

March, 2012

ナノメディシン分子科学

平成 23 年度研究成果報告書



文部科学省科学研究費補助金
新学術領域研究（研究領域提案型）
平成23年8月～28年3月
領域番号：2306
領域略称名：ナノメディシン
領域代表者：石原一彦

目次

	ページ
1. 研究領域の概要と総括班	----- 1
領域代表 石原一彦（東京大学・大学院工学系研究科）	
2. A01(ア)	----- 5
「細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析」	
計画班代表 樋口秀男（東京大学・大学院理学系研究科）	
3. A01(イ)	----- 31
「In vivo 心筋ナノイメージング解析」	
計画班代表 福田紀男（東京慈恵会医科大学・医学研究科）	
4. A01(ウ)	----- 41
「細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析」	
計画班代表 由井伸彦（東京医科歯科大学・生体材料研究所）	
5. A02(エ)	----- 49
「バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス」	
計画班代表 石原一彦（東京大学・大学院工学系研究科）	
6. A02(オ)	----- 59
「直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製」	
計画班代表 三宅 淳（大阪大学・大学院基礎工学研究科）	
7. A02(カ)	----- 70
「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」	
計画班代表 丸山 厚（九州大学・先端物質化学研究所）	
8. A03(キ)	----- 80
「多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御」	
計画班代表 岩田博夫（京都大学・再生医科学研究所）	
9. A03(ク)	----- 91
「がんリンパ行性転移の分子機構に解明基づく新治療法創発」	
計画班代表 権田幸祐（東北大学・大学院医学系研究科）	
10. A03(ケ)	-----103
「細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析」	
計画班代表 夏目敦至（名古屋大学・大学院医学系研究科）	

「ナノメディシン分子科学」領域全体と総括班

領域代表 東京大学工学系研究科 石原一彦

【本領域研究の目的】

ナノメディシン分子科学とは、生体を構成し生命活動を司る細胞環境における分子反応に関わるものである。細胞環境でタンパク質や核酸に関わる反応は、生命機能に極めて重要であることは周知の事実である。しかしながら、細胞環境は、通常の化学反応環境と比べて、全く異なることが知られている。ナノメディシン分子科学では、このように未開拓であった特殊な細胞環境における分子反応を定量的に理解・考察するために、分子反応パラメーターを導出する。すなわち、細胞にフォーカスし、細胞環境下での分子反応論の確立、細胞内、細胞膜近傍の特殊環境の理解、バイオ分子の特異的反応様式の理解を基本とする学術領域と定義する。これにより、分子反応場となる細胞系を通して、組織、生体全体へと高次元に連携する生体システムを、各次元で、異分野に属する研究者が共通する言葉で理解・考察できるようにする。ここでは、2つの基本的目的を掲げて、研究を推進するとともに新しい学術領域の創成を目指す。一つは、“ナノメディシン分子科学”の創成により、細胞環境での分子反応パラメーターを基盤として、生命反応の理解、病態理解の科学的根拠、医薬品や医療デバイス創製のための設計に結実し、超高齢社会に対応する、安全・安心、高効率医療の発展に大きな貢献する。二つ目は、バイオ・医療産業の爆発的発展を誘引する工学的基礎情報提供と、将来的にこれを支え、より発展させることができる人材育成を行う。

【本領域研究の計画研究班】

研究項目 A01 「ナノメディシンの分子科学」

樋口秀男 東京大学 大学院理学系研究科 教授

福田紀男 東京慈恵会医科大学 医学部 准教授

由井伸彦 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

研究項目 A02 「ナノメディシンのための分子科学」

石原一彦 東京大学 大学院工学系研究科 教授

三宅 淳 大阪大学 大学院基礎工学研究科 教授

丸山 厚 九州大学 先端物質化学研究所 教授

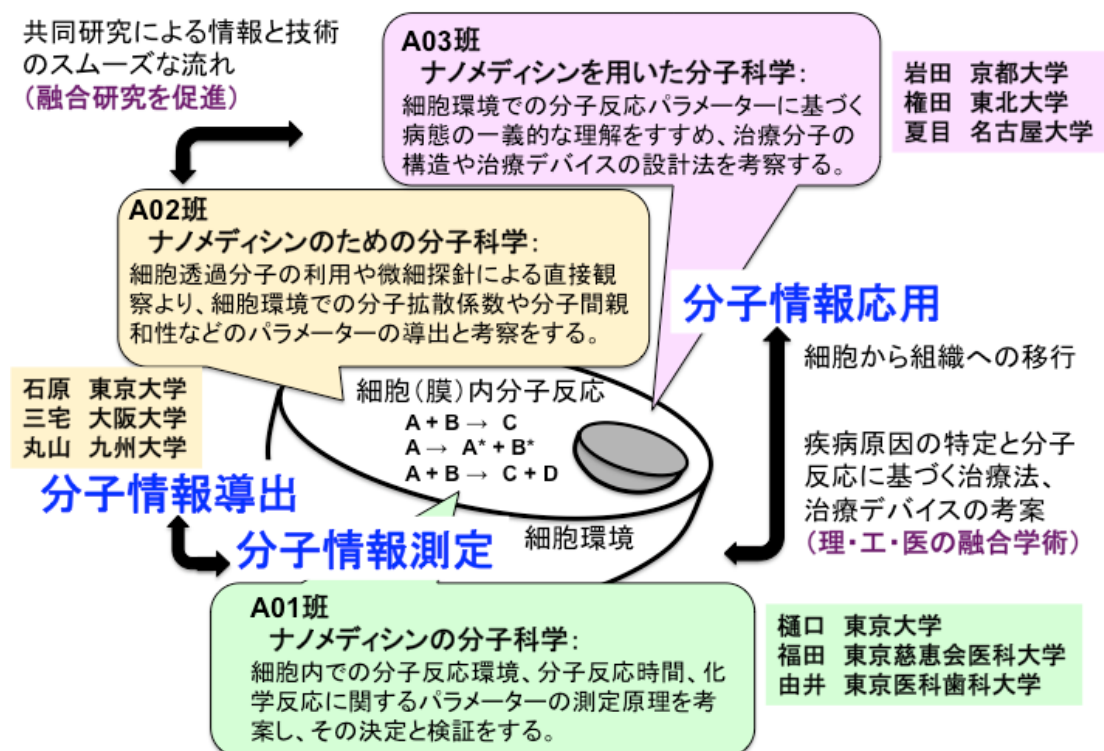
研究項目 A03「ナノメディシンを用いた分子科学」

岩田博夫 京都大学 再生医科学研究所 教授

権田幸祐 東北大学 大学院医学研究科 講師

夏目敦至 名古屋大学 大学院医学研究科 准教授

【本領域研究の内容】



研究項目 A01「ナノメディシンの分子科学」では細胞内での分子反応環境、分子反応時間、化学反応に関するパラメーターの測定原理を考案し、その決定と検証をする。研究項目 A02「ナノメディシンのための分子科学」では、細胞内への物質輸送や探針による直接観察より、分子拡散係数や分子間親和性などのパラメーターの導出と考察をする。研究項目 A03「ナノメディシンを用いた分子科学」では、細胞環境での分子反応パラメーターに基づく病態の一義的な理解をすすめ、治療分子の構造や治療デバイスの設計法を考察する。また、対象を細胞レベルから組織レベル・生体レベルまで拡張し、疾病原因の特定と分子反応に基づく治療法、治療デバイスの考案を行う。さらに公募研究を加えて、それぞれの研究班間での共同研究を積極的に推進し、これまで未遭遇の知識の思いがけない結合を誘起し、シームレスな融合によりナノメディシン分子科学を作り上げ

る。また、分子科学を基盤に工学センスを加味し、医療技術の向上と産業創成で新しい価値を作り出す研究戦略の実現を進める。

例えば、細胞環境下で生じる様々な分子反応を解明するためのポリマー分子や超分子の創製と、分光学的精密測定、ナノ探針による細胞内での直接分子間力の測定より、従来困難であった細胞内の特殊環境におけるバイオ分子反応の定量化と検証が可能となる。これらは、生命現象において特徴的な分子反応の不連続性、非線形性の理解につながります。また、実際の生体環境下での細胞内分子反応を精度よく解析することで、疾病発症・転移機構の理解や分子シグナル伝達と組織治癒の相関解明につなげる。これらにより、全ての疾病の原因を細胞内での分子反応の異常に起因すると考察し、統一的に理解する新医療原則を提案する。また、細胞周期調整・細胞反応調節分子の導入による根本的治療法・デバイスの創出へと結実させる。

平成 24 年度より公募研究を開始し、“ナノメディシン分子科学”を創成するために欠かせない課題、細胞機能の根源に関わる内容で、“ナノメディシン分子科学”を創成するために必要な課題、計画研究の成果を統合し、相乗的に何倍もの成果をあげるために役立つ課題、さらに斬新な発想による問題解決の糸口を包含する課題などを採択する予定である。

【領域研究で期待される成果】

新学術領域の創成により期待される研究成果と波及効果を示す。細胞内分子反応の理解と考察により、正確な分子反応パラメーターが得られる。また、難治疾患治療のための革新的化学療法の開拓やコンピューター創薬の効率化、医療デバイス創製の促進、iPS 細胞などの細胞ソースの製造の安定化が実現される。その波及効果として、細胞環境での分子科学の飛躍的な発展、QOL の向上を目指す低侵襲治療・診断の実現、先端医療を創出する新しい工学の確立、医療・医薬品産業の成長促進と国際的競争力の回復、および新しい学術領域を担う研究者の育成などが挙げられる。

【平成 23 年度の成果】

平成 23 年度は総括班および各計画研究班にて、本学術領域研究を開始するための環境整備、共同研究を誘引するための情報交換などを積極的に行った。

総括班では、研究を潤滑に遂行するために、領域研究事務局を東京医科歯科大学生体材料工学研究所内に設置し、専門事務補助員を配置した。また、事務局に WEB サーバーを整備し、ホームページ (<http://www.tmd.ac.jp/nanomedicine>) を開設した。これにより日常の研究班間の情報伝達、情報交換、あるいは情報集積などを円滑に進める体制

を構築した。領域研究全体の基盤となる標準化細胞試料の提供を目的として、名古屋大学内に研究支援員を配置した。これらの人員、設備の整備により、領域全体の情報交換が行えるようになった。本領域から生み出される成果を一般に平易に解説することを目的として、News Letter を創刊した。

平成 23 年 9 月に新学術領域研究設立公開シンポジウムおよび第 1 回全体会議（東京大学：参加者 157 名）を行い、研究内容に関して集中的に討論し理解を深めるとともに、議論を公開することで本研究領域の目的と意義および各計画研究班の研究内容について一般に情報提供を行った。また、第 2 回全体会議を平成 24 年 3 月（京都）に行った。

関連学会においてナノメディシンに関するセッションを設け、より広く情報の提供を行った。

- (1) 平成 23 年 9 月：高分子学会 高分子討論会 高分子とナノ医療（岡山）
- (2) 平成 24 年 3 月：ナノメディシンに関する日本-台湾ジョイントシンポジウム(The 3rd Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine)（京都）
- (3) 平成 24 年 3 月：ナノ学会バイオ部会国際シンポジウム(5th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2011)（名古屋）

各計画研究班では、研究計画調書に沿って研究設備、機器の整備を行った。また、計画研究を進めていく過程で、順次共同研究の開始および展開への準備を行った。

細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析

研究代表者：東京大学理学系研究科 樋口 秀男

分担研究者：東京大学理学系研究科 茅 元司

1. 研究の概要

「百聞は一見に如かず」とは、人の話を何回も聞くより、自分の目で確かめた方がよく分かるとの喩えである。生物科学においても、聞くよりも見たほうが理解できる場合が多い。それは、見た事は 3 次元空間で時々刻々変化する 4 次元の像であるから、その情報量は膨大であるからであろう。そこで、我々は、細胞内やマウス体内で起こる生命現象を 1 分子あるいは 1 粒子レベル高時空間精度でイメージングをおこなっている。今年度は、非侵襲下で量子ドットを用いて、マウス内の好中球内の小胞を観察する事に成功した。小胞は、 $3\mu\text{m/s}$ の超高速で移動する事を発見した。

2. 研究の背景と目的

細胞内分子機能の理解は、過去 15 年間の蛍光蛋白質観察と分子生物学の進展によって劇的に深まった。しかしながら、分子生物学や蛍光蛋白質は個々の分子を観察するのではないため、分子反応や機能を直接的に理解することはできない。一方、組換え蛍光蛋白質の登場とほぼ時を同じくして分子機能を直接的に観察する 1 分子ナノ精度の計測が登場した。この方法の登場によって、精製された実験系においてモーター蛋白質などの 1 分子運動、ATP 加水分解反応、分子内構造変化などが明らかにされた。さらに近年蛍光性ナノ粒子 (CdSe やダイヤモンド) の登場により、高輝度で長時間の蛍光観察が可能となり、細胞内の分子位置を正確に測定できるようになった。この粒子を利用して、マウス内でも 1 分子の位置を追跡できるようになった。しかしながら、これらの技術、すなわち蛍光蛋白質、分子生物学、1 分子計測、蛍光性ナノ粒子を組み合わせ、細胞内の分子反応を観察する研究はほとんどない。そこで本研究では、これらの近年の技術革新を取り入れ、さらに新しい方法を開発して、細胞内のナノメートル領域の分子や小器官の反応を 1 分子・1 粒子レベルで高精度測定を行う。

3. 成果

非侵襲 *in vivo* がん細胞・白血球のイメージング

これまでの *in vivo* イメージングでは、腫瘍部を切開して、癌腫瘍表面近くを観察できた。しかしながら、切開をすると、出血や免疫細胞の活性化などが起こり、生きたままの姿を観察する事は困難である。そこで、非侵襲で観察できる装置システムの改良と観察法の工夫をおこなった。明るくするため、倍率を下げ、レーザーの集光度および強度を上げた。血量が見えるように、青い光の透過像を得られるようにした。観察法として、

A01 班 (ア)

約 $200\mu\text{m}$ の厚さしかない耳をえらび、蛍光を発する毛の脱毛をした。がん細胞をラベルするために Herceptin-量子ドット複合体を尾静脈注射した。細胞膜に結合した量子ドットの観察に成功した。また、白血球の中でも運動能が高い好中球やマクロファージに結合した多粒子化量子ドットを結合することで、血管中の好中球をより鮮明に量子ドットを観察する事ができた。また、耳に刺激剤を塗りクロファージを誘発したところ、貪食した量子ドットの詰まった小胞の運動を観察する事ができ、小胞の位置を 15nm 精度で追跡することができた。また、細胞運動を観察でき、仮足が急速に伸びたのち、細胞体が仮足の方法に動き出した。好中球が生体内を動くメカニズムが解ってきた。小胞の動きを詳細に調べた結果、小胞はしばらくうごいて止まるといった「stop and go」様式で動いていることが明らかとなった。

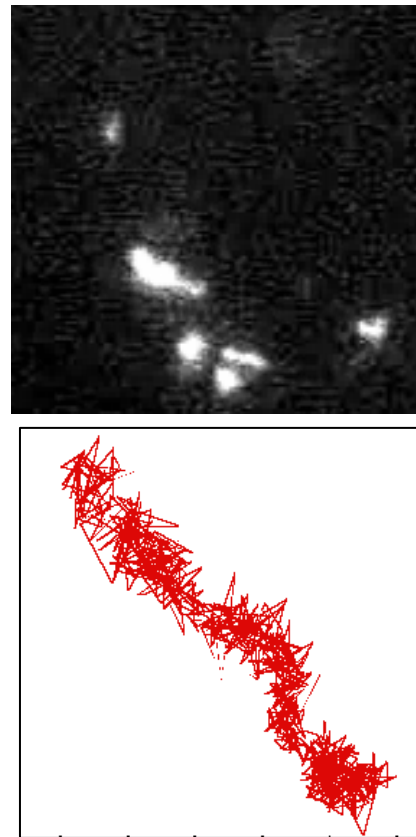


図1 非侵襲下で観察された、好中球内の小胞の動き（上図）、と動きの軌跡（下図）

In vivo GFP のイメージング

微小管結合タンパク質 EB1 の動態変化をマウス生体内において経時観察し、体内における細胞内微小管の動態変化をナノメートル精度で解析した。

微小管結合タンパク質 (end-binding protein 1, EB1 と略す) は微小管プラス端集積因子の一種で、他のプラス端集積因子と共に微小管の機能制御に働いていると考えられているが、その機能の詳細は未だ不明である。EB1 分子の局在は、微小管先端を起点にして尾を引くような様相を呈する。つまり EB1 の集積を追跡することで細胞内における微小管の動態を観察することが可能になる。本研究では、ヒト乳癌由来培養細胞内で発現させた EB1-GFP のコメット様の局在を微小管伸長端マーカーとして利用し、動態の観察・追跡を行った。観察には改良型スピンドディスク型共焦点顕微鏡を使用した。自動輝点追跡プログラムを用いて EB1-GFP コメットの輝度中心をナノメートル精度で追跡することにより、EB1-GFP の細胞内速度分布を微小管伸長速度の細胞内分布として算出した。生きたマウスの体内における微小管動態を調査するため、GFP-EB1 を発現したヒト乳癌細胞をヌードマウスに移植し、移植細胞内の GFP-EB1 の *in vivo* 観察を行うことに成功した。GFP-EB1 の速度を測定することによって、温度を算出することができた。同時に、滑筋様細胞 (SK-LMS-1) をマウス内で腫瘍化して、細胞内 EB1 の観察した。

Imaging and model analysis of molecular function in cells

Hideo Higuchi

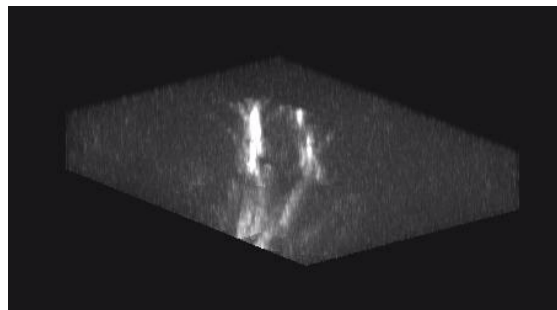
Motoshi Kaya, Taro Gakujitu*

Department of Physics, the University of Tokyo, Japan

** Department of Biotechnology, University of Kyoto, Japan*

The detailed molecular functions of purified proteins have been investigated deeply in the biophysical and biochemical works. However, physiological conditions in the cell environment are very different from those in *in vitro* assays of purified proteins where the experiments are performed; for example, the ion composition is different in the cells and the assays cells have adaptor proteins and cytoskeletal networks that are not present in the assays. Therefore, it is crucial to measure the molecular functions of motor proteins in cells to understand the molecular mechanisms of vesicle transport by motor proteins. We planed to measure the force and movements generated by myosin, dynein, and kinesin in living cells to understand the molecular mechanisms of movement within cells. In the previous works, the force of vesicles driven by motor proteins was measured the conventional optical trapping. The refractive index and size of the vesicles had not determined accurately in the previous works. We constructed apparatus to be able to measure the force independent of these factors. The momentum changes of photon was directly measured from the angle of scattered light and number of photons.

Tumor was exposed by dissecting the skin and a epicedium, so far. Many biological systems especially the immune system were activated by the dissection. To avoid the dissection, we developed the method of non-invasive imaging. The auricle was selected for non-invasive imaging because of thin and short hair. The auricle was illuminated by high power laser for short time. We investigated the motility of vesicle in neutrophil, a kind of white blood cell, in mice. Neutrophil is activated by the inflammation of TPA and goes out of blood vessel to cure the inflammation. 1 day after the inflammation, many of neutrophil go out of the blood vessel. We observed clearly the movement of vesicle containing antibody-quantum dot. The shape of neutrophil becomes long and front domain may pull the cell. The velocity of the vesicle was changed very much from 0.3 to 3.1 $\mu\text{m/s}$. Surprisingly, the velocity of 3 $\mu\text{m/s}$ is about three times of velocity of dynein and kinesin.



3D image of vesicle transport in neutrophile.

A01 班 (ア)

業績リスト

総説・解説・成書

1. 樋口秀男 「マウス個体内の1分子計測」 現代化学 (2011)
2. 樋口秀男 「ナノバイオ」 理大科学フォーラム 8, 19-24 (2011)
3. Y Toyoshima and H. Higuchi “Motile and Enzymatic properties of native dynein molecules” in Handbook of Dynein. K. Hirose and LA Amos ed. (2012)

その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. M. Kaya Non-linear elasticity and step size of single skeletal myosin molecules interacting with actin filaments. Gordon Research Conference on muscle contraction and motor proteins. (2011)
2. 茅 元司「骨格筋ミオシンの1分子計測から見てきた筋肉の巧みな収縮メカニズム」第2回イメージングワークショップ 東京理科大学野田キャンパス (2011)
3. H Higuchi and M. Kaya. Single molecule biophysics in an *in vitro* and *in vivo*. 3dr Japan-Taiwan joint symposium (2012)
4. M. Kaya. Effect of non-linear elasticity of skeletal myosins on force generation in muscle. Subgroup meeting of Motility in Biophysical society Annual meeting (2012)
5. Motoshi Kaya Application of optical tweezers to understand molecular mechanism of muscle contractions. International Symposium on Nanomedicine, Nagoya University, Japan (2012)
6. 茅 元司「階層レベルを意識した筋収縮の分子機構の解明」定量生物学の会 名古屋大学 (2012)

In vivo 心筋ナノイメージング解析

研究代表者：東京慈恵会医科大学 福田紀男
研究分担者：東京慈恵会医科大学 照井貴子
研究分担者：東京慈恵会医科大学 小比類巻 生

1. 研究の概要

心筋の発生張力は、収縮の基本単位である分子集合体（サルコメア：）の長さが $0.1\ \mu\text{m}$ 変化しただけでも~2 倍変化する。我々は、蛍光ナノ粒子（量子ドット）や GFP を *in vivo* 心臓に応用し、サルコメアの長さを $10\ \text{nm}$ の精度で測定するシステムを構築することに成功した。また、局所的な熱刺激法として赤外光レーザーを用い、単離心筋細胞に数℃の加熱を与えると、電気刺激時の収縮に匹敵するレベルの収縮が惹起されることを見出した。この収縮には細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は伴っていないことから、サルコメアレベルで生じていることが推察された。

2. 研究の背景と目的

心筋細胞（長軸~ $100\ \mu\text{m}$ 、短軸~ $20\ \mu\text{m}$ ）では、長軸方向に~ $2.0\ \mu\text{m}$ の間隔で存在する横行小管（T管）周辺のナノ領域において細胞膜の電氣的興奮が細胞内 Ca^{2+} 濃度の局所の上昇を惹起し、 Ca^{2+} の拡散がアクチン分子とミオシン分子の結合、そしてATP加水分解反応を引き起こす。心筋細胞に特徴的なこの反応（興奮収縮連関）は、細胞内を一定の方向に伝播し、イオン通過性の高い介在板を介して隣接する心筋細胞へと伝達される。結果、リズム的な心臓の拍動が得られる。心筋研究の分野では、心筋細胞内の構造と機能との関係が長年に渡り調べられているが、ほとんどの研究が空間分解能にして数 $10\ \text{nm}$ 以上の変化を対象としたものであり、しかも実験結果を生物学の言葉で現象的に記述しているに過ぎなかった。我々は、世界に先駆けて高分解能の手法を心筋細胞標本に応用し、心筋収縮構造（サルコメア：長軸~ $2.0\ \mu\text{m}$ 、短軸~ $1.0\ \mu\text{m}$ ）のnmレベルの構造歪が発生張力に決定的な影響を及ぼすことを見出している。

本研究では、mm レベルの動きをとまなう小動物個体の心臓から心筋細胞内局所の生体分子の挙動やイオン動態を nm 精度で抽出できる顕微システムを新たに開発し、これを基盤として生体分子の集団がどのようにして心臓拍動のリズム調節機構を生み出すかを、物理学と化学の言葉を使って明らかにする。また、各心臓病のモデル動物を使い、心筋細胞ナノ領域における生体分子の挙動やイオンの動態がどのように変化して心拍のリズム破綻につながるかを明らかにする。得られた実験結果はモデル化し、心臓各部位での心筋細胞内分子ダイナミクスの変化が心臓のリズム調節機構に与える影響を正確に予測することのできる数理モデルを開発する。

A01 班 (イ)

3. 成果

(I) 量子ドットを用いた実験

我々は、抗 α アクチニン抗体-量子ドット (QD655) 複合体を作製し、これによって除膜単離心筋細胞 (ラット) の Z 線をラベルし、SPOC (中間活性条件下、サルコメア単位で生じる自励振動現象) の波形を解析することに成功している。本年度、リポフェクション試薬 (FuGENE[®]HD) を用いることによって QD をインタクト心筋細胞内に導入し、Z 線に結合させた。QD 処理したインタクト心筋細胞は電気刺激への応答性を示し、電気刺激周波数を変化させた際の単一サルコメアの長さ変化を正確に測定することに成功した。また、FuGENE[®]HD-QD は、*in vivo* 心臓にも応用可能であった。すなわち、摘出心臓表面からの観察によって、単一サルコメアの長さ ($\sim 2.00\ \mu\text{m}$, 30 fps) を 10 nm の精度で測定することに成功した。

(II) GFP を用いた実験

ラットの幼若心筋細胞の Z 線に GFP を発現させ、蛍光観察することによって SPOC (上参照) の振動特性を解析した。イオノマイシン (Ca^{2+} イオノフォア) 処理した幼若心筋細胞に Ca-SPOC 溶液 (pCa 6.0; 10 mM EGTA) を加えると、自励振動が観察された。さらに、インタクトの幼若心筋細胞に電気刺激を加え、波形解析を試みた。その結果、刺激頻度を生理的なレベル (3~5 Hz) に上げると、伸展速度の著しい上昇とともに短縮/伸展の位相が変化し、波形がイオノマイシン処理細胞における SPOC に類似していた。これらの結果は、生理的な拍動条件下、幼若心筋細胞においても SPOC が駆使されていることを示唆する。

また、遺伝子発現を利用することによって、*in vivo* 心臓において単一サルコメアの動きを共焦点下に観察した (カメラ速度: 100 fps)。すなわち、 α -actinin-GFP 発現組み換えアデノウイルスベクター (ADV) を作製し、これを麻酔・開胸したマウスの心臓に投与した。ADV 投与 2~3 日後に心臓を摘出し、表面から共焦点観察すると、約 20% の心筋細胞において横紋構造が確認された。静止時のサルコメア長は $\sim 2.00\ \mu\text{m}$ であった。なお、単一サルコメアの長さの測定精度は 10 nm であり、QD を使って得られた結果とほぼ同じであった。マウスを人工呼吸下、開胸してサルコメア長を計測すると、収縮、弛緩時にそれぞれ $\sim 1.70\ \mu\text{m}$ 、 $\sim 2.00\ \mu\text{m}$ であった。

(III) 心筋細胞への加熱実験

顕微鏡下での温度測定法と局所熱パルス法を組み合わせ、心筋細胞機能の温度感受性を評価した。局所的な温度測定には、温度変化に応じて変化する蛍光色素を用いた。局所的な熱刺激法には、赤外光レーザーを用いた。心筋細胞の温度を 36°C から数 $^{\circ}\text{C}$ 上昇させると、電気刺激に伴う収縮に匹敵する収縮反応が得られた。温度上昇に伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は認められず、加熱による収縮はサルコメアレベルで生じていることが分かった。

Real-time imaging of cardiac muscle *in vivo*

Norio Fukuda

Takako Terui

Fuyu Kobirumaki-Shimozawa

Department of Cell Physiology, The Jikei University School of Medicine, Japan

A number of studies have been conducted in tissues and cells to elucidate the molecular mechanisms of myocardial contraction. However, because of many differences between *in vitro* and *in vivo* conditions, the dynamics of myocardial sarcomere contractions in living animals is not yet understood. In the present study, we developed a novel system allowing us to conduct real-time imaging of single sarcomeres in the beating heart *in vivo*. First, anti- α -actinin antibody-quantum dots (QDs) were transfected from the surface of the beating heart of the rat *in vivo*. The striated patterns with $\sim 2.00\ \mu\text{m}$ intervals were observed after perfusion under fluorescence microscopy, and an electron microscopic observation confirmed the presence of QDs in and around the T-tubules and Z-disks, but primarily in the T-tubules, within the first layer of cardiomyocytes of the left ventricular wall. Then, we expressed GFP at sarcomeric Z-disks (α -actinin) by using the adenovirus vector system in living mice, and conducted real-time imaging of the movement of single sarcomeres under fluorescence microscopy. SL was found to be $\sim 2.00\ \mu\text{m}$ in the isolated heart during diastole. This value is close to what was obtained previously by others in rats under a similar experimental condition using various experimental techniques, i.e., in X-ray diffraction (Yagi et al., 2004) and two-photon imaging (Bub et al., 2010). Moreover, we successfully observed striations of cardiac muscle and measured the length of single sarcomeres in the open-chest mouse under anesthesia at 10 nm precision. It was found that SL was ~ 1.70 and $\sim 2.00\ \mu\text{m}$ during systole and diastole, respectively.

Likewise, we demonstrated that microscopic heat pulses induced contraction in intact cardiomyocytes of the rat. The temperature increase, ΔT , required for inducing contraction of cardiomyocytes was dependent upon the ambient temperature; that is, ΔT at physiological temperature was lower than that at room temperature. Ca^{2+} transients were not detected during the course of contraction. We confirmed that the contractions of skinned cardiomyocytes were induced by the heat pulses even in Ca^{2+} -free solutions. We consider that this heat pulse-induced Ca^{2+} -decoupled contraction technique has the potential to stimulate heart and skeletal muscles in a manner different from the conventional electrical stimulations.

A01 班 (イ)

業績リスト

学術論文

1. Higuchi S, Tsukasaki Y, Fukuda N, Kurihara S, Fujita H. Thin filament-reconstituted skinned muscle fibers for the study of muscle physiology. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:486021.
2. Oyama K, Mizuno A, Shintani SA, Itoh H, Serizawa T, Fukuda N, Suzuki M, Ishiwata S. Microscopic heat pulses induce contraction of cardiomyocytes without calcium transients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417:607.
3. Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Serizawa T, Mizuno A, Kagemoto T, Shimozawa T, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Sarcomere imaging by quantum dots for the study of cardiac muscle physiology. *J Biomed Biotechnol*. 2012 in press

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 照井貴子 日本生理学会 平成23年度 入澤宏・彩記念若手研究奨励賞 日本生理学会奨励賞
タイトル：「心筋サルコメアイメージングの試み」 2012年3月

細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析

研究代表者：東京医科歯科大学 生体材料研究所 由井 伸彦
分担研究者：東京大学 大学院工学系研究科 金野 智浩
東京医科歯科大学 生体材料研究所 徐 知勲
東京医科歯科大学 生体材料研究所 田村 篤志

1. 研究の概要

細胞内分子反応解析のための基盤ツールとして、各種の細胞内分解性基を有するポリロタキサンを合成し、その生体との相互作用の基礎を解析した。具体的には、カチオン性ポリロタキサンと核酸との複合体形成や核酸放出特性、細胞毒性に着目した細胞との相互作用を検討し、ポリロタキサンの超分子骨格に由来する効果を確認した。こうした知見をもとに次年度には、細胞内での分子反応解析を定量的かつ視覚的に実施していく。

2. 研究の背景と目的

これまでに、細胞内で分解するポリロタキサンによる遺伝子キャリア開発を推進し、超分子構造による遺伝子との複合体形成能とその解離による遺伝子放出能力を細胞内外で両立制御できることを明らかにしてきた。また、ポリロタキサン中の環状分子の線状高分子鎖に沿った可動性に着目し、細胞膜レセプタータンパク質と結合するリガンド分子をポリロタキサン中の環状分子に導入して、レセプタータンパク質との多価相互作用における可動性の効果を明らかにしてきた。これにより、環状分子の回転や並進移動といった可動性をもとにしてリガンドーレセプター間の多価相互作用を亢進し、結合定数を飛躍的に増大できることを定量的に示すとともに、多価相互作用に与える環状分子の可動性の効果を明らかにしてきた。

本研究では、細胞内での各種酵素反応や pH 変化に応答して構造の骨格が変化し、その情報をもとに細胞内反応をリアルタイムで解析するとともに、構造変化をもとにした細胞内治療が可能な超分子の設計を目指す。具体的には、環状分子である各種シクロデキストリン(CD)を線状高分子鎖が貫通したポリロタキサン骨格を基本として、CD と線状高分子鎖との相互作用の細胞内刺激応答制御による CD の運動性や局在性の調節を検討し、それを量子ドットや蛍光分子による FRET と組み合わせて分光学的に解析する。更には、細胞内代謝反応や先天的疾患性酵素反応による CD の応答変化を利用することで、細胞内診断と治療の両面での応用展開を図る。これにより最終的には、領域内での連携をもとにして、細胞内反応に応答して駆動するナノメディシンの分子科学を確立する。

領域内での分光学的解析あるいは病態解析に関連した連携により、ナノメディシン分

A01 班 (ウ)

子科学における分子パラメーターを解析するために必要な技術の確立および応用展開をはかっていく。具体的には、本研究で設計する細胞内応答駆動型超分子に量子ドットを導入することによって、細胞内成分との間での FRET を A01 班 (ア) と共同して解析することができ、細胞内の微小器官領域での生体反応をリアルタイムに追跡可能となる。また、A03 班と連携することで、病態原因の分子反応を追跡して細胞内診断と治療の両面での応用が可能となる。こうした連携により、細胞内分子反応に関するデータを統合的あるいは分散的に解析し、細胞反応調節のパラメーターを領域内で共有し、更なる研究展開へフィードバックすることにより、領域内での新たな研究シーズを創成していく。

3. 成果

本年度は、細胞内での分子間反応を解析する動的超分子の基盤として、環状分子として α -シクロデキストリン (α -CD)、線状高分子としてポリエチレングリコール (PEG) を用いて種々の細胞内分解性基を PEG 末端に有するポリロタキサンを合成し、その細胞内分子反応の基礎となる解析を行った。具体的には、細胞内還元環境下で分解するジスルフィド結合、細胞小胞内など低 pH 下で分解するアセタール基をそれぞれ PEG 両末端に導入したポリロタキサンを合成した。その上で、タンパク質や核酸など有用物質の細胞内送達、細胞膜タンパク質との相互作用、および細胞内取り込みを制御するために、CD 側鎖に疎水性基 (メキシ基) あるいはカチオン性基 (ジメチルアミノエチル基) を導入した。これらポリロタキサンを用いて、核酸 (pDNA および siRNA) との複合体形成および核酸放出特性を解析した。また、細胞毒性を培養 HeLa 細胞を用いた MTT アッセイにより評価した。更に、来年度以降にポリロタキサンの細胞内挙動を共焦点レーザー顕微鏡および FACS により定量的に解析する目的で、CD 側鎖に蛍光物質 (ローダミンおよびフルオレセイン) を導入した。

カチオン性基を導入した細胞内分解性ポリロタキサンとアニオン性である核酸との複合体形成については、pDNA ではカチオン/アニオン比に依存した傾向が認められたが、siRNA ではモル比依存性が認められた。またこれら核酸の放出特性解析から、siRNA との複合体が pDNA よりも粗であることが示された。こうした結果から、pDNA と siRNA とではカウンターカチオンであるポリロタキサンとの複合体形成の機構が異なっていることが明らかとなった。また、種々のカチオン性基を有する細胞内分解性ポリロタキサンの細胞毒性を MTT アッセイにより評価した。対照として用いたポリエチレニンではカチオン濃度依存的な強い細胞毒性が認められたが、ポリロタキサンの毒性ははるかに軽微であり、カチオン濃度依存性の低いことがわかった。これより、カチオン性基を導入した細胞内分解性ポリロタキサンでは、カチオン性基が導入されている CD の運動性やポリロタキサン骨格による分子剛直性などによって細胞膜構造を破壊するような強い相互作用を回避しているものと推測された。今後は、蛍光物質を導入した細胞内分解性ポリロタキサンによる細胞膜との相互作用およびエンドサイトーシスの可視化によって、更に詳細に検討していく予定である。

Analysis of biomolecules using cyto-responsive supramolecular polymers

Nobuhiko Yui

Tomohiro Konno*, Ji-Hun Seo, Atsushi Tamura

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Japan

** Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Japan*

Biological systems including cells and tissues are sophisticatedly hierarchical and dynamic, and they always inspire us to design materials for the possible applications. These structures are basically constructed from the building-blocks via several intermolecular forces such as van der Waals interaction, intermolecular hydrogen bonds, electrostatic interaction, and sometimes hydrophobic effects in water, and are directly related to performing a variety of functions such as intercellular signal transduction through plasma membranes, intracellular metabolism triggered by cytoplasmic calcium increase, and cellular proliferations. In the last quarter century, many scientists have studied interfacial phenomena between these biological systems and artificial materials surfaces in order to design functional biomaterials for medical uses. Throughout these researches, it has been well recognized that biological responses to these surfaces include complicated acute and chronic reactions, eventually leading to cellular and tissue rejection in living bodies. In order to solve these problems, one may understand and realize any differences in the structures and their functions between natural tissues and artificial materials. From this point of view, it should be stated that one of the dominant differences would be the mobility of molecules constructing these materials, and quite a new approach is strongly required to design biomaterials which can perform far-reaching properties in future advancing nanomedicines.

In these perspectives, we have studied supramolecular-structured polyrotaxanes as novel biomaterials, because many cyclic molecules are expected to move along a threading polymer chain. One of the characteristics seen in polyrotaxanes is the mobility of cyclic compounds, and they can be freely rotational and sliding if any intermolecular forces with the linear chain and the neighboring cyclic compound are eliminated. In particular, polyrotaxanes consisting of α -CD molecules and a poly(ethylene glycol) (PEG) chain are feasible in the structural components as biomaterials.

In this study, we prepared a variety of cytocleavable and/or ligand-immobilized polyrotaxanes to examine interaction with cells in terms of (1) extracellular bindings with proteins, nucleic acids, and/or lipid membranes, (2) intracellular reactions with proteins in endosomes/lysosomes and/or cytoplasm, (3) cytotoxicity, and (4) delivering proteins and/or nucleic acids to cytoplasm or nucleus of target cells.

業績リスト

学術論文

1. Y. Yamada, M. Hashida, T. Nomura, H. Harashima, Y. Yamasaki, K. Kataoka, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, Different mechanisms for nanoparticle formation between pDNA and siRNA using polyrotaxane as the polycation, *ChemPhysChem* **13**, in press (2012).
2. Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, N. Yui, Quantitative and mechisim-based investigation of post-nuclear gene delivery events for transgene expression by biocleavable polyrotaxanes with well controlled cationic density, *Biomaterials* **33**, in press (2012).

総説・解説・成書

1. N. Yui, Emerging biomedical functions through “mobile” polyrotaxanes, *Supramolecular Polymer Chemistry* (A. Harada, ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 2012, p.195-204.
2. 由井伸彦、「ポリロタキサン」の超分子構造による薬物キャリア、*未来医療を支える先端バイオマテリアル* (石原一彦、秋吉一成、山岡哲二編)、エヌティーエス東京 (2012)

その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 由井伸彦「動的構造によるバイオマテリアル機能設計」第 56 回高分子夏季大学、福井、2011 年 7 月 14 日.
2. 由井伸彦「ポリロタキサンを用いた動的ナノ界面における生体応答」第 12 回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム、大阪、2011 年 11 月 1 日.
3. 由井伸彦「超分子の動的特性を活かしたバイオマテリアル機能設計」櫻井靖久名誉教授追悼シンポジウム、東京、2011 年 12 月 2 日.
4. 由井伸彦「超分子の動的特性を活かした有機系バイオマテリアルの機能創成」日本歯科理工学会関東支部冬季セミナー、東京、2012 年 3 月 3 日.

バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス

研究代表者：東京大学工学系研究科 石原 一彦

分担研究者：東京大学工学系研究科 井上 祐貴

1. 研究の概要

細胞を対象とした細胞外からの物質輸送、細胞内での移動を、細胞内の特殊環境を考慮しながら追跡し、その速度定数を明確にする細胞内分子輸送プローブを創製する。さらに、このプローブを利用して未解明な点の多い、細胞膜からの分子の取り込み過程を、細胞膜への分配、細胞膜中での拡散、細胞膜から細胞質内への脱離に分けて定量的に考察する。

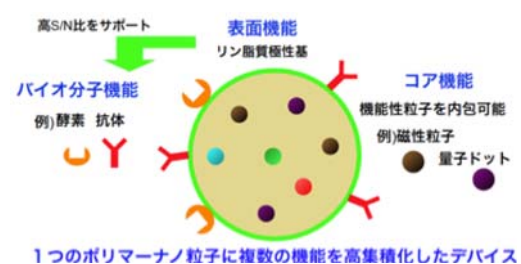
2. 研究の背景と目的

本研究では、細胞内の特異的な部位に、選択的にバイオ分子を輸送し、遺伝子発現や酵素反応に由来する細胞機能発現について分子科学的に理解をするとともに、疾病に対する有効なバイオ分子治療、細胞を基礎とする先進医療技術、さらには組織再生医療への高機能・高信頼細胞ソースの提供などの関連する基盤を開拓することを目指している。これを通して、細胞内での分子反応の理解と一義的考察を完成させる。

研究代表者は、生体親和性ポリマーマテリアルについて研究を続けてきており、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) を一成分として含むポリマーを創製した。これを利用することで、細胞反応や組織反応を完全に阻止し、人工心臓、人工股関節などの生体内埋め込み医療デバイスの臨床使用を実現した。

MPC ユニット組成の増加により水溶性かつ両親媒性とすることができ、この水溶性 MPC ポリマーを利用することで、ポリマーナノ粒子を創製している。さらに、ナノ粒子表面にタンパク質を温和な条件で結合させるために、新たな反応性 MPC ポリマーを合成し、これにより酵素や抗体を固定化することに成功している。特に一つの粒子上に複数のバイオ分子を結合させ、これら分子間の協同的反応により標的分子の認識信号を増幅できることを明らかにした。これらの MPC ポリマーナノ粒子についての基礎知見と、その細胞応答を解析することで、細胞機能評価、解明するデバイスを構築する。

一方、両親媒性の MPC ポリマーが、細胞膜を分子拡散により通過し、細胞質内の特定部位に濃縮することを発見した。合成ポリマー（分子量 30KDa）の細胞膜拡散・透過現象は世界で初めての知見であるとともに、ポリマーに結合させたパイロット分子の役割



を明確にイメージングすることに成功した。これらのポリマー分子構造に起因する分子設計を基礎として、細胞内輸送に関連した事象を定量化するとともに反応パラメーターにより明確に表現することを目指す。

3. 成果

ラジカル重合により合成した poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-*n*-butyl methacrylate (BMA)-*co*-*p*-nitrophenyl oxycarbonyl-4,5 oxyethylene glycol methacrylate (MEONP)) (PMBN) と、poly (lactic acid) (PLA) を用いて溶媒蒸発法により QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子(PMBN/PLA/QD)を調製した。調製したナノ粒子の透過型電子顕微鏡(TEM)観察、動的光散乱(DLS)測定、吸収及び蛍光スペクトル測定を行い、粒子物性及び光学特性を評価した。PMBN/PLA/QD とオクタアルギニン(R8)、オクタグリシン(G8)、およびシークエンスを変化させたオクタペプチド(G6R2、G4R4、G2R6)をリン酸緩衝溶液(PBS)中で 24 時間 4°C で攪拌し、アルギニンセグメントが最表面に配向した各 peptide-PMBN/PLA/QD を作製した。ナノ粒子の細胞内取り込みを観察するために、glass bottom dish に 10%のウシ胎児血清(FBS)を含む培地を用いて 1.0×10^4 cells/cm² の密度でヒト子宮ガン(HeLa)細胞を播種し 24 時間、37°C で前培養した。その後、終濃度が 100 nM になるように各 peptide-PMBN/PLA/QD を加え、2 時間 37°C でインキュベートした。PBS でリンス後、FBS を含む培地に交換し、ナノ粒子の細胞内取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

調製した PMBN/PLA/QD は水中で安定に分散した。DLS 測定結果及び TEM 像より 4 から 20 nm の大きさの PMBN/PLA/QD に QD が 1 から 8 個程度内包されていることがわかった。また、QD 内包前後でナノ粒子の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルに変化は認められなかった。これらの結果より、本手法を用いることで QD の光学特性を維持しながら QD を水中に分散させることが可能であるといえる。共焦点顕微鏡画像より、細胞膜透過ペプチドである R8 を固定化した PMBN/PLA/QD のみ細胞内への取り込みが観察された。シークエンスを変化させたオクタペプチド(G6R2、G4R4、G2R6)を結合させた場合、細胞内への取り込みに大きな変化が認められ、グリシンユニット(G)の存在により粒子が取り込まれなくなる事が明らかとなった。これは、オクタペプチドの細胞膜透過性を支配する因子として、アミノ酸の化学構造だけではなく、その配列も考慮しなければならないことを示している。これより、PMBN/PLA/QD は細胞による非特異的な取り込みを抑制でき表面バイオ分子の動態を追跡可能であるため、細胞内への物質輸送を考える際に有効な表面バイオ分子の情報を得ることが可能な物質移行評価デバイスであるといえる。

細胞による非特異的な取り込みを抑制することが可能な QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子を調製した。このナノ粒子はバイオイメージングデバイスとして利用可能であることが示唆された。今後、QD の光学特性を活かしたリアルタイムイメージング能の評価を行い、細胞環境での分子情報導出への展開を目指す。

Molecular transport nanodevice immobilized specific biomolecules

Kazuhiko Ishihara, Yuuki Inoue

Department of Materials Engineering, the University of Tokyo, Japan

We developed new polymer nanoparticles embedding quantum dots with artificial cell membrane-biointerface as a highly sensitive bioimaging probe. These nanoparticles were prepared by assembling phospholipid polymer as a platform and oligopeptide as a bioaffinity moiety on the surface of the nanoparticles. They showed high resistance to non-specific cellular uptake from HeLa cells due to the nature of phospholipid polymer with phosphorylcholine groups. On the other hand, when arginine octapeptide was immobilized on their surface, they could permeate the membrane of HeLa cells effectively and good fluorescence based on quantum dots could be observed. Thus we obtained stable fluorescent polymer nanoparticles covered with artificial cell membrane, which are useful as an excellent bioimaging probe evaluation for biomolecular function in the target cells.

To confirm the selectivity of uptake to cells, effect of chemical structure of octapeptide was examined. Many research groups reported that arginine-rich peptide is useful as a cell penetrating peptide. However, the abilities of other oligopeptides to penetrate the cell membrane have not been well characterized. Thus, we evaluated the function of various octapeptides as a cell penetrating peptide by using our PMBN/PLA/QD as an analyzing tool. We selected the octapeptides having simple sequences constructed from just one kind of amino acid, tyrosin (Y, hydrophobic), asparagine (N, hydrophilic), glutamic acid (E, hydrophilic and anionic), histidine (H, hydrophilic and weakly cationic), lysine (K, hydrophilic and cationic), or arginine (R, hydrophobic and cationic). Only K8 and R8 conjugated PMBN/PLA/QD could internalize in HeLa cells. It is well known that R8 and K8 work as a cell penetrating peptide. This result indicated that the hydrophilic and cationic nature of oligopeptides play a key role in the cell membrane permeation. In order to understand the mechanism of cell penetration induced by these hydrophilic and cationic oligopeptides, it will be required to investigate the relationship between surface cationic density on the nanoparticles and cell membrane permeation.

It is important to understand the effect of sequence of octapeptide composed of inert and active amino residue for internalization to cells. We prepared a series of octapeptide by glycine(G) and arginine(R) as G8, GGGGGGRRR(G8R2), GGGGRRRRR(G4R4), GGRRRRRRR(G2R8), and R8. Although the surface -potential of original PMBN/PLA/QD was slightly negative, it altered by immobilization of octapeptide on the surface. Image of cells examined with fluorescence microscopy is shown. After applying the various nanoparticles, they started to internalize into the cells. However, we observed that only R8-immobilized nanoparticles could internalize into cells.

The PMBN/PLA/QD is good probe for evaluation of biomolecules to understand their performance. And R8-peptide is effective to induce cell internalization. Moreover, R8-PMBN/PLA/QD is a most suitable material for conducting the kinetic analysis of cell membrane permeation.

業績リスト

学術論文

1. Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Takanori Kihara, Tomoko Okada, Toshiya Sato, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake, Chikashi Nakamura, Mechanical force-based probing of intracellular proteins from living cells using antibody-immobilized nanoneedles, *Biosensors Bioelectron.* 15(1), 323-329 (2012)
2. Tatsuo Aikawa, Tomohiro Konno, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, Continuous preparation of a spherical phospholipid polymer hydrogel for cell encapsulation using a flow-focusing microfluidic channel device, *Langmuir* 28(4), 2145-2150 (2012)

総説・解説・成書

1. Kazuhiko Ishihara, Yusuke Goto, Ryosuke Matsuno, Biomimetic polymer nanoparticles embedding quantum dots, *MRS Proceedings* 1357, mrs11-1357-1l06-07 (2011)
2. Kazuhiko Ishihara, Yan Xu, Tomohiro Konno, Cytocompatible hydrogel composed of phospholipid polymers for regulation of cell functions, *Adv. Polym. Sci.* 247, 141-166 (2012)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Kazuhiko Ishihara, Enhanced and specific internalization of polymeric nanoparticles to cells, The 4th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam (Invited Lecture), Ho-chi Minh, Jan 8-11 (2012)
2. 石原一彦、細胞環境の理解と細胞機能制御を目指したポリマーバイオマテリアル設計、新学術領域研究「ソフト界面の分子科学」公開シンポジウム（特別講演）東京、2012年1月26日
3. Kazuhiko Ishihara, Biomimetic Polymer Nanoparticles Both Embedding Quantum Dots and Immobilized Biomolecules, Biomimetic Materials Processing 2012 (Invited Lecture), Nagoya, Jan 25 (2012)
4. Kazuhiko Ishihara, Phospholipid Polymer Nanoparticles in Nanomedicine Research, The 3rd Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine (Plenary Lecture), Kyoto, March 8 (2012)
5. Kazuhiko Ishihara, Polymeric nanoparticles with artificial cell membrane surface for specific internalization to cells, 5th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2011) (Special Lecture), Nagoya, March 17 (2012)

直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製

研究代表者：大阪大学基礎工学研究科 三宅 淳

分担研究者：大阪大学基礎工学研究科 木原隆典

連携研究者：産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 中村 史

1. 研究の概要

mRNA を細胞内で直接計測するための極微小探針(直径 400nm、長さ 10 μ m)を作製した。極微小探針を AFM にて直接細胞に挿入することで、概ね 1000 コピー以上存在する mRNA の安定的な検出に成功した。極微小探針の検出反応速度から見積もられるターゲット mRNA の見かけの濃度は 10^3 程度高く、細胞内における mRNA の反応が溶液系と大きく異なることが示唆された。また、様々な細胞における力学構造を同一環境で比較可能な力学解析系の構築も行った。

2. 研究の背景と目的

疾病を分子反応の統合として理解・応用する技術系の構築には、細胞を反応場とした分子反応の一義的理解と普遍的考察が欠かせない。特に細胞内は通常の化学実験と異なり、多くの繊維性構造体や膜構造体、様々なタンパク質複合体・巨大核酸が高密度に存在する分子クラウディング環境となっている。そのため、細胞内における分子反応を理解・考察するためには、通常の *in vitro* で行われるような希薄溶液中での分子反応研究ではなく、実際の細胞内環境下での分子反応研究、特に細胞内での分子拡散・排除体積効果等に影響を与える高分子物理環境を明らかにし、その環境下での分子反応を研究することが必要となる。

しかしながら、細胞内空間は極度に複雑な高分子流体であり、これを一義的に明らかにし、さらにその中での分子反応の定量的解析・分子反応パラメーターの同定は困難である。そのため、簡略的であっても細胞内の物理環境を再現する構造モデルを構築し、その中での高分子動態を実験的・仮想的に再現することができれば、細胞内分子反応研究の重要なプラットフォームとなり得る。

本研究は、こうした細胞内の高分子動態を実験的に解析し、さらにコンピューター上で仮想的に再現することを目標とする。具体的には、細胞内環境下における分子反応の詳細な解析を可能とする極微小探針の創製を行い、それを用いて直接細胞内における分子反応、特に mRNA 等の巨大分子の定量解析を目指す。さらに、細胞の物理構造モデルを細胞の力学特性・分子拡散等から簡略的にシミュレーションにより構築し、細胞内における mRNA 等の巨大分子の動態制御について広く考察することを目指す。

3. 成果

我々はこれまで、原子間力顕微鏡(atomic force microscope, AFM)のシステムを利用し、極

A02 班 (オ)

微小探針(直径 200–400nm, 長さ 10 μ m)を直接細胞に挿入・抜去する細胞操作技術の開発を行ってきた。また AFM を用いて細胞の力学特性を明らかにする研究も行ってきた。こうした研究を基盤とし、本年度は以下の研究開発を行った。

(1) 極微小探針による細胞内 mRNA 応答解析

細胞の内在性 mRNA を直接計測するために、極微小探針の表面に高感度・高特異的な核酸検出プローブであるモレキュラービーコンをビオチン-アビジン結合によって修飾を行い、mRNA に対するナノプローブの創製を行った。作成したナノプローブ表面上におけるモレキュラービーコンの被覆密度は 1×10^4 分子/ μm^2 程度であり、ナノプローブの検出限界は溶液系で 1nM であった。作成したナノプローブを細胞に挿入したところ、細胞内のみで特異的にナノプローブの応答を確認することが出来た。検出を行ったターゲット mRNA はヒト GAPDH およびヒト beta-actin であり、いずれのナノプローブもヒト細胞に挿入した場合にのみ応答した。以上より、生細胞の内在性 mRNA を特異的に検出可能なナノプローブの作製と検出システムの構築に成功した。ヒト GAPDH は 1 細胞内に 1000 コピー、3nM 程度の濃度で存在すると考えられるが、作製したナノプローブの蛍光輝度値からの見かけの濃度も 3nM であった。一方で、ナノプローブの反応速度から見積もられるターゲット分子の見かけの濃度は 10^3 程度高く、細胞内における mRNA の応答機構が溶液系と大きく異なっていることが、本ナノプローブによる直接検出によって明らかとなった。

(2) 細胞の力学構造解析

細胞は細胞内に存在するアクチン細胞骨格・細胞質によって、リボソームとは異なる力学構造(粘弾性体であり、運動・不均一性・多様な形態のため時空間内での変動が大きい)を有している。そのため、その特性を一義的に表現することは難しい。そこで、細胞の形態から生じる非対称性をなくし、均等な球状で AFM 測定するシステムを構築した。球状状態で細胞のアクチン細胞骨格は再構築され膜周辺の cortical actin が発達する。こうした cortical actin に由来する球状細胞の力学特性も、接着時と同様に時空間内での変動は大きく、対称空間内での不均一性・動的変化を表していると思われる。こうした球状細胞の弾性率は分裂期の細胞の弾性率よりも 3–4 倍高く、アクチン細胞骨格の再構築・cortical actin の発達プロセスが両機構で異なることが力学的に示唆された。

(3) コラーゲンを介した細胞周辺環境の分子拡散解析

コラーゲン線維はインテグリン等の膜タンパク質を介して細胞内骨格系と連結されており、その力学バランスは内外で釣り合った状態にある。また細胞は自身周辺のコラーゲン線維をアクチン骨格系によって再配置させ、安定状態に収束する。こうした細胞外の物理環境の変化を蛍光相関分光法によって複数のストークス半径を有するプローブを用いて解析を行った。細胞外における分子拡散はコラーゲン線維の再配置によって低下し、特にストークス半径 3nm 以上で大きく影響を受けうる線維の再配置が生じていることが見出された。

Development of a nanoprobe for measuring the molecular dynamics in living cells

Jun Miyake

Takanori Kihara, Chikashi Nakamura*

Department of Engineering Science, Osaka University, Japan

**Biomedical Research Institute, AIST, Japan*

In living cells, there are many huge filamentous structures, organelles, protein complexes, and nucleic acids. The protein concentration in living cells is estimated to reach several hundred mg/mL. The complex intracellular environment rises from awful molecular crowding conditions in the cytosol. To learn the dynamic molecular reactions in living cells, it is essential to clarify their physicochemical structure and features like disproportional macromolecular crowding structures, molecular diffusion, and excluded volume effect.

In this project, we have aimed to analyze the macromolecular dynamics, simulate physical structures, and finally discuss the dynamic molecular reactions in cells. Particularly we have aimed to quantitatively measure the intrinsic mRNA dynamics and reactions inside cells by developing a nanoprobe for mRNA using a fine nanoneedle. Our research will be a platform for better achievements in nanomedicine molecular science.

The amount of total mRNA in a cell is approximately $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ molecules. The transcript copy number is up to 5×10^3 and mostly in the range of 50 to 500 copies. For example, from the results of quantitative PCR, GAPDH mRNA in a HeLa cell was about 1.0×10^3 copies and its concentration was estimated about 3.4 nM. Thus, to analyze the dynamics of mRNA in living cells, we have to develop an mRNA detection system with nM sensitivity in molecular crowding conditions. To this end, we modified the nanoneedle with molecular beacon, which is a highly sensitive nuclear acid probe. The developed nanoprobe could detect as small as 1 nM RNA in solution, but the reaction time required for 100 nM of RNA was 10 min. By using the nanoprobe for GAPDH or beta-actin, we succeeded in selective detection of the mRNA inside the cells. The estimated concentration of intrinsic GAPDH mRNA was approximately 3 nM by reacted fluorescence intensity of the nanoprobe, but by reaction rate of the nanoprobe, the appeared concentration was estimated 10^3 -fold high rather than the above concentration. Probably this contradiction will be a one of the effects of physico-chemical features on macromolecular dynamics in a cell.

Moreover, we built a measurement system for mechanical property characterization of floating round cells, which have negligible asymmetric acto-myosin tension. This system can evaluate the mechanical properties of many cell types under the same conditions of cell shape. we also succeeded in detecting the non-Newtonian behavior of molecules surrounding the cells using FCS system.

業績リスト

学術論文

1. Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Takanori Kihara, Tomoko Okada, Toshiya Sato, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake and Chikashi Nakamura, Mechanical Force-Based Probing of Intracellular Proteins from Living Cells Using Antibody-Immobilized Nanoneedles, *Biosens. Bioelectron.* **31**, 323-329 (2012)
2. Yuji Shimizu, Takanori Kihara, Seyed Mohammad Ali Haghparast, Shunsuke Yuba and Jun Miyake, Simple display system of mechanical properties of cells and their dispersion, *PLoS ONE*, in press
3. Kazumi Hakamada and Jun Miyake, Evaluation method for gene transfection by using the period of onset of gene expression and cell division, *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 124-127 (2012)

総説・解説・成書

1. 木原隆典, 中村 史, 三宅 淳 「ナノニードルによる細胞内分子評価と生体適合性高分子の利用」 *ファインケミカル* 40, 33-40 (2011)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 木原隆典, 三宅 淳 「細胞の機械特性計測とそれを利用した細胞評価の可能性」 第 26 回生体・生理工学シンポジウム Sep 20 (2011)
2. 木原隆典, 三宅 淳 「AFM による細胞計測」 日本機械学会第 24 回バイオエンジニアリング講演会 Jan 8 (2012)
3. 三宅 淳 「細胞の機械的特性」 第 38 回バイオサロン, 機械学会バイオエンジニアリング学会主催, Jan 6 (2012)

細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節

研究代表者：九州大学先導物質化学研究所	丸山 厚
分担研究者：九州大学先導物質化学研究所	狩野有宏
分担研究者：九州大学先導物質化学研究所	嶋田直彦

1. 研究の概要

メッセンジャー-RNA や microRNA などの細胞内の核酸をイメージングする手法の実現は、生体内に多種多様に存在する細胞の機能発現を理解するために有用である。また、それらを標的とした医薬により、細胞機能の調節も可能となる。細胞内核酸イメージングを実現するためには、大量に存在する夾雑核酸から、対象となる核酸と高選択的に結合する核酸プローブ技術、核酸プローブを細胞内に効率的に送達するデリバリー技術が必要となる。本課題では、これらを生体分子の構造・機能制御する高分子材料に基づき構築する。

2. 研究の背景と目的

本課題では、細胞内において、DNA および RNA のイメージングを可能とする核酸ナノセンシング法の構築とそれによる細胞機能発現の解明と制御を目的とする。遺伝子の変異や発現状態の解析は、細胞の機能発現、疾病の病態・要因解明に有用である。さらに、昨今では、マイクロ(mi)RNA など短い核酸断片が重要な細胞機能を担うことが見いだされている。細胞内で空間的および時間的に高い分解能でこれらの核酸イメージングする手法が求められている。これには、1) 核酸プローブの塩基配列選択性の向上、2) 核酸検出感度の向上および3) プローブ核酸を細胞内に効率よく送達する手法が求められる。核酸の検出には核酸プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションが基盤となる。細胞内では、核酸は自己および他の核酸分子やタンパク質と多様に相互作用し、プローブ核酸との結合を困難にしている。従って核酸ハイブリッドの熱力学的安定性を高めるとともに、プローブ核酸の反応速度を高める工夫も核酸イメージングに不可欠となる。我々は、核酸のハイブリッド形成を分子科学的に考察し、ハイブリッド形成を格段に迅速・安定化する核酸シャペロン機能を持った高分子材料の構築並びに、核酸の配列を一塩基レベルまで厳密に識別可能な核酸プローブの開発を行ってきた。また、細胞内送達には細胞膜破壊/融合活性を持つペプチドが有用であるが、シャペロン高分子材料によりその効率を効果的に向上できることを見いだしてきた。本研究では、これらの知見を集約しさらに班内外の共同研究を通じて、生体に優しくかつ高い時空間分解能で細胞内イメージングを可能とする核酸ナノセンシング法とそれによる細胞機能調節法の基盤を構築する。

3. 成果

エンドソーム内の pH 変化 (pH7.4→5.0) に応答する塩基性基を有するポリカチオンでは高い遺伝子発現活性を示すものが多い。これを説明する機構として、細胞内への移行を促すプロトンスポンジ効果[1]やプロトン化に依存した膜障害活性[2]などが提唱されている。本研究ではアミノ酸の α -アミノ基が低い pK_a を有することに着目し、新しいエンドソーム pH 応答性高分子の合成とその細胞内送達キャリアとしての評価を行った。主鎖高分子 Polyallylamine (PAA, 5 kDa) または Poly-L-Lysine (PLL, 29 kDa) のアミノ基に対し Gly または Boc 保護されたアミノ酸 (His, Lys, Arg, Orn) を修飾し、その後 TFA によって脱保護を既報に準じて行った [3]。ポリカチオンの修飾率及び塩基性度は $^1\text{H-NMR}$ および pH 滴定法により決定した。また、蛍光タンパク質 (EGFP) またはルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA (pDNA) を用いてトランスフェクション活性を評価した。合成したポリカチオンと pDNA を混合し、NIH3T3 細胞培養液に加え 3 時間インキュベーションした。その後に培地交換し、24 時間後の遺伝子発現量および細胞毒性を評価した。

アミノ酸を修飾率 90%前後で側鎖に導入したポリカチオンを合成した。塩基性度の測定結果から、合成したポリカチオンは α -アミノ基に由来するエンドソーム内 pH (7.4→5.0) でのバッファー能を示した。また、未修飾のポリカチオンは高い塩基性度のみ、His 化物は低い塩基性度のみを持っているのに対し、Lys 化 PAA、Arg 化 PAA はその双方を有していた。

N/P (ポリカチオンのアミノ基/核酸のリン酸基) = 40 における遺伝子導入を行った結果、Lys 化 PAA と ArgPAA においてはどちらもレポーター遺伝子の発現が観察され、遺伝子発現には DNA との複合体形成・細胞膜への結合に効果的な高い pK_a とエンドソーム内 pH に応答する低い pK_a の塩基性基双方が必要と示唆された。一方、無水酢酸で Lys 化 PAA を処理し α -アミノ基をアセチル化すると、遺伝子導入活性は顕著に低下し、塩基精度の低い α -アミノ基が遺伝子導入活性に有用であることが考えられた。主鎖ポリマーの分子量や種類を変えても、同様なアミノ酸依存性が見られた。遺伝子を細胞内に導入する上で適した pH 応答性を α -アミノ酸の α -アミノ基が有すると示唆された。 α -アミノ酸をビルディングブロックとして利用した生体適合性の高いキャリア設計が期待される [4]。

- [1] O.Bousiff, F.Lezoualch, M.A.Zanta, M.D.Mergny, D.Scherrman, B.Demeneix, J.P.Behr, *Biochem.*, **1995**, *92*, 7297-7301.
- [2] Y.Lee, K.Miyata, M.Oba, T.Ishii, S.Fukushima, M.Han, H.Koyama, N.Nishiyama, K.Kataoka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5163-5166.
- [3] P.Midoux, M.Monsigny, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*, 406-411.
- [4] T.Wada, A.Kano, N.Shimada, A.Maruyama, α -Amino acid pendant polymers as endosomal pH-responsive gene carriers, *Macromol. Res.*, in press.

Evaluation and regulation of cellular functions through *in-situ* nucleic acid imaging

Atsushi Maruyama

Naohiko Shimada, Arihiro Kano

Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

In situ-imaging of nucleic acids, such as messenger RNAs and microRNAs, could be a promising tool to understand a molecular basis of cellular functions. Both highly sensitive DNA probes and effective cytosolic delivery systems are required to construct the imaging tool.

Polycationic carriers with amino groups responsive to endosomal pH (between 7.4 to 5.5) provide efficient gene transfection, being a promising carrier for intra-cellular delivery. Polyethylenimine (PEI), chitosan, the polyamidoamine (PAMAM) dendrimer and poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] (PDMAEMA) are examples of polycationic transfection reagents with weakly basic amino groups that are protonated at endosomal pH. The efficacy of these reagents is thought to be due to their lysosomotropic activity. Osmotic puncture of lysosomes through the proton buffer effect was proposed. An enhanced membrane disrupting effect through direct interaction with the protonated amino groups was recently proposed. To date, weakly basic amino groups, such as the imidazole group and ethylene diamine units, have been examined as endosomal pH-responsive groups. However, lack of readily incorporable basic groups with pK_as around the endosomal pH has made polymeric carrier design difficult. Very few basic groups with pK_a in the appropriate range occur naturally, limiting our ability to design biocompatible gene carriers design.

We focused on the α -amino groups of naturally occurring α -amino acids as endosomal pH-responsive groups. The α -amino groups of the α -amino acids in an aqueous buffer have pK_a > 9 and could not respond to endosomal pH. While basicity of the α -amino group is reduced by electron-withdrawing effect of the neighboring α -carboxyl group, its protonation is promoted by the neighboring α -carboxyl anion. It is, therefore, possible to reduce the pK_a of the α -amino group to the neutral pH range by converting the carboxyl group to a nonionic ester or amide group. Further, the pK_a of amino groups can be decreased when cationic groups are densely arranged along a polymer chain. Hence, polymers having α -amino acids as pendant groups are potential carriers with endosome-escaping function.

Amino groups of linear poly(allylamine) (PAA) or poly(L-lysine) (PLL) were coupled with α -carboxyl groups of α -amino acids (Gly, His, Lys, Arg, and Orn). Acid-base titration indicated that Lys-, Arg-, and Orn-pendant polymers had both strongly basic groups and endosomal pH-responsive α -amino groups. These polymers, like PAA and PLL, formed stable complexes with DNA. Lys-, Arg-, and Orn-pendant polymers were effective transfection reagents independent of the backbone polymers. The pH-responsive α -amino groups enhanced transfection activity as shown by the observation that acetylation of the α -amino group resulted in a considerable loss in transfection activity. These results strongly suggested a lysosomotropic activity of the α -amino groups. Among the α -amino acid-pendant polymers tested, the Orn-pendant polymer exhibited the highest transfection activity/toxicity index. Since PLL with α -amino acid-pendants is composed of naturally occurring amino acids, it is expected to be biodegradable, and these reagents have promise as cytosolic carriers.

業績リスト

学術論文

1. T. Wada, A. Kano, N. Shimada, A. Maruyama, α -Amino acid pendant polymers as endosomal pH-responsive gene carriers, *Macromol. Res.*, in press.
2. H. Asanuma, T. Osawa, H. Kashida, T. Fujii, X. Liang, K. Niwa, Y. Yoshida, N. Shimada, A. Maruyama, Highly sensitive in-stem molecular beacon system chaperoned by a cationic copolymer, *Chem. Commun*, 48, 1760 – 1762, (2012), in press.
3. R. Moriyama, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, The role of cationic comb-type copolymers in chaperoning DNA annealing, *Biomaterials*, 32, 7671-7676 (2011) .
4. R. Moriyama, J. Mochida, A. Yamayoshi, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Preparation of cationic comb-type copolymer having tetra-alkylammonium groups and its interaction with DNA, *Current Nanoscience*, 7, 979-983 (2011)

総説・解説・成書

1. 狩野有宏、丸山厚「PEG をグラフトしたポリ-L-リシンの siRNA との相互作用および血中滞留性と腫瘍集積性の検討」*Antisense*, 15, 3-11 (2011)

その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. Invited speaker, 11th International Symposium on Biorelated Polymers At the ACS Spring 2012 National Meeting, Annealing activity of cationic comb-type copolymers for DNA assembly, San Diego, March 25 – 29, 2012
2. Invited speaker, Korea-Japan joint symposium on recent trends of polymeric and self-assembling materials and their application to biotechnology, Manipulation of DNA Quadruplex Assembly with Cationic Copolymers, Kitakyushu, Japan, Feb. 8, 2012
3. 招待講演、東京女子医科大学 櫻井靖久名誉教授追悼シンポジウム「医学・薬学・工学の融合を目指して」、「生体高分子の構造と機能を操る合成高分子」、東京女子医科大学、2011年12月2日
4. Invited speaker, IUMRS-ICA 2011, Cationic Comb-type Copolymers as Bio-transformers for Biomolecular Nanomachines, Taipei, September 19-22, 2011
5. Co-organizer, Korea-Japan joint symposium on recent trends of polymeric and self-assembling materials and their application to biotechnology, Feb. 8, 2012

多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御

研究代表者：京都大学再生医科学研究所 岩田 博夫

分担研究者：京都大学再生医科学研究所 有馬 祐介

分担研究者：名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター 岡本 行広

1. 研究の概要

細胞に障害を与えずに細胞表面の修飾を行う方法、さらに、その方法を用いて細胞を自由自在に配列する方法の研究を行った。再生医療の多くの局面で必要となる複数の組織からなる3次元組織の構築を行うことが可能になり、再生医療の多くの局面で必要となる手法を提供できると考える。

2. 研究の背景と目的

生体内では二次結合、すなわち弱い結合を通じて分子がダイナミックに相互作用している。DNAの二重らせん、抗原・抗体反応、レセプター・リガンド相互作用、酵素・基質相互作用、細胞・細胞間相互作用、高次形態形成等々、生命活動の多くの局面で、二次結合は一つ一つの相互作用は弱いだがそれが協同することで極めて特異的で多様性を持った強い相互作用を行うことができるばかりでなく、ダイナミックに相互作用のon-offを行っている。生命活動の本質は“弱い相互作用の協同性”に潜んでいるといっても過言ではないと考えている。本研究では、申請者が再生医科学研究所に所属していることもあり、細胞レベルのダイナミックスに着目する。初期の細胞集合体を形成させた後、細胞は予想外の速さでこの集合体の中でダイナミックに相互の位置を変えている。個体発生時、組織の再生時、がん細胞の転移という具合に生物のほとんどの局面でこの細胞のダイナミックな動きに遭遇する。この過程の研究法を確立するとともに、この過程に関与する分子を明らかにし、相互作用定数を決め、数理モデルを構築してそのダイナミックな過程の理解を進める。応用面では、再生医療への展開、また、iPS細胞から誘導した機能細胞、その集合体である機能組織体の薬物スクリーニングへの供給が可能になる。本研究は、まさにナノスケールの分子間相互作用から再生医療(メディシン)に向かうナノメディシンの研究である。

3. 成果

医工学に関連した多くの研究では、細胞接着を制御するときには材料表面の修飾が行われてきた。しかし、再生医療になると新たな若干異なる状況が出てくる。すなわち異なる細胞を三次元的に配列させて新たな組織を作る、さらに人工的な手が加わった再生組織を生体に移植する。これらの時に細胞間の界面を上手にコントロールする必要がある。本研究では、細胞表面の修飾を行う新しい試みを行っている。

A03 班（キ）

細胞表面の修飾方法として、①イオン間相互作用；負に帯電している細胞とカチオン性高分子とのイオンコンプレックス形成、②疎水性相互作用；細胞膜の脂質二重膜と長いアルキル鎖の疎水性相互作用、③共有結合；膜タンパクのアミノ基と活性エステルとの反応の3つの方法が用いられてきた。①と③の方法はかなり細胞に障害を与え、修飾後の細胞の生存率は決して高くない。本研究では②の方法を採用した。②は細胞に与える影響は極めて小さく、修飾後の細胞の生存率が高い。

②の方法では、両親媒性高分子のポリエチレングリコールとリン脂質の複合体（PEG脂質）や長鎖アルキル鎖を側鎖に有するポリビニルアルコールなどが用いられてきた。疎水部であるアルキル鎖が自発的に細胞膜の脂質二重膜に導入され、親水部分は細胞表面に残る。この親水部分に他の官能基を導入しておき、更なる修飾に用いる。例えば、PEG鎖末端にオリゴDNAを導入したDNA-PEG脂質を利用すれば、細胞表面に特定配列のオリゴDNAを提示できる。細胞表面に固定したい分子にこのオリゴDNAの相補配列鎖DNA'鎖を固定すれば、オリゴDNA同士のハイブリダイゼーションにより、細胞表面に特定分子を固定できる。例えば、株化T細胞（CCRF-CEM）の懸濁液に、ポリチミジン3リン酸（polyT）が結合したpolyT-PEG脂質を添加し、洗浄後、蛍光色素（FITC）で標識したポリアデノシン3リン酸（FITC-polyA）を加えたところ、細胞表面に蛍光を認めた。この方法の治療への応用を一例紹介する。インスリン依存型糖尿病の治療のため、インスリン分泌組織、膵ランゲルハンス氏島（膵島）を経門脈的に肝臓内の血管に移植することが試みられている。このとき、膵島の表面で血液が凝固し、それに引き続いて起きる炎症反応により多くの移植膵島が死んでしまう。これを防止するために、膵島表面に抗凝固物質や補体制御因子の固定化を行った。

PEG脂質により細胞表面に導入したDNAを接着分子として利用すると、二次元平面上や三次元空間上に、細胞を自由に配列することが可能になる。フォトリソグラフィーやインクジェットプリンターを用いて、金薄膜を有するガラス基板上に、DNA-SH溶液を様々なパターン状に印刷し、金-チオール反応によって基板上に固定化する。相補配列鎖DNA'を有するDNA'-PEG脂質を導入した細胞を播種すると、DNA間のハイブリダイゼーションにより、先にDNA-SH溶液で印刷したパターン通りに細胞を基板上に固定できる。異なる複数種のDNA配列を利用すると、それらの細胞を自由に配置できる。これらの手法は、細胞間相互作用の研究に展開できるであろう。

さらに、細胞の三次元配列を可能にする。例えば、赤色に標識した細胞に polyA-PEG 脂質により polyA を導入し、また、緑色に標識した細胞に polyT を導入する。両者を混合すると、DNA 間のハイブリダイゼーションにより細胞同士の接着が引き起こされ赤色標識の細胞と緑色標識の細胞が交互に並んで接着できる。移植膵島を拒絶反応から守るため、膵島を高分子製の半透膜でマイクロカプセル化することが行われてきた。polyA-PEG 脂質を用いると膵島を他の細胞でカプセル化することも可能になる。本年で使用した細胞は培養細胞であるが、患者由来の細胞を利用できれば、免疫拒絶反応が起こりにくい膵島の表面加工が可能になるかもしれない。

Three Dimensional Tissue Regeneration Through Multipoint Molecular Weak Association

Hiroo Iwata¹

Yusuke Arima¹, Yukihiro Okamoto²

¹ Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University,

² FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevice, Nagoya University

New methodology using ssDNA-PEG-lipid as a cell adhesive will be presented to display cells in certain area on a glass plate and to regenerate 3D tissue using cells as building blocks. When a ssDNA-PEG-lipid solution is added to a cell suspension, the hydrophobic alkyl chains of the ssDNA-PEG-lipid spontaneously form hydrophobic interactions with the lipid bilayer of the cell membrane. The ssDNA which is presented on the cell surface can be used as an adhesive to immobilize cells on various surfaces.

Various patterns can be drawn on glass plates using cells along the patterned ssDNA. Solutions of ssDNA-SHs were printed by an inkjet printer onto a glass plate covered with a gold thin layer. ssDNA-SHs were immobilized onto the surface through the thiol-gold interaction. Cells with ssDNA'-PEG-lipid, in which ssDNA' was complementary to the ssDNA sequence of the ssDNA-SHs on the surface, were applied to the surface to induce cell attachment through the ssDNA-ssDNA' hybridization.

The ssDNA-PEG-lipid was utilized to immobilize cells on a cell aggregate. ssDNA was introduced onto the surface of HEK293 cells with an ssDNA-PEG-lipid, and ssDNA' was introduced onto the surface of cell aggregates with an ssDNA'-PEG-lipid. Then, the ssDNA'-cell aggregate were mixed with the ssDNA-HEK293 cells. The HEK293 cells were immobilized on the cell aggregate surface through DNA hybridization. Although the HEK293 cells existed as single cells on the aggregate just after immobilization, the surface of the aggregate was completely covered with a cell layer after 3 days in culture.

A03 班 (キ)

業績リスト

学術論文

1. Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H., Improvement of neural stem cell survival in collagen hydrogels by incorporating laminin-derived cell adhesive polypeptides. *Bioconjug Chem.* 2012 Feb 15;23(2):212-21.
2. Arima Y, Toda M, Iwata H., Surface plasmon resonance in monitoring of complement activation on biomaterials. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Sep 16;63(12):988-99. Review.

総説・解説・成書

1. Arima Y, Kato K, Teramura Y, Iwata H, Design of Biointerfaces for Regenerative Medicine, *Adv Polym Sci.* 2012;247:167-200
2. 寺村裕治、岩田博夫、第3章 膵島細胞による再生医療 3. 3 バイオマテリアルが切り開く新規膵島治療 再生医療叢書 第5巻 代謝系臓器、朝倉書店 (2011)
3. 竹本 直紘、岩田 博夫、インスリン分泌細胞の機能維持を目指したバイオ人工膵臓ー細胞表面修飾ー、医学のあゆみ、

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 岩田博夫、多点の弱い相互作用を利用して、細胞のふるまいを制御する、*Nature ダイジェスト*、9(1)、26-27 (2012)

がんリンパ行性転移の分子機構に解明基づく新治療法創発

研究代表者：東北大学 大学院医学系研究科 権田 幸祐

1. 研究の概要

本研究班の目標を達成するには、*in vivo* 分子イメージング法の開発が鍵となる。本年度は、蛍光粒子開発と血管新生イメージングに関して成果が得られた。量子ドット等の蛍光ナノ粒子は、その内部に毒性の高い物質を含んでいることが多い。我々は独自技術により、粒子を均一なシリカ層でコーティングし、内部物質流失の原因となる粒子の酸化を半分以上に抑制した。またこの粒子でリンパ節イメージングすることにも成功した。血管新生イメージングでは、血管新生因子を蛍光粒子標識し、虚血組織中の蛍光粒子分布を可視化した。その結果、血管新生因子受容体が、わずか数倍程度持続的に発現することが、生理的な血管新生に重要であることを明らかにした。

2. 研究の背景と目的

本研究班では、研究成果の最終的な出口として、がんリンパ行性転移メカニズムの解明とこれに基づく新治療法の創発を目指している。本目標を達成するためには、定量的な*in vivo*分子イメージング法の開発が重要である。優れた分子イメージング法は、本新学術研究領域が掲げる「特殊な細胞環境における分子反応を定量的に理解・考察するために、分子反応パラメーターを導出する」という目標に対し、大きな貢献ができると考えている。これまでの多くの*in vivo*イメージングは、蛍光、発光、磁気、X線等を用い、個体や組織全体の撮像にフォーカスした方法が主であり、分子や細胞個々のレベルでの生体メカニズム解析が難しかった。我々は、蛍光ナノ粒子の量子ドットをトレーサーに用い、新たな*in vivo*分子イメージング装置を開発し、がん転移活性化因子(膜タンパク質PAR1)や転移性がん細胞の体内動態を、7-9nmの空間位置精度で捉えることに成功してきた(Gonda, Higuchi, et al., *J.Biol.Chem.*,2010)。量子ドットは、1粒子当たりの蛍光強度が一定であり、優れた耐光性を持つ。そのため量子ドットで標的分子を特異的に標識し、その蛍光強度分布や蛍光重心位置の動きを解析すれば、生体分子の量や動態を定量的に長時間観察することができる。我々が、先行研究で開発した*in vivo*分子イメージング装置は、組織自家蛍光や生体振動(拍動や呼吸)の影響のため、高精度なイメージングの持続時間が短く(数分レベル)、改善すべき課題が多く残っていた。本研究班では、蛍光材料、生体操作手技、イメージング装置、画像解析など様々な視点から、定量的な*in vivo*分子イメージング法の改良を目指している。本年度は、「シリカコーティング技術を用いた蛍光粒子開発」と「血管新生イメージング」に関して成果が得られた。

3. 成果

【シリカコーティング技術を用いた蛍光粒子開発】量子ドットは励起光下での酸化により、蛍光褪色や内包カドミウムの溶出が起こる。これらを改善するために、量子ドットをシリカ層に内包し、シリカコーティングが量子ドット酸化に与える影響を検討した。シリカコーティングでは、TEOSを材料として、反応温度・時間・濃度などの諸条件に加え、反応場の容積の大きさ等も考慮し、均一なシリカ層を複数種作製することに成功した。シリカコート量子ドットを前肢皮下に注入し、体内動態を検討したところ、注入部に接続した腋窩リンパ節への移行性が観られた。蛍光標識されたリンパ節を摘出後、励起光下で組織内の量子ドット耐光性を評価したところ、シリカ層によって量子ドットの耐光性が約2倍に強化されていることが分かった。このようにシリカ層は励起光下の量子ドット酸化を抑制し、耐光性を向上させたことから、量子ドット酸化によるカドミウム溶出も抑制していることが期待される。

【血管新生イメージング】*In vivo*分子イメージングでは、生体操作手技の開発は重要である。この手技開発の中で、既存の概念を打破する血管新生メカニズムの解明に成功した。日本では、がん、脳梗塞、心筋疾患など血管構造関連疾患が死因の半分以上を占める。よって生理的な血管新生メカニズムの理解は重要である。血管新生では、血管内皮増殖因子(VEGF)やその受容体(VEGF-R)などが制御因子として重要な役割を果たしている。血管新生メカニズムの検討に虚血モデルマウスが有用であるが、これまでの作製法では手術時の炎症や浮腫がメカニズムへ影響を与えていた。我々はこれらの要因を排し、腓腹筋に選択的な血管新生を引き起こすモデルマウスを開発した。モデルマウス虚血肢の血管新生を経時観察した結果、手術後21日間、持続的な血管新生が誘導されていた。次に量子ドットとVEGFを結合させたプローブを作製し(VEGF-量子ドット)、生体観察を行った。イメージングでは血管新生が起こっている「血管の分岐部」と血管新生が見られない「血管の直線部」に注目して解析を行った。その結果、血管直線部では虚血肢と正常肢の間に大きな違いは見られなかった。一方、血管分岐部ではVEGF-量子ドットが結合したVEGF-Rの分布に違いが見られた。4日目の虚血肢では血管分岐部と血管直線部の間でVEGF-Rの分布に大きな違いは見られなかった。しかし9日目の虚血肢では血管分岐部のVEGF-Rは、血管の直線部の約3倍になっていた。さらに14日目の虚血肢では、9日目よりも血管新生に伴う血流量の増加が見られるにもかかわらず、血管分岐部のVEGF-Rは、血管の直線部の約3倍量で一定であった。以上の結果から、(1)血管新生が行われる部位では、手術後9日目くらいにかけて、VEGF-Rの分布が3倍程度に増加すること、(2)血管新生に必要なVEGF-Rの分布はわずか3倍量で十分であり、これによって血管直線部からの分岐(血管新生)が持続的に誘導されていくこと、が分かった。これまではVEGF-Rが10-20倍に過剰発現することが新たな血管の構築に重要であると長年信じられてきた。本研究により、我々は世界に先駆けて、新たな血管新生メカニズムの概念を構築することに成功した。

Clarification of molecular mechanism of lymphatic metastasis and development of new therapy for cancer metastasis

Kohsuke Gonda

Department of Nano-Medical Science, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Japan

To clarify molecular mechanism of lymphatic metastasis and apply the mechanism to development of new therapy for cancer metastasis, we aim at the improvement of a quantitative *in vivo* molecular imaging method from various aspects like a fluorescent material, the living body operation technique, the imaging device, and the image analysis, etc. In this year, we mainly got two results. One is for the "development of fluorescent nano-particle using silica-coating technology ". Another is for the "visualization of angiogenesis mechanism".

Quantum dot (QD), which is bright and photostable nano-particles, is expected to be a good tool for *in vivo* imaging. Previously, we succeeded in imaging a DDS process and metastatic cancer cells in mice and lymph vessel networks in pig stomach with QDs. However, the oxidation of QDs in tissues leads to elevated levels of cadmium toxicity and decreases in their photostability. We prepared QD/SiO₂ core-shell nanoparticles that consist of a single QD and a uniform silica shell. We varied the shell thickness and evaluated the photostability of the nanoparticles with high-accuracy single-particle imaging measurements, demonstrating that the photostability was severalfold greater than QDs alone. Moreover, *in vivo* fluorescence imaging showed that subcutaneously injected QD/SiO₂ specifically labeled the lymph node. The silica layer also enhanced the photostability of QD/SiO₂ in SLN tissues.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a critical role in angiogenesis. However, as vascular imaging at the molecular level is impossible, the detailed *in vivo* dynamics of VEGF and its receptor (VEGF-R) remain unknown. To understand the molecular distribution of VEGF and the VEGF-R, we prepared ischemic mice with a new surgical method and induced angiogenesis in the gastrocnemius muscle. Then, we made a VEGF-conjugated QD and performed immunostaining of VEGF-R-expressing cells with the fluorescent probe, demonstrating the high-affinity of the probe for VEGF-R. To observe the physiological molecular distribution of VEGF-R, we performed *in vivo* single particle imaging of gastrocnemius in the ischemic leg with the VEGF-conjugated QD. The results suggested that only a 3-fold difference of VEGF-receptor distribution is involved in the formation of branched vasculature in angiogenesis, although previous *ex vivo* data showed 10 to 20-fold difference in its distribution, indicating that a method inducing a several-fold local increase of VEGF-R concentration may be effective in generating site-specific angiogenesis in ischemic disease. This new *in vivo* imaging of ischemic mice could make useful contributions to understanding the mechanisms of angiogenesis and to developing a VEGF-R-related drug.

業績リスト

学術論文

1. Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, Satomi S, Ohuchi N. *In vivo* imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. *Blood* 118: e93-e100 (2011).
2. Kobayashi Y, Nozawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Fabrication and fluorescence properties of multilayered core-shell particles composed of quantum dot, gadolinium compound, and silica. *J Mater. Sci.* 47: 1852-1859 (2012).
3. Ueno H, Ishikawa T, Bui KH, Gonda K, Ishikawa T, Yamaguchi T. Mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliary cells can generate overall directional flow. *Nanomedicine* in press.

総説・解説・成書

1. 権田幸祐、樋口秀男、渡邊朋信、武田元博、大内憲明「ナノイメージングで探るがん転移の仕組み」SURGERY FRONTIER Vol. 18 No. 1 50-57 (2011)
2. 上村想太郎、小澤岳昌、加地範匡、権田幸祐「見つけることに意義がある-1分子計測の可能性-」現代化学 11月号 26-30 (2011)
3. 濱田庸、権田幸祐、佐藤成、山家智之、里見進、大内憲明「血管新生における血管内皮増殖因子受容体分布の生体分子イメージング」ナノ学会会報 第10巻第1号 35-39 (2011)

招待講演

1. Gonda K. *In vivo* molecular imaging of cancer metastasis and angiogenesis in mice using fluorescent nano-particle. 3rd Global COE International Symposium "New Trends in Basic and Clinical Cancer Research for Innovative Therapy". December 8-9, 2011, Nagoya.
2. Gonda K. Application of nanoimaging to mechanism analysis and diagnosis of cancer metastasis. Nanotechnology Cancer Asia-Pacific Network Meeting. February 15, 2012, Nagoya.
3. Gonda K, Hikage M, Hamada Y, Nakagawa T, Ohuchi N. Development of imaging system for advanced nanomedicine. 5th International Symposium on Nanomedicine. March 15-17, 2012, Nagoya.

特許(海外出願)

1. 権田幸祐、宮下穰、武田元博、大内憲明、「がん発症又はがん発症リスクの判定方法」、PCT/JP2011/004762 (2011年8月26日)
2. 宮下穰、権田幸祐、武田元博、大内憲明、「抗体を成分として含む医薬品の有効性の判定方法」、PCT/JP2011/004763、国立大学法人東北大学 (2011年8月26日)

報道

1. 日経産業新聞「血管の新生、1分子まで観察 東北大、光るナノ粒子使い」2011年10月10日
2. 科学新聞「持続的な血管新生誘導のメカニズム」2011年10月14日

がんにおける Akt 結合タンパク Girdin の役割

研究代表者：名古屋大学大学院医学系研究科 夏目敦至

分担研究者：名古屋大学大学院医学系研究科 千賀 威

1. 研究の概要

VHL 遺伝子は癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) として認識されており、遺伝的または体細胞的変異によってその遺伝的機能が消失し、腫瘍化がおこると考えられている。VHL 遺伝子から翻訳される VHL 蛋白 (pVHL) は主に、E3 ubiquitin ligase 複合体としての機能を持ち、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) (低酸素誘導因子) の分解制御を行っている。低酸素状態において、pVHL による HIF のユビキチン化と分解が抑制され、VEGF (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) 遺伝子の転写を促進する。Girdin は、VEGF を介した生体の血管新生 (postnatal angiogenesis) に Akt 依存的に関わっていることから、本研究では、低酸素下の状態での Girdin の脳腫瘍幹細胞の幹細胞性の維持と、その役割を検討した。低酸素の状態では、Girdin の発現上昇が示された。

2. 研究の背景と目的

フォン・ヒッペル・リンドウ (VHL) 病の原因は、染色体の 3p25 領域に存在する von Hippel-Lindau 病 (VHL) 遺伝子の変異であることが分かっている。

VHL 遺伝子は癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) として認識されており、遺伝的または体細胞的変異によってその遺伝的機能が消失し、腫瘍化がおこると考えられている。VHL 遺伝子から翻訳される VHL 蛋白 (pVHL) は主に、E3 ubiquitin ligase 複合体としての機能を持ち、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) (低酸素誘導因子) の分解制御を行っている。低酸素状態において、pVHL による HIF のユビキチン化と分解が抑制され、様々な遺伝子の転写を促進する。VEGF (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) もそれらの遺伝子の一つであり、血管の新生・成熟・維持などの作用を持つ。VHL 病で特徴的な血管芽腫や淡明細胞型腎癌では腫瘍血管の造成が顕著であり、VEGF も高発現している。

VEGF は、血管内皮細胞の細胞分裂の促進、血管透過性の亢進に関与するサイトカインで、正常な組織の血管新生にも不可欠な調節因子であるが、一方で、種々の癌細胞でも発現亢進が認められている。癌細胞内では、VEGF が血管新生を促すことで栄養や酸素の供給を高め、癌細胞の増殖、浸潤、転移に関与しているものと考えられている。

VEGF 発現による血管新生と、それに伴う細胞運動は、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 経路によるセリンスレオニンキナーゼ AKT (PKB) のリン酸化活性により制御されている。その結果、低酸素誘導性因子 1 α (HIF1 α) などの転写因子の合成

A03 班 (ケ)

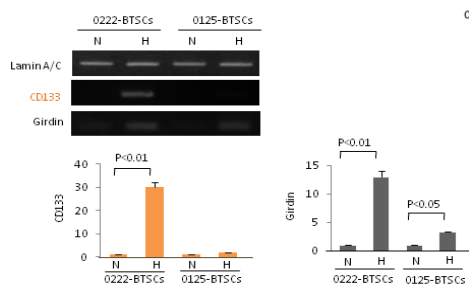
促進、様々な下流基質の活性化が認められ、血管新生・細胞運動が促進されることが分かっているが、詳細なメカニズムは未だに不明な点が多い。

近年、新規 Akt 基質として同定された Girdin はアクチン細胞骨格の結合分子であり、アクチン線維と細胞膜との架橋の役割を果たし、Akt によるリン酸化によって細胞運動を制御することが分かっている。更なる研究によって、Girdin が、VEGF を介した生体の血管新生 (postnatal angiogenesis) に Akt 依存的に関わっていることから、Girdin の機能が悪性腫瘍細胞の血管新生、細胞運動、浸潤性に重要な役割を果たしている可能性が明らかにされた。

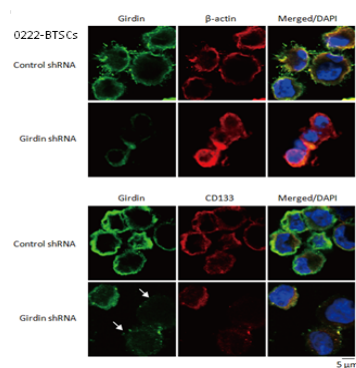
本研究では、Girdin の脳腫瘍幹細胞の低酸素状態での幹細胞性の維持と、その役割を検討した。

3. 成果

1. BTSC を 1%O₂ の状態で 14 日間培養をすると、CD133 の発現上昇とともに Girdin の発現も上昇した。



2. CD133 と Girdin は共局在する。



4. 考察

Girdin は、Akt の新基質として血管内皮細胞や、悪性腫瘍の細胞運動のキーファクターとして注目を浴びている。これまでの本研究の結果により、脳腫瘍幹細胞において分化を誘導さ

A03 班（ケ）

せれば、Girdin の発現は低下し、逆に Girdin 遺伝子の発現を抑制すると、脳腫瘍幹細胞はその幹細胞性を保てなくなることが示された。そして脳腫瘍幹細胞の細胞運動能、浸潤性、腫瘍形成能に深く関わっていることが示唆された。また Girdin の上流因子 Akt は VEGF を介した血管新生に深く関与していることから、VHL 病においても、Girdin が新たな治療法開発において注目されるべき因子であることは本研究から示唆されることであり、更なる Girdin の分子機構解明を進める予定である。

5. 結論

脳腫瘍幹細胞において低酸素状態にすると Girdin の発現は上昇し、脳腫瘍幹細胞はその幹細胞性を増強されることが示唆された

Girdin Maintains the Stemness of Glioblastoma Stem Cells

Atsushi Natsume

Senga, Takeshi

Nagoya University School

Glioblastomas (GBMs) are the most common and aggressive type of brain tumor. GBMs usually show hyperactivation of the PI3K-Akt pathway, a pro-tumorigenic signaling cascade that contributes to pathogenesis. Girdin, an actin-binding protein identified as a novel substrate of Akt, regulates the sprouting of axons and the migration of neural progenitor cells during early postnatal-stage neurogenesis in the hippocampus. Here, we show that Girdin is highly expressed in human GBM. Stable Girdin knockdown in isolated GBM stem cells resulted in decreased expression of stem cell markers, including CD133, induced multilineage neural differentiation, and inhibited *in vitro* cell motility, *ex vivo* invasion, sphere-forming capacity, and *in vivo* tumor formation. Furthermore, exogenous expression of the Akt-binding domain of Girdin, which competitively inhibits its Akt-mediated phosphorylation, diminished the expression of stem cell markers SOX2 and nestin and migration on the brain slice, and induced the expression of neural differentiation markers GFAP/ III Tubulin. Our results reveal that Girdin is required for GBM-initiating stem cells to sustain the stemness and invasive properties.

業績リスト

学術論文

1. Kishida Y, Natsume A, Kondo Y, Takeuchi I, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Saito K, Ando h, Ohka F, Sekido Y, Wakabayashi T. Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. *Carcinogenesis*, in press.
2. Natsume A, Kato T, Enomoto A, Kinjo S, and Wakabayashi T. (2011) Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells. *Oncogene*, in press.
3. Ohka, F., Natsume, A., Motomura, K., Kishida, Y., Kondo, Y., Abe, T., Nakasu, Y., Namba, H., Wakai, K., Fukui, T. Wakabayashi T. (2011). The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PLoS One* 6, e23332.
4. Iwami, K., Natsume, A., and Wakabayashi, T. (2011). Cytokine networks in glioma. *Neurosurgical Review* 34, 253-263; discussion 263-254.

総説・解説・成書

1. 夏目敦至 「脳腫瘍取扱い規約 第3版」金原出版(2010) pp50-55.
2. 夏目敦至 「新時代の脳腫瘍学-脳腫瘍におけるエピジェネティクス」日本臨床社(2010) pp34-42.
3. 夏目敦至 「遺伝子診療学-脳腫瘍-ゲノム異常の最新アトラス」日本臨床社(2010) pp56-62
4. 夏目敦至 「脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第3版」医学書院(2009) pp34-37.

その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 夏目敦至 「Glioma における治療戦略」 鹿児島脳神経外科セミナー 2011年11月4日
2. 夏目敦至 「悪性脳腫瘍のエピジェネティクス異常」 神奈川脳神経外科セミナー 2011年9月16日