

CONTENTS

●Review

樹状細胞療法と多能性幹細胞
熊本大学大学院医学薬学研究部 千住 寛

漢方診断・再発見 4 感染症と漢方
熊本大学エイズ学研究センター 岡田 誠治

●Topics on Chemistry

ナノ粒子を用いた神経細胞
へのタンパク質導入
株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

一分子 DNA ポリメラーゼによるリアルタイム
DNA シーケンシング
株式会社同仁化学研究所 江頭 貴宏

2010 No.133

ISSN 0385-1516

DOJIN NEWS

ドージンニュース

目次

Review

樹状細胞療法と多能性幹細胞
 熊本大学大学院医学薬学研究部 千住 寛 …………… 1

漢方診断・再発見

4 感染症と漢方
 熊本大学エイズ学研究センター 岡田 誠治 …………… 6

Topics on Chemistry

ナノ粒子を用いた神経細胞へのタンパク質導入
 株式会社同仁化学研究所 大内 雄也 …………… 8
 一分子 DNA ポリメラーゼによるリアルタイム DNA シーケンシング
 株式会社同仁化学研究所 江頭 貴宏 …………… 9

Commercial

新製品
 アンジオテンシン変換酵素阻害活性測定キット…………… 12

Q&A
 アンジオテンシン変換酵素阻害活性測定キット…………… 12

試作品
 SAMs 作製用試薬…………… 13

開発中
 二次元電気泳動用膜タンパク質溶解剤…………… 11

お知らせ

書籍のご案内…………… 10
 販売中止予定のお知らせ…………… 11
 フォーラム・イン・ドージン開催報告…………… 14

新製品案内

アンジオテンシン変換酵素阻害活性測定キット

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ACE Kit – WST	100 tests	68,000	A502



20th フォーラム・イン・ドージン前夜祭にて、演者らと

樹状細胞療法と多能性幹細胞 Dendritic cell therapy and pluripotent stem cells



千住 覚 (SATORU SENJU)

- 1) 熊本大学・大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野
- 2) 熊本大学・発生医学研究所・幹細胞部門・iPS細胞研究担当
- 3) 科学技術振興機構・CREST

要約

Dendritic cells (DC) are the most potent antigen-presenting cells and the major regulator cells of immune system. Genetically engineered DC expressing antigens and immuno-regulatory molecules are regarded as promising means to manipulate immune responses both positively and negatively. We have established methods to generate DC from mouse and human embryonic stem (ES) cells. Genetic modification of ES cell-derived DC (ES-DC) can readily be done by the introduction of expression vectors into undifferentiated ES cells by electroporation and subsequent induction of differentiation of the transfectant ES cell clones to ES-DC. Using mouse models, we have demonstrated the usefulness of genetically modified ES-DC in eliciting anti-cancer immunity and in treating autoimmune disease. Considering future clinical application of this technology, unavailability of human ES cells genetically identical to the patients is a crucial problem. By applying ES-DC technology to iPS cells, we will overcome the issue of histocompatibility and also ethical issues arising from the use of human ES cells. I herein introduce our researches on pluripotent stem cell-derived dendritic cells and discuss the possible clinical application.

キーワード：多能性幹細胞、ES細胞、iPS細胞、樹状細胞、免疫療法 がん、自己免疫疾患

1.はじめに

樹状細胞は、生体内各所に常在する白血球の一種であり、抗原タンパク質をプロセスしてT細胞に提示する抗原提示機能に特化した細胞である。感染性微生物の生体への侵入、あるいはワクチンの投与などに際しては、樹状細胞がこのような外来性の異物（抗原）を捕捉し、リンパ管あるいは血管を経由してリンパ節や脾臓などのリンパ性組織へ移行する。リンパ性組織において、樹状細胞は、捕捉した外来抗原中のタンパク質を限定分解し、その結果として産生されたオリゴペプチドをMHC(主要組織適合抗原複合体；ヒトにおいてはHLA)分子との複合体として細胞表面上へ提示する。一方、T細胞は、血流に乗って全身を巡っており、血行性にリンパ性臓器へ到達する。そして、樹状細胞上に提示された抗原に対する特異的なレセプター（T細胞レセプター、TCR）を有するT細胞が、これを認識し活性化することにより、抗原特異的な免疫応答、すなわち獲得免疫応答が開始される。樹状細胞は、このように抗原特異的な免疫応答の賦活化において必須の役割を担っているが、さらに、自己に対する免疫応答を抑制する免疫学的自己寛容の維持、あるいは、過剰な免疫応答を抑制する上でも、重要な役割を果たしていると考えられる。

樹状細胞は、このように免疫応答の制御を担う中心的な細胞であり、これを用いた細胞療法が検討されている。すなわち、体外で操作により抗原を付加した、あるいは、機能を修飾した樹状細胞を投与することにより、生体の免疫応答を人為的に制御する免疫制御療法である。

我々は、これまでにマウス、サル、およびヒトの多能性幹細胞から樹状細胞を作製する技術、さらに未分化な状態の多能性幹細胞において遺伝子改変を行い、これを樹状細胞へ分化誘導するこ

とにより遺伝子改変樹状細胞を作製する技術を開発している。そして、マウスモデルにおいて、特定の抗原と各種の免疫制御分子を同時に発現する樹状細胞を作製し、これを投与することにより個体の免疫応答を抗原特異的に制御するという独自の手法を確立している。これまでの筆者らの研究のほとんどは、ES細胞を使用したものであるが、今後は、これまでの成果をiPS細胞へ応用し、医療技術としての実用化へ向けた研究を進めたいと考えている。本稿では、筆者らの研究を中心に多能性幹細胞由来の樹状細胞を用いる免疫制御療法について紹介する。なお、本稿では、実験の方法や結果の詳細については割愛させていただいたので、内容に興味を持たれた方には、参考文献に挙げた原著論文をご参照頂ければ幸いである。

2.がんに対する抗原特異的免疫療法

がんに対する抗原特異的免疫療法は、適切ながん抗原を標的とすることにより選択的にがん組織を攻撃することを狙うものであり、副作用が少なく、かつ効果の高い治療法になりうる可能性を秘めている。過去十数年来、免疫療法の標的となりうるがん抗原の同定が精力的に行われてきた結果、数多くのがん抗原が同定されているが、そのうちのかなりのものは、細胞表面ではなく細胞質あるいは核内に存在するタンパク質である。これらのがん抗原を標的として免疫療法を行うためには、抗原に特異的なT細胞(主に細胞障害性T細胞) 応答を賦活化する必要がある。

現在、これまでに同定された抗原の標的抗原としての有用性を検討すべく臨床試験が行われている。多くの臨床試験では、細胞障害性T細胞のエピトープに相当する合成ペプチドを皮下投与するペプチドワクチンの手法が採られている。細胞障害性T細胞

胞のエピトープとなる 8-10 アミノ酸残基のオリゴペプチドは、一般的には安定な化学物質であり、大量合成と精製が容易、比較的安価、総じて毒性がない等、医薬品として製造・使用する場合のメリットが大きい。また、多くの臨床試験の結果から、適切なエピトープを選択すれば、人体への投与が許容されている不完全フロイントアジュバントを用いたペプチドワクチンによる細胞障害性 T 細胞の誘導効果は十分に高いことが示されている。一方、マウスを用いた動物実験において、抗腫瘍効果の誘導という点では、T 細胞刺激細胞である樹状細胞に腫瘍抗原を負荷して投与する樹状細胞ワクチンにより、さらに高い効果が得られることが認識されている。

3. 抗原特異的免疫抑制法

種々の自己免疫疾患は、様々な自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、免疫系による攻撃により組織傷害が生ずるものである。今日、多くの自己免疫疾患に対して施行されている免疫抑制剤を用いた治療では、免疫応答能が全般的に低下する結果、感染症に罹患する、あるいは悪性腫瘍が発生する危険性が高まるという問題がある。そこで、免疫応答能全体を低下させず、標的となっている自己抗原に対する免疫応答のみを特異的に抑制する治療法の開発が切望されている。

また、腎移植など固形臓器の移植においては、移植後の拒絶反応が、また、骨髄移植などの造血幹細胞移植においては、移植片対宿主病 (GVHD) の発症が、大きな問題となっている。このような拒絶反応と GVHD は、レシピエントあるいはドナー由来の免疫細胞のアロ (同種異系) 抗原に対する反応が原因で発生するものである。これを制御するため、移植医療においても免疫抑制剤の使用が必須であり、これに伴い免疫不全状態が招来される。この問題を克服し移植医療をより安全かつ成功率の高いものとするために、アロ抗原に対する免疫応答を特異的に抑制する医療技術の開発が必要である。

樹状細胞は、免疫応答を抑制的に制御する制御性 T 細胞 (regulatory T cells) を活性化する能力にも優れている。アロ抗原を発現する樹状細胞を用いてアロ抗原特異的な制御性 T 細胞を活性化するなどして、アロ抗原に対する免疫応答をコントロールできる可能性がある。

4. 樹状細胞を作製するための材料としての多能性幹細胞の有用性

現在、臨床的に施行されている樹状細胞療法として、腫瘍抗原を負荷し生体に移入するがんに対する細胞ワクチン療法がある。抗腫瘍免疫療法に用いられる樹状細胞は、末梢白血球中の単球 (モノサイト) を GM-CSF 等のサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製されている。しかしながら、末梢血単球は、体外で増殖させることができないため、樹状細胞治療に必要な数を得るためには、大量の血液をアフエレーシス (成分採血) 処理することにより得られた白血球中から単球を分離する必要がある。さらに、単球から樹状細胞への分化誘導効率には細胞ドナーにより大きな個人差があり、アフエレーシスを行っても必ずしも十分な数の樹状細胞が得られるとは限らない。このように、末梢血単球由来の樹状細胞を用いる方法は、ドナーの負担と細胞供給の不安定性という問題があり、その臨床的有効性が確認されたとしても、医療技術として広く普及するのは困難であると予想される。

ES 細胞は、様々な細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞である。ES 細胞は、また、旺盛な増殖能力を有し

ており、適切な条件の下で培養することにより、多能性を保ったまま無限に増殖させることが可能である。筆者らは、無限増殖能を有する ES 細胞を材料として樹状細胞を作製することが可能になれば、細胞ドナーへ負担をかけることなく必要な数の樹状細胞を作製できるようになると考えた。また、ES 細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション法により、簡便に遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも容易である。そこで、ES 細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより、抗原タンパク質あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能を様々に修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

5. マウス ES 細胞からの樹状細胞への分化誘導

以上のような考えに基づいて、筆者らは、まず、マウスの ES 細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。マウスの ES 細胞から各種の血液細胞への分化を誘導する方法として、OP9 細胞 (正常な M-CSF 遺伝子を欠損した op/op マウスに由来する骨髓ストローマ細胞株) をフィーダー細胞として用いる方法が、仲野ら¹⁾により報告されていた。筆者らは、この方法を参考にして、OP9 細胞等のフィーダー細胞と共培養することにより、ES 細胞から血液細胞への分化を誘導し、さらに適切なタイミングで樹状細胞への分化を促すサイトカインを加えることにより、樹状細胞への分化誘導ができると考え、研究を開始した。その結果、マウス ES 細胞から樹状細胞を作製する以下のような培養プロトコルを確立した (図 1)²⁾。

まず、維持培養中の ES 細胞をトリプシン / EDTA を用いて回収し、単層培養している OP9 細胞の上へ播種し、5-6 日間培養する。この結果、ドーム状に盛り上がった形態を示す未分化な ES 細胞のコロニーが、分化した平坦な形態のコロニーへ変化する。次に、分化した細胞をトリプシン / EDTA を用いて培養プレートから回収し、新たに準備した OP9 細胞上で GM-CSF の存在下で 5-6 日間培養する。この結果、OP9 細胞上に浮遊性あるいは弱付着性の ES 細胞の細胞が出現し、GM-CSF に依存して増殖する。この細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し、さらに GM-CSF の存在下で培養を続けると 3-7 日目頃より不規則な樹状突起を有する浮遊性の細胞が出現する。この細胞は、アロ T 細胞を刺激して増殖誘導する活性 (MLR 刺激活性) を有しており、また、細胞表面に CD80、CD86、MHC クラス II 等を発現していた。これをさらに TNF- α 、IL-4、抗 CD40 刺激抗体、あるいは LPS 等で刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力な T 細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞となる。筆者らは、この ES 細胞由来の樹状細胞を、ES-DC と名付けた。ES-DC は、GM-CSF に依存して分化すること、および、表面マーカー (CD11b 陽性) から、ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えられる。

6. マウスモデルを用いた ES-DC による免疫制御療法の有効性の検討

上述した方法で作製した、様々な遺伝的改変を施したマウスの ES-DC を用いて、免疫制御に関する以下のような研究を行った。

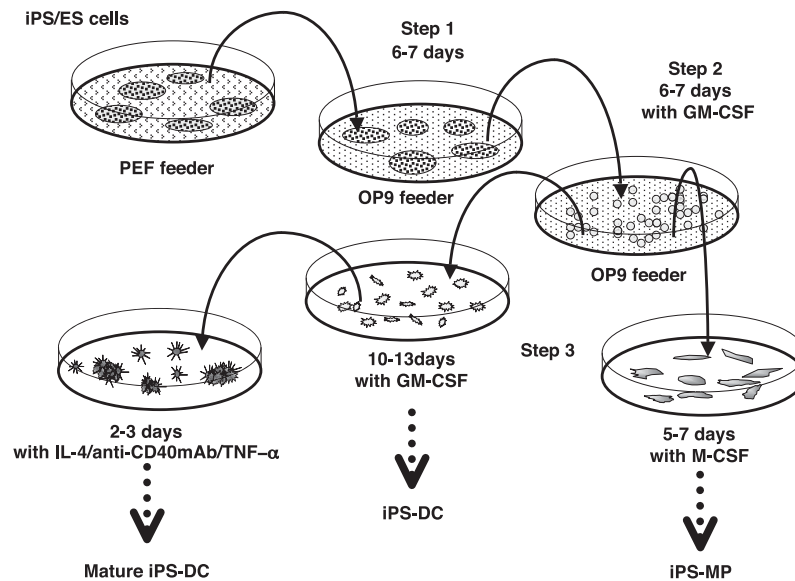


図1 マウスiPS・ES細胞からの樹状細胞への分化誘導

6.1 抗原とケモカインを共発現するES-DCを用いた抗腫瘍免疫効果の増強

ナイーブ（抗原に暴露されていない）T細胞は、リンパ節などのT細胞領域において樹状細胞による抗原提示を受け、エフェクターT細胞やメモリーT細胞となる。しかしながら、樹状細胞を体外から投与した場合、リンパ節へ到達するのは投与した樹状細胞のうちの極一部であり、例えば、樹状細胞を皮下投与した場合、所属リンパ節へ到達するのは1%以下に過ぎない。したがって、体外から移入した樹状細胞のうち、抗原特異的なナイーブT細胞と遭遇しT細胞を感作するという役目を果たせるものは、ごく一部であるということになる。

筆者らは、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを発現させることにより、ES-DCが抗原特異的T細胞を遭遇する効率を改善し、抗原を負荷した樹状細胞による免疫効果を向上させられると予想した。生体移入したES-DCがリンパ性臓器へ遊走できなくても、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを強制発現させておけば、ES-DCが存在する場所へT細胞が集まるので、抗原特異的なT細胞を活性化する効果を高めることができると考えたのである。

モデル腫瘍抗原であるオブアルブミン（OVA）の遺伝子を導入したマウスES細胞に、さらに、T細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、このES細胞からOVAとケモカインを同時に発現するES-DCを作製した。T細胞の遊走を促すケモカインとして、生理的に存在する樹状細胞からは産生されない、SLC（CCL21）、Mig（CXCL9）、およびLymphotactin（XCL1）の3種類を選択した。そして、OVAと各々のケモカインを同時に発現するES-DCを作製し、これらのES-DCをマウスに投与した時の免疫効果を比較した³⁾。

その結果、この3種類のケモカインのいずれについても、OVAを単独で発現するES-DCよりも、OVAとケモカインを同時に発現するES-DCの方が、より効果的にCTLを活性化できることが

わかった。さらに、SLCあるいはMigをOVAと同時に発現するES-DCは、OVA単独発現のES-DCよりも、抗腫瘍効果の誘導においても優れていた。特にSLCの共発現により、最も強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた。

6.2 αガラクトシルセラミド（α-GalCer）を負荷した抗原発現ES-DCによる抗腫瘍免疫の誘導

NKT細胞は、NK細胞とT細胞の中間的な性質を有する細胞であり、腹腔内、肝臓、肺等に多く存在する。通常のT細胞と同様に抗原レセプターを発現するが、その構造の多様性は非常に限定的であり、非古典的MHCクラスI分子の一種であるCD1d分子上に提示されたα-GalCerなどの脂質抗原をリガンドとして認識する。α-GalCerの刺激を受けたNKTは、IFN-γやIL-4などのサイトカインを大量に産生し、他の免疫細胞を活性化する。樹状細胞にα-GalCerを負荷して投与することにより、NKT細胞によるIFN-γの産生を強力に誘導できることが知られており、α-GalCerを負荷した樹状細胞による抗腫瘍免疫療法の臨床試験も行われている。

我々は、マウスES-DCも、通常の樹状細胞と同様にα-GalCerを負荷した場合にNKT細胞を活性化することができることを見いだした⁴⁾。そこで、腫瘍抗原を発現するES-DCにα-GalCerを負荷して投与することにより、抗原特異的なT細胞とNKT細胞を同時に活性化し、より強力な抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え実験を行った⁴⁾。

OVA抗原を人為的に発現させたマウスメラノーマ細胞MO4をマウス腹腔内に移植し、その3日後にES-DCを投与し、その後のマウスの生存期間を観察した。その際、投与するES-DCについて、OVA抗原を発現する、あるいは発現しないものに、各々、α-GalCerを負荷した場合と負荷しない場合の合計4通りを比較した。その結果、α-GalCerを負荷していない抗原を発現しな

いES-DCを投与した場合に比べて、 α -GalCerを負荷したOVA抗原非発現のES-DCあるいは α -GalCerを負荷していない抗原発現ES-DCを投与した場合、わずかではあるが有意な生存期間の延長が見られた。一方、 α -GalCerを負荷したOVA抗原発現のES-DCを投与した場合には、著明な生存期間の延長が見られた。腹膜播種をきたした悪性腫瘍のコントロールは非常に困難であり、がん治療の臨床医学において解決すべき大きな課題である。筆者らは、以上の実験結果は、ES-DCによる腹膜播種がんに対する新たな治療法の可能性を示すものであると考えている。

6.3 ES-DCを用いた免疫応答の抑制的制御

ES-DC技術の応用として、自己免疫疾患の標的となる自己抗原と免疫抑制分子とを同時に発現させたES-DCによる自己免疫疾患の治療について検討を行った^{5,6)}。EAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎)は、MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein)などミエリン鞘抗原を強力なアジュバントと混合して動物に投与することにより、自己反応性T細胞を活性化することにより誘導される自己免疫疾患のモデルである。このモデル疾患では、中枢神経系への炎症細胞浸潤と下肢を中心とする運動麻痺が惹起される。

MOGに由来するペプチドとT細胞応答を抑制する機能を有するTRAILあるいはPD-L1を共発現するES-DCをマウス個体に投与することにより、EAEの発症を抑制できるかどうかを検討した。TRAILとMOGあるいはPD-L1とMOGを発現したES-DCを投与したマウスにおいて、MOGペプチドで誘導されるEAEの抑制が観察された。一方で、無関係な抗原であるOVAとTRAILあるいはOVAとPD-L1を発現したES-DCを投与したマウスでは、MOGペプチドによるEAE発症の抑制は認められなかった。さらに、これらのES-DCを投与したマウスにおいて、外来抗原蛋白(KLH)に対する免疫応答能力には変化がなかった。以上より、標的的自己抗原と免疫抑制分子を同時に発現するES-DCを投与することにより、免疫応答の抗原特異的な抑制的制御が可能であることが示された。また、この研究において、TRAILを発現するES-DCによるEAE発症抑制効果に制御性T細胞が関与していることを見いだした⁶⁾。

7. ヒトES細胞からのES-DCの作製

ES-DCの臨床応用をめざして、ヒトのES細胞からES-DCを作製する分化誘導法の開発も行った⁷⁾。造血細胞の分化や増殖を支持することが知られている複数のストローマ細胞株(OP9、ST2、PA6)をフィーダー細胞として用いて比較した結果、ヒトのES細胞の分化誘導においても、OP9を用いることにより最も良い結果が得られた。ヒトES-DCの作製においては、マウスの場合と異なり、分化誘導の過程で一時的にGM-CSFに加えてM-CSFを添加することが有効であり、また、フィーダー細胞なしで培養するステップで、GM-CSFに加えてIL-4を添加することが必要であった。ヒトES-DCも、タンパク質抗原をプロセスしてT細胞へ提示する活性やアロMLR刺激活性など、樹状細胞としての機能を備えていた。また、マウスES-DCの場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変ES-DCを作製することも可能であった。

8. マウスiPS細胞からの樹状細胞の作製

これまでに我々がES細胞を用いて確立した樹状細胞分化誘導法を用いて、マウスのiPS細胞から樹状細胞を作製できるのかど

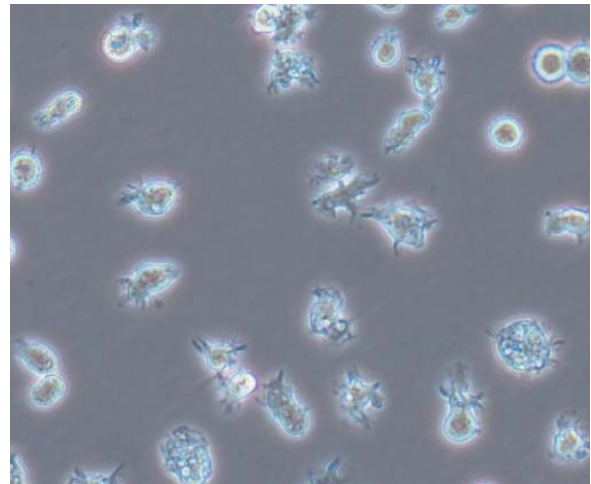


図2. ヒトiPS細胞由来の樹状細胞の形態

うか検討を行った⁸⁾。本研究では、京都大学再生医科学研究所の山中教授らの研究グループにより樹立されたマウスiPS細胞の分与を受け実験に用いた。

ES細胞に近い性質を有しているとされていたNanog-iPS細胞⁹⁾を、マウスのES細胞の場合に準じて分化誘導することを試みた。その結果、ES細胞の場合とほぼ同様の培養操作により、樹状細胞を作製することができた。iPS細胞由来の樹状細胞(iPS-DC:iPS cell-derived dendritic cells)は、樹状細胞様の形態を有するのみでなく、細胞表面にMHCクラスII、CD80、CD86を発現し、また、IL-12とTNF- α を産生した。すなわち、T細胞に対する抗原提示細胞として必要な分子を発現しており、また、タンパク質抗原のプロセッシング機能を有していた。さらに、樹状細胞に特徴的な性質とも言える、アロ(同種異系)のT細胞に対する非常に強力な増殖反応(一次MLR)誘導活性を有していた。

以上の分化誘導の過程における形態の変化や最終的に産生される樹状細胞の機能において、iPS細胞はES細胞とほぼ同等であったが、微妙な差異も認められた。iPS細胞は、我々がこれまでに扱ってきた色々な系統のES細胞株と比較すると、全てのステップにおいて分化の速度がやや遅く、最終的に樹状細胞へ分化するまでの期間が2割程度長くなる傾向があった。また、ES細胞からの分化誘導では、分化段階が進んで成熟するにつれ細胞の増殖能力が低下する、つまり、分化誘導のステップのあとの方になると細胞があまり増えない傾向があった。ところが、iPS細胞の場合は、分化段階が進み、成熟した樹状細胞に近い段階でもある程度の増殖能力を保持している、という違いも認められた。結果的に、Nanog-iPS細胞からは、マウスES細胞よりも、同じ数の未分化細胞から分化誘導培養をスタートした場合、より数多くの樹状細胞を得ることができる、という結果であった。筆者は、このようなES細胞とiPS細胞の違いは、iPS細胞作製時に導入された初期化因子(リプログラミングファクター)遺伝子が低いレベルで発現することに起因するものと考えている。

我々は、さらに、遺伝子導入により抗原を発現させたiPS-DCによる抗腫瘍細胞ワクチンの実験も行った。まず、未分化なiPS細胞に、モデル抗原であるOVA(ovalbumin:卵白アルブミン)の発現ベクターを導入した。次に、この抗原遺伝子導入iPS細胞から、前述の方法によりiPS-DCを作製した。このOVA抗原発現iPS-DCをマウス個体へ投与すると、マウス体内においてOVA

特異的な CTL (細胞傷害性 T 細胞) が誘導された。そして、OVA 抗原発現 iPS-DC による細胞ワクチンを施したマウスは、OVA 抗原を発現するメラノーマ (MO4 株) に対して拒絶あるいは増殖抑制効果を示した。すなわち、抗原遺伝子を発現させた iPS-DC の投与により、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を惹起することができた。

9. おわりに

マウス ES 細胞からの樹状細胞作製については、筆者らに先んじて、Fairchild らが、胚様体 (Embryoid Body) 形成を経由する方法を報告している¹⁰⁾。また、ヒト ES 細胞からの樹状細胞作製についても、国外の研究グループから胚様体形成法あるいは OP9 細胞を用いるフィーダー共培養が、報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。

最近、ヒト iPS 細胞から樹状細胞を含む各種のミエロイド系細胞を作製できることが、Slukvin らのグループから報告された¹⁴⁾。筆者らも既に、ヒトの iPS 細胞からも機能的な樹状細胞を作製できていることを確認している (未発表: 図 2)。体細胞から作製できる iPS 細胞の場合は、基礎的な研究の段階においても、また、臨床応用の段階でも、ES 細胞に比べるとその使用に際しての倫理的問題という障壁はるかに低い。さらに、iPS 細胞は、治療の対象となる患者自身から作製することが可能である。このため、ES 細胞とレシピエントの間の組織不適合性の問題も、ES 細胞のかわりに iPS 細胞を使用することによりクリアされる見込みとなった。今後は、ヒト iPS 細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチンの臨床応用へ向けた動きが出てくるのではないかと予想される。

ヒト iPS 細胞作製法に関連して様々な改良が報告されてはいるものの、現在の iPS 細胞作製技術では、一人のドナーからの iPS 細胞の樹立に相当な費用と時間を必要とする。従って、治療対象者全てについての個別の iPS 細胞の作製は、医療経済的に成立しない可能性、また、時間がかかりすぎて治療に必要なタイミングで細胞を供給できない可能性がある。このような問題の解決策として、日本人集団において頻度の高い HLA タイプのホモ接合体の方々にドナーになっていただいて iPS 細胞を作製し “iPS 細胞バンク” を設立する、と言う構想¹⁵⁾ は非常に有用であると考えられる。しかしながら、頻度が低い HLA ハプロタイプでは、ホモ接合のドナーが得られない可能性があるため、バンクでのカバーは難しいかもしれない。

筆者らは最近、マウス ES 細胞を用いた研究において、MHC クラス I 分子の細胞表面の発現に必須の分子である TAP (transporter associated with antigen processing) あるいは $\beta 2$ ミクログロブリンの遺伝的改変により、分化した後に任意の MHC クラス I 分子のみを発現する ES 細胞を作製する手法を報告した¹⁶⁾。頻度が低い HLA ハプロタイプについては、ヒトの iPS 細胞にこのような遺伝的改変を施すことにより任意の HLA を発現する iPS 細胞を作製する、という方法が有効であろう。

[参考文献]

- 1) Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **1994** 265:1098-1101.
- 2) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* **2003** 101: 3501-3508.
- 3) Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S et al. Enhanced priming of antigen-specific CTL in vivo by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein ; application to anti-tumor

- vaccination. *J. Immunol.* **2004** 172: 776-786.
- 4) Matsuyoshi H, Hirata S, Yoshitake Y et al. Therapeutic effect of α -galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Science* **2005** 96:889-896.
- 5) Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J. Immunol.* **2005** 174: 1888-1897.
- 6) Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D et al. Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalo-myelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J Immunol* **2007** 178:918-925.
- 7) Senju S, Suemori H, Zembutsu et al. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* **2007** 25: 2720-2729.
- 8) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, et al. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **2009** 27:1021-1031.
- 9) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **2007** 448:313-317.
- 10) Fairchild PJ, Brook FA, Gardner RL, et al. Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr Biol* **2000**;10:1515-1518.
- 11) Zhan X, Dravid G, Ye Z, et al. Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells *in vitro*. *Lancet* **2004**;364:163-171.
- 12) Slukvin II, Vodyanik MA, Thomson JA, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. *J Immunol* **2006**;176:2924-2932.
- 13) Su Z, Frye C, Bae KM, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into immunostimulatory dendritic cells under feeder-free culture conditions. *Clin Cancer Res* **2008**;14:6207-6217.
- 14) Choi KD, Vodyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43 +CD45+ progenitors *J Clin Invest* **119** 2009:2818-2829.
- 15) Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nature Biotechnol* **2008** 26:739 - 740.
- 16) Matsunaga Y, Fukuma, D, Hirata S et al. Activation of antigen-specific CTL by beta 2-microglobulin or TAP1 gene-disrupted and recipient-matched MHC class I gene-introduced allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *J.Immunol.* **2008** 181:6635-6643.

筆者紹介

氏名：千住 覚 (SATORU SENJU)

連絡先：熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野

〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1

Tel: 096-373-5313

Fax: 096-373-5314

e-mail: senjusat@gpo.kumamoto-u.ac.jp

経歴：

- 1987年 九州大学医学部卒業
- 1987-1989年 内科臨床研修
- 1989-1993年 九州大学大学院医学研究科博士課程 (生体防御医学研究所・遺伝学部門) 卒業
- 1993-1995年 ワシントン大学ハワードヒューズ医学研究所PD 研究員
- 1995年- 現所属

現在の研究テーマ：iPS細胞由来の樹状細胞とマクロファージを用いた疾患治療法の開発

漢方診療・再発見

4

感染症と漢方

岡田 誠治
熊本大学エイズ学研究センター
予防開発分野・教授

1.はじめに

人類は、その誕生以来感染症に苦しめられている。人類どころか最強の恐竜であるTレックスさえもトリコモナス（現在では鳥や哺乳類に感染する原虫）の感染により命を奪われていたらしいことが最近判明している。20世紀には抗生物質や抗ウイルス剤の登場で感染症を抑え込むことが期待されたが、いまだに世界三大感染症といわれるエイズ・結核・マラリアをはじめ感染症により多くの人が命を落としているのが現実である（表1）。また、この四半世紀だけでもエイズウイルス、C型肝炎ウイルス、SARSウイルスをはじめとする多くの新たな病原体が発見され、ヒトの癌の約20%はウイルスなどの感染症に由来していること等、ヒトが存在する限り感染症との関わりは避けては通ることはできないと考えられる。

漢方医学では、体質や体の状態に応じて処方するため、主に慢性疾患が対象であると思われがちであるが、実は、急性感染症など多くの急性疾患に有効な処方が多い。本稿では、最近話題の新型インフルエンザとエイズを例に感染症への漢方のかかわりについて述べたい。インフルエンザと人間の付き合いは非常に長く、紀元前430年にアテネを襲った大疫病はインフルエンザであったと推測される。この疫病は、アテネのペロポネソス戦争の敗北の遠因となるのである。また、紀元前412年にも「高熱・震え・咳を伴う疫病があつという間に広がり去って行った」というヒポクラテスの記録が認められる。本邦においても平安時代以降様々な書物にその流行の記載が認められ、当然ながら漢方による治療が行われてきた。一方、エイズは1981年に発見された新しい疾患であるが、その巧妙な機構によりあつという間に世界中に広がり、既に3000万人がエイズにより死亡し、現在3300万人がエイズに感染していると言われている。本邦においてもエイズ患者数は増加の一途を辿っている。最近では新型インフルエンザやC型肝炎に世間の注目が集まっているが、エイズは秘かにその感染が広がっており、本格的に対策が必要になっている。

表1. 世界三大感染症

感染症	罹患者数	年間死者数
エイズ	3,300万人	200万人
結核	915万人	166万人
マラリア	2億5千万人	88万人以上

表2. 主なインフルエンザの流行

発生年	名称	型	死者数	致死率
1918年	スペイン風邪	H1N1型	4000万人	2.0%
1957年	アジア風邪	H2N2型	200万人	0.5%
1968年	香港風邪	H3N3型	100万人	0.5%
2008年	新型インフルエンザ(豚インフル)	H1N1型	?	0.5%推定

季節性インフルエンザは日本で毎年1万人前後が死亡している（致死率0.05%）

2.新型インフルエンザA (H1N1)

今年4月にメキシコで始まった新型インフルエンザの流行は、その後アメリカからあつという間に全世界に広がり、6月に入ってWHOはパンデミック(Pandemic, 世界的流行)を宣言している。平成21年9月現在で、世界中で30万人以上が罹患し、既に数千人の死者が出ている。日本においても全国的に流行が続いている。本邦においては、4月下旬から検疫体制が強化され、国際空港における「機内検疫」や赤外線を用いた乗客の発熱状態の検査が行われた。しかし潜伏期の患者を見つけ出すことはきわめて困難であり、検疫体制の強化はある程度流行を遅らせる効果はあつたようだが、残念ながら本邦への侵入を防ぐことはできなかった。SARS騒ぎのときもそうであったが、航空機の時代に呼吸器感染症の侵入を防ぐことは極めて困難である。流行開始当初は、患者数をすべて報告する全数調査が行われたが、7月以降は流行が全国に広がったため、現在では定点調査が行われている。8月に入り高温多湿な日本においては流行が一時収束することが予想されたが、案に反して夏休み中も流行は持続し、新学期を向かえた9月以降は学校における集団感染が多発している。定点医療機関あたりの患者数から推計される週間新規患者数は9月中旬では18万人となり、更に流行は広がりつつある。

インフルエンザの治療薬としては、タミフルとリレンザなどの抗ウイルス剤が使われている。いずれもウイルスの複製を抑える薬であり、発症後48時間以内に服用を始めることが必要である。タミフルは10代の子供では異常行動が問題となっており、リレンザが処方される。また、最近タミフル耐性ウイルスが出現している。リレンザは吸入薬であり、適切に吸入することが必要である。タミフルの主原料は、中華料理の香料に用いられる「八角」である。八角は健胃作用などがあり漢方薬としても用いられるが（漢方名は大茴香）、八角そのものには抗インフルエンザ効果はない。漢方薬では、麻黄湯がインフルエンザに有効であり、保険適応である。最近、A型インフルエンザだと診断された患者を対象に、抗ウイルス薬、総合感冒薬、麻黄湯のそれぞれを投与して、効果を比較した研究が報告された。この研究によれば、麻黄湯を投与した群で、総合感冒薬に比べると、急性気管支炎、肺炎の発生率が低下することが明らかになった。さらに、発熱日数を比較したところ、麻黄湯を投与した群は、抗ウイルス薬と同じくらいの短期間で済んでいることが分かった。漢方医学では、インフルエンザのような症状は、体の表面部にある水毒によって起こると考えるようである。そこで、水毒を取り除く作用を持つ麻黄湯が選ばれてきた。子どもや高齢者など、体力が衰えている人（虚証・裏証）に使うときは注意が必要であり、そのような場合には麻黄附子細辛湯が良いとされる。また、板藍根（バンランコン）は、中国でよく用いられている生薬であるが、清热解毒作用がありインフルエンザに有効であるとされている。

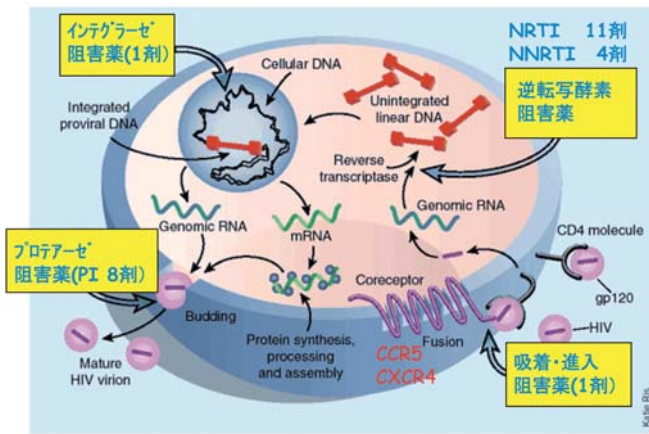


図1 HIV-1の生活環と治療薬

近年、鳥インフルエンザの流行が取りざたされてきたが、今回の新型インフルエンザの流行は、多分に教示的なものがある。今のところ過去の大きな流行に比べて死者数は少なく(表2)、季節性インフルエンザに比べても致死率は高くはないとされるが、最近では免疫的に異常のない若者の死亡例も報告されはじめており、今後とも注意が必要である。現在のところタミフルやリレンザのような分子標的薬が有効であるが、耐性を獲得する可能性があり予断を許さない。麻黄湯のような漢方を有効に使うことにより、耐性インフルエンザに対処することが必要になる。

3. エイズと漢方薬

HIV-1 感染に対する漢方薬の効果は、様々な角度から検証されてきた。小柴胡湯の主成分である甘草やグリチルリチルに HIV-1 の複製を抑える作用があることや HIV-1 感染細胞にアポトーシスを誘導することが 1990 年代に明らかになり、感染者への投与が検討されたが、当時は大きな効果は認められなかった。その後、複数の抗 HIV-1 薬を組み合わせ投与する HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) の登場によりエイズ患者の生命予後は著しく改善され、今やエイズは慢性疾患化している。しかし、治療が長期化するにつれて、肝障害や高脂血症・動脈硬化などの抗 HIV-1 薬の様々な副作用が問題となっている。興味深いことに HAART により HIV-1 ウイルス量が良好にコントロールされており CD4 数が正常の患者でも悪性腫瘍にかかる確率が正常人よりもはるかに高いことが分かってきた。HAART によって複製が抑えられていても HIV-1 潜伏感染細胞の存在により免疫系が抑制されていることが原因と考えられているが、詳しいことは解っていない。このような状態においては、漢方薬の効果も期待される。また、現在の抗 HIV-1 薬は HIV-1 のライフサイクルに効くため、HIV-1 の増殖を抑えることは可能であるが、潜伏感染細胞には全く効果がなく、HIV-1 を排除することはできない(図1)。私たちは最近、麻黄湯が HIV-1 潜伏感染細胞を活性化させることを見出しているが (Murakami T, *et al.* Biol. Pharm. Bull., 31(12):2334-2337, 2008)、抗 HIV-1 薬と共に麻黄湯を投与することにより、体内から潜伏感染細胞を排除することが可能になり、エイズの治癒が可能になるかもしれない。

4. 漢方薬による感染予防効果への期待

ウイルスがヒトの細胞に感染するためには、まずウイルス表面の蛋白が細胞表面の受容体と結合することによりウイルス膜と標的細胞膜の融合が起こる。HIV-1 の場合には、このウイルスの細胞への吸着と侵入を阻害する侵入阻害剤が既に実用化されている(図1)。補中益気湯などの漢方薬には、ウイルスの侵入を阻害することによる感染抑制効果があることが明らかにされている。一方で、補中益気湯などの補剤には、全身の体力を改善するとともにマクロファージの活性化、NK細胞活性化などの免疫増強作用があることが知られている。また、副作用が少なく長期的な服用が可能なのが必要である。これらの点を総合して、特に体力のないお年寄りにおいては、補中益気湯などの漢方薬のインフルエンザなどへの予防効果が期待されている。

5. おわりに

生体防御に関与する免疫系は、様々な免疫担当細胞のバランスで成り立っている。近年、漢方薬の機能が科学的に解明されつつあり、免疫細胞を膺活する機序がかなり明らかになっている。しかしながら、人体においては、免疫細胞の培養系における実験結果がそのまま反映されるものではなく、ある免疫細胞を活性化することで生体における免疫系のバランスを崩し、却って生体防御機構を低下させる危険性もある。漢方では、人体のバランスの偏り偏倚を正常に戻すことによりその効果を発揮する。そのためにはバランスがどのように崩れているかを正確に把握して、適切な処方を行うことが重要であり、正確な診断能力が要求される。今後、漢方が様々な感染症の予防や治療に有効活用されることが望まれる。

著者プロフィール



氏名：岡田誠治 (OKADA Seiji)
所属：熊本大学エイズ学研究センター
予防開発分野・教授

連絡先：熊本県熊本市本庄2-2-1

略歴：

1985年 自治医科大学医学部卒業
1985-1996年
茨城県で地域医療に従事(僻地診療所3年、地域中核病院4年)
1996年
千葉大学医学部附属高次機能制御研究センター
生体情報分野・助手
2000年
千葉大学大学院医学研究科発生医学講座分化制御学・助教授
2002年
熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野 教授

研究テーマ：

- ・ HIV-1感染モデル動物を用いたHIV-1感染の病態解析と抗HIV-1療法の開発
- ・ エイズ関連悪性リンパ腫の病態解析と治療法の開発

Topics on Chemistry

ナノ粒子を用いた神経細胞へのタンパク質導入

株式会社 同仁化学研究所 大内雄也

遺伝子導入法は、細胞内に目的のタンパク質を導入する技術として医学、薬学、生物学など多く分野において今や必要不可欠な技術としてその地位を確立しつつある。しかし、導入効率の低さや毒性、ウイルスを用いた際の安全性など、遺伝子導入法には依然として多くの問題が残されている。近年、遺伝子導入法に代わる技術として直接タンパク質を導入する方法が注目されている。2009年4月には癌化の危険性が少ないタンパク質導入法を用いたiPS細胞の作成法が発表され、その有用性に期待が寄せられている。

今回のトピックでは、神経細胞へのタンパク質導入に関する研究を取り上げたい。神経細胞はアルツハイマー病やパーキンソン病など多くの神経疾患に関与しており、長年多くの研究者によって機能解明や治療法などが検討されてきている。神経細胞へのタンパク質導入は、神経研究に新たな実験方法を提案すると共に神経疾患の治療法への応用が期待される。

Polybutylcyanoacrylate (PBCA) ナノ粒子は脳や中枢神経系へのドラッグキャリアーとして機能することが報告されている。このナノ粒子は低比重リポタンパク質 (LDL) レセプターを介して血液脳関門を通過し、脳や神経に薬物を運搬すると考えられている。しかしながら、このナノ粒子が神経細胞内に薬物を運搬するという報告はない。Hasadsriらは、PBCA ナノ粒子を用いた神経細胞へのタンパク質導入を試みると共に PBCA ナノ粒子の神経細胞内への薬物送達の可能性を示している。神経細胞表面には LDL レセプターが多く存在するため、LDL レセプターを介したタンパク質導入が期待できたのである。

まず PBCA ナノ粒子によるタンパク質導入を確認するため、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal) の神経細胞への導入検討を行った (β -gal 基質を用いれば、発色あるいは蛍光によって β -gal がタンパク質機能を保持したまま細胞内に取り込まれたかどうかを確認することができる)。その結果、PBCA ナノ粒子によって β -gal がその機能を保持したまま神経細胞内に特異的に導入されることが確認された。また導入するタンパク質として small GTPase の一つである RhoG を用いた場合、RhoG が導入された

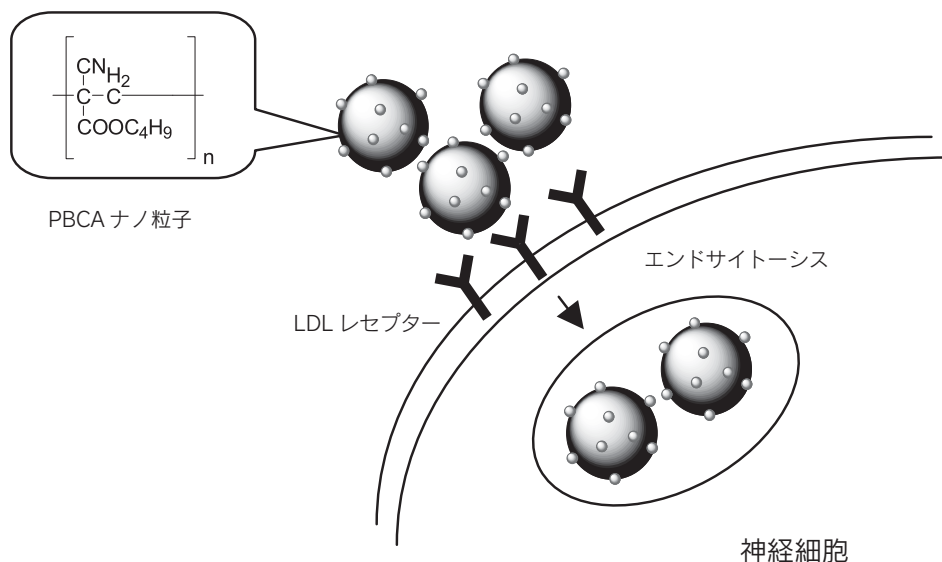
神経細胞において神経突起伸長および分化が観察された。これは PBCA ナノ粒子を用いたタンパク質導入によって神経細胞機能の制御が可能であることを示している。さらに蛍光標識した抗 synuclein 抗体を導入することで神経細胞内 synuclein の検出にも成功している。

PBCA ナノ粒子のタンパク質導入のメカニズムは、未だ不明な点が多いが、その取り込みがエネルギー依存的であり、抗 LDL レセプター抗体によって阻害されることから、その取り込み機序は、Haradsri らが予想した通り LDL レセプターを介したエンドサイトーシスによるものであることが示唆されている。エンドサイトーシスに取り込まれた PBCA ナノ粒子は、エンドリソソーム内のエステラーゼにより加水分解を受け、いわゆる“プロトンスポンジ効果”によりエンドリソソームから放出されると推察されている。その後、導入されたタンパク質と PBCA ナノ粒子は分離し、PBCA ナノ粒子は細胞内ですみやかに分解される。これは細胞内に導入された β -gal の半減期が 122 分間であったのに対し、PBCA ナノ粒子は 27 分間であったことから裏付けられている。

PBCA ナノ粒子を用いた神経細胞へのタンパク質導入は、遺伝子導入法や TAT タンパク質 (ペプチド) 等を用いたタンパク質導入法よりも効果的で毒性が低いことが示されている。また導入するタンパク質に手を加えることなく、PBCA ナノ粒子と混合して神経細胞に添加するだけでタンパク質の導入が可能なることから簡便で汎用性の高い手法だと言える。本手法は神経学の新たな研究ステージ、神経疾患の新たな治療法の可能性を示唆するものと考えられる。

[参考文献]

- 1) Linda Hasadri, Jorg Kreuter, Hiroaki Hattori, Tdao Iwasaki and Julia M. George, *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 6972-6981.
- 2) Karine Andrieux and Patrick Couvreur, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **2009**, *1*, 463-474.



Topics on Chemistry

一分子 DNA ポリメラーゼによるリアルタイム DNA シーケンシング

株式会社 同仁化学研究所 江頭 貴宏

今日、ゲノム情報の解明が盛んに行われている。なかでも、ヒトのゲノムの全塩基配列を解析するプロジェクトであるヒトゲノム計画 (Human Genome Project) が、2003年に完了し、遺伝子疾患の原因追究やその治療法開発だけでなく、ヒトの進化の歴史の解明など、バイオ技術、生命科学に应用できることが期待されている。

ゲノムの塩基配列を解析する手法としては、サンガー法やその改良法があり、これらは DNA ポリメラーゼを利用したものである。サンガー法では低濃度の鎖停止ヌクレオチド (ターミネーターと呼ばれる) などを使って読み取りを中断し、電気泳動などで分離して解析を行っている。従ってこの方法は、操作が煩雑で、解析に時間がかかってしまう (図 1)。

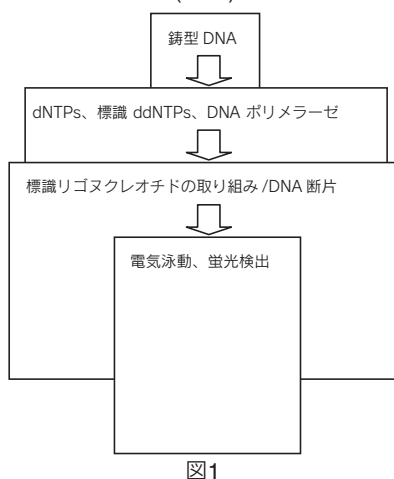


図1

サンガー法の欠点を克服し、高速で大量に DNA 配列分析を可能にする次世代の方法が考えられている。

その方法は、一分子の DNA ポリメラーゼを使用し、DNA 合成中に取り込まれた蛍光標識ヌクレオチドをリアルタイムで検出する方法¹⁾や、ヌクレオチドが DNA 合成中に取り込まれる時に放出するピロリン酸を ATP に変換し発光反応に用いることで、DNA 合成中に使われたヌクレオチドを定量するピロリン酸塩検出塩基延長法がある²⁾。また、化学的識別とは全く異なる、ヌクレオチドの各塩基を物理的に識別することによって配列を決定するナノポア法がある³⁾。ナノポア法は半導体技術を応用したもので、一本鎖 DNA を微小な Si 酸化膜を通過させ、その時に流れる電流を測定し塩基配列を解読する。この方法は操作が簡単で安価であること、しかも、蛍光色素などの試薬を必要としないという大きなメリットを持つが、一分子の塩基を識別出来る解像度が得られるかどうか課題である。

ここでは、次世代の塩基配列解析法の中で、特に一分子の DNA ポリメラーゼを固定化し、リアルタイムで DNA 合成を観察する方法を紹介する。

この方法は Pacific Bioscience 社が開発し、短時間で DNA 配列を読み取ることができ、読み取れる鎖長が従来法よりも長く、ゲノムの解析の速度を大幅に増やすことができるようになる時期が期待されている (図 2)。

この方法の特徴は、それぞれ違う波長をもつ蛍光色素を塩基ではなく末端のリン酸につけた 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTPs) (図 3) を使うことである。また、Zero-Mode Waveguide(ZMW) を開発し、鑄型 DNA に従って連続的に合成を

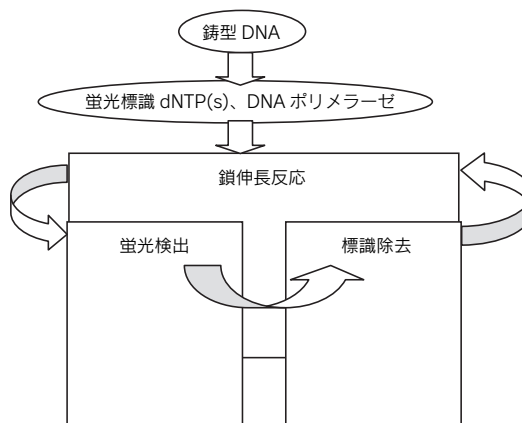


図2

行一分子の DNA ポリメラーゼが、dNTPs を取り込む間の蛍光のみ検出できるようになり、リアルタイムで DNA 塩基配列の決定に成功した。

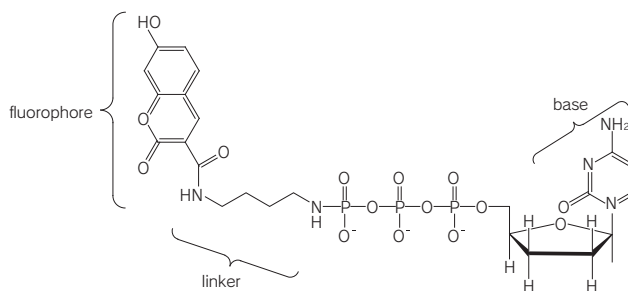


図3 蛍光標識dNTPsの一例

リアルタイムで複数の DNA ポリメラーゼの DNA 合成を一度に検出すると、各々の DNA ポリメラーゼの合成速度にバラツキがあるため正確な測定ができない。そのため、DNA 合成を個別に観察する必要がある。そこで、一分子の DNA ポリメラーゼを直径 100nm のガラス基盤に独立に吸着させ、DNA 合成の様子を個別に観察した。

DNA ポリメラーゼを吸着させるガラス底面には、ビオチン化したポリエチレン・グリコールを結合させ、DNA ポリメラーゼ 1 分子のみを固定化した。また、側面への非特異吸着を抑えるために、側面のアルミニウム表面をポリリン酸で修飾している (図 4)。

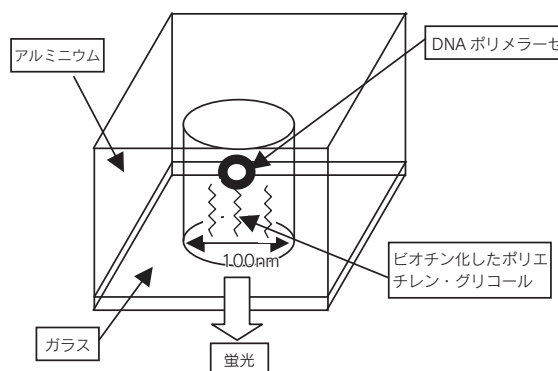


図4

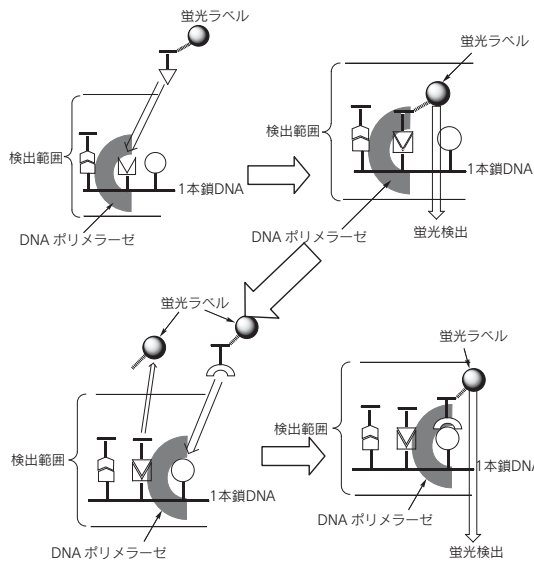


図5

DNAポリメラーゼによるDNA合成を蛍光検出する場合は、蛍光ラベルを持つヌクレオチドが必要になる。共焦点顕微鏡や全反射顕微鏡法などの照射範囲が広いものを使うとDNA合成の活性部位に取り込まれていない蛍光ラベルを持つヌクレオチドの蛍光が観測されてしまいバックグラウンドが高くなるという問題点がある。そのため、ZMWを使って狭い範囲を照射し、DNAポリメラーゼ分子にしか光が届かないように設計されている。

リアルタイムでのDNA配列の決定は以下のように行われる(図5)。鋳型一本鎖DNAの塩基に相補的な蛍光ラベルしたdNTPがDNAポリメラーゼにより取り込まれ、蛍光基もZMWの検出範囲内に入ってきて蛍光が検出される。DNA合成が終了すると、蛍光ラベルしたリン酸ジエステル結合が外れて拡散し、より蛍光基がZMWの検出範囲外に出ていくため、蛍光が検出されなくなる。次に、別の蛍光ラベルしたDNAの塩基に相補的なdNTPがDNAポリメラーゼにより取り込まれ、DNAが合成される間、蛍光が検出され、DNA合成が終了し、蛍光ラベルしたリン酸ジエステル結合が外れると蛍光が検出されなくなる。この検出を続けて、検出された蛍光波長の種類と順番により、DNAの配列が決定される。

図4に示した一分子のDNAポリメラーゼを固定したZMWを、数千を集積して1枚のチップにすることが考えられている。このチップを用いると、数千の鋳型DNAのDNA配列を一度に観測でき、多くのDNA解析ができる。

ここで紹介したDNAシーケンシング方法を使うことで、解析スピードが増し、さらに一度に多種類のDNAを分析することでコストの低減にも繋がる。また、多くの解析データを蓄積することができるようになる。その結果、ヒトの遺伝子と染色体の根本的な構成がより明らかになり、一人一人にあわせたオーダーメイド医療を行なえるなど、治療や予防が画期的に進展することが期待されている。

【参考文献】

- 1) J. Eid, et al., *Science*, **2009**, *323*, 133-138
- 2) Mostafa Ronaghi, et al., *Anal. Biochem.*, **1996**, *242*, 84-89.
- 3) S. Iqbal, D.Akin and R. Bashir, *Nature Nanotechnology*, **2007**, *April 2*, 243.

書籍のご案内

「現代医学は人間をどうみているか」—新たな医学概論の試み—



著者：山本 哲郎
2009年10月10日発刊
ページ390P サイズB6

書評

「現代医学は人間をどうみているか」—新たな医学概論の試み—
(山本哲郎著、2009年)
熊本大学名誉教授 三浦 洵

本書は、「医学概論」を意識して熊本大学大学院医学薬学研究部、分子病理学分野の山本哲郎教授が上梓した著書である。本書は副題の「新たな医学概論の試み」にあるように、現在多くの医学部、医療関連学部のカリキュラムで取り入れられている「医学概論」とは、少し趣を異にしている。というよりむしろ、従来の「医学概論」という範疇には収まりきれない広がりを持っている。

本書は、病理学という基礎医学の中でも、学際的色彩の強い領域を専門にする著者が、教育科目としての医学概論の原点を問直し、その幅広い知識・視野と経験に基づいて、生物としてのヒトの俯瞰に始まって、人の文化人類学的・医療人類学的側面、現代医学の根源的な諸問題を鋭く論じた好著で、医師・医学関連技術者はもちろん、生命科学系・薬学系の研究者にも推薦できる一冊である。

＜ご注文とお支払方法＞

価格 2,100 円 (2,000 円 + 税)

※ご送付する場合は、送料分担保費として 100 円を追加させていただきます

下記の e-メールアドレスもしくはファックス番号に御注文ください。

e-メール：igaku@book-yamamoto.com

Fax: 096-385-0314 (山本哲郎 宛)

必要記入事項：

1. 郵便番号、ご住所、ご氏名、お電話番号（ご連絡のつきやすい番号をお書きください）あるいは e-メールアドレス（以上は本の送付以外には使用いたしません）。

2. ご注文冊数

お支払：

お受取りになった本にはさまっている郵便振替用紙を用いて郵便局でお振り込みください（振り込み手数料は必要ありません）。

教材使用などでまとめてご必要な時は、以下にご連絡ください。

山本哲郎

〒860-0811 熊本市本荘 1-1-1

熊本大学大学院医学薬学研究部分子病理学分野

Tel: 096-373-5304 Fax: 096-373-5308

e-mail: tetsu@gpo.kumamoto-u.ac.jp

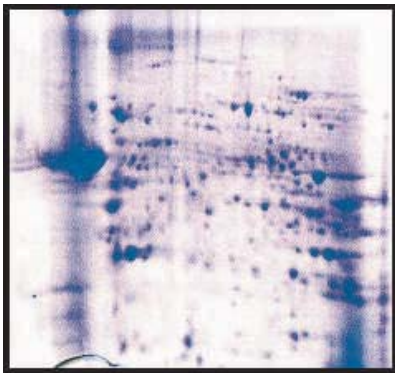
開発中

二次元電気泳動用膜タンパク質溶解剤

Membrane Protein Solubilizer for 2D Electrophoresis

二次元電気泳動法は、タンパク質の網羅的解析法の一つとして欠かせない技術となっています。しかしながら、膜タンパク質などの疎水性タンパク質は、その溶解性の低さから二次元電気泳動での解析が困難とされています。このたび、小社では疎水性タンパク質の溶解性を飛躍的に向上させた二次元電気泳動用のタンパク質溶解剤を開発いたしました。一般的な CHAPS を用いたタンパク質溶解剤に比べ、バックグラウンドの低下およびタンパク質スポット数の増加（約 1.6 倍）が観察されました。また、Cytochrome P450 等の疎水性タンパク質を検出することに成功しております（図 1）。

●一般的なタンパク質溶解剤



●開発中のタンパク質溶解剤

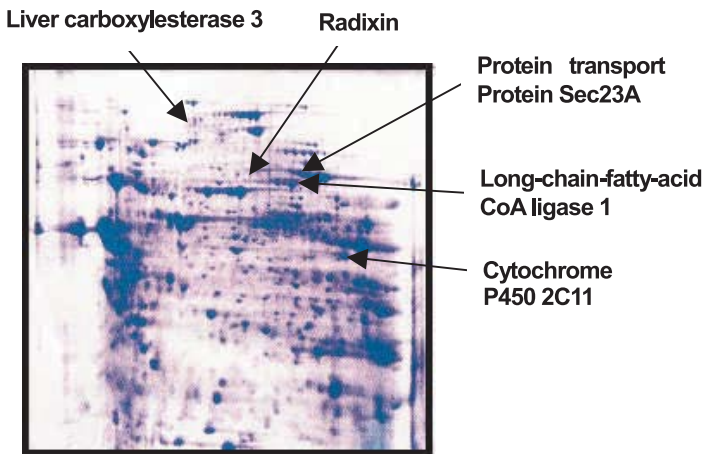


図1 二次元電気泳動後のゲル画像（CBB染色）
サンプル：ラット肝臓マイクロゾーム

販売中止予定のお知らせ

平素は、同仁化学研究所製品をご使用いただき誠に有難うございます。

2010年2月1日より、下記製品の販売を中止いたします。在庫に関しましては、小社マーケティング部までお問い合わせください。

販売中止品

同仁コード	コード番号	品名
A407	—	AR II
B010	347-00323	Bismuthiol- II
E004	345-03261	EDDP
D510	—	DR II
LK22	—	B-Phycoerythrin Labeling Kit-NH ₂
LK25	—	B-Phycoerythrin Labeling Kit-SH
SP11	348-01051	Dioxane,(Sp)

包装容量削減品

同仁コード	コード番号	品名	削減容量	代替容量
B299	—	Biotin-PEAC ₅ -maleimide	100 mg	→ 10 mg
B300	—	Biotin-PE-maleimide	100 mg	→ 10 mg
B302	340-06413	Biotin-AC ₅ -hydrazide	100 mg	→ 10 mg
B304	—	Biotin-OSu	100 mg	→ 10 mg
B305	—	Biotin-AC ₅ -OSu	100 mg	→ 10 mg
B306	—	Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	100 mg	→ 10 mg
B319	—	Biotin Sulfo-OSu	100 mg	→ 10 mg
B320	—	Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu	100 mg	→ 10 mg
B321	—	Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	100 mg	→ 10 mg
C309	345-06441	CFSE	25 mg	→ 10 mg
C348	—	Carboxy-PTIO	100 mg	→ 10 mg
CC01	349-05501	Caged ATP	5 mg	→ 1mg
D045	342-05611	deoxy-BIGCHAP	1 g	→ 500 mg
D535	—	3-Deoxyglucosone	10 mg	→ 1 mg
E009	341-00762	Co(II)-EDTA	25 g	→ 10 g
E010	349-00822	Cu(II)-EDTA	25 g	→ 10 g
E014	342-01772	Mn(II)-EDTA	25 g	→ 10 g
F007	345-03663	FITC-I	1 g	→ 100mg 500 mg
M012	341-01845	MX	500 g	→ 25 g, 100 g
M014	—	MEGA-8	25 g	→ 1 g, 5 g
M015	—	MEGA-9	25 g	→ 1 g, 5 g
M016	—	MEGA-10	25 g	→ 1 g, 5 g
N018	349-04761	NAM	50 mg	→ 10 mg
N388	347-06923	NOR 1	50 mg	→ 10 mg
N390	341-06943	NOR 3	50 mg	→ 10 mg
N391	348-06953	NOR 4	50 mg	→ 10 mg
N448	344-08013	NOR 5	50 mg	→ 10 mg
O393	—	n-Octyl-β-D-maltoside	1 g	→ 500 mg

新製品

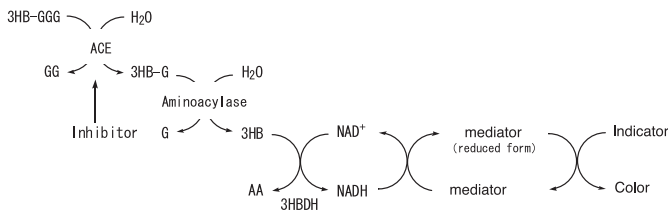
アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性測定キット

ACE Kit – WST

本キットはアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性を測定するためのキットです。発売当初より、多くの研究者にご好評いただいております。

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) は、血圧調節メカニズムの一つであるレニン-アンジオテンシン系において、アンジオテンシン I から昇圧作用を有するアンジオテンシン II を生成するなど、血圧上昇に大きく関係している酵素です。近年、高血圧予防を目的とした機能食品 (特定保健用食品) が多く販売されるなど、

<測定原理>



<特長>

- ・96穴マイクロプレートアッセイ対応。迅速、簡便に多検体を測定できる (分光光度計での測定も可能)。
- ・再現性の高いデータを得ることができる。
- ・有害な有機溶媒を使用しない。

ACE 阻害作用を有する食品成分が注目を集めています。

従来の ACE 阻害活性測定法は、合成基質 Hippuryl-His-Leu(HHL) から切り出されてくる馬尿酸を酢酸エチルで溶媒抽出後、濃縮乾固し、再溶解して 228 nm の吸光度を測定するという煩雑な方法でした。その方法に対し、本キットは、新規合成基質と種々の酵素を組み合わせることにより、酢酸エチルのような有機溶媒を使用することなく、多くのサンプルを迅速・簡便に測定することが可能です。

ACE 阻害作用という機能性を探し出し、その機能性の管理に簡便に、再現性よくご使用いただけます。

<キット内容>

- ・ Substrate buffer 1 ml × 2 本
- ・ Enzyme A 2 本
- ・ Enzyme B 2 本
- ・ Enzyme C 2 本
- ・ Coenzyme 2 本
- ・ Indicator solution 5 ml × 2 本

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
ACE Kit-WST	100 tests	68,000	A502

Q1.キットの原理は?

A1.合成基質である3HB-GGGから酵素反応により3HBを生成させ、この3HBを検出します。3HB-GGG → 3HBとなる工程において、ACEが関与します。ACE阻害物質を系に添加することで3HBの生成が抑えられ、Indicatorの吸光度が低下します。この吸光度の差からサンプルの阻害活性を測定します。

Q2.キットの特長は?

A2.「一度に多検体を測定できる」、「再現性が高い」、「有機溶媒を使用しない」、「短時間 (約1.5時間) で測定できる」という点です。従来の方法は基質 (HHL) から切り出されてくる馬尿酸を酢酸エチルで抽出後、濃縮乾固し測定する方法であり、非常に操作も煩雑で手技的誤差も出やすい方法です。

Q3.既存法との相関はありますか?

A3.既存法とは測定原理(基質)が異なるのでデータの相関はありません。

Q4.Substrate buffer、Indicator solutionの溶液の安定性は?

A4.冷蔵で1年は安定です。

Q5.発色反応時間を10分より長くすると問題がありますか?

A5.発色反応は5分間で完結します。10分～60分の間であれば、吸光度に変化はありません。

Q6.発色反応を37℃で行ってはいけませんか?

A6.問題ありません。

Q7.着色のある試料のブランクの測定方法を教えてください。

A7.Substrate buffer、Enzyme working solution、Indicator working solutionの代わりに純水を加えたものを測定し、これをサンプルブランクとして試料の測定結果から差し引いて下さい。

(Sample 20 μl + 純水240 μl)

Q8.ACE活性は測定できますか?

A8.本キットは、ACE阻害活性を測定するキットです。ACEそのものの活性は測定できません。

Q9.ACEの由来は?

A9.ウサギ由来です。

Q10.DMSOやエタノールの影響を教えてください。

A10.DMSOやエタノールが試料中に1%以上含まれると反応を妨害します。

Q11.最終的な評価は、阻害率で行うものですか?それともユニットを出すものなのですか?

A11.阻害率です。

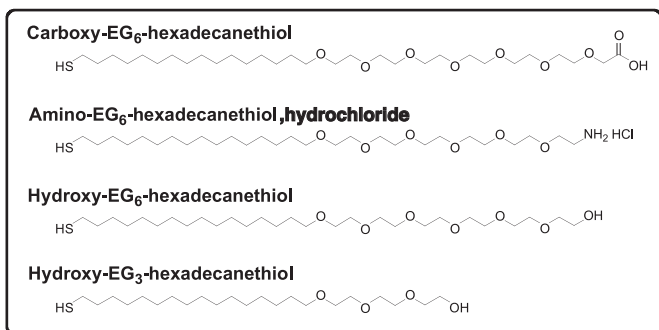
試作品

自己組織化単分子膜作製用試薬

アルカンチオールやジスルフィド類が金属基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers : SAMs) は光スウィッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトレジストなどのパターン化材料、つや出し・濡れ性などの表面改質といった機能性材料分野から、マイクロアレイ、化学修飾電極、QCMやSPR等を用いたバイオセンサーなどの分野で広く応用されています。

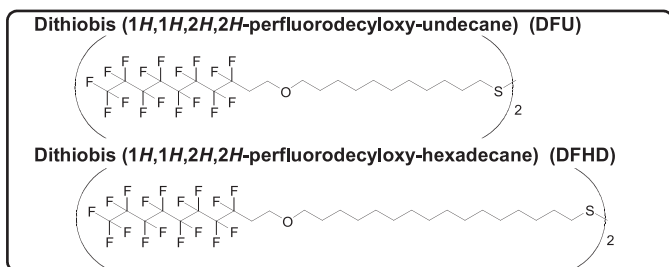
小社では様々な特性を有するアルカンチオールやジスルフィド類を販売しており、現在は下記のような新規化合物を試作しております。ご興味のある方は小社まで御問い合わせ下さい。

○オリゴエチレングリコール含有長鎖アルキルチオール類



オリゴエチレングリコールを有するSAMsは非特異吸着を抑えることができることから、SPRやQCM等のバイオセンサーで汎用されています。上記のオリゴエチレングリコール含有長鎖アルキルチオール類は既存のものよりも長いアルキル鎖 (C16) を有しており、より安定なSAMsが作成されると期待されます。

○フッ化炭素鎖末端アルキルジスルフィド類



フッ化炭素鎖末端を有するSAMsは、高い撥水性を持ち、化学的に安定な表面を形成することが期待されます。フッ化炭素鎖自体は van der Waals 力が弱く、自己組織化能が低いと考えられることから、上記のフッ化炭素鎖末端アルキルジスルフィド類には安定なSAMsを形成するよう長鎖アルキル基 (C11、C16) を導入しています。

試作品

ビオチン SAM 作製用試薬

Biotin-SAM Formation Reagent

QCM や SPR 等のバイオセンサーに SAMs を介してタンパク質を固定化する方法としては、末端カルボン酸の SAM を活性化してタンパク質のアミノ基と反応する方法、Ni-NTA を有する SAM に His-Tag タンパク質を固定化する方法、アビジン-ビオチンを利用する方法 (図1) などがあります。中でもアビジン-ビオチン法は迅速に且つ強固にタンパク質を固定化できることから汎用されている方法です。

このたび、小社では NeutrAvidin や Streptavidin などのアビジン類を効率的に固定化し、非特異吸着の少ないセンサーを作成するためのビオチン SAM 作製用試薬を開発致しました。本試薬を用いて作成したビオチン SAM では、従来品に比べより多くの NeutrAvidin を結合し、NeutrAvidin 結合後の表面への Fetal Bovine Serum(FBS) の非特異吸着は従来品に比べ著しく小さいことが分かっています (図2)。

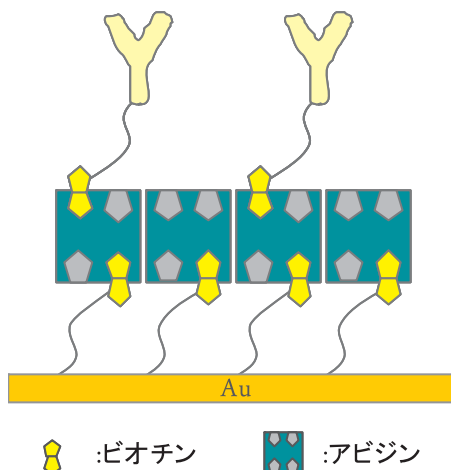


図1 ビオチン-アビジン法による金表面へのタンパク質の固定化の模式図

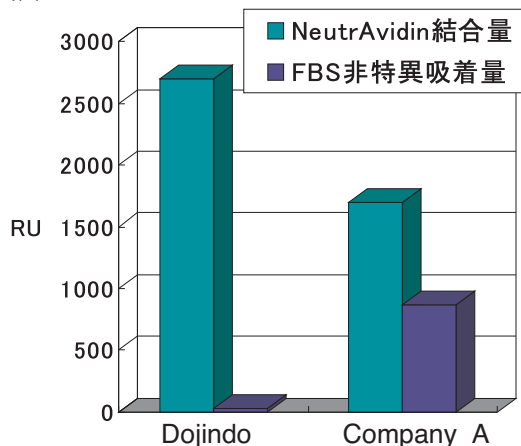


図2 Biotin-SAM Formation Reagent及び他社Biotin-SAM試薬を用いて作製したSAMへのNeutrAvidinの結合量とNeutrAvidin結合後の表面へのFBSの非特異吸着量の比較

‘Forum in DOJIN 20th Anniversary International Symposium’ 開催報告 “Fluorescence Biology” – from molecules to systems –

株式会社同仁化学研究所が現在のテクノリサーチパークへ移転したのをきっかけに始まったフォーラム・イン・ドージンも20周年を迎え、今回はそれを記念した国際フォーラムとして開催した。20周年に相応しいテーマとして、小社のコア技術ともいえる蛍光試薬と、それによって切り開かれる生物学という思いを込めて「蛍光生物学」という斬新なタイトルにした。例年同様、熊本市の鶴屋ホールで開催されたが、今回は一般の方も参加され、200人近い参加者となった。



分子生物学の研究で多用される Cy Dye の開発者である Alan Waggoner 教授が基調講演を行い、種々の細胞機能の解析に蛍光技術を用いた例を紹介された。温厚で親しみやすい人柄の先生で、写真家の奥様とアメリカ西部をレンタカーでよく旅行されているようで、今回も奥様を同伴され、晩秋の日本の自然を楽しまれたようであった。次の東大薬学部の浦野先生は、主にフルオレッセイン骨格をもつ蛍光性低分子の設計コンセプトからそれらを用いた生命現象の解析まで、最近の研究成果を交えて話された。これら蛍光性プローブの開発は、それによって生命現象の理解が深まり、「蛍光生物学」の発展に欠かせない。会場の研究者からも多くの質問が寄せられた。



今回の国際フォーラムには北京大学医学部の先生方にも参加していただいた。基礎医学院の尹先生は PTEN と p53 の作用機序について、また朱先生は HDAC 阻害剤の癌研究への応用について講演された。学院長の尹先生は昨年アメリカから帰国されたばかりの典型的な海亀派で、さらに朱先生も九大留学の経験があり、流暢な日本語を話される。北京大学医学部 (Health Science Center, HSC) は基礎医学院の他にも、公衆衛生学院、薬学院、看護学院などの5つの学院と8つの附属病院から成る巨大な組織である。HSC 副部長の方先生は講演に先立ち HSC の概要について説明されたが、最近の中国では基礎研究にもかなりの予算が下りてきているようである。

最後のセッションでは基礎医学院の韓先生と熊本大医学部の宋先生の講演だった。韓先生はフォーラム代表世話人の山本先生(熊本大医)と懇意にされており、今回の企画でも大変お世話になった。講演は漢方薬の微小循環への影響を蛍光可視化技術で解析する研究の紹介であった。また、宋先生は大脳聴覚野における音の伝わり方を蛍光性の膜電位色素を用いて可視化されており、大変興味深いものであった。宋先生は山東省青島のご出身であり、相手に合わせて中国語、日本語、英語を自由に話される。講演後のミキサーでは在熊の中国人留学生も多く参加し、貴重な情報交換の場にもなった。また、今回のフォーラムは北京大学医学部のホームページでも紹介されている。

(http://bynew.bjmu.edu.cn/art/2009/12/8/art_1146_39771.html)

尚、講演要旨をご希望の方は小社カスタマーサービス部までご連絡ください (free dial: 0120-489548)。



(熊本・水前寺成趣園の紅葉 Mrs. Karen Waggoner 撮影)

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス

0120-021557

フリーダイヤル

0120-489548