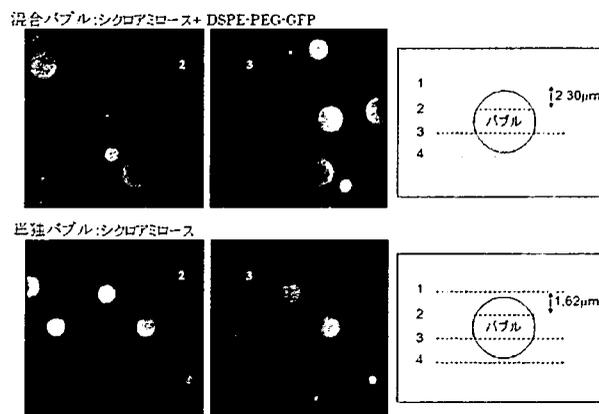


図1: GFP標識バブルの共焦点レーザー顕微鏡観察像(励起波長:475nm、蛍光波長:505nm)。DSPE-PEG-GFP有無条件下でバブルを調製し観察。

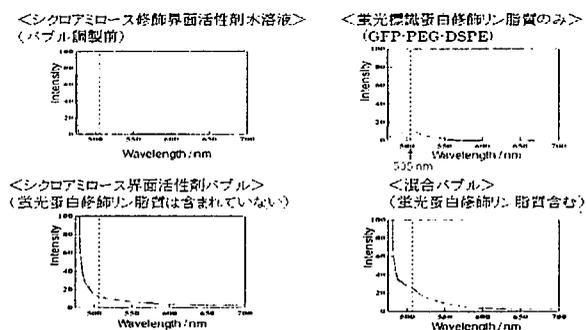


図2: 475nm励起光によるバブルの蛍光スペクトル。DSPE-PEG-GFP有無条件下でバブルを調製し、475nm励起光照射による蛍光波長を観察

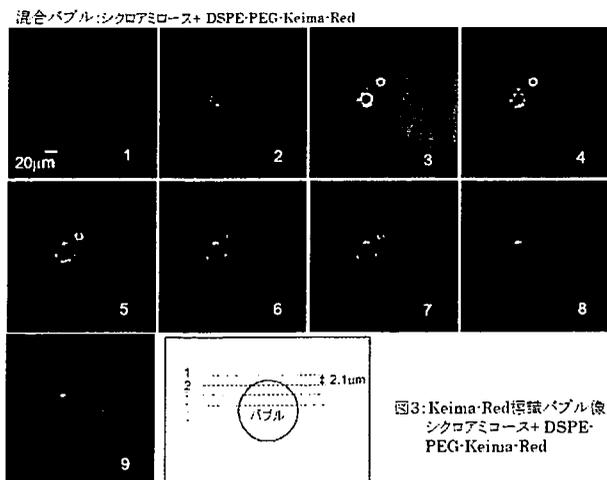


図3: Keima-Red標識バブル像(シクロアミロース+ DSPE-PEG-Keima-Red)

実験 3.

A. 研究目的

抗CD147抗体標識バブルの細胞表面CD147分子への特異的集積性を調べる目的で、抗CD147抗体の有効性確認のため、抗CD147抗体標識リポソームを作製して、培養細胞への集積性と抗癌剤内封による標的分子特異的抗腫瘍効果発現を調べた。

B. 研究方法

1. 材料

中空リポソーム製剤コートソーム EL-A-01、*DSPE-PEG-maleimide (MW: 5kD)、*DSPE-PEG-NHS (MW: 3kD)は日本油脂 (株) から購入した。タグ付き組換え Green fluorescent protein (recombinant His-tag-GFP)、抗 CD147 抗体 (Mab12C3, aCD147ab) は当研究室で作製した。*DSPE-PEG: distearyl phosphatidylethanolamine polyethylenglycol

2. 蛍光色素および抗体標識リポソームの作製

(1) DSPE-PEG-GFP:

DSPE-PEG-maleimide 1mg と GFP 1mg を 300 μ l 0.1M KPB (pH6.5)で室温、一昼夜反応させる。

(2) DSPE-PEG-aCD147ab:

同様に 1.0mg DSPE-PEG-NHS と 1mg aCD147ab を 300 μ l 0.1M KPB (pH8.0)で室温、一昼夜反応させる。

(3) Immunoliposome (aCD147ab-GFP-liposome):

10mg コートソームを 720 μ l メタノールで溶解し、DSPE-PEG-GFP と DSPE-PEG-aCD147ab 各 40 μ l を混合する。室温で 30 分静置後、遠心 (15,000rpm, 30min) によりコートソーム非結合の DSPE-PEG-GFP、DSPE-PEG-aCD147ab および未反応の GFP、aCD147ab を除去(上清)する。沈殿を 1ml 滅菌 PBS で 2 回洗浄する。沈殿を 200 μ l 滅菌 PBS で懸濁する。

(4) 抗癌剤封入 immunoliposome (aCD147ab-liposome/GSH-DXR) の調製

上記(3)で得られた immunoliposome に我々の研究室で開発した極めて抗癌効果の強いグルタチオン

結合アドリアマイシン (GSH-DXR) を添加し室温で 30 分静置後、コートソーム内に封入されなかった GSH-を遠心 (15,000rpm, 30min) により除去(上清)する。沈殿を 1ml 滅菌 PBS で 2 回洗浄する。沈殿を 200 μ l 滅菌 PBS で懸濁する。

3. 細胞

ヒト扁平上皮がん細胞A431、ヒト子宮内膜癌細胞 Ishikawa、ヒト前立腺がん細胞PC3とCD147siRNA 発現抑制細胞 (PC3/KD) を用いた。培養は通常のもよった。

C. 研究結果

1. A431, Ishikawa, PC3 および PC3/KD 細胞における CD147 発現

各細胞における CD147 発現を aCD147ab で、蛍光顕微鏡観察および細胞抽出液の SDS-PAGE と Western blot により確認した (図 1)。A431, Ishikawa および PC3 細胞ではいずれも CD147 の発現が確認されたが、PC3/KD 細胞では CD147 発現が消失していた (図 1)。

2. CD147 発現細胞への aCD147ab-liposome の特異的集積

A431 細胞に aCD147ab-GFP-liposome を 30 分暴露後、GFP 蛍光を顕微鏡観察すると、図 2 のように細胞への aCD147ab-GFP-liposome の集積が観察された。aCD147ab-GFP-liposome 添加時に過剰の aCD147ab の同時添加は、aCD147ab-GFP-liposome の蛍光を消失させた (図 2)。また、aCD147ab を持たない GFP-liposome 処理では GFP 蛍光は認められないことから、aCD147ab を介した liposome の CD147 を介し特異的な細胞集積が観察された。次いで CD147 発現の PC3 細胞に aCD147ab-GFP-liposome を添加すると、GFP 蛍光の集積が観察されたが、CD147 を発現抑制した PC3/KD 細胞に aCD147ab-GFP-liposome を添加しても GFP 蛍光は観察されず、aCD147ab-GFP-liposome が CD147 を標的として集積したことが確認された (図 2)。

3. GSH-DXR 内封 aCD147ab-liposome

(aCD147ab-liposome/GSH-DXR) の A431, Ishikawa, PC3 および PC3/KD 細胞に対する殺細胞効果

各細胞に aCD147ab-liposome/GSH-DXR を 4 時間

暴露し、96時間後の生細胞率をMTT法により求め、死細胞率を算出すると、特異性の無い正常マウス (Mo) IgG-liposome/GSH-DXR に比べ A431, Ishikawa, PC3 細胞は有意な殺細胞効果を示したが、PC3/KD 細胞では有意な殺細胞効果は観察されず、CD147 発現細胞への殺細胞効果の特異性が認められた (表1、図3)。

D. 考察

正常組織におけるCD147の発現が極めて少ないのに比べ、多くのがん細胞でCD147の高発現が報告されている。本実験ではaCD147ab-liposomeを用いることによるCD147分子標的治療の有効性について検討した。aCD147ab-liposomeのCD147発現細胞への集積が過剰のaCD147abにより競合的に抑制されること、CD147発現抑制細胞PC3/KDへの集積が観察されないことから、aCD147ab-liposomeがCD147発現細胞への特異的な集積が明らかになった。さらに、aCD147ab-liposome/GSH-DXRを用いた抗腫瘍効果判定実験から、CD147発現細胞への特異的殺細胞効果が認められた。これらのことは、aCD147ab標識バブルにもCD147発現細胞への特異的効果が期待され、診断と治療の両面において有用となることが示唆された。

本実験で用いたGSH-DXRは多剤耐性克服の目的で開発した薬剤で、DXR単剤よりも非常に強い殺細胞効果を示すことから、標的治療において低濃度で効果を発揮できる薬剤としてバブル内封薬剤としての有効性が期待される。

E. 結論

1. aCD147ab-liposome は CD147 発現細胞にのみ特異的に集積した。
2. GSH-DXR 内封 aCD147ab-liposome に CD147 発現細胞に特異的な殺細胞効果が観察された。これらの結果から、aCD147ab-liposomeを用いた分子標的治療への有効性が期待された。また、aCD147ab標識バブルの有用性が期待される基礎的データとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Eda H, Aoki K, Fujii, K, Ohkawa K.; FGF-2 signaling

induces downregulation of TAZ protein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *BBRC* 366;471-75,2008

- 2) Asakura T, Sasagawa A, Takeuchi H, Shibata S, Marushima H, Mamori S, Ohkawa K.; Conformational change in the active center region of GST P1-1 due to binding of a synthetic conjugate of DXR with GSH, enhanced JNK-mediated apoptosis *Apoptosis* DOI 10.1007 2007.

- 3) Mamori T, Asakura T, Ohkawa K., Tajiri H: Survivin expression in early hepatocellular carcinoma and post-treatment with anti-cancer drug under hypoxic culture *World J Gastroenterol* 13(40): 1306-11,2007

- 4) Mamori S, Nagatsuma K, Matsuura T, Ohkawa K., Hano H, Fukunaga M, Matsushima M, Masui Y, Fushiya N, Onoda H, Searashi Y, Takagi I, Tagiri H.; Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma in needle biopsy samples. *World J Gastroenterol.* 13(21): 2913-7, 2007.

2. 学会発表

- (1) 射谷和徳、伊藤貴司、今野剛人、大川 清、松浦知和、阿部正彦、酒井秀樹、土屋好司. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発. 第46回日本生体医工学会大会. 仙台、4月

- (2) 中田典生、宮本幸夫、西岡真樹子、今野剛人、射谷和徳、伊藤貴司、土屋好司、酒井秀樹、阿部正彦、松浦知和、大川 清. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発 第2回日本分子イメージング学会総会、福井、6月

- (3) Konno T, Itani K, Itoh T, Tsuchiya K, Abe M, Sakai H, Matsuura T, Ohkawa K. Approach for early cancer diagnosis using targeted ultrasound contrast agents. The Academy of Molecular Imaging and The Society for Molecular Imaging : Molecular Imaging Joint Conference, 2007, Sept. 8-11 Rhode Island USA

- (4) 朝倉 正、間森 聡、青木勝彦、松平浩、大川 清. 癌細胞膜表面高発現糖タンパク質CD147を標的とした

化学療法の検討：(Target chemotherapy of anti-CD147 antibody-liposome encapsulated GSH-DXR conjugate on CD147-expressed carcinoma cells). 第66回日本癌学会総会. 横浜. 10月.

(5) Ueda K, Yamada K, Aoki K, Takahashi H, Urashima M, Okamoto A, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T, Study of CD147 expression in endometrial carcinoma and cervical carcinoma: Correlation with clinicopathogenesis. 第66回日本癌学会総会. 横浜. 10月.

(6) 間森 聡、高木一郎、大川 清. CD147は...早期肝癌のターゲティングマーカーになり得るか? - 3次元腫瘍浸潤モデルと肝生検よりの検討 - JDDW 2007 2007、10月 東京

表1 Cytotoxic effect of GSH-DXR-encapsulated aCD147ab-immunoliposome

	Cell death rate (%)	
	aCD147ab-liposome/GSH-DXR	MolG-liposome/GSH-DXR
A431 cells	46 ± 7%	18 ± 3%
Ishikawa cells	37 ± 8%	20 ± 4%
PC3 cells	38 ± 9%	17 ± 4%
PC3/KD cells	18 ± 4%	16 ± 3%

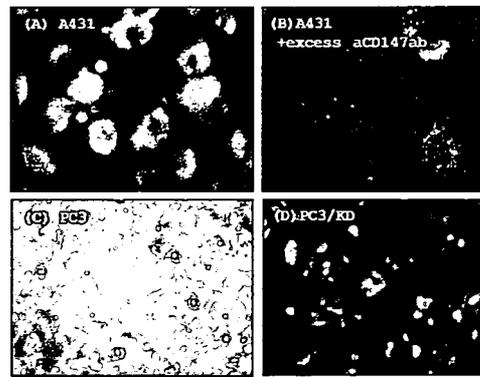


図2. Accumulation of aCD147ab-GFP-liposome in A431 (A), A431 + excess aCD147ab (B), PC3 (C), and PC3/KD (D). The GFP accumulation was observed by fluorescence microscopy. Existence of excess aCD147ab exhibited a competitive inhibition of liposome-accumulation (B).

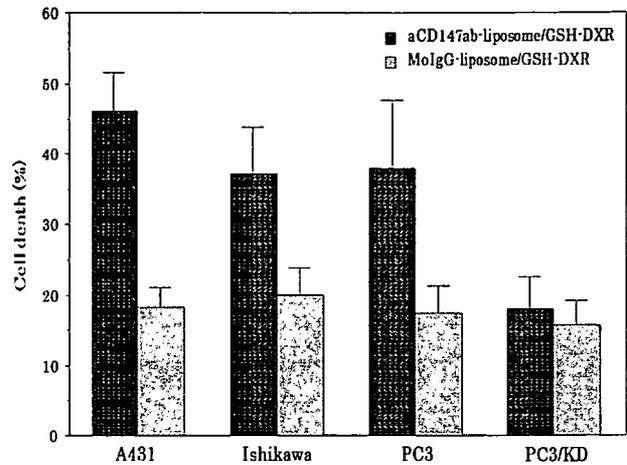


図3. Cytotoxicity of aCD147ab-liposome/GSH-DXR for 4h-exposure against A431, Ishikawa, PC3 and PC3/KD cells.

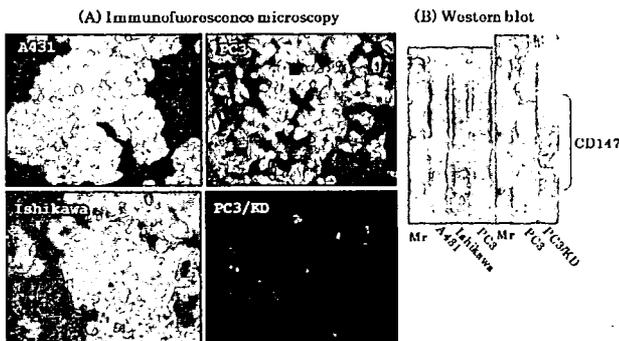


図1. Expression of CD147 in human carcinoma cells (A431, Ishikawa and PC3). (A) Observation by fluorescent microscopy using aCD147ab (Mab12C3) and Alexa488-anti-MolG as secondary antibody. PC3/KD: CD147-knock down PC3. (B) Western blot analysis of CD147 by aCD147ab (Mab12C3).

2. 細胞内在性 RNA アプタマーと標的 RNA 結合タンパク質の相互作用の機能解析

分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 教授

流動研究員 堀谷 学 財団法人医療機器センター・東京慈恵会医科大学

研究要旨：細胞内在性 RNA アプタマーと仮定されるアンチザイム・シュードノット RNA に結合するタンパク質の同定を行うため、ヒト細胞抽出物のシュードノット RNA 結合タンパク質を UV クロスリンク法により解析したところ、野生型シュードノット RNA には結合しないが、5'側ステムを破壊した変異体に特異的に結合するタンパク質が検出された。RNA を用いたアフィニティー精製とペプチド・マス・フィンガープリンティングを行い、このタンパク質の同定に成功した。このタンパク質は翻訳中のリボソームにより部分融解されたアンチザイム・シュードノットに結合し翻訳フレームシフトを制御する可能性があるため、リコンビナントタンパク質を用いて解析を行った。

A. 研究目的

細胞内在性 RNA アプタマーと仮定されるアンチザイム・シュードノット RNA に結合するタンパク質の精製、及び同定を試み、翻訳フレームシフトに対する効果を検討した。

B. 研究方法

ヒト胎児腎細胞（HEK293）由来の FreeStyle 293F 細胞のライセートの超遠心沈液中を用い、UV クロスリンク法により RNA 結合タンパク質の存在を評価した。目的とする RNA 結合タンパク質は、5'末端をビオチン化した RNA とストレプトアビジンを架橋した磁気ビーズを用いて、細胞抽出物よりアフィニティー精製した画分を、SDS-PAGE により分離した。分離されたタンパク質バンドをゲルより切り出し、トリプシンを用いてゲル内消化を行い、ペプチド・マス・フィンガープリンティング (PMF) により配列を同定した。

同定したタンパク質の cDNA をヒト脳 cDNA ライブラリーより増幅し、ヒスチジンタグ配列が付加されるプラスミドに導入した。作製したプラスミドを大腸菌に導入し、リコンビナントタンパク質として過剰発現させ、Ni-NTA カラムおよび陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製タンパク質を用い、ゲルシフトにより RNA 結合性を評価した。また、フレームシフト促進配列をウミシイタケとホタルのルシフェラーゼ ORF で挟んだ mRNA を用いたウサギ網状赤血球ライセートの *in vitro* 翻訳系によるアンチザイムの翻訳フレームシフト・アッセイ系に添加し、翻訳フレームシフト効率を測定する実験を行った。

C. 研究結果

昨年度報告した UV クロスリンク法により検出されたタンパク質は、アンチザイム・シュードノット RNA の 3'側ステムの変異に

関わらず検出され、構造特異性が低かった。本年度は、5'側ステムを破壊する変異を導入した RNA プロブを用いて、同様の実験を行ったところ、この変異体特異的に検出される 34 kD タンパク質の存在があることがわかった。このタンパク質を、翻訳中のリボソームにより部分融解されたシュードノットに結合するタンパク質と仮定し、同定を試みた。まず、野生型シュードノット RNA 及び、5'側ステム破壊変異体、3'側ステム破壊変異体、5'側ステムと 3'側ステム二重破壊変異体を用い、それぞれ細胞溶解液の超遠心上清からアフィニティー精製を行った。RNA 結合画分を SDS-PAGE により分離したところ、34 kD 付近に 5'側ステム破壊変異体特異的なバンドが検出された。このタンパク質は、バンドを切り出した後トリプシンを用いてゲル内消化後抽出し、MALDI/TOFMS により解析を行った。解析データの PMF を行ったところ、有意なタンパク質が同定された ($p < 0.05$)。続いて、この同定されたタンパク質のモノクローナル抗体 (市販) を用いて、アフィニティー精製した RNA 結合画分のウエスタン・ブロッティングを行った。その結果、5'側ステム破壊変異体の RNA 結合画分のみにはバンドが検出され、同定したタンパク質が正しいことを確認すると共に、RNA 構造に対して特異性があることが示唆された。

次に、このタンパク質が翻訳フレームシフトに与える影響を調べるために、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を作製した。作製したタンパク質の RNA 結合性をゲルシフトにより評価したが、過剰の tRNA 存在下において 1 μ M のタンパク質を 5'側ステム破壊変異体に添加しても、バンドシフトは起こらず、RNA 結合性の評価が十分にできなかった。また、

in vitro 翻訳系に添加し、アンチザイムの翻訳フレームシフト効率を測定した。その結果、125-250 nM 程度添加するとフレームシフト効率が、非添加時に対して 20%程度上昇する可能性があることがわかったが、この結果については再現性を確認する必要がある。一方で、500 nM 以上添加すると翻訳効率とともに翻訳フレームシフト効率が減少することがわかったが、フレームシフト促進配列の種類によらないため非特異的な効果と考えられる。

D. 考察

細胞溶解液超遠心上清の RNA 結合画分のウエスタン・ブロッティングによると、同定したタンパク質は RNA 結合特異性を十分に有していると考えられる。しかし、リコンビナントタンパク質を用いた実験においては RNA 結合性が確認できておらず、翻訳フレームシフトへの影響に対しての検証が不十分である。

E. 結論

本研究においてはアンチザイム・シュードノットの変異体に結合するタンパク質を同定したが、このタンパク質の存在は翻訳中のリボソームにより部分融解されたシュードノット構造の形成状態を示唆する興味深い結果である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Isome M, Lortie MJ, Murakami Y, Parisi E, Matsufuji S, Satriano J. The antiproliferative effects of agmatine correlate with the rate of cellular proliferation.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007 Aug;
293(2): C705-11.

2) Tanaka Y, Osaka T, Hattori A,
Murakami Y, Matsufuji T, Matsufuji S,
Shinkawa T, Isobe T, Mizutani T. Soluble
Liver Antigen/Liver and Pancreas, an
Antigen in Autoimmune Hepatitis Patients:
Influence on Selenocysteine Synthesis and
its Complex with HSP70.

J. Health Sci. 2007 Dec; 53(6) 682-691.

2. 学会発表

1) 堀谷 学, Howard MT, Atkins JF, 村井
法之, 松藤千弥. 部分融解したアンチザイム・
シュードノットを認識する RNA 結合タンパク質.
第9回日本 RNA 学会年会. 7月 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

3. ブタ膵を用いた膵組織に対する超音波内視鏡下 Hot Saline 注入法 (E-Hot) の基礎的研究
(動物実験申請番号 19-011R2)

分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授
協力研究者 今津博雄 東京慈恵会医科大学 講師

研究要旨:全身麻酔下で3頭のブタ膵に超音波内視鏡下 Hot-Saline 注入法 (E-Hot) を行った。2ml の Hot Saline の注入で約 1cm 径の範囲で膵細胞の凝固壊死が得られ、腹腔内への Hot Saline の漏出は認めなかった。E-Hot が膵癌治療に臨床応用されうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、切除不能局所進行膵癌に対し、従来行なわれている化学療法、放射線療法以外に、CT ガイド下あるいは超音波内視鏡下の活性化 T 細胞、樹状細胞、TNFerase の局注療法や小線源治療の報告がみられるが、従来の治療を大きく凌ぐような結果は得られていない。昨年、ブタ膵に対するエタノール注入法の基礎的研究の結果が報告されたが、肝癌に対して確立されているこの手法は胆管損傷、肝梗塞などの偶発症が報告されており、ヒト膵癌に応用した場合、同様の偶発症が危惧される。また、肝癌治療において Hot Saline 注入法はエタノール注入法と同等の効果が報告されている。Saline は冷やされると全く無害の物質であり、臨床応用された場合の膵癌の局注において安全に膵癌細胞の凝固壊死を得られることが期待される。本研究ではブタ膵において超音波内視鏡下 Hot Saline 注入法 (E-Hot) が安全かつ効果的な膵細胞の凝固壊死を得ることができるかどうか検討する。

B. 研究方法

全身麻酔下で3頭のブタに Curvilinear 型 EUS を挿入、22G 超音波穿刺針で経胃的に膵尾部を穿刺する。ICG を混和した沸騰中の Hot Saline を 5ml のシリンジに充填し、膵尾部にゆっくり注入する。注入量は 5ml もしくは 2ml とする。Necropsy は注入 5 時間後に行い、腹腔内への Hot Saline の漏出の有無を観察し、膵内の壊死範囲の評価を行う。

C. 研究結果

1 頭に 5ml、残り 2 頭に 2ml の Hot Saline を超音波内視鏡下で注入した (図 1)。3 頭とも腹腔内への Hot Saline の漏出は見られなかった (図 2)。5ml の注入では EUS 上、膵の葉間に Hot saline が貯留し、膵内に出血を伴っていた。2ml の注入ではいずれも膵実質に Hot saline が停滞し、病理組織標本で径約 1cm の範囲で膵細胞壊死が得られた (図 3)。

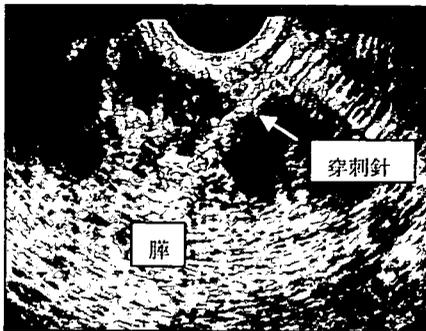


図 1：E-Hot 中の超音波内視鏡像

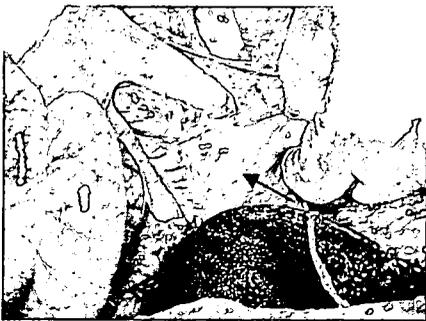


図 2：Necropsy 所見。ICG は膵内に停滞し腹腔内への漏出は見られなかった。



図 3：病理所見。約 1cm 径の範囲で膵細胞壊死が得られた。

D. 考察

E-Hot で安全に Saline を膵内に注入し、膵細胞の凝固壊死を得ることができた。膵癌は肝癌に比べて乏血性であり、Hot Saline が腫瘍内で冷やされるまでに時間がかかることが予想され、肝癌よりも少ない注入量で E-Hot が

安全に膵癌治療に臨床応用されうると考えられる。

E. 結論

E-Hot で膵細胞の凝固壊死を得ることが可能で、膵癌治療に臨床応用されうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 超音波内視鏡関連研究発表

1. 論文発表

1) Tsukinaga S, Imazu H, Uchiyama Y, Kakutani H, Kuramochi A, Kato M, et al. Diagnostic approach using endosonography guided fine needle aspiration for lymphadenopathy in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2007; 21: 3758-9.

2. 学会発表

1) 今津博雄, 角谷 宏, 田尻久雄, 胆・膵悪性腫瘍に対する画像診断－術前 staging について－. 第 49 回日本消化器病学会大会. 神戸. 2007 年 10 月.

2) Imazu H, Uchiyama U, Kakutani H, Kuramochi A, Kato M, Tsukinaga S, et al. A prospective comparison of EUS-guided FNA using 25-gauge and 22-gauge aspiration needle. 15th United European Gastroenterology Week. Paris. 2007 年 10 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

4. 消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 — 食道癌と異形性上皮 —

分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師

研究要旨：CD147 を高感度で認識する単クローン抗体(MAb12C3)を用い、臨床摘出標本で食道癌、および食道異形成上皮での CD147 発現を検討した。CD147 発現は、食道癌、食道異形成上皮に認められた。CD147 発現のレベルを比較したところ、Stage III 以上の進行癌では、異形成上皮での CD147 発現が軽度で食道癌での発現に差が見られるものは、予後不良であった。Stage II 以下の食道癌では、両者の発現の差と予後には相関がみられなかった。CD147 を分子ターゲットとして、予後を含む悪性度のリスク評価を行うことが可能となればその臨床的価値は高いと考えられた。

A. 研究目的

平成 17 年度分担研究報告書において我々は、早期食道癌において、CD147 発現が腫瘍の大きさ、深達度に有意な関係が認められていたことを報告した。本研究では、食道癌の前癌病変である食道異形成上皮での CD147 発現を調べ、その臨床的意義を検討する。

B. 研究方法

当院で手術を施行した食道癌症例（101 例）を対象とした。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製し、食道癌、食道異形成上皮において抗 CD147 抗体（MAb12C3）を用いた免疫組織染色を行い、染色強度パターンを 3 段階（no staining、partial staining、diffuse and strong staining）に分類し検討した。また、染色パターンを数値化（no staining = 0、partial staining = 1、diffuse and strong staining = 2）し、同一症例での数値化した染色パターンの差（食道癌—食道異形成上皮）と予後についての検討を行った。

研究結果

CD147 の発現は、食道癌および食道異形成上皮において認められた。CD147 発現のレベルを比較したところ、Stage III 以上の進行癌では、異形成上皮での CD147 発現が軽度で食道癌での発現強度に差が見られるものは、予後不良であった(図 2)。Stage II 以下の食道癌では、両者の発現の差と予後には相関がみられなかった(図 1)。

C. 考察

我々は、本研究において CD147 発現を指標とした超音波による癌の分子イメージングの対象として早期食道癌の有望性を報告してきた。今回その前癌病変である食道異形成上皮についての CD147 発現について検討した。実際の臨床応用を考えた場合、前癌病変での CD147 発現について検討していくことは必須のものである。今回の検討では、多くの食道異形成上皮においても CD147 発現が認められた。早期食道癌においては、腫瘍の大きさ、深達度と CD147 発現が有意な関係が認められたが、今回の結果より CD147 発現は、悪性度だけでなく、発癌過程についても関連していることが考えられた。CD147 発現のレベルを比較したところ、Stage III 以上の進行癌では、異形成上皮での CD147 発現が軽度で食道癌で高発現となる染色レベルに差が見られるものは、予後不良であった。Stage II 以下の食道癌では、両者の発現の差と予後には相関がみられなかった。つまり、早期癌では、同じ背景粘膜から発生した食道癌、食道異形成上皮の間で CD147 発現にまだ差がみられないが、進行癌になると癌と前癌病変での差が明瞭となり予後と相関する結果が得られた。したがって、今回の結果より CD147 発現は、進行食道癌においても、異形成上皮と

比較することにより、悪性度や予後の指標になりうる可能性が示唆された。さらなる検討を加え本研究によって有望な成果が得られれば、超音波内視鏡を用いることにより食道癌においては、早期癌だけでなく進行癌においても治療方針の決定が容易になる、画期的な臨床応用につながることを期待される。

D. 結論

CD147 発現は、食道癌のみならず食道異形成上皮に認められた。食道癌においては、その診断、治療方針の決定に CD147 が寄与する可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Omura N, Kashiwagi H, Yano F, Tsuboi K, Ishibashi Y, Kawasaki N, Suzuki Y, Mitsumori N, Urashima M, Yanaga K. Prediction of recurrence after laparoscopic fundoplication for erosive reflux esophagitis based on anatomy-function-pathology (AFP) classification. Surg Endosc. 2007; 21: 427-30.

2) Ueda K, Yamada K, Urashima M, Ishibashi Y, Shirai M, Nikaido T, Takahashi H, Okamoto A, Saito M, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Association of extracellular matrix metalloproteinase inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3. Oncol Rep. 2007; 17: 731-5.

3) Omura N, Kashiwagi H, Yano F, Tsuboi K, Ishibashi Y, Kawasaki N, Suzuki Y, Matsumoto A, Mitsumori N, Urashima M, Yanaga K. Gastric ulcer after laparoscopic fundoplication for gastroesophageal reflux disease: significance of the eradication of Helicobacter pylori. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2007; 17:193-6

4) Nakayoshi T, Kawasaki N, Suzuki Y, Yasui Y, Nakada K, Ishibashi Y, Hanyu N, Urashima M, Yanaga K. Epidural administration of morphine facilitates time of appearance of first gastric interdigestive migrating complex in dogs with paralytic ileus after open abdominal surgery. J Gastrointest Surg. 2007; 11:648-54.

H. 知的財産権の出願状況

なし

図 1

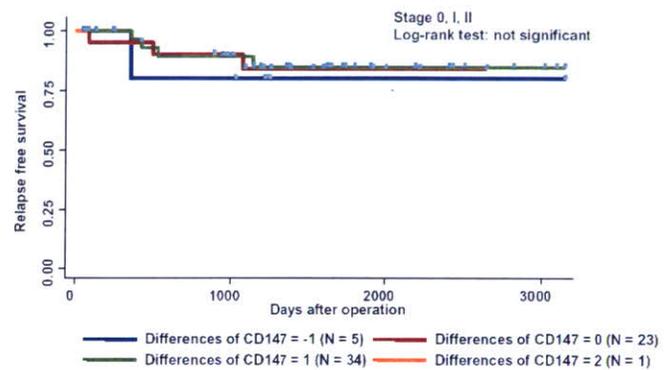
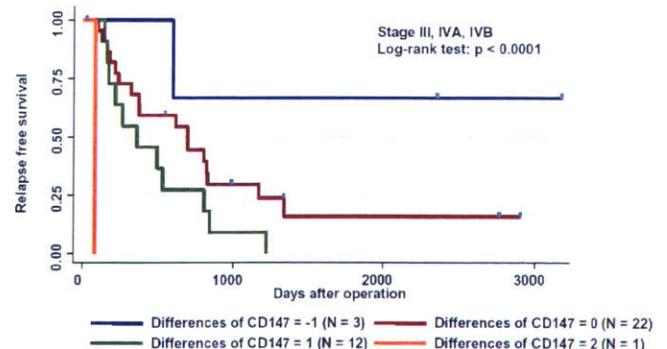


図 2



5. 子宮頸部腫瘍における CD147 発現解析

分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師

協力研究者 上田 和 東京慈恵会医科大学 助教

研究要旨：子宮頸部扁平上皮癌および高度扁平上皮内病変における CD147 の発現を、CD147 を高感度で認識するモノクローナル抗体 (MAb12C3) を用いて解析し、臨床病理学的因子や予後との関連性について検討した。子宮頸部腫瘍における CD147 発現は、高率 (84.7%) に認められた。その染色強度は統計学的に、SCC 高値例で有意に高く、臨床進行期との相関を認めた。今後、CD147 を分子ターゲットとした子宮悪性腫瘍の診断や治療などへの臨床応用が期待される。

A. 研究目的

CD147 は、matrix metalloproteinase の発現を誘導することにより、癌の浸潤や転移に関与する分子マーカーとして知られている。我々はこれまで、子宮内膜癌における CD147 発現と臨床進行期や組織分化度などの臨床病理学的因子や患者予後との関連について検討し、報告した (Ueda K *et al.*, *Oncol Rep*, 2007)。今回、子宮頸部扁平上皮癌および高度扁平上皮内病変における CD147 発現を解析し、子宮頸癌の発生過程、浸潤・転移における発現の変化および関連性について検討した。

B. 研究方法

当院にて初回治療として外科的手術を施行した子宮頸部腫瘍症例計 72 例 (子宮頸部扁平上皮癌 61 例、高度扁平上皮内病変 11 例) を対象とした。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色および CD147 認識モノクローナル抗体 MAb12C3 で免疫染色を行い、検討した。

C. 研究結果

CD147 は、正常扁平上皮では基底細胞や旁基底細胞に発現を認めるものの、中・表層細胞には発現を認めなかった。それに対し、子宮頸部腫瘍では 72 例中 61 例 (84.7%) の腫瘍細胞表面に発現し、高度扁平上皮内病変の段階より高い発現率を示した。

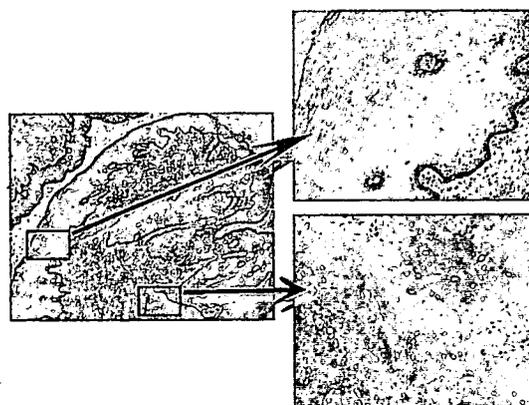


図1：子宮頸部組織（扁平上皮癌）
統計学的にも、その染色強度は SCC 高値例で有意に高く ($p=0.01$)、臨床進行期との相関を