

|      |       |
|------|-------|
| 課題番号 | LS096 |
|------|-------|

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

|                |   |
|----------------|---|
| 研究課題名          | 血管新生を誘導する siRNA とナノ薬物送達法による革新的な低侵襲性治療法の創成 |
| 研究機関・<br>部局・職名 | 佐賀大学・医学部・教授                               |
| 氏名             | 寺本 憲功                                     |

1. 当該年度の研究目的

平成24年度は乳癌抑制遺伝子、Int6 を標的分子とし、核酸の配列が決定した血管新生効果を有する siRNA に関する実験を主に動物個体(ラット)レベルで行い、細胞レベルと同様に動物個体において血管新生作用を有するか否かについて経時的に明らかにすることを研究目的とした。本 siRNA を用いて健常ラットの下肢筋肉(骨格筋)組織に対して数百ナノサイズのハイブリッドバブルと超音波を組み合わせた音響穿孔法(ソノポレーション法)にて siRNA を骨格筋細胞内へ導入し、骨格筋組織に微小血管が新生されるか否かの観点について ①音響穿孔法による低侵襲性細胞内導入の条件設定(超音波の出力量、周波数、超音波の照射時間、ナノバブルと核酸との混合比率 等)を行い、②血管造影による血管新生の評価、③レーザー光によるリアルタイム血流画像化装置を用いた血流動態を可視化し、さらに④新生血管の組織学的解析等の様々な角度による健常ラットを用いた動物実験による解析を進めた。

2. 研究の実施状況

平成24年度は我々が強力な血管新生効果を有すると確認した核酸配列の2種類の siRNA をラット初代培養骨格筋細胞に低侵襲性に細胞内導入し、分子生物学的手法(RT-PCR 法、ウエスタンブロット法 等)を用いて再評価し、Int6 のノックダウン効果、またそれに伴う血管新生誘導因子(VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor、PDGF: Platelet-Derived Growth Factor 等)の誘導性が最も強力であると確認された siRNA の候補を最終的に1つに絞り、直ちに動物実験に移行した。動物実験の移行に伴い、ソノポレーション法の諸条件(超音波の出力量、候補周波数、超音波の照射時間、ナノバブルと核酸との混合比率 等)を決定するため、GFP 遺伝子をソノポレーション法にて健常ラットの下肢筋肉(骨格筋)組織に導入し、その GFP 発光量および GFP タンパク質量を評価基準とし、動物実験での予備的条件設定を行い、最終的にその基準値を決定した。

その実験条件下で健常ラットの下肢筋肉(骨格筋)組織に対し、siRNA をソノポレーション法にて導入すると①血管新生誘導因子(VEGF、PDGF)の誘導性が遺伝子およびタンパク質レベルで明らかとなった。また②血管造影法にて健常ラット下肢に新生血管の形成が確認された。さらに③レーザー光によるリアルタイム血流画像化装置にて siRNA をソノポレーション法にて細胞内導入した領域の血流動態が上昇していることも明らかとなった。すなわち、健常ラットの下肢筋肉(骨格筋)組織において細胞レベルと同様に Int6 のノックダウン効果にて血管新生作用を有することが、細胞レベル同様、動物個体レベルで示唆された。

3. 研究発表等

|                      |  |
|----------------------|--|
| <p>雑誌論文<br/>計2件</p>  | <p>(掲載済み一査読有り) 計2件<br/>                 ① Teramoto N, Zhu HL, Yotsu-Yamashita M, Inai T, Cunnane TC<br/>                 Resurgent-like currents in mouse vas deferens myocytes are mediated by Na<sub>v</sub>1.6 voltage-gated sodium channels.<br/>                 Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 464 (5) 493-502.<br/>                 ② Kito Y, Teramoto N<br/>                 Effects of Hange-shashin-to (TJ-14) and Keishi-ka-shakuyaku-to (TJ-60) on contractile activity of circular smooth muscle of the rat distal colon.<br/>                 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 303 (9) G1059- G1066.<br/>                 (掲載済み一査読無し) 計0件<br/>                 (未掲載) 計0件</p>   |
| <p>会議発表<br/>計11件</p> | <p>専門家向け 計7件<br/>                 ① 鬼頭 佳彦, 寺本 憲功<br/>                 「ウサギ小腸ペースメーカー電位発生機序の解明」<br/>                 熊本・平成24年11月23日・日本薬理学会<br/>                 ② 久留 和成, 寺本 憲功<br/>                 「GLP-1 分泌神経細胞の細胞外グルコース応答に関する解析」<br/>                 熊本・平成24年11月23日・日本薬理学会<br/>                 ③ 森永 秀孝, 寺本 憲功<br/>                 「肝臓のインスリン抵抗性におけるクッパー細胞の影響」<br/>                 熊本・平成24年11月23日・日本薬理学会<br/>                 ④ 鬼頭 佳彦, 寺本 憲功<br/>                 「ウサギ小腸における線維芽細胞様細胞の自発性電気活動」<br/>                 福岡・平成25年3月21～23日・日本薬理学会年会<br/>                 ⑤ 久留 和成, 寺本 憲功<br/>                 「GLP-1 分泌神経細胞におけるグルコース受容ニューロンの解析」<br/>                 福岡・平成25年3月21～23日・日本薬理学会年会<br/>                 ⑥ 森永 秀孝, 寺本 憲功<br/>                 「肝臓のインスリン抵抗性におけるクッパー細胞の影響」<br/>                 福岡・平成25年3月21～23日・日本薬理学会年会<br/>                 ⑦ Sidaway P, Bowen J, Caputo F, Teramoto N, Brain KL<br/>                 「Kv7 channel activation reduces spontaneous excitability of mouse isolated detrusor smooth muscle, whilst leaving stimulus evoked contraction unaffected」<br/>                 福岡・平成25年3月21～23日・日本薬理学会年会<br/>                 一般向け 計4件<br/>                 ① 寺本 憲功<br/>                 「明日からの診療に役立つ薬理学 ～BRONJと最先端・次世代研究～」<br/>                 佐賀・平成24年4月15日・九州大学歯学部同窓会 佐賀支部 同門会<br/>                 ② 寺本 憲功<br/>                 「最新の泌尿器科領域における薬物治療 ～最先端・次世代の研究を中心に～」<br/>                 佐賀・平成24年10月13日・佐賀県泌尿器科懇話会<br/>                 ③ 寺本 憲功<br/>                 「脳は甘みを感知する！？ ～甘味受容体(T1R2)と生活習慣病との関連性について～」<br/>                 佐賀・平成24年10月27日・佐賀大学医学部 歯科口腔外科 同門会<br/>                 ④ 寺本 憲功<br/>                 「佐賀から世界へ そして世界から佐賀へ ～最先端・次世代の研究～」<br/>                 佐賀・平成24年11月17日・佐賀県立致遠館高等学校 理系ガイダンス</p> |
| <p>図書<br/>計0件</p>    | <p>特記事項はありません。</p>   |

様式19 別紙1

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| 産業財産権<br>出願・取得状<br>況<br><br>計0件 | (取得済み) 計0件<br><br>(出願中) 計0件  |
| Webページ<br>(URL)                 | <a href="http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top_Page.html">http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top_Page.html</a>  |
| 国民との科<br>学・技術対<br>話の実施状<br>況    | <p>地域のみならず一般向けに 科学・技術の対話を実施し、サイエンスを啓蒙した。</p> <p>①「明日からの診療に役立つ薬理学 ～BRONJと最先端・次世代研究～」<br/>                 (実施日) 平成24年4月15日<br/>                 (場所) 千代田館 佐賀 (対象者) 歯科医師 (参加者) 30名<br/>                 (内容) 佐賀県内で開業あるいは勤務している歯科医師に対して近年、'次世代の医薬品'として脚光を浴びている siRNA を用いた核酸医薬医療の有効性について 本プログラムの最新の知見を基に分かりやすく講演を行った。</p> <p>②「最新の泌尿器科領域における薬物治療 ～最先端・次世代の研究を中心に～」<br/>                 (実施日) 平成24年10月13日<br/>                 (場所) ホテルマリターレ創世 佐賀 (対象者) 佐賀県泌尿器科懇話会 (参加者) 45名<br/>                 (内容) 佐賀県内で開業あるいは勤務している泌尿器科医に対して近年、'次世代の医薬品'として脚光を浴びている siRNA を用いた核酸医薬医療の有効性について 本プログラムの最新の知見を基に分かりやすく講演を行った。</p> <p>③「佐賀から世界へ そして世界から佐賀へ ～最先端・次世代の研究～」<br/>                 (実施日) 平成24年11月17日<br/>                 (場所) 佐賀県立致遠館高等学校 (対象者) 佐賀県立致遠館高等学校理数科2年生 (参加者) 45名<br/>                 (内容) 地元の高等学校の理数科特別進学クラスの生徒を対象に「科学」の面白さを伝え、近年、「科学離れ」が激しいとよばれる若い世代を対象に「科学」を啓蒙し、本プログラム内容のみならず医学に関する最新の知見を分かりやすく講演を行った。</p> |
| 新聞・一般雑<br>誌等掲載<br>計1件           | <p>① 理系ガイダンス<br/>                 佐賀県立致遠館高等学校<br/> <a href="http://www3.saga-ed.jp/chien-hs/SSHhp/H24_Guidance/H24_Guidance_08.html">http://www3.saga-ed.jp/chien-hs/SSHhp/H24_Guidance/H24_Guidance_08.html</a></p>   |
| その他                             | 特記事項はありません。  |

4. その他特記事項

特記事項はありません。

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

|      | ①交付決定額      | ②既受領額<br>(前年度迄の<br>累計) | ③当該年度受<br>領額 | ④(=①-②-<br>③)未受領額 | 既返還額(前<br>年度迄の累<br>計) |
|------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 114,000,000 | 45,000,000             | 42,000,000   | 27,000,000        | 0                     |
| 間接経費 | 34,200,000  | 13,500,000             | 12,600,000   | 8,100,000         | 0                     |
| 合計   | 148,200,000 | 58,500,000             | 54,600,000   | 35,100,000        | 0                     |

## 2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

|      | ①前年度未執<br>行額 | ②当該年度受<br>領額 | ③当該年度受<br>取利息等額<br>(未収利息を除<br>く) | ④(=①+②+<br>③)当該年度<br>合計収入 | ⑤当該年度執<br>行額 | ⑥(=④-⑤)<br>当該年度未執<br>行額 | 当該年度返還<br>額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 57,346       | 42,000,000   | 0                                | 42,057,346                | 41,442,856   | 614,490                 | 0           |
| 間接経費 | 0            | 12,600,000   | 0                                | 12,600,000                | 12,600,000   | 0                       | 0           |
| 合計   | 57,346       | 54,600,000   | 0                                | 54,657,346                | 54,042,856   | 614,490                 | 0           |

## 3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

|         | 金額         | 備考                          |
|---------|------------|-----------------------------|
| 物品費     | 26,365,066 | 全反射エハネット顕微鏡、EM-CCDカメラ、実験試薬等 |
| 旅費      | 424,520    | 学会参加旅費、ナノバルブ作製旅費等           |
| 謝金・人件費等 | 6,877,635  |                             |
| その他     | 7,775,635  | 薬効薬理試験の予備検討、学会参加費等          |
| 直接経費計   | 41,442,856 |                             |
| 間接経費計   | 12,600,000 |                             |
| 合計      | 54,042,856 |                             |

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

| 物品名                            | 仕様・型・性能<br>等                | 数量 | 単価<br>(単位:円) | 金額<br>(単位:円) | 納入<br>年月日  | 設置研究機関<br>名 |
|--------------------------------|-----------------------------|----|--------------|--------------|------------|-------------|
| Molecular Device<br>(Axon CNS) | データ取得ソフトウ<br>ェア(室町機械)       | 1  | 830,550      | 830,550      | 2012/10/22 | 佐賀大学        |
| 全反射エハネット顕<br>微鏡・電動Ti-TIRF      | 株)ニコンインステック                 | 1  | 9,082,500    | 9,082,500    | 2013/3/28  | 佐賀大学        |
| Patch Clamp<br>Amplifier       | 有)シンテクノ                     | 1  | 2,992,500    | 2,992,500    | 2013/3/19  | 佐賀大学        |
| Software<br>PatchMaster        | 有)シンテクノ                     | 1  | 672,000      | 672,000      | 2013/3/19  | 佐賀大学        |
| EM-CCDカメラ                      | DU897U-CSO-<br>#BV-ST 株)ニコン | 1  | 4,725,000    | 4,725,000    | 2013/3/28  | 佐賀大学        |
| パーフェクトフォーカスユニ<br>ット            | 株)ニコンインステック                 | 1  | 881,806      | 881,806      | 2013/3/28  | 佐賀大学        |
| 電動レーザーTIRF<br>照明装置             | 株)ニコンインステック                 | 1  | 1,102,694    | 1,102,694    | 2013/3/28  | 佐賀大学        |
| 画像取得ソフトウェア                     | NIS-Reserch制御<br>装置付 株)ニコン  | 1  | 1,207,500    | 1,207,500    | 2013/3/28  | 佐賀大学        |