

話 題

第1回金沢大学学際科学実験センターシンポジウム

金沢大学学際科学実験センター

森 厚 文

平成17年5月24日、金沢大学医学部十全講堂において「第1回学際科学実験センターシンポジウム」が開催され、約400名の参加があった。学際科学実験センターは、平成15年4月に4研究分野・5施設（研究分野：トレーサー情報解析分野、遺伝子改変動物分野、ゲノム解析分野、機器分析分野、研究施設：アイソトープ総合研究施設、アイソトープ理工系研究施設、実験動物研究施設、遺伝子研究施設、機器分析研究施設）を統合拡充して設立された。その設置目的の1つである学際的複合研究を推進するために、シンポジウムを企画し、今回はテーマとしてトレーサー情報解析分野が中心となって「RIを用いた分子イメージングの学際的研究」を取り上げた。

基調講演として福井大学高エネルギー医学研究センターの藤林靖久教授、大阪市立大学大学院医学研

究科の渡辺恭良教授から、それぞれ「分子イメージングの現状と将来－21世紀COEプログラム『生体画像医学の統合研究プログラム』－」、「病態科学・創薬における分子イメージング－21世紀COEプログラム『疲労克服研究教育拠点プログラム』－」と題して、現在実施・展開中の「21世紀COEプログラム」における分子イメージング研究の重要性について講演があった（写真1）。

引き続き「RI画像医学の学際的研究－脳科学及びがん研究における分子イメージング－」と題してシンポジウムが行われ、シンポジスト6名の講演の後、基調講演の講師2名を加えた8名で総合討論が行われた（写真2）。

以下に、プログラムとその要旨を掲載する。



写真1 基調講演



写真2 シンポジウム

表 第1回学際科学実験センターシンポジウムプログラム

開催日時：平成17年5月24日(火) 13時30分～17時35分

開催場所：金沢大学医学部十全講堂

◆開会の挨拶(13時30分～13時35分)

山口和男(金沢大学学際科学実験センター長)

◆第1部 基調講演(13時35分～15時20分)

司会：利波紀久(金沢大学医学系研究科教授)

●講演1：分子イメージングの現状と将来

ー21世紀COEプログラム「生体画像医学の統合研究プログラム」ー

藤林靖久(福井大学高エネルギー医学研究センター教授)

●講演2：病態科学・創薬における分子イメージング

ー21世紀COEプログラム「疲労克服研究教育拠点の形成」ー

渡辺恭良(大阪市立大学大学院医学研究科教授)

休憩(15時20分～15時30分)

◆第2部 シンポジウム(15時30分～17時30分)

●テーマ：RI画像医学の学際的研究ー脳科学及びがん研究における分子イメージングー

司会：森 厚文(金沢大学学際科学実験センター教授)

山口和男(金沢大学学際科学実験センター教授)

S-1 アポトーシスのPETイメージング剤開発

西村伸太郎(先端医学薬学研究センター新薬研究開発部長)

S-2 痴呆予防医療のためのSPECTイメージング剤開発

柴 和弘(金沢大学学際科学実験センター助教授)

S-3 放射能標識アンチセンスによる癌多剤耐性能診断と多剤耐性癌治療の可能性

絹谷清剛(金沢大学医学系研究科助手)

S-4 遺伝子治療モニタリングのための遺伝子発現イメージングの開発

平井宏和(金沢大学学際科学実験センター助教授)

S-5 標識リガンドの輸送ツールの探索

加藤将夫(金沢大学自然科学研究科助教授)

S-6 分子イメージング研究のための遺伝子改変マウスの開発

浅野雅秀(金沢大学学際科学実験センター教授)

◆閉会の挨拶(17時30分～17時35分)

森 厚文(金沢大学学際科学実験センター教授)

基調講演1：「分子イメージング：福井大学21世紀COEにおける研究を含めて」

藤林靖久(福井大学高エネルギー医学研究センター)

福井大学では、2004年度より「生体画像医学の統合研究プログラム」が21世紀COEに採択され、基礎から臨床にわたる広い範囲での生体画像医学研究を推進している。その中の重要なキーワードの一つが「分子イメージング」である。

「分子イメージング」研究については、近年非常に注目が集められているが、実際にどのような研究分野であるのかについては、個々の研究者によってその定義も範囲も異なっているように感じられる。我々は、近年の分子生物学の急速な進展を基盤として、生命現象の画像化のうち分子生物学的知見によって説明可能なものを分子イメージングと呼ぶこととした。分子生物学の根本原理は、遺伝情報とその発現過程の解析である。遺伝子発現とはすなわちmRNAとその翻訳であるタンパクをさす。核医学は、酵素やレセプターの画像化、あるいはそれらの作用によって生まれる生理現象の画像化を疾患診断に利用するものであり、分子生物学的解釈が可能である場合には分子イメージングと呼べると考えている。

米国では、二つの分子イメージング学会(Society for Molecular ImagingとAcademy of Molecular Imaging)が設立された。ほぼ同時期にはNIHがNational Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering(NIBIB)の設置を決定した。また、NIHに属するNational Cancer Institute(NCI)が全米に6つのin vivo Cellular(Cancer) and Molecular Imaging Centerを指定し、さらに追加公募を続けているなど、国を挙げての研究体制を構築しつつある。本邦でも厚生労働省、経済産業省、文部科学省がそれぞれ分子イメージングに関する大型研究公募を行い、拠点形成の具体化を進めている。

分子イメージング研究では、まず従来からある核医学画像の分子生物学的解釈が活発に行われている。腫瘍の細胞膜グルコース輸送タンパクGlutの発現とFDG集積との関連の解明などがこれにあたる。加えて、積極的に遺伝子工学技術を利用する遺伝子・細胞治療や再生医療における治療モニタリングが試みられている。これには、治療効果を従来からある核医学検査を用いて評価するサロゲートマーカーイメージングと、汎用レポーター遺伝子を導入し間接的に治療遺伝子発現をモニターする手法とが考えられる。前者の例として、虚血心筋における血管内皮細胞増殖因子遺伝子導入の効果を心筋血流を

指標に解析するものがあげられる。また、後者については、福井大学にてエストロゲンレセプターをレポーター遺伝子に用いる系を提案している。これらについて、いくつかの研究結果を示しながら、その将来性について議論を深めたい。

基調講演2：「病態科学・創薬における分子イメージング-疲労の分子イメージングを中心に-」

渡辺恭良(大阪市立大学大学院医学研究科)

疲労感・倦怠感、我々が日常的に経験している感覚であり、発熱、痛みとともに、身体の内環境(恒常性)の乱れを知らせる重要なアラーム信号の1つである。疲労は、私たちにとって非常に身近な問題であり、ストレスの多い現代社会に生きる私たちの中で慢性疲労に悩んでいるヒトが多いにもかかわらず、科学的・医学的研究はこれまで断片的であった。ここ数年で、生活習慣病をはじめとする疾患の予防医療・予知医療の発展とともに、このような未病に如何に対処するかという気運が高まり、「疲労の科学」に目を向けられるに至った。

文部科学省・科学技術振興調整費による疲労研究班[生活者ニーズ対応研究「疲労および疲労感の分子・神経メカニズムとその防御に関する研究」(平成11-16年度、研究代表者：渡辺恭良)]では、これまでに知られてきた断片的な疲労の分子・神経メカニズムの研究結果を統合し、分子イメージングや遺伝子解析などの新しい方法論も取り入れて「疲労」と「疲労回復・予防」についての研究を深めてきた。ここでは、ポジトロンエミッショントモグラフィ(PET)やMicroPETを用いた研究成果を中心に疲労の分子神経メカニズムの研究の進捗状況について概説したい。本プロジェクトは、2004年夏、文部科学省-日本学術振興会の21世紀COEプログラム革新的学術分野に我々大阪市立大学が申請した「疲労克服研究教育拠点の形成」として課題採択された(拠点リーダー：渡辺恭良)。現在、大学を挙げて、疲労の基礎・臨床研究と抗疲労食薬開発プロジェクトを進めている。

疲労の仮説には、明らかに間違っただけのものがあり、それは、生物医学全体を良く理解していない者が断片的な知識により記載あるいは発表したものが定説として一人歩きしたものが多いため。そのような誤った仮説がいつまでも横行しているところが、疲労研究の最も大きな問題点である。人類、医学にとって、これだけ重要な現象であるのに、明確な統合的研究がなされていなかった。象徴的な例は、疲労の乳酸原因物質仮説である。現在、我々の[3-¹¹C]乳酸の

PET 研究の結果などからも、乳酸が疲労原因物質である可能性は、否定的である。また、いくつかのアミノ酸の説にも様々な問題がある。

8名の慢性疲労症候群(CFS)患者と8名の健常コントロールについて、PETを用いた脳局所血流量と脳局所アセチルカルニチン代謝の検討を行ったところ、局所血流量はCFS患者群で前帯状回、眼窩前頭野、左側頭葉、海馬、中脳、橋など種々の部位において低下していたが、局所アセチルカルニチン代謝は局所血流異常とは異なり、自律神経系の調節や情動などに深く関連している Brodmann 24 野、意欲やコミュニケーションにおいて重要な Brodmann 9/46d 野、及び小脳核の一部において著減していた。アセチルカルニチンのアセチル基は、脳内で主にグルタミン酸生合成に利用されていることも確認され、これらの両領域における神経伝達物質の生合成障害がCFSの臨床症状の主体である慢性疲労感と深く関連している可能性が初めて明らかになった。また、慢性疲労症候群(CFS)では、筑波大学の成田らとの共同研究により、セロトニントランスポーター(5-HTT)のプロモーター領域の長さにつき、S、L、XLの3種類があり、日本人においては、ほとんどが短いS-formであるにも関わらず、CFS患者においては、長いものが多くなることが判明した。では、実際に、CFS患者において5-HTTの蛋白発現、機能がどのようにになっているかを調べるために、5-HTTに特異的なリガンドである $[^{14}\text{C}] (+)\text{McN5652}$ を用いたPET研究を浜松先端医療センターの尾内らとの共同研究で行った。10名のCFS患者と10名の健常人ボランティアでPETを行い、SPM99による解析結果では、前帯状回の一部で、CFS患者の5-HTTが統計的に有意に低くなっている結果を得た。患者の痛みに関するスコアとの相関を持つ前帯状回の微小区画は、ここで見出した部分のかなり後ろであることが判明し、この前帯状回の前部のセグメントは、疲労感に係る部位であることを示唆した。この部分は、これまでに筆者らがスウェーデン・ウプサラ大学PETセンターと共同で行ったCFS患者の脳局所血流量の低下している部位と良く一致する。つまり、この前帯状回の前部のセグメントは、慢性化する疲労に関する重要なスポットであり、この部分の機能低下、セロトニン系の低下が疲労の重要な特性であると言っても差し支えない。セロトニンの重要性は、最近益々注目されているが、このように様々な精神神経疾患において、脳のどの部分のセロトニン系がどのように問題があるかをきちんと明らかにしていくことが重要であると思われる。ヒト・患者での遺伝子解析と分子イメージング

の結果とのつき合わせは、総合的な解釈を行うために、今後も益々重要になってくると思われる。

感染性の疲労、精神ストレスにより起こってくる疲労、運動性の疲労に共通して働くメカニズムがあり、全くすべてが同じメカニズムということでないにせよ、どこかで疲労を感じる神経回路があり、そこに様々な修飾が及んでいると思われる。この神経回路は、まさに目標が達成された満足感や昼寝などによる睡眠・日内リズムの中枢とも密接な交流があるといえる。痛みの研究では、痛みを忘れるぐらいに物事に熱中している時の脳内の活動を調べて、このような修飾系の入力についても判明しつつある。このような考えに立てば、近い将来、疲労感の神経回路についてももう少し理解が進むものと考えられる。

我々が開発した疲労動物モデルの実験では、マイクロPETによる脳機能イメージングにより、前頭部のグルコース利用能が低下していることが判明した。ヒトの脳神経系と疲労によって起こる様々な症状とを詳細に考えていくと、疲労に付随して起こるなどの現象の原因を明らかにしなければいけないが見えてくる。

[参考]

- 1) 井上正康, 倉恒弘彦, 渡辺恭良: 疲労の科学—眠らない現代社会への警鐘, 講談社(2001)
- 2) 渡辺恭良: 疲労の科学, 医学のあゆみ第1土曜特集, **205**, 医歯薬出版(2003)
- 3) 倉恒弘彦, 渡辺恭良, 井上正康: 危ない! 「慢性疲労」, NHK生活人新書, NHK出版(2004)

S-1: アポトーシスのPETイメージング剤開発

^{18}F -Labelled Annexin V: a PET Tracer for Apoptosis Imaging

西村伸太郎((財)先端医学薬学研究センター)

Abstract:

Annexin V can be used to detect apoptotic cells in vitro and in vivo, based on its ability to identify extracellular phosphatidylserine, which arises during apoptosis. In the present study, we examined the synthesis of fluorine-18 labelled annexin V as a positron emission tomography tracer for apoptosis imaging. The distribution of $[^{18}\text{F}]$ annexin V and technetium-99m labelled annexin V, a well-characterised SPECT tracer for apoptosis imaging, was compared. $[^{18}\text{F}]$ annexin V was synthesized using N-succinimidyl 4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzoate as an ^{18}F labelling reagent. Synthesized and purified $[^{18}\text{F}]$ annexin V was confirmed by SDS-PAGE. In an ex vivo imaging experi-

ment, [^{18}F]annexin V was intravenously injected into rats 24 h after the induction of myocardial ischaemia, and accumulation in the left ventricle was examined. [^{18}F]annexin V accumulated in the infarct area of the left ventricle, where apoptotic cells were observed. In separate experiments, [^{18}F]annexin V or [(99^{m}Tc)]annexin V was intravenously injected into ischaemic or normal animals, and the distribution of the tracers was compared. In ischaemic animals, accumulation of [^{18}F]annexin V and [(99^{m}Tc)]annexin V in the infarct area was about three fold higher than in the non-infarct area. Furthermore, the ratio of accumulation in the normal heart to the blood radioactivity was not significantly different between the tracers. In normal animals, however, the uptake of [^{18}F]annexin V in the liver, spleen and kidney was much lower than that of [(99^{m}Tc)]annexin V. The low uptake of [^{18}F]annexin V in these organs might represent an advantage over [(99^{m}Tc)]annexin V. Further investigation on the in vivo imaging and the development of the automated apparatus for [^{18}F]annexin V which is applicable for the GMP regulation, are underway.



Figure-2: Automated Synthetic Apparatus for [^{18}F]annexin V

Reference:

- 1) Y. Murakami, H. Takamatsu, J. Taki, M. Tatsumi, A. Noda, R. Ichise, J.F. Tait, and S. Nishimura: ^{18}F -labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **31**, 469-474 (2004)

Synthesis of ^{18}F -Labeled Annexin V

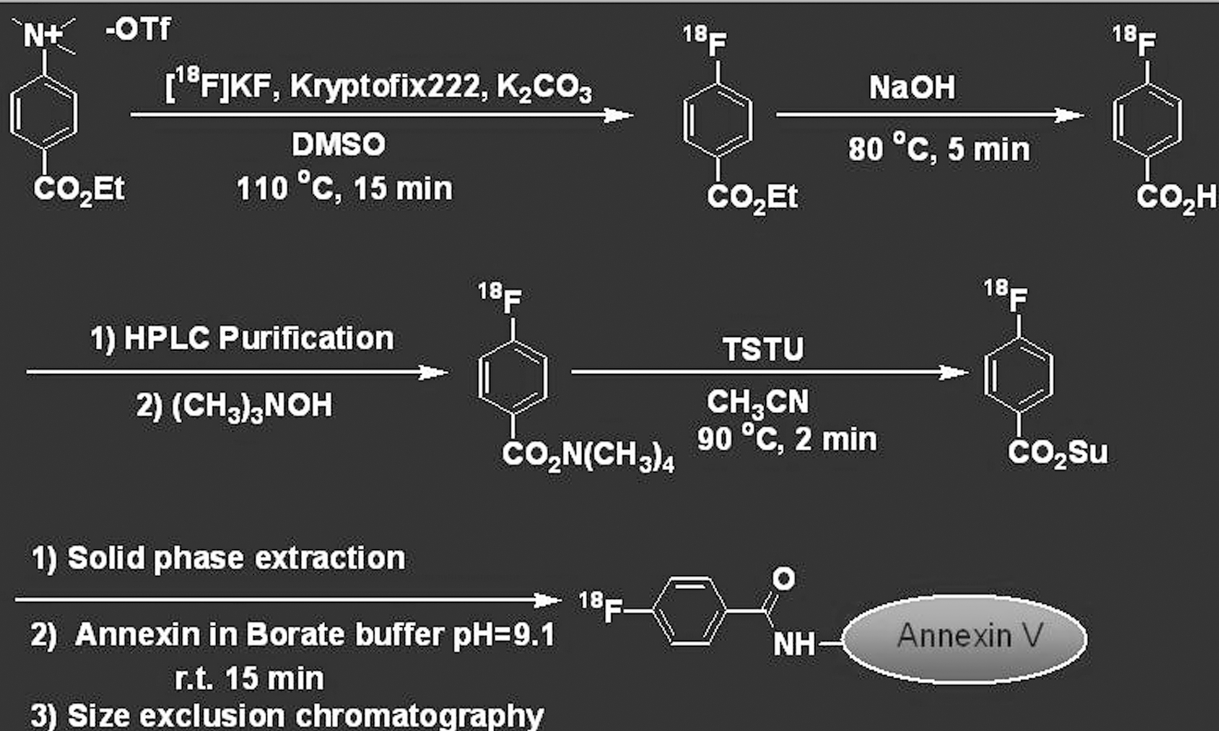


Figure-1: Synthetic Route of ^{18}F -Labeled Annexin V

S-2：痴呆予防医療のための SPECT イメージング剤開発

柴 和弘, 小川数馬, 森 厚文 (金沢大学学際科学実験センター)

加齢に伴う脳の高次機能障害を呈する痴呆は、高齢化社会を迎えた我が国でも重要な社会問題になっている。特に、比較的老齢早期から発症するアルツハイマー病については、早期診断・治療及び予防が重要となってくる。現在、アルツハイマー病の発症因子の特定や治療法など盛んに研究が進められている。一方、画像診断法により、早期診断を目的とした分子イメージング剤の開発研究も盛んに行われ、早期治療や治療効果の判別に役立つと考えられる。

アルツハイマー病をターゲットにした分子イメージング剤を開発するには、アルツハイマー病の神経化学変化を鋭敏に捉える放射性核種標識分子イメージング剤の開発が必要である。アルツハイマー病の神経化学的变化として、アセチルコリン神経系の変化が注目されている。特に、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) やアセチルコリンエステラーゼ (AChE) のような酵素及びシナプス前終末部のシナプス小胞膜に存在するアセチルコリントランスポーター (VACHT) の変化が注目されており、それらの変化を画像化する分子イメージング剤の開発が望まれている。

今回、我々はアルツハイマー病を含むアセチルコリン神経系疾患の客観的早期診断を目指して、VACHT に特異的に結合するベサミコール誘導体による SPECT 用 (single photon emission computed tomography) の放射性ヨウ素核種標識 VACHT 分子イメージング剤の開発研究について報告する。さらに、

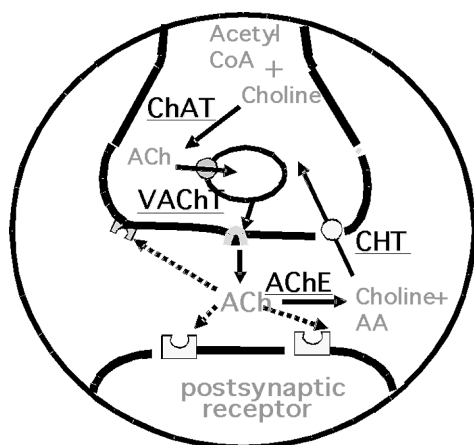


図 アセチルコリン神経系

アルツハイマー病の早期の段階で最も変化が大きいとされる ChAT をターゲットにした分子イメージング剤の開発のための基礎研究についても報告する。

SPECT 用の脳神経機能をターゲットにした分子イメージング剤を開発する際に重要なことは、①分子イメージング剤が血液-脳関門 (BBB) を通過すること、②放射性ヨウ素標識により、基となる薬物が持つ本来の性質が失われないこと、③分子イメージング剤がターゲットに対してのみ特異的に高親和性で結合すること、④血中クリアランスが早いこと等である。これらを踏まえ、ベサミコールのベンゼン核のオルト、メタ、パラ位にヨウ素を導入したヨードベサミコール類を合成し、VACHT に対する親和性をインビトロ実験による検討を行った。さらに、放射性ヨウ素標識化の検討並びにモデル動物を用いたインビボ実験により、VACHT 分子イメージング剤としての可能性について検討した。

その結果、SPECT 用 VACHT イメージング剤として放射性ヨウ素標識 (-)-o-iodovesamicol [(-)-oIV] が VACHT に対する親和性が高く ($K_i = 15.0 \text{ nM}$)、またインビボでの (-)- ^{125}I -oIV のラット脳内分布も VACHT 密度の高い部位 (海馬、扁桃核群、梨状葉皮質等) に多く集積することがわかった。インビボ阻害実験において、(-)- ^{125}I -oIV の脳内集積が 40 % まで減少することから、(-)- ^{125}I -oIV はラット脳内で、特異的に VACHT に結合していることがわかった。また、イボテン酸によりマイネルト核を一側性に破壊して作成した学習障害モデルラットを用いた実験の結果、(-)- ^{125}I -oIV は破壊側でその投射部位である大脳皮質で有意な集積減少 (約 17 %) が見られた。これらのことから、放射性ヨウ素標識 (-)-oIV はアルツハイマー病を含むアセチルコリン神経系疾患の診断のための分子イメージング剤となりうる可能性があることがわかった。

また、ChAT 分子イメージング剤の開発研究として、最初に、新しい ChAT に高親和性を示す物質の発見並びに合成を目指し、新しい高親和性 ChAT 結合物質を発見するためのスクリーニングに適した ChAT 酵素活性測定法の開発検討した。

その結果、96 穴マイクロプレートを利用したラジオアイソトープ ChAT 酵素活性測定法が、0.75% tetraphenylboron in 酢酸エチル: MicroscintTM [0] (1 : 5) (総量 200 mL) の混合有機溶液による溶媒抽出法により、生成物である [^3H] acetylcholine のみを選択的に測定できることが可能となった。この方法を用いて、3,000 種類のカビ試料をスクリーニングし

た結果、現在までに、19種類の阻害試料及び1種類の増強試料が見つかり、現在さらに、精製を行い、化合物の特定を目指しているところである。

S-3：放射能標識アンチセンスによる癌多剤耐性能診断と多剤耐性癌治療の可能性

絹谷清剛，白 景明，横山邦彦，道岸隆敏，利波紀久（金沢大学大学院医学系研究科）

癌治療に際して、対象となる癌細胞あるいは癌組織の性状診断は効果的な治療に直結する重要な問題である。現在、種々の癌種で、生検材料などを用いてその性状に関連する遺伝子シーケンスの検出が試みられている。しかし、この方法は侵襲的であり、かつサンプリングエラーによる誤診が発生し得る問題点を有している。これに対し、遺伝子シーケンスに特異的な放射性元素標識アンチセンスオリゴヌクレオチド(ODN)を用いた画像化が可能であれば、低侵襲的で高精度の診断ができることに加え、治療用核種による治療にも結びつく点で理論上理想的な方法である。この手法の確立には、高い比放射能の標識ODNを得るための標識法の樹立、効果的な細胞内デリバリー法の開発が必要である。本研究では、癌細胞の薬剤耐性に深く関わる多剤耐性遺伝子mdr1のmRNAに対するアンチセンスODNの放射性元素標識を試み、多剤耐性細胞（マウス白血病細胞株P388/R）へのターゲティングの可能性を検討した。

まず、P388/R細胞が本研究におけるターゲット細胞として妥当なものであることを証明するために、mdr1のmRNAをRT-PCR法で測定した。また、それがコードするP糖蛋白(P-gp)発現状態を、P-gpの基質であることが知られている放射性医薬品^{99m}Tc-sestamibiの細胞内摂取量分析で検討した。ODN標識は、二官能基性キレート剤を用いた¹¹¹In標識法条件の最適化を行い、¹¹¹Inの放出するγ線による画像化に必要な高比放射能標識体を得られるか否かを検討した。最終的に得られた標識ODNの細胞内摂取動態の詳細を観察し、細胞内摂取改善法を探った。

RT-PCRにより、mdr1 mRNAがP388/R細胞に高度に発現しているのに対し、その親株で多剤耐性能を有さないP388/S細胞にはごくわずかししか発現していないことが示された。また、P388/R細胞への^{99m}Tc-sestamibi摂取は、P388/S細胞に比べ有意に低かった。これらの結果により、P388/R株の多剤耐性能がmRNAレベルとphenotypeで証明された。¹¹¹In標識ODNを得るために、mdr1 mRNAの-1位から14位のシーケンスに相補的な15-merのphos-

phorothioate化アンチセンスODNの5'末端のリン酸基に結合させたアミノ基を介して、pH 8-9の条件下で無水diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)を結合させた。0.1-17.4 μMの濃度条件でpH 5で¹¹¹InCl₃と1時間反応させ、高速液体クロマトグラフィーで標識率を確認した結果、¹¹¹InCl₃添加量に依存的に比放射能が高値となり、1,634 MBq/nmolの高比放射能標識体を得ることできた。アンチセンス標識体のmRNAとのハイブリッド形成能は85%と十分に保持されていた。標識体そのものの形態での細胞内取り込みは、P388/R株、P388/S株の両者においてアンチセンスODNとセンスODNに有意差は認められなかった。原因は主にODNの陰性帯電と細胞膜の陰性帯電による相互作用にあると考えられた。ODNを正電荷あるいは中性電荷を持つ合成脂質キャリア(Transfast™)に抱合することにより、アンチセンスODNのP388/R細胞への選択的高度集積とその保持が確認された。

以上の結果から、ODNの¹¹¹In標識が、γ線による生体内腫瘍組織画像化が可能な高比放射能で達成可能であることが示された。また、標識体のキャリア抱合化により、¹¹¹In標識アンチセンスODNの効果的な細胞内デリバリーが可能であることが明らかになった。これらの成果は、今後の放射性元素標識アンチセンスODNによる癌組織性状診断法の開発に結びつくものであると考える。

[参考文献]

- 1) J. Bai, et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **31**, 1523-1529 (2004)

S-4：遺伝子治療モニタリングのための遺伝子発現イメージングの開発

平井宏和(金沢大学学際科学実験センター)

小脳は体の平衡を保ったり、歩行するなどたくさんの筋肉を使う運動を行う際に、個々の筋肉の動きを調節する協調運動に関与している。また、スポーツが上達することに代表される運動学習にも重要な役割を果たす。我々が脳で考え、それを動作に移す場合、その信号は脳幹、脊髄を経て筋肉に伝えられ運動となる。脳から脳幹へ入った信号は脊髄に送られるだけでなく、苔状線維を介して小脳皮質にも入り、そこで顆粒細胞に伝達される(図1)。顆粒細胞の軸索(平行線維)は、プルキンエ細胞との間に興奮性シナプスを形成し、これに信号を伝える。一個のプルキンエ細胞には10万個にもおよぶ平行線維シナプスが形成されている。また、下オリブ核

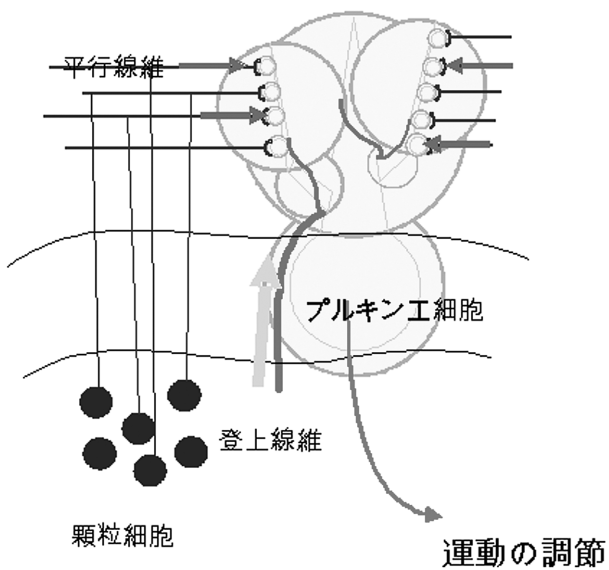


図1

の神経細胞からも登上線維を介して興奮性入力を受ける。プルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであり、その信号は脳幹の小脳核、前庭核を経て最終的に筋肉へ伝えられ、複数の筋肉の動きを調整することによってスムーズに動作が行えるようにする。プルキンエ細胞は様々な遺伝的要因で、発達期あるいは成熟後に障害を受ける。プルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであることから、その障害は顕著な小脳機能障害、すなわち小脳失調（運動失調、構語障害、眼振など）として現れる。もしプルキンエ細胞の障害を回復することができれば、小脳失調の根本的な治療につながる可能性がある。

国の難病に指定されている脊髄小脳変性症

（Spinocerebellar ataxia ; SCA）は、小脳、脳幹、脊髄の神経細胞が変性・脱落下し進行性の運動失調を主症状とする症候群である。SCAの約40%は遺伝性で、近年のゲノム科学の急速な発展に伴い原因遺伝子がつぎつぎに同定されている。SCAの1型、2型、3型などにおいては、原因遺伝子内のCAGリピートの異常伸長が病因であることが明らかとなっている。原因遺伝子は異常伸長ポリグルタミン鎖を含むタンパク質に翻訳され、神経細胞内に蓄積する。これにより神経細胞が障害され、最終的に変性脱落するのである。したがって、神経細胞内において原因遺伝子の発現を抑制、あるいは翻訳後であっても毒性を持つタンパク質を分解することができれば、SCAの根治につながると考えられる。実際、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、SCA1型モデルマウス的小脳プルキンエ細胞にshRNAを導入することで原因遺伝子の発現を低下させ、運動失調の進行を抑える研究が報告されている。一方、我々はレンチウイルスベクターを用いて、原因タンパク質の分解を促進する遺伝子をプルキンエ細胞に導入し、これによって神経変性を抑える研究を行っている。これまでの研究で、小脳プルキンエ細胞に効率的に遺伝子導入することに成功している（図2）。しかし、小脳は虫部と両側の半球よりなる大きな器官であるため、接種したウイルスが小脳全体に広がらず、しばしば遺伝子発現が小脳の一部に局限してしまうことがある。SCAの遺伝子治療として臨床応用した場合、小脳のできるだけ広範囲で治療用遺伝子が発現する必要がある。小脳のどの程度の領域で治療用遺伝子が発現しているのかをモニターすることは、その後の治療方針を決める上で重要なことである。遺伝子発現領

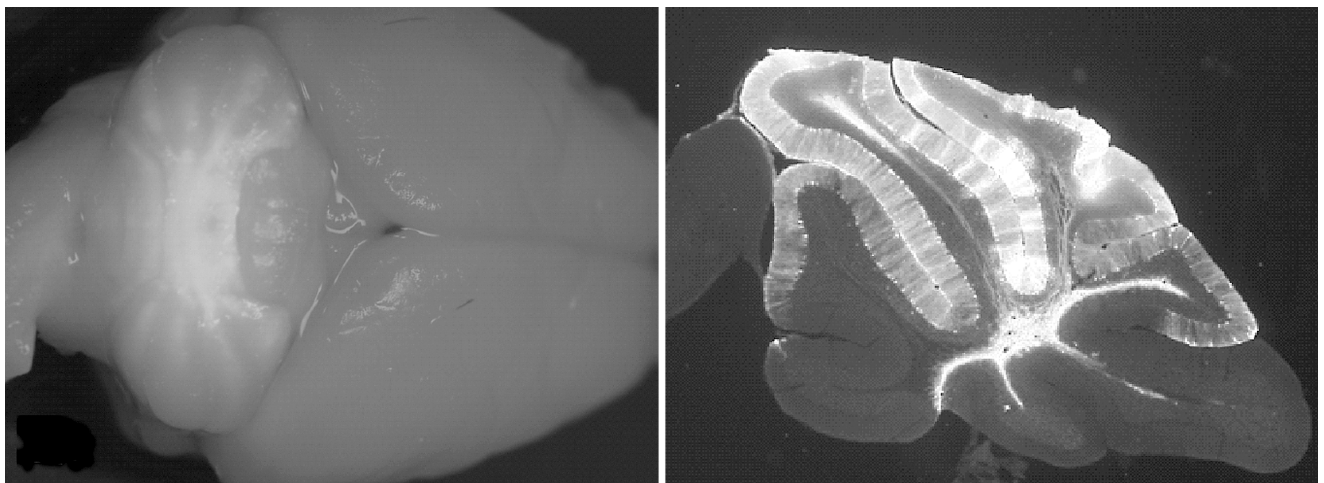


図2

域が十分でない場合は、追加のウイルス接種が必要となるからである。このようなことから、我々はレンチウイルスベクターによる小脳皮質への遺伝子発現をモニタリングする方法を検討した。

遺伝子発現モニタリングのためのレポーター遺伝子として、我々はドパミン D2 受容体遺伝子を発現させることとした。小脳におけるドパミン D2 受容体遺伝子の発現は、静脈投与した ^{125}I -IBZM の特異的結合を検出することで可能となる。ドパミン D2 受容体には点変異を導入し、受容体としての機能を阻害した。ブルキンエ細胞は内在性のドパミン D2 受容体を発現していないため、この受容体遺伝子を発現させても Dominant Negative 体として働くことはなく、また内在性受容体への IBZM 結合によるバックグラウンド上昇の心配もない。レンチウイルスで発現させることができる外来遺伝子は、一般的には 8kbp と言われている。しかし、5～6 kbp を超えるとパッケージング効率が著しく低下し、得られるウイルス力価も低くなる。ドパミン D2 受容体遺伝子は 1.4kbp と小さく、治療用遺伝子、プロモーターと合わせても 4 kbp 程度であり、パッケージングにも影響を与えないと考えられる。

S-5：標識リガンドの輸送ツールの探索

加藤将夫，久保義行，辻 彰（金沢大学大学院自然科学研究科）

1 はじめに

生体は自身にとって「必要なもの」を体内へ積極的に取り込み、「不要なもの」を体外へ排出することで、ホメオスタシスを維持していると考えられる。したがって、生体組織の細胞、とりわけ物質輸送を司る細胞膜上には、生体にとって必要なものと不要なものとを認識し区別するための様々な輸送機構の存在することが推測される。生体にとって異物である標識リガンドを分子イメージングのため利用する場合には、このような輸送の分子機構を解明するとともに、組織（あるいは細胞）選択的なデリバリー特性を示す理想的なリガンドを構築しなければならない。我々はこれまで細胞膜上に備わる輸送担体（トランスポーター）に着目し、それらの分子実体の解明や生体内での役割を解析することによって、「必要なもの」と「不要なもの」を巧妙に選別輸送する分子機構の一端を明らかにすることを目指して研究を行ってきた。

2 血液脳関門における物質輸送

生体のホメオスタシス維持にとって極めて重要な

中枢神経系への物質輸送は、血液脳関門によって極めて厳密に制限されている。血液脳関門は古くは血管内皮細胞のタイトジャンクションにより形成される物理的バリアーとの理解がなされていたが、現在では内皮細胞膜上に存在する種々の輸送機構からなるダイナミックなバリアーであることが認識されている。標識リガンドを血液脳関門へ到達させる場合、いくつかの輸送経路を利用することが考えられる。すなわち、リガンド自身の濃度勾配に従って細胞膜を透過する単純拡散、トランスフェリンなど内因性物質に対する受容体を利用した受容体介在性エンドサイトーシス、主に塩基性のペプチドやタンパク質と内皮細胞表面との結合を利用した吸着性エンドサイトーシス、アミノ酸や糖、薬物などを認識し輸送するトランスポーター介在性の膜透過などである。低分子の標識リガンドを利用する場合、とりわけトランスポーター介在性の膜透過が重要となる。

薬物など生体にとって異物の血液脳関門を介した物質透過は、一般には透過する分子の脂溶性と分子サイズによって決まるため、内皮細胞を介した単純拡散が薬物の透過性の重要な決定因子であると考えられてきた。しかしながら、免疫抑制薬であるシクロスポリン、抗不整脈薬であるジゴキシン、抗悪性腫瘍薬のビンクリスチンなど、脂溶性が高いにもかかわらず脳の実質側にほとんど移行しない薬物も見られる。我々は、この原因が血液脳関門の血液側細胞膜に局在する P-糖タンパク質を介した排出輸送系の働きであることを世界に先駆けて報告し、現在ではこの仮説が広く認知されているばかりでなく、multidrug resistance associated protein (MRP) family, organic anion transporting polypeptide (OATP) family, breast cancer-resistance protein (BCRP) など、様々な異物認識トランスポーターが血液脳関門として機能することが示唆されつつある。P-糖タンパク質が脳への物質移行に重要な役割を果たす例として、比較的脂溶性の高いニューキノロン系抗菌薬の脳への移行が P-糖タンパク質により制限され、けいれん等の副作用が低く抑えられている例がある。P-糖タンパク質は血液脳関門のみならず、肝臓、腎臓、小腸などの上皮細胞管腔側にも発現しており、胆汁、尿、消化管への異物排出ポンプとして機能していると考えられている。一方で、血液脳関門には栄養物質を循環血液から選択的に取り込むために、それぞれ独立したトランスポーターが発現している。したがって、これらを利用した物質の脳へのデリバリーも可能となる。例として中性アミノ酸輸送系による L-

ドーパ、バクロフェン、ギャバペンチンなどの脳への輸送がある。また我々の研究から、H1-拮抗薬であるメピラミンはトランスポーターを介して脳内に移行する一方、両性イオン型のH1-拮抗薬はカチオン型誘導体に比してトランスポーターに対する親和性が低く、脳移行性が低下するため、眠気などの中枢性副作用が抑えられることが示されている。このようにトランスポーターによる認識性を変えることにより物質の脳移行性を制御することが可能である。

3 癌細胞における物質輸送

腫瘍細胞は自身の生存と増殖能を維持するために、細胞膜輸送系を確立し、必要なものと不要なものを区別している。腫瘍細胞には前述のP-糖タンパク質等の排出輸送系が高いレベルで発現し、幅広い抗癌剤を細胞外へ排除する。一方で、ある種のアミノ酸トランスポーターは腫瘍細胞に強く発現し、栄養物質の取り込みに働いていることが推測されている。また、主として小腸と腎臓に発現しているオリゴペプチドトランスポーターが腫瘍細胞にも発現しており、ベスタチン等のペプチド系抗癌剤の腫瘍組織選択的なデリバリーに関与することが我々のグループにより示されている。オリゴペプチドトランスポーターは小腸や腎臓の上皮細胞管腔側膜に発現し、ペプチドの吸収や再吸収に関与する。腫瘍細胞の血液側に面して発現していると考えられるオリゴペプチドトランスポーターの選択的な標識リガンドは、癌診断にも有用である可能性がある。

4 新規トランスポーターとそのネットワークの探索

近年の分子生物学的研究の進歩により、数多くの異物認識トランスポーターが同定され、物質の細胞膜透過に重要な役割を果たすことが示唆されつつある。一方で、それらトランスポーター分子が細胞膜上においてどのような形で存在するかについては、ほとんど明らかになっていない。我々は最近、腎臓や小腸の管腔側に発現する種々のトランスポーターがPDZドメインを有するある種のscaffoldタンパク質群と特異的に相互作用することを明らかとしている。これらタンパク質は分子内に複数のトランスポーター結合ドメインを有し、各ドメインが単独で結合能を有することから、多くのトランスポーターがこれらscaffoldタンパク質を介しネットワークを形成することが考えられる。実際我々は、このようなトランスポーターのネットワークが生体内でも起こり、物質の効率的な輸送に極めて重要であることを示唆するデータを得ており、薬物の組織選択的デリバリーにおいてもそのようなネットワークとしての

生理的役割を解析する必要があるものと考えられる。

5 文献

- 1) A. Tsuji: Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport system, *J. Am. Soc. Exp. Neuro.*, **2**, 54-62 (2005)
- 2) 辻 彰: 薬物トランスポーター群の分子機構を用いた創薬, *医療ジャーナル*, **40**, 1427-1433 (2004)
- 3) 辻 彰: パスポート・ケートウェイ蛋白質の分子認識・輸送, *DDS*, **18**, 83 (2003)
- 4) T. Nakanishi, I. Tamai, A. Takaki, and A. Tsuji: Cancer cell-targeted drug delivery utilizing peptide transporter, *Int. J. Cancer*, **88**, 274-280 (2000)
- 5) Y. Kato, Y. Sai, K. Yoshida, C. Watanabe, T., Hirata, and A. Tsuji: PDZK1 directly regulates the function of organic cation/carnitine transporter OCTN2, *Mol. Pharmacol.*, **67**, 734-743 (2005)

S-6: 分子イメージング研究のための遺伝子改変マウスの開発

成瀬智恵, 福住好恭, 柿内 太, 浅野雅秀 (金沢大学学際科学実験センター)

ヒトやマウスのゲノム配列の解読が終了し、我々が持っていると予想される2万5千から3万個の遺伝子について各々の機能解析へと研究が展開しているが、発生・免疫・神経といった高次の生命機能の解析には遺伝子改変マウスを用いた研究が欠かせない。ES細胞での相同組換え法を用いた従来の遺伝子改変マウスの作出法は、時間とコストが掛かり、すべての遺伝子を対象とした網羅的な解析には不适当である。そこで登場してきたのが、トラップベクターをES細胞ゲノム中にランダムに挿入する遺伝子トラップ法やENUなどの突然変異原性のある化学物質をマウスに投与して、ランダムにゲノムに突然変異を導入する方法である。どちらも特定の遺伝子を狙って変異を導入することはできないが、一度の操作でたくさんの遺伝子に変異を導入することが可能である。特に、遺伝子トラップは、トラップベクターの配列をプローブにトラップされた遺伝子を同定することが容易であり、トラップベクターの挿入によりトラップした遺伝子が破壊される可能性が高く、さらにトラップベクター内のlacZ遺伝子を指標に、トラップした遺伝子の生体内での発現パターンを容易にイメージングすることができる。

我々は、レチノイン酸などの液性分化誘導因子を培地に添加したり、Brachyury や HNF-3 β などの発生制御転写因子をアデノウイルスベクターを用いて ES 細胞に作用させることで、発生過程に重要な役割を担っている遺伝子をトラップすることを試みている。今回は、「分子イメージング」がキーワードであるので、我々のところでトラップに成功したいくつかの遺伝子について、トラップベクター内の lacZ 遺伝子を用いた生体内の発現イメージングの例

を紹介する。LacZ 遺伝子に核移行シグナルを付加してあるので、発現細胞の核が鮮明に染まり、ヘテロ変異マウスを用いて、卵割期の初期胚から成体臓器の切片まで容易に発現パターンをイメージングすることができる。また、これらの遺伝子のホモ変異マウスでは、その発現が強く見られたところで、異常が観察されており、lacZ を用いた発現イメージングは、遺伝子変異マウスに生じる異常を解析する上でたいへん有効な手段となることがわかる。

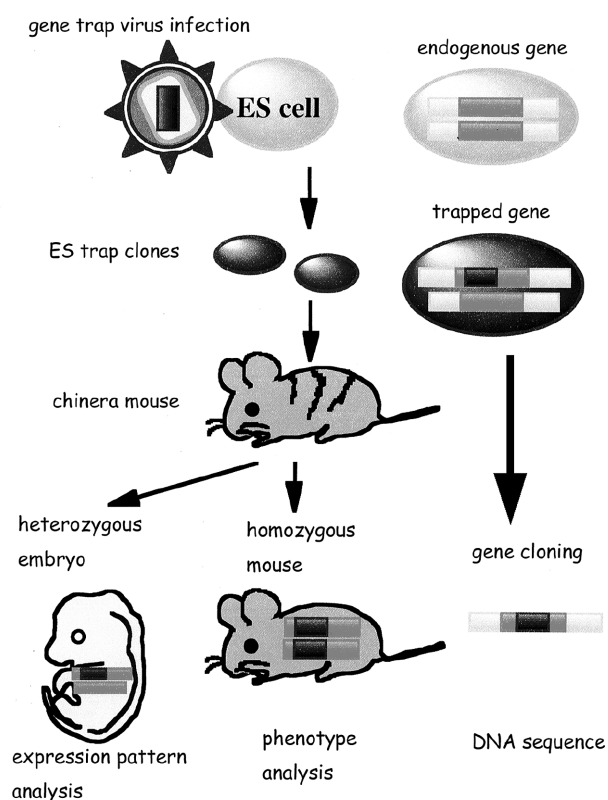


図1 遺伝子トラップの流れ

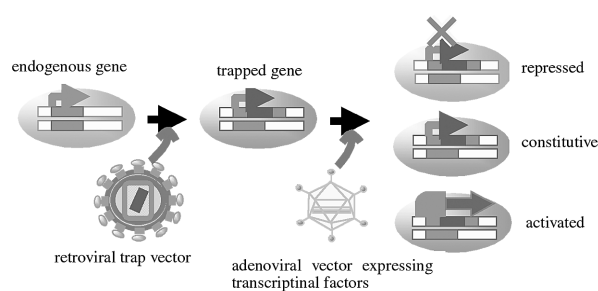


図2 転写因子による選別

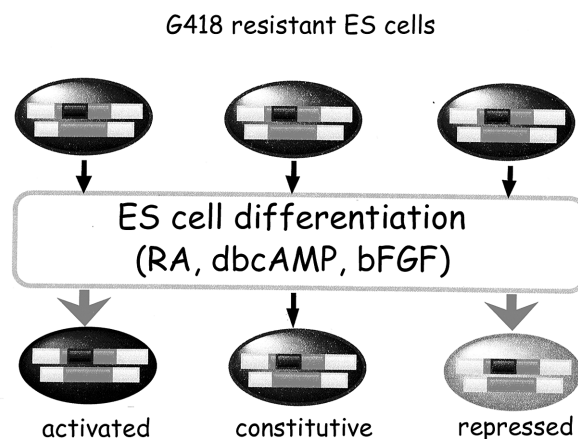


図3 液性分化誘導因子による選別