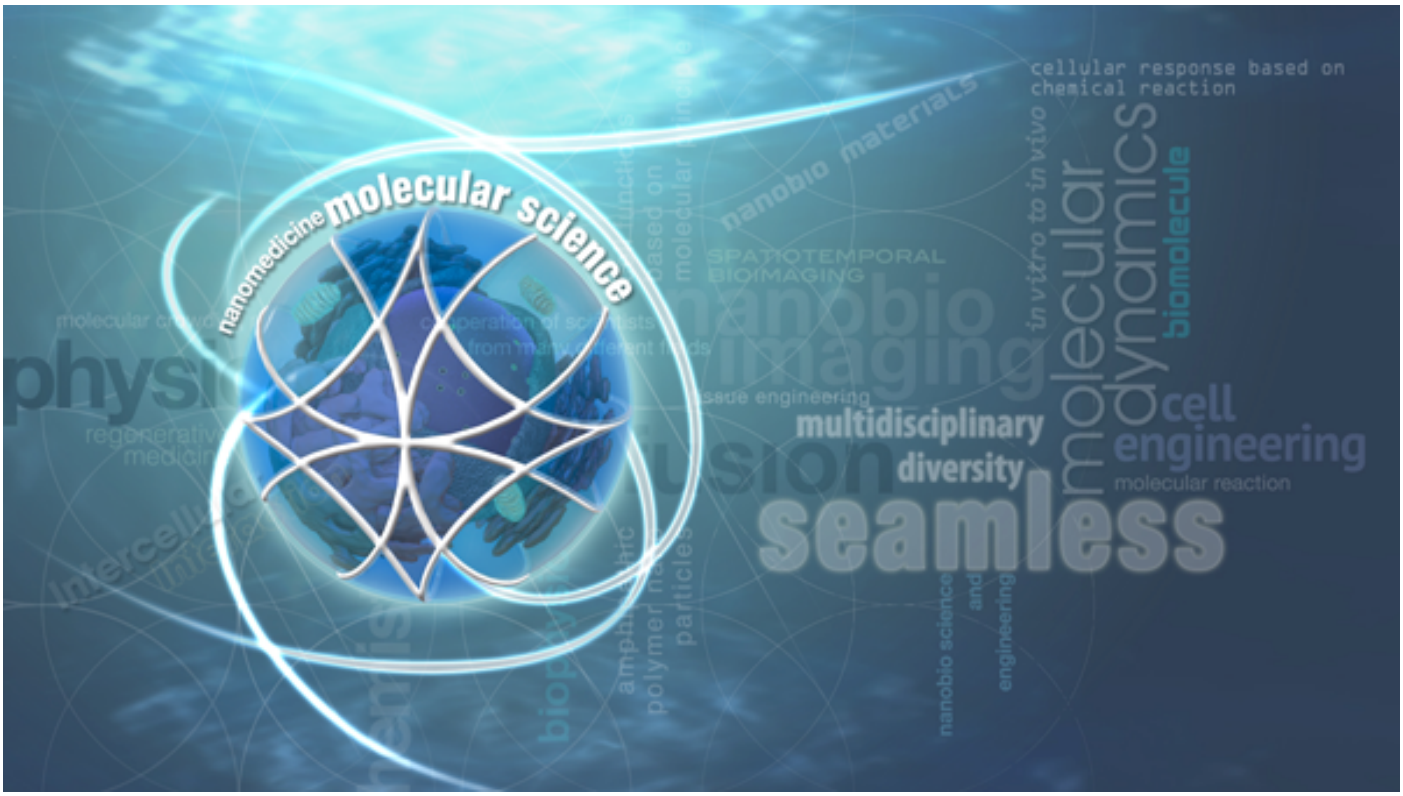
文部科学省　科学研究費補助金　新学術領域研究

ナノメディシン分子科学

領域代表　石原　一彦（東京大学）

第1回全体会議・公開シンポジウム
プログラム・要旨集

2011 年 9 月 22 日（木）
東京大学　武田先端知ビル　武田ホール



新学術領域「ナノメディシン分子科学」

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す。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す。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ます。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します。

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します。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・考察できるようにします。これには大きく2つの目的があります。

1. 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をします。
2. 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います。

領域代表

石原　一彦　（ISHIHARA, Kazuhiko）

東京大学　教授
大学院工学系研究科
マテリアル工学専攻・バイオエンジニアリング専攻

領域代表挨拶

平成 23 年度より、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」が発足いたしました。工学、理学、医学など幅広い既存の学術分野の融合のもと、新しい分子化学を基盤とする細胞環境の理解と考察を進め、最終的には高度の分化・進化した医療に貢献できる学術領域の構築を目指しています。

“ナノメディシン”という単語は、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合による新しい医療というように思いがちです。いわゆる2つの大きな科学イノベーションの足し算という観点から、バイオチップやバイオセンサー、ナノキャリアーなどの医療技術に利用できるデバイスの研究がされました。一部のデバイスは診断や分析に有効であることは周知の事実ですが、この周辺領域を取り扱う学術はいまだに存在せず、工学としての展開を妨げ、また医療において信頼性を獲得するには至っていません。ここで、新たな観点から「ナノメディシン分子科学」を新学術として創出することで、化学・物理学などの基礎科学で、生命現象を明確に理解する学術領域が生まれるとともに、これは、工学、薬学、医学などと連結し、直接社会貢献する分野に大きな福音をもたらします。具体的な波及効果としては、以下のことを想定しております。

現状の医療においても、疾病の発症原因を、細胞内の分子反応により解釈することで、一義的に解釈できると考えています。また、これに対する治療法も、分子反応パラメーターを解析しながら選択することができるようになり、より効果的な治療が可能となります。革新的医療への適切な貢献として、組織再生医療に期待されている ES 細胞、iPS 細胞の製造法確立に有用な分子パラメーターが提供でき、この分野の研究・開発を効率化でき、世界的なイニシアティブを堅持できます。

医療産業活性化の促進として、正確な生体分子情報が得られることで、安全性と医療機能性を加味した医療デバイスの設計、製造が容易になります。開発プロセスの統一化・簡略化ができるため、開発期間が著しく短縮されます。効率の良い医薬品設計法の確立として、コンピューター科学に正確かつ豊富なパラメーターを提供できます。バイオシミュレーションや、創薬の分子シミュレーションが大きく進展します。

広範な知識を有する若手研究者の育成として、複雑系である生命・生体活動を統一した情報で理解でき、専門分野を異にしながらも、医工学の領域において優れた研究者の育成が可能となると考えています。

くれぐれも新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」への皆様のご支援とご指導をお願いいたします

領域研究概要

新学術領域研究
「ナノメディシン分子科学」概要

領域略称名 :ナノメディシン

領域番号 :2306

設定期間 :平成 23 年度　～　平成 27 年度

領域代表者 :石原　一彦

所属機関 :東京大学

ナノメディシン分子科学は、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す。しかしながら、細胞環境は通常の化学反応環境とは全く異なります。ナノメディシン分子科学では、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を導出します。

すなわち、細胞にフォーカスし、細胞環境での分子反応論の確立、細胞環境の理解、細胞内化学反応様式の理解を基本とする学術と定義します。これにより分子反応場となる細胞を通して生体全体へと連携するシステムを、各次元で、異分野に属する研究者が共通する言葉で理解・考察できるようにします。これには大きく2つの目的があります。

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、医薬品や医療機器創製のための設計に結実し、超高齢社会に対応する安全・安心医療の発展に貢献します。

また、バイオ・医療産業の爆発的発展を誘引する工学的情報提供と、将来的にこれを支え、より発展させる人材育成を行います。

事務局

〒101－0062　東京都千代田区神田駿河台２－３－１０
東京医科歯科大学
生体材料工学研究所内
ナノメディシン分子科学研究領域事務局　　由井 伸彦
電話：03-5280-8022
メール：nanomedicine.ibb@tmd.ac.jp

研究組織

総括班

研究代表者

石原一彦　（東京大学）

研究分担者

樋口　秀男　（東京大学）

岩田　博夫　（京都大学）

連携研究者

宇理須　恒雄　（名古屋大学）

権田　幸祐　（東北大学）

夏目　敦至　（名古屋大学）

福田　紀男　（東京慈恵医大）

丸山　厚　（九州大学）

三宅　淳　（大阪大学）

由井　伸彦　（東京医科歯科大学）

計画研究班

A01 班　ナノメディシンの分子科学

研究代表者　樋口　秀男（東京大学）　分担研究者　茅　元司（東京大学）

研究代表者　福田　紀男（東京慈恵会医大）分担研究者　栗原　敏（東京慈恵会医大）、橋本　和弘（東京慈恵会医大）、本郷　賢一（東京慈恵会医大）、草刈　洋一郎（東京慈恵会医大）、照井　貴子（東京慈恵会医大）、小比類巻　生（東京慈恵会医大）

研究代表者　由井　伸彦（東京医科歯科大学）　分担研究者　金野　智浩（東京大学）、徐　知勲（東京医科歯科大学）

A02 班　ナノメディシンのための分子科学

研究代表者　石原　一彦（東京大学）　分担研究者　井上　祐貴（東京大学）

研究代表者　三宅　淳（大阪大学）　分担研究者　木原　隆典（大阪大学）

研究代表者　丸山　厚（九州大学）　分担研究者　狩野有宏（九州大学）、嶋田直彦（九州大学）

A03 班　ナノメディシンを用いた分子科学

研究代表者　岩田　博夫（京都大学）　分担研究者　有馬　祐介（京都大学）　岡本行広（名古屋大学）

研究代表者　権田　幸祐（東北大学）

研究代表者　夏目　敦至（名古屋大学）　分担研究者　千賀威（名古屋大学）

プログラム

13:00～13:15　領域代表挨拶　　石原　一彦（東京大学）

13:15～13:20　研究総括班挨拶　　宇理須　恒雄（名古屋大学）

「ナノメディシンを用いた分子科学」

13:20～13:40　がんリンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発
権田　幸祐（東北大学）

13:40～14:00　多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御
岩田　博夫（京都大学）

14:00～14:20　遺伝子解析と分子トレーシングを基盤とした細胞標的分子の創製
夏目　敦至（名古屋大学）

14:20～14:35　コーヒーブレーク

「ナノメディシンの分子科学」

14:35～14:55　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
樋口　秀男（東京大学）

14:55～15:15　生体内ナノ分子計測を利用した心疾患病態の解析
福田　紀男（東京慈恵会医科大学）

15:15～15:35　細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析
由井　伸彦（東京医科歯科大学）

15:35～15:50　コーヒーブレーク

「ナノメディシンのための分子科学」

15:50～16:10　バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス
石原　一彦（東京大学）

16:10～16:30　直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製
三宅　淳　（大阪大学）

16:30～16:50　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
丸山　厚　（九州大学）

16:50～17:00　総括談話　　片岡　一則（東京大学）

17:30～　懇親会（懇親会費：¥2,000）

A03 班（ク）

がんリンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発

研究代表者　東北大学　権田　幸祐

１．背景

国内死因の第１位はがんであり、その最も脅威な点は転移能である。がん転移治療を効果的に行うために、生体内環境における転移メカニズムの理解は必須である。転移の分子メカニズム解明には、生体イメージングを用いた分子機能解析が重要であるが、これまでの生体イメージング(蛍光、発光、磁気、X線)は、個体や組織全体の撮像にフォーカスした方法が主であり、空間位置精度はμmレベルであった。そのため分子レベルの転移メカニズムの理解は困難であった。研究代表者らは、がん転移活性化因子PAR1(膜蛋白質)に注目し、抗PAR1抗体が結合した量子ドット(蛍光性ナノ粒子)をトレーサーに用いることにより、がんモデルマウス生体内のPAR1分子や転移性がん細胞の動態を空間位置精度7-9nmで捉えることが可能な生体ナノイメージング装置の開発に成功した(*J.Biol.Chem.*, 2010)。

がん転移の治療には、転移メカニズムの理解に加え、転移性がんを早期に発見・治療することが重要である。がん転移は脈管（リンパ管、血管）を通して起こるが、リンパ管の構造は血管に比べ脆弱であり転移が起こり易い。そのためリンパ行性転移は、血行性転移よりも病初期段階において進行が診られ、がん転移の早期診断を行う重要な指標となる。リンパ行性転移では、がん細胞はリンパ管へ浸潤後、リンパ流に乗りリンパ節へ転移すると考えられている。これまでリンパ節の組織診断では、リンパ節内のがん細胞の有無を薄切切片(数μm)を用いて調べていた。しかし、この方法では、摘出リンパ節(数cm)のわずか0.1%以下しか診断できておらず、微小転移を見逃してしまう危険性が高かった。研究代表者らは、量子ドットを蛍光トレーサーに用い、ブタのリンパ管ネットワークを高感度で蛍光イメージングした結果、リンパ節内でがん転移が起り易いと考えられている「輸入リンパ管のリンパ節への流入部」を高精度で特定する方法を開発した(*Nanotechnology*,2010)。

本研究班では、これまでの研究代表者の成果と他研究班の概念や技術を有機的に結びつけることにより、分子反応理解の視点から、「リンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発」を推進したいと考えている。

２．目的

本研究では生体ナノイメージング装置に独自画像処理技術(PCT/JP2011/004762)や新規蛍光デバイス(A01 班、A02 班)を融合し、さらに A01 班と光学技術連携を行うことで、超高感度・超高精度・長時間の生体ナノイメージングを可能とする新規装置の開発を行う。この装置を用いて、がん転移を誘導する「がん転移活性化因子の分子反応パラメータ」に着目した解析を行い、「(1)リンパ行性転移メカニズム解明」を行う。さらに生体組織に比べ、

より高次解析が可能な細胞反応場から得られた分子反応パラメータ概念(A02 班、A03 班)を生体組織内の薬剤分子反応やトレーサー分子開発へ連携させ、「(2)リンパ節内転移がん細胞の超高感度検出法開発」や「(3)がん転移抑制分子送達システムの創製」を行う。すなわち本研究では、リンパ行性転移メカニズムの理解およびこれに基づく新規診断法・治療法の創発を分子科学的立場から目指している。

３．特色と意義

これまでのナノメディシンでは、DDS ナノキャリアをはじめ、ナノ材料開発分野が目覚しい進歩を遂げている。一方でこれまでの生体イメージング技術は、分子レベルの解析に達していなかったため、ナノ材料の機能性を分子レベルで評価し、ナノ材料の分子設計に応用することが出来なかった。すなわちイメージング技術進歩の遅延が律速となり、ナノメディシンの真の意味での発達を妨げていた。A01 樋口班や A01 福田班の光学技術と研究代表者の生体ナノイメージング技術の連携・融合を図ることにより、細胞場から生体までを幅広くカバーできる高次元なイメージング技術の発展が期待できる。この技術を A01 由井班の蛍光分子デバイスや A02 石原班の蛍光性ナノ粒子と連携した分子イメージングを行うことにより、「がん化分子や薬剤分子の入力情報」と「がん疾患発現やがん治療効果の出力情報」の対応関係を繋ぐ「分子反応パラメータ」の構築を目指す。さらに他の研究班から得られた細胞場の分子反応パラメータ概念を融合することによって、細胞場から生体までを幅広くカバーできる普遍的な分子反応パラメータ構築が期待される。

４．主な論文

1. Yoo J, Kambara, T, Gonda K, Higuchi, H. *Exp. Cell Res.* **314**, 3563-3569 (2008).
2. Gonda K, Watanabe TM, Ohuchi N, Higuchi H. *J. Biol. Chem.* **285**, 2750-2757 (2010).
3. Hikage M, Gonda K, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Kumasaka M, Watanabe M, Satomi S, Ohuchi N. *Nanotechnology* **21**, 185103 (2010)
4. Watanabe TM, Tokuo H, Gonda K, Higuchi H, Ikebe M. *J. Biol. Chem.* **285**, 19605-19614 (2010).
5. Kobayashi Y, Nozawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **55**, 79-85 (2010).
6. Cong L, Takeda K, Hamanaka Y, Gonda K, Watanabe M, Kumasaka M, Kobayashi Y, Kobayashi M, Ohuchi N. *PLoS ONE* **5**, e13167 (2010)
7. Imamura J, Suzuki Y, Gonda K, Roy CN, Gatanaga H, Ohuchi N, Higuchi H. *J. Biol. Chem.* **286**, 10581-10592 (2011).
8. Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya, A. *J. Colloid Interface Sci.* **358**, 329-333 (2011).
9. Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, Satomi S, Ohuchi N. *Blood* in press.

A03 班（キ）

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
名古屋大学革新ナノバイオ
デバイス研究センター　岡本　行広

１．背景

個体の発生において、細胞の運命が決定され、次いでそれらの細胞が所定の位置に配された組織が形成され、さらによりマクロな各種臓器が形成される。これらの過程において細胞間の相互作用が決定的に重要な役割を果たしている。さらに、近年大きな期待を持って迎えられている再生医療においても、細胞の機能を十分に引き出すためには、複数種の細胞が生理的に相互作用し機能を発揮できる状態の組織を再生する必要がある。しかし、複数種の細胞からなる組織の再構築は、現在のところ細胞を単に混ぜて後は成り行き任せである。また、細胞間相互作用を研究する手法はボイデンチャンバー法など極めて初歩的な手法があるのみである。この様に、複数種の細胞が相互に作用しながら、細胞が分化しさらに相互の位置関係を変えながら組織を構築する過程を研究する手法は皆無である。

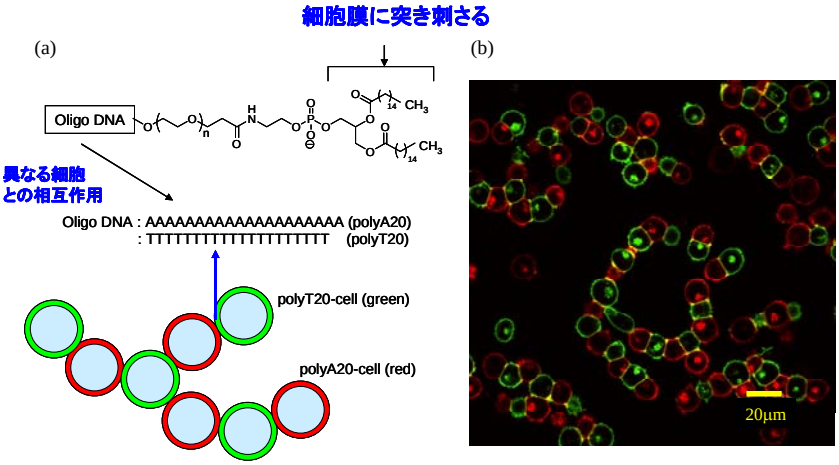


図1．細胞を並べる

我々の初歩的試みを図 1 に示した。図 1(a)に細胞の配列に用いる複合分子を示す。細胞膜に錨を下ろすリン脂質と細胞間を接着させるオリゴ核酸さらに分子の水溶性を高めるポリエチレングリコールとから成る複合分子である。この分子を用いた細胞配列の一例として、細胞膜を赤と緑の蛍光色素で染色した細胞の交互配列を試みた。この場合オリゴ核酸としてオリゴチミジンとオリゴアデニンを用いた。図 1(b)に共焦点顕微鏡像を示した。赤の細胞と緑の細胞が交互に並び、分子が設計した機能を発揮して細胞を配列していることがわかる。

図 1 に示したリン脂質－ポリエチレングリコール－オリゴ DNA 複合分子(LED 分子)は細胞を接着させる糊である。望む部分に細胞を接着させることを可能にした。

iPS 細胞研究に巨額の研究費が投入されている。その目指すところは、早期には創薬時の評価系への細胞の供給、次いで再生医療と言われている。薬物評価デバイス内での

細胞の配置、さらに候補薬物評価に真に必要な多種の細胞からなる機能組織の構築はまったくと言っていいほど研究・開発が行われていない。本研究では、評価デバイスに必要な細胞の配列手法の開発、複数の組織からなる２次元さらに３次元組織の構築を行う。本研究で開発する手法は創薬時の評価系を確立するキーテクノロジーとなり、創薬研究を加速すると考える。さらに、本手法の先には再生医療の実現に必要な複数の細胞から成る組織体の構築がある。

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

３．特色と意義

分子間の相互作用に関する研究手段は数多くあり、その理解も進んでいる。細胞間の相互作用による組織体の形成に関しては、その基礎に分子間の相互作用があるものの、分子間相互作用による組織体の形成、また形態形成の理解は途についたばかりである。さらに一歩進めて、人工的に形態形成を再現できる手法はない。研究(計画)は、まさにナノスケールの分子間相互作用から再生医療に向かうナノメディシンの研究である。

iPS 細胞を用いた応用研究のターゲットは、創薬時の評価系への細胞の供給であるが、本手法を用いて評価デバイスに必要な細胞の配列を行うことが出来るようになり、High throughput スクリーニングが可能になる。また、ES 細胞や iPS 細胞の細胞間相互作用を用いて分化誘導できる培養系の確立し、再生医療に用いることが出来る機能細胞を得ることが出来る。細胞が本来の機能を発揮するのに必要な、複数の組織からなる 3 次元組織の構築を行うことが可能になる。この様に再生医療の多くの局面で必要とな

る手法を提供することになる。

４．主な論文

1. Sakurai K, Teramura Y, *Iwata H., Cells immobilized on patterns printed in DNA by an inkjet printer. Biomaterials. 2011;32(14):3596-3602.
2. Teramura Y, *Iwata H., Improvement of graft survival by surface modification with poly(ethylene glycol)-lipid and urokinase in intraportal islet transplantation. Transplantation. 2011;91(3):271-8.
3. Inui O, Teramura Y, *Iwata H., Retention dynamics of amphiphilic polymers PEG-lipids and PVA-Alkyl on the cell surface. ACS Appl Mater Interfaces. 2010;2(5):1514-20.
4. Teramura Y, Minh LN, Kawamoto T, *Iwata H., Microencapsulation of islets with living cells using polyDNA-PEG-lipid conjugate. Bioconjug Chem. 2010;21(4):792-6.
5. Teramura Y, Chen H, Kawamoto T, *Iwata H., Control of cell attachment through polyDNA hybridization. Biomaterials. 2010;31(8):2229-35.
6. Arima Y, Kawagoe M, Furuta M, Toda M, *Iwata H., Effect of swelling of poly(vinyl alcohol) layers on complement activation. Biomaterials. 2010;31(27):6926-33.
7. Arima Y, Kawagoe M, Toda M, *Iwata H., Complement activation by polymers carrying hydroxyl groups. ACS Appl Mater Interfaces. 2010;1(10):2400-7.
8. Okamoto Y, Tokeshi M, Kaji N, Baba Y, Immuno-pillar chip: A new platform for rapid and easy-to-use immunoassay. Lab Chip. 2010;10(24):3335-40.
9. Park Y-S, Dmytruk A, Dmitruk I, Kasuya A, Okamoto Y.; Kaji N, Tokeshi M, Baba Y, Aqueous phase-synthesized CdSe nanoparticles with well-defined numbers of constituent atoms. J Phys Chem C. 2010;114(44):18834-40.

A03 班（ケ）

遺伝子解析と分子トレーシングを基盤とした細胞標的分子の創製

研究代表者　名古屋大学　夏目敦至
分担研究者：名古屋大学　千賀　威

１．背景

悪性脳腫瘍の代表格である膠芽腫の治療抵抗性には、腫瘍組織の不均一性(heterogeneity)が重要な原因になっている。脳腫瘍幹細胞のコンセプトは、その不均一性のしくみを明らかにすることで新しい治療薬を開発できる可能性を提示している。そのしくみの解明の糸口として、我々は近年、ゲノムの変化を伴わず遺伝子発現を制御するエピジェネティクスな変化が腫瘍細胞への誘導の重要な引き金を担っていることを証明してきている。

２．方法・結果

膠芽腫の臨床検体から neurosphere 法で５つのグリオーマ幹細胞株を樹立し、網羅的にエピジェネティクスの変化を検索した（詳細は伊藤元一の演題）。なかでもポリコームタンパク複合体(Polycomb group; PcG)と H3-K27 メチル化に依存した遺伝子不活化機構が重要で(Nat Genet, 2008)、グリオーマ幹細胞の維持そして多様な表現型を持つグリオーマ細胞への分化に EZH2 が重要な鍵を握っていることが明らかとなった。EZH2 は PcG を構成する分子で Histon3-lysine27 にメチル基を転移する。EZH2 は膠芽腫で高発現されているが、興味深いことに同一組織内でも核または細胞質での局在が異なる。in vitro でのグリオーマ幹細胞の分化の過程で、EZH2 の局在は細胞質から核へ、核から細胞質へダイナミックに変化した。また、RNA 干渉法や小分子化合物によって、EZH2 を阻害するとグリオーマ幹細胞から腫瘍細胞への分化が抑制され、NOD-SCID マウス脳への腫瘍形成能を失った。

３．結語

腫瘍細胞が微小環境に可塑的に適応し、腫瘍の不均一性を構築するために EZH2 は重要な役割をしていることが示唆され、さらに EZH2 を阻害する小分子化合物は、腫瘍の不均一性を制御する有望な治療薬になりうることが考えられた。

４．主な論文

1. Natsume A*, Kinjo S, Yuki K, Kato T, Ohno M, Motomura K, Iwami K, Wakabayashi T. Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy. *Brain Tumor Pathol*. 2011 Feb;**28**(1):1-12.
2. Momota H, Iwami K, Fujii M, Motomura K, Natsume A, Ogino J, Hasegawa T, Wakabayashi T. Rhabdoid glioblastoma in a child: case report and literature review. *Brain Tumor Pathol*. 2011 Feb;**28**(1):65-70.
3. Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, Takahashi H, Hashimoto N, Takahashi J,

Aoki T, Sugiyama K, Ogura M, Natsume A*, Yoshida J. A multicenter phase I trial of combination therapy with interferon-β and temozolomide for high-grade gliomas (INTEGRA study): the final report. *J Neurooncol.* 2011 Feb 14. [Epub ahead of print]

4. Motomura K, Natsume A*, Kishida Y, Higashi H, Kondo Y, Nakasu Y, Abe Y, Namba H, Wakai K, Wakabayashi T. Benefits of Interferon-β and Temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter: *a multicenter study.Cancer*, in press, 2010.
5. Motomura K, Ogura M, Natsume A*, Yokoyama H, Wakabayashi T. A free-radical scavenger protects the neural progenitor cells in the dentate subgranular zone of the hippocampus from cell death after X-irradiation. *Neurosci Lett*, in press, 2010.
6. Ohno M, Natsume A*, Iwami K, Iwamizu H, Noritake K, Ito D,Toi Y, Ito M, Kazuya M, Yoshida J, Yoshikawa K Wakabayashi T. Retrovirally engineered T-cell-based immunotherapy targeting type-III variant epidermal growth factor receptor, a glioma-associated antigen. *Cancer Sci*, in press, 2010.
7. Kato T, Natsume A, Toda H, Iwamizu H, Sugita T, Hachisu R, Watanabe R, Yuki K, Motomura K, Bankiewicz K, and Wakabayashi T. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Therapy*, in press, 2010.
8. Natsume A, Kondo Y, Ito M, Motomura K, Wakabayashi T, Yoshida J. Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas. *Cancer Sci.* **101**, 1331-6, 2010.
9. Ohno M, Natsume A, Kondo Y, Iwamizu H, Motomura K, Toda H, Ito M, Kato T, Wakabayashi T. The modulation of MicroRNAs by type I IFN through the activation of signal transducers and activators of transcription 3 in human glioma. *Mol Cancer Res* 2009;**7**:2022-30.
10. Ito S, Natsume A, Shimato S, Ohno M, Kato T, Chansakul P, Wakabayashi T, Kim SU. Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma. *Cancer Gene Ther* 2009.
11. Yuki K, Natsume A, Yokoyama H, Kondo Y, Ohno M, Kato T, Chansakul P, Ito M, Kim SU, Wakabayashi T. Induction of oligodendrogenesis in glioblastoma-initiating cells by IFN-mediated activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett* 2009;**284**:71-9.
12. Ohno M, Natsume A, Fujii M, Ito M, Wakabayashi T. Interferon-beta, MCNU, and conventional radiotherapy for pediatric patients with brainstem glioma. *Pediatr Blood Cancer* 2009;**53**:37-41.

A01 班（ア）

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　樋口　秀男
分担研究者：東京大学　茅　元司

１．背景

細胞内分子機能の理解は，過去 15 年間の蛍光蛋白質観察と分子生物学の進展によって劇的に深まった．しかしながら，分子生物学や蛍光蛋白質は個々の分子を観察するのではないため，分子反応や機能を直接的に理解することはできない．一方，組換蛍光蛋白質の登場とほぼ時を同じくして分子機能を直接的に観察する 1 分子ナノ精度の計測が登場した（石島，樋口．柳田ら BBRC 1994, Svoboda.. . . Block Nature 1993）．この方法の登場によって，精製された実験系において DNA 及び RNA ポリメラーゼ・リボゾーム・モーター蛋白質などの 1 分子運動，ATP 加水分解反応，分子内構造変化，重合過程などが明らかにされた（ Endow & 樋口　Nature 2001;上村....Tsen Nature 2006; 茅&樋口　Science 2010）．さらに近年蛍光性ナノ粒子（CdSe やダイヤモンド）の登場により，高輝度で長時間の蛍光観察が可能となり，細胞内の分子位置を正確に測定できるようになった（渡邉&樋口　Biophys J. 2007）．この粒子を利用して，マウス内でも１分子の位置を追跡できるようになった（多田，樋口ら Cancer Res 2007）．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て，細胞内の分子反応を観察する研究はほとんどない．そこで本研究では，これらの近年の技術革新を取り入れ，さらに新しい方法を開発して，細胞内のナノメートル領域の分子や小器官の反応を１分子・１粒子レベルで高精度測定を行う．

２．目的

生命活動に関わる分子反応の場は主に細胞内のナノ領域であり、このサイズ内で起こる分子機能や構造の時間変化（ダイナミックス）の理解が生命の本質を解明する上で欠かせない。そこで、本研究ではナノ領域での分子ダイナミックスを捉えるため、培養細胞及びマウス内の分子及び細胞内小器官の位置を三次元でー1nm かつー1ms の高時空間精度で観察できる蛍光微鏡装置を開発し、この装置を用いてバイオ分子の動態を解析することで、これらの分子反応が、がん組織や筋肉組織においてなす役割を考察する。これまでの培養細胞を用いた研究によって、目的の時間分解能より~10 倍程度低い精度に到達しているが、In vivo では高背景光や脈動が問題となるため精度は~1000 倍以上低い。そこで A02(エ)班と協力しながら、生体親和型量子ドットなど明るい蛍光物質と画像解析によってこれらの問題点を克服する。この装置を用いて、タンパク質や核酸

分子の動態を高精度で追跡し(A02 班(カ)と協力)、細胞、組織、血液のレオロジーと分子輸送との関連を明らかにする。また，がん細胞の浸潤運動（A03(ク)班）および筋肉損傷修復ダイナミックスの分子動態を細胞膜と細胞骨格の動きを捉えるなどして明らかにし、細胞の種々の応答現象を分子構造と電子反応に着目しながら解析する（A01(ウ)班、A03(キ)班と協力)。得られた結果を統合して、In vivo における分子ダイナミックスモデルを提案する。

３．特色と意義

研究の特色は高精度で位置や反応を追跡する材料と装置を開発する事である．この装置を細胞だけでなくマウスにまで応用する点が独創的である．本研究が成功すれば，多くの分子反応を高精度で測定できるので，この方法は多くの研究者が利用できる普遍的方法である．従って，分野を超えた分子科学の発展に寄与する意義がある．

４．主な論文

1 Kaya M. and *H. Higuchi. *Science* 329, 686-689 (2010)

2 Hirota Y., A. Meunier, S.Huang, T. Shimozawa, O.Yamada, Y.S Kida, M. Inoue, T. Ito, H. Kato, M. Sakaguchi, T. Sunabori, M. Nakaya, S. Nonaka, T. Ogura, H. Higuchi, H. Okano, N.Spassky, and *K. Sawamoto. *Development* 137, 3037-3046 (2010)

3 Fujita H, H. Hatakeyama, TM. Watanabe, M. Sato, H. Higuchi and * M. Kanzaki. *Mol. Biol. Cell* 21, 2721-2731 (2010)

4 Gonda K, T M. Watanabe, N.Ohuchi, and *H. Higuchi. In Vivo Nano-imaging of Membrane Dynamics in Metastatic Tumor Cells Using Quantum Dots. *J. Biol. Chem.* 285,2750-2757 (2010)

5 Kawai M., H. Higuchi, M. Takeda, Y. Kobayashi and N. Ohuchi. *Breast Cancer Research*, 11：R43 (2009)

6 Yoo J, T. Kambara, K. Gonda, and *H. Higuchi. Intracellular imaging of targeted proteins labeled with Quantum Dots. *Exp. Cell Res.* 314, 3563-3569 (2008).

7 Takeda M., H. Tada, H Higuchi, Y. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Sakurai, T. Ishida and N. Ohuchi. *Breast Cancer* 15:145–152 (2008)

8 Kaya, M., Leonard, T.R. and *Herzog, W. (2006) *Journal of Biomechanics* 39, 2752-2766

9 Watanabe, T.M., T. Sato, K. Gonda and *H. Higuchi. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 359 1-7 (2007).

10 Watanabe, T.M. and *H. Higuchi. *Biophysical J.* 92, 4109-4120, (2007).

11 Tada, H., *H. Higuchi, T.M. Watanabe, and N. Ohuchi. *Cancer Res.* 67, 1138-1144, (2007).

A01 班（イ）

生体内ナノ分子計測を利用した心疾患病態の解析

研究代表者　東京慈恵会医科大学　福田紀男

１．背景

心筋細胞（長軸～100 μm、短軸～20 μm）では、長軸方向に～2.0 μm の間隔で存在する横行小管（T 管）周辺のナノ領域において細胞膜の電気的興奮が細胞内 Ca^{2+}濃度の局所的上昇を惹起し、Ca^{2+}の拡散がアクチン分子とミオシン分子の結合、そして ATP 加水分解反応を引き起こす。心筋細胞に特徴的なこの反応（興奮収縮連関）は、細胞内を一定の方向に伝播し、イオン通過性の高い介在板を介して隣接する心筋細胞へと伝達される。結果、リズミックな心臓の拍動が得られる。

心筋研究の分野では、心筋細胞内の構造と機能との関係が長年に渡り調べられているが、ほとんどの研究が空間分解能にして数 10 nm 以上の変化を対象としたものであり、しかも、実験結果を生物学の言葉で記述しているに過ぎなかった。我々は、世界に先駆けて高分解能の手法を心筋細胞標本に応用し、心筋収縮構造（サルコメア：長軸～2.0 μm、短軸～1.0 μm）の nm レベルの構造歪が発生張力に決定的な影響を及ぼすことを見出している（論文 3,5,6）。また、サルコメアは細胞内 Ca^{2+}濃度の振動に反応するだけの単純な ON-OFF 装置であるという従来の考えを覆すことに成功した。すなわち、Ca^{2+}濃度一定の中間活性条件下、収縮構造が自発的に振動するという非線形物理現象（SPOC）を発見し、その振動数が各種動物の静止時の心拍数と比例関係にあることを突き止めた（論文 2,4）。この事実は、アクトミオシン分子モーターが集合体となって基本リズムを生み出すこと、そして、ペースメーカーによる強制振動がそのリズムを変調させるという、全く新規の心拍調節メカニズムを示唆する。これらの知見に基づき、申請者らは最近、生きた小動物の心臓に量子ドット（QD）を適用し、サルコメアの動きを 10 nm の精度でイメージングした（論文 1）。また、サルコメアの局所に GFP を発現させ、心臓において SPOC に類似したサルコメアの振動運動を観察している。

２．目的

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新たに開発し、これを基盤として生体分子の集団がどのようにして心臓拍動のリズム調節機構を生み出すかを、物理学と化学の言葉を使って明らかにする。また、各心臓病のモデル動物を使い、心筋細胞ナノ領域における生体分子の挙動やイオンの動態がどのように変化して心拍のリズム破綻につながるかを明らかにする。得られた実験結果はモデル化し、心臓各部位での心筋細胞内分子ダイナミクスの変化が心臓のリズム調節機構に与える影響を正確に予測することのできる数理モデルを開発する。

３．特色と意義

我が国における心疾患の死亡率は癌に次いで第二位となっており、生命科学の中でも心臓研究は重要な位置を占める。心拍リズムの破綻はそのまま突然死につながり、超早期の発見は極めて重要である。しかしながら従来の、ほとんどすべての心臓研究は、心筋細胞の機能発現における分子やイオンの役割を現象論的に記述しているに過ぎず、反応場における分子パラメーターを普遍化・体系化するに至っていない。さらに、細胞や組織レベルで得られた生物情報をそのまま個体に当てはめて考察している研究が大半を占める。このため、疾患の予兆となる分子挙動の変化を捉えることができず、治療が遅れ、死に至る症例が毎年多数報告されている。本研究では、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* において高速で可視化し、拍動リズム調節機構やそのリズム破綻に至る病態メカニズムを探る。これは、従来の医学生物学的アプローチでは不可能であった心臓病の病態やその程度を、物理学や化学の言葉を使って定義し直すことになる。また、本研究で得られる技術的な知見は、診断装置開発に変革をもたらす。すなわち、心疾患に関し、現在臨床現場で汎用されている診断装置は精度が十分でないため、疾患超早期の段階で生じる心筋細胞内の微小な変化をとらえることができないが、本研究で開発する基盤技術は心疾患を超早期に発見することを可能にする。

４．主な論文

1. Serizawa T, Terui T, Kagemoto T, Mizuno A, Shimozawa T, Kobirumaki F, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Real-time measurement of the length of a single sarcomere in rat ventricular myocytes: a novel analysis with quantum dots. *American Journal of Physiology -Cell Physiology-* (2011 Epub ahead of print).
2. Ishiwata S, Shimamoto Y, Fukuda N. Contractile system of muscle as an auto-oscillator. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2011;**105**:187-198.
3. Terui T, Shimamoto Y, Yamane M, Kobirumaki F, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Regulatory mechanism of length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle: role of thin filament cooperative activation in the Frank-Starling relation. *Journal of General Physiology* 2010;**136**:469-482.
4. Sasaki D, Fukuda N, Ishiwata S. Myocardial sarcomeres spontaneously oscillate with the period of heartbeat under physiological conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;**343**:1146-1152.
5. Fukuda N, Wu Y, Farman G, T. Irving TC, Granzier HL. Titin isoform variance and length dependence of activation in skinned bovine cardiac muscle. *Journal of Physiology (London)* 2003;**553**:147-154.
6. Fukuda N, Sasaki D, Ishiwata S, Kurihara S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation* 2001;**104**:1639-1645.

A01 班（ウ）

細胞内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　由井　伸彦
分担研究者：東京大学　金野　智浩
東京医科歯科大学　徐　知勲

１．背景

ナノメディシンの実現には、細胞内の多次元にわたる各種反応を分子科学的に統合して把握する必要がある。特に、細胞代謝反応に関与する種々の生体分子（細胞形質膜や膜直下の受容体群、リソソーム内酵素、ミトコンドリア電子伝達系酵素、骨格系タンパク質の再配列を制御する細胞質内酵素、核内での遺伝子転写や粗面小胞体でのタンパク質産生）による空間的に異なる領域での同時多発的あるいは連携して進行する分子反応をリアルタイムで追跡しつつ、各種酵素反応を任意に調節することは、疾患種によらず共通したナノメディシン分子科学の基礎として不可欠である。

こうした背景のもとに研究代表者らは、細胞の構造的階層性と機能性が分子間力により動的に調節されている点に着目し、非共有結合からなる超分子集合体をベースにした動的バイオマテリアル設計を推進してきた。とりわけ、多数の環状分子の空洞部を線状高分子鎖が貫通した骨格を有するポリロタキサンには、環状分子の線状高分子鎖に沿った可動性や末端基の分解脱離により生起する超分子構造全体の解離などの特徴があり、これらを活かしたバイオマテリアル研究を世界に先駆けて提唱してきた。その一環として、細胞内で分解するポリロタキサンによる遺伝子キャリア開発を推進し、超分子構造による遺伝子との複合体形成能とその解離による遺伝子放出能力を細胞内外で両立制御できることを明らかにした。また、ポリロタキサン中の環状分子の線状高分子鎖に沿った可動性に着目し、細胞膜レセプタータンパク質と結合するリガンド分子をポリロタキサン中の環状分子に導入して、レセプタータンパク質との多価相互作用における可動性の効果を明らかにしてきた。ここでは、環状分子の回転や並進移動といった可動性をもとにしてリガンドーレセプター間の多価相互作用を亢進し、結合定数を飛躍的に増大できることを定量的に示すとともに、多価相互作用に与える環状分子の可動性の効果を明らかにしてきた。

２．目的

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

開を図る。これにより最終的には、領域内での連携をもとにして、細胞内反応に応答して駆動するナノメディシンの分子科学を確立する。

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

３．特色と意義

細胞内で部位特異的あるいは疾患特異的な変動を刺激として、環状分子の線状高分子鎖に沿った位置や可動性を調節し、それに基づいた分光学的特性の変化を利用して細胞内の微小器官領域における反応をリアルタイム解析する点に学術的特色がある。これまでにも細胞内の刺激に応答して機能が変化する高分子の設計は行われていたが、分子量に依存した高分子鎖の屈曲性や拡散性に規定される宿命があった。本研究で用いるポリロタキサンは、環状分子の位置や可動性を調節して生体成分との多価相互作用を亢進できる特徴があり、それをもとにして多くの生体反応を調節できる可能性がある。こうした内容は、研究代表者が研究してきた機能性ポリロタキサン設計とその生体との相互作用解析とを基盤とすることで初めて可能になるものと考えている。

４．主な論文

1. T. Ooya, M. Eguchi, N. Yui, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13016 (2003).
2. T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, R. Ito, K. Kogure, H. Harashima, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3852 (2006).
3. A. Yamashita, N. Yui, T. Ooya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure, H. Harashima, *Nat. Protocols* **1**, 2861 (2006).
4. N. Yui, T. Ooya, *Chem. Eur. J.* **12**, 6730 (2006).
5. N. Yui, R. Katoono, A. Yamashita, *Adv. Polym. Sci.* **222**, 55 (2009).
6. Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, *Bio. Pharm. Bull.* **33**, 1218 (2010).
7. H. Hyun, N. Yui, *Macromol. Rapid Commun.* **32**, 326 (2011).
8. H. Hyun, N. Yui, *Macromol. Biosci.* **11**, 765 (2011).
9. S. M. Shaheen, H. Akita, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, V. Biju, M. Ishikawa, H. Harashima, *Nucleic Acids Res.* **39**, e48 (2011).

A02 班（エ）

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　石原　一彦
分担研究者：東京大学　井上　祐貴

１．背景

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

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

MPC ユニット組成の増加により水溶性かつ両親媒性とすることができ、この水溶性 MPC ポリマーを利用することで、ポリマーナノ粒子を創製している。さらに、ナノ粒子表面にタンパク質を温和な条件で結合させるために、新たな反応性 MPC ポリマーを合成し、これにより酵素や抗体を固定化することに成功している。特に一つの粒子上に複数のバイオ分子を結合させ、これら分子間の協同的反応により標的分子の認識信号を増幅できることを明らかにした。MPC ポリマーナノ粒子表面のバイオ分子の活性は、固定化されていても天然の状態と同じレベルに維持され、これは通常の臨床診断用ポリマー粒子に固定化する場合の 100 倍であった。さらに、表面にバイオ分子を結合しない場合、MPC ポリマーナノ粒子が細胞に対して全く認識されず、細胞内に取り込まれないことを世界で初めて発見した。このことはノイズの低いプラットフォームに、高いシグナルレベルでバイオ分子を固定できることにつながり、これによりバイオ分子の持つ特性、機能を大きな S/N 比で分析、解析が可能になると考えた。これらの MPC ポリマーナノ粒子についての基礎知見と、その細胞応答を解析することで、細胞機能評価、解明するデバイスを構築する。

２．目的

本研究では、細胞を対象とした細胞外からの物質輸送、細胞内での移動を、細胞内の特殊環境を考慮しながら追跡し、その速度定数を明確にする細胞内分子輸送プローブを創製する。さらに、これを利用することで、未解明な点の多い細胞膜からの分子取り込みに関する素過程を、細胞膜への分配、細胞膜中での拡散、細胞膜から細胞質内への脱離に分けて定量的に考察する。従来、プローブ自体に誘起される非特異的な細胞応答のために正確に評価ができなかった、バイオ分子の細胞内への取り込み、細胞質内での移動、反応につい

て、細胞親和性ポリマーの適用により、完全に特異的な親和性の評価、移送現象の追跡が可能となる。これらを、樋口(A01)、権田(A03)、夏目(A03)との協同研究においてがん細胞の機能解明、抗がん剤の設計、心筋組織の疾患治療法指針の提案などに結びつける。さらに、福田(A01)、丸山(A02)とは、細胞内でのバイオ分子反応の速度論的理解を深めることで、細胞応答の分子論を構築・実証することが可能と考えている。一方、両親媒性の MPC ポリマーが、細胞膜を分子拡散により通過し、細胞質内の特定部位に濃縮することを発見した。合成ポリマー（分子量 30KDa）の細胞膜拡散・透過現象は世界で初めての知見であるとともに、ポリマーに結合させたパイロット分子の役割を明確にイメージングすることに成功した。これらのポリマー分子構造に起因する分子設計を基礎として、細胞内輸送に関連した事象を定量化するとともに反応パラメーターにより明確に表現することを目指す。

３．特色と意義

1) 細胞と長時間共存していても細胞機能に影響を与えず、かつ、全く取り込まれないポリマーナノ粒子はこれまで存在しなかった。このような性質を持つナノ粒子の創製とその表面へのタンパク質などバイオ分子の安定かつ高活性を維持する固定化によるバイオ機能化を実現する。
2) 従来、微粒子の細胞への取り込み（非特異的反応）が必ず起こるために、表面官能基やバイオ分子の効果が判別できなかった問題を、根本から解決し、新しいバイオ分子の発見、新機能解明に大きな貢献ができるポリマーナノ粒子プローブ創製である。
3) 量子ドットや磁性粒子など無機結晶をポリマーナノ粒子中に安定に実装し、水媒体に対する分散性、細胞適合性をナノ粒子表面の MPC ユニットで担保することで、新規な蛍光分光を利用したバイオ分子反応解析、分析あるいは磁力を利用した分離を実現するポリマーナノ粒子プローブを提供できる。
4) 細胞内で生じる遺伝子発現や酵素反応を分子科学的に理解するとともに、疾病に対して有効なバイオ分子治療（ナノメディシン）を開拓することを目指した研究である。マテリアル工学はもとより、低侵襲人工臓器工学、組織再生工学、遺伝子診断・治療学、バイオイメージング工学など先端医療に関連する領域に有用な情報を提供できる基盤となる。

４．主な論文

1. N. Tajima, M. Takai, K. Ishihara, *Anal Chem*, **81**, 1969-1976 (2011).
2. T. Goda, Y. Goto, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **31**, 2380-2387 (2010).
3. M. Ukawa, H. Akita, T. Masuda, Y. Hayashi, T. Konno, K. Ishihara, H. Harashima, *Biomaterials*, **31**, 6355-6362 (2010).
4. R. Matsuno, Y. Goto, T. Konno, M. Takai, K.Ishihara, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 358–365 (2009).
5. Y. Goto, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, K.Ishihara, *Biomacromolecules,* **9**, 3252-3257 (2008).

A02 班（オ）

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　木原隆典
連携研究者　産総研　中村 史

１．背景

細胞は生体の要素であり、疾病の分子機構の解明やその機能の理解はますます重要になりつつある。特に癌化、運動、組織形成などの高度な機能がどの様な機構によって形成されるかについてのより高度な理解が求められている。一方、細胞内は単純な溶液ではなく、極度に濃厚な状態にあって空間的に均一ではない。細胞内の化学反応の理解のためには、細胞内の分子の偏在の様相について詳細な解析が必要である。また、その状態・反応については希薄溶液の化学反応ではなく、溶液構造に基づく新規な理解方法が求められる。

我々はこれまで、原子間力顕微鏡を利用して、細胞内に直接ナノプローブを挿入・抜去が可能な細胞操作技術の開発を行なってきた。さらにこの技術と各種蛍光分子プローブを融合させることで、実際の生きた細胞内における酵素活性や mRNA を計測可能な MOMENT (Molecular Meter with Nanoneedle Technology)法という技術の開発を行なった (Kihara et al., 2009)。MOMENT 法は蛍光プローブを固定した直径 200 nm 程度の円柱状の「極微小探針」を直接生きた細胞内に挿入することで、細胞内分子を直接的に、かつ高い空間・時間分解能を維持して検出・計測する技術である。それは、これまでのような溶液系のプローブではなく「極微小探針」という固相プローブであるため、細胞内における分子応答の定量化、さらには細胞内における各種固相環境での反応（オルガネラにおける膜表面での反応やフィラメント構造体での反応）の定式化に優れていると考えられる。実際この手法により、細胞内における内在性 mRNA はその絶対数に比べてみかけの分子濃度が圧倒的に高く存在していることを明らかにしつつあり (Kihara et al., 2010)、細胞生物学に新たな視点を提供できるものと考えて研究を進めている。

２．目的

本研究では i）細胞内環境における分子反応の定量化・定式化が可能なレベルの「極微小探針」の創製を行なうと共に、これを基本ツールとして実際の細胞内における分子反応、特にその解析手法が困難でありかつその明確な解析ツールのない ii）mRNA を主軸とした細胞内反応の解析を行う。さらにそこから iii）細胞内における mRNA の分子ダイナミクスを明らかにし、それを拡大させる形で iv）細胞動態（細胞ダイナミクス）の定式化、さらにはその細胞ダイナミクスの解析から v）mRNA の動態制御に関連した疾患現象の理解を目指す。

３．特色と意義

本研究では、細胞の機能に関わる様々な分子について、直接観察・改変するための極微小探針システムを創製し、細胞内の特定位置・環境下での生体分子挙動・反応 を明らかにすると共に、これを利用した新たな疾病分子の挙動観察法の開発を目指す。細胞 は

外界と脂質二重膜で隔たれ、さらにその内側には各種オルガネラや膜構造体、タンパク質 複合体が高濃度に存在し、高分子が濃縮された分子クラウディング環境が実現されている。 そこでの分子挙動・分子反応は生体外の希薄溶液中のものとは大きく異なることが知られて いる。細胞内の位置特異性を考慮した分子の挙動・反応を A02(エ)班と協同で解析し、それ を基礎として疾病原因分子の応答を解明することで、ナノメディシン分子科学の創成と実 現・応用に資すると考えられる。研究代表者は細胞内に直接挿入操作が可能な極微小探針の 開発と、それを応用した細胞内分子検出法の開発を進めてきた。かかる基盤技術を利用・発展させることで、これまで困難であった細胞内環境下での分子挙動の解析方法を確立する。 また A01 班と協同して、細胞内分子挙動・反応の定量化・モデリング・病態解析を行なうと 共に、A03 班と協同することで、細胞内の疾病分子挙動が組織レベルでどのような影響を及ぼすかを検討する。

４．主な論文

1. Kihara T., Shinohara S., Fujikawa R., Sugimoto Y., Murata M., Miyake J.,
   Regulation of cysteine-rich protein 2 localization by the development of actin fibers during smooth muscle cell differentiation.,
   Biochem Biophys Res Commun. 411, 96-101 (2011).

2. Kihara T., Haghparast S.M., Shimizu Y., Yuba S., Miyake J.,
   Physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap,
   Biochem Biophys Res Commun. 409, 1-6. (2011).

3. Kihara T., Zhang Y., Hu Y., Mao Q., Tang Y., Miyake J.,
   Effect of composition, morphology and size of nanozeolite on its in vitro cytotoxicity.,
   J. Biosci Bioeng. 111, 725-30 (2011).

4. T. Kihara, X.Y. Liu, C. Nakamura, K.M. Park, S.W. Han, D.J. Qian, K. Kawasaki, N.A. Zorin, S. Yasuda, K. Hata, T. Wakayama, J. Miyake,
   Direct electron transfer to hydrogenase for catalytic hydrogen production using a single-walled carbon nanotube forest,
   Int. J. Hydrogen Energy 36, 7523-7529 (2011).

5. Kihara T, Yoshida N, Kitagawa T, Nakamura C, Nakamura N, Miyake J.,
   Development of a novel method to detect intrinsic mRNA in a living cell by using a molecular beacon-immobilized nanoneedle.
   Biosens Bioelectron. 2010 Jul 30. [Epub ahead of print]

6. Kagiwada H, Nakamura C, Kihara T, Kamiishi H, Kawano K, Nakamura N, Miyake J.,
   The mechanical properties of a cell, as determined by its actin cytoskeleton, are important for nanoneedle insertion into a living cell.
   Cytoskeleton 67(8), 496-503 (2010)

7. T. Sugitate, T. Kihara, X.Y. Liu, J. Miyake,
   Mechanical role of the nucleus in a cell in terms of elastic modulus,
   Current Applied Physics 4S1, e291-e293 (2009).

8. Kihara T., Nakamura C., Suzuki M., Han S.W., Fukazawa K., Ishihara K., Miyake J.,
   Development of a method to evaluate caspase-3 activity in a single cell using a nanoneedle and a fluorescent probe,
   J. Biosens. Bioelectron. 25, 22-27 (2009).

A0２班（カ）

細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節

研究代表者　九州大学　丸山　厚
分担研究者：九州大学　狩野　有宏
九州大学　嶋田　直彦

１．背景

遺伝子の変異や発現状態の解析は、細胞の機能発現、疾病の病態・要因解明に有用である。たとえば、体細胞変異を細胞レベルで検出する手法は、ガン悪性度の判定感度向上に不可欠である。また、細胞内でのメッセンジャーRNA(mRNA)やウィルスゲノムの動態を時空間的に高い分解能でイメージングする手法は、細胞やウィルスの生活環の理解とその制御に有用である。さらに、昨今では、マイクロ(mi)RNA など短い核酸断片が重要な細胞機能を担うことが見いだされ、ガンなどとの疾患との関連も日々知見が蓄積されていが、その細胞内動態の解析も miRNA の機能を解析する上で不可欠と考えられる。核酸のその場（in situ）検出は、核酸プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションが基盤となろう。しかしながら、細胞内では、核酸は自己および他の核酸分子やタンパク質と多様に相互作用し、プローブ核酸との結合を困難にしている。従って核酸ハイブリッドの熱力学的安定性を高めるとともに、プローブ核酸の反応速度を高める工夫も核酸イメージングに不可欠となる。また、細胞内の核酸分子を検出するに十分なシグナル/バックグラウンド比を得る原理が不可欠である。さらに、プローブ核酸を効率良く細胞内に送達するデリバリー手法も求められる。つまり、細胞内イメージングの実現には、１）核酸プローブの塩基配列選択性、２）核酸プローブの核酸検出感度、および３）細胞内へのプローブ核酸送達法を向上する必要があるとともに、それらの機能を集積・パッケージングした分子システムの構築が求められる。

２．目的

研究代表者らは、核酸のハイブリッド形成を分子科学的に考察し、ハイブリッドの安定性を高める高分子材料として、核酸間の静電的反発を解消するカチオン性くし型共重合体を設計した。推測通り共重合体はハイブリッドを顕著に安定化することが確認された。しかし、その速度論的機構を解析した結果、予想外にもくし型共重合体はハイブリッド解離速度より形成速度を格段に高めていることが見いだされた。さらに、共重合体は核酸の正確なハイブリッド形成を促す核酸シャペロン活性を有することを明らかにした。共重合体の核酸シャペロン活性を利用することで、核酸配列を一塩基レベルまで厳密に迅速、簡便に識別可能なポリカチオン加速型鎖交換法（PASE）を開発した。既に多種、多様な核酸分子が存在する中、標的核酸の一塩基の違いを高い分解能で検出できることを示した。本研究課題では、このような知見を活用し、多様な分子が存在する細胞内で高選択的かつ高感度で核酸をイメージングするための核酸プローブシステムの設計を行う。

一方で、細胞内イメージングには、上記プローブシステムを細胞内に効率良くかつ細胞にダメージを与えることなく送達する手法が必要となる。細胞内への送達にはウィルスの感染を模倣する細胞膜破壊/融合活性を持つペプチドが有効と考えられるが、現状ではその活性は十分でない。このようなペプチドの活性を向上させるためには、ペプチド２次構造および溶存状態、さらに標的となる細胞膜への移行性などをパラメーターとして分子科学的に考慮した送達システムの設計が必要である。我々は、くし型共重合体が、膜融合性ペプチドのコイル・ヘリックス転移を効果的に誘導し、かつその溶存状態を高め、ペプチド機能を顕著に高めることを見いだしており、本課題ではこれを細胞内送達に活用する。

３．特色と意義

本研究課題では、くし型共重合体に独自に見いだされた核酸およびペプチドに対する特異的機能を基盤に、細胞内における核酸ハイブリダイゼーション、膜融合ペプチドの構造転移と細胞膜との相互作用、細胞膜構造変化に関わる分子科学的因子を追求する。さらに、細胞内イメージングに必要となる細胞内送達から細胞内での核酸検出に至る分子機能をパッケージングした分子システムの創出を目指す。このような分子システムは核酸医薬、タンパク質医薬などをプローブ核酸と積み替えることで、効果的な細胞機能制御手法へ転換することも可能であろう。

４．主な論文

1. R. Moriyama, J. Mochida, A. Yamayoshi, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Preparation of cationic comb-type copolymer having tetra-alkylammonium groups and its interaction with DNA, *Current Nanoscience*, in press.
2. R. Moriyama, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, The role of cationic comb-type copolymers in chaperoning DNA annealing, *Biomaterials*, 32, 7671-7676 (2011) .
3. P. L. T. Tran, R. Moriyama, A. Maruyama, B. Rayner, J. L. Mergny, A mirror-image tetramolecular DNA quadruplex, *Chem Commun*., 47, 5437-9 (2011).
4. T. Ishihara, A. Kano, K. Obara, M. Saito, X. Chen, T. G. Park, T. Akaike, A. Maruyama, Nuclear localization and antisense effect of PNA internalized by ASGP-R-mediated endocytosis with protein/DNA conjugates, *J. Controlled Rel.*, in press.
5. R. Moriyama, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, DNA assembly and reassembly activated by cationic comb-type copolymer, *Biomaterials*, 32, 2351-2358 (2011).
6. N. Sonda, M. Hirano, N. Shimada, A. Kano, S. Kidoaki, A. Maruyama, Cationic comb-type copolymers do not cause collapse but shrinkage of DNA molecules, *Chem. Lett*, 40, 250-251 (2011).
7. A. Kano, K. Moriyama, T. Yamano, I. Nakamura, N. Shimada, A. Maruyama, Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA, J. *Controlled Rel.*, 149, 2-7 (2011) .

nanomedicine molecular science

www.tmd.ac.jp/nanomedicine

ナノメディシン分子科学研究領域事務局
〒101-0062　東京都千代田区神田駿河台 2-3-10
東京医科歯科大学　生体材料工学研究所内
nanomedicine.ibb@tmd.ac.jp

＊無断で複写転写することを禁止いたします。Copyright 2011 Nanomedicine Molecular Science. All Right Reserved.