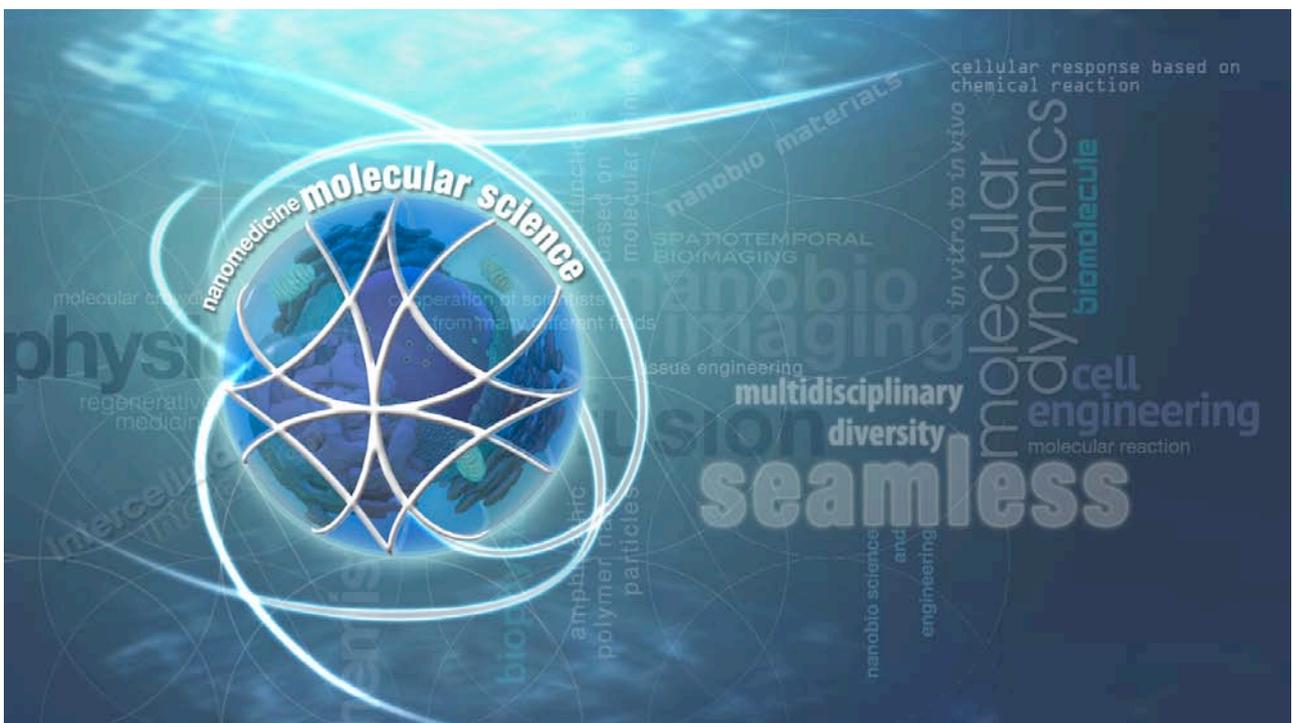


---

# ナノメディシン分子科学

## 平成 26 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)	----- 9
「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)	
4. A01(ウ)	----- 13
「心筋細胞内分子機能のナノイメージングと個体への応用」	
計画班代表 福田紀男 (東京慈恵会医科大学・医学研究科)	
5. A02(エ)	----- 17
「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)	----- 21
「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)	----- 26
「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・先導物質化学研究所)	
8. A03(キ)	----- 30
「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)	
9. A03(ク)	----- 34
「低悪性度神経膠腫における遺伝子変異の全貌」	
計画班代表 夏目敦至 (名古屋大学・大学院医学系研究科)	
10. A03(ケ)	----- 40
「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)	

11. 公募	-----	44
「蛍光寿命イメージングを用いた細胞内イオン濃度の動的変化の解明」		
中林 孝和 (東北大学・大学院薬学系研究科)		
12. 公募	-----	48
「内在性 mRNA の一分子イメージングによる RNA 代謝機構の解明」		
岡部 弘基 (東京大学・大学院薬学系研究科)		
13. 公募	-----	52
「軸索パターンの構築において時空間情報伝達と構造的安定化を司る分子反応の解明」		
小西 慶幸 (福井大学・大学院工学研究科)		
14. 公募	-----	56
「光増感剤修飾分子を用いた PCI の分子科学」		
大槻 高史 (岡山大学・自然科学研究科)		
15. 公募	-----	60
「1細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いた細胞死に関わる生体分子の1分子計測」		
許 岩 (大阪府立大学・ナノ科学・材料研究センター)		
16. 公募	-----	64
「高分子超薄膜を用いた未活性浮遊細胞固定技術“ナノラッピング”の確立と機能解」		
岡村 陽介 (東海大学・創造科学技術研究機構)		
17. 公募	-----	68
「高精度の位置決めと環境測定を細胞内において一粒で可能にする粒状蛍光プローブ」		
鈴木 団 (早稲田大学・重点領域研究機構)		
18. 公募	-----	72
「イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」		
合田 達郎 (東京医科歯科大学・生体材料工学研究所)		
19. 公募	-----	76
「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」		
檜田 啓 (名古屋大学・工学系研究科)		
20. 公募	-----	80
「細胞内酵素反応を定量的に解析するためのナノプローブの開発」		
中田 栄司 (京都大学・エネルギー理工学研究所)		
21. 公募	-----	84
「画像解析による微弱電流依存性の細胞内輸送亢進機構解明と革新的指向性 DDS への展開」		
小暮 健太郎 (京都薬科大学・薬学部)		

22. 公募	-----	88
「糖鎖改変技術を利用したバイオ輸送システム」		
岩崎 泰彦 (関西大学・化学生命工学部)		
23. 公募	-----	92
「細胞が産生する浸透圧調節分子と人工高分子化合物を用いたs細胞モデル実験系の構築」		
三好 大輔 (甲南大学・フロンティアサイエンス学部)		
24. 公募	-----	97
「実験的に抽出された分子反応パラメータを導入したマラリア感染赤血球モデルの開発」		
今井 陽介 (東北大学・大学院工学系研究科)		
25. 公募	-----	101
「細胞機能解明のためのエクソソーム定量解析ナノデバイスの創製」		
安井 隆雄 (名古屋大学・工学系研究科)		
26. 公募	-----	105
「ナノ核酸デバイスを用いた自然免疫応答発現機構の網羅的解析」		
南川 典昭 (徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)		
27. 公募	-----	109
「細胞取込過程の環境変化を認識するナノカプセルの構築と超音波力学療法への展開」		
原田 敦史 (大阪府立大学・工学研究科)		



文部科学省科学研究費補助金

新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」

研究期間：平成 23 年 8 月-平成 28 年 3 月

### 【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が関わる反応は、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。

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疾患治療法・デバイスの創出へと結実させる。

平成 26 年度より採択された公募研究を包含し、「ナノメディシン分子科学」を創成するために必要な課題を統合し、相乗的に何倍もの成果をあげるために活動を活発にする。

#### **【領域研究で期待される成果】**

新学術領域の創成により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 26 年度の成果】**

##### **研究体制の整備**

平成 26 年度は 4 月より新たに公募研究班として 17 の研究グループが加わり計画研究班 9 研究グループと併せて総数 26 研究グループ体制となり、今後 2 年間の研究を進めることとなった。また、6 名を班友として、研究領域活動への参加をしていただくこととなった。

総括班では、継続活動として各研究班の情報交換を、緊密にかつ円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ている。また、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。また、WEB の活用をより活性化しつつ、研究グループ全体への情報の配信、グループ間の情報交換を速やかに行えるようにした。

さらに一般社会への研究成果の公開を進めてきている。

本領域研究において、「細胞内イメージング」が重要な共通基盤技術として利用されることから、東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻内に共焦点レーザー顕微鏡システムを設置し共有設備にしているが、共通使用の利便性を高めるために大学院博士課程学生を実験補助員として配置した。本システムの周囲には細胞培養設備を中心に、全反射蛍光顕微鏡や蛍光相関分光測定装置、正立・倒立蛍光顕微鏡など細胞内反応解析、追跡に必要な機材を集中的に配置しており、研究班員、班友には簡便に利用することができるようにした。

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。

### 情報交換・公開の促進

本領域から生み出される成果を一般に公開する目的で、WEBを有効に活用し、平成25年度研究報告書を掲載するとともに、領域研究の内容を平易に解説することを目的として、News Letterを発刊した。特に新しく採択された公募研究班の研究紹介を中心に紹介した。

平成26年7月に第7回全体会議（東京大学：参加者60名）を行い、全計画研究班、公募研究班および班友（ポスター発表）が、非公開で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、共同研究の推進、融合研究の開拓について積極的に進められるようにした。総括班としても、これを支援する体制を整えた。第8回全体会議を平成27年3月2-3日（松島：参加者40名）に合宿制で行った。平成26年5月に日中ナノメディシンシンポジウム（広島）を主催し、第5回 Taiwan-Japan Nanomedicine Symposiumも含めて、アジア諸国へのナノメディシン分子科学の情報発信を進めた。さらに、平成26年4月に、「革新的イメージングで拓く医学新領域」の主題で新学術領域ナノメディシン分子科学シンポジウムを横浜にて開催した。このシンポジウムでは分析機器企業の後援により、実際に最新の測定装置を会場に設置し、講演と実際の試料観察と並行して行った。

関連する学協会の学会・大会にてシンポジウムを行った。ナノ学会バイオ部会国際シンポジウム（8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014)（平成26年12月松山）、第6回 Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine（平成27年1月台北）、生物物理セミナー～悪性脳腫瘍の幹細胞をみる～（平成26年6月東京）、ナノバイオメディシン部会研究会（平成26年9月岡崎）、ナノメディシン分子科学&生物物理セミナー～骨格筋損傷における治癒メカニズム～（平成26年11月東京）を共催した。これらの学協会との連携は、本学術領域での成果を広く公開できるとともに、

関連分野の研究者との情報交換を活性化し、将来的な発展を誘起できる。

海外からの研究者、企業との情報交換など、比較的小規模の情報交換を支援・推進することを目的とした NMMS セミナーシリーズ を積極的に開催し、平成 26 年度は、7 回開催するに至った（開催地：東京 2 回、京都 2 回、大阪 1 回、名古屋 1 回、神戸 1 回）。

新学術領域研究を継続的に発展させるための若手人材育成を目的とし、研究領域に関連する若手研究者が積極的に「ナノメディシン分子科学」に参加・議論する、「若手の会」を実施している。本年度はさらに新しい試みとして、平成 26 年 11 月に 第 3 回「若手の会」会議（東京）を国際セミナー（ナノメディシン若手国際交流セミナー：細胞工学と組織再生医療の最前線）として実施した（招待講演 1 件：Case Western Reserve University, Nicolas P. Ziats 教授、講演 4 名、若手パネリスト 9 名）。を平成 27 年 1 月に、第 4 回「若手の会」会議（招待講演 1 件：東京医科歯科大学安田賢二教授）（東京）を平成 27 年 1 月に開催した。若手の会のメンバー数は増加し、40 名を超えるに至っている。

中高生や一般者へ向けて本学術領域の内容を紹介する アウトリーチ活動 を、研究室見学、公開実験、市民公開シンポジウムへの情報提供などにより積極的に行った（計 12 件）。

## 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

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粒子レベルで説明することを行っている。今年度は、マウスを傷つけることなく耳介腫瘍内のがん細胞をコントラストよくイメージングすることができた。このがん細胞の中でも抗がん剤に対して耐性をもったがん幹細胞が、紫外線に対してどのくらいの耐性を持つのかを調べたところ、他のがん細胞より紫外線にも耐性を持つことがあきらかとなった。これらの研究は、がん化のメカニズム解明に役立つと期待される。

### 2. 研究の背景と目的

細胞内分子機能の理解は、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、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、精製された実験系を用いて、分子機能の詳細が明らかにされた。さらに近年蛍光性ナノ粒子の登場により、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。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、マウス内や細胞内のナノメートル領域の分子や小器官の反応を高精度測定を行う。

### 3. 成果

#### 非侵襲がん細胞の観察

がん組織・細胞の非侵襲 *in vivo* イメージングに関する現在作成中の論文に追加するデータを得るために2つの実験を行った。1つは、MDA-MB-231細胞のGFP-tub.とWild Typeを9:1で混合し、がん組織の蛍光タンパクのバックグラウンドを抑え *in vivo* イメージングを行い、これまで以上に鮮明な *in vivo* がん細胞像を得る研究で2つ目はヌードマウスの耳介の腫瘍形成率が低い、例数が少なくSKIDマウスとの間に有意差がみられないことから、例数を増やす実験である。MDA-MB-231細胞のGFP-tub.とWild Typeを9:1で混合し、マウス耳介に接種した結果背景光の低くコントラストの高い細胞イメージングができた。また、ヌードマウスの耳介の腫瘍形成率についての実験では、これまで  $4 \times 10^6$  cells の接種細胞数では腫瘍の形成がみられなかったが、 $5.0 \times$

## A01 班 (ア)

$10^6$ cells 以上の細胞を接種すると、腫瘍が形成することが新たに明らかとなった。

**がん幹細胞の紫外線耐久性**：近年、がん細胞の中でもがん幹細胞は抗がん剤耐性や放射線耐性を示すため、抗がん剤治療が十分ながんを撲滅できない主要因となっている。我々は、脳の悪性腫瘍からライン化された細胞 (Brain tumor stem cells, BTSCs) の紫外線に対する耐性を調べた。がん幹細胞と幹細胞ではない腫瘍細胞 U87 に紫外線 (280nm) 10 分照射した後に、幹細胞に結合した量子ドット -

EGFR の細胞膜上の運動をトラッキングを行った。その結果、がん幹細胞の EGFR の膜上の運動は、照射前とほとんど変化しなかった。それに対して、幹細胞ではない U87 では、膜上の運動は大きく阻害された (遅くなった)。これらのことから、がん幹細胞が、紫外線に対する耐性があること明らかとなった。

**PAR-1 のエンドサイトーシス過程の 3D イメージング**：これまで、マウスを用いた研究を報告してきたが、今回は、培養細胞を用いたがん化に関連する研究成果を報告する。がん化を誘発する膜タンパク質 PAR-1 (Protease activated receptor 1, 権田班との共同研究) を過剰発現した培養細胞内がどのようにして、膜タンパク質を細胞内に取り込むのかその過程の追跡をおこなった。PAR-1 は、スロンビンや MMP1 といった分解酵素によって、アミノ酸の一部が切断されることで活性化し、これに伴い G タンパク質系のカスケードが活性化して細胞運動能を亢進し、転移を起こすことが知られている。我々は、細胞膜上の PAR-1 のエンドサイトーシス速度とスロンビンによるカスケードの活性化とに関連があるかをしらべるために、3 次元的な位置検出を行った。PAR-1 に対するモノクローナル抗体 (権田, 樋口 J. Biol. Chem. 2010) に量子ドットを結合して、PAR-1 の位置を検出した。量子ドット - 抗体複合体を細胞と反応させてから、約 2 時間後には、細胞上の量子ドットの半数が細胞内に取り込まれることが判明した。さらに詳しく調べるために、3 次元的な位置を数 nm 精度で検出できる装置を用いて、PAR-1 がどのようにエンドサイトーシスするのかを明らかにした (図 1)。約 150 秒の位置追跡によって、エンドサイトーシスする

PAR1, 膜表面上を動くだけの PAR1 として、膜の中から外に向かうエンドサイトーシスとは逆方向の運動が見られた。膜の中から外に向かう PAR-1 は、一度エンドサイトーシスした小胞が舞い戻ってきたのか、あるいは、リサイクリングの途中を見ているのかのいずれであろうと考えている。

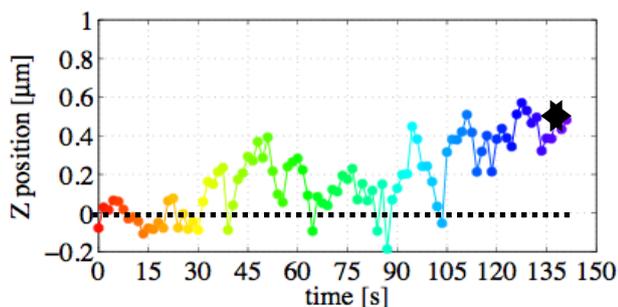


図 1. 細胞内にエンドサイトーシスされた PAR1-量子ドットの深さ方向に変位する経過

## 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*

We developed new imaging methods to visualize molecules under noninvasive condition. We focused on the ear auricle of mouse for observation of tumor cells because very thin (about 150-200 $\mu$ m) and limited hypodermal tissue. We developed a novel xenograft model of the ear auricle with breast cancer cells in order to observe them noninvasively by spinning disk confocal (CSU) system. We injected mixture of human breast cancer cell lines, MDA-MB-231-tubulin-GFP and MDA-MB-231, into the ear auricle of SCID mice to reduce the background fluorescence for GFP-cells. The cancer cells were clearly imaged



Brain tumor stem cells (BTSCs) populate in a small portion of tumor and are responsible for the recurrence of the tumor after treatment. BTSCs have also been known to have high resistance to radiotherapy and chemotherapy. Despite such well-known properties, the difference in membrane functions between BTSCs and non-BTSCs remains unclear. A potential factor is dynamics of the BTSC membrane protein marker, CD133. Thus, we evaluate dynamics of CD133 labeled with quantum dots using confocal microscope. BTSCs showed higher motility and expression level of CD133 than that of non-BTSCs, suggesting that dynamics of CD133 might be a key property in membrane functions of BTSCs.

Protease activated receptor 1 (PAR-1), has been known to be one of the most essential membrane protein that mediates intracellular signals promoting cell motility, which is closely related to cancer metastasis. Since the machinery of vesicles carrying this PAR-1 proteins plays a key role in signal transfer, we imaged the trafficking of PAR-1 carrying vesicles, mainly focused on the moment of endocytosis, to analyze the movement of activated PAR-1 after internalization. Our triple-view method consisting of dual-focus fluorescence and phase contrast optics, enabled us to track endocytotic vesicles in 3-dimension. Also, using confocal microscopy, we were able to diagnose the characteristic movements of PAR-1 proteins with respect to their relative position in a cell.

## A01 班 (ア)

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Ryoma Nakao\*, Kenji Kikushima, Hideo Higuchi, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Bai DongYing, Makoto Ohnishi, and Hidenobu Senpuku. Novel Approach for Purification and Selective Capture of Membrane Vesicles of Periodontopathic Bacteria, *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*. May: 9:e95137 (2014)
2. Ichimura T., T. Jin, H. Fujita, H. Higuchi and \*T.M. Watanabe. Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles. *Frontiers in Physiology*. 00273 (2014).

#### 総説・解説・成書

1. 茅元司 分担執筆 「2章 筋肉ミオシン」 化学同人「1分子生物学」 石渡信一, 原田慶恵編 2014.10
2. 樋口秀男, 多田隈尚史 分担執筆 「12章 細胞内での運動」 化学同人「1分子生物学」 石渡信一, 原田慶恵編 2014.10

#### その他(報道, 受賞, 特許, 主な招待講演, 活動など)

1. (招待講演) Hideo Higuchi, Kenji Kikushima and Sayaka Kita. Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles. 8th Internal Symposium on Nanomedicine (Matsushima) 2014.12.7
2. (招待講演) Higuchi (Tokyo): Single molecule biophysics towards “in vivo“. Cooperation in Physics Workshop: Today-LMU (Munich, Germany) 10/27, 2014
3. (招待講演) Hideo Higuchi, Kenji Kikushima and Sayaka Kita Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles. A3 Foresight Symposium on Nanomedicine. (Sendai) 2014.9.2
4. (招待講演) 樋口 秀男 「階層を上る1分子モータータンパク質」 東北大学応用物理学専攻セミナー (仙台) 2014.7.14
5. (シンポジウム・企画発表) 樋口秀男 「細胞内の分子ダイナミクス」 サブコースシンポジウム 生物物理の新展開 (東大) 2014.4.25
6. (招待講演) 茅 元司 (2014) 1分子顕微鏡を用いて見えてきた筋肉の効率的な収縮メカニズム. 日本光学会年次学術講演会シンポジウム「バイオフィotonicsの展望」筑波大学東京キャンパス文京校舎2014.11.5-7
7. (招待講演) 茅 元司 (2014) 1分子計測技術を用いて効率的な筋収縮の仕組みを紐解く. 第87回日本生化学会大会シンポジウム「次世代型筋研究の夜明け」国立京都国際会館 2014.10.15-18
8. (招待講演) Motoshi Kaya (2014) Intermolecular cooperativity of skeletal myosins in myofilaments. Gordon Research Conference (Muscle & Molecular Motors), Mount Snow Resort West Dover, VT USA (July6-11, 2014)
9. (研究会組織) 宇理須恒雄, 樋口秀男 分子研研究会「細胞核内反応の分子科学」(岡崎) 2014.9.7
10. (社会活動) 樋口秀男 高校生に対する講義「傷を治す白血球と分子の活躍」 沼津西高校生約 90 名 (東大) 2014.10.20.
11. (社会活動) 喜多清 小学校 5 年生への理科の講義 (ガン研究の紹介と発生についてとキャリア教育も兼ねて) つくばみらい市立小絹小学校 (約 100 名) 2014. 7. 14

## 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 生体材料工学研究所 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 生体材料工学研究所 徐 知勲  
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 田村 篤志

### 1. 研究の概要

シクロデキストリン (CD) 空洞部に線状高分子が貫通した超分子ポリロタキサン (PRX) を用いた細胞内分子反応解析、治療応用を推進している。これまでの研究で細胞内環境特異的に分解応答を示す PRX を利用した細胞内への治療用核酸、タンパク質の導入、ならびに希少難治性代謝疾患であるライソゾーム病治療薬としての PRX の応用を検討してきた。本年度は、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしているオートファジー機能に対する PRX の作用に関して検討を行った。

### 2. 研究の背景と目的

ライソゾーム病の一種であるニーマンピック病 C 型 (NPC 病) は、sterol sensing domain を有する膜貫通タンパク質 NPC1 の変異により、リソソームにコレステロールの蓄積を生じる疾患である。本疾患は常染色体劣性遺伝により起こるため患者数は少ないものの、進行性神経後退や肝脾腫を示す致死的疾患であるが、現在有効な治療法は確立されていない。近年、コレステロール包接能を有するヒドロキシプロピル  $\beta$ -シクロデキストリン (HP- $\beta$ -CD) が細胞内から NPC 病細胞からコレステロールを除去し、NPC 病モデルマウスの生存期間を著しく延長することが見いだされ、現在 NPC 病に対する臨床試験が世界中で進められている。一方、本研究では  $\beta$ -CD 空洞部にポリマー鎖が貫通した構造の PRX の利用を検討している。昨年度の研究で、NPC 病患者由来皮膚線維芽細胞 (NPC1 細胞) に対する PRX のコレステロール除去作用を評価した結果、HP- $\beta$ -CD の 100 分の 1 程度の濃度で正常細胞と同程度までコレステロール量を減少することを明らかとした。

多くのライソゾーム病では脂質、糖質の蓄積以外にも不良タンパク質やオルガネラの分解により細胞の恒常性維持に重要な役割を担うオートファジーに異常があることが明らかとされつつある。NPC 病においてもオートファジー機能不全により細胞質にオートファゴソーム、不良タンパク質の蓄積が認められている。このようなオートファジーの機能不全は多くの神経変性疾患において認められており、NPC 病においても病態との関連が指摘されている。そこで本年度は、 $\beta$ -CD を貫通した PRX の NPC1 細胞に対するオートファジー機能への影響を評価した。

### 3. 成果

NPC 病細胞に対し HP- $\beta$ -CD、ならびに末端にジスルフィド結合を有する水溶性 P123/ $\beta$ -CD ポリロタキサン (HEE-SS-PRX) を作用させた後の細胞内総コレステロール量を定量した結果、HEE-SS-PRX は HP- $\beta$ -CD よりも低濃度でコレステロール量の減少が認められた。細胞質中のオートファゴソームを抗 LC3 抗体で染色した結果、NPC1 細胞では正常細胞と比較して LC3 陽性小胞数が有意に増加していた。HEE-SS-PRX ( $\beta$ -CD 濃度 1 mM) を作用させた結果、正常細胞と同程度まで LC3 陽性小胞数が減少したが、HP- $\beta$ -CD (10 mM) を作用させた場合は未処理 NPC1 細胞よりも LC3 陽性小胞の増加が認められた。LC3 量、ならびにオートファジーにより選択的に分解を受ける p62 量をウェスタンブロットにより評価した結果、HP- $\beta$ -CD では LC3-II、p62 量が濃度依存的に増加し、HEE-SS-PRX では LC3、p62 量が濃度依存的に減少した。

以上の結果より、HP- $\beta$ -CD と HEE-SS-PRX はコレステロールの減少作用という点においては有効濃度の差はあるものの同様の効果であるが、オートファジーに対しては正反対の作用を示した。特に HEE-SS-PRX は、オートファゴソーム数ならびに p62 量の減少をもたらすことより、NPC1 細胞のオートファジー不全を改善していると考えられる。

HEE-SS-PRX によるオートファジー機能改善メカニズムを明らかとするため mRFP-GFP-LC3 によりオートリソソーム形成の評価を行った。NPC1 細胞ではオートリソソームの指標である mRFP<sup>+</sup>-GFP<sup>-</sup>小胞数が正常細胞よりも極端に低かったが、HEE-SS-PRX により正常細胞と同程度まで mRFP<sup>+</sup>-GFP<sup>-</sup>小胞が増加した。このとき、リソソーム内酵素の活性と発現量の変化は認められなかったことより、上記の結果はオートリソソーム形成促進によるものであると考えられる。

リソソームにおけるコレステロールの異常蓄積がオートファジーの最終段階であるオートリソソーム形成を阻害しているとする、HEE-SS-PRX によるコレステロール除去がオートファジー機能の正常化に寄与していると考えられる。HEE-SS-PRX によるオートファジー不全の機能改善は NPC 病のみならずオートファジー機能の低下が認められる神経変性疾患に対する新規治療薬として応用展開が期待できる。

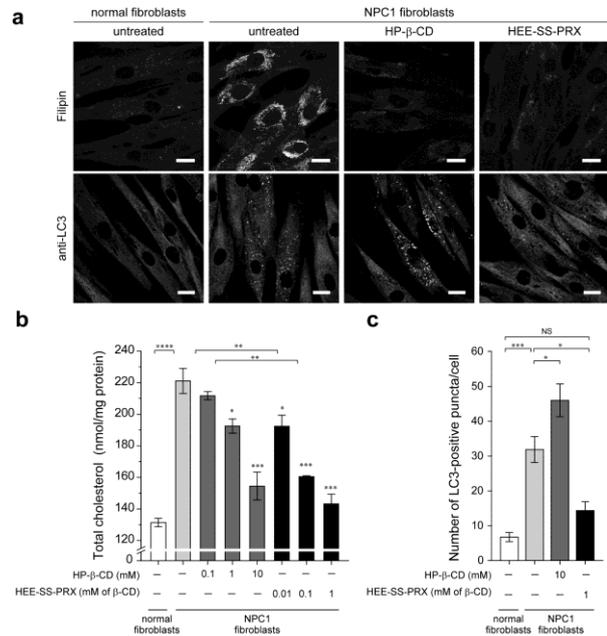


Fig. 1. (a) Filipin and anti-LC3 staining for normal and NPC1 fibroblasts treated with HP- $\beta$ -CD (10 mM) and P123/ $\beta$ -CD HEE-SS-PRX (1 mM of  $\beta$ -CD) for 24 h. (b) Total cholesterol in normal and NPC1 fibroblasts treated with HP- $\beta$ -CD and P123/ $\beta$ -CD HEE-SS-PRX for 24 h. (c) The number of LC3-positive puncta in normal and NPC1 fibroblasts treated with HP- $\beta$ -CD and P123/ $\beta$ -CD

## **Analysis of biomolecules using cyto-responsive supramolecular polymers**

Nobuhiko Yui<sup>1</sup>

Tomohiro Konno<sup>2</sup>, Ji-Hun Seo<sup>1</sup>, Atsushi Tamura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biomaterials and Bionengineering, Tokyo Medical and Dental University, Japan*

<sup>2</sup>*Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Japan*

Niemann-Pick type C (NPC) disease is an autosomal recessive lysosomal trafficking disorder caused by the dysfunction of NPC1 protein, which induces the chronic accumulation of unesterified cholesterol within lysosomes of cells. This abnormal cholesterol accumulation leads to various clinical symptoms, such as progressive neurodegeneration and hepatosplenomegaly, often resulting in fatality at an early age. Nevertheless, there is currently no effective therapy for NPC disease, although various methodologies have been examined in attempt to establish NPC disease therapy. Recently, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD), a derivative of cyclic oligosaccharide, has received tremendous attention as a potential therapeutic for NPC disease. It has been revealed that the intravenous administration of HP- $\beta$ -CD reduces the cholesterol content in various organs, leading to a remarkable prolongation of the life-span of NPC disease model mice. Despite the significant therapeutic effect of HP- $\beta$ -CD, it has limited therapeutic due to its toxic effect at high concentration.

We have recently developed  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD)-threaded biocleavable polyrotaxanes (PRXs) which can release threaded  $\beta$ -CDs in response to the intracellular environments as a therapeutics for NPC disease. The biocleavable PRXs exhibited effective cholesterol reduction ability and negligible toxic effect compared with hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD). In this study, we investigated the effect of biocleavable PRX and HP- $\beta$ -CD on the impaired autophagy in NPC disease. The NPC-patient-derived fibroblasts (NPC1 fibroblasts) showed an increase in the number of LC3-positive puncta compared with normal fibroblasts, even in the basal conditions: the HP- $\beta$ -CD treatment markedly increased the number of LC3-positive puncta and the levels of p62 in NPC1 fibroblasts, indicating that autophagic flux was further perturbed. In sharp contrast, the biocleavable PRX reduced the number of LC3-positive puncta and the levels of p62 in NPC1 fibroblasts through an mTOR-independent mechanism. The mRFP-GFP-LC3 reporter gene expression experiments revealed that the biocleavable PRX facilitated the formation of autolysosomes to allow for autophagic protein degradation. Therefore, the  $\beta$ -CD-threaded biocleavable PRXs may be promising therapeutics for ameliorating not only cholesterol accumulation but also autophagy impairment in NPC disease. Therefore, our designed  $\beta$ -CD-threaded biocleavable PRXs have great potential for the treatment of NPC disease.

業績リスト

学術論文

1. A. Tamura, M. Tokunaga, Y. Iwasaki, N. Yui. Spontaneous assembly into pseudopolyrotaxane between cyclodextrins and biodegradable polyphosphoester ionomers. *Macromol. Chem. Phys.* **215** (7), 648-653 (2014)
2. A. Tamura, H. Tanaka, N. Yui. Supramolecular flower micelle formation of polyrotaxane-containing triblock copolymers prepared from macro-chain transfer agent bearing molecular hooks. *Polym. Chem.* **5** (15), 4511-420 (2014)
3. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara. Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for encapsulation to provide unified quality cells. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **39** (3), 279-282 (2014)
4. X. Lin, T. Konno, K. Ishihara. Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobes conjugated with molecular beacons. *Biomacromolecules* **15** (1), 150-157 (2014)
5. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Quantitating distance-dependent, indirect cell-cell interactions with a multilayered phospholipid polymer hydrogel. *Biomaterials* **35** (7), 2181-2187 (2014)
6. J. Choi, T. Konno, K. Ishihara. Multilayered phospholipid polymer hydrogels for releasing cell growth factors. *Biomaterials and Biomedical Engineering* **1** (1), 1-12 (2014)
7. A. Tamura, I. Fukumoto, N. Yui, M. Matsumura, H. Miura. Increasing the repeating units of ethylene glycol-based dimethacrylates directed towards reduced oxidative stress and co-stimulatory factors expression in human monocytic cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **103** (3), 1060-1066 (2015)
8. S. Yamada, Y. Sanada, A. Tamura, N. Yui, K. Sakurai. Chain architecture and flexibility of  $\alpha$ -cyclodextrin/PEG polyrotaxanes in dilute solutions. *Polym. J.* in press (2015)
9. A. Tamura, N. Yui.  $\beta$ -Cyclodextrin-threaded biocleavable polyrotaxanes ameliorate impaired autophagic flux in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* in press (2015)

総説・解説・成書

1. A. Tamura, N. Yui. Threaded macromolecules as a versatile framework for biomaterials. *Chem. Commun.* **50** (88), 13433-13446 (2014)
2. 金野智浩. リン脂質ポリマーヒドロゲルを用いた細胞機能制御. *ゲルテクノロジーハンドブック* (監修 中野義夫) 株式会社エヌ・ティー・エス, 789-792, 2014年10月
3. T. Konno. Cytocompatible phospholipid polymers for non-invasive nanodevices, *Intracellular Delivery II* Aleš Prokop, Yasuhiko Iwasaki, Atsushi Harada (Eds.), 255-264, Springer Netherlands (2014)

その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 招待講演: N. Yui. Designing cytoleavable polyrotaxanes as a vehicle for molecular logistics of biomacromolecular delivery into target cells. *The 6th Forum on New Materials*, Italy, June, 2014
2. 招待講演: N. Yui. Supramolecular biomaterials exploit new paradigm of modulating cellular functions. *2014 Annual Meeting of the Korean Society for Biomaterials*, Korea, Nov, 2014.
3. 招待講演: 由井伸彦. ポリロタキサンの動的骨格を活かした細胞機能の調節 新たな治療法を目指して. *第15回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム*, 東京, 2014年10月.
4. 招待講演: 由井伸彦. 超分子材料の動的特性を活かした細胞機能の調節. *近畿化学協会機能性色素・エレクトロニクス部会東京地区合同講演会*, 東京, 2014年12月.
5. 招待講演: T. Konno. Cytocompatible soft-biomaterials for cell engineering, *8th International Symposium on Nanomedicine*, Ehime, December, 2014
6. 招待講演: 田村篤志. インターロック高分子による希少難治性代謝疾患治療. *第65回医用高分子研究会*, 東京, 2015年3月.
7. 報道: 日経産業新聞「薬, 細胞に取り込みやすく, 東京医科歯科大, 遺伝性の難病で成果, 数珠状につなげ実現」 2014年11月7日
8. 特許: 寺内正彦, 池田 剛, 田村篤志, 山口 聡, 原田 清, 由井伸彦. 「骨形成因子安定保持剤, 骨形成因子活性化剤, 骨形成因子の安定保持方法, 及び骨形成因子の活性化方法」特願 2014-224265
9. 特許: 田村篤志, 由井伸彦. 「ポリロタキサン, 及び医薬組成物」 PCT/JP2014/071553

## 心筋細胞内分子機能のナノイメージングと個体への応用

研究代表者：東京慈恵会医科大学 福田紀男  
分担研究者：東京慈恵会医科大学 小比類巻 生  
分担研究者：早稲田大学 大山廣太郎

### 1. 研究の概要

21世紀は「心臓病の時代」と呼ばれ、癌に次いで高い死亡率を示している。我々は、“Cardiac Nano-medicine”という分野を創成し、nm精度で病態診断や治療効果の判定を可能にする新しい技術の開発を目指している。本年度、“Cardiac Nano-medicine”の土台となる“Cardiac Nano-physiology”の研究に取り組んだ。心筋における収縮の基本単位はサルコメア (~2.0  $\mu\text{m}$ ) と呼ばれる分子集合体であり、この長さが~0.1  $\mu\text{m}$  変化しただけでも心臓のポンプ機能に非常に大きな影響を与える。したがって、サルコメア長とポンプ機能との関係を探ることは心臓の機能を探る上で最重要課題の一つである。我々は、GFPを*in vivo*心臓に応用し、培養細胞ならびに生きたマウスにおいてサルコメアの長さをnmの精度で測定する新たなシステムを構築することに成功し、この手法をサルコメア長ナノメトリー (*SL nanometry*) と命名した (学術論文: 1)。

### 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)周辺において細胞膜の電気的興奮が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の局所の上昇を惹起し、 $\text{Ca}^{2+}$ 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。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100 nm以上の変化を対象としたものであった。我々の班では、心筋細胞内ナノ領域でのイオン動態や分子の挙動を*in vivo*において高時間・空間分解能で可視化し、心臓拍動リズム調節機構やそのリズム破綻、特に突然死に至る病態メカニズムを探ることを目的としている。従来の医学生物学的アプローチでは不可能であった心疾患病態やその程度を分子科学に基づいて定義し、心臓研究に独創的な新しい研究分野を創成することを目指している。

本研究では、mmレベルの動きをとも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駆使することによって、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。

### 3. 成果

本年度のハイライト: “Cardiac Nano-physiology” について、細胞および個体のレベルにおいて研究を行った。その結果、我々は、心筋細胞内のサルコメア長 (~2.0  $\mu\text{m}$ ) を高空間 (3 nm)・時間 (50 fps) 分解能で計測する技術を開発することに成功した (SL nanometry)。また、SL nanometry を生きているマウスに適用し、従来の方法では不可能であった心臓拍動中の心筋細胞内サルコメアの動きや収縮のトリガーとなっている  $\text{Ca}^{2+}$  の拡散を捉えることに世界で初めて成功した。以下、これらの成果の詳細を記す。

(I) 心筋細胞実験: ラットの幼若心筋細胞の Z 線に GFP を発現させ、心筋細胞内のサルコメアについて詳細な解析を行った。サルコメア長変化の測定精度は、3 nm (カメラ速度: 50 fps) であった。これは、世界最高のサルコメア長計測精度であり、拍動中の個々の単一サルコメアの解析を可能にする技術である (SL nanometry: 論文 1)。この系を応用して、心不全治療薬 (omecamtiv mecarbil: OM) の薬効評価を試みた。OM を加えると cell-SPOC 時のサルコメアの動きがダイナミックになり、アクトミオシン活性が上昇していることが示された。すなわち、我々が開発した幼若心筋細胞の実験ならびに計測システムは、薬理学の評価系としても優れていると考えられる。また、SL nanometry を赤外 (IR) レーザー (波長: 1455 nm) による熱刺激法と組み合わせ、体温よりもわずかに  $\sim 1^\circ\text{C}$  高い条件において高速 ( $\sim 10\text{ Hz}$ ) のサルコメア振動 (HSOs) が惹起されることを見出した (論文 4)。HSOs は *in vivo* 心臓において不整脈の発生に関与している可能性がある。

(II) In vivo マウス実験: 小動物 *in vivo* 心臓において、心筋細胞内のナノ分子情報を抽出できる新たな顕微システムを構築した。すなわち、マウス *in vivo* 心臓において、サルコメアの動きや (収縮のトリガーとして働いている)  $\text{Ca}^{2+}$  の動きを高空間 (10 nm)・時間 (100 fps) 分解能で捉えることに世界で初めて成功した (論文投稿中)。In vivo 心筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  拡散については、新たな解析法を独自に開発した。また、代表的な心疾患である拡張型心筋症と肥大型心筋症について検討し、静脈環流量が多ければ多いほど一回拍出量が多くなるという Frank-Starling 機構がサルコメアの細いフィラメント (アクチンフィラメント) の “on-off” 平衡に依存して変化することを報告した (論文 2)。

(III) iPS 由来心筋細胞を用いた研究: マウス iPS 細胞を分化誘導し、拍動する iPS 心筋を得ることに成功した。これらの細胞には筋原線維が形成されており、サルコメア長は約  $\sim 2.0\ \mu\text{m}$  であった (論文作成中)。現在、iPS 心筋細胞を効率よく精製し、マウス心臓に移植、その機能を *in vivo* ナノ計測によって詳細に検討する手法を開発中である。

(IV) 熱負荷による心筋刺激: 我々は、生体ラットから単離した心筋細胞の温度を  $36^\circ\text{C}$  から数  $^\circ\text{C}$  上昇させると、加熱中に筋収縮が生じることを報告している (BBRC 2012)。本年度、上述した *in vivo* 心筋イメージングの実験系に本手法を応用し、拍動している心臓においても加熱によって心筋細胞の収縮が増強することが示された (論文作成中)。

## Nano-imaging of molecular functions in cardiac muscle

Norio Fukuda

Fuyu Kobirumaki-Shimozawa

Kotaro Oyama\*

*Department of Cell Physiology, the Jikei University School of Medicine, Japan*

*\*Department of Physics, Waseda University, Japan*

We conducted cardiac nano-physiology studies under various conditions.

First, a change in myocardial length dramatically changes the heart's pump functions on a beat-to-beat basis (i.e., the Frank-Starling mechanism of the heart). Given, therefore, the importance of accurate measurement of sarcomere length in cardiomyocytes, we developed a novel experimental system for simultaneous nano-scale analysis of single sarcomere dynamics and  $[Ca^{2+}]_i$  changes via the expression of AcGFP in Z-discs in neonatal cardiomyocytes of the rat [i.e., sarcomere length (SL) nanometry]. We then investigated the effects of infra-red laser irradiation on sarcomere dynamics in living neonatal cardiomyocytes of the rat. A rapid increase in temperature to  $>38^{\circ}C$  induced  $[Ca^{2+}]_i$ -independent high-frequency ( $\sim 5$ – $\sim 10$  Hz) sarcomeric auto-oscillations (Hyperthermal Sarcomeric Oscillations; HSOs). In myocytes with the intact sarcoplasmic reticular functions, HSOs coexisted with  $[Ca^{2+}]_i$ -dependent spontaneous beating in the same sarcomeres, with markedly varying frequencies ( $\sim 10$  and  $\sim 1$  Hz for the former and latter, respectively). The present findings suggest that in the mammalian heart, sarcomeres spontaneously oscillate at higher frequencies than the sinus rhythm at temperatures slightly above the physiologically relevant levels.

Second, we developed a high-speed (100 fps) high-resolution (20 nm) imaging system for myocardial sarcomeres in living mice. Using this system, we conducted three-dimensional analysis of sarcomere dynamics during the cardiac cycle, simultaneously with electrocardiogram and left ventricular pressure measurements. We found that (1) the working range of sarcomere length ( $1.90 \pm 0.06$  and  $1.68 \pm 0.06$   $\mu m$  in diastole and systole, respectively) existed on the shorter resting distribution side and (2) the left ventricular developed pressure was linearly correlated with the sarcomere length change between diastole and systole on the order of 100 nm. The present experimental system has a broad range of application possibilities for unveiling sarcomere dynamics in cardiomyocytes *in vivo* in health and disease.

Third, recent advances in muscle physiology have enabled identification of the factors involved in length-dependent activation, viz., titin (connectin)-based interfilament lattice spacing reduction and thin filament “on-off” regulation, with the former triggering length-dependent activation and the latter determining the fraction of myosin molecules recruited to thin filaments. We found that various mutations occur in the thin filament regulatory proteins, such as troponin, in the ventricular muscle of failing hearts, which consequently alter the Frank-Starling mechanism.

## A01 班 (ウ)

### 業績リスト

#### 学術論文

- (1) Shintani SA, Oyama K, Kobirumaki-Shimozawa F, Ohki T, Ishiwata S, Fukuda N. Sarcomere length nanometry in rat neonatal cardiomyocytes expressed with  $\alpha$ -actinin-AcGFP in Z-discs. *Journal of General Physiology* **143**, 513-524, (2014).
- (2) Kobirumaki-Shimozawa F, Inoue T, Shintani SA, Oyama K, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *Journal of Physiological Sciences* **64**, 221-232, (2014).
- (3) Udaka J, Fukuda N, Yamauchi H, Marumo K. Clinical definition and diagnostic criteria for sarcopenia. *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* **3**, 347-352, (2014).
- (4) Shintani SA, Oyama K, Fukuda N, Ishiwata S. High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **457**, 165-170, (2015).

#### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

##### ・主な招待講演

- (1) 福田紀男. “Real-time imaging of single sarcomeres in the mouse heart *in vivo*”. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (2014年1月、名古屋大学).
- (2) 福田紀男. 「高精度分子イメージングを用いた心臓拍動メカニズムの解析」 革新的分子イメージングで拓く医学新領域 (2014年4月、東京工業大学) .

##### ・シンポジウム

- (1) 大山廣太郎、新谷正嶺、伊藤秀城、石井秀弥、福田紀男、鈴木団、石渡信一. 「局所熱パルス法を用いて細胞の温度感受性を解明する」 第91回日本生理学会大会. 鹿児島. 2014年3月 (シンポジウム)

##### ・学会シンポジウム企画

- (1) 第91回日本生物物理学会大会. 他学会連携シンポジウム (日本生物物理学会) . タイトル: 熱による細胞機能の調節 (Modulation of cellular functions by heat) .オーガナイザー: 福田紀男 (慈恵医大・細胞生理)、石渡信一 (早大・理工) 鹿児島. 2014年3月.

## 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

細胞内の任意の場所にナノ粒子を輸送する際、細胞膜の透過およびエンドソームは障害となる。まず、イメージング性能の向上を目指し、多数の量子ドット(QD)を一つの2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーナノ粒子に内包する手法を確立し、高輝度化を実現した。さらに表面に結合させるオリゴペプチドの種類と組成を変化させることで、細胞内器官への分布を調節する試みを行った(図1)。一方、細胞内における特定の反応を追跡する目的で、分子ビーコン(MB)を細胞親和型水溶性・両親媒性ポリマーに結合させて、細胞内への分子拡散による導入を達成した(図2)。さらに、新たに細胞を化学反応容器として考え、この反応の促進を目指して、細胞内磁気攪拌子の創製をおこなった。

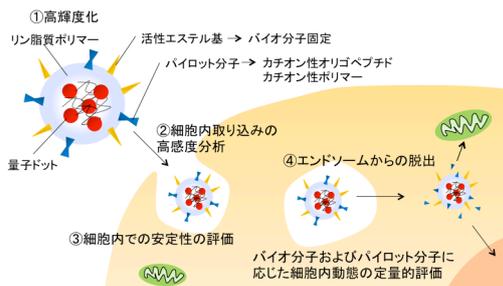


図1. 細胞内取り込みと輸送過程を対象としたナノ粒子の創製

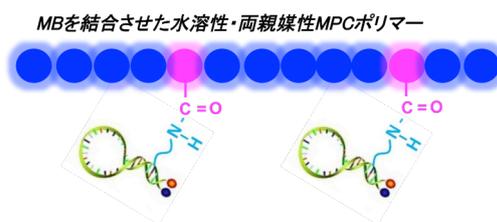


図2. 水溶性両親媒性 MPC ポリマーに MB を結合した分子捕捉キャリアーの構造

### 2. 研究の背景と目的

超音波照射が QD 内包 MPC ポリマーナノ粒子の蛍光量子収率に与える影響を評価することにより QD 内包 MPC ポリマーナノ粒子の高輝度化を目指した。また、蛍光イメージングツールを細胞内の任意の場所に輸送する際、細胞膜の透過およびエンドソームは障害となる。そこで、カチオン性ペプチドおよびカチオン性ポリマーを用い、その特性に応じた QD 内包 MPC ポリマーナノ粒子の細胞内動態を定量的に解析することによって、QD 内包 MPC ポリマーナノ粒子の選択的な細胞内輸送を目的とした。また、水溶性両親媒性 MPC ポリマーに MB を結合した分子捕捉キャリアーを合成し、細胞内への拡散現象による取り込みと、細胞内での mRNA の選択的捕捉特性に対するポリマー分子構造の影響について評価した。さらに、細胞親和性を有し、遠隔的に外部磁場に応答する細胞内磁気攪拌子の創製を目的とする。具体的には、酸化鉄ナノ粒子内包型リン脂質ポリマー被覆異形ナノ粒子を設計した。超常磁性を有する酸化鉄ナノ粒子をデバイス

## A02 班 (エ)

内に内包させることで、外部磁場による回転特性を獲得させる。特に、物理的な作用による攪拌効率を向上させるため、粒子形状を異形とする。また、細胞膜構造を模倣したリン脂質ポリマーおよびカチオン性分子により表面改質を行うことで、相反する細胞親和性および細胞内移行性をデバイスに兼備させる。このようなナノデバイスの回転運動を解析することで、化学的パラメーターとして細胞内の粘性を定量的に導出することができる。さらには、この物理的な攪拌により細胞内化学反応に関する分子のダイナミクスを制御することで、細胞機能を劇的に変化させることも可能となる。

### 3. 成果

1) 活性エステル基を有する MPC ポリマーで QD を被覆したナノ粒子 (PMBN/PLA/QD) を作製した。さらに、その作製条件の検討により高輝度化を実現した。

2) 水溶性両親媒性 MPC ポリマーに MB を結合した分子捕捉キャリアーを設計、創製した。MB 部位はポリマーの側鎖に結合させ、標的分子に認識能と捕捉特性を確保している。細胞内取り込みおよび細胞内 GAPDHmRNA に対して効果的に機能することが認められた。これを利用して、MB の種類を変化させ、細胞内での分子反応生成物である mRNA の解析を行う。

3) 細胞親和性を有し、外部磁場に応答する細胞内磁気攪拌子の創製を行った。スチレン (St) 油滴中に酸化鉄ナノ粒子を分散させた後にミニエマルジョン重合を行うことで、真球形の酸化鉄ナノ粒子内包型ポリスチレン (PSt) 粒子を得た。得られた磁性コア粒子を含む poly(vinyl alcohol) (PVA) フィルムを作製し、PSt および PVA のガラス転移温度以上で加熱・延伸することで、磁性コア粒子の形状に異方性を与えた。作製した磁性コア粒子の形状を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し、画像解析によりアスペクト比を算出した。また、磁気ピンセットを用いて、作製した異形磁性コア粒子の回転特性を評価した。ミニエマルジョン重合を用いて作製した真球形の磁性コア粒子 (粒径: 130 nm) は、物理的延伸を行うことで長軸が約 210 nm に伸長し、短軸は約 100 nm に減少した。物理的延伸法により、球形粒子に形状の異方性を与えることができた。磁気ピンセットを用いた回転磁場の印加により、作製した異形磁性コア粒子は水中において回転運動を示した。すなわち、世界最小の磁気攪拌子の創製に成功した。粒子の回転速度は外部磁場の回転速度を 5Hz, 2Hz と変化させるとその回転に追従し、ほぼ一致したことから、作製した異形磁性ナノ粒子は良好な磁気応答性を有することがわかった。

さらに、表面処理を行い、細胞親和性と細胞内送達特性を与えるマテリアルプロセスを実施している。

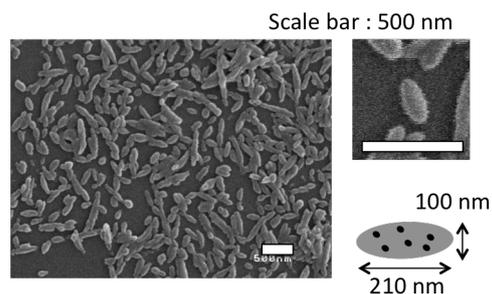


図 3. 細胞内での攪拌を目指した磁気攪拌子

## **Transport nanodevice immobilized specific biomolecules**

Kazuhiko Ishihara

Yuuki Inoue

*Department of Materials Engineering, The University of Tokyo, Japan*

To obtain a stable and highly sensitive bioimaging fluorescence probe, polymer nanoprobe were prepared using biocompatible phospholipid polymer. We have found that the polymeric nanoparticles embedding quantum dots (QDs) covered with phospholipid polymers showed resistance to cellular uptake from HeLa cells. On the other hand, when an arginine octapeptide (R8), which was one of the cell penetrating peptide, was immobilized at the surface of the nanoparticles, they could penetrate the membrane of HeLa cells effectively. In this study, we investigate effect of oligopeptide on internalization and transportation of the nanoparticle into cells.

We prepared new type of nanoprobe by conjugating between the water-soluble and amphiphilic phospholipid polymer with molecular beacon (MB). We conclude that the MPC polymer-MBs nanoprobe will promote the development of noninvasive monitoring intracellular biomolecules and bio-reaction, can be used to deepen our understanding of basic cellular processes, and could also be applied toward the early detection, accurate clinical diagnosis, and effective treatment of diseases in the future.

Active control of cellular circumstances will be the key technology for progressing cell engineering. To achieve this, we consider the control of chemical reactions in cells by using an intracellular magnetic stirring device. It is consisted of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -encapsulated anisotropic polymer nanoparticles covered with phospholipid polymers. This is a new intracellular device, which rotates in cells and enables the direct analysis of intracellular circumstances and control of cell functions. In this paper, we report the fabrication of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -encapsulated anisotropic polymer nanoparticles by the conventional suspension polymerization and the following processing with thermal treatment and the suitable surface modification for the use in cells.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -encapsulated polystyrene (PSt) spherical nanoparticles were successfully prepared by the soap-free polymerization. The diameter measured by dynamic light scattering was about 150 nm and a neodymium magnet could collect it. The physical anisotropy was given to the nanoparticles by stretching the nanoparticles-embedded poly(vinyl alcohol) (PVA) film at 160°C which is above the glass transition temperature of PSt (102°C) and PVA (85°C). After the physical stretch, the major axis was enlarged to about 330 nm and the minor axis was shortened to about 130 nm. The nanoparticle could rotate by alternative magnetic fields. That is world most small magnetic stirrer has been obtained. Next, we are now modifying the surface of the polymer nanoparticle to internalize into cells and rotating in the cells.

## A02 班 (エ)

### 業績リスト

#### 学術論文

1. J. Choi, T. Konno, K. Ishihara, Phospholipid polymer multilayered hydrogels for releasing cell growth factor protein, *Biomaterials & Biomedical Engineering*, 1(1), 1-12 (2014)
2. T. Goda, P. Kjall, K. Ishihara, A. Richter-Dahlfors, Y. Miyahara, Biomimetic interfaces reveal activation dynamics of C-reactive protein in local microenvironments, *Adv Healthcare Mater*, 3(11), 1733-1738 (2014)
3. S. Chantasirichot, Y. Inoue, K. Ishihara, Amphiphilic triblock phospholipid copolymers bearing phenylboronic acid groups for spontaneous formation of hydrogels with tunable mechanical properties, *Macromolecules*, 47(9), 3128-3135 (2014)
4. H-I. Kim, K. Ishihara, Phospholipid polymer modification can reduce cytotoxicity of poly(lactic acid) nanoparticles, *Biomaterials & Biomedical Engineering*, 1(2), 83-92 (2014)
5. X. Lin, K. Ishihara, Water-soluble polymers bearing phosphorylcholine group and other zwitterionic groups for carrying DNA derivatives, *J Biomater Sci Polym Edn*, 25(14-15), 1461-1478 (2014)
6. N. Machida, Y. Inoue, K. Ishihara, Phospholipid polymer-covered magnetic nanoparticles for tracking intracellular molecular reaction, *Trans Mat Res Soc Japan*, 39(4), 185-188 (2014)
7. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara, Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for encapsulation to provide unified quality cells, *Trans Mat Res Soc Japan*, 39(3), 279-282 (2014)

#### 総説・解説・成書

1. K. Ishihara, H. Oda, T. Aikawa, T. Konno, Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering, *Macro Sympo*, in press (2014)

#### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 日本経済新聞「ES 細胞の保管ゲルで冷却不要」2014年11月18日（新聞報道）
2. 小田悠加、金野智浩、石原一彦、日本バイオマテリアル学会第36回大会ハイライト講演 2014年11月18日（受賞）
3. 小田悠加（石原研究室）International Polymer Conference (IPC) 2014 IPC 2014 Young Scientist Poster Award 2014年12月5日（受賞）
4. 吉江健介（石原研究室）日本MRS学会 若手研究奨励賞 2015年1月19日（受賞）
5. K. Ishihara, Y. Inoue Bioinspired fabrication of artificial cell membrane with phospholipid polymer and biomolecules for nanomedicine molecular science, Japan-China Nanomedicine Symposium, Hiroshima, May 16, 2014 (Plenary Lecture)
6. K. Ishihara, Nanomedicine molecular science using phospholipid polymer biomaterials, 日中韓フォーサイト事業 国際シンポジウム, 東京, October 8, 2014 (Plenary Lecture)
7. K. Ishihara, Y. Tsukamoto, Y. Inoue, Bioinspired and cytocompatible phospholipid polymer nanoparticles, 7th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, Ha Long City, Vietnam, November 4, 2014 (Plenary Lecture)
8. K. Ishihara, Reversible forming/dissociating artificial extracellular matrices for cellular engineering, 7th World Congress of Preventive and Regenerative Medicine, Taipei, Taiwan, November 6, 2014 (Plenary Lecture)
9. K. Ishihara, Nanomedicine Molecular Science based on the Phospholipid Polymer Biomaterials, International Polymer Conference (IPC) 2014, December 2, 2014 (Invited Lecture)

## 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 新岡宏彦  
分担研究者：大阪大学基礎工学研究科 田中信行  
分担研究者：北九州市立大学環境生命工学科 木原隆典

### 1. 研究の概要

極微小探針を用いて生細胞内における細胞骨格の直接的検出技術の開発を行った。レーザーアブレーションを用いて細胞膜穿孔を行なった際の穿孔サイズと細胞表面の硬さとの相関について研究を行った。また、CRP2 によるアクチン繊維の構造制御および新規イメージングプローブの研究を行った。

### 2. 研究の背景と目的

疾病を分子反応の統合として理解し、それを解決する技術系の構築には、細胞を反応場とした分子反応の統合的理解あるいは高次の体系化が欠かせない。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等に影響を与える高分子環境を明らかにし、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、これを簡易な形で定式化し、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を行うことは困難である。そのため、実際の細胞内環境下における分子動態・分子反応を解析可能な実験系の構築と、それを簡略的にも再現可能なモデルを構築することが出来れば、細胞内分子反応研究の重要なプラットフォームになると考えられる。

本研究は、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、それを用いた細胞内における分子反応および細胞骨格弾性の定量解析、新規の高分解能細胞イメージング手法の開発を行うことで、広く細胞内における分子動態・反応解析のプラットフォームの構築を目指す。

### 3. 成果

#### (1) レーザーアブレーションを用いた細胞膜硬さ計測

細胞膜にフェムト秒パルスレーザーを集光するとアブレーションにより膜の一時的な細胞膜穿孔を引き起こすことが可能である。先行研究より細胞膜の力学特性の大部分を担っているアクチン骨格は細胞膜損傷時の修復過程(孔のサイズや修復速度)に寄与していることが報告されている。従って、細胞膜の力学特性を示す指標として細胞膜穿孔中の最大直径:  $D_0$  を定義し計測を行なった。HeLa 細胞はTIG-1 細胞を用いて  $D_0$  を計測したところ、HeLa細胞は TIG-1細胞に比べ有意に大きな孔が形成されるという結果が得られた ( $n = 50$ ,  $P < 0.05$ )。AFMによりHeLa細胞とTIG-1細胞表面のヤング率測定を行な

## A02 班 (オ)

ったところ、TIG-1細胞の方が強度の高い繊維が細胞表面に現れており高いヤング率を示した。さらに、各種細胞において、Cytochalasin-Dによりアクチン重合阻害を行なったところ、孔の拡大傾向が確認された。以上のことから、レーザー照射時の細胞膜挙動にはアクチン骨格が寄与することが示唆され、アクチン骨格の形成度合いにより細胞膜挙動の変化が見られたといえる。レーザーを用いることにより、従来の細胞力学特性計測手法では不可能であった、組織やゲル内部の細胞計測へ応用可能であると考ええる。

### (2) CRP2 によるアクチン繊維の構造制御

アクチン繊維は細胞骨格として細胞形態制御に働くと共に、細胞運動や筋収縮に働く。平滑筋細胞に特異的に発現する転写因子 CRP2 (cysteine and glycine rich protein 2) は、アクチン繊維に結合することでアクチン繊維の機能に作用を及ぼすと考えられている。そこで、CRP2 によってアクチン繊維の物理的な特性がどのように変化し、それによって細胞内の物理環境どのような影響を受けるか検討を行った。X線小角散乱解析より、CRP2 はアクチン繊維の周囲にほぼ 1:1 で結合し、アクチン繊維のみかけの断面直径を増大させた。特にアクチン繊維に CRP2 が 1:1 で最大量結合する場合の断面慣性半径はおよそ 1.7 倍になると推測された。また、CRP2 はアクチン繊維に結合することで、 $\alpha$ -actinin と同様に繊維のバンドル化に寄与することが明らかとなった。さらに、CRP2 を過剰発現させた平滑筋細胞の機械特性を調べたところ、細胞表面のヤング率が上昇が確認された。また、CRP2 によって細胞内でアクチン繊維の脱重合が抑制されることも見出された。CRP2 とコフィリンの結合を調べたところ、両者が相互作用することも明らかとなった。さらに、CRP2 の類縁タンパク質である CRP1, CRP3 もアクチン繊維と結合し、繊維のバンドル化を促すことが確認できた。以上より、CRP2 および CRP タンパク質ファミリーは筋細胞内でアクチン繊維/筋繊維に結合し、繊維のバンドル化や安定化に寄与することで筋細胞内の物理的な環境に影響を及ぼすと考えられる。

### (3) 新規バイモーダル(高分解能/近赤外光イメージング)プローブの開発

電子線励起及び近赤外光励起によって発光を呈するイメージングプローブの開発を行なった。電子線励起によって誘起される発光をカソードルミネッセンス(CL)といい、励起源に電子線を用いるためナノメートルレベルの高分解能イメージングが可能となる。また、近赤外光は生体分子による散乱や吸収が少なく、細胞組織深部にまで到達するため、in vivoイメージングに適している。電子線励起においても紫外光励起においてもそれぞれ青、緑、赤色に発光する希土類添加 $Y_2O_3$ 蛍光体ナノ粒子( $Y_2O_3:TmYb$ ,  $Y_2O_3:HoYb$ ,  $Y_2O_3:ErYb$ )の作製を行ない、また、それらの蛍光体を用いて細胞のCLおよび近赤外光イメージングが可能である事を示した。CLイメージングでは粒径50 nmのナノ粒子イメージングに成功し、空間分解能は10 nm以下であった。CLスペクトルが各ナノ粒子によって異なるため、電子顕微鏡画像を蛍光顕微鏡画像のようにカラーにすることができると考える。また、 $Y_2O_3:TmYb$ ナノ粒子を細胞シートに導入し、光散乱特性がヒト皮膚と同様である脂質懸濁液を通して観察したところ、懸濁液の厚さが3 mmの場合でも細胞シート観察が可能であった。本蛍光体ナノ粒子を用いて、CL顕微鏡によるナノイメージングから、マウス等の小動物の深部イメージングまでを一つの蛍光体で実現する事が可能であると考ええる。

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

Jun Miyake<sup>1</sup>, Hirohiko Niioka<sup>1</sup>, Nobuyuki Tanaka<sup>1</sup>, Takanori Kihara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Engineering Science, Osaka University, Japan*

<sup>2</sup>*Department of Life and Environment Engineering, The University of Kitakyushu, Japan*

In living cells, there are many large 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 about 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 aimed to analyze the macromolecular dynamics, simulate physical structures, and finally discuss the dynamic molecular reactions in cells. Particularly by developing a nanoprobe for intracellular macromolecules, we intended to quantitatively measure macromolecular dynamics and reactions inside cells. Our research will be a platform for better achievements in nanomedicine molecular science.

### (1) measurement of cellular membrane stiffness by using laser ablation

When femto-second pulsed laser is focused on cellular membrane, transient pore is formed by laser-induced ablation. Cells have membrane-resealing process and it is reported that actin filaments are related to the process and cellular stiffness. We defined  $D_{\phi}$  as the size of pore to measure the stiffness.  $D_{\phi}$  of HeLa cells were larger than that of TIG-1 cells ( $n = 50$ ,  $P < 0.05$ ) and AFM results show HeLa cells are softer than TIG-1 cells. These two types of cells were measured with laser ablation method and AFM after a treatment with cytochalasin-D that constricts polymerization of actin filament. Results show the treated cells tended to exhibit larger  $D_{\phi}$  than those of non-treated cells. As a conclusion, softer cells tend to show larger  $D_{\phi}$  and cellular mechanical property can be evaluated by the laser-induced ablation method.

### (2) CRP2 regulates actin filament structure

CRP2 (cysteine rich protein 2) is a smooth muscle specific LIM protein. CRP2 works as a transcription cofactor of SRF (serum response factor) in nucleus and binds with actin filaments in cytoplasm. In this year, we have examined the physical effects of CRP2 on actin filaments in vivo and in vitro. From small angle X-ray scattering analysis, cross sectional radius of gyration of CRP2 bound actin filaments increased about 1.7-fold as compared with that of actin filaments. CRP2 bundled actin filaments and CRP2 over expressing-smooth muscle cells showed higher cell surface rigidity. Furthermore, other CRP family, CRP1 and CRP3, also bound with and bundled actin filaments. Thus, we assume that CRP family regulates physical properties in muscle cells by contribution of actin filaments bundling and stability.

### (3) Development of bimodal (high-spatial-resolution/near-infrared light imaging) nano-probes

We propose new imaging nano-probes that emit light under both near-infrared (NIR) light and electron-beam excitation, where light emission under electron beam excitation is called cathodoluminescence (CL). Due to electron beam excitation, the spatial resolution of CL microscopy is on the order of nanometers. NIR light allows us to image deep tissue region because NIR light is insensitive to absorption, scattering, and autofluorescence.  $Y_2O_3:Tm, Yb$ ,  $Y_2O_3:Ho, Yb$ ,  $Y_2O_3:Er, Yb$  nano-probes emit light around 800 nm, 1200 nm, 1530 nm respectively under 980 nm excitation. CL imaging of each nano-probe shows nm order high-spatial-resolution. The phosphors described here will allow the realization of new imaging method covering the nanometer to millimeter scale, i.e., the molecular to in vivo scale.

## A02 班 (オ)

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Onuki-Nagasaki R, Nagasaki A, Hakamada K, Uyeda T, Miyake M, Miyake J, Fujita S.  
“Identification of kinases and regulatory proteins required for cell migration using a transfected cell-microarray system,”  
BMC Genet., **16**, 9, 2015
2. S. Fukushima, T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, J. Miyake, M. Ashida, T. Araki and M. Hashimoto,  
“Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Tm,Yb Nanophosphors for Correlative Upconversion Luminescence and Cathodoluminescence Imaging,”  
Micron, **67**, 90-95, 2014.
3. N. Tanaka, H. Ota, K. Fukumori, J. Miyake, M. Yamato, T. Okano,  
"Micro-patterned cell-sheets fabricated with stamping-force-controlled micro-contact printing,"  
Biomaterials, **35**, 9802-9810, 2014.
4. Sun Q, Chen M, Miyake J, Qian DJ.  
“Fabrication and characterization for the nanoconjugates of pyridyldithio-functionalized multiwalled carbon nanotubes and cytochrome c in Langmuir-Blodgett films,”  
J Nanosci Nanotechnol. **7**, 5468-5472. 2014.
5. Han, S.W., Morita, K., Simona, P., Kihara, T., Miyake, J., Banu, M., Adachi, T.,  
“Probing Actin Filament and Binding Protein Interaction Using an Atomic Force Microscopy,”  
J. Nanosci. Nanotech. **14**, 5654-5657, 2014.
6. Han SW, Nakamura C, Miyake J, Chang SM, Adachi T.,  
“Single-cell manipulation and DNA delivery technology using atomic force microscopy and nanoneedle,”  
J Nanosci Nanotechnol. **14**, 57-70, 2014.

#### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

##### 受賞

1. 新岡宏彦 平成 26 年度 第八回風戸研究奨励賞  
「光・電子相関顕微鏡法のためのプローブ開発と細胞イメージング応用」

##### 招待講演

2. Jun Miyake, Knowledge of the Asian next generation, Japan-Korea Bilateral Joint Seminar: Cross-Boundary Cancer Studies Toward the Cancer Cure in Asia  
February 21-22, 2014, Yonsei University, Seoul, Korea
3. 田中信行、「バイオユーザーフレンドリーな流体活用システム」、横浜市立大学 学内セミナー、2015 年 3 月 18 日
4. 田中信行、「表面張力顕微鏡の創成と幹細胞マーカー解析への応用 -液体親和性を可視化する-」、株式会社池田理化主催 再生医療分野 若手研究者交流会、2015 年 1 月 31 日
5. Jun Miyake, Takanori Kihara, Hirohiko Niioka, Chikashi Nakamura, Nanoprobes for measuring the molecular dynamics in living cells  
The 6th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, January 8-9, 2015, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
6. 三宅 淳、細胞場における RNA の動態解析・遺伝子発現の制御システムの解析、細胞核内反応の分子科学、分子科学研究所、2014 年 9 月 27 日

## A02 班 (オ)

7. 田中信行、「流体を活用したバイオメディカルインタフェース」、日本機械学会東海学生会主催 第 201 回講演会、鈴鹿工業高等専門学校、2014 年 11 月 13 日
8. 田中信行、「流体を活用した再生医療支援技術」、第 5 回次世代医療システム産業化フォーラム 2014, 大阪商工会議所, 2014 年 11 月 10 日
9. 田中信行、「界面制御を利用したバイオメディカルユーザインタフェース」、BioMecForum 第 74 回研究会、大阪大学、2014 年 7 月 5 日
10. 木原隆典 「細胞によって形成される石灰化組織とその利用」 地域連携による「ものづくり」継承支援人材育成協働プロジェクト特別講演会 (2015)

### 活動

11. 木原隆典 「振動する化学反応と生命」 北九州市立大学国際環境工学部オープンキャンパスにてナノメディシン分子科学の内容を含む実演・解説を行った。(2014.11.9)
12. 木原隆典 「細胞内の染色体を観察する」 北九州市立大学国際環境工学部オープンキャンパスにてナノメディシン分子科学の内容を含む実習を行った。(2014.7.12-13)

## 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：東京工業大学大学院生命理工研究科 丸山 厚  
 分担研究者：東京工業大学大学院生命理工研究科 嶋田直彦

## 1. 研究の概要

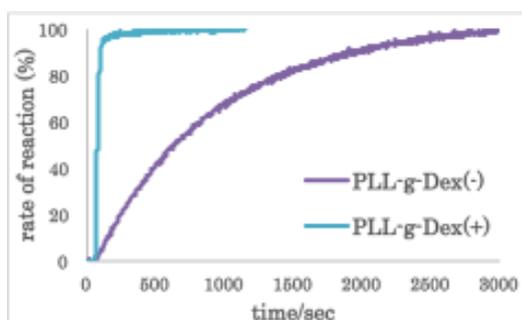
メッセンジャー-RNA や microRNA などの細胞内の核酸をイメージングする手法の実現は、生体内に多種多様に存在する細胞の機能発現を理解するために有用である。また、それらを標的とした医薬により、細胞機能の調節も可能となる。RNA 分解活性を持つ核酸酵素、DNAzyme、の遺伝子発現制御や遺伝子解析への応用が期待されている。我々はこれまでに核酸間ハイブリダイゼーションを促す高分子材料を実現した。本研究では、高分子材料により DNAzyme の活性を高められる事を明らかにした。

## 2. 研究の背景と目的

配列特異的な RNA 切断活性をもつ DNAzyme は、その特徴から様々な生物工学的応用が期待されており、特定の配列の核酸存在下でのみ DNAzyme 活性を発現する multicomponent deoxyribozyme (MNAzyme)を用いたウイルス核酸の検出法も提案されている[1]。しかし、DNAzyme は一般にターンオーバー効率が低く、その改善が必要と考えられる。ターンオーバー効率を高めるためには、切断された核酸断片の DNAzyme からの解離と DNAzyme への基質核酸の結合を促す必要がある。我々は、カチオン性グラフト共重合体である Poly(L-lysine)-graft-dextran (PLL-g-Dex)が、DNA と静電的相互作用し、核酸間の静電反発を軽減し、核酸のハイブリダイゼーションを促進することを報告してきた[2]。そこで、PLL-g-Dex の添加により、DNAzyme のターンオーバー速度が向上し、それに伴う反応速度の向上が見込まれるのではないかと考えた。一方、核酸間のハイブリッド形成を高める上では、核酸の濃度を高める工夫も有効であると考えられる。我々はカチオン性基を有する poly(allylamine)-co-(allylurea) (PAU) が生理的条件下で、液滴状のコアセルベートを形成することを報告してきた[3]。PAU を加えることで、核酸と PAU の静電相互作用により核酸をコアセルベートに濃縮し、DNAzyme 反応の速度向上が可能になると考えた。そこで、以上の 2 種類のカチオン性高分子について DNAzyme 反応に対する効果を検討した。

## 3. 成果

図 1 に PLL-g-Dex を加えた際の基質と



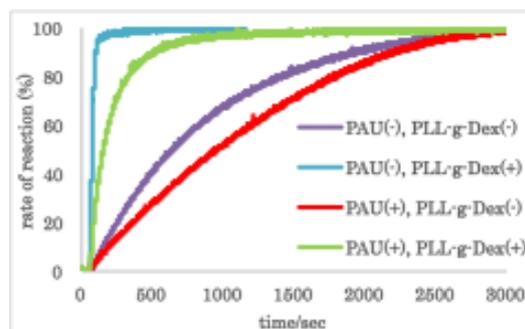
**Fig. 1** Effect of PLL-g-Dex(N/P=2) on DNAzyme reaction at 50°C in HEPES buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.3), [substrate] = 50

## A02 班 (カ)

DNAzyme の反応結果を示す。PLL-g-Dex の添加により反応速度が著しく上昇したことがわかる。これは、PLL-g-Dex がターンオーバー過程が促進されたためである。[4] 次に、PAU によるコアセルベート形成を利用した DNA の濃縮を検討した。PAU 非存在下において、視野全体が均一に明るくなっている様子が蛍光顕微鏡により観察された。一方で、PAU 存在下において、視野内に直径数 $\mu\text{m}$  程度の輝点が多数観察出来た。これは、蛍光修飾された DNA が静電相互作用により PAU と結合し、DNA をコアセルベート内に濃縮されたためであると考えられる。PAU 非存在下の蛍光強度に比べ、PAU の添加により輝点の蛍光強度が大きく上昇したことから、DNA の局所濃度を高められることがわかる。

以上の結果から、PAU、PLL-g-Dex を同時に添加することで、DNA の濃縮と DNAzyme 反応のターンオーバー効率が高められ、DNAzyme 反応の全体速度を相加的に高められると考えられた。PAU の添加による DNAzyme の反応速度の変化を測定した結果を図 2 に示す。PLL-g-Dex 非存在下において、PAU 存在下(赤線)と PAU 非存在下(黄線)を比較すると、PAU の添加により、反応速度が 0.7 倍に低下しており、PAU が DNAzyme の反応を阻害することがわかった。一方、PLL-g-Dex 存在下において、PAU 存在下(図 3 緑線)と PAU 非存在下(図青線)を比較すると、PAU 存在下の方が、0.2 倍に速度は低下しているものの、コントロール(黄線)に比べると、9 倍反応速度が向上していることがわかった。

以上の結果より、PLL-g-Dex は DNAzyme 反応を加速するのに対し、PAU は抑制することがわかった。一方、PAU 存在下でも PLL-g-Dex の加速効果が保持されることがわかった。PLL-g-Dex による DNAzyme の反応速度の向上、及び、PAU によるコアセルベート形成による DNA の濃縮により、DNA 検出への応用が考えられる。



**Fig. 2** Effect of PLL-g-Dex(N/P=2) and PAU(N/P=1000) on DNAzyme reaction at 50°C in HEPES buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.3), [substrate] = 50 nM, [DNAzyme] = 2 nM.

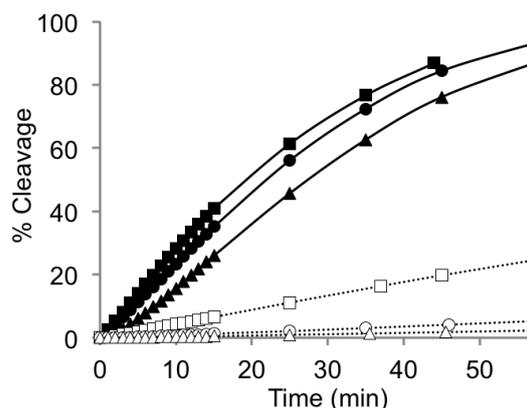
- [1] E.Mokany, S.M.Bone, P.E.Young, T.B.Doan, A.V.Todd, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1051-1059
- [2] L.Wu, N.Shimada, A.Kano, A.Maruyama, *Soft Matter*, 2008, **4**, 744-747
- [3] N.Shimada, H.Ino, K.Maie, M.Nakayama, A.Kano, A.Maruyama, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3418-3422.
- [4] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, 3, 308-316, (2015)

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

Atsushi Maruyama, Naohiko Shimada  
Dept. of Biomol. Engineering, Tokyo Inst. of Tech.

We previously reported that a cationic comb-type copolymer consisting of a polycationic backbone and hydrophilic graft chains of dextran promoted hybridization of a pair of complementary DNAs. The copolymer also facilitates the strand exchange reaction between double-stranded DNA and homologous single-stranded DNA. Recently, we showed that the copolymer considerably enhanced ribonuclease activity of the previously described 10-23 DNzyme. [1] Here, we evaluated the cationic copolymer in an MNzyme derived from the 10-23 DNzyme and increased MNzyme sensitivity. Furthermore, the copolymer enabled us to shorten the substrate-binding arms of the MNzyme, decreasing the optimum temperature of the MNA assay from 50 °C to physiological temperature.

Considerably higher cleavage activity was observed in the presence than in the absence of the PLL-g-Dex (Fig. 1), suggesting that the copolymer promoted turnover of the target. We then decreased the MNzyme concentration while holding initial substrate and target concentrations constant. At lower MNzyme concentrations we observed a significant decrease in MNzyme activity in the absence of the copolymer, but only a slight decrease in the activity was observed in the presence of copolymer. At 2 nM of each of the partzymes, the copolymer increased the cleavage rate by 50 fold relative to cleavage in the absence of copolymer.



**Fig. 1.** MNzyme A reactions at different MNzyme concentrations in the presence (filled symbols and solid lines) and absence (open symbols and dotted lines) of PLL-g-Dex. Squares indicate 200 nM MNzyme; circles indicate, 20 nM; triangles indicate 2 nM. Reactions were performed at 50°C in 25 mM MgSO<sub>4</sub> with 200 nM substrate, 2 nM target.

[1] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, 3, 308-316, (2015)

[2] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, MNzyme-catalysed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer, *Biomater. Sci.*, in press

## A02 班 (カ)

### 業績リスト

#### 学術論文

1. J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, MNzyme-catalysed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer, *Biomater. Sci.*, in press
2. K. Kawai, A. Maruyama, Triple helix conformation-specific blinking of Cy3 in DNA, *Chem. Commun.*, 51, 4861-4864 (2015)
3. J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, 3, 308-316, (2015)
4. N. Shimada, S. Kidoaki, A. Maruyama, Smart hydrogels exhibiting UCST-type volume changes under physiologically relevant conditions, *RSC Advances*, 4, 52346-52348, (2014)
5. N. Shimada, W. Song, A. Maruyama, DNA strand exchange reaction activated by cationic comb-type copolymers having ureido groups, *Biomater. Sci.*, 2, 1480-1485 (2014)
6. D. Miyoshi, Y. M. Ueda, N. Shimada, S. I. Nakano, N. Sugimoto, A. Maruyama, Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine comb-type copolymer with hydrophilic graft chain, *ChemMedChem.*, 9, 2156-63 (2014)
7. K. Kawai, T. Koshino, A. Maruyama, T. Majima, Blinking Triggered by The change in the solvent accessibility of a fluorescent molecule, *Chem. Commun.*, 50, 10478-81 (2014)
8. R. Arivazhagan, M. Endo, K. Hidaka, N. Shimada, A. Maruyama, H. Sugiyama, Lock-and-key mechanism for the controllable fabrication of DNA origami structures, *Chem. Commun.*, 50, 8743-6(2014)

#### 総説・解説・成書

1. J. Gao, A. Maruyama, Biohybrid, in *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Shiro Kobayashi, Klaus Muellen (eds.), Springer, in press
2. A. Bakhtiar, M. Sayyad, R. Rosli, A. Maruyama, E. H. Chowdhury, Intracellular delivery of potential therapeutic genes: prospects in cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 14, 247-57 (2014).

#### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 特許：嶋田直彦、丸山厚 「温度応答性細胞塊作製方法」 国内出願 特願 2014-228156 出願日：2014年11月10日
2. 招待講演, Polymer materials to control assembly and functions of biopolymers: DNA, peptide and lipid, The 2nd International Symposium on Polymer Ecomaterials PEM 2014, August 22-26, 2014, Kunming, China (他 10件)

## 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、がん患部に接続するセンチネルリンパ節の微小転移の有無を高確度で診断する技術の開発が重要となる。本年度は、X線吸収能と蛍光能を同時に保持するマルチモーダルナノ粒子の合成に着手し、担がんマウスを使ってX線と蛍光を用いたセンチネルリンパ節診断法の開発を試みた。マウスの後肢先端にがん細胞を移植した担がんマウスを作製した後、がん患部にマルチモーダルナノ粒子を注入し、センチネルリンパ節(膝窩リンパ節)のイメージングを行った。その結果、マルチモーダルナノ粒子によってX線と蛍光で同一の膝窩リンパ節をイメージングすること、またX線と蛍光のそれぞれの特長を活かしリンパ節のがん転移危険部位である輸入リンパ管流入部を高精度で特定すること、などに成功した。

### 2. 研究の背景と目的

がんは原発巣での増殖とそこからの転移を通じて症状が進む。転移は脈管(リンパ管、血管)を通して起こるが、リンパ行性転移は血行性転移よりも病初期段階において進行が観測されるため、がん転移早期診断の格好の指標となる。センチネルリンパ節はがん患部から最初にリンパ流を受けるリンパ節として定義されており、リンパ節転移の有無を調べる際の診断基準となる。センチネルリンパ節診断は乳がんや皮膚がんの診断において臨床応用されているが、リンパ節内のがん転移部位を正確に特定する技術に課題があった。通常、廓清、切除されたリンパ節は病理標本として、2-4 $\mu\text{m}$ 厚さの1ないし2枚の切片のスライドで作製され、転移の有無が検索される。成人のリンパ節の大きさは数cm程度であるため、リンパ節診断の標本として作製されたスライドはリンパ節の約1/10000程度の部分を見ているに過ぎない。よってリンパ節に転移があったとしても、ある程度の大きさに腫瘍が増殖しないと標本切片上にがん細胞が検出されず、見落とされる可能性がある。

本研究では、蛍光とX線のモダリティを応用し、センチネルリンパ節転移の有無を診断する高精度イメージング法を開発を目指している。薄切組織環境下の蛍光信号強度は蛍光物質質量と励起光出力に比例するため、蛍光イメージングは光透過性の高い微小組織条件では定量性に優れている。しかし個体レベルでは組織中の光の散乱や吸収の影響が大きくなり、定量的な解析が困難となる。一方、X線CTイメージングは厚みのある組織でもX線の透過性が高く、CT値は造影剤量に比例するため、定量性が高い。しかしX線CTでは蛍光のようにnmスケールの分解能を出すことはできず数十 $\mu\text{m}$ レベルが

## A03 班 (キ)

限界である。よって蛍光と X 線の両者の長所を融合すれば、分子から個体レベルまで高定量性のマルチモーダルイメージングが十分に可能である。本研究では「量子ドットをシリカ層で内包したナノ粒子」と「金ナノ粒子」を別々に合成し、これらを融合したマルチモーダルナノ粒子の開発を行い、高確度なセンチネルリンパ節診断法の開発を目指した。

### 3. 成果

本マルチモーダルナノ粒子の物性を評価した結果、合成の過程で量子ドットの蛍光能は減衰しておらず、金ナノ粒子は既存のヨード系造影剤よりも高い CT 値を有していたことから、動物イメージングに十分な蛍光能と X 線吸収能を保持していることが分かった。次に高い転移効率を持つリンパ節転移モデルマウスを作製した。この担がんマウスは、マウス後肢先端に注入したがん細胞が膝下の膝窩リンパ節に高効率・高再現性で転移するモデルである。本マルチモーダルナノ粒子をリンパ節転移の診断プローブに応用することを狙いとして、ナノ粒子を担がんマウスのがん部位に注入した結果、ナノ粒子はがん患部に接続するリンパ管を通過してリンパ節に移動し、蛍光と X 線 CT で同一の膝窩リンパ節(センチネルリンパ節)をイメージングすることに成功した。さらに X 線 CT 画像を詳細に解析した結果、ナノ粒子はリンパ節内で不均一に分布していることが分かった。この不均一性の詳細な解析を進めた結果、ナノ粒子は輸入リンパ管のリンパ節流入部に滞留していることが分かった。この部分は、がんが輸入リンパ管を通過して最初にリンパ節にたどり着く部位であるため、がんがリンパ節転移を開始する部位と考えられている。よって本ナノ粒子は、がん患部に接続する輸入リンパ管のリンパ節流入部を高精度で可視化することにより、リンパ節へのがん微小転移を高確度で診断可能なプローブになり得ることが期待された。

領域内の共同研究として、がん細胞のリンパ管内の動態について、東北大・今井班と協力し計算科学的に解明することを目指している。さらに摘出リンパ節の診断には、的確な組織診断法が重要となるが、現在、がん組織に存在するがん関連因子の高精度蛍光イメージング法の開発を東大・樋口班と協力しながら進めており、関連論文が科学雑誌の審査中にある。

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

Kohsuke Gonda

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

Recently, sentinel lymph node diagnosis for cancer surgery is growing in importance because cancer cells metastasize to other parts of the body via lymph vessels or blood vessels. To develop a diagnostic method of sentinel lymph node in cancer using both X-ray CT and fluorescence imaging, we made new nanoparticles for multimodal imaging. X-ray Computed tomography (CT) is one of the most widely used clinical imaging modalities. The X-ray CT imaging has resolution with around several tens of micrometers and can visualize at levels ranging from small tissues to whole body by high penetrative power of X-rays. Recently, X-ray CT apparatus with further high resolution has been developed intensively although tri-iodobenzene as X-ray contrast agent have been mainly used. Au nanoparticles (AuNPs) attract lots of attention as useful contrast agent than conventional iodine agent in that X-ray absorption coefficient. Additionally, it is easy to control surface modification of the AuNPs. Quantum dots (QDs) is one of recently-developed fluorescence nanoparticles and used for various biological imaging. The brightness and photostability of QDs is much greater than those of conventional fluorescent dyes or proteins. Fluorescence imaging has the resolution with hundreds of nanometer and high quantitative sensitivity because the fluorescence signal intensity is proportional to the intensity of the photon excitation energy. However, as the fluorescence imaging was affected by optical scatter and absorption in cells or tissues, tissue permeability of fluorescence is not well. Therefore, fluorescence imaging is suitable to visualize at levels ranging from molecular to small tissues.

Here in we developed new contrast agent which consist of AuNPs and QDs. To make silica-coated QDs conjugated with AuNPs (QDs/SiO<sub>2</sub>/AuNPs), silica coating of QDs was performed using a modified Stöber method based on the sol-gel method. Then AuNPs were conjugated with silica shell surface of silica-coated QDs using APES. To examine a potential of QDs/SiO<sub>2</sub>/AuNPs as sentinel lymph node tracer for cancer diagnosis, the particles were injected into tumor site of tumor-bearing mice and then X-ray CT and fluorescent imaging was performed. We could visualize an identical sentinel lymph node with X-ray CT and fluorescence imaging. Moreover, by imaging QDs/SiO<sub>2</sub>/AuNPs distribution in lymph networks using X-ray CT and fluorescence imaging, we have succeeded in precisely identifying the inflow of afferent lymph vessels into the sentinel lymph node, where lymph node metastasis begins.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Kobayashi Y, Nagasu R, Shibuya K, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Synthesis of a colloid solution of silica-coated gold nanoparticles for X-ray imaging applications. *Journal of Nanoparticle Research* 16: 2551 (2014).
2. Nemoto N, Shibahara Y, Tada H, Uchida K, McNamara KM, Chan MS, Watanabe M, Tamaki K, Miyashita M, Miki Y, Gonda K, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Clinical significance of subtype classification in metastatic lymph nodes of breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Biological Markers* in press.
3. Kondo T, Mori K, Hachisu M, Yamazaki T, Okamoto D, Watanabe M, Gonda K, Tada H, Hamada Y, Takano M, Ohuchi N, Ichiyangi Y. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn<sub>1-x</sub>Zn<sub>x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for hyperthermia treatment. *Journal of Applied Physics* in press.
4. Koseki Y, Ikuta Y, Murakami T, Onodera T, Oikawa H, Cong L, Tada H, Gonda K, Ohuchi N, Kasai H. Cytotoxicity of pure nanodrugs of SN-38 and podophyllotoxin dimers in human cancer HepG2, KPL-4, and MCF-7 cells. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* in press.

### 総説

1. Kobayashi Y, Gonda K, Ohuchi N. Imaging processes using core-shell particle colloid solutions for medical diagnosis. *Athens Journal of Natural & Formal Sciences* Vol 1, No1, 31-41 (2014)
2. 久保田洋介、権田幸祐、小林芳男、亀井尚、中川智彦、松戸寛武、渋谷恭介、大内憲明 「X線 CT と蛍光を用いたリンパ節のデュアルイメージング」 ナノ学会会報 第 12 巻第 2 号 69-72 (2014 年)
3. 権田幸祐 「個体のなかでの 1 分子機能解析は可能か」 1 分子生物学 (原田慶恵・石渡信一/編) (化学同人) 第 13 章 (2014 年)
4. 小林芳男、権田幸祐、大内憲明 「ナノカプセル造影剤の開発」 マイクロ/ナノカプセルの調製、徐放性制御と応用事例 第 10 節 264-271 (技術情報協会) (2014 年)

### 招待講演

1. Gonda K, Hamada Y, Kawamura K, Kubota Y, Kobayashi Y, Ohuchi N. Nano-bioimaging of cancer and peripheral artery disease with highly-quantitative sensitivity. 7<sup>th</sup> International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology. November 2-6, 2014, Ha Kong City, Vietnam.
2. Gonda K, Ohuchi N. Nano-bioimaging of cancer and peripheral artery disease with X-ray CT and fluorescence. 8th International Symposium on Nanomedicine. December 4-6, 2014, Ehime University.
3. Gonda K. High Sensitive Imaging of Cancer with X-ray or Fluorescence. The 6th Taiwan-Japanon Symposium on Nanomedicine. January 8, 2015, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.

## 低悪性度神経膠腫における遺伝子変異の全貌

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

成人に発症する脳腫瘍の約半数を占める神経膠腫は、病理学的に低悪性度と高悪性度に低悪性度は緩徐に進行するが数年から十数年の経過を経てより高悪性度の腫瘍として再発する。段階的に悪性化する腫瘍であるため腫瘍内多様性及び単一細胞クローンがどのように進展していくかの過程を解明することは今後の治療の発展につながると考えられる。

今年度の研究成果として、低悪性度神経膠腫は時間的・空間的に多様性を有する腫瘍であり、その遺伝子変異には変異の生じる順番が存在すること、腫瘍が生じた後に一部のサブクローンがヒエラルキーを有する driver 変異を順番に獲得し多様性を形成しながら進展していくことが明らかになった (Nature Genetics, in press)。

### 2. 研究の背景と目的

低悪性度神経膠腫瘍(LGG)の遺伝子異常はいまだ十分に解明されていない。我々は低悪性度神経膠腫瘍における遺伝子異常の全貌を明らかにするため High throughput sequencing を行った。同時に、我々は4患者の multisampling 腫瘍と10患者の初発/再発腫瘍に対し、次世代シーケンスである Whole exome sequencing (WES)を行った。確認された変異について deep sequencing を行い正確なアレル頻度を測定し、統計的な解析手法である PyClone analysis を行うことにより subclone を同定し腫瘍内多様性を明らかにすることを目的とした。また、同定された subclone を用いクローンの動態の解析を試みた。

### 3. 成果

52例の whole exome sequencing (WES)と283例の target sequencing を行った。TCGAから425例の WES data を使用し合計760例のLGGに対し遺伝子解析を行った。LGGにおいて既知の遺伝子変異に加え新たに RTK-mTOR pathway ,NOTCH pathway, SWI/SNF complex および histone methyltransferase (HMT) の変異が有意に認められた。LGGは *IDH1/2* の変異と 1p19q LOH によって特徴的な3 type に分類される。Type I (*IDH* mut / 1p19q LOH)は *TERT* promotor (98%), *CIC* (59%), *FUBP1* (31%) 変異を有しコピー数異常は 4q / -18 といった deletion を起こす。Type II (*IDH* mut / 1p19q intact)

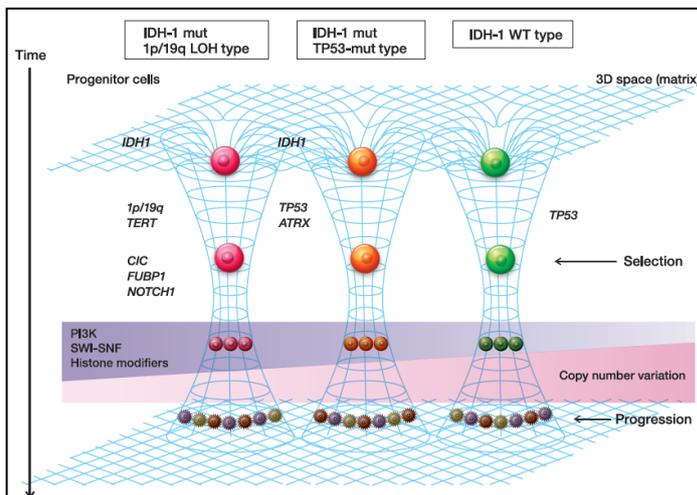
## A03 (ク) 班

では 97% に TP53 の biallelic inactivation を認めた。ATRX (77%) の変異も高頻度であり 8q/10p など に copy 数 gain を起こしやすい。Type III (IDH wt) は *EGFR*, *PTEN*, *CDKN2A/2B* などの変異の頻度が高く GBM-like pattern を有する。これらの変異は高い排他性を有し各 Type ごとに特徴的な遺伝子変異パターンをとる (図)。各遺伝子における変異アレル頻度から Bradley-Terry model を用いて変異の生じる順番を検討する規則性が認められる。*IDH1/2*, *TERT*, 1p19q LOH, *TP53*, *ATRX* 変異は腫瘍発生早期に生じると考えられ、その後 NOTCH pathway, SWI/SNF complex, HMT の変異が生じる。

multisampling 検体において各部位で変異パターンは異なり腫瘍内多様性が確認された。Phylogenetic tree を描くと *IDH1*, 1p19q LOH, *TERT* promoter, *TP53*, *ATRX* 変異はいずれも truncal mutation として存在し腫瘍の発生に重要な変異と考えられた。一方 *FUBP1*, *CIC*, *NOTCH1* 及び Histone methyltransferase などの変異は分岐を形成した。また同一遺伝子であっても同一患者内で異なる変異パターンを有する parallel mutation が認められた。そのためこれらの driver 変異は clonal evolution を引き起こし腫瘍の進展を引き起こしていると考えられた。

経時的検体において同様の解析を行うと *IDH1*, 1p19q LOH, *TERT* promoter はいずれも truncal mutation であった。一方、*TP53*, *ATRX* に parallel mutation を認め分岐を形成する症例があり *IDH1* より後に発生すると考えられた。multisampling 検体と同様に *FUBP1*, *CIC*, *NOTCH1* には parallel mutation を認め clonal evolution を引き起こしていると考えられた。

今回、我々の解析により LGG において新たな遺伝子変異が明らかとなった。遺伝子変異



異パターンは極めて排他性の強い 3 type に分類され、各 Type において遺伝子変異はヒエラルキーを有する。LGG は決まった順番で変異が発生し、その driver 変異を獲得することにより clonal evolution を引き起こして進展していくことが明らかとなった。

LGG は時間的・空間的に多様性を有する腫瘍であり、その遺伝子

変異には変異の生じる順番が存在すること、腫瘍が生じた後に一部の subclone がヒエラルキーを有する driver 変異を順番に獲得し多様性を形成しながら進展していくことが明らかになった。

## The landscape and clonal architecture in lower grade glioma

Atsushi Natsume, Takeshi Senga\*

*Department of Neurosurgery, Nagoya University, Japan*

*\* Department of Tumor Biology, Nagoya University, Japan*

**Background:** Lower grade gliomas (LGGs, WHO grade II/III gliomas) account for approximately one third of all gliomas. Although LGGs are typically slowly progressive, their clinical course is invariably indolent and most patients ultimately succumb to death. In contrast to glioblastoma, our knowledge about the genetic lesions and clonal evolution in LGG is still incomplete.

**Methods:** To obtain a complete registry of gene mutations involved in LGG pathogenesis and their role in clonal evolution, we analyzed whole exome sequencing and/or targeted sequencing of 757 LGG cases from Japan and the Cancer Genome Atlas consortium. Clonal evolution in LGG was investigated using multi-time point/regional sampling in 14 cases with LGGs.

**Results:** Massive parallel sequencing revealed LGGs were clearly grouped into three subgroups with or without *IDH1/2* mutation and 1p/19q loss of heterozygous (LOH). Type I tumor with *IDH1/2* mutation and 1p/19q LOH had a most favorable survival and harbored mutations in *TERT* promoter, *CIC*, *FUBP1* and *NOTCH1*. Type II tumor with *IDH1/2* mutant/1p19q intact subtype represented *TP53* biallelic inactivation and/or *ATRX* mutations. Type III tumor with *IDH1/2* intact showed GBM like mutation profile and poor prognosis.

Large scale samples allowed to obviously detect strong positive/negative correlations with each other driver genes. Extensive analysis of variant allele frequencies among co-existing mutations revealed temporal orders of gene mutations in each subtypes.

Multi regional/time-points sampling analysis supported mutational order and revealed a close correlation of regional heterogeneity with the history of clonal evolution, illustrating the way by which a tumor expands from its origin to surrounding regions, while increasing intratumor heterogeneity and spatially intermingling different evolutionary branches in periphery.

**Conclusion:** Our findings delineated the landscape of gene mutations in LGG. LGG had mutually exclusive mutational patterns with hierarchical order in discrete subtypes. LGG contiguously developed and generated heterogeneity through acquiring new mutations in a complex but ordered fashion. Prominent regional heterogeneity raises a potential concern that sequencing of bulk tumor may not detect rare, but important mutations.

## 業績リスト

## 学術論文

1. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano SA, Natsume A, Ogawa S. Mutational landscape and clonal architecture in grade-II and III gliomas, *Nature Genetics*, in press.
2. Sugiyama M, Hasegawa H, Ito S, Sugiyama K, Maeda M, Aoki K, Wakabayashi T, Hamaguchi M, Natsume A, Senga T: Paired related homeobox 1 is associated with the invasive properties of glioblastoma cells. *Oncol Rep* 33:1123-30, 2015
3. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Momota H, Kato A, Motomura K, Watabe N, Muraishi S, Nakahara H, Saito Y, Takeuchi I, Wakabayashi T: Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy. *Biomed Res Int* 2014:860241, 2014
4. Suzuki A, Nobusawa S, Natsume A, Suzuki H, Kim YH, Yokoo H, Nagaishi M, Ikota H, Nakazawa T, Wakabayashi T, Ohgaki H, Nakazato Y: Olig2 labeling index is correlated with histological and molecular classifications in low-grade diffuse gliomas. *J Neurooncol* 120:283-91, 2014
5. Torii K, Yamada S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Tanahashi K, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Tanaka C, Fujii T, Nakayama G, Koike M, Sugimoto H, Nomoto S, Natsume A, Fujiwara M, Mizuno M, Hori M, Saya H, Kodera Y: Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. *Gastric Cancer*, 2014
6. Wang L, Yamaguchi S, Burstein MD, Terashima K, Chang K, Ng HK, Nakamura H, He Z, Doddapaneni H, Lewis L, Wang M, Suzuki T, Nishikawa R, Natsume A, Terasaka S, Dauser R, Whitehead W, Adekunle A, Sun J, Qiao Y, Marth G, Muzny DM, Gibbs RA, Leal SM, Wheeler DA, Lau CC: Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. *Nature* 511:241-5, 2014
7. Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K: Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Sci* 105:363-9, 2014
8. Iwami K, Momota H, Fujii M, Natsume A, Yagi S, Toriyama K, Kamei Y, Wakabayashi T: Anaplastic meningioma with rapid growth after omental flap transposition: a case report and experimental study. *Brain Tumor Pathol*, 2014
9. Nishimura Y, Natsume A, Ginsberg HJ: Spinal dural arteriovenous fistula associated with L-4 isthmic spondylolisthesis. *J Neurosurg Spine* 20:670-4, 2014
10. Momota H, Fujii M, Tatematsu A, Shimoyama Y, Tsujiuchi T, Ohno M, Natsume A, Wakabayashi T: Papillary glioneuronal tumor with a high proliferative component and minigemistocytes in a child. *Neuropathology* 34:484-90, 2014
11. Motomura K, Fujii M, Maesawa S, Kuramitsu S, Natsume A, Wakabayashi T: Association of dorsal inferior frontooccipital fasciculus fibers in the deep parietal lobe with both reading and writing processes: a brain mapping study. *J Neurosurg* 121:142-8, 2014
12. Ohka F, Ito M, Ranjit M, Senga T, Motomura A, Motomura K, Saito K, Kato K, Kato Y, Wakabayashi T, Soga T, Natsume A: Quantitative metabolome analysis profiles activation of glutaminolysis in glioma with IDH1 mutation. *Tumour Biol* 35:5911-20, 2014
13. Umebayashi D, Natsume A, Takeuchi H, Hara M, Nishimura Y, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Wakabayashi T: Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *J Neurotrauma* 31:1967-74, 2014
14. Nishimura Y, Ellis MJ, Anderson J, Hara M, Natsume A, Ginsberg HJ: Progressively unstable c2 spondylolysis requiring spinal fusion: case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 54:761-7, 2014
15. Tsujiuchi T, Natsume A, Motomura K, Kondo G, Ranjit M, Hachisu R, Sugimura I, Tomita S, Takehara I, Woolley M, Barua NU, Gill SS, Bienemann AS, Yamashita Y, Toyokuni S, Wakabayashi T: Preclinical evaluation of an O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-siRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains. *Am J Transl Res* 6:169-78, 2014
16. Yamashita Y, Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, Tsujiuchi T, Natsume A, Wakabayashi T, Toyokuni S, Tsurumi T: Lack of presence of the human cytomegalovirus in human glioblastoma. *Mod Pathol* 27:922-9, 2014
17. Ando H, Natsume A, Senga T, Watanabe R, Ito I, Ohno M, Iwami K, Ohka F, Motomura K, Kinjo S,

## A03 (ク) 班

Ito M, Saito K, Morgan R, Wakabayashi T: Peptide-based inhibition of the HOXA9/PBX interaction retards the growth of human meningioma. *Cancer Chemother Pharmacol* 73:53-60, 2014

18. Sato N, Maeda M, Sugiyama M, Ito S, Hyodo T, Masuda A, Tsunoda N, Kokuryo T, Hamaguchi M, Nagino M, Senga T. Inhibition of SNW1 association with spliceosomal proteins promotes apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Med*. 2015; 4(2): 268-77.

### 総説・解説・成書

1. 夏目敦至 「グリオーマに対する化学療法の最新知見」 脳神経外科ジャーナル (2014)
2. 夏目敦至 「Pyrosequencing による MGMT メチル化解析」 *Clinical Neuroscience* (2014)
3. 夏目敦至、棚橋邦明 「神経線維腫症 II 型」 日本臨床神経症候群
4. 夏目敦至 「脳腫瘍のゲノム解析に基づく新戦略」 臨床医のための脳神経外科
5. 出口彰一、近藤豊、夏目敦至「神経膠腫におけるエピジェネティクス機構と non-coding RNAs」
6. 夏目敦至、本村和也、大岡史治、鈴木啓道、若林俊彦「神経膠芽腫のプロファイリング」 病理と臨床
7. 夏目敦至 「グリオーマの摘出」 脳神経外科ジャーナル
8. 夏目敦至 「脳実質内腫瘍摘出術」 脳神経外科プラクティス

### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 受賞 第 15 回日本分子脳神経外科学会賞
2. 招待講演:夏目敦至 「日本における TSC 標準治療を目指して」 TSC Days Japan 2014. 10/25/2014
3. ランチョンセミナー:夏目敦至 「テモダールの陰翳礼賛から学ぶ悪性神経膠腫の神秘」 第 32 回日本脳腫瘍学会 12/2/2014
4. 招待講演:夏目敦至 中外製薬 富士御殿場研究所 研修会 「脳腫瘍の基礎と臨床」 9/6/2014
5. 招待講演:夏目敦至 「脳腫瘍に対する臨床試験デザイン」第 3 回 Neuro-Oncology West 9/20/2014
6. 招待講演:夏目敦至 「膠芽腫ガイドラインの目的と推奨レベルの設定根拠」脳腫瘍診療ガイドラインを考える会 9/20/2014
7. 招待講演:夏目敦至 「膠芽腫ガイドラインにおけるギリアデルなどの位置づけ」ギリアデル meet the expert 10/22/2014
8. 招待講演:夏目敦至 「脳腫瘍に対する臨床試験デザイン」第 3 回 Neuro-Oncology West 9/20/2014
9. 招待講演:Atsushi Natsume. Epigenetic plasticity and mutational landscapes reveal intratumoral heterogeneity and clonal evolutions in gliomas」 3<sup>rd</sup> Cancer Stem Cell Symposium 11/22/2014
10. 招待講演:夏目敦至 「グリオーマのゲノム、エピゲノムの進展と悪性化のメカニズムと治療介入」 第 3 回島根脳腫瘍学術講演会 10/17/2014
11. 招待講演: Atsushi Natsume. Clinical application of Raman spectroscopy in Neurosurgery」 1<sup>st</sup> Raman-Bio-sensing Seminar, Jan 20, 2015
12. 招待講演:夏目敦至 「悪性脳腫瘍における遺伝子異常による多段階発がんメカニズムの解明」 2015. 1. 16. MERRO 第 1 回次世代若手研究会
13. Toshihiko Wakabayashi, Atsushi Natsume, Junki Mizusawa, Hiroshi Katayama, Soichiro Shibui, Ryo Nishikawa, and Members of Japan Clinical Oncology Group Brain Tumor Study

## A03 (ク) 班

- Group (JCOG-BTSG). JCOG0911 INTEGRA study : a randomized screening phase II trial of chemoradiotherapy with interferon- $\beta$  plus temozolomide versus chemoradiotherapy with temozolomide alone for newly-diagnosed glioblastoma. Society for Neuro-Oncology, 2014
14. JCOG0911 INTEGRA study : a randomized screening phase II trial of chemoradiotherapy with interferon- $\beta$  plus temozolomide versus chemoradiotherapy with temozolomide alone for newly-diagnosed glioblastoma. Oct 9, 2014, 73rd JNS, Tokyo.
  15. Atsushi Natsume. Temporal and spatial evolution of clones in low grade gliomas 07/21/2014 20<sup>th</sup> International Conference of Brain Tumor Research and Therapy. Lake Tahoe
  16. Atsushi Natsume. *Vaccine-based immunotherapy for malignant gliomas-current trends and future perspectives SymBioPharma 07/19/2014*
  17. 招待講演 : 夏目敦至 「網羅的(エピ)ゲノム解析に基づく治療戦略」 癌治療学会 8/27

## 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：大阪大学 大学院基礎工学研究科 岡本 行広

### 1. 研究の概要

我々は PEG 脂質の末端に一本鎖 DNA (ssDNA) を結合した ssDNA-PEG 脂質を細胞表面の修飾材料を用い、DNA の相補対形成を介した細胞表面への生理活性物質の固定化や細胞－基板間、細胞－細胞間接着の制御を行ってきた。本年度はその技術を生かし、組織工学用足場材料として用いられるポリ乳酸表面への細胞パターンニングを実現した。また、制限酵素分解サイトを有する ssDNA-PEG 脂質を設計し、制限酵素の添加によって接着細胞を選択的に回収できることを示した。さらに、ガラス上に形成した支持脂質二分子膜を細胞膜モデルとして用い、DNA を介した細胞接着に伴う ssDNA-PEG 脂質の挙動について調べた。その結果、細胞接着に関与する ssDNA-PEG 脂質は細胞接着面へ集積する一方、接着に関与しない ssDNA-PEG 脂質は接着面から排除されることが分かった。

### 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、細胞レベルのダイナミクスに着目する。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。

### 3. 成果

## A03 班 (ケ)

### (1) ポリ乳酸上での細胞パターンニング

ポリ乳酸(PLA)は組織工学用足場材料としてよく用いられる生分解性高分子であり, 3D プリンターを用いれば任意の3次元構造体を作製することができる。しかし, PLA 表面は細胞接着性に乏しく, また, 生体組織のように複数種の細胞を位置選択的に接着させることは困難である。PLA フィルムへ配列の異なる ssDNA のパターンを形成, または配列の異なる ssDNA を固定化した PLA ファイバーを配置し, 相補鎖を有する ssDNA-PEG 脂質で修飾した細胞を播種することで, 細胞のパターンニングに成功した (図 1)。

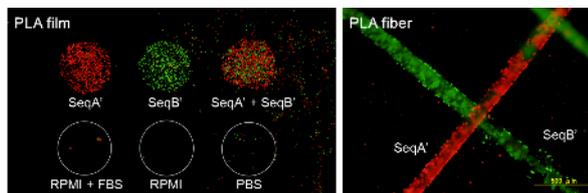


図 1. PLA フィルムおよびファイバー上での細胞パターンニング

### (2) DNA 分解酵素を用いた細胞の選択的回収

遺伝子工学で利用される, 特定の DNA 配列を選択的に切断する制限酵素を利用し, DNA を介して接着した細胞を選択的に回収することを試みた。制限酵素 (BamH1 または EcoR1) の切断サイトを有する ssDNA-PEG-脂質を設計し, それを用いて細胞-基板間および細胞-細胞間接着を誘導した。その後, BamH1 を添加すると, その切断サイトを有する細胞のみが脱離した (図 2, 緑標識細胞)。また, すべての DNA を分解する酵素 (Benzonase) を添加することで, DNA を介して接着した細胞をその DNA 配列に寄らず脱離させることができた。

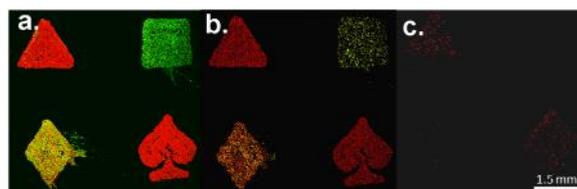


図 2. 制限酵素による細胞パターンの選択的脱離。(a) 細胞パターン作製直後, (b) BamH1 添加後, (c) Benzonase 添加後

### (3) 脂質膜上における ssDNA-PEG-脂質の挙動

ssDNA-PEG-脂質による細胞-細胞間接着をより詳細に調べるため, ガラス基板に形成した支持脂質二分子膜 (SLB) を細胞膜モデルとして用いた。これにより, 細胞接着面の観察が容易となる。SLB を蛍光標識 ssDNA-PEG-脂質で修飾し, その相補対 ssDNA'-PEG-脂質で修飾した細胞を播種したところ, 細胞の接着面に ssDNA-PEG-脂質が集積することが明らかとなった (図 3)。次に, 二種類の ssDNA-PEG-脂質を SLB に導入し, 細胞の接着に伴う ssDNA-PEG-脂質の挙動を調べた。その結果, 細胞-SLB 間の接着に関与する ssDNA-PEG-脂質は細胞接着面に集積する一方, 接着に関与しない ssDNA-PEG-脂質は細胞接着面から排除されることが分かった。

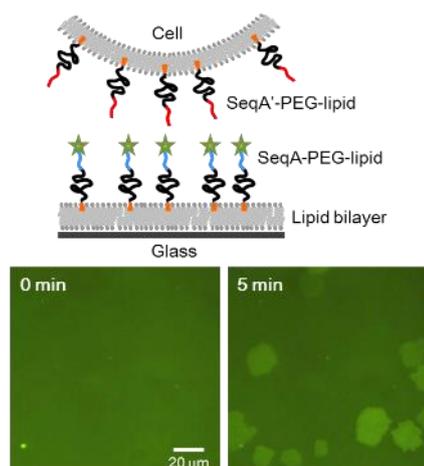


図 3. 蛍光標識 SeqA-PEG-脂質で修飾した SLB へ SeqA'-PEG-脂質修飾細胞を播種した際の蛍光像変化

## Three Dimensional Tissue Regeneration Through Multipoint Molecular Weak Association

Hiroo Iwata<sup>1</sup>

Yusuke Arima<sup>1</sup>, Yukihiro Okamoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University,

<sup>2</sup> Graduate School of Engineering Science, Osaka University

We have reported that cell surface can be easily modified with single stranded DNA-poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates (ssDNA-PEG-lipids). The ssDNA presented on the cell surface acts as an adhesive to immobilize functional molecules, materials and various cells on the cell surfaces.

Poly(lactic acid) (PLA) has been widely used to prepare 3D scaffolds for 3D tissue regeneration. Cells, however, hardly adhere or proliferate on PLA surfaces due to its hydrophobicity. In addition, it is difficult to arrange different kinds of cells into specific positions. We examined a simple and rapid method of inducing cell adhesion on PLA through DNA hybridization. Cell surfaces were modified with ssDNA-PEG-lipid, and the cells could then attach to PLA surfaces modified with complimentary ssDNA' through DNA hybridization. Use of ssDNAs with different sequences allowed for attachment of different kinds of cells to PLA fibers and films in a spatially controlled manner. Additionally, cells proliferated well in a culture medium supplemented with fetal bovine serum. Cells attached through DNA hybridization exhibited formation of focal adhesions and F-actin when incubated in a serum-containing medium. These results suggest that the coexisting modes of cell adhesion through DNA hybridization and natural integrin-mediated adhesion machinery caused no serious effects on cell growth. Thus, the combination of a 3D scaffold made of PLA and cell attachment through DNA hybridization on the PLA scaffold is a promising method to fabricate 3D tissue engineering constructs.

For the development of cell surface engineering, it is important to understand the behavior of ssDNA-PEG-lipids on cell surface. We employed supported lipid bilayers (SLBs) to recapitulate cell-cell interaction through DNA hybridization. While ssDNA-PEG-lipids were homogeneously distributed over both the cell membrane and the supported lipid bilayer, the ssDNA-PEG-lipids were recruited at the cell contacting region upon cell attachment. This result suggests that lateral diffusion of ssDNA-PEG-lipids are slowed when associated with their complementary ssDNA-PEG-lipids at the opposite lipid bilayer. Next, we prepared SLB modified with two kinds of ssDNA-PEG-lipids with different ssDNA sequences (SeqA and SeqB). When the SLB was incubated with cells modified with SeqA'-PEG-lipids, the SeqA-PEG-lipids were recruited at the cell contacting region. In contrast, the SeqA-PEG-lipids were excluded from the cell contacting region when cells modified with SeqB'-PEG-lipids attached.

## A03 班 (ケ)

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Sho Deno, Naohiro Takemoto, Hiroo Iwata. Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surfaces through DNA hybridization. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 350–357 (2014)
2. Shuhei Konagaya, Hiroo Iwata. Microencapsulation of dopamine neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochim Biophys Acta.*, **1850**, 22-32 (2014).
3. Toshiki Matsui, Yusuke Arima, Naohiro Takemoto, Hiroo Iwata. Cell patterning on polylactic acid through surface-tethered oligonucleotides. *Acta Biomater.*, **13**, 32-41 (2015).
4. Yukihiro Okamoto, Ayato Hibito, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Development of a microRNA extraction chip from human tumor cells, *Bunseki Kagaku*, **64**, 9-13 (2015)
5. Ian T. Hoffecker, Naohiro Takemoto, Yusuke Arima, Hiroo Iwata. Sequence-specific nuclease-mediated release of cells tethered by oligonucleotide phospholipids. *Biomaterials*, in press.

#### 総説・解説・成書

1. 岡本 行広, 支持脂質膜を利用した膜タンパク質の電気泳動分離分析, *ぶんせき*, 2014, 691
2. 岡本 行広, 辻本 悠亮, 馬越 大, ナノバイオ分析の新展開 ～新たな駆動力・分子認識場の活用～, *分離技術*, 2014, 44, 23-27.

#### その他 (報道, 受賞, 特許, 主な招待講演, 活動など)

1. 招待講演: H. Iwata. Cells patterned on polylactic acid through surface tethered oligonucleotides. The 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (2014. 8. 28, Taiwan)
2. 招待講演: Y. Arima, T. Matsui, H. Iwata. Cell patterning on polylactic acid through surface tethered oligonucleotides. The 2nd Japan-China Symposium on Nanomedicine (2014.5.16-17, Hiroshima)
3. 招待講演: Y. Arima, H. Iwata, H. Cell adhesion to self-assembled monolayers and supported lipid bilayers for studying cell-substrate and cell-cell interaction. 7th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine (7th WCPRM) (2014.11.5-7, Taiwan)
4. 招待講演: 岩田博夫, 組織修復材料+細胞による糖尿病の治療. 京都市成長産業創造センター 一周年記念フォーラム - 今を支え未来を創るケミストリー (2014.11.27, 京都)
5. 招待講演: Y. Arima, H. Iwata. Controlled cell attachment using oligonucleotide-poly(ethylene glycol)-lipid conjugates and their recruitment upon cell attachment. 8th International Symposium on Nanomedicine (2014.12.4-6, Matsuyama)
6. 招待講演: 有馬祐介, モデル表面を用いた細胞-材料間および細胞-細胞間接着の解析. 2014 KIPS 若手高分子シンポジウム (2014.12.12, 京都)

## 蛍光寿命イメージングを用いた細胞内イオン濃度の

### 動的変化の解明

研究代表者：東北大学大学院薬学研究科 中林 孝和

#### 1. 研究の概要

光退色に強いローダミン色素誘導体について、蛍光寿命の pH 依存性を測定した。蛍光寿命は pH によって変化し、色素分子の酸塩基平衡によって説明することができた。新たな蛍光寿命用 pH プローブとなることができる。また、光線力学的治療に用いられる色素の蛍光寿命画像を検討し、蛍光寿命が正常細胞とがん細胞において異なることを示した。色素周囲の環境が両細胞において異なることがわかる。

#### 2. 研究の背景と目的

蛍光寿命の値は、光退色や励起光強度の揺らぎなどの様々な実験条件に依存しないために、蛍光強度測定に比べて定量的な情報を得ることができる。申請者らは、細胞内に元から存在する自家蛍光分子の蛍光寿命測定を行い、細胞内 pH などの細胞内環境の無染色定量測定を提案してきた。本研究では、自家蛍光だけではなく、機能性色素分子と蛍光寿命を組み合わせた細胞内環境計測手法の開発および高感度計測を行うことを目的とする。また共同研究を行うことによって、蛍光寿命から細胞内環境を計測するための新たな機能性色素分子の開発へと展開することを目指す。

#### 3. 成果

フルオレセイン色素や蛍光タンパク質などの pH 感応性色素を用いた細胞内 pH 測定において、染色色素の蛍光寿命から細胞内 pH をその場で求められることを示している。しかし、蛍光寿命画像の測定には分の時間がかかることが多く、光退色によって蛍光強度が減少し信号雑音比が低下することが問題であった。今回、光退色に強い色素として近年報告<sup>1)</sup>されたローダミン色素誘導体(AcidiFluor<sup>TM</sup> ORANGE)を用いて、蛍光寿命を用いた媒質の pH 検出を検討した。Fig. 1 に pH4.5 における AcidiFluor の蛍光スペクトルと蛍光励起スペクトルを示す。蛍光強度は pH の増加に対して減少しており、蛍光強度の強いプロトン付加体と蛍光強度の弱い脱プロトン体の酸塩基平衡によって説明される。実際に酸性領域から pH6 付近で蛍光スペクトルが約 20 nm 長波長シフトしており、短波長側の蛍光がプロトン付加体、長波長側の蛍光が脱プロトン体に帰属される。蛍光励起スペクトルにおいても、pH6 付近での長波長シフトが観測された。470 nm を励起光とし、60 ps の装置関数で AcidiFluor の蛍光減衰曲線の pH 依存性を測定した。蛍光減衰曲線は pH によって大きく変化し、ピコ秒の蛍光寿命を持つ成分とナノ秒の蛍光

## 公募

寿命を持つ成分の2成分の割合が pH によって変化した。酸性領域ではナノ秒の蛍光寿命成分が、中性からアルカリ性領域ではピコ秒の蛍光寿命成分が主成分となり、主成分の蛍光寿命は、pH4.5 では約 2.6 ns, pH8 では約 40 ps であった。蛍光スペクトルとの比較から、ナノ秒の蛍光寿命成分がプロトン付加体、ピコ秒の蛍光寿命成分が脱プロトン体に帰属できる。蛍光減衰曲線を単一から三次の指数関数( $\sum A_i \exp(-t/\tau_i)$ )を用いて再現し、平均蛍光寿命( $\sum(A_i \tau_i)/A_i$ )を pH に対してプロットした。pH が 5 から 7 において、平均蛍光寿命の顕著な変化が観測された。平均蛍光寿命の pH 依存性が、基底状態におけるプロトン付加体と脱プロトン体との酸塩基平衡のみによるとした場合、見かけ上の酸解離定数 pKa を用いて、(1)式で表すことができる。

$$\tau_F = a + b[1 + 10^{(pK_a - pH)}]^{-1} \quad (1)$$

$a$  および  $b$  は測定値のオフセットとダイナミックレンジである。得られた pH 依存性は(1)式で表すことができ、pKa は約 5.6 であった。平均蛍光寿命の pH 依存性は検量線となり、AcidiFluor の蛍光寿命を用いても、緩衝溶液中の pH が求められることがわかった。新たな蛍光寿命用 pH プロブとなることができる。

AcidiFluor で染色された HeLa 細胞の蛍光寿命イメージング (FLIM) 測定を行った。本研究では、今まで行ってきた 4 分割された蛍光減衰曲線を測定する時間ゲート法ではなく、画像の各点において時間相関光子計数法を用いて蛍光減衰曲線を測定し、多成分の指数関数によって減衰曲線を解析して蛍光寿命の画像化を行っている。HeLa 細胞中での蛍光減衰曲線は 2 成分で再現することができ、緩衝溶液中とは異なる値であった。イオノフォアを用いた細胞内 pH と蛍光寿命との間の検量線を作成し、蛍光寿命から細胞内 pH の測定を行うことを計画している。

光線力学的治療 (PDT) に用いられる光感受性色素について、がん細胞と正常細胞内における光励起ダイナミクスを検討している。がん細胞中と正常細胞中において蛍光寿命の値が異なり、色素周囲の環境が両細胞において異なることが示された。しかし、正常細胞とがん細胞における寿命変化の増減は、色素によって異なっていた。また、がん細胞の蛍光寿命画像では、蛍光寿命の値が個々の細胞によっても異なり、色素周囲の環境が異なることを示している。FLIM は、PDT 色素の細胞内環境を調べる有用な手法であることがわかる(太田信廣先生(北海道大学), 李黎明先生(千歳科学技術大学)との共同研究)。

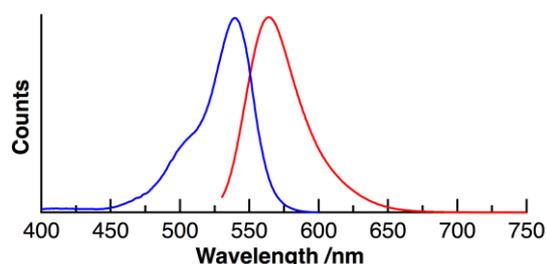


Fig. 1. Fluorescence (red) and fluorescence excitation (blue) spectra of AcidiFluor ORANGE in buffer solution at pH 4.5.

1. D. Asanuma, Y. Takaoka, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 6085 (2014).

## **Application of Fluorescence Lifetime Imaging to the Evaluation of Intracellular Ion Concentrations**

Takakazu Nakabayashi  
*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Japan*

Fluorescence lifetime imaging (FLIM) is a very useful method to investigate environments in a single cell because the value of fluorescence lifetime is independent of photobleaching and experimental conditions such as fluctuation of excitation power. We have previously shown that FLIM of endogenous fluorophores can be used to evaluate intracellular environments such as intracellular pH. In the present study, we have investigated the optical properties of some exogenous fluorophores to be used for the lifetime-based sensing of intracellular environments.

We have measured the pH dependence of the fluorescence lifetime of the Rhodamine derivative called AcidiFluor in buffer solution. AcidiFluor having excellent photostability exhibits the strong fluorescence in acidic conditions, which can be explained in terms of the acid-base equilibrium between the fluorescent protonated species and the non-fluorescent de-protonated species. The fluorescence decay of AcidiFluor is found to be strongly affected by pH of the medium. The fluorescence decay profile is mainly composed of the nanosecond and picosecond lifetime components, and the relative contribution of the two lifetime components to the decay profile depends on pH. These nanosecond and picosecond lifetime components are assigned to the fluorescent protonated and the non-fluorescent de-protonated species, respectively. The average fluorescence lifetime was calculated from the preexponential factor of each decay component, and the correlation curve between the average fluorescence lifetime and pH in buffer was fitted by the following function:

$$\tau_F = a + b[1 + 10^{(pK_a - \text{pH})}]^{-1} \quad (1)$$

Eq. (1) was derived from the assumption that the observed pH dependence of the average fluorescence lifetime only comes from the acid-base equilibrium in the ground state. This result indicates that medium pH can be evaluated by the fluorescence lifetime of AcidiFluor. We have also measured FLIM of AcidiFluor in HeLa cells. The fluorescence lifetime in HeLa cell is found to be different from that in buffer solution.

We have compared the fluorescence properties of representative photosensitizers for photodynamic therapy (PDT) in normal and cancer cells. The value of the fluorescence lifetime is different within a cell and among cells, which reflects the different intracellular environment around photosensitizers from each other. This result indicates that FLIM is useful to investigate environment of PDT dyes within a cell.

## 公募

### 業績リスト

#### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

##### （総説・解説）

1. Takakazu Nakabayashi and Nobuhiro Ohta  
Sensing of Intracellular Environments by Fluorescence Lifetime Imaging of Exogenous Fluorophores  
*Analytical Sciences*, in press.
2. 中林孝和, 太田信廣 「NADH の自家蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境計測」  
光学, 印刷中.

##### （招待講演）

1. 中林孝和, 太田信廣, 日本分析化学会第 63 年会 2014 年 9 月, 広島  
「自家蛍光寿命を用いた生体分析化学の展開」
2. 中林孝和, 日本光学会年次学術講演会 2014 年 11 月, 東京  
「蛍光寿命イメージングを用いた細胞計測：寿命変化の機構解明」

## 内在性 mRNA の一分子イメージングによる RNA 代謝機構の解明

研究代表者：東京大学大学院薬学系研究科 岡部 弘基

### 1. 研究の概要

本研究では、これまでに開発した蛍光標識線形アンチセンスプローブを用いた細胞内 mRNA のイメージング法や、先行する新学術領域「ナノメディシン分子科学」公募研究において開発した、蛍光相関分光法 (FCS) を用いた生細胞内における mRNA 定量解析法を応用して、細胞内における内在性 mRNA の一分子イメージング法を開発した。まず、任意の標的 mRNA に対して高い親和性を有するアンチセンスプローブを得ることを目指して、多数の mRNA のプローブ候補に対し、標的 mRNA との結合能のスクリーニングを行った。この結果、複数の優れた親和性を有するプローブを得た。続いて、これらの細胞内における高感度検出により、細胞内 mRNA の一分子イメージングを行った。今後は、本法を用いて細胞内 RNA 代謝を直接観察し、その時空間的パラメータを決定する。また、そのメカニズムを解明することにより、RNA を標的としたナノメディシン領域の劇的な推進を支える礎となる知見を得る。

### 2. 研究の背景と目的

近年、siRNA や miRNA などの小分子 RNA や非翻訳 RNA の発見により、mRNA は積極的に翻訳を介して遺伝子発現を調節する機能性分子であることが示された。これら小分子 RNA の作用標的は細胞質 mRNA が担う翻訳であり、タンパク質発現量の直接的調節を担っている。このような細胞質を舞台とした RNA 代謝は細胞運命の操作に基づく治療法の開発において有望な標的である。しかしながら、細胞内における翻訳制御研究についてはそれに関与する因子同定の域を超えず、メカニズムやダイナミクスは不明であった。このことから、本研究では細胞質において mRNA の発現量や振る舞いを一分子検出により直接かつ定量的にとらえることにより、RNA 代謝を理解し、細胞機能を操作する技術基盤の創成を目指している。

これまでの本領域研究において、我々は生細胞内における蛍光標識アンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブの mRNA との相補結合に伴う拡散運動の変化に着目した新規検出法を開発した。また、これを応用して生細胞内における内在性 mRNA の定量解析および追跡法を開発し、初めて生細胞内で mRNA 分解の実時間追跡に成功した。一方、細胞内における RNA 代謝のダイナミクスとメカニズムを解明するには、個々の mRNA の受ける制御 (分解や翻訳抑制) を細胞内の局所環境において直接観察することが必須である。そこで、本研究ではこれまでに開発したアンチセンスプローブによる内在性

## 公募

mRNA の定量的検出法を駆使することにより、内在性 mRNA の一分子イメージング法を開発する。これにより細胞内 RNA 代謝のダイナミクスとメカニズムを詳細に明らかにすることに加えて、アンチセンスプローブの結合能に関する定量的かつ網羅的解析から、生細胞内における mRNA の構造や状態の理解することを目的とした。

### 3. 成果

生細胞内における mRNA の一分子可視化は、アンチセンスプローブを結合させ、一分子検出イメージング法により行うこととした。まず、GAPDH mRNA を標的として、高い親和性を有するアンチセンスプローブを開発した。GAPDH mRNA コーディング領域の予測二次構造を得た後、比較的安定して形成される局所的な構造に基づき複数の候補プローブを設計した。次に、細胞内アンチセンスプローブの拡散速度の定量解析から標的 mRNA との結合を評価することで、生細胞内での結合能に関するスクリーニングを行った。光褪色後蛍光回復 (FRAP) による細胞内拡散の定量的解析から、GAPDH mRNA に高い親和性で結合できるアンチセンスプローブを複数獲得した。得られた結合能に関する結果には、予想通り高い親和性を示すものもあったが、予想と相反する結果も得られた。そこでアンチセンスプローブの結合能に関して、配列と結合能を詳細に考察した。その結果、プローブ配列と結合能についての一般則を見出し、これに基づいて新規にアンチセンスプローブ候補を設計した。新たに設計したプローブ候補は高い確率で優れた結合能を示したことから、この知見が効率良くプローブを設計に関する際の指針となることを確認した。

次に、高親和性アンチセンスプローブを用いた細胞内 mRNA の一分子検出に取りくんだ。mRNA 由来の信号を高い信号-背景比で検出するために、複数のアンチセンスプローブを用いたり、アンチセンスプローブを標識する蛍光色素の種類や細胞内イメージング条件を詳しく検討することにより、COS7 細胞の細胞質内 GAPDH mRNA の一分子イメージングに成功した。この方法を用いることで、ストレス環境において形成するストレス顆粒 (SG) 内の mRNA の一分子追跡に応用した。今後は本法を用いた内在性 mRNA 代謝のイメージングを行う。

## Single molecule imaging of endogenous mRNA in single living cells

Kohki Okabe

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Japan*

In eukaryotic cells mRNA plays a key role in gene regulation through various step of processing throughout the cell. Direct observation of endogenous mRNA in living cells promises a significant comprehension of these refined regulation. Recently a number of fluorescent probes for mRNA have been developed including our fluorescent linear antisense probe. However, quantitative analysis and single molecule imaging of intracellular mRNAs has been difficult. In this study, we quantitatively measured the molecular diffusion of antisense probes to determine the binding ability in living cells. When antisense probes hybridize with mRNA, which forms large complexes with various RNA binding proteins, they have slower diffusion constants than unbound probes which is in a free state.

Antisense 2'-*O*-methyl RNA probes for GAPDH mRNA labeled with Cy3 were microinjected into the cytoplasm of COS7 cells and the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of antisense probes was analyzed. As we expected, probes hybridized with mRNA showed slower diffusion times than those of unbound probes. Two fractions having different diffusion times were observed, suggesting that we could detect both antisense probes-mRNA hybrid and unbound probes. The fraction ratios of bound and unbound probes were different among cells, reflecting the different affinity of various antisense probes.

Next, we performed single-molecule imaging of endogenous GAPDH mRNA in COS7 cells using high-affinity antisense probes. By optimizing the fluorophore and imaging conditions, we were able to detect single-molecule mRNA in the cytoplasm and inside of stress granule (SG). These results indicated that our method will be a powerful tool for detailed observation of RNA metabolism in real time.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Uno S, Kamiya M, Yoshihara T, Sugawara K, Okabe K, Tarhan MC, Fujita H, Funatsu T, Okada Y, Tobita S, Urano Y., A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nat. Chem.*, **6**, 681-689 (2014).

#### 総説・解説・成書

1. 岡部弘基, 「蛍光イメージング法による生細胞内温度計測法の開発と応用」, 分析科学 BUNSEKI KAGAKU, Vol. 63 No. 6, (2014), p455-465.
2. 岡部弘基, 「細胞内部の温度をみたいー蛍光イメージングによる細胞内温度変化と分布の可視化」, 実験医学(増刊号), Vol. 32 No. 15 (2014), p186-193.
3. 岡部弘基, 「細胞内温度イメージングで見えてきた熱と細胞の関係」, 生体の科学, Vol. 65 No. 5 (2014), p400-401.

#### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 岡部弘基, 第37回内藤コンファレンス ポスター賞, 「Imaging of Temperature in living cells」, ヒルトンニセコビレッジ, ニセコ町, 2014年7月18日.
2. 岡部弘基, 「定量的イメージングによる細胞機能の先端分析」, 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2014), 帝京大学, 東京都板橋区, 2014年8月20日. (招待講演)
3. 岡部弘基, “Imaging of Temperature in a Living Cell Using Polymeric Thermometer and Quantitative Microscopy”, *Advances in Live Single-Cell Thermal Imaging and Manipulation (ALSCTIM)*, 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄県恩納村, 2014年11月10日. (招待講演)
4. 岡部弘基, “細胞内温度のイメージングと操作”, 応用物理学会 量子エレクトロニクス研究会, 上智大学軽井沢セミナーハウス, 軽井沢町, 2014年12月20日. (招待講演)
5. 岡部弘基, “ポリマー温度センサーと定量的顕微鏡法を用いた細胞内温度イメージング”, 第9回 NIBB バイオイメージングフォーラム, 岡崎コンファレンスセンター(岡崎市), 2015年1月26日. (招待講演)
6. 第四回ナノメディシン分子科学若手の会, 東京大学薬学部, 2015年1月24日. (主催)

## 軸索パターンの構築において時空間情報伝達と 構造的安定化を司る分子反応の解明

研究代表者：福井大学大学院工学研究科 小西 慶幸

### 1. 研究の概要

神経軸索は分岐した枝の局所的な伸長・退縮を伴いながら形態を構築する。本研究課題では軸索パターンの調節を司る細胞内の分子反応について、時間的・空間的变化を定量的に解析し、軸索内で空間的情報が伝搬し、微細構造の変化を介して場所に依存した伸長・退縮の違いをもたらす機序をモデル化する。これまでの解析でキネシンモーター領域 (K5H) が多く分配される軸索分枝において、退縮が抑制されることを見出しており、その機序の解明を試みる。特に本年度はキネシンの下流で構造安定化を担う因子として、主に微小管についての解析を詳細に行い、軸索内で領域特異的な制御をうける機序を明らかにした。この結果、微小管の安定性はキネシンには直接依存せず、軸索分枝長に依存した制御を受ける可能性を示した。さらに軸索の成長円錐の機能において中心的な役割を担うアクチン繊維についても解析を行った。

### 2. 研究の背景と目的

神経細胞は安定性と可塑性を保ちながら複雑に分岐した軸索パターンを構築・維持する。細胞形態を司る主要な分子反応、即ちアクチン繊維や微小管の重合またモーター分子のキネティクスについての理解が進んできたが、軸索パターンの制御をこれら分子反応の延長として理解するのは容易ではない。本研究課題では細胞を構成する微細構造の動態解析に軸索内輸送を介した空間的情報の伝播という視点を加え数理的に解析し、軸索パターンを調節する分子反応のモデルを構築することを目指す。これにより、軸索変性の機序の理解や軸索再生の手法確立に役立てることを目的とする。本領域におけるこれまでの解析で、軸索パターンニングにおいて特定の枝に蛍光標識したモーター分子、キネシン (K5H-GFP) が選択的に分配されることで局所に軸索退縮を阻害する可能性を示した。さらに詳細な分子反応を明らかにするため、軸索内のキネシン分布に依存したアクチン繊維・微小管、ミトコンドリアおよび他の分子の動態を時間的・空間的に解析し、軸索内の場所に依存して安定性の違いが生じる機構を示す。

### 3. 成果

- ・ 分岐軸索における局所的な微小管動態の解析

前年度の成果として分岐した枝毎の微小管の動態を GFP-tubulin を用いた光褪色後傾向回復法 (FRAP) により解析したところ、隣接した軸索長短枝間で短枝では 3 倍近い解離反応速度の違いが検出された。この違いがキネシンに依存するか否かを明らかにす

## 公募

るため、長さが同等の軸索分枝間で蛍光標識したキネシンモーター領域 (K5H) の存在量と微小管の解離反応速度を比較した。その結果、K5H シグナル量が低い分枝では解離反応速度  $K_{off}=0.0014/s$  に対し高い分枝では  $K_{off}=0.0020/s$  であり有意な差は見られなかった。このことからキネシンの分布が軸索分枝の長さの変化を介して間接的に微小管の動態を制御する可能性が示唆された。

### ・ 分岐軸索内の微小管伸長の解析

神経細胞内に GFP-EB3 を発現させることで微小管の伸長を解析した。分岐軸索の長枝・短枝で EB3 シグナルの出現頻度を解析したところ、分岐点からの距離では短枝  $0.096/\mu m$ , 長枝  $0.046/\mu m$  で有為な差が検出された ( $p<0.05$ )。一方、末端からの距離では短枝  $0.12/\mu m$ , 長枝  $0.10/\mu m$  で有意な差は検出されなかった。また、EB3 の移動速度は約  $0.1\mu m/s$  で長枝・短枝間で有意な差は見られなかった。以上の結果から長枝・短枝間で生じる FRAP の回復速度の違いは軸索末端からの距離に依存した違いにより説明できることを示した (図 1)。これまでの解析から、神経の極性確立における突起長に依存した微小管の制御を示した Seetapun ら (Curr boil. 2010) のモデルが軸索分岐における微小管の動態の説明に当てはめられると考えられ、今後モデルの検証を行う。

### ・ 分岐軸索成長円錐におけるアクチン繊維の解析

軸索先端の成長円錐はフィロポディアやラメリポディアといったアクチン繊維の骨格に依存した特有の形態を示し、軸索の伸長や維持に重要な役割を担っている。キネシンの軸索内分布に依存して局所的に成長円錐の形態やアクチン繊維の動態が制御される可能性を検討した。Phalloidin によるアクチン繊維染色の結果、軸索を進展する培養 2 日では成長円錐の形態を示すのに対し、軸索の分岐が進む培養 5 日目には軸索先端の狭い領域にのみ限定してアクチン繊維が存在することが示された。また、Lifeact 発現プラスミドを神経細胞に導入することで、軸索パターンニングにおいてキネシンモーター領域とアクチン繊維との同時観察に成功した。軸索分岐における K5H と Lifeact のシグナル強度には正の相関が得られた。さらに軸索のタイムラプスイメージングから経時的データを取得し、時間依存的な関連を解析した結果、分岐軸索末端の K5H 量の変化に従って Lifeact のシグナルも同様に变化することが示された。このことから分岐軸索末端の F-アクチン量はキネシンに依存することが示唆された。今後、アクチンの機能阻害によりキネシンに依存した軸索分枝の安定化が抑制されるか否か解析を行う。

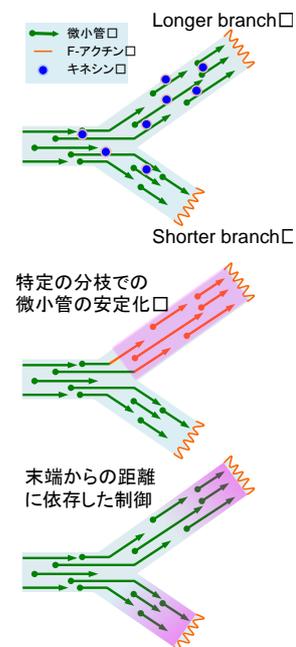


図 1 : 分岐軸索におけるキネシンの分配と微小管の制御

## **Local regulation of molecular reactions in maintaining axonal integrity**

Yoshiyuki Konishi

*Graduate school of Engineering, University of Fukui, Japan*

The maintenance of cellular morphology is especially important for neurons to make connection with specific targets. The mechanisms by which neurons locally control cellular nanostructures, such as F-actin/microtubules remained unsolved. Our aim is to demonstrate molecular systems by which neurons process spatial information and regulate cellular structure at right position at right time. We focused on the axonal branch morphology and tested the possibility that axonal transport might play roles to regulate the axonal branch pattern. Previous studies have revealed that the motor domain of kinesin heavy chain (K5H) is accumulated in axon in hippocampal neurons. We found that there is a positive correlation between signal intensity of K5H-GFP and axonal branch length, suggesting the possibility that axonal branch pattern is regulated via axonal transport. We further performed long-term multipoint time-lapse imaging of branched axons and analyzed the growth/retraction of each axonal branch. By quantitative analysis of obtained time-lapse images, we found that axonal branch which contain high ratio of K5H-GFP show lower retraction value. These results indicate the existence of novel system that maintain branched axonal pattern via controlling axonal transport.

By fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis using tubulin-GFP, We have found that in shorter axonal branches, microtubule turnover is faster than that in the longer axonal branches. We also tested whether microtubule turnover is depend on the amount of K5H in each axonal branch terminal. However, no significant difference was observed ( $K_{off}=0.0014/s$  in low K5H branch,  $K_{off}=0.0020/s$  in high K5H branch). Next we analyzed the growth of microtubules by expressing GFP-EB3 in neurons. Time laps imaging data revealed that velocity of EB3 is about  $0.1\mu m/s$  in both longer- and shorter axonal branches. There is a significant difference in the frequency of EB3 near the branching point ( $0.096/\mu m$  in shorter branch,  $0.046/\mu m$  in the longer branch), whereas there is no significant difference when that is compared near the branch terminal ( $0.12/\mu m$  in shorter branch,  $0.10/\mu m$  in longer branch). These observations support the idea that microtubule turnover is depending on the distance from the axonal branch terminal rather than regulated directly by kinesin.

We also analyzed the amount of F-actin using Lifeact, and found that there is a positive correlation between the intensity of K5H and Lifeact in each branch terminals. Furthermore, time-lapse image analysis indicated the time dependent correlation between two molecular indicators.

公募

## 業績リスト

### 学術論文

1. Yoshiyuki Konishi Y. Cellular mechanisms for the axonal pattern formation: Initiation and branch morphogenesis. *Forma* 29:51-54 (2014)

## 光増感剤修飾分子を用いた PCI の分子科学

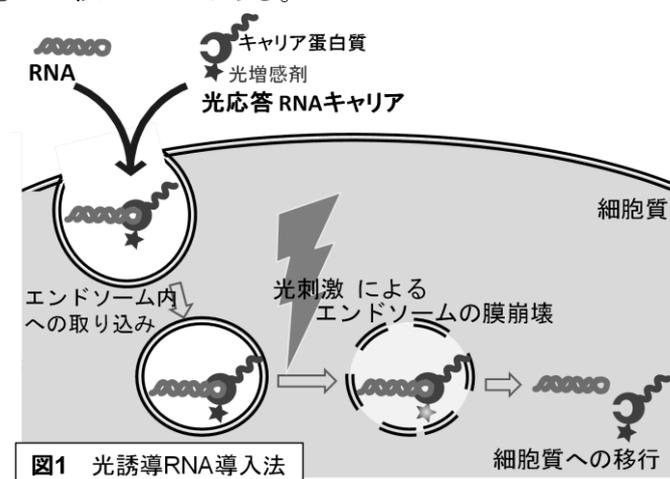
研究代表者：岡山大学大学院自然科学研究科 大槻高史

### 1. 研究の概要

細胞に投与した際エンドソームに集積する生体分子について、光と光増感剤を用いてエンドソームから脱出させる方法 (photochemical internalization; PCI) が知られている。本研究では、PCI 法における照射後のエンドソーム脱出のメカニズムを探ることを目的とする。これまでに光増感剤の性質として照射時の一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の生成が重要であることが分かってきた。本年度は、このように  $^1O_2$  の寄与が大きいことを更に裏付ける結果を得た。また、照射後の細胞観察により、エンドソームの膜にプロトンが通り抜けるような小さな隙間が生じた後に膜の破裂が起こるような現象を確認した。エンドソーム膜破壊へのコレステロールの関与が示唆された。

### 2. 研究の背景と目的

各種キャリアを用いた動物細胞内への物質導入法において、エンドサイトーシスを経由する場合、目的物質の多くがエンドソームに閉じ込められてしまう問題がしばしば起こる。この問題の解決法の1つとして、近年、光と光増感剤を用いる方法 (PCI 法) が用いられている。これはキャリア分子と共に (1) キャリア分子により運ばれる物質と (2) 光増感剤とを同時に細胞培養液に加え、(1) と (2) とをエンドソーム内に蓄積させた後に、光をあててエンドソーム脱出させる方法である。筆者らの開発した光誘導 RNA 導入法 (図1) も PCI 法の1つである。



PCI 法においてエンドソーム膜が崩壊するのは、エンドソームに集積した光増感剤が励起照射により活性酸素種を放出することが理由と考えられているが、従来の研究で

## 公募

は、PCI の成否に関わる光増感剤の性質として「細胞内局在」と「光増感反応」とがきちんと分けて議論されていなかった。また、PCI に用いられる光増感剤の性質と PCI の成否の相関を論じるには、まだ調べられた光増感剤の種類が少ない。そこで、本研究では光増感剤の「光増感反応」に着目して、光照射によるエンドソーム破壊機構の解明に取り組む。

### 3. 成果

本方法では光増感剤を大きなキャリア蛋白質に付加して用いているため、光増感剤の局在は主に蛋白質に支配されているため、様々な光増感剤を比較する上で光増感剤の「局在」ではなく「光増感反応」に依存した結果を見ることができる。昨年度までの研究で、光応答 RNA キャリアにおける光増感剤部分について多数の候補物質を用いてみた結果、光照射後の RNA のエンドソーム脱出（細胞質内拡散）の度合いが大きく異なり、それが一重項酸素 ( $^1O_2$ ) 生成の度合いと相関が高いことが分かってきた。

本年度は昨年度に加えて  $^1O_2$  生成の寄与について更に確認するとともに、 $^1O_2$  生成以降のエンドソーム破壊機構を探るための実験を行った。まず、 $^1O_2$  量子収率の極めて高い（ $\sim 0.95$ ）、すなわち吸収した光エネルギーのほとんどを  $^1O_2$  生成に用いるローズベンガルを光増感剤部分に用い、その付加率とエンドソーム破壊効率の相関が大きいことを確認した。このことはエンドソーム破壊に対し  $^1O_2$  の寄与が大きいことを裏付ける結果と考えられる。 $^1O_2$  の生成後、膜破壊までに何が起きているかも謎である。まずは、 $^1O_2$  との反応性が高いことが報告されているコレステロールの関与を疑ってみた。コレステロール阻害剤を用いた結果、光照射時のエンドソーム膜破壊の阻害が見られたため、コレステロールの関与が示唆された。また、光照射後の細胞観察により、エンドソームの膜にプロトンが通り抜けるような小さな隙間が生じた後に膜の破裂が起こるような現象を確認した。十数マイクロ秒の  $^1O_2$  の寿命と比べると、かなり長い時間（数秒から百数十秒）かけてエンドソーム破壊が起こることから、 $^1O_2$  が最初に起こす反応は膜破壊を即座に起こしうるものではないと推察される。 $^1O_2$  と最初に反応した何らかの物質はじわじわ時間をかけて膜を不安定化させるか、または別の物質との反応を経由して膜不安定化に関わるのだと考えられる。

## **Mechanism of photochemical internalization using photosensitizing molecules**

Takashi Ohtsuki

*Department of Biotechnology, Okayama University, Japan*

In many drug delivery strategies, an inefficient cytoplasmic uptake of the drug often occurs due to endosomal entrapment. One of the methods to overcome this problem is to use a photosensitizer and light for disruption of the endosomal membrane. This method is referred to as photochemical internalization (PCI). It has been considered that the endosomes are disrupted by reactive oxygen species generated photo-dependently from the photosensitizer. However, “photosensitizing reaction” and “cellular localization” of photosensitizers have not been separately discussed in the previous reports. In addition, it is necessary to compare many kinds of photosensitizers to discuss their property important for PCI. In the photo-dependent cytosolic RNA delivery method that is one of the PCI strategies, an RNA carrier protein carrying a photosensitizer is used. The localization of the “small” photosensitizer is strongly affected by the “large” RNA carrier protein. Thus, by using this system, we can discuss only “photosensitizing reaction” and the factor of “cellular localization” can be ignored.

In this study, we designed and prepared peptide-photosensitizer conjugate molecules (photosensitizing peptide molecules), such as a photosensitizing RNA carrier and photosensitizing apoptosis-inducing molecules, for the PCI strategy. The photosensitizing peptide molecules are considered as examples for a drug-carrier complex covalently attached to a photosensitizer. In addition, molecular mechanism of the light-dependent endosomal disruption was elucidated using these photosensitizing molecules. Correlation plots between photoresponsive parameters and endosome escape efficiency suggested that  $^1\text{O}_2$  quantum yield of the photosensitizer was highly related to the endosomal escape efficiency. This was confirmed by the experiment using  $^1\text{O}_2$  quenchers. Involvement of cholesterol in the endosomal escape was also suggested. By time-lapse imaging of endosomal escape of the photosensitizing molecule, we observed pH increase in the endosome followed by the endosome disruption.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Akahoshi, A., Doi, Y., Sisido, M., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Photo-dependent protein biosynthesis using a caged aminoacyl-tRNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 5369–5372 (2014)
2. Watanabe, K., Ijiri K., Ohtsuki, T., mTOR regulates the nucleoplasmic diffusion of Xrn2 under conditions of heat stress. *FEBS Letters*, 588, 3454–3460 (2014)
3. Hakata, Y. Tsuchiya, S., Michiue, H., Ohtsuki, T., Matsui, H., Miyazawaa M. and Kitamatsu, M., Intracellular delivery of a peptide cargo by a cell-penetrating peptide via leucine-zippers does not affect the function of cargo, *Chemical Communications*, 51, 413-416 (2015)

### 総説・解説・成書

1. Watanabe K. and Ohtsuki T., Intracellular delivery of RNA via RNA-binding proteins or peptides. **Fundamental Biomedical Technology**, Vol 7 (Intracellular Delivery), Prokop, Iwasaki & Harada(Eds), Chapter 19 (2014).
2. Watanabe, Y., Suematsu, T. and Ohtsuki T., Losing the stem-loop structure from metazoan mitochondrial tRNAs and co-evolution of interacting factors. **Frontiers in Genetics** (2014) 5:109.
3. 大槻高史, PCDR 法と CLIP-RNAi 法, 生命化学研究レター, No.46, pp.10-14 (2014)

### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 特許：特願 2014-227611、大槻高史、小関 英一、小淵浩嗣、松浦栄次「ポリ乳酸修飾 RNA を含有する分子集合体及びそれを用いた RNA 送達システム」2014 年 11 月 8 日出願
2. 特許：特許第 5660537 号、大槻高史、宍戸昌彦、公文裕巳、柏倉祐司、落合和彦、「乳酸菌により二本鎖 RNA を生成するキット及びその利用」2014 年 12 月 12 日登録

## 1 細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いた

### 細胞死に関わる生体分子の1分子計測

研究代表者：大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター 許 岩

#### 1. 研究の概要

本研究は、細胞死を1細胞かつ1分子レベルで定量的に理解するために、1細胞分析に最適かつ1細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いて、細胞死に関わる最も重要なタンパク質の1つであるシトクロムc (cytochrome c) の1分子計測法を開発する。本年度は、独自に開発した(1) ガラスナノチャネルの低温または室温接合法(従来は高温1000℃が必要)と、(2) ナノチャネルで光の回折限界を超える自在なナノパターンニング法、という二つの世界初の技術を利用して、シトクロムcの1分子計測チップの作製ができた。さらに、このチップを用いて、シトクロムcの1分子計測へ必要かつ不可欠な自己組織化単分子膜(SAM)の高密度ナノアレイ化に成功している。現在、シトクロムcを捕捉する抗体のナノチャネル内固定化を推進しているところである。

#### 2. 研究の背景と目的

細胞アポトーシス(apoptosis)すなわちプログラムされた細胞死に関わる生体分子の計測は、癌または免疫疾患や神経変性疾患などの疾患メカニズム解明と治療法の開発への応用に繋がる。現状では、アポトーシスの研究において、細胞集団レベルでのアポトーシスに関わる平均的な生体分子情報が利用されている。しかし、細胞集団のアポトーシスは細胞集団を構成する個々の細胞のアポトーシス進行および相互作用などによる結果であり、アポトーシスの誘発メカニズムや疾患との関連性などを精密に明らかにするために、アポトーシスを1細胞かつ1分子レベルで定量的に理解しなければならない。そこで本研究の目的は、細胞死を1細胞かつ1分子レベルで定量的に理解するために、アポトーシスに関わる最も重要なタンパク質の1つであるシトクロムcに着目し、独自に開発した1細胞分析に最適かつ1細胞内環境の特徴を有するナノチャネル技術に基づいて、シトクロムcの1分子計測法を開発し、アポトーシス進行とシトクロムcの量との相関関係を明らかにすることである。アポトーシスにおけるシトクロムcを1細胞かつ1分子レベルで定量することは、細胞死を起こす原点の究明に迫り、細胞死の初期段階における化学反応様式の定量的な理解を可能とし、ナノメディシン研究目標である細

## 公募

胞環境における分子反応への理解の推進に大きく貢献できる。

### 3. 成果

シトクロム c の 1 分子計測チップは、マイクロチップに配置された百本のナノチャンネル内に分子捕獲用金ナノアレイを有する構造となる。1 本のナノチャンネルは、細胞の体積 (数ピコリットル pL、 $pL = 10^{-12} L$ ) より 2 桁小さい数十フェムトリットル ( $fL = 10^{-15} L$ ) 容積をもつため、細胞内容物を 1 分子レベルで解析するには最も適している。さらに、百本程度のナノチャンネルを配列することにより、1 細胞体積とほぼ同じ容積を有する細胞内環境のような狭い分子が込み合った空間を再現することができる。

本研究では、2 本の U 字型流体導入用マイクロチャンネルを 100 本のナノチャンネルで繋げた架橋構造を設計し、それぞれのチャンネル基板を作製した後に接合させている。まずフォトリソグラフィーに続くプラズマエッチングでマイクロチャンネルを作製した。流体導入しやすいようにマイクロチャンネルを幅 400  $\mu m$ 、深さ 3  $\mu m$  と設計し、電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) と表面形状測定装置で設計通りにマイクロチャンネルが作製できたことを確認した。一方、ナノチャンネルで光の回折限界を超える自在なナノパターンニング法に基づき、電子ビームリソグラフィ (EBL)、プラズマエッチングで 100 本のナノチャンネルを作製した後、再び EBL、プラズマエッチング及び真空蒸着、リフトオフといった工程でナノチャンネル内にナノ金表面アレイを作製した。FE-SEM や表面形状測定装置で、長さ 400  $\mu m$ 、幅 800 nm、間隔 2  $\mu m$ 、深さ 300 nm のナノチャンネル内に 1 本につき 160 個、計 16000 個の 500 nm ナノ金表面アレイが確認できた。最後に、ナノチャンネル内金ナノアレイに優しい、独自に開発したガラスナノチャンネルの低温または室温接合法 (従来は高温 1000°C が必要) で、2 枚の基板を接合させることで、チップができあがった。

本研究ではポワソン分布理論による 1 分子単位で目的分子捕獲という仕組みとなるため、標的分子数がナノ金表面アレイ数の 10% 未満である場合、個々のナノ金表面が標的分子 1 つと結合しているか、または全く結合していないかのいずれかになる。計算では試料濃度が 0.26 nM 以下である場合、標的分子数がナノ金表面アレイ数の 10% 以下となり、ポワソン分布に従う。1 細胞内主要なタンパク質の濃度は約 0.17 nM であるため、本研究で設計したナノチャンネルは上記のような超微量かつ高濃度な試料の 1 分子計数に適していると考えられる。

また本研究では、ナノチャンネル内の金ナノアレイ上に形成させた SAM によりシトクロム c 捕捉抗体を固定するので、作製したチップを用いて SAM 形成実験を行い、高密度の SAM ナノアレイの作製に成功した。現在、シトクロム c を捕捉する抗体のナノチャンネル内固定化を推進している。

## **Measurement of single cell apoptosis at the single-molecular level by using nanofluidic channels**

Yan Xu

*Nanoscience and Nanotechnology Research Center, Research Organization for the 21st Century,  
Osaka Prefecture University, Japan*

To precisely clarify the induction mechanism of apoptosis and its relations to diseases, it is necessary to quantitatively understand apoptosis of single cells at the single molecular level. The purpose of this study is to develop a method to measure cytochrome c in single cell at the single molecular level by using nanofluidic channels. Cytochrome c is one of the most important proteins involved in the initial stage of apoptosis. Quantification of cytochrome c in apoptosis of single cells at single molecular level enables to approach the origin of cell death and enable quantitative understanding of the biochemical reaction at the early stage of cell death.

We achieved the fabrication of the nanofluidic chip for measurement of cytochrome c at the single molecular level in this year. The nanofluidic chip contains a micro-/nanofluidic channel hybrid. The nanofluidic chip was fabricated in the glass substrates using two original techniques. One technique is site-specific nanopatterning of arbitrary features in nanofluidic channels. Another technique is low-/ room-temperature bonding of glass nanofluidic channels. In the chip, two side microfluidic channels are bridged by 100 parallel arrayed nanofluidic channels, with gold nanoarray in each nanofluidic channel. The structure provides 16000 nanodot-shaped gold array in the arrayed nanofluidic channels in the chip. Each nanofluidic channel has an ultra-small volume of approximately 96 fL ( $\text{fL} = 10^{-15} \text{ L}$ ). Thus, the arrayed nanofluidic channels are appropriate to handle 9.6 pL ( $\text{pL} = 10^{-12} \text{ L}$ ) liquid, which is approximately as same as the volume of a single mammalian cell.

In order to capture cytochrome c molecules, we proposed to immobilize the capture antibody of cytochrome c on the gold nanoarray via self-assembled monolayers. Hence, we further performed the formation of nanoarray of self-assembled monolayers (SAMs) on the gold nanoarray in the nanofluidic chip via well-known thiol-gold interactions. All liquids were introduced to the arrayed nanofluidic channels through the microfluidic channels by air pressure. The capability of formation of a fluorescein-disulfide SAM nanoarray on the gold nanoarray in arrayed nanofluidic channels was confirmed by using a fluorescence microscope.

Currently, we are focusing on the immobilization of capture antibody of cytochrome c in the chip for single molecule detection.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Yan Xu, Nobuhiro Matsumoto, Qian Wu, Yuji Shimatani, and Hiroaki Kawata. Site-Specific Nanopatterning of Functional Metallic and Molecular Arbitrary Features in Nanofluidic Channels. *Lab Chip*, in press

### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 受賞：許岩 「平成 25 年度化学とマイクロ・ナノシステム学会若手優秀賞」 2014 年 5 月 22 日
2. 受賞：許岩 「阪府立大学平成 26 年度学長顕彰」2014 年 8 月 11 日
3. 特許：許岩 「流路構造体および流路構造体の製造方法」 特願 2014-101461 号 出願日：2014 年 5 月 15 日
4. 招待講演： Yan Xu. Functionalization of Nanofluidic Channels and its Application to NanoBio Sciences, “Summit of Biomedical and Health Engineering (2015), SIAT, CAS”. Shenzhen, China, Jan., 2015
5. 活動：許岩 一般市民向けの科学セミナー NanoSquare カフェ「マイクロ・ナノ化学チップ技術の最前線」 2015 年 3 月 7 日

## 高分子超薄膜を用いた未活性浮遊細胞固定技術 “ナノラッピング”の確立と機能解明

研究代表者：東海大学創造科学技術研究機構 岡村 陽介

### 1. 研究の概要

生体組織や浮遊細胞のイメージングは、ガラス基板に乗せて緩衝液を滴下した状態で観察するのが常套手段である。しかし、緩衝液の蒸発に伴う生体組織や浮遊細胞の乾燥やステージを移動する際のぶれがしばしば問題となる。今年度は、生体組織用の透明な撥水性超薄膜(膜厚 100 nm 以下)を新規に創製した。生体組織は撥水性超薄膜でラッピングでき、超薄膜が有する撥水性と高い接着性を利用することで生体組織の保水・保定を実現するイメージングツールへの応用の可能性を見出した。

### 2. 研究の背景と目的

高分子を超薄膜(膜厚 100 nm 以下)に加工すると、ナノ厚特有の高柔軟性・高接着性が発現する<sup>[1]</sup>。このため、反応性官能基や接着剤を使用せず物理吸着のみで種々の界面(皮膚や臓器等)に貼付できる。生体組織のイメージングは、ガラス基板に乗せて緩衝液を滴下した状態で観察するのが常套手段であるが、緩衝液の蒸発に伴う組織の乾燥やステージを移動する際のぶれが問題となる。一方、血球を代表とする浮遊細胞は、液中ではブラウン運動して焦点が定まらない他、ガラス基板上では瞬時に活性化するため未活性状態からのイメージングは難しい。 [1] Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* **21**, 4388 (2009).

本研究では、生体組織や浮遊細胞を超薄膜で固定する技術「ナノラッピング」を提案し、新規イメージングツールに応用する(Fig. 1)。前者では、撥水性超薄膜を創製して生体組織をラッピングし、生体組織の保水・保定を実現する。後者では、液性刺激因子が自由に透過できるように貫通孔を設けた超薄膜を新規に創製して浮遊細胞を基板にラッピングして固定し、刺激前後の細胞機能を解明する。今年度は、前者に関して報告する。

### 3. 成果

#### 3.1. 撥水性超薄膜の創製と物性

SiO<sub>2</sub> 基板上にポリビニルアルコール(PVA)水溶液、含フッ素高分子溶液(CYTOP, 10 mg/mL, 旭硝子社製)の順にスピコートした(Fig. 2)。基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲層が瞬時に溶解し、基板の形状を維持した超薄膜が水面に浮いた状態で回収できた(Fig. 3a, 膜厚: 18 ± 0.2 nm)。これは CYTOP の撥水性に起因し、大気に面したほうが安定であるためと考えられる。実際、撥水性超薄膜の水接触角は 111 ± 1° と計測され、

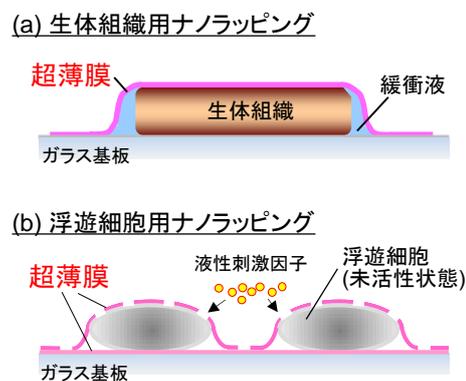


Fig. 1 本研究構想 (生体組織や未活性浮遊細胞を「ナノラッピング」して、保水・保定する技術を提案)



Fig. 2 撥水性超薄膜の調製法

その表面は確かに撥水性であった(Fig. 3b)。また、分光光度計にて透過率を測定したところ、紫外・可視領域(200-800 nm)で吸収はみられず、撥水性超薄膜の高い透明性を実証した。さらに、超薄膜の膜厚はスピコート時の CYTOP 溶液の濃度に比例し、膜厚は任意に制御できることも確認した。以上より、透明な撥水性超薄膜の創製に成功した。

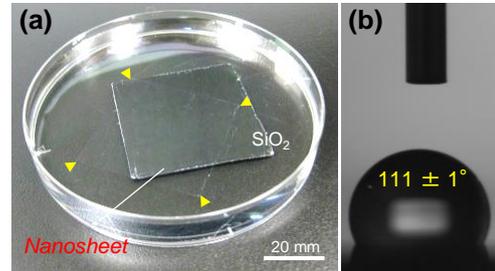


Fig. 3 (a) 水中で基板から剥離させた撥水性超薄膜。(b) 撥水性超薄膜の水接触角測定。

### 3.2. 撥水性超薄膜の保水能

撥水性超薄膜は、種々の界面に貼付あるいはラッピングすることができる。ここでは、撥水性超薄膜の保水効果に注目した。まず、モデルとしてアルギン酸ヒドロゲルを恒温恒湿下で静置したところ、水の蒸発に伴ってゲルは収縮し、約 10 時間後には完全に乾燥した(Fig. 4a,b)。そこで、撥水性超薄膜でラッピングしたところ、膜厚の上昇と共にゲルの乾燥を顕著に抑制でき、明らかな保水効果が見られた(Fig. 4a,b)。他方、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)からなる超薄膜(水接触角: 68 ± 1°)を比較対照としたところ、保水効果は確認できなかった(Fig. 4b)。

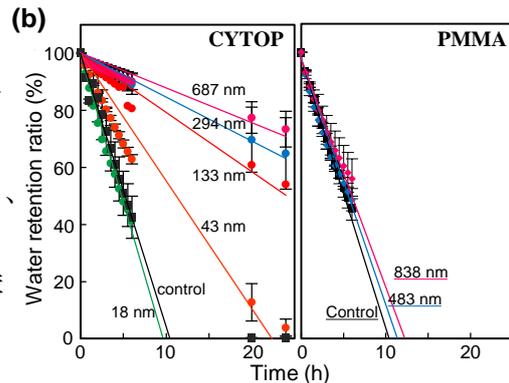
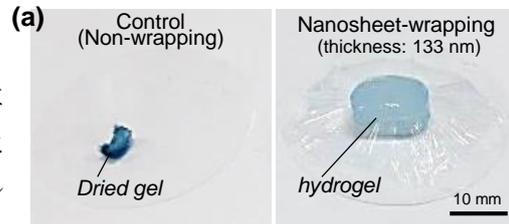


Fig. 4 (a) 撥水性超薄膜によるヒドロゲルのラッピング(写真は恒温恒湿下(25°C, RH: 50%)で 24 時間静置した写真)。(b) ゲルの保水率と撥水性超薄膜の膜厚の関係(PMMA 超薄膜の保水率と比較)。

次いで、生体組織(脾臓)を用いて保水効果を検討した。ゲルと同様に、撥水性超薄膜(膜厚: 133nm)で脾臓を基板ごとラッピングでき、ガラス基板間に安定に固定化された。恒温恒湿条件下に静置したところ、ラッピングしない群と比較して、明らかな保水効果が観察された。これは、超薄膜の撥水性を保水能に転換した結果であり、撥水性超薄膜のユニークな特徴を見出した。

### 3.3. 撥水性超薄膜の保定能

蛍光標識ラテックスビーズ(1 μmφ)を内包したヒドロゲルをガラス基板に乗せ、リン酸緩衝液を滴下し、蛍光顕微鏡にて観察したところ、ビーズは同一方向に移動、すなわちゲル全体のぶれを確認した。そこで撥水性超薄膜(膜厚: 133 nm)でゲルをラッピングしたところ、ビーズの移動は見られなかった。以上の結果より、撥水性超薄膜は保水・保定を実現する生体組織用イメージングツールへの応用の可能性を見出した。

## **Fabrication of Nanosheets for Bio-imaging of Tissues/Floating Cells ~Nano-wrapping to provide water retentivity and fixation~**

Yosuke Okamura\*

\* *Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, Japan*

We have developed free-standing ultra-thin films (often called nanosheets or nanomembranes) for biomedical applications. The nanosheets possess a thickness of less than 100 nm and represent unique properties such as good adhesiveness, amazingly flexibility and a high degree of transparency<sup>[1]</sup>. On the other hand, for bio-imaging, tissues and floating cells are typically observed on the glass substrate, to which physiological buffer is added to avoid drying. However, tissues and floating cells are gradually dried during observation due to evaporation of water. Moreover, it is often difficult to be come into focus due to moving them into buffer. To this end, we develop the nanosheets as a bio-imaging tool of tissues and floating cells to provide water retentivity and fixation on the substrate. In this fiscal year, we propose a water-repellent nanosheet composed of fluorine-containing polymer (CYTOP, Asahi Glass Co., Ltd.) for tissue-imaging.

An aqueous solution of 10 mg/mL poly(vinyl alcohol) (PVA) as a water-soluble sacrificial layer was pipetted onto a silicon wafer (SiO<sub>2</sub> substrate, typical size: 40 × 40 mm). The substrate was spin-coated for 20 s at 4,000 rpm, followed by drying at 70°C. The PVA-coated substrate was then spin-coated with a 10 mg/mL of CYTOP solution under the same conditions. When the substrate was immersed into water, the water-repellent nanosheet was instantly detached from the substrate by dissolving only the PVA sacrificial layer with water. The thickness of the nanosheet was approximately 20 nm and the nanosheet represented the water-repellent property, yielding the water-contact angle of  $111 \pm 1^\circ$ . Moreover, the thickness was proportional to the concentration of CYTOP utilized for spin-coating.

When only alginate hydrogels as a model were incubated on the glass substrate for 24 h under the conditions of constant temperature and humidity (25°C, RH: 50%), they were completely dried within 10 h. However, the hydrogels wrapped with the water-repellent nanosheets were significantly prevented the evaporation of the water. On the other hand, poly(methyl methacrylate) nanosheets (water-contact angle:  $68 \pm 1^\circ$ ) were no effect on the water retention. Moreover, we demonstrated that the water-repellent nanosheets were also prevented the drying of the mouse spleens and firmly fixed on the substrate due to the high adhesiveness of the nanosheets. These water-repellent nanosheets therefore would be a helpful tissue-imaging tool to provide water retentivity and fixation.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

該当なし

#### 総説・解説・成書

1. Yosuke Okamura\* and Yu Nagase. Fabrication of Bio-friendly Polymer Nanosheets for Biomedical Applications. *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* **39**, 379-384 (2014).
2. Yu Nagase\* and Yosuke Okamura. Synthesis of New Biocompatible Polymers and Fabrication of Nanosheets. *Biomedical Engineering*, one chapter contribution edited by InTech (2015) *in press*.

#### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

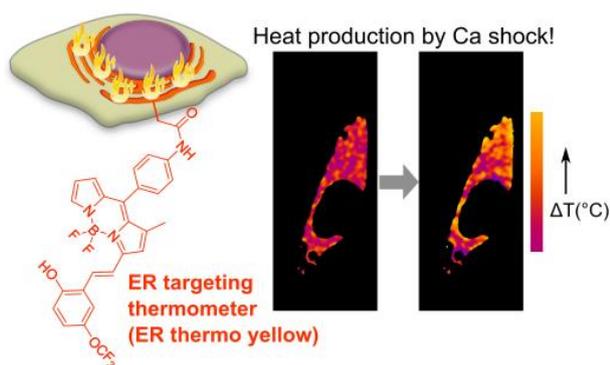
1. 学会発表: 岡村 陽介\*, 増田 愛美, 小田 龍馬, 長瀬 裕. 含フッ素高分子からなる撥水性超薄膜の調製と物性評価. 第 63 回高分子討論会 (2014 年 9 月 24 日, 長崎).
2. 学会発表: 増田 愛美, 長瀬 裕, 岡村 陽介\*. フッ素含有高分子からなる撥水性超薄膜の創製と機能評価. 第 58 回湘北地区懇話会 (2014 年 11 月 21 日, 神奈川).
3. 学会発表・受賞: Ami Masuda, Yu Nagase and Yosuke Okamura\*. Preparation and Characterization of Fluorine-containing Polymer Ultra-thin Films with Water Repellency. 第 24 回日本 MRS 年次大会 (2014 年 12 月 11 日, 横浜). (奨励賞受賞)

## 高精度の位置決めと環境測定を細胞内において一粒で可能にする 粒状蛍光プローブ

研究代表者：早稲田大学重点領域研究機構 鈴木 団

### 1. 研究の概要

時々刻々とめまぐるしく変化する細胞内環境を、位置を特定しながら正しく測ることは、細胞内で起こる生命反応の正確な理解につながる技術となる。本年度に我々は、生きた細胞の膜小胞体（ER）に局在する低分子型の温度計分子を利用した。ER 膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプを主要な熱源とする熱産生を狙い、カルシウムショックに伴う熱産生の計測



と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態との相関を得た（図、論文 1）。また、大型甲虫が生きたままその内部状態を計測する *in vivo* 蛍光イメージング系を開発した。エサに混ぜたさまざまな蛍光色素を、経口投与を介して大型甲虫の体内に取り込ませることで筋肉を蛍光染色し、電気刺激による筋肉の  $\text{Ca}^{2+}$  応答が検出できることを示した（論文 2）。

### 2. 研究の背景と目的

細胞内では多数の異なる物質、構造体がひしめき合い、薄い溶液系とはまるで異なる特殊な細胞内環境を作り出している。さらに細胞内・間の情報伝達や細胞運動といった活動により、このような細胞内環境は空間的にも時間的にもめまぐるしく変動する。細胞生物学はもちろん、細胞を治療や診断の対象にしようとする革新的な医療技術や新しい産業技術においては、このように変化する細胞内環境を計測すること、細胞内分子や器官の働きを連続して捉えること、の 2 つが同時に求められる。

本研究では、細胞内環境に感受性を持ち、環境を記述するのに十分な空間分解能とリアルタイムで計測が可能な時間分解能とを併せ持つ新しいプローブ、またこれらプローブに適した計測技術をセットで開発することを目指す。この新しい方法を用いれば、細胞内の局所で、カルシウム濃度を初めとした細胞内環境の変化と分子や器官の位置の変化とを、これまでになく精度で測ることが可能となる。

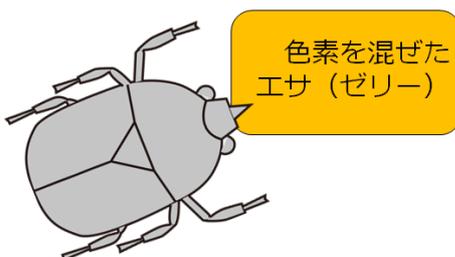
### 3. 成果

ER は細胞の内部で熱発生源となりうる。本研究では、顕微鏡を用いて小胞体の温度を測る技術を開発した。共同研究者らが開発した蛍光色素ライブラリーの中から、ER に集積し、かつ温度変化に対して蛍光強度がより大きく変化する色素 (ER thermo yellow) を利用した。これは、温度上昇 1 度あたり蛍光強度が約 4% の減少を示す、非常に高い感度を持った蛍光温度センサーであった。さらに ER thermo yellow は、培地に混ぜて細胞へふりかけるだけで、筋肉細胞や褐色脂肪細胞へも容易に導入できた。蛍光ナノ粒子型、蛍光タンパク質型といった細胞用の蛍光温度センサーはこれまでも報告されている。しかし細胞 (特に初代培養細胞) への導入は極めて困難であったり、あるいは煩瑣な作業を伴う問題点があった。我々の見出した蛍光分子の「簡便さ」という利点は、大きな技術的進歩と言える。

ER thermo yellow を利用することで、HeLa 細胞の ER、すなわち熱源からの距離がゼロの場所にこの温度計を選択的に配置した。カルシウムイオンフォアによる細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の急激な上昇に伴う熱産生を、リアルタイムで計測することに成功した。温熱療法は、熱に弱いとされるガン細胞を、熱を用いて死滅させる手法である。今回開発した分子サイズの温度計を用いて、目視では分からない微小のガンを、顕微鏡下で、実際の温度を測りながら死滅させるなどの応用も考えられる (論文 1)。

生きた動物個体で、細胞内の情報を単一細胞レベルで計測することは本研究の最終目的の一つである。動物個体への薬物の動態や物理的な刺激による生理的な応答を観察し計測する際、対象を、生理的な応答を検出するプローブで予め標識しておく必要がある。遺伝子工学的なラベルは一般的であるが、細胞内の部位特異的に蛍光ラベルすることが可能である反面、動物個体を遺伝子的に蛍光標識することは、実験動物・昆虫モデルの作成に長時間要するなどの技術的・経済的な課題がある。加えて、評価の対象が、遺伝的に同一の個体群に限定されるという問題もある。本研究で我々は、クビワオオツノカナブン (*Mecynorrhina torquata*) をモデル系として用いた。餌に  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素、電位変化感受性蛍光色素、細胞質染色蛍光色素を混ぜ、経口投与し、昆虫類・節足動物の特徴である開放血管系を利用して全身を循環させた。光学顕微鏡下で、電気刺激に応答した脚の筋肉内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化が検出できることを示した。

筋肉や神経は、細胞レベルで見ると、昆虫とヒトとの間で共通点が非常に多い。特に  $\text{Ca}^{2+}$  の例は筋肉や神経に関わる多くの疾患に関係する普遍的な因子であり、波及効果が特に広いと考えている (図、論文 2)。



- 染色時に、麻酔や体の固定が不要。
- 通常の飼育条件下で染色できるため、動物にストレス無し。

## Single fluorescent nanoparticles measuring the location and the environment in living cells

Madoka Suzuki

*Organization for University Research Initiatives, Waseda University, Japan*

Cellular functions are affected by externally applied stimuli such as electrical, chemical, or physical factors. In this project, we aim to develop probes and microscopy methods that can measure the intracellular environment.

In this fiscal year 2014, we completed (1) the development of a novel fluorescent thermometer probe targeting the endoplasmic reticulum in single living cells, and (2) the construction of *in vivo* monitoring method of calcium dynamics in muscles of a live insect.

(1) Fluorescent nanothermometers can measure intracellular temperature as fluorescent signals. In this study, we reported the first thermosensitive fluorophore, ER thermo yellow, that selectively targets endoplasmic reticulum (ER). ER thermo yellow stains ER evenly in various kinds of live cells including primary culture cells, and visualizes the intracellular temperature gradient imposed by external small heat source. In HeLa cells, we demonstrated that ER thermo yellow can monitor heat production by the abrupt increase of intracellular calcium level.

(2) Calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) works as a second messenger in the cell that converts these stimuli received at the plasma membrane into the intracellular cascade of signaling. Fluorescent calcium indicators are widely accepted as convenient tools in biology. However, delivery of these chemical dyes into living animals for fluorescence imaging remains still challenging. Genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  sensors are other options to visualize  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics *in vivo*, but the applications are limited only to model animals such as fruit flies, mice and rats. Here we introduce a non-invasive and simple method for staining live beetles, in which chemical fluorescent dyes can be orally dosed. When a chemical  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, Fluo-8, AM, was orally introduced into an insect via food, we found that the indicator diffused from the insect digestion system to the target muscle tissue. The fluorescence intensity of Fluo-8 and the frequency of electrical stimulation were observed, indicating the orally dosed Fluo-8, AM, was successfully cleaved into Fluo-8 in muscle cells and monitored  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics of the cells. This novel method will potentially enable researchers to monitor various signaling events in a variety of insect tissues including muscle and nerve systems.

## 公募

## 業績リスト

### 学術論文

1. Arai, S., Lee, S.-C., Zhai, D., Suzuki, M. and Chang, Y.-T. A Molecular Fluorescent Probe for Targeted Visualization of Temperature at the Endoplasmic Reticulum. *Sci. Rep.*, **4**, 6701 (2014)
2. Ferdinandus, Arai, S., Ishiwata, S., Suzuki, M. and Sato, H. Oral Dosing of Chemical Indicators for In Vivo Monitoring of Ca<sup>2+</sup> Dynamics in Insect Muscle. *PLoS ONE*, **10(1)**, e0116655 (2015)

### 総説・解説・成書

1. 鈴木団：熱パルスによる細胞機能の変調, 『1 分子生物学』 (編集:石渡信一、原田慶恵), 化学同人 (2014)
2. 大山廣太郎、新井敏、鈴木団:細胞内の温度測定に適した蛍光ナノ温度計, *ナノ学会会報*, **13(1)**, 49-56 (2014)

### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 招待講演: 鈴木団 「Thermal activation and temperature measurement of single living cells」 *Advances in Live Single-Cell Thermal Imaging and Manipulation (ALSCTIM 2014)* (2014)
2. 招待講演: 鈴木団 「細胞内温度計測」 分子科学研究所研究会 「細胞核内反応の分子科学」 (2014)
3. 招待講演: 鈴木団 「1 細胞サイズの温度を測る蛍光顕微温度イメージング」 甲南大学サイエンスライブチケット/第 13 回 NMMS セミナー (2014)
4. 招待講演: 鈴木団 「Microscopic Manipulation and Optical Imaging for Quantification in Biology」 *Asia Biofusion-Measurement Joint CoP Event, P&G* (2014)

## イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性と

### ナノメディシンの評価

研究代表者：東京医科歯科大学生体材料工学研究所 合田 達郎

#### 1. 研究の概要

細胞・バイオミメティックス界面・ラベルフリー型センサーを融合させ、細胞膜近傍微小環境での生体分子活性化機構を高感度・高精度に解析することにより、科学パラメータを用いた細胞毒性や細胞病態の統一的定量評価をおこない、生体のシステム化された動的な応答機構を分子レベルで解明することを目的とする。免疫応答やアポトーシスに代表されるシステム化された生体反応は微小環境に連動して大きく変化することが知られており、生体分子の病巣特異的な活性化機構の一部はイオン・温度・pH 変化といった物理化学的微小環境変化や細胞膜自身の形質変化が引き金になっている。そこで、バイオミメティックス工学と高感度バイオセンシングを融合し、特殊な細胞膜微小環境を人工的に再構築し、生体内での局所的な変化を引き金とする分子活性化機構の物理化学的パラメータを明らかにする。また、上記の技術を用いて、遺伝子送達キャリアなどのナノ材料の細胞膜通過機構や治療効果・細胞膜障害性を定量的に解析する。

#### 2. 研究の背景と目的

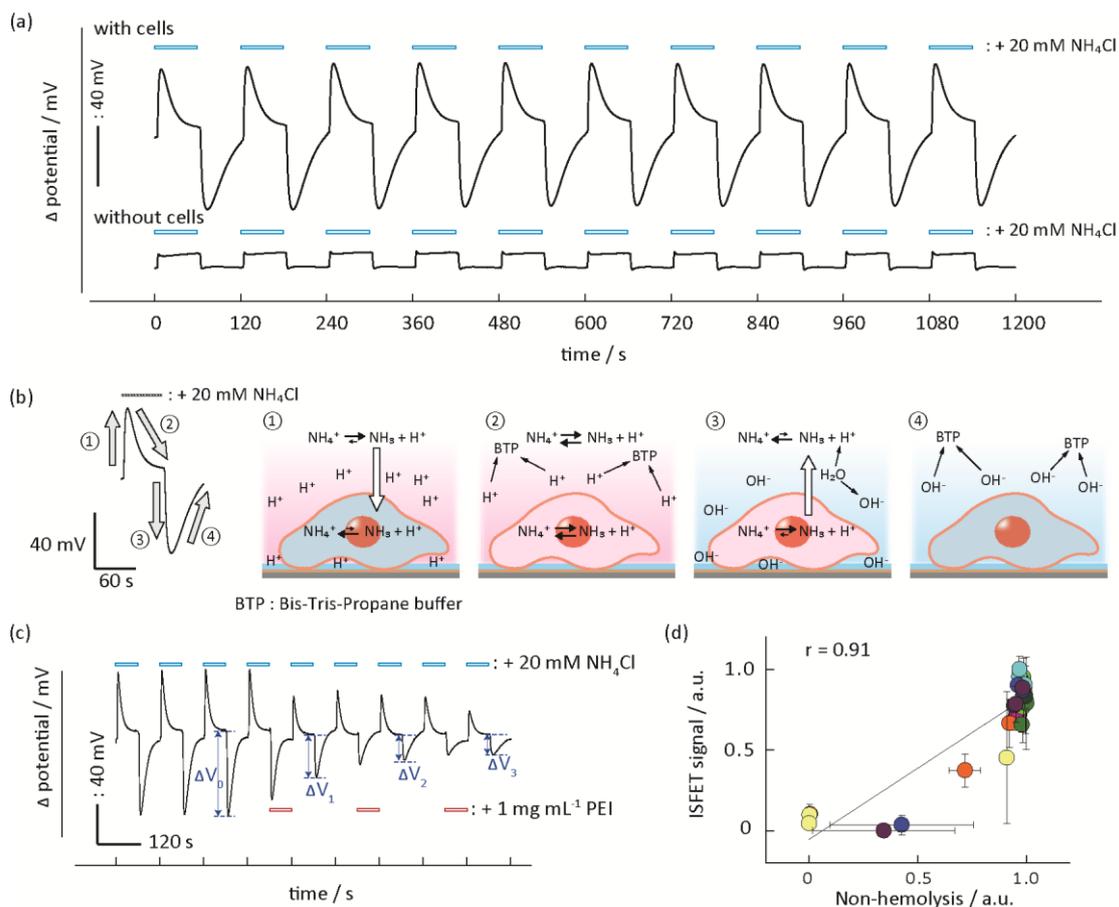
核酸や薬物のキャリアである各種ナノマテリアルの細胞内送達の分子メカニズムや、細胞内輸送にともなう細胞毒性誘起の分子科学など、ナノメディシンのための分子科学を構築し、将来的な高スループット薬剤スクリーニングへの応用や、動物実験の代替評価技術の礎を構築する必要がある。そこでバイオミメティックス技術とバイオセンサーを組み合わせて、細胞膜近傍の特定イオンを高感度・高精度に測定することにより、ナノ材料の細胞膜通過機構、各種オルガネラでの生化学反応に対する細胞内外でのイオン収支の解明、ナノ材料が細胞に形成する一時的なナノポアがもたらす胞膜障害性を定量的・一義的に評価することを目指す。

#### 3. 成果

微小流路と ISFET (Ion-Sensitive Field-Effect Transistor) からなる半導体型 pH センサーのゲート部に細胞を直接播種し、ゲート電極-細胞間のナノ空間における一時的な pH 変化を細胞膜の半透膜としてのバリア性の指標とする、新しい細胞膜障害性評価法を開発した。細胞非侵襲的に  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液を作用させると  $\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}^+$  のアンモニア平衡反応と、 $\text{NH}_3$  選択的な細胞膜透過によって、溶液を添加した瞬間にゲート電極-細胞間のナノ空間で過渡的な pH 変化が起こる(図 a)。これは非イオン性の  $\text{NH}_3$  分子のみが細胞膜を透過し、平衡反応

## 公募

により細胞外において  $H^+$  が過剰に産生されることに由来する (図 b)。  $NH_3$  の細胞内への受動拡散の終了に伴い (~ 1 min)、細胞膜近傍の過剰な  $H^+$  由来の正のピークは収束する。次に、細胞外液を元の緩衝液に交換すると、細胞内から  $NH_3$  の選択的受動拡散が起こり、平衡反応に従って細胞膜近傍で  $H^+$  が消費されることによって一時的な負方向のピークが出現する。ここで、膜障害性を有する様々な化合物を細胞に作用させると  $NH_3$  のみならず  $NH_4^+$  と  $H^+$  も透過するようになり、  $NH_4^+ \rightleftharpoons NH_3 + H^+$  平衡反応の乱れが小さくなることで一時的な pH 変化は減少することが明らかとなった (図 c)。ピークの減少率をパラメータとして、化合物を 1 分間接触させた後の膜障害性を評価し、従来法である赤血球溶血試験結果との比較を行ったところ、高い相関係数 ( $r = 0.91$ ) が得られ、ISFET-細胞系によるリアルタイム・非標識に膜障害性を評価できることが明らかとなった (図 d)。また相関図より、わずかに溶血性を示す領域でも ISFET-細胞系では大きな電位変化として検出できることが示され、化合物の添加による細胞膜の乱れを従来よりも高感度に測定できると考えられる。今後、基礎医学や細胞生物学の新たな高感度リアルタイム細胞膜測定法として、ナノ材料の評価、新規薬剤スクリーニング法、及び細胞治療の非侵襲性の定量的評価への応用が期待される。



図：ISFET - 細胞系による細胞膜障害性の測定。(a)細胞存在・非存在下での  $NH_4Cl$  水溶液交換による電位応答。(b)電位応答機構。(c)細胞膜障害に伴う電位ピークの低下。(d) ISFET - 細胞系による膜障害性パラメータと赤血球溶血性試験結果の相関。

## **Evaluating nanomedicine molecular science using sensitive ion-sensitive field-effect transistors**

Tatsuro Goda

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

An integrated microdevice for measuring proton-dependent membrane activity at the surface of *Xenopus laevis* oocytes has been achieved. By establishing a stable contact between the oocyte vitelline membrane and an ion-sensitive field-effect (ISFET) sensor inside a microperfusion channel, changes in surface pH that are hypothesized to result from facilitated proton lateral diffusion along the membrane were detected. The solute diffusion barrier created between the sensor and the active membrane area allowed detection of surface proton concentration free from interference of solutes in bulk solution. The proposed sensor mechanism was verified by heterologously expressing membrane transport proteins and recording changes in surface pH during application of the specific substrates. Experiments conducted on two families of phosphate-sodium cotransporters (SLC20 & SLC34) demonstrated that it is possible to detect phosphate transport for both electrogenic and electroneutral isoforms and distinguish between transport of different phosphate species. Furthermore, the transport activity of the proton/amino acid cotransporter PAT1 assayed using conventional whole cell electrophysiology correlated well with changes in surface pH, confirming the ability of the system to detect activity proportional to expression level.

Further, we discovered that the ISFET covered with the monolayer of eukaryotic cells on the gate insulator detected a time course of the cell membrane disorder caused by external reagent at high spatiotemporal resolution compared with conventional end-point assays without the aid of optical setting. An instant addition/removal of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution to the bulk phase surrounding the cells induced pH oscillations at the cells/ISFET nanointerspace. The temporal pH changes resulted from the imbalanced  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  equilibrium reaction because of the selective permeability of  $\text{NH}_3$  out of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{H}^+$  across the healthy plasma membrane. Impaired semi-permeability for these ions in damaged cell membrane when challenged by nanoscale materials attenuated the imbalanced state of the equilibrium at the point of addition/removal of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , yielding the decreased transient pH signal. The results from cells-ISFET measurement were consistent with traditional hemolysis assay (correlation factor:  $r = 0.91$ ) for a wide variety of reagents and were relevant to existing cell-based toxicity and proliferation assays with advanced features on simplicity and high-throughput analysis. An integration of tiny ISFET sensors comparable to the size of single cell (about tens micrometers) on a chip would obtain the signal on cytotoxicity from individual cell among the population of cultured two dimensional cell monolayer without destroying the intact state.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Tatsuro Goda<sup>\*</sup>, Peter Kjall, Kazuhiko Ishihara, Agneta Richter-Dahlfors and Yuji Miyahara, "Biomimetic Interfaces Reveal Activation Dynamics of C-Reactive Protein in Local Microenvironments", *Advanced Healthcare Materials*, **2014**, 3(11), 1733-1738.
2. Yasuhiko Iwasaki, Toshihiro Kimura, Masaki Orisaka, Hideya Kawasaki, Tatsuro Goda<sup>\*</sup> and Shinichi Yusa, "Label-free Detection of C-reactive Protein using Highly Dispersible Gold Nanoparticles Synthesized by Reducible Biomimetic Block Copolymers", *Chemical Communications*, **2014**, 50(42), 5656-5658.

### 総説・解説・成書

1. Tatsuro Goda, Miyuki Tabata, Yuji Miyahara, "Electrical and Electrochemical Monitoring of Nucleic Acid Amplification", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3, 29 (2015).
2. Tatsuro Goda<sup>\*</sup>, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, "Critical Update on 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC) Polymer Science", *Journal of Applied Polymer Science* 132, 41766 (2015).
3. 宮原裕二, 松元亮, 合田達郎, 前田康弘, 田畑美幸, 三條舞, "機能性超分子界面を用いるバイオトランジスタ", 超分子材料の設計と応用展開 (原田明 編), シーエムシー出版, 2.1.3章, 78-90 (2014)
4. 合田達郎, 宮原裕二, "バイオトランジスタ", スマート・ヒューマンセンシング～健康ビッグデータ時代のためのセンサ・情報・エネルギー技術～ (三林浩二 編), シーエムシー出版, 2.6章, 123-130 (2014)

### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 招待講演: 合田達郎, 機能性ナノ界面の構築とバイオセンシング応用, 日本薬学会 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2014年8月20-21日
2. 招待講演: Tatsuro Goda, Cell Membrane-Mimetic Interfaces for Biomaterials and Bioengineering, International Polymer Conferences (IPC) Dec. 2-5 (2014)
3. 報道: *Advanced Healthcare Materials*, 2014年11月号フロントカバーピクチャー掲載
4. 活動: 合田達郎 第3回ナノメディシン若手研究会 「バイオミメティックス界面を用いたC-反応性タンパク質分子動態の解明」 2014年10月10日
5. 活動: 合田達郎 第4回ナノメディシン若手研究会 「イオン応答性電界効果トランジスタによる細胞膜障害性の評価」 2015年1月23日

## 細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発

研究代表者：名古屋大学大学院工学研究科 檜田 啓

### 1. 研究の概要

RNA が持つ生体機能が次々に明らかになりつつあることから、近年細胞における RNA の動態解析が注目されている。我々はこれまでに RNA を高感度に検出可能な新たな蛍光性核酸プローブであるインステムモレキュラービーコン (ISMB) の開発に成功している。本研究では更に高感度かつ酵素耐性を持つ ISMB を開発し、これを用いた細胞内における RNA の蛍光イメージングを目指している。昨年度までの成果によりペリレンや Cy3 を複数分子導入した ISMB の開発に成功している。今年度はこの Cy3 複数導入 ISMB を用いた細胞内イメージングについて検討を行った。

### 2. 研究の背景と目的

近年の研究により、細胞内において RNA が極めて多様な機能を担っていることが明らかとなった。従って、細胞内においていつ・どこで・どのくらい RNA が発現しているかを知ることは、細胞内における分子反応を理解するうえで極めて重要である。細胞内で RNA を可視化するプローブの一つにモレキュラービーコン (MB) がある。この MB は、末端に蛍光色素及び消光色素が結合したヘアピン型 DNA であり、標的 RNA が存在しない際には蛍光がほとんど観察されないという特長を有している。しかしながら、従来の MB は末端に色素が結合されていたために、末端の揺らぎ (ブリージング) に起因するバックグラウンド発光によって偽陽性シグナルが観察されるという問題点があった。また、従来型 MB では蛍光色素を複数導入した際に自己消光が観察されるという問題もあった。

それに対し、我々はステム内部に色素を導入したインステムモレキュラービーコン (ISMB) を開発した。その結果、従来型 MB と比べてブリージングを低減することでバックグラウンド発光を抑制し、結果として従来型 MB より高感度な RNA 検出に成功した。また、蛍光色素を複数導入することによって、更に高感度な検出が可能であることを明らかにした。昨年度までの本領域における成果により、東京工業大学丸山厚教授らによって開発されたカチオン性グラフト共重合体とペリレン導入 ISMB を併用することによって、超高感度な RNA 検出に成功した。また、従来の Cy3 誘導体では複数導入した際に自己消光が観察されるという問題点があったが、新規 Cy3 誘導体を合成し、これを 2 分子導入した ISMB を開発した。その結果、自己消光を抑制することによって、Cy3 1 分子導入 ISMB よりもはるかに高感度な検出が可能であることを見出した。本年度はこれらの ISMB を用いた細胞内 RNA イメージングについて検討を行った。

### 3. 成果

これまでに Cy3 複数導入 ISMB を用いて固定化された細胞において強制発現した GFP の mRNA のイメージングに成功している。しかしながら、強制発現した系では内在性 RNA と比較して細胞内における局在性が変化する可能性があった。また、RNA 発現量も不明であった。そこで、本年度は ISMB を用いた細胞内在性 mRNA のイメージングについて検討を行った。ターゲットとしては細胞内に比較的多く存在することが知られている  $\beta$ -actin の mRNA とした。まず、 $\beta$ -actin mRNA をターゲットとする ISMB を合成し、*in vitro* で RNA 検出能を評価したところ、ターゲット RNA 添加に伴い、蛍光発光強度が 105 倍増大することが明らかとなった(図 1)。そこで、この ISMB を用いた細胞内 RNA イメージングを試みた。具体的には HeLa 細胞を固定化し、Triton X を添加し細胞内にこの ISMB を導入した後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。また、コントロールとしてスクランブル配列を持つ ISMB を合成し、これを同様の手法で細胞に導入し観察を行った。その結果、コントロール ISMB では発光が観察されなかったのに対し、 $\beta$ -actin をターゲットとした ISMB からは強い発光が観察された。従って、固定化された細胞内において  $\beta$ -actin mRNA を検出可能であることが明らかとなった。また、結合しなかった MB を洗浄することなく観察したところ、洗浄有りのサンプルと同程度の発光が観察された(図1)。一般的な FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法では蛍光ラベルした核酸を添加した後に、結合しなかったプローブを洗浄操作によって除去する必要がある。しかしながら、洗浄操作の程度によって結果が大きく左右されるという問題点があった。それに対し、ISMB はターゲットなしでの発光を強く抑制できるため、洗浄操作がなくても RNA を検出可能であるという利点がある。以上の結果から、Cy3 複数導入 ISMB が洗浄操作不要な FISH プローブとして機能することを明らかにした (Kashida *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, *in press*, DOI: 10.1016/j.bmc.2015.02.030)。

領域内共同研究として、東京工業大学の丸山厚先生、嶋田直彦先生と共にポリマー存在下における核酸構造解析について解析を行った。また、これまでに9つの研究グループに ISMB を提供し共同で研究を進めている。

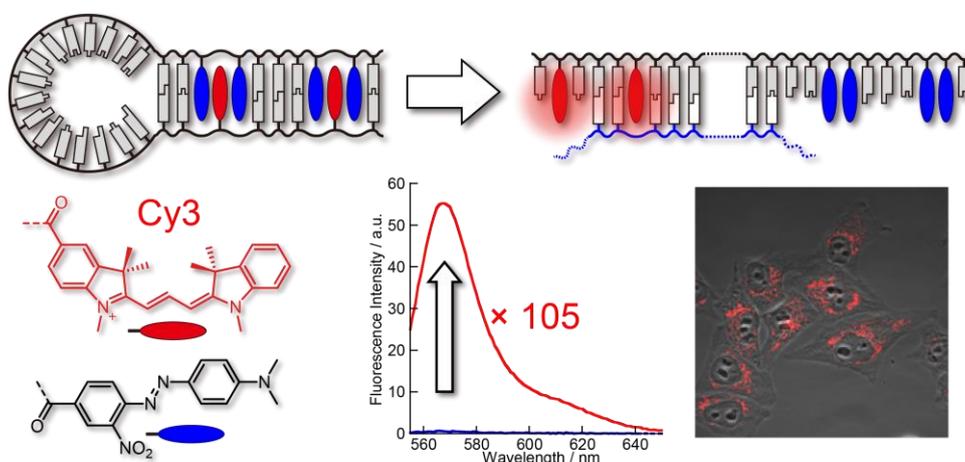


図1 Cy3 複数導入 ISMB の模式図、ターゲットの添加に伴う蛍光発光共同変化、及び FISH イメージ (洗浄操作なし)。

## Development of a highly-sensitive nucleic acid probe for *in vivo* imaging

Hiromu Kashida

*Graduate School of Engineering, Nagoya University, Japan*

Spatiotemporal control of RNA expression has been attracted much attention due to its relevance to various kinds of cell function. To visualize RNA in cell, monitoring tools with high sensitivity are strongly required. Previously, we have developed In-Stem Molecular Beacons (ISMB) by incorporating fluorophores (perylene) and quenchers (anthraquinone) into stem portion of molecular beacon. ISMB could detect target RNA with higher sensitivity than conventional molecular beacons, which tether fluorophores and quenchers at their termini. In addition, incorporation of multiple fluorophores into ISMB drastically enhanced the sensitivity. In this project, we aim to develop highly sensitive MB for *in vivo* RNA imaging. Last year, we synthesized a novel Cy3 derivative and incorporated it into ISMB. As a result, ISMB tethering two Cy3 fluorophores showed higher detection sensitivity than ISMB with one Cy3 moiety. We also applied this ISMB to visualize GFP mRNA, which was transcribed from plasmids, in fixed HeLa cells. This year, we synthesized ISMB targeting  $\beta$ -actin mRNA, and investigated its detection ability in cell. We also applied this ISMB to a wash-free FISH probe.

We first synthesized ISMB targeting  $\beta$ -actin mRNA and investigated its sensitivity *in vitro*. Strong emission from Cy3 was observed in the presence of the target RNA, and S/B (signal/background) ratio was as high as 105. Then we added ISMB to permeabilized HeLa cells and the emission of Cy3 was monitored by confocal laser scanning microscopy. Strong emission was observed with ISMB that targeted  $\beta$ -actin mRNA whereas no emission was observed with control ISMB with scrambled sequence. Hence, we concluded that  $\beta$ -actin mRNA was successfully visualized with ISMB. Interestingly, similar emission was also observed without washing procedures. In standard FISH experiments, fluorescently-labeled RNA probe is added to permeabilized cells, and unbound probe is removed by washing. However, results are highly dependent on efficiency of this washing process; stringent washing causes no signal emission whereas strong background emission was often observed after incomplete washing. Since ISMB can suppress background emission in the absence of the target RNA, it has a potential as a wash-free FISH probe.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Hiromu Kashida, Takuya Osawa, Kazuhiro Morimoto, Yukiko Kamiya, Hiroyuki Asanuma “Molecular design of Cy3 derivative for highly sensitive in-stem molecular beacon and its application to the wash-free FISH” *Bioorg. Med. Chem. in press*, DOI:10.1016/j.bmc.2015.02.030

#### 総説・解説・成書

1. 浅沼浩之、榎田 啓 「プローブへの応用を目指した人工ヌクレオチドの設計」 最先端メディカルエンジニアリング 第2版 203-208 (2014)

#### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

##### 招待講演(2件)

1. Hiromu Kashida “Highly-sensitive RNA detection by using In Stem Molecular Beacon” (Invited) China/Japan Young Chemists Forum, 2014年8月, 北京大学
2. 榎田啓 「機能性核酸材料の創製を目指した人工塩基対の開発」(招待講演) 第63回高分子学会年次大会 2014年5月、名古屋国際会議場

#### 活動

1. 榎田啓 NMMS 第16回セミナーを開催した(2014年9月)

#### 学会発表(領域内共同研究成果)(3件)

1. 渡邊和則・三好祐一・佐藤奈央子・森本一弘・榎田啓・浅沼浩之・大槻高史 「細胞内で蛍光を発する低分子 RNA 追跡ツールの設計」第8回バイオ関連化学シンポジウム 2014年9月、岡山大学
2. Ryuichi Maeda, Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma, Naoki Sugimoto and Daisuke Miyoshi “A new sequence-specific detection system of mRNA G-quadruplex by use of FRET” The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014年11月, 北九州国際会議場
3. 前田龍一・森本一弘・榎田啓・浅沼浩之・杉本直己・三好大輔 「脱ワトソン・クリックの核酸化学(12): チオフラビンTを用いた配列特異的RNA四重らせん構造検出法の開発」日本化学会第95春季年会 2015年3月(予定)、日本大学

## 自己集合型ナノキャリアの創製

研究代表者：京都大学エネルギー理工学研究所 中田 栄司

### 1. 研究の概要

我々は、これまでに一部の蛍光色素誘導体が水溶液中で自己集合化したナノプローブの開発に成功している。このナノプローブは、血清存在下の培地および細胞内などの複雑な環境下でも安定な自己集合体を形成している一方、酵素応答部位を適切な箇所を導入することで、細胞内のエステル加水分解酵素やニトロ還元酵素などの酵素反応を経て分散状態となることが明らかとなっている。本研究では、これまでのこれら知見を生かし、薬剤を内包した酵素応答性蛍光ナノキャリアを構築し、その細胞内動態と薬物放出性についてリアルタイムに評価することを目的とする。

### 2. 研究の背景と目的

ドラッグデリバリーシステム(DDS)において、外部刺激応答性担体の開発は、薬剤送達の時空間的な制御をおこなう目的で非常に有用である。中でも酵素反応をトリガーとしたナノキャリアからの薬剤放出制御は、疾患特異的な酵素を標的とすることで、患部選択的な薬物送達を可能とするため有用である。これまで申請者らは、水溶液中で自己集合化した蛍光色素誘導体が、酵素反応や光照射をトリガーとして分散することで、蛍光強度や色調変化を示すナノプローブの開発に成功している。<sup>[1,3]</sup> このナノプローブは、ある種の蛍光色素(例えば SNARF)に対して疎水的な置換基を導入することで、水溶液中で 100 nm 程度の自己集合体を形成する。この自己集合体は、蛍光色素を骨格として有していながらも無蛍光で、細胞内や血液中などの集合体が不安定化する環境下においても極めて安定に存在している。その一方で、酵素反応に応答する脱離基を導入することで、酵素との反応後速やかに分散し、蛍光性を回復するユニークなナノプローブである(約 100 倍の蛍光変化)。既にこの自己集合型ナノプローブで、エステル加水分解酵素やニトロ還元酵素・グリコシド結合切断酵素などの細胞内酵素をリアルタイムに検出することに成功している。また、特筆すべき点として、本ナノプローブは超分子的自己集合体であることから、複数の要素を混ぜ合わせたマルチな応答性のナノプローブや他の有機化合物を内包したナノプローブの創製が出来ると期待される。そこで、本研究では、当該ナノプローブを利用して、自己集合型ナノキャリアを創製し、細胞内酵素や特定の波長の光照射で内包した薬剤を放出する過程を、ナノキャリアの動態及び分散過程と同時に可視化して評価することを目的としている。

### 3. 成果

(その1) 合理的設計に基づいたナノプローブの創製

## 公募

### (フッ素イオン応答型ナノプローブ)<sup>[4]</sup>

我々の自己集合化ナノプローブは、導入する疎水性保護基の疎水性置換基定数を指標とすることで、自己集合状態と分散状態をあらかじめ推測することができる。<sup>[3]</sup> この特徴を利用することで、合理的設計指針に基づいたナノプローブの創製が可能となる。本年度はその応用例として、フッ素イオンに反応して脱離するシリル基を保護基として採用し、種々のシリル基の中から疎水性置換基定数を指標として、TBDPSを選定した(図1)。設計した SNARF-OTBDPS は、期待した通り、水溶液中で自己集合体を形成していた。特筆すべき点として、自己集合状態となっているため、本来加水分解しやすいシリル基が水溶液中で安定に存在していることが明らかとなった。また、そのイオン選択性を評価したところ、期待通り、フッ素イオンに対して選択的に反応し、蛍光が回復することが明らかとなった。このことから、我々の疎水性置換基定数を指標とした自己集合化ナノプローブの合理的設計の有用性を示すことに成功した。

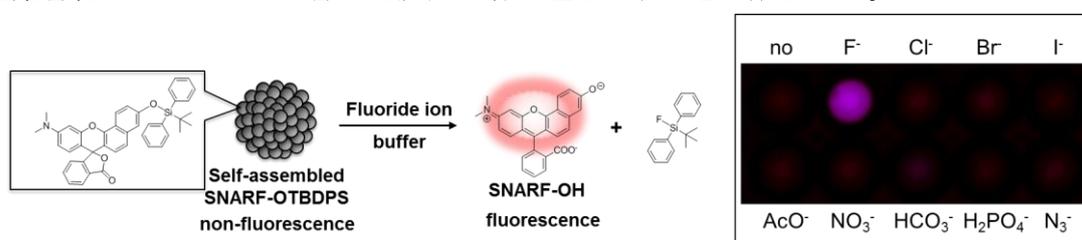


図1.合理的設計に基づいたフッ素イオン応答型ナノプローブの創製

### (その2) ニトロリダクターゼ応答型ナノプローブの機能評価

これまでにニトロリダクターゼをトリガーとしたナノプローブを SNARF を基本骨格として評価してきた(SNARF-OBn(pNO<sub>2</sub>))。しかしながら、その反応性が低いことが一因として、細胞内での機能評価において長時間の観察を要するという問題があった。蛍光色素の骨格を Rhodol に変更した場合(Rhodol-OBn(pNO<sub>2</sub>))、自己集合性は保持しつつもその反応性を大幅に改善することに成功していたことから、これを用いた大腸菌由来の内在性ニトロリダクターゼの検出を評価した。培養した大腸菌に SNARF-OBn(pNO<sub>2</sub>)または Rhodol-OBn(pNO<sub>2</sub>)を添加したところ、試験管内での機能評価で得られた知見同様、Rhodol-OBn(pNO<sub>2</sub>)では、迅速な蛍光回復が確認され、一方で、SNARF-OBn(pNO<sub>2</sub>)では、ゆっくりとした蛍光回復が確認された。これらの結果は、同じ応答部位を有していても応答性の異なるナノキャリアとして利用できることを示唆しており、今後その応答性の差異と構造の相関関係についても評価していく。

(その他) 東北大学 中林孝和教授、岡山大学 大槻高史教授、大阪府立大学 原田敦史准教授との領域内共同研究。

[1] a) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6952 (2009). b) E. Nakata, et al., *Chem. Comm.*, **46**, 3526 (2010). c) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 1663 (2011). [2] E. Nakata, et al., *Chem. Lett.*, **39**, 734 (2010). [3] E. Nakata, et al., *RSC Adv.*, **4**, 348 (2014). [4] E. Nakata, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 327 (2015).

## Development of the self-assembled nano-carrier

Eiji Nakata

*Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan*

In the field of nanomedicine molecular science, the enzymatic activity is one of the useful parameter to understand the condition of living system. And also, it is very important as the trigger of medicinal and biological agents. Thus, the methodology to monitor enzymatic activities in living system are very important. Recently, we developed a novel strategy to control the fluorescent property of asymmetric xanthene scaffold, such as SNARF, that enables rational design of fluorescent probe to monitor the cellular enzymatic activity.<sup>[1]</sup> The mechanism underlying the fluorescence off/on switching is based on the lactone formation under a hydrophobic condition. A certain kind of derivatives formed self-assembly in an aqueous condition and existed as the lactone form. We explored the structure-activity relationship of the derivatives and developed a rational design strategy for self-assembled fluorescent nano probes to monitor the enzymatic activity.<sup>[2]</sup> We hypothesized that the fluorescent nano probes could be applied as the enzyme responsible nano-carrier.

To demonstrate the rational designable characteristics of fluorescent nano probe, a fluorescent nanoprobe to detect the fluoride ions present in aqueous solutions (SNARF-OTBDPS) was designed.<sup>[3]</sup> Among the various silyl group which well known as the fluoride ion selective leaving group, *tert*-butyldiphenylsilyl was selected based on our rational design strategy for self-assembled fluorescent nanoprobe. The designed SNARF-OTBDPS formed self-assembled cluster and showed good selectivity in the detection of the fluoride ions versus other anions. Furthermore, the silyl ether group in SNARF-OTBDPS displayed high stability against hydrolysis, owing to the formation of self-assembled clusters. In addition, the rapidly responsive nitroreductase-activated fluorescent nanoprobe based on Rhodol chromophore was applied to monitor the activity of endogenous nitroreductase in *E. coli*.

By using these results in combination, we would like to rationally design the enzyme responsible nano-carrier based on our self-assembled nano probes.

[1] a) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6952 (2009). b) E. Nakata, et al., *Chem. Comm.*, **46**, 3526 (2010). c) E. Nakata, et al., *Chem. Lett.*, **39**, 734 (2010). d) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 1663 (2011). [2] E. Nakata, et al., *RSC Adv.*, **4**, 348 (2014). [3] E. Nakata, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 327 (2015).

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. \*Eiji Nakata, Yoshijiro Nazumi, Yoshihiro Yukimachi, Yoshihiro Uto, Hitoshi Hori and Takashi Morii  
“Self-Assembled Fluorescent Nanoprobe for the Detection of Fluoride Ions in Aqueous Solutions”  
Bull. Chem. Soc. Jpn., 2015, 88, 327-329.

#### 総説・解説・成書

1. 中田 栄司 「細胞内レシオ型蛍光 pH プローブ開発のための自己集合化ナノプローブの合理的設計戦略」和光純薬時報 Vol. 82, No. 4, 2014

#### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

##### 招待講演

1. Eiji Nakata, 2014. 08.27, ISOMRM, taiwan  
“The Rational Design of Latent Ratiometric Fluorescent pH Probe for Intracellular pH Measurement”
2. 中田 栄司, 2014.09.02, ナノ粒子・構造応用研究会 第9回公開講演会, 東京  
“外部刺激応答性自己集合化蛍光プローブを用いたバイオイメージング”

##### 特許取得

1. 登録番号 5578517 「ナノ集合体」出願人 国立大学法人京都大学, 発明者 中田 栄司, 掘 均, 宇都 義浩・行待 芳浩 登録日 平成26年7月18日

## 画像解析による微弱電流依存性の細胞内輸送亢進機構解明と革新的

### 指向性 DDS への展開

研究代表者：京都薬科大学 小暮健太郎

#### 1. 研究の概要

我々はこれまでに、微弱電流によって siRNA 等を非侵襲的に皮内細胞質まで送達する技術を確立している。我々は、微弱電流によって細胞の取り込み機構や細胞内輸送等が亢進していると仮説を立て、本研究においてその検証と薬物送達への展開を目指して取り組んでいる。これまでに、微弱電流によって外来物質がエンドサイトーシスで取り込まれること、さらにシグナル伝達系の活性化を介して種々のエンドサイトーシス関連タンパク質も活性化されることを見出している。2014 年度は、これらの知見に基づき、微弱電流による細胞内変化について検討を行い、細胞内輸送の亢進、膜電位の増加、TRP チャネルの関与の可能性、および共同研究による核酸の細胞質送達のエビデンスを見出した。

#### 2. 研究の背景と目的

我々はこれまでに、イオントフォレシス（微弱電流による経皮薬物送達促進技術）により siRNA や CpG オリゴ核酸など親水性高分子を皮膚内（in vivo）に効率よく浸透させるとともに、高い RNAi 効果や抗腫瘍免疫反応を誘起することに成功している（Kigasawa et al., Int. J. Pharm (2010), Kigasawa et al., J. Control. Release (2011)）。このことは、微弱電流によって核酸が細胞質まで送達されたことを意味している。さらに、微弱電流処理による細胞内タンパク質のリン酸化を網羅的に解析したところ、細胞取り込みや細胞内輸送に関与する多くのタンパク質のリン酸化が亢進していることが明らかになっている。この結果から、微弱電流によって種々のシグナル伝達系が活性化されることで、エンドサイトーシス関連タンパク質が活性化され、エンドサイトーシスが誘起されることでナノ粒子などが取り込まれるとともに、取り込まれた外来物質の細胞内輸送が亢進することが示唆された。これらのことから我々は、「微弱電流により細胞シグナル伝達が活性化し、外来物質の取り込みと微小管を介した膜小胞輸送速度が亢進し効率よく細胞質に送達される」という仮説を立てた。本公募研究では、細胞内輸送活性化を可視化し、原因となる分子反応パラメータを見出すことで革新的 DDS へ展開することを目指している。今年度は、微弱電流処理時において細胞内輸送亢進を誘導する鍵となる因子を見出すため、微弱電流処理時の細胞膜電位変化、細胞内輸送亢進に対する  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害剤の影響、モレキュラービーコンを用いた細胞質への送達確認、を検討した。

### 3. 成果

微弱電流処理時の細胞膜電位変化を評価するため、細胞膜電位変化によって細胞内に移行し蛍光を発する色素である DiBAC<sub>4</sub>(3) (Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol) 存在下において、マウス皮膚繊維芽細胞 NIH-3T3 に微弱電流処理したときの蛍光強度変化を検討した。その結果、DiBAC<sub>4</sub>(3)は無処理細胞(コントロール)にもある程度取り込まれるが、微弱電流処理することで、より多く細胞内に取り込まれ、強い蛍光を発することが明らかとなった。画像から数値化した DiBAC<sub>4</sub>(3)の相対的蛍光強度は、約 30%増大していた。約1%の蛍光強度変化は、1mV の膜電位変化を示すことから、微弱電流処理により、細胞膜電位が約 30mV 変化することが明らかとなった。この結果から我々は、微弱電流刺激によって、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルの活性化を介した Ca<sup>2+</sup>流入が誘導されるのではないかと予想し、特に TRP チャネルが関与しているのではないかと推察した。TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは、陽イオンチャネルから成るスーパーファミリーの一群であり、6 つのファミリー (TRPC1~7 (Canonical)、TRPM1~8 (Melastatin)、TRPV1~6 (Vanilloid)、TRPA1 (Ankyrin)、TRPP1~3 (Polycystin)、TRPML1~3 (Mucolipin が)存在する。TRP チャネルは、様々な物理刺激(温度・機械刺激・電位変化)や化学物質刺激に対するセンサーとして働くことが知られている。そのため我々は、電位変化に応答する TRPチャネルが、微弱電流処理時に活性化され、Ca<sup>2+</sup>誘導性の細胞シグナル伝達活性化が誘起されるのではないかと考えて、TRP カチオンチャンネル阻害剤 SKF96365 (1-[2-[3-(4-Methoxyphenyl)propoxy]-2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1H-imidazole hydrochloride)による細胞内輸送亢進に対する影響を検討した。その結果、10 μM の SKF96365 存在条件において、微弱電流処理による蛍光ラベル化カチオンリポソームの細胞内輸送亢進が抑制されることが明らかとなった。これらのことから、微弱電流処理によって、TRP チャネル等を介した Ca<sup>2+</sup>流入が誘導され、それにより細胞内シグナル伝達が活性化し、細胞取り込みおよび細胞内輸送が亢進することが示唆された。

この細胞内取り込みに関して、エンドサイトーシスであることは明らかとなっているが、それくらいの効率で取り込まれたものが細胞質に到達できるのかは不明であった。蛍光ラベル化リポソームや蛍光ラベル化 siRNA では、蛍光シグナルは細胞内に確認できるが、それがエンドソーム内なのか否かについては、エンドソーム染色薬などを用いても判別し難く、良いプローブがないかと思っていた。このことを解決するために、領域内の名古屋大学檜田啓准教授の開発したモレキュラービーコン(MB)を用いることとした。ここでは、ルシフェラーゼ安定発現 B16-F1 メラノーマ細胞に対してルシフェラーゼ配列含有 MB を添加し、微弱電流処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。細胞質まで MB が到達すれば、ルシフェラーゼ mRNA と開裂した MB が結合することで、蛍光が観察される。実際に、微弱電流処理後に観察したところ、MB 由来の赤色蛍光が観察された。このことから、微弱電流処理によって MB が取り込まれ、細胞質まで輸送されることが確認された。今後、MB を用いた細かな検討を行うことで、微弱電流処理による細胞取り込みおよび細胞内輸送亢進の詳細が解明できると考えている。

## **Clarification of mechanism of faint electricity-induced acceleration of intracellular transport, and expansion into innovative DDS**

Kentaro Kogure

*Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University*

Recently, we succeeded in the induction of potent RNAi effect by in vivo transdermal delivery of siRNA via iontophoresis (Kigasawa K, et al., *Int. J. Pharm.* 383 (2010) 157). Iontophoresis is known as a noninvasive technology for enhancement of transdermal drug delivery via faint electricity. Thus, it was suggested that siRNA was delivered into cytoplasm by electric treatment. Based on this, we hypothesized that cellular uptake mechanism and intracellular transport must be changed by electric stimulus. Previously, we confirmed that faint electricity enhanced intracellular transport of liposomes taken up by endocytosis. In the present study, we examined the effect of faint electricity treatment on fluorescent signals of DiBAC<sub>4</sub>(3) (Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol), which is known as indicator of membrane potential. The fluorescent intensity of DiBAC<sub>4</sub>(3) increased 30%. It was indicated that membrane potential of the cells was changed by faint electricity. From this result, TRP (Transient Receptor Potential) channels were considered to be candidates as the cause of membrane potential change. In order to confirm the role of TRP channels, especially voltage dependent TRP, in the response to faint electricity, the effect of TRP inhibitor, SKF96365 (1-[2-[3-(4-Methoxyphenyl)propoxy]-2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1H-imidazole hydrochloride) on intracellular transport of liposomes internalized via faint electric treatment. As a result, intracellular transport of liposomes induced by faint electricity was inhibited by the addition of SKF96365. Moreover, the cells were treated with faint electricity in the presence of molecular beacon, which can show fluorescent signals by binding with mRNA in cytoplasm. The molecular beacon was developed by Dr. Kashida, who is a member of the Nanomedicine. We examined the faint electric treatment with molecular beacon encoding anti-luciferase sequence against cells stably expressing luciferase. As a result, fluorescent signals derived from molecular beacon were observed in the cells treated with faint electricity. This result indicates that molecular beacon associated with mRNA after delivery into cytoplasm by faint electricity. In conclusion, it was suggested that faint electricity accelerated intracellular transport and cytoplasmic delivery of extraneous subjects by activation of cell signaling via membrane potential change.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1.

#### 総説・解説・成書

1. 小暮健太郎、気賀澤郁、濱 進、梶本和昭. 第2章第1節イオントフォレシスによる経皮デリバリー技術. 注射剤・経口製剤に代わる新しい薬剤投与デバイスの開発, pp. 49-52, (株)技術情報協会(2014).

#### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 小暮健太郎、塩田佳菜子、気賀澤郁、梶本和昭、濱 進. イオントフォレシスによる抗酸化成分の皮内送達. 第6回経皮投与製剤FGシンポジウム(東京),2014.11.
2. Toyoda M, Hama S, Ikeda Y, Nagasaki Y, Kogure K. Anti-cancer vaccine by transdermal delivery of antigen peptides-loaded nanogel by faint electric treatment. The 7th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (Ha Long City, Vietnam, 2-6 November, 2014).
3. Kogure K, Toyoda M, Hama S, Ikeda Y, Nagasaki Y. Anti-cancer vaccination by transdermal delivery of antigen peptide-loaded nanogels via iontophoresis. 1st Symposium for the Promotion of Applied Research Collaboration in Asia 2015(Taipei, Taiwan, 8-11 February, 2015).
- 4.

## 糖鎖改変技術を利用したバイオ輸送システム

研究代表者：関西大学化学生命工学部 岩崎泰彦

### 1. 研究の概要

細胞は高濃度かつ高密度の糖鎖で被覆されており、その分布や化学組成は種、細胞周期、癌化などによって異なる。そのため、糖鎖は細胞の特徴を表現する「顔」とも言われている。糖鎖は複数種の単糖が連なった多様性に富む構造をもち、受容体機能、情報交換機能、接着機能など細胞のあらゆる生物機能を担っている。天然の糖鎖を利用することにより、高度な生物機能を備えたバイオマテリアルの獲得が可能になる。そこで、細胞由来の天然糖鎖を複合したヒドロゲルの調製し、このヒドロゲル表面で糖/レクチンの特異的結合を再現した。

### 2. 研究の背景と目的

近年、ES 細胞、iPS 細胞の樹立が可能になり、難病の治療や組織再生技術に細胞を積極的に利用することが進められている。その反面、細胞の機能は多岐にわたり、また、その構造が極めて複雑であるため、細胞の特殊性については未だ不明な点が多い。我々は最近、生きた細胞の糖鎖末端に分布するシアル酸残基にメタクリロイル基 ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ ) を誘導し、この官能基を温和な条件で化学反応させることで、細胞の表面に非天然の性質を付与することに成功した。細胞膜糖鎖に誘導したメタクリロイル基と他のビニルモノマーを共重合することにより、細胞膜成分を担持したポリマーが得られる。このポリマーは細胞種特有の糖鎖を持つため、糖鎖を介した分子認識機構の解析に有効なツールとなる。また、このポリマーを利用することにより、白血球が炎症部位に遊走される現象を再現した新たな薬物輸送システムの実現が可能になる。さらに、細胞種を変えることにより、癌マーカーとなる糖鎖抗原を搭載したマテリアルともなるため、ワクチンとしての利用も期待できる。

### 3. 成果

N-メタクリロイルマンノサミン(Man)を終濃度 5 mM になるように添加した RPMI-1640 培地中で HL-60 細胞を3日間培養した。別途、サイトカイン(IL-1 $\alpha$ ) 処理によりセレクチンを誘導した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を準備し、これと ManM 処理した HL-60 細胞を 30 分間接触させた。メタクリロイル基の有無による HL-60 細胞の接着数に差は認められなかった。このことからメタクリロイル基の誘導が糖タンパク質とセレクチンの結合に影響をおよぼさないことが明らかとなった。続いて、メタクリロイル基を誘導した糖タンパク質の重合性を評価した。上述の通りに ManM 処理した HL-60 細胞を RIPA Lysis buffer により溶解し、所定濃度の 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)、ペルオキシ二硫酸アンモニウム(APS)、N,N,N',N'-テト

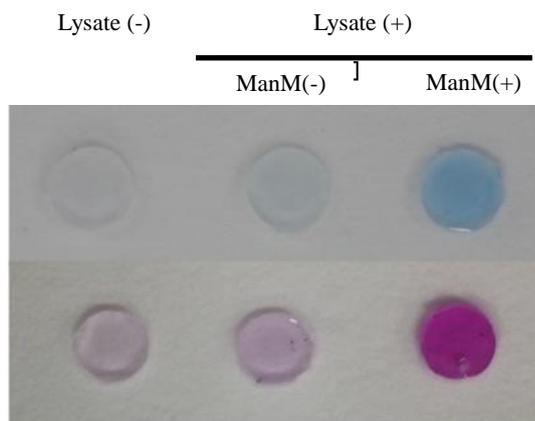
## 公募

ラメチルエチレンジアミン(TMEDA)を加え混和したのち1時間静置した。その後、HL-60細胞の膜表面に恒常的に発現している糖タンパク質(PSGL-1)をウエスタンブロッティングにより追跡した。その結果、反応前に比べManM処理したHL-60細胞のPSGL-1の分子量が著しく増加し、糖タンパク質とMPCを共重合できることがわかった。一方、ManM処理していないHL-60細胞の溶解液を同様な反応に供してもPSGL-1の分子量上昇は認められなかった。

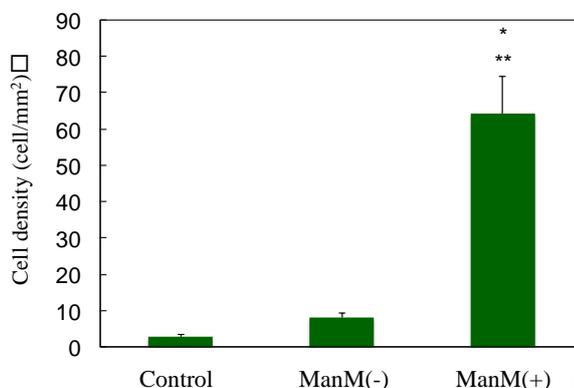
糖タンパク質を複合したバイオマテリアルとしてハイドロゲルの調製を試みた。先述どおりに調製した確認細胞溶解液にMPC、APS、TMEDA、さらに架橋剤として*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(MBAA)を加え、重合することによりハイドロゲルを調製し、ハイドロゲル内の糖タンパク質及び糖質の染色を行った。結果を図1に示す。細胞溶解液を添加することなく調製したハイドロゲル、および未処理の細胞溶解液を添加して調製したハイドロゲルに比べ、ManM処理した細胞の溶解液を添加して調製したハイドロゲルがCoomassie Brilliant Blue(CBB)染色と過ヨウ素酸-shiff染色によって有意に着色することがわかり、ハイドロゲル内に糖タンパク質が複合化されていることが確かとなった。

ハイドロゲルに複合された糖タンパク質の機能を確認するためにセレクチンを誘導したHUVECをハイドロゲルに接触させた。結果を図2に示す。先の染色実験で糖タンパク質の固定化が確認されたハイドロゲルの表面で良好なHUVEC細胞の接着が確認された。一方、他のハイドロゲル表面にHUVECは接着せず、また、セレクチンを誘導していないHUVECはいずれのハイドロゲルにも接着しないことから、ハイドロゲルに組み込まれた糖タンパク質とHUVEC上のP-セレクチンとの結合によってハイドロゲル上での細胞接着が起こっていることが明らかとなった。

本手法により調製されるハイドロゲルは糖タンパク質に由来する分子認識能や細胞接着能といった細胞特油の機能を再現できるため、癌細胞や糖タンパク質の機能解明、薬剤のスクリーニング等への応用も期待できる。



**Fig.1** A Photograph of hydrogels stained with (a) CBB and (b) PAS reagent.



**Fig.2** Density of adherent HUVEC cells on hydrogels. \* $P < 0.01$  vs. Control \*\* $P < 0.01$  vs. ManM(-)

## **Molecular transport system emerged from cell surface engineering**

Yasuhiko Iwasaki

*Department of Chemistry and Materials Engineering,  
Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Osaka, Japan*

Carbohydrates located on the outermost surface of the cell membrane contribute to various forms of communication between living cells and their environment. Recently, the biological and therapeutic functions of carbohydrates have been clarified and many glycopolymer bioconjugates have also been designed. Although these approaches are very successful for use in the regulation of cell-material interaction, almost all synthetic glycopolymers have simple carbohydrate residues because the structure of natural carbohydrates is very complex. In addition, some may not interact uniquely with specific cells and instead show affinity to a broad range of substrates. In the current study, synthetic substrates incorporating metabolic engineered glycoproteins of mammalian cells were prepared for the first time and selectin-mediated cell adhesion on the surface of synthetic hydrogels was demonstrated.

The cells were incubated with *N*-methacryloylmannosamine (ManM) for 3 days to deliver methacryloyl groups to the glycoproteins of the cells. Redox radical polymerization of methacryloyl functionalized glycoproteins with MPC and a crosslinker resulted in a transparent hydrogel. The hydrogels prepared with untreated HL-60 cell lysate did not exhibit staining after treatment with Coomassie Brilliant Blue and Periodic acid-Schiff stain reagents. In contrast, the dyes remained in the hydrogels prepared with ManM-treated HL-60 cell lysate. The surface density of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on the hydrogels was also detected by gold-colloid-labeled immunoassay. On the MPC hydrogels prepared with lysate of untreated HL-60 cells (without ManM-treatment), very few IL-1 $\alpha$  stimulated HUVECs were observed. In contrast, a large number of IL-1 $\alpha$  stimulated HUVECs adhered to the hydrogels prepared with the lysate of the ManM-treated HL-60 cells.

We succeeded in preparing a hydrogel bearing natural glycoproteins of leukemia cells and the selectin-mediated adhesion of cytokine-stimulated endothelial cells on the hydrogel was also observed. In living system, selectin-mediated cell adhesion is considered an essential step in leading to inflammation, reperfusion injury, rheumatoid arthritis, metastasis, infection, etc. Thus, novel synthetic materials, which regulate these bioresponses, could be obtained. The metabolic oligosaccharide engineering with ManM is robustness for creating biointeractive synthetic materials because this is the first effort to use glycoproteins as monomers for conventional radical polymerization, which is the most practical polymerization method.

## 公募

## 業績リスト

### 学術論文

1. Yasuhiko Iwasaki, Toshihiro Kimura, Masaki Orisaka, Hideya Kawasaki, Tatsuro Goda, Shin-ichi Yusa. Label-free detection of C-reactive protein using highly dispersible gold nanoparticles synthesized by reducible biomimetic block copolymers. *Chem. Commun.* 2014, 50, 5656-5658.
2. Hideya Kawasaki, Santosh Kumar, Gao Li, Chenjie Zeng, Douglas R. Kauffman, Junya Yoshimoto, Yasuhiko Iwasaki, Rongchao Jin. Generation of Singlet Oxygen by Photoexcited Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub> Clusters. *Chem. Mater.* 2014, 26, 2777-2788.
3. Yasuhiko Iwasaki, Aki Matsunaga, Shuetsu Fujii. Preparation of Biointeractive Glycoprotein-Conjugated Hydrogels through Metabolic Oligosacchhalide Engineering. *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 1626-1631.

### 総説・解説・成書

1. 岩崎泰彦 「糖鎖改変技術による細胞表面の修飾と機能化」 *バイオマテリアル* 32 111-119 (2014).

### その他（報道, 受賞, 特許, 主な招待講演, 活動など）

1. 招待講演 : Yasuhiko Iwasaki. Surface modulation of carbohydrate ligands on cells Using Polymerization technique, CIMTEC 2014, June 2014, Montecatini Terme.
2. 招待講演 : Yasuhiko Iwasaki. Preparation of polymer-glycoprotein bioconjugates and their molecular recognition, ISOMRM, August 2014, Tao-Yuan.

## 細胞が産生する浸透圧調節分子と人工高分子化合物を用いた

### 細胞モデル実験系の構築

研究代表者：甲南大学フロンティアサイエンス学部 三好 大輔

#### 1. 研究の概要

生体分子が進化を遂げてきた細胞内は、生体分子が非常に混み合った分子クラウディング状態にある。このような環境にある生体分子の物性は、試験管内のそれと全く異なる。そのため、細胞質内にある核酸の分子反応パラメータの解明には、細胞環境を構築し、その実験系において核酸の構造安定性や酵素機能、さらには分子間相互作用を定量解析する必要がある。そこで本研究では、細胞核内を化学模倣した実験系を領域内の研究成果として構築した。さらに、細胞質内の精密模倣にも、領域内で提供された細胞膜模倣分子を用いた。これらの分子環境において、核酸の構造安定性を定量解析したところ、核酸の非標準構造が特異的に安定化されることが明らかとなった。

#### 2. 研究の背景と目的

細胞内の生体分子反応の化学的理解には、細胞内の分子環境を化学的に解明し、生体分子反応パラメータと細胞内分子環境パラメータの相関を解明する必要がある。近年、申請者らは、生体分子と直接相互作用しない合成高分子を用いて分子クラウディング環境を構築し、DNA の構造やその熱力学的安定性に対する効果を定量化する方法を構築した。さらに、分子クラウディングによる DNA 構造の安定化機構には、水分子の活量変化が重要であることも見出したしかし、細胞内で分子クラウディング状態を誘起して、水分子の活量に大きく影響するのは、低分子化合物の浸透圧調節分子である。細胞は、外部からのストレスに応答するために、浸透圧調節分子の種類や濃度をダイナミックに変化させ、遺伝子の発現を調節している。また細胞核内では、正電荷をもった

ヒストンタンパク質が高濃度に存在している。しかし、このような分子が核酸の構造や機能に及ぼす効果の検討例はほとんどなく、その作用機構も明らかではない。そこで本研究では細胞モデル系の構築に向けて、(1) 細胞核内の化学模倣に合成高分子を用い、(2) 細胞質内の化学模倣に浸透圧調節分子による分子クラウディング状態を用いた。さらに、これらの環境における核酸構造の熱力学的安定性を系統的に検討した。

#### 3. 成果

上述のように、細胞内環境を精密に化学模倣するために本研究では次の化合物を用いた。(1) 細胞核内環境の化学模倣：細胞核内に存在するヒストンタンパク質を化学模

## 公募

倣した Lys を主鎖骨格としてもつ正電荷ポリマー。(2) 細胞質内環境の化学模倣：細胞質内で生体分子の物性を調節している浸透圧調節分子 (オズモライト)。それぞれの課題について得られた成果を示す。

(1) 細胞核内環境の化学模倣 (丸山厚先生、嶋田直彦先生との共同研究)：細胞核内では、ゲノム DNA がヒストンタンパク質と結合し、ヌクレオソームを形成している。そのため、細胞核内の DNA を標的とした機能性分子を設計するためには、ヒストンタンパク質と結合した状態の核酸の物性を解明する必要がある。しかし、Lys や Arg を多くもつヒストンタンパク質と DNA の複合体は、不溶化し凝集することから、定量的解析が困難である。そこで本研究では、領域内共同研究として、東京工業大学の丸山先生・嶋田先生から、Lys を主鎖骨格として持ち、デキストランを側鎖にグラフと重合したポリマー (PLL-g-Dex) を提供していただき、核酸構造に対する効果を定量的に検討した。その結果、PLL-g-Dex は、核酸の非標準構造であるパラレル型二重らせん構造や三重らせん構造を特異的に安定化することが示された。さらに、二重らせん構造と三重らせん構造のスイッチングを制御することにも成功した (図 1)。これらの成果は、細胞核内で核酸の非標準構造が安定に存在することを示唆している。また、核酸構造の合目的的スイッチングは、これまでにないアンチセンス・アンチジーン・リボザイムの構築につながる。



図 1. PLL-g-Dex による核酸三重らせん構造の誘起

(2) 細胞質内環境の化学模倣 (石原和彦先生・金野智浩先生との共同研究)：細胞質内に存在する化合物の特徴として、両性イオンが多いことがあげられる。浸透圧調節分子では、グリシンベタインやトリメチルアミン-N-オキシドなどが両性イオンである。さらに、細胞膜を形成する脂質もその親水性部分がホスホリルコリンである。そこで、これらの両性イオンの浸透圧調節分子と、石原先生・金野先生から提供していただいたホスホリルコリン基を含む MPC を用いて分子クラウディング環境を惹起し、核酸構造に対する効果を定量した。その結果、様々な両性イオン物質による分子クラウディングは、核酸の標準構造である二重らせん構造を不安定化することが分かった。一方、両性イオンは、核酸の非標準構造である四重らせん構造を安定化させることが示された。特に MPC は、モル濃度辺りの四重らせん構造に対する安定化効果が極めて高いことが示された。これらの成果は、四重らせん構造の安定化によるバイオテクノロジーやナノテクノロジーに展開が期待される。また、分子量や官能基を系統的に変化させた MPC ポリマーを用いることで、細胞内核酸物性の解明につながると考えられる。

## Cell-mimicking systems based on naturally-occurring osmolytes and synthetic polymers

1. Daisuke Miyoshi

*FIRST (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology) and FIBER (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research), Konan University, Japan*

One of the most distinguishing features of the molecular conditions in cells is an environment crowded with proteins and cell organelles. In addition to the macromolecules that cause the crowded environment, small hydrophilic molecules such as metabolites and osmolytes are highly accumulated in cells, resulting in the properties of intracellular water being quite different from those of a dilute solution. The intracellular environment is possibly a key determinant of the efficiency of broad cellular processes, including tumor generation, susceptibility to diseases with aging, intracellular phase separation, molecular compartmentation, and metabolism. However, most of the molecular crowding studies have been done by use of nonionic and inert synthetic polymers. Such molecular crowding conditions are not able to consider as precise cell mimicking systems. Therefore, in this study we focused on two projects: (1) Developing precisely mimicking system for cell nucleus, where there are abundant of histone proteins. (2) Mimicking cell cytoplasm by use of zwitterionic biomolecules such as osmolytes and

**(1) Developing precisely mimicking system for cell nucleus:** A synthetic copolymer consisting of a polycationic (polylysine) backbone with hydrophilic graft chains can be used to quantify the structure and stability of DNA in the presence of cationic molecules, because their water solubility. We studied the thermodynamics of DNA structures in the presence of a comb-type copolymer of a polycation backbone and dextran side chains: poly(L-lysine)-graft-dextran (PLL-*g*-Dex). It was found that at the parallel conformations involved in both DNA duplexes and the DNA triplex were significantly and specifically stabilized by the cationic copolymers. Moreover, DNA structural switches responding to the cationic copolymers were further designed.

**(2) Development of a new G-quadruplex ligand with bright fluorescence signal:** About 30% of the volume of the cell interior is occupied by large biomolecules, small metabolites, and osmolytes, leading to molecular crowding conditions. In particular, there are large amounts of zwitterionic molecules. Here, we studied the thermodynamics of the canonical DNA duplex and non-canonical DNA G-quadruplex structures under molecular crowding conditions using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), as a model compound of a naturally occurring zwitterionic molecule. It was found that MPC stabilized the DNA G-quadruplex structure, whereas it destabilized the DNA duplex.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文 (2件)

1. Daisuke Miyoshi, Yu-mi Ueda, Naohiko Shimada, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Atsushi Maruyama, Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine comb-type copolymer with hydrophilic graft *chain ChemMedChem*, **9**, 2156-2163 (2014). (**Highlighted as the back cover**).
2. Yu-mi Ueda, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Naoki Sugimoto, and Daisuke Miyoshi, DNA structures under molecular crowding conditions with a phosphorylcholine derivative (MPC), *Transact. Mater. Res. Soc. Jpn., in press* (2015).

#### 総説・解説・成書 (0件)

#### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

##### 報道 (3件)

1. 2014年7月14日付の日刊工業新聞に丸山厚先生、嶋田直彦先生らとの共同研究の成果が掲載された (2014年7月)
2. 2015年2月24日付の神戸新聞で村尾育英会研究奨励賞受賞の記事が掲載された (2015年2月)
3. 2015年2月14日付の産経新聞で村尾育英会研究奨励賞受賞の記事が掲載された (2015年2月)

##### 招待講演 (4件)

1. Daisuke Miyoshi Structural polymorphism of DNA induced and regulated by molecular crowding National Univ. of Kaohsiung Dept of Applied Chemistry Seminar, National University of Kaohsiung, Kaohsiung, Taiwan (2015年1月)
2. 三好大輔 細胞内分子環境でも機能する分子の合理設計指針 第3回 エキゾチック自己組織化材料シンポジウム (日本化学会新領域研究グループ「エキゾチック自己組織化材料」主催), 鳥取大学工学部 (2014年12月)
3. Daisuke Miyoshi Non-canonical DNA structures under molecular crowding conditions School of Physics & Mathematical Science Seminar, Nanyang Technological University, Singapore (2014年12月)
4. 三好大輔 細胞内でも活性を保持できる機能性分子の合理設計に向けた取り組み 東京農工大学工学部講演会, 東京農工大学 (2014年9月)

他、本年度学会発表 16件 (下に記した共同研究成果を含む)

##### 特許 (0件)

##### 受賞など (2件)

1. 三好大輔 第32回村尾育英会学術奨励賞 (一般財団法人村尾育英会) (2015年3月)
2. 村田耕平、Pramanik Smritimoy、臼井健二、杉本直己、三好大輔 優秀ポスター賞、第46回若手ペプチド夏の勉強会 京都府青少年海洋センター (京都) (2014年8月)

##### 活動 (4件)

1. 東京農工大学での講演会でナノメディシンの紹介を行った (東京農工大学 2014年9月)
2. Nanyang Technological University (シンガポール) での講演会でナノメディシンの紹介を行った Nanyang Technological University (2014年12月)
3. エキゾチック自己組織化材料シンポジウムでナノメディシンの紹介を行った 鳥取大学 (2014年12月)
4. 第13回 NMMS セミナーを開催した 甲南大学 (2014年7月)

## 公募

### 領域内共同研究成果の発表 (11 件)

#### 学術論文 (2 件)

1. Daisuke Miyoshi, Yu-mi Ueda, Naohiko Shimada, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Atsushi Maruyama, Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine comb-type copolymer with hydrophilic graft *chain ChemMedChem*, **9**, 2156-2163 (2014). (Highlighted as the back cover).
2. Yu-mi Ueda, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Naoki Sugimoto, and Daisuke Miyoshi, DNA structures under molecular crowding conditions with a phosphorylcholine derivative (MPC), *Transact. Mater. Res. Soc. Jpn.*, in press (2015).

#### 学会発表 (9 件)

1. 丸山 厚・嶋田 直彦・三好 大輔・上田 侑美・中野 修一・杉本 直己 カチオン性くし型共重合体の DNA 構造特異的相互作用: パラレル二重鎖選択的安定化 第 63 回高分子学会年次大会, 名古屋国際会議場, 2014/5
2. 前田龍一、中林孝和、村嶋貴之、杉本直己、三好大輔 核酸四重らせん構造リガンドの新規スクリーニングシステムの開発 日本ケミカルバイオロジー学会 第 9 回年会, 大阪大学 豊中キャンパス 大阪大学会館, 2014/6
3. Yu-mi Ueda, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi DNA structures under molecular crowding conditions with choline phosphate derivative (MPC) The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka Univ., 2014/8
4. Ryuichi Maeda, Takakazu Nakabayashi, Valerie Gabelica, Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Naoki Sugimoto, Nobuhiro Ohta, Daisuke Miyoshi DNA G-quadruplex detection system by use of a protein fibril ligand The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka Univ., 2014/8
5. 前田龍一, 鮎澤隼哉, 中林孝和, 村嶋貴之, 杉本直己, 三好大輔 チオフラビン T を利用した新規四重らせん構造リガンドスクリーニングシステムの開発 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山大学, 2014/9
6. 三好 大輔, 嶋田 直彦, 中野 修一, 杉本 直己, 丸山 厚 カチオン性くし型共重合体による DNA 三重らせん構造の特異的安定化 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山大学, 2014/9
7. Ryuichi Maeda, Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma, Naoki Sugimoto, and Daisuke Miyoshi FRET-based detection of G-quadruplexes in the 5' -UTR cancer related mRNAs 第 41 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014), 北九州国際会議場 (小倉), 2014/11
8. Yu-mi Ueda, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Naoki Sugimoto, and Daisuke Miyoshi Thermodynamics of DNA structures under molecular crowding conditions with naturally-occurring biomolecules 第 41 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014), 北九州国際会議場 (小倉), 2014/11
9. Daisuke Miyoshi, Yu-mi Ueda, Naohiko Shimada, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Atsushi Maruyama DNA structure and stability under molecular crowding conditions Asian Chemical Biology Conference (ACBC) 2014, National University of Singapore, 2014/12

#### その他 (1 件)

1. 2014 年 9 月発刊の *ChemMedChem*, (volume 9, issue 9) の裏表紙に研究成果が掲載された

## 実験的に抽出された分子反応パラメータを導入した

### マラリア感染赤血球モデルの開発

研究代表者：東北大学工学研究科 今井 陽介

#### 1. 研究の概要

マラリアに感染した赤血球は膜表面に接着タンパクを発現する。この分子反応の発現によりマラリア感染赤血球は微小血管内に接着し、周囲の赤血球を巻き込んだ組織レベルの微小循環障害を引き起こす。我々はマラリア感染によって微小循環障害に至る過程を力学的に解明するため、マラリア感染赤血球の挙動を計算機上で再現できるシミュレーション技術を開発している。今年度は、赤血球膜の固体力学、血漿・細胞質の流体力学および接着タンパクの結合をモデル化し、最先端の高速計算技術であるGPU計算を用いて解析する手法を構築した。

#### 2. 研究の背景と目的

マラリアは、分子反応の発現により組織レベルで細胞集団挙動の異常を生じる代表的な疾患である。熱帯熱マラリア原虫が寄生した赤血球は膜表面に接着タンパクであるPfEMP1を発現し、これは血管内皮細胞上のICAM-1, TSP, CD36など複数のタンパクと、また正常な赤血球上のタンパクとリガンド-レセプタ結合する。これによりマラリア感染赤血球は微小血管内に接着し、脾臓の免疫機構から逃れ安定に増殖し、最終的に周囲の赤血球を巻き込んだ大規模な微小循環障害を引き起こす。

我々は世界に先駆けてマラリア感染赤血球の細胞力学モデルを構築し、これを用いた数値計算によって、周囲の赤血球を伴う細胞集団挙動を明らかにしてきた。近年、リガンド-レセプタ結合に関わる分子反応パラメータの抽出がなされており、これを我々の開発してきた細胞力学モデルに導入することで、分子反応の発現に由来する組織レベルの微小循環障害を再現する数値計算が可能となる。

本研究では、第一に、実験的に抽出されたリガンド-レセプタ結合の分子反応パラメータを導入したマラリア感染赤血球の細胞力学モデルを開発する。第二に、これを用いた数値計算により、マラリア感染による分子反応の発現と赤血球の集団挙動の関係を解明する。

#### 3. 成果

ここまでの研究において、マラリア感染赤血球の細胞力学モデルの開発が完了して

## 公募

いる。細胞膜の固体力学を有限要素法，血漿・細胞質の流体力学を格子ボルツマン法あるいは境界要素法で計算する。リガンド-レセプタ結合の確率的プロセスを Bell モデルに基づくモンテカルロ法で計算し，大規模なパラメトリック計算を可能にするため GPU 計算に実装した。図 1a のようにマラリア感染赤血球の壁面上の回転挙動を再現し，さらに，ロゼット形成のモデルも同様の手法を用いて開発した（図 1b）。

この計算力学モデルを用いて，離脱頻度やせん断速度を中心としたパラメトリック計算を実施し，パラメータと細胞挙動の関係を解析した。例えば生理学的なせん断速度の流れ場において，マラリア感染赤血球の回転速度はリガンド-レセプタ結合の離脱頻度にほぼ比例し，離脱頻度  $1\text{s}^{-1}$  程度以上で壁面上を回転運動し， $10^{-3}\text{s}^{-1}$  でほとんど定常接着となる結果が得られた（図 1c）。実験的に計測された CD36 の離脱頻度は  $10^{-3}\text{s}^{-1}$  程度であり，血管壁に定常接着することが報告されているが，我々の計算力学モデルによってよく再現されている。また ICAM-1 の場合には離脱頻度は明らかにされていないものの， $10\text{ }\mu\text{m/s}$  の回転運動となることが報告されており，我々の計算結果から離脱頻度は  $5\text{-}10\text{ s}^{-1}$  程度であることが示された。また，ロゼット形成のシミュレーションでは，血管壁上でマラリア感染赤血球が回転運動を示した広いパラメータ群のほとんどすべてのケースで，非常に強固な接着となることが明らかとなった。

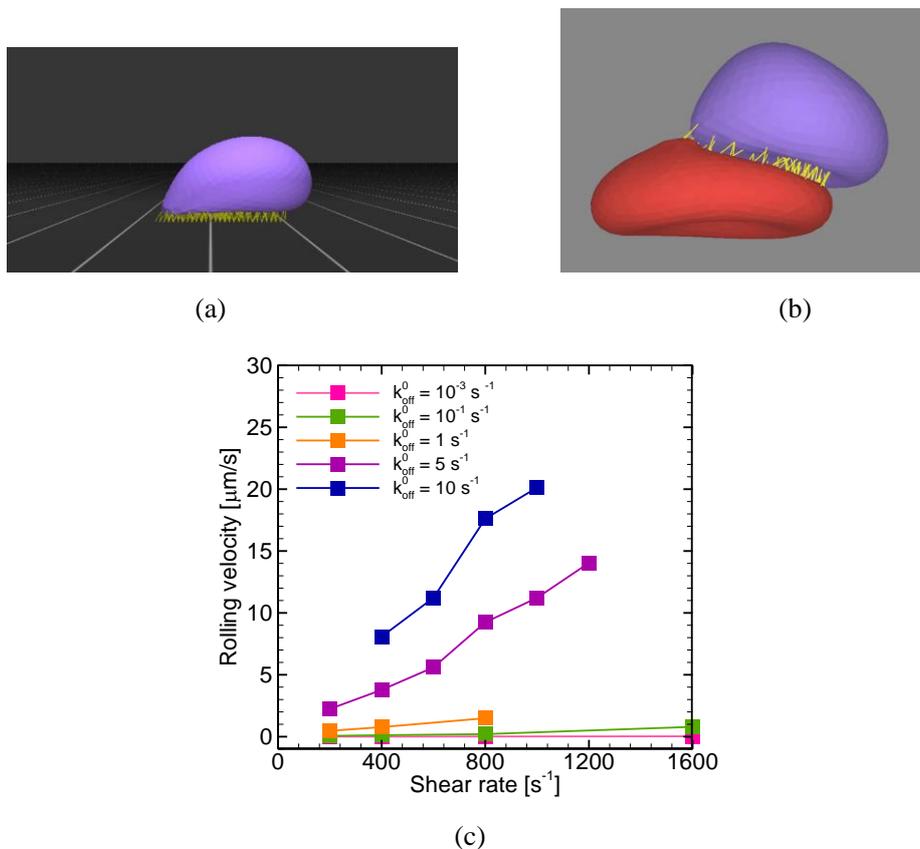


図 1: マラリア感染赤血球の計算力学モデル. (a) 壁面上の回転運動, (b) ロゼット形成, (c) 壁面上の回転速度.

## **A numerical model of red blood cells infected by *Plasmodium falciparum* malaria**

Yohsuke Imai

*School of Engineering, Tohoku University, Japan*

Red blood cells infected by *Plasmodium falciparum* (*Pf*-IRBCs) adhere to endothelial cells because of proteins exported from the parasite. Cytoadhesion of *Pf*-IRBCs to endothelial cells is mediated by ligand-receptor interactions. Ligands on the surface of *Pf*-IRBCs, PfEMP1, interact with various receptors on endothelial cells. Examples include intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Thrombospondin (TSP), and cluster of differentiation 36 (CD36). Each receptor has different biochemical characteristics from other receptors. For example, the dissociation rate of PfEMP1-TSP bindings is approximately  $10^{-1} \text{ s}^{-1}$ , while that of PfEMP1-CD36 bindings is  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Such differences in biochemical characteristics cause a receptor-dependent behavior of *Pf*-IRBCs on the blood vessel wall, detachment, rolling or firm adhesion. However, the relationship between the *Pf*-IRBC behavior and the biochemical characteristics has not been fully understood, because this problem involves not only biochemical interactions of proteins, but also fluid and solid mechanics of cellular flows. *Pf*-IRBCs also adhere to healthy RBCs, and form a cluster of RBCs called rosette. It is difficult to track a flowing rosette in experiments, and the behavior of rosettes in microcirculation has not been reported. In this study, we develop a numerical model of the dynamics of *Pf*-IRBCs under flow condition.

A *Pf*-IRBC was modeled by an oblate ellipsoidal capsule with ligands on its surface. We employed the boundary element based method for cellular flow, coupled with the finite element method for membrane mechanics and the Monte Carlo method for ligand-receptor interactions. The deformability of the *Pf*-IRBC model was determined by a numerical test, mimicking an experiment of single RBC stretching using optical tweezers. We simulated the rolling motion and firm adhesion of *Pf*-IRBCs on a planar surface under simple shear flow. The rolling velocity of *Pf*-IRBCs increases almost linearly with the shear rate and the dissociation rate. We also simulated rosette formation under flow conditions and show that the adhesion between *Pf*-IRBCs and healthy RBCs is very stable.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

##### 総説・解説・成書

1. Toshihiro Omori, Yohsuke Imai, Kenji Kikuchi, Takuji Ishikawa, and Takami Yamaguchi, Hemodynamics in the microcirculation and in microfluidics, *Ann. Biomed. Eng.* **43**, 238-257 (2015).

##### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 受賞：今井陽介 平成 26 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞「生体流れの計算バイオメカニクスの研究」2014 年 4 月 15 日
2. 受賞：Daiki Matsunaga, Yohsuke Imai, Takami Yamaguchi, Takuji Ishikawa Best Poster Award 「Rheological analysis of dense capsule suspension under simple shear flow, Dynamics of Capsules, Vesicles, and Cells in Flow, Compiègne, France, 2014 年 7 月 15-18 日
3. 招待講演：今井陽介, 武石直樹, 阿見祥久, 山口隆美, 石川拓司「微小血管内の細胞流動・接着現象の計算力学モデル」第 53 回生体医工学会大会 (2014)
4. 招待講演：Yohsuke Imai, Akihisa Ami, Takami Yamaguchi, Takuji Ishikawa 「A numerical simulation on the motion of malaria-infected cells in microcirculatory blood flow」7th World Congress on Biomechanics, Boston, USA (2014)

## 細胞機能解明のためのエクソソーム定量解析ナノデバイスの創製

研究代表者：名古屋大学 大学院工学研究科 安井 隆雄

### 1. 研究の概要

組織・生体全体において、生体システムや複雑な生命現象、細胞機能を解明するためには、細胞が分泌する直径 50-100 nm の脂質二重膜で覆われたエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームを解析することが重要である。エクソソームを定量的に解析するためには、煩雑な操作と長時間の測定、高価な実験設備が必要である等の多くの課題がある。本研究ではナノワイヤ構造体を微小流体デバイスに組み込むことで、新規ナノデバイスを創製し、エクソソームの定量的な解析から生体システム・複雑な生命現象・細胞機能の解明を行うことを目的とした。本年度は、エクソソームの内部の核酸解析が可能な新規ナノデバイスを創製した。

### 2. 研究の背景と目的

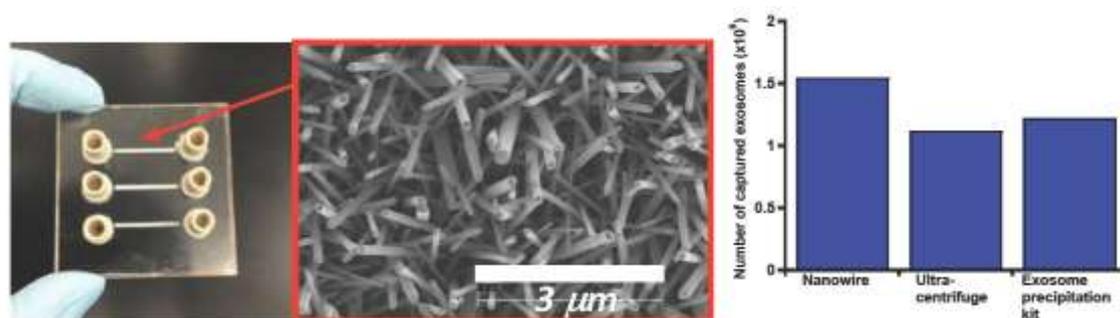
エクソソームは、その内部に生命の微調整役として機能する microRNA 等の核酸が、その表面には様々な膜タンパク質が存在しており、細胞間や個体間、生体システム全体の伝搬物質として機能していることが明らかになっている。特に、ヒトの生老病死という一連の生物学的な生命現象においては、「1. 生命の誕生：母乳中エクソソームの受け渡し」「2. 老化：加齢に伴うエクソソーム放出量の減少」「3. 疾患：エクソソームを媒介とするウィルス増殖」「4. 死：がん細胞由来エクソソームによる生体内免疫システムの低下」へのエクソソームの関与が報告されている。このような背景のもと、細胞機能の解明には、これまでに行われてきたサイトカイン等のタンパク質・核酸等の単一分子を中心とした研究から、細胞環境におけるエクソソームのタンパク質や核酸等のバイオ分子が関わる分子反応を定量的に理解する必要がある。エクソソームを定量的に解析するためには、煩雑な操作と長時間の測定、高価な実験設備が必要である等の多くの課題がある。エクソソームの解析において最も大きな課題の 1 つは、細胞培養上清・尿・血液等に含まれている直径 50-100 nm 程度のエクソソームを高効率に分離回収することである。現在までに報告されている手法では、エクソソームを沈殿凝集させる試薬を用いる手法であったり、超遠心分離を用いる手法であったりと、エクソソームを分離回収する

## 公募

ためには長時間を要する作業が必要である。そこで本研究では、エクソソームを高効率に分離回収し、エクソソームの定量的な解析を行い、エクソソームを媒介とした生体システムや複雑な生命現象、細胞機能の解明を行うことを目的とした。

### 3. 成果

新規ナノデバイス(ナノワイヤデバイス)はポリメタクリル酸メチル樹脂(PMMA)製マイクロ流路内に酸化亜鉛ナノワイヤを水熱合成させ、作製した(図左)。PMMA 基板上に反応性イオンエッチング法により幅 1 mm、長さ 3 cm、深さ 30  $\mu$ m の流路を作製し、酸化亜鉛ナノワイヤを流路内へ位置選択的に成長させた。流路内への位置選択性は、流路外をマスキングテープにより被膜し、結晶核となる酸化亜鉛粒子懸濁液を流路内に滴下しアニーリングすることで達成した。その後、水熱合成法により結晶核酸化亜鉛粒子を結晶成長させ、酸化亜鉛ナノワイヤを流路内に得た。流路外のマスキングテープを剥がした後に PMMA 基板の貼り合わせを行った。本ナノワイヤ構造体は、直径約 100 nm、長さ 2-3  $\mu$ m の六方ウルツ鉱結晶であり、流路の側面・底面に均一に結晶成長されている。これらナノワイヤ構造体により、PMMA 流路内の比表面積の増大、ナノ空隙、酸化亜鉛ナノワイヤ側面の正電荷の特性を得ることができた。本ナノワイヤデバイスを用いて、1 mL のエクソソーム含有液(尿・血清・細胞上清液等)を送液するだけでエクソソームの高効率分離に成功した(図右)。また、エクソソームを吸着分離したナノワイヤデバイスにエクソソーム破碎液を送液することでエクソソーム由来 miRNA 溶液を回収し、マイクロアレイ・定量逆転写 PCR(qRT-PCR)の 2 つの手法を用いて抽出評価を行い、本ナノワイヤデバイスが高効率に miRNA を回収可能であることを示すことに成功した。これら結果より、本デバイスを用いることで、エクソソームの高効率回収からエクソソームの定量的解析が可能であることが明らかとなった。今後は、本デバイスを用いて、エクソソームを媒介とした生体システムや複雑な生命現象、細胞機能の解明を行う予定である。



図：(左)新規ナノデバイス(ナノワイヤデバイス)の写真とナノワイヤ構造体の SEM 画像、(右)それぞれの手法を用いた時のエクソソーム回収個数の比較

## **Quantitative exosome analysis nanodevices toward cellular function elucidation**

Takao Yasui

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Japan*

Since exosomes contain microRNA (miRNA) and membrane proteins in and on them, respectively, which can be a candidate to elucidate inter- and intra-cellular function, recently, quantitative exosome analysis, such as in urine, serum, and saliva, received a lot of attention from researchers. Massive data obtained from exosome analysis in less sample volume is of great importance to realize less invasive diagnosis and effective searching for unknown biomarkers based on exosome analysis, however, conventional methods can not fulfill such a requirement; it takes several mL of sample volume. Also, it is significantly difficult to attain highly efficient capture of exosomes using conventional methods due to exosome size ranging from 50 to 100 nm. In this research, we fabricated nanodevices by combining nanowire structures and microchannels and achieved highly-efficient separation of exosomes from small sample volume for a realization of quantitative exosome analysis

For fabrication of nanodevices, ZnO nanowire structures (100 nm in diameter and 2-3  $\mu\text{m}$  in length) were fabricated in polymethyl methacrylate (PMMA) microchannels for highly efficient separation of exosomes in 1 mL sample volume. The separation efficiency was evaluated among four methods: using the nanowire structures embedded in microchannels, ultracentrifugation, and exosome precipitation kit. We confirmed that around  $10^9$  exosomes were captured on nanowire structures due to electrostatic interaction between negatively charged exosomes and positively charged nanowire structures, and nanometer-scale spacing between nanowires. Comparison of among three methods showed nanowire structures were superior to other two methods. Introduction of lysis buffer triggered extraction of miRNA in captured exosomes, and extracted miRNA from urine and serum exosomes were analyzed in microarray. Extraction efficiency using the three methods was evaluated by scatter plots. Number of miRNA types was also used to evaluate the extraction efficiency among the three methods. The evaluation data showed nanowire structures showed the largest number of extracted miRNA types. Since the nanowire structures could achieve highly efficient extraction of miRNA in exosomes, undetectable miRNA using ultracentrifugation or exosome precipitation reagent became detectable miRNA using nanowire structures.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Takao Yasui, Satoru Ito, Takeshi Yanagida, Yong He, Sakon Rahong, Masaki Kanai, Kazuki Nagashima, Hiroshi Yukawa, Noritada Kaji, Tomoji Kawai, and Yoshinobu Baba; Exosomal micro-RNA analysis in urine or serum using nanowire structures, *Micro Total Analysis Systems 2014*, **1**, 680-682 (2014)

### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 受賞：安井隆雄 「ナノ構造体を用いた生体分子解析」 2014年5月22日
2. 受賞：安井隆雄 「1次元フォトニック結晶による感染症の無標識診断技術の開発」 2014年11月21日
3. 招待講演：安井隆雄 「ナノ構造体を用いた生体分子解析」 第29回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (2014年5月22日)
4. 招待講演：安井隆雄 「ナノワイヤ構造体を用いた生体分子解析」 第33回分析化学中部夏期セミナー (2014年9月5日)
5. 招待講演：安井隆雄 「ナノワイヤを用いたエクソソーム分離抽出技術」 中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会 (2014年12月10日)
6. 招待講演：安井隆雄 「ナノ構造体を利用した生体由来物質の解析」 第12回生物計測化学懇談会 (2015年2月23日)
7. 招待講演：安井隆雄 「Nanowires for Functional Biomolecule Detection」 Pittcon Conference & Expo 2015 (2015年3月11日)

## ナノ核酸デバイスを用いた自然免疫応答発現機構の網羅的解析

研究代表者：徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 南川 典昭  
 連携研究者：徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 古川 和寛

### 1. 研究の概要

生体内現象は、生体分子が高度に相互作用することにより調節、維持されており、その相互作用様式の解明は、生命現象を理解する上で極めて重要である。研究代表者らは、自らが開発したナノ核酸デバイスを用いて、siRNA によって誘起される分子反応 (RNA 干渉効果による遺伝子発現抑制と TLR3 を介した自然免疫応答) の発現機構解明を行ってきた。今年度はさらに自然免疫応答の網羅的解析を目的とし、Whole Blood Assay (WBA) により自然免疫応答の増強・軽減を検討するとともに、その鍵となるパターン認識受容体を同定すべくナノ核酸デバイスを用いた光ラベル化法の開発を試みた。

### 2. 研究の背景と目的

核酸によるパターン認識受容体を介した自然免疫応答は、元来生物に備わる重要な生体防御機構である。しかし、その発現機構は極めて複雑であり、核酸とパターン認識受容体との分子認識メカニズムが明らかにされていないため予測が難しい。

研究代表者らは独自に開発したナノ核酸デバイス (図 1: デアザアデニン環の 7 位および 3 位に導入された臭素原子がメジャーおよびマイナーグループの立体障害として機能) を用いて siRNA によって誘起される分子反応の発現機構解明を行ってきた。すなわち、siRNA

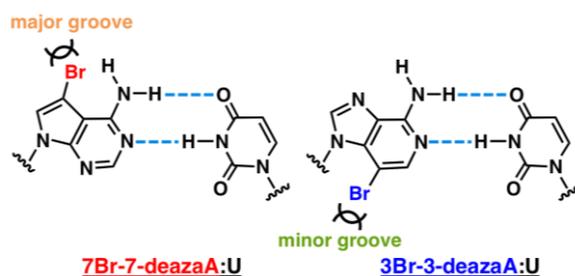


図 1 ナノ核酸デバイスの構造

の様々な位置にこのデバイスを導入し、TLR3 を介した自然免疫応答の回避能について評価した結果、siRNA のセンス鎖の 5' 末端付近にマイナーグループ側の立体障害となる 3Br-3-deazaA (3Br-deA) を導入した場合、RNA 干渉効果の増強と TLR3 を介した自然免疫応答を軽減できることが明らかとなった。しかしこの研究において、すべてのパターン認識受容体との相互作用を一括して評価できる Whole Blood Assay (WBA) では、逆に自然免疫応答を増強させることが明らかとなり、まずはこの一般性を検討するとともに、自然免疫応答発現の鍵となるパターン認識受容体の同定を試みた。

### 3. 成果

**(1) WBA による自然免疫応答評価:** まず、ナノ核酸デバイスをセンス鎖中央部分 (siR1)、アンチセンス鎖 5'末端部分 (siR2, 4 他) ならびにセンス鎖 5'末端部分 (siR3, 5 他) に導入した siRNA を調製した (12 種類、計 24 本)。これらについて WBA (*PLos ONE* 2013, 8, e71057.) を行い、自然免疫応答変化を IL-8 の誘導量を指標にして定量評価した。その結果、siR1, 2 および 4 においては顕著な IL-8 誘導量変化が観察されないのに対し、センス鎖 5'末端付近に 3Br-deA を導入した siR3 および 5 では自然免疫応答の増強が観察された (図 2)。この結果は前述のように、TLR3 との相互作用解析により得られたものとは異なる。しかし、その傾向に一般性が見られたことから、さらなる自然免疫応答誘導パターン認識受容体との分子認識機構の理解が求められることが示された。

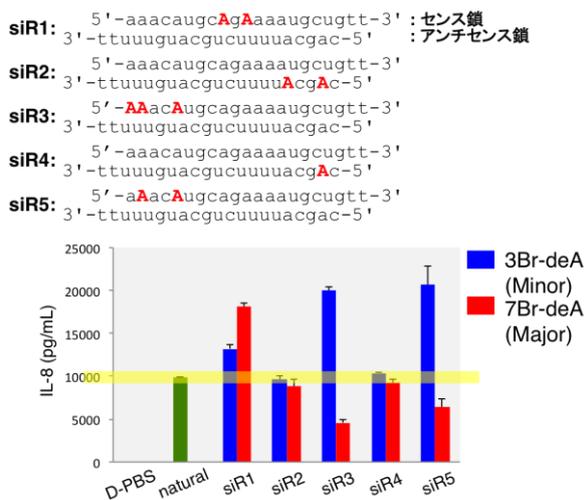


図 2 WBA による自然免疫応答評価

**(2) ナノ核酸デバイスを用いた光ラベル化法開発検討:** WBA により観察された自然免疫応答変化をもたらす鍵となるパターン認識受容体を同定すべく、ナノ核酸デバイスを用いた光ラベル化法を検討した。これまでに報告された核酸とタンパク質の相互作用を解析する方法として、ピリミジン塩基の 5 位に臭素あるいはヨウ素原子を有した 5-Bromo (5-Iodo) uridine を利用し、これに光照射を行なうことにより生じたラジカルを介して標的を補足する手法が知られている (*J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 5796.). 研究代表者らが開発したナノ核酸デバイスにおいても同様の光照射による標的補足が可能であると期待し、まずはヌクレオシドレベルでの検討を行なった。しかし、5-iodo uridine が 5 分以内にラジカルを生じる条件においても 7-Br-7-deazaA (7Br-deA) および 3Br-deA からはラジカルの発生が

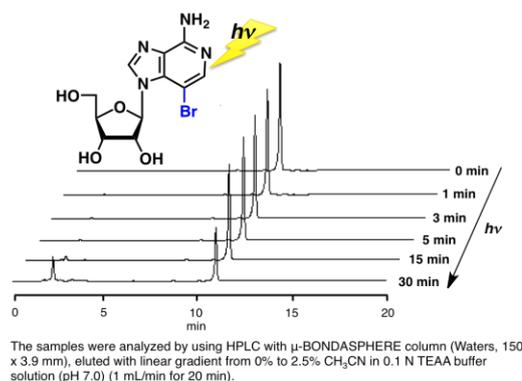


図 3 3Br-deA への光照射検討

確認されなかった (図 3)。そこで、臭素原子の代わりにトリフルオロアジリン基を導入した新しいナノ核酸デバイス (図 4) を設計し、その合成法についてもおよその目処をつけた。今後は、これらを導入した siRNA を調製し、鍵となるパターン認識受容体を補足するとともに相互作用様式を解明する。

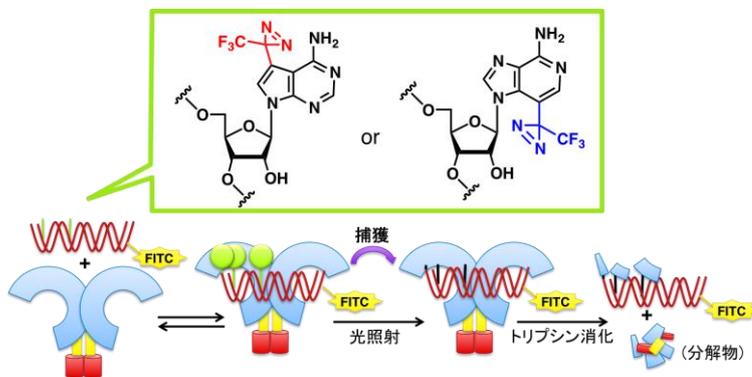


図 4 新しいナノ核酸デバイスの構造とコンセプト

## Elucidation of the innate immune systems activated by siRNA using a nano-chemical device.

Kazuhiro Furukawa, Noriaki Minakawa\*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, Japan

The interactions of nucleic acids with proteins such as enzymes and transcription factors play a central role in numerous biological processes including the regulation of gene expression. Since this interaction occurs in a strict and specific manner, an understanding of how proteins bind structurally to nucleic acids is critical in determining the mechanisms of the biological process. In addition, this information is expected to provide clues for the development of nucleic acids-based therapeutics, such as siRNAs and aptamers.

In our previous report, we described about the utilities of the nano-chemical device consisting of a set of 3-bromo-3-deazaadenine (3Br-deA) and 7-bromo-7-deazaadenine (7Br-deA) nucleosides (Fig. 1), to elucidate molecular interaction between siRNA and RNA induced silencing complex (RISC) or toll-like receptor 3 (TLR3) proteins. In this year, we studied innate immune responses induced by siRNA with nano-chemical device using Whole Blood Assay (WBA) and attempted to develop a photoaffinity labeling system using nano-chemical device.

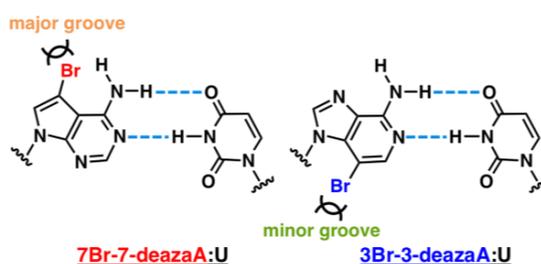


Fig. 1 Structures of nano-chemical device

We carried out WBA to evaluate whole innate immune response induced by siRNA in others of the interaction with TLR3. As a result, drastic attenuations of the IL-8 level were observed when the 3Br-3-deazaAs (3Br-deAs) were introduced into the 5'-end of the sense strand (Fig. 2, siR3 and 5). However, these tendencies obtained by WBA were different from that of TLR3 dependent assay. Thus, we attempted the photoaffinity labeling to detect a receptor protein, which plays critical role to induce innate immune response with siRNA. First, to investigate whether radical generations were occurred or not, 7Br-7-deazaA (7Br-deA) and 3Br-deA nucleoside units were photoirradiated. However, both 7Br-deA and 3Br-deA were inactive against irradiation. Accordingly, we explored a new nano-chemical device with a trifluoro diazirine group at C7 or C3 position of deazaadenine ring instead of a bromo group. With this new device, the studies of receptor protein detection are currently underway.

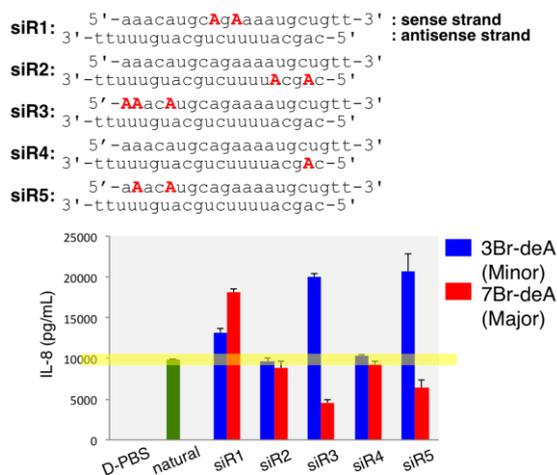


Fig. 2 The results of WBA

業績リスト

学術論文

1. Yota Saito, Yosuke Hashimoto, Mai Arai, Noriko Tarashima, Tadashi Miyazawa, Kazuya Miki, Mayumi Takahashi, Kazuhiro Furukawa, Naoshi Yamazaki, Tatsuhiro Ishida and Noriaki Minakawa\* Chemistry, properties, and in vitro and in vivo applications of 2'-*O*-methoxyethyl-4'-thioRNA, a novel hybrid type of chemically modified RNA *ChemBioChem*, **15**, 2535–2540 (2014)

総説・解説・成書

該当なし

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 受賞: 田良島典子、吉良太孝、山崎尚志、古川和寛、南川典昭 最優秀ポスター賞 創薬懇話会 2014 in 岐阜「ナノ核酸デバイスを利用した siRNA-タンパク質相互作用における分子認識機構の解明」2014年07月11日
2. 受賞: 田良島典子、齋藤陽太、橋本洋佑、古川和寛、石田竜弘、南川典昭 奨励賞 アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014「Synthesis and in vitro/vivo evaluation of anti-miRNA consisting of 2'-*O*-methoxyethyl-4'-thioRNA, a novel hybrid type of chemically-modified ON」2014年07月11日
3. 招待講演: 南川典昭「Chemistry of 4'-selenonucleic acids. –Can 4'-selenonucleic acids exceed 4'-thionucleic acids?–」アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014
4. 南川典昭「4'-チオ核酸を用いる核酸創薬研究の展望」第15回 NMMS セミナー

## 細胞取込過程の環境変化を認識するナノカプセルの構築と

### 超音波力学療法への展開

研究代表者：大阪府立大学工学研究科 原田 敦史

#### 1. 研究の概要

新規音増感剤として、抗がん剤である doxorubicin (DOX) へミトコンドリアターゲティング能を付与するために triphenylphosphonium (TPP) を導入した DOX-TPP を合成した。DOX、DOX-TPP 及びこれまでにナノカプセルへの内包が可能であることが確認されている rhodamine 6G の超音波照射による一重項酸素生成を singlet oxygen sensor green を検出プローブとして用いて評価し、これら3つの化合物が音増感剤としての機能を有することを確認した。また、DOX と DOX-TPP では細胞内動態に違いが生じることが示唆された。

#### 2. 研究の背景と目的

生体系においては、生体高分子が的確に自己組織化した数十ナノメートルスケールの超分子集合体（ナノ集合体）が数多くみられ、環境に呼応した動的構造変化を通じて重要な生体機能の一翼を担っている。その代表例であるウイルスは、エンドサイトーシスによって細胞へ取り込まれる過程において、細胞内エンドソームにおける pH 低下をトリガーとする動的な構造変化を通じて膜融合を生起せしめ、更には、細胞質中を移動して核へと到達し、核膜孔から核内へと侵入してカプシド構造の崩壊に基づいてウイルス遺伝子を核内に放出する。このカプシドの二段階動的構造変化が、その機能発現において重要な過程となっている。本研究は、樹状高分子とポリペプチドからなるカチオン性高分子が、ポリペプチドテイル鎖のコンフォメーション変化により高分子鎖の三次元構造が制御される効果により自発的に単分散なポリマーベシクルを形成でき、さらに、架橋構造導入により分散安定性の優れたカチオン性ナノカプセルが得られるという発見をドラッグデリバリーシステム（DDS）へ展開するものである。カチオン性ナノカプセルを細胞質内の還元環境で開裂するジスルフィド結合により安定化することにより、樹状高分子内部三級アミンのプロトンスポンジ効果によるエンドソーム脱出能と組み合わせることにより細胞取込過程の微小環境変化を認識するナノカプセルを構築する。また、このナノカプセルへ音増感剤を内封することによって、超音波照射による音増感剤の活性酸素種生成を通じた殺細胞効果の発現により治療効果を示す超音波力学療法への展開を図る。

### 3. 成果

カチオン性ナノカプセルに内封する音増感剤として、カチオン性化合物に関するリリース抑制が確認されていることから、rhodamine 6G (Rh6G) と doxorubicin (DOX) を選択した。Rh6G は細胞質全体に分布し、DOX は核に局在することが知られている。そこで、光線力学療法においては一重項酸素がミトコンドリアにダメージを与えることが殺細胞効果の誘導において重要であることが報告されているので、DOX 分子にミトコンドリア指向性を付与するためにトリフェニルホスホニウム (TPP) 基を導入することを検討した。反応経路を図 1 に示す。

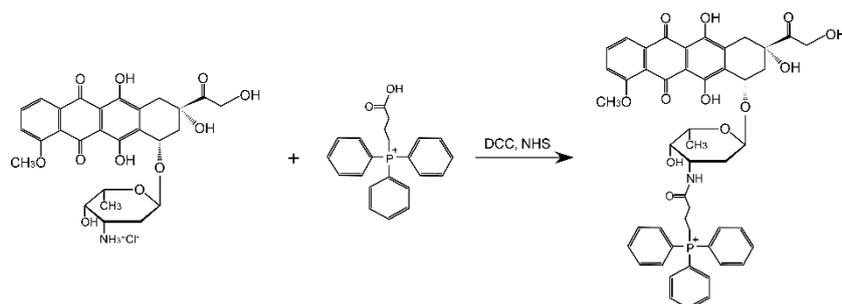


図 1. DOX 分子への TPP 基導入反応経路

縮合剤を用いて TPP 基及び COOH 基をもつ化合物を DOX と反応させることにより DOX-TPP を得た。構造の確認は、<sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR によって行った。得られた DOX-TPP と DOX の細胞内分布の違いを検討するために、HeLa 細胞に両化合物をそれぞれ播種し 1 時間後のレーザー共焦点顕微鏡像を図 2 に示す。

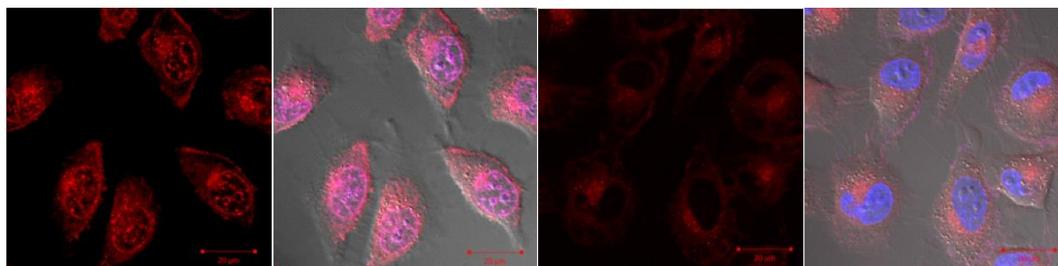


図 2. DOX 及び DOX-TPP で処理された HeLa 細胞のレーザー共焦点顕微鏡像  
左から DOX 処理された細胞の蛍光像、位相差像との重ね合わせ、DOX-TPP 処理された細胞の蛍光像、位相差像との重ね合わせ

DOX の場合、1 時間後では細胞質に分布しているものもみられるが、核内に分布しているものも見られた。一方、DOX-TPP では、細胞質にのみ赤色蛍光が観察され、核にも分布していないことが確認された。今後、より長時間培養した際の両化合物の細胞内分布の評価を行う必要があるが、TPP 基の導入により細胞内動態を変化させることがかのであることが示唆された。DOX、DOX-TPP 及び Rh6G について超音波照射時一重項酸素生成能を singlet oxygen sensor green を検出プローブとして用いて評価した結果、これらの化合物は一重項酸素生成能を有し、その程度が同程度であることが確認された。

## **Creation of nanocapsules recognizing environmental change in cellular uptake process for effective sonodynamic therapy**

Atsushi Harada

*Department of Applied Chemistry, Osaka Prefecture University, Japan*

In the biological system, there are various types of supramolecular assemblies with dozens of nanometers scale in which biopolymers precisely organize, and they carry the part of important biological function through the dynamic structural change in response to micro-environment. The natural virus which is the representative example makes membrane fusion through the dynamic structural change in response to pH decrease in the endosome in cells in a process taken in cells by endocytosis. Further, they move into the cytoplasm and arrive at the nucleus, and then invade from pore of nuclear membrane a nucleus and it is intranuclear and releases a viral gene based on the collapse of the capsid structure. Two step dynamic structural changes, the detachment and the collapse of this capsid, becomes an important process in the function manifestation. On the other hand, the author investigated that head-tail type polycation composed of dendritic polymer and polypeptide could spontaneously form narrowly-distributed polymer vesicles and this polymer vesicle was stabilized by introduction of cross-linkages. In this study, the author develops the nanocapsules to sonodynamic therapy in drug delivery system (DDS) field through virus-inspired design.

It is known that rhodamine 6G (Rh6G) and doxorubicin (DOX) have the ability of reactive oxygen species (ROS) generation by sonication. Also, when both compounds were incubated with the cultured cells, Rh6G distribute to whole cytoplasm and DOX can localize to nucleus. The author try to modify the intracellular distribution of DOX molecules. For this purpose, triphenylphosphonium (TPP) group was introduced to DOX molecule through the condensation reaction between primary amine of DOX and carboxylate of (3-carboxypropyl) triphenyl-phosphonium bromide, since TPP group have high affinity to mitochondria. For thus obtained DOX-TPP and DOX, intracellular distribution was compared. DOX-TPP did not distribute to nucleus and showed different distribution with DOX. The author succeeded the change in intracellular distribution of DOX molecules. Also, ROS generation ability of DOX, DOX-TPP and Rh6G were evaluated by using singlet oxygen sensor green as a fluorescent probe. These compounds showed singlet oxygen generation by sonication, and there was no significant difference among these molecules.

公募

## 業績リスト

### 学術論文

なし

### 総説・解説・成書

Intracellular Delivery II, A. Prokop, Y. Iwasaki, A. Harada, Eds., 2014, Springer (監修)

### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

特許：原田敦史、山本聡、小暮健太朗、濱進 「治療装置および治療システム」

特願 2014-143268 出願日：2014年7月11日

受賞：京都薬科大学 小暮教授のグループとの共同研究に関する成果発表を行い、山本 聡 (学生) が第43回医用高分子シンポジウム 優秀賞を受賞