

図2 作製した scFv 抗体の性状解析。A、ウェスタンプロット法による分子量の確認。レーン1、scFv 抗体非発現培養上清；レーン2、scFv 抗体発現培養上清（精製前）；レーン3、scFv 抗体発現培養上清（精製後）。矢印は scFv 抗体の位置を示す。B、CEA 発現癌細胞との反応性。scFv 抗体と CEA 発現癌細胞の MKN 45 を反応させた後、scFv 抗体分子に含まれているヒスチジンタグに対する抗体を用いてそれぞれ検出した。

原（CEA）のような腫瘍関連抗原は、細胞のがん化に伴って過剰発現する糖蛋白であり HLA には依存しない。そこで我々は、これまでに CEA を特異的に認識するマウス抗体と T 細胞抗原レセプター（TCR）を遺伝子工学的に結合したキメラ受容体を CTL に発現させ、標的細胞の HLA 非依存的に傷害する方法を開発してきた。しかしながら、マウス抗体はヒトにとっては異物であり、臨床応用を考えるとヒト抗体を用いることが望ましい。我々は、CEA に特異的なヒト抗体の遺伝子を用いてヒト抗体 / TCR・融合遺伝子を作製し、HLA に依存しない CTL の腫瘍ターゲティングを試みた。

研究概要

1. ヒト抗体の可変領域遺伝子の同定

これまでにヒト抗体遺伝子を導入され、産生する抗体がヒト遺伝子由来となる KMmouse™ を CEA で免疫し、CEA に特異的なヒト抗体を産生するハイブリドーマを作製した。このハイブリドーマより RNA を抽出し、ヒト抗体の重鎖（H 鎖）と軽鎖（κ 鎖）それぞれの可変領域に特異的なプライマーを用いてヒト抗体遺伝子を増幅した。可変領域遺伝子をクローニングした後、その塩基配列を決定した。

2. ヒト単鎖抗体の作製と性状解析

同定したヒト抗体可変領域遺伝子をリンカー（GGGGG）を用いて SOE-PCR 法にて結合し、ヒト単鎖抗体（scFv）遺伝子を作製した（図1）。

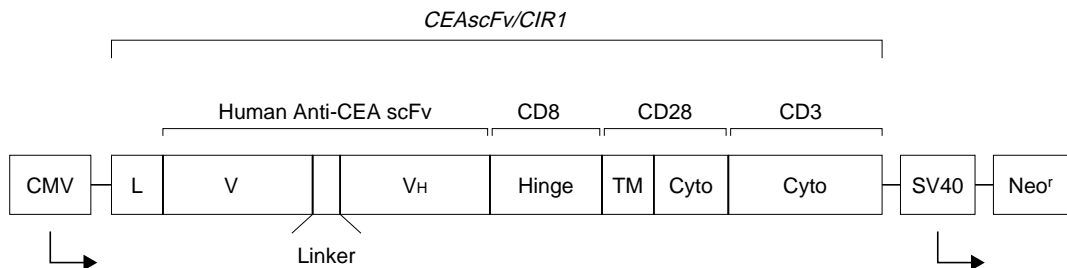


図3 ヒト抗体 / TCR・融合遺伝子の構築。CEAscFv/CIR1 以外の部分は発現ベクターの一部で、略語の意味は以下の通りである。CMV、サイトメガロウイルスプロモーター；SV40、サイモンウィルス40プロモーター；Neo^r、ネオマイシン耐性遺伝子。

次に、大腸菌のたんぱく発現系を用いて scFv 抗体を得た。作製した scFv 抗体の分子量をウェスタンブロット法 (図 2 A) で、また CEA との反応性を ELISA および FACS 解析 (図 2 B) にて確認した。

3 . ヒト抗体 / TCR ・融合遺伝子の作製

TCR の細胞内領域の一部である CD3 ζ 、T 細胞活性化を助ける共刺激分子 CD28 を膜貫通部分に、また T 細胞の表面抗原で免疫グロブリンスーパーファミリーの一員でもある CD8 α をヒンジ部分として、CEA に特異的なヒト scFv 抗体と遺伝子工学的に結合し、ヒト抗体 / TCR ・融合遺伝子 (CEAscFv/CIR 1 と命名 : 図 3) を作製した。

まとめ

CEA に特異的なヒト抗体の可変領域の遺伝子を単離し、scFv を作製した。このヒト遺伝子由来の scFv は CEA に対する反応性を保持していた。今回、CTL を HLA 非依存的に腫瘍細胞へ集積する手段として TCR との融合遺伝子 CEAscFv/CIR 1 を作製した。現在、ヒト抹消血より単離した T 細胞に CEAscFv/CIR 1 を導入し、CEA 発現腫瘍細胞に対する集積能や傷害活性の増強を検討中である。

発表論文

- 1 . Shibaguchi H., Kuroki Ma., Kuroki Mo., Badran A., Hachimine K. and Kinugasa T.: Cloning and sequencing of variable region cDNAs of a novel human monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, and generation of a single chain variable fragmented antibody. *Anticancer Res.*, 24:3355-3360, 2004.
- 2 . Imakiire T., Kuroki Mo., Shibaguchi H., Abe H., Yamauchi Y., Ueno A., Hirose Y., Yamada H., Yamashita Y., Shirakusa T., Ishida I. and Kuroki Ma.: Generation, immunologic characterization

and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen. *Int. J. Cancer*, 108 (4) : 564-570, 2004.

- 3 . Shibaguchi H., Arakawa F., Imakiire T., Kuroki Mo. and Kuroki Ma.: cDNA cloning and sequencing of a novel monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen and construction of a mouse/human chimeric antibody. *Anticancer Res.*, 23 (6) :4383-4388, 2003.
- 4 . Arakawa F., Shibaguchi H., Xu Z. and Kuroki Ma.: Targeting of T cells to CEA-expressing tumor cells by chimeric immune receptors with a highly specific single-chain anti-CEA activity. *Anticancer Res.*, 22 (6): 4285-4389, 2002.



り高い血流量を得ることに成功した。今後はこの手法は心筋や脳における血管新生に応用されると期待されている。逆に血管新生抑制薬物を同様の手法でマウスに実験したところ癌（卵巣癌）の増殖を抑えることも可能であった。

現在開発中の物も含めいくつかの超音波造影剤用のマイクロバブルが臨床応用されている。その中にはバブル自体に様々な工夫が加えられようとしており、診断と遺伝子治療を兼ねたバブルもいくつか考案されている。マイクロバブルの膜の外に抗体を付着させたものや遺伝子をバブルの内側に埋め込んだものなど、開発が進んでいる。バブルのからの素材としてポリマーを使えば自由に膜の厚みをコントロールでき、バブルの大きさ、固さによって治療用途を選択できると予想される。これらのバブルを用いれば、ターゲットとなる組織にバブルを集積させ、エコーで診断した上で、治療用超音波エネルギーでバブルを破壊し、その部位で遺伝子を導入できる。マイクロバブルの製造技術はまだまだ発展する余地がある。また、血管内カテーテルの先端から超音波を共振させ、血栓のすぐ近くで血栓溶解剤の効果を増強させる方法が開発されており、脳梗塞、下肢の動脈閉塞の治療にマイクロバブルを併用すれば薬物投与の減量、血流が再開通するまでの時間を大幅に短縮することも可能である。超音波が目的部位へ到達できれば、理論的に体の殆どの部位の癌などへの遺伝子治療にも応用が可能である。また、治療への応用とは限らず、研究目的でニワトリ胚、マウス胚、植物、昆虫、など様々な生物へ自由に遺伝子導入が可能となるので今後の進展が期待されている。

従来、診断医学と治療医学は密接な関係にありながら、直接お互いの領域に踏み入れることはまれであった。診断学のベースとなるノウハウ・技術（レントゲン、CT、MRI、超音波、生化学的検査、病理など）と治療（薬物投与、

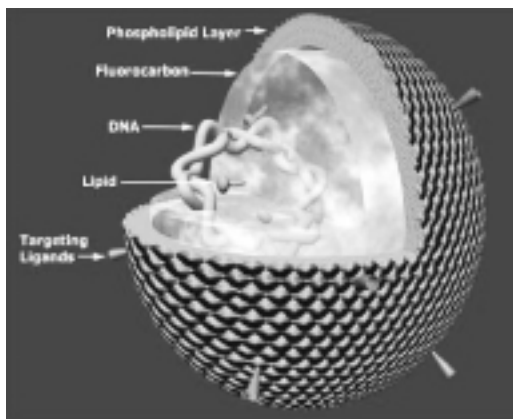


図2 マイクロバブルの表面にセンサーを付けたり、内部に遺伝子を封入することも将来可能となるかもしれない（IMARX THERAPEUTICS 社提供）。

手術、など）には重複する分野がなく、お互いの役割分担がはっきりした。しかし、この両者は急激に接近しつつあり、今後ますますお互い関わりを持つものと予想される。その担い手が第三世代の超音波造影剤と言われている。目的部位へ誘導する物質をバブルの表面に分子レベルで突き出した“アンテナ”（ポリエチレングリコール、PEG）の先端に付けることが可能である。目的の癌、動脈硬化はエコー画像で造影され、容易に診断できる。超音波造影剤の特徴である、血流量、速度の測定に加え、組織内の薬物や遺伝子の濃度を正確に知ることができ、本来、全身の血中薬物濃度の情報しか得られなかったものが、目的部位での組織内薬物濃度がリアルタイムで時間的に追うことができることは、画期的な手法と言える。

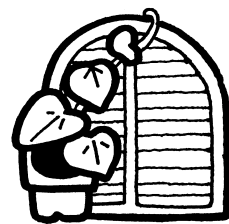
まとめ

マイクロバブル本来の造影目的と異なる遺伝子の“運び屋”や細胞内導入の“ブースター”として応用する技術も検討されるようになり、大きさ、殻の性質など遺伝子導入専用に最適化されたバブルが開発され、特定の組織のみに集積する、“知的（Intelligent）”バブルも夢では

なくなってきた。超音波で非浸襲的かつ安全に遺伝子導入を増強・制御できればあらゆる疾患に対する新しい治療方法として役に立つと考えられる。

参考文献

- 1) Greenleaf, WJ, et al: Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound in Med & Biol*; 24: (1998) 587-595.
- 2) Guzman, HR et al: Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. I. Quantification of molecular uptake and cell viability. *J Acoust Soc Am* 110: (2001) 588-596.
- 3) Tachibana, K et al: Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation* 92: (1995) 1148-1150.
- 4) Tachibana, K et al: Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *Lancet* 353: (1999) 1409.
- 5) Taniyama, Y, Tachibana, K et al: Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 105: (2002) 1233-1239.



into a glass column with dimensions of 9 cm i.d. and 22 cm height. 800 ml of test solution, with an initial 2-CP concentration of about 50, 40 and 30 ppm, was filled in the reactor at room temperature and pH 7.0, respectively. The solution was circulated continuously with an air pump at a flow rate of 8 L/min. The light source, located in centre of the reactor, was furnished with 254 nm UVC Lamp (National GL 13/Q, 13 W intensity: 6-8 mW/cm²). Products were analyzed by ion chromatography (Dionex; Model DX-120) and TOC analyzer (Shimadzu; Model TOC 5000 A). Analyses of 2-CP, were carried out by using HPLC (Alliance, Model Wrs 2690) with a detector of mass spectrometer.

3 . Results and discussions

Table 1 summarized the physical property of SiO₂/TiO₂ and Al₂O₃/TiO₂ catalyst using in the experiment. Though the Al₂O₃/TiO₂ beads exhibited relatively high surface areas with respect to SiO₂/TiO₂ ones, it was clear that the latter have a more high pore volume and immobilized more TiO₂ than the former.

Table 1 The physical property of the experimental catalyst

	S _{BET} (m ² /g)	Pore size (Å)	Pore Volume (ml/g)	TiO ₂ (wt%)
SiO ₂ /TiO ₂	119	310	0.99	20.5
Al ₂ O ₃ /TiO ₂	340	38	0.56	13.6

Fig.3 and 4 show the degradation profiles for 2-CP at different initial concentration, respectively, with two type of photocatalytic beads. More than 95% of 2-CP was removed from the solution due to the photocatalytic oxidation after 4 hr from the start of the reaction.

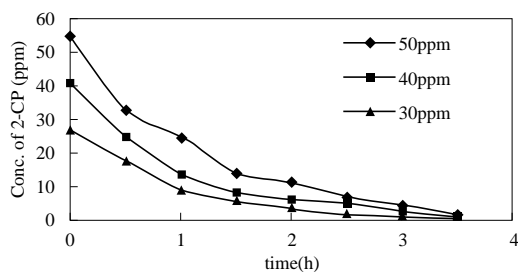


Fig.3.The diagram of the degradation of 2-CP at different initial concentration using SiO₂/TiO₂ beads.

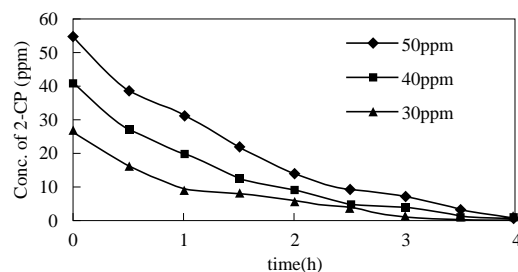


Fig.4.The diagram of the degradation of 2-CP at different initial concentration using Al₂O₃/TiO₂ beads.

Most of the heterogeneous photocatalytic degradation reactions follow Langmuir-Hinshelwood (LH) kinetics:

$$r_0 = -\frac{dC_0}{dt} = \frac{k_r K_s C_0}{1 + K_s C_0}$$

where r_0 is the initial rate and C_0 is the initial concentration. To determine the LH parameters, the initial rates at various initial concentrations were to be determined by a nearly linear plot of r_0 with C_0 . The degradation coefficients, could be directly obtained from the linearly regressed line. The calculated result was shown in Table.2. This data indicated that the degradation rate of 2-CP using SiO₂/TiO₂ beads was higher than that using Al₂O₃/TiO₂ beads.

Table 2 The kinetic parameters of experimental catalyst

	SiO ₂ /TiO ₂	Al ₂ O ₃ /TiO ₂
K _r (mmol/L · h)	0.22	0.16
K _s (L/mmol)	7.2	10.1

A postulated reaction pathways is described in Fig.5. It shows that the degradation proceeds

through a stepwise formation of intermediates. The catechol, and pyrogallol are the products of the initial stages of the degradation. These aromatic intermediates undergo photocatalytic oxidation to ring cleavage to yield carboxylic acids and aldehydes, which give CO₂ and H₂O due to decarboxylation.

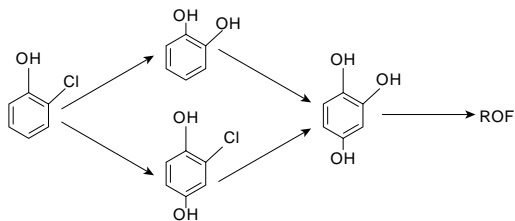


Fig 5 A postulated degradation pathway.

4 . The next plan

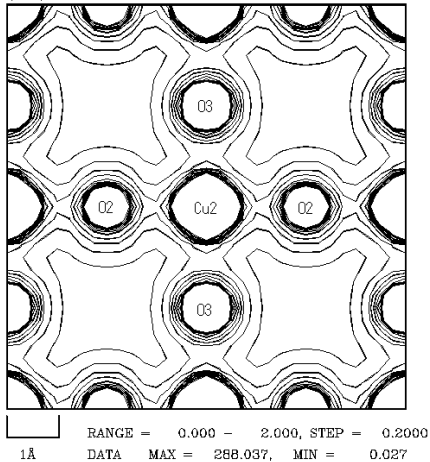
The intermediates formed during the degradation process will be analyzed in the next step. The other kind of chlorophenol will be used as photocatalytic degradation objective. A Pilot photocatalytic fluidized reactor has already been designed and will be used to eliminate the toxic matters in real landfill leachate.

5 . Reference

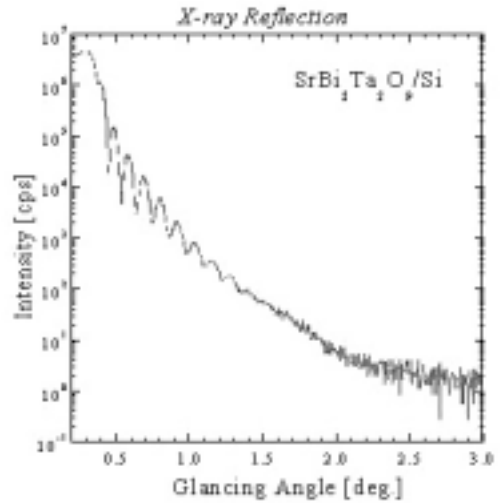
K. Nakano, E. Obuchi et al, Photocatalytic treatment of water containing dinitrophenol and city water over TiO₂/SiO₂, Separation and Purification Technology 34 (2004), 67-72.



Mon Dec 1 12:53:44 2003, FILE = gbco68.hkl.gif
 GBC068.mem
 (HKL) PLANE, AXES ASSIGNED BY POINT

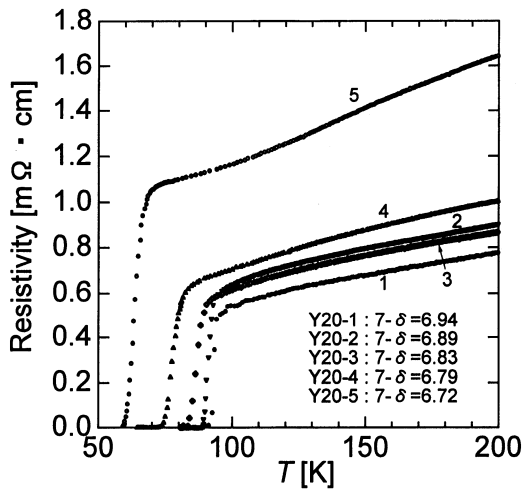


(a)

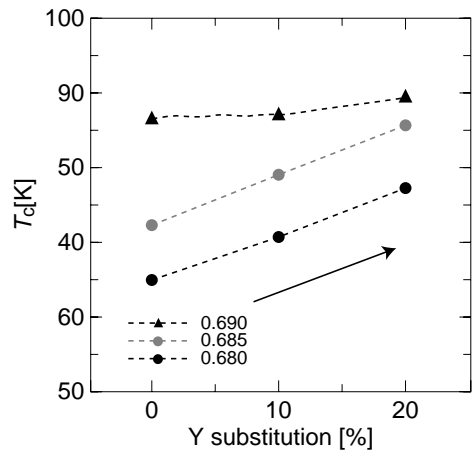


(b)

図2 (a) 銅酸化物超伝導面の電子密度分布、(b) 膜厚や界面を反映した反射X線の干渉



(a)



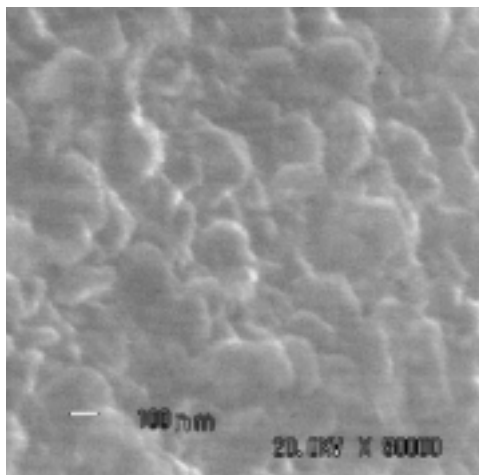
(b)

図3 (a) 高温超伝導体の電気抵抗の温度依存性、(b) イットリウム置換による転移温度向上

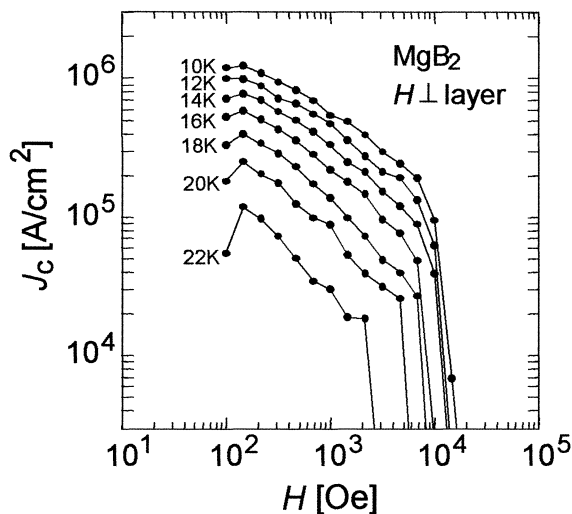
高精度スペクトロメータを用いた、局所構造・長周期構造の解明、などの手法の開発と確立に取り組んだ。その結果、図2に示すような成果を得ることができた。これらはいずれも最先端の研究成果であり、その内容は国際的な学術誌に報告された。

高機能特性の発現とその向上

上記のようにして作成・評価した物質群の特性と機能を様々な計測手段を用いて測定した結果、以下のような特性が発現し、さらに元素置換や表面改質によってそれらの特性をより一層高度化できることが示された。



(a)



(b)

図4 (a) ニホウ化マグネシウム薄膜の表面構造、(b) 臨界電流密度 1 MA/cm^2 の達成

図3 (a) は希土類元素位置にイットリウムを置換したガドリニウム系銅酸化物高温超伝導体の電気抵抗の温度依存性であり、図3 (b) に示すようにイットリウム置換によって特に低酸素状態における試料の転移温度を向上できることが分かった。またダイヤモンドライクカーボン (DLC) の電界放出特性がプラズマ表面処理によって改善できることが示された。

さらに新規超伝導体の開発にも取り組み、図4に示すようなニホウ化マグネシウム (MgB_2) 薄膜の作成に成功し、 1 MA/cm^2 (1平方センチメートル当たりで100万アンペア) という世界最高レベルの臨界電流密度を達成することができた。

これらは、高エネルギー研究所・物質材料研究機構・スロバキア工科大学などとの共同研究の成果でもある。

問題点と今後の課題

以上のような成果が得られた一方で、課題や問題点も明らかになってきた。例えば、最先端

の構造解析手法の立ち上げには成功したが、それらを駆使して、ミクロな構造と高機能特性の相関や発現のメカニズムの十分な解明に成功するまでには至っていない。実質的な研究期間が4年しかなく、良質の試料作成と解析システムの確立に多くの努力が必要であったことも原因である。また、ここまで得られた高機能特性はチャンピオンデータとしての段階であり、その安定性をより一層確実なものにしていくことも必要である。

プロジェクト3の研究課題の一部は継続課題として文部科学省に申請されることになっているが、申請されない部分も含めて、今後も一層の研究推進が必要であり、また実際にも研究が進展することを期待している。