

March, 2016

ナノメディシン分子科学

平成 27 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）
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)	----- 6
「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)	----- 10
「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)	----- 15
「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)	----- 19
「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)	----- 23
「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)	----- 27
「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」	
計画班代表 丸山 厚（九州大学・先端物質化学研究所）	
8. A03(キ)	----- 32
「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)	----- 36
「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」	
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
「自己集合型ナノキャリアの創製」		
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に関わる反応は、生命機能に極めて重要であることは周知の事実である。しかしながら、細胞環境は、通常の化学反応環境と比べて、全く異なることが知られている。ナノメディシン分子科学では、このように未開拓であった特殊な細胞環境における分子反応を定量的に理解・考察するために、分子反応パラメーターを導出する。すなわち、細胞にフォーカスし、細胞環境下での分子反応論の確立、細胞内、細胞膜近傍の特殊環境の理解、バイオ分子の特異的反応様式の理解を基本とする学術領域と定義する。これにより、分子反応場となる細胞系を通して、組織、生体全体へと高次元に連携する生体システムを、各次元で、異分野に属する研究者が共通する言葉で理解・考察できるようにする。ここでは、2つの基本的目的を掲げて、研究を推進するとともに新しい学術領域の創成を目指す。一つは、“ナノメディシン分子科学”の創成により、細胞環境での分子反応パラメーターを基盤として、生命反応の理解、病態理解の科学的根拠、医薬品や医療デバイス創製のための設計に結実し、超高齢社会に対応する、安全・安心、高効率医療の発展に大きな貢献する。二つ目は、バイオ・医療産業の爆発的発展を誘引する工学的基礎情報提供と、将来的にこれを支え、より発展させることができる人材育成を行う。

【本領域研究の内容】

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 27 年度の成果】

研究体制の整備

平成 27 年度は最終年度となり、研究領域の方向性を再考し、より活発な共同研究の推進、成果の公表などを心がけた。平成 26 年 4 月より 17 の公募研究班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、さらに 6 名を班友として、研究領域活動を実施してきた。

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た。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。最終年度になり、研究領域の研究成果の取りまとめ、今後の展開を図るために、名古屋大学宇理須恒雄教授を総括班メンバーに新たに

加え、体制を強化した。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た。

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た。これを班員、班友に開放し、その実験にかかる細胞培養関連実験費用の負担は総括班経費で行った。平成 27 年 8 月に専攻の移転に伴い設置場所を変更したが、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定期的なメンテナンスやマニュアル作りなど利便性の向上を行った。

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 26 年度研究成果報告書を掲載した。

平成 27 年 7 月に第 9 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。一方、研究領域の成果を広く公表するために、公開シンポジウムを開催した（平成 27 年 7 月 1 日東京：参加者 70 名）。総括班としても、これを支援する体制を整えた。第 10 回全体会議を平成 28 年 3 月 1-2 日（熱海：参加者 40 名）に合宿制で行った。さらに、国内外から関連分野の著名な研究者を招待し、3rd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science-Toward Medical Biophysics-を東京にて開催した（平成 27 年 11 月 25-26 日：参加者 80 名）。また、第 7 回 Taiwan-Japan Nanomedicine Symposium（平成 28 年 1 月京都：参加者 60 名）を開催し、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。平成 27 年 9 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仙台（参加者 120 名）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（9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015)（平成 27 年 12 月津）を共催した。環太平洋国際化学会議（International Chemical Congress of Pacific Basin Societies : PacifChem2015）にて Symposium on Nanomaterials and

Nanomedicine を開催し 3 日間の日程で 200 名を超える参加者を得ることができた(平成 27 年 12 月ホノルル)。また同大会にて、Symposium on Advances in Polymers for Medicine を領域代表の石原が担当し、高分子科学とナノメディシン分子科学の情報を共有すると同時に、参加した若手研究者との交流も行った。「産業応用へナノサイエンスとテクノロジーの新展開」シンポジウム (平成 28 年 1 月東京：参加者 100 名) を共催し、ナノメディシン分子科学を基盤とする産業応用に関する情報の提供を実施した。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することができるとともに、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。来年度は、10th World Biomaterials Congress (平成 28 年 5 月 Montreal：参加者総数 4,000 名) にて、Intracellularly Acting Nano-structures Biomaterials のシンポジウム(Symposium Chair: Dr. Nobuhiko Yui, Tokyo Medical and Dental University:総括班)が採択されており、国内外からの参加者による討論が予定されている。

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 27 年度は、7 回開催するに至った(開催地：東京 4 回、仙台 1 回、徳島 1 回、神戸 1 回)。さらに新たな試みとして、大学院専攻との共同にて、大学院学生や若手スタッフに対する研究成果、研究領域関連分野の情報提供を行った(平成 28 年 1 月 15 日：東京大学大学院マテリアル工学専攻マテリアル工学セミナーと併催：参加者 70 名)。来年度以降、このセミナーを順次各大学にて開催することを予定している。

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。第 5 回「若手の会」会議 (新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」＋「超高速バイオアセンブラ」合同若手の会：招待講演 3 件) (大阪) を平成 27 年 10 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。

また、幾つかの新学術領域(ナノメディシン、ソフトインターフェイス、元素ブロック、バイオメティックス)に参加している研究者が、それぞれの大学院生に研究成果を発表する機会を作っているが、これを関西地区大学合同研究発表会として実施した(平成 27 年 11 月姫路：参加者 70 名)。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 9 件)。

平成 27 年度も本新学術領域研究成果の報告のみならず、共催、合同開催などを実施することで多彩な研究活動を進めることができた。さらに一領域だけでなく、周辺学術領域、関連学術領域との情報交換を、グローバルに推進することができた。

研究期間の成果を将来につなげるために若手教育を図っているが、その中で本学術領域が広く認識できるような教科書を作成してきている。具体的には、「ナノメディシンの分子科学」という題名で講談社サイエンティフィックから平成 28 年秋をめどに刊行予定であり、3 章 14 節にわたる基礎編と最新のトピックスとの組み合わせにて解説している。すでに原稿が集まり、現在、編集作業へと移っている。また、英文での成果報告資料の作成ということで、国際科学雑誌である Science and Technology of Advanced Materials(Impact Factor: 3.513 (2014))に Focusing Issue として、Nanomedicine Molecular Science in Japan を刊行予定であり、各研究班よりの原稿投稿が終了し、通常の審査を実施中である。

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 粒子レベルで解明することを行っている。今年度は、これらのがん細胞の除去するため、細胞内の活性酸素を発生させることで、特定のがん細胞を死滅させることができた。また今年度より、心筋細胞の不思議な振動現象を高精度で解析を行った。この振動が骨格筋の振動と関連していることも明らかとなった。

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

がん幹細胞の選択的除去の試み

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に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追跡した。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が明らかとなった。がん幹細胞耐性について調べるもう一つの方法として、赤色 (700nm) の蛍光を発するとともに、活性酸素を発生する蛍光色素 IR700 を利用した。この IR700 にがん幹細胞特有の細胞膜タンパク

A01 班 (ア)

質 (CD133) に対する抗体を結合した. この IR700 と抗体との複合体をがん幹細胞と反応をさせた後, 赤色 (645nm) で照射を行った結果, 5 分程度の照射によって, がん幹細胞がネクロシスを起こすことがあきらかとなった (図 1). この方法を用いれば, 選択的にターゲットとする細胞を死滅させることができると期待される. この IR700 の照射によって, 小胞運動が遅くなることを指標として, 細胞の活性化を定量的に評価できる新しい方法を開発した. これは, 細胞の位相差像を撮影し, 約 500nm x 500nm の面積内の強度ゆらぎの時系列を独自のプログラムにより解析を行った. その結果, 接着がん細胞においては, 揺らぎが時間とともに減少したのに対して, がん幹細胞においては, むしろ揺らぎが大きくなった. この揺らぎ減少は, モータータンパク質の不活性化によると思われる. 一方, 揺らぎが大きくなったのは, 細胞がブレベングを起こしたことで, 細胞内の自由空間がどうかしたためであると考えた.

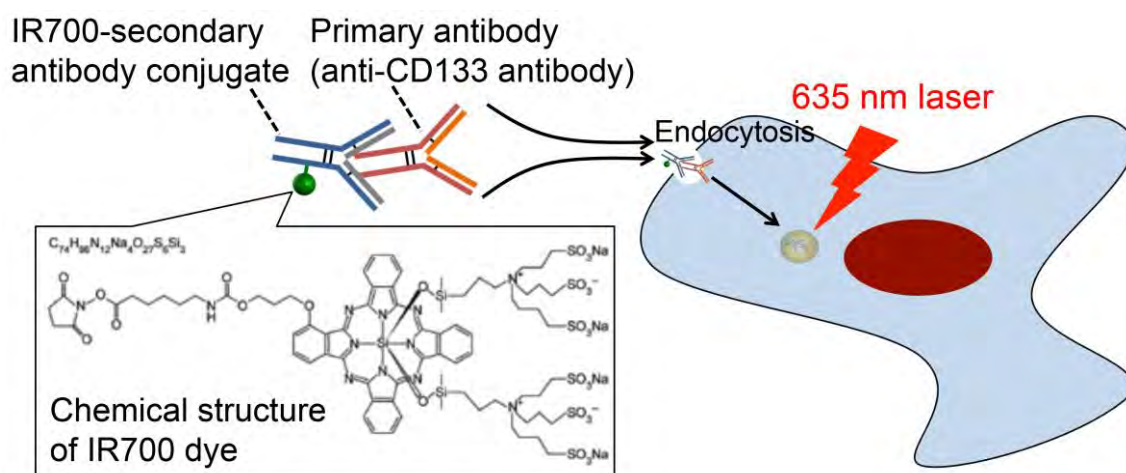


図 1. IR700 を細胞特異的に結合して, 選択的除去の試み

心筋細胞の振動運動の解析とモデル計算

心筋より精製されたディッシュ上での心筋細胞は, 自発的に周期的な収縮を行うことが知られている. 我々は, 心筋を 37°C から数°C 温度を上げることによって, 高速の振動が観られる現象を高時空間分解能 ($\sim 5\text{nm}$, 2ms) で解析を行った. その結果, 振動の振幅は, カルシウムの収縮の周期に同期して増減を繰り返すのに対して, 振動の周期は, カルシウム濃度によらずほぼ一定であった. この現象を説明するためのモデル計算によって, 振動は, 収縮から弛緩に至る周期によって生み出されており, 振幅の増減は, ストレッチアクティベーションと似た速度依存性を追加することで説明ができることを見出した.

このような振動現象が, 心筋特有ではなく, 骨格筋にもそのような機能が備わっていることを, 少数分子のナノメートル精度の変位, pN レベルの力測定および, シミュレーション研究によって明らかにした.

Imaging and model analysis of molecular function in cells

Hideo Higuchi

Motoshi Kaya, Taro Gakujitu*

Department of Physics, the University of Tokyo, Japan

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

We image the vesicle transport in mice under a noninvasive condition. We developed a non-invasive technique for the in vivo imaging of neutrophils labeled with quantum dots, up to 100 μm below the skin surface of mice (Fig.1). The quantum dots were endocytosed into vesicles in the neutrophils, allowing us to track the vesicles with high spatiotemporal precision at ~ 10 msec per frame with 15 nm accuracy. When the neutrophils were moving within the interstitium, the speed of the vesicles was very fast. The speed is about four times faster than the in vitro velocity of a molecular motor, such as kinesin or dynein. This is the first report in which non-invasive techniques have been used to visualize the internal dynamics of neutrophils¹. The observed high-speed vesicle transport is likely important for the bactericidal function of neutrophils.

Noninvasive imaging method was developed to visualize GFP in tumor cells in xenograft model mice. We chose mouse auricles to prepare tumor because of very thin and limited hypodermal tissue. We prepared a novel xenograft model in the auricle of SCID mice with breast cancer expressing GFP and glioma cells. Tumors composed of these cells were successfully formed in mouse auricle by improving injection method. The structures of tumor, cells and tumor vessel were visualized by tissue staining. The GFP cells were observed by fluorescence of GFP in separated tumors, dissection of skin around tumor and without injuring. We successfully performed real time observation of GFP within breast cancer cells under noninvasive condition.

Sarcomere is an essential unit of cardiomyocyte. It is well known that sarcomere has three state (i.e. contraction, relaxation and spontaneous oscillation state) dependent of the solution condition. In intact cardiomyocytes, we found hyperthermal sarcomeric oscillations (HSOs) that is Ca^{2+} independent and high-frequency ($\sim 5\text{-}10$ Hz) auto-oscillations induced by a rapid increase in temperature to $>38^\circ\text{C}$. This finding suggest that the temperature shift the state from relaxation to oscillation. We found that the HSOs was occurred in skinned cardiac myofibrils. The skinned myofibrils are suitable for exchanging chemical compounds and proteins. Therefore using this system, we will understand the molecular aspect of HSOs.

A01 班 (ア)

業績リスト

学術論文

1. Kohsuke Gonda, Minoru Miyashita, Hideo Higuchi, Hiroshi Tada, Tomonobu M Watanabe, Mika Watanabe, Takanori Ishida, Noriaki Ohuchi. Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging. *Scientific Reports* 5, 14322 (2015.9)
2. Chikako Shingyoji, Izumi Nakano, Yuichi Inoue and Hideo Higuchi. Dynein arms are strain-sensitive direction-switching force generators. *Cytoskeleton* 72:388-401 (2015.8) doi: 10.1002/cm.21232

総説・解説・成書

1. 樋口 秀男 「普遍生物学」 生物物学会誌 巻頭言 55, 285 (2015)

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: Motility of motor proteins, myosin, kinesin and dynein. Cooperation in Physics Workshop: LMU-UT 東大 東京 (2016.2.29-3.1)
2. (招待講演) Hideo Higuchi Noninvasive *in-vivo* imaging of neutrophil and tumor cells in mouse auricles. PacifiChem Hawai USA (2016.12.14-20)
3. (招待講演) 樋口 秀男 「モータータンパク質運動の統合的理解」 第2回理工バイオの集い 早大 東京 (2016. 3. 12)
4. (国際会議組織) Hideo Higuchi 「Toward Medical Biophysics」 3rd international nanomedicine symposium. 東大 東京 11/25-26, 2015
5. (社会活動) 樋口秀男 講義「傷を治す白血球と分子の活躍」 沼津西高校生約 40 名 (東大) 10/19, 2015.

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 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、ライソゾーム病モデルマウスに対する治療効果の評価、成長因子を用いたモデルマウスにおける骨再生など *in vivo* での有効性に関して評価を行った。以下に、ポリロタキサンと成長因子の複合体を用いた *in vivo* 骨再生に関して本年度の成果を概説する。

2. 研究の背景と目的

顎口腔領域において、歯槽骨の萎縮、腫瘍切除による顎骨の部分的欠損、疾患による顎骨欠損などに対する顎骨再建方法について様々な方法が検討されている。現在では、顎骨欠損部への自家骨移植が最も頻繁に行われている。自家骨のほとんどは腸骨からの採取によるものであり、顎骨再建術の他にも別途な手術が必要となるため患者への負担は大きくなる。骨形成成長因子である bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は強力に骨の再生を促すことが知られており、再生医療において広く注目されている。しかし、BMP-2 は不安定なタンパク質であり、また広範囲の骨再生には数ヶ月といった期間を要するため、多量の BMP-2 投与が必要となる。しかし、多量投与による炎症、異常骨形成、癌化等の報告がある。BMP-2 の投与量、投与頻度低減のためのアプローチとして、BMP-2 の活性を亢進する添加剤の利用が検討されている。硫酸化多糖類であるヘパリンを BMP-2 に添加することで、低濃度での骨分化や骨再生が可能となることが報告されている。しかしながらヘパリンは血液抗凝固作用を示すため、臨床応用は困難である。そこで本研究では、ヘパリンの代替材料として超分子構造を有するポリロタキサン (PRX) の利用を検討した。PRX の α -CD 部にヘパリンと同様の化学構造である硫酸基を導入した硫酸化 PRX を設計し、BMP-2 とのポリイオンコンプレックス形成、血液抗凝固作用、*in vitro* での骨分化に関して前年度まで評価を行い、硫酸化 PRX の添加により BMP-2 の骨分化効率が著しく向上することを見出している [1]。そこで本年度は、マウス頭蓋骨欠損モデルに対する骨再生能に関して評価した。

3. 成果

主軸高分子として分子量2,200のポリエチレングリコール (PEG)、環状分子として α -CD からなる PRX を調製した。本 PRX に 1,3-propanesultone を反応させることで α -CD 部位に sulfopropyl ether を導入した (α -CD 貫通数 10.5、硫酸基導入数 10.2、分子量 13,700)。得られた硫酸化 PRX と BMP-2 を混合することでポリイオンコンプレックスを調製した。本複合体はこれまでの報告と同様に *in vitro* での骨分化誘導、石灰化の促進作用を示すことを確認した。

BMP-2/硫酸化 PRX 複合体による骨分化促進作用が実際に *in vivo* での骨再生に対しても有効化明らかとする

ため、マウス頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生の評価を行った。ICR マウス (5 週齢、雄) の頭蓋骨に 3.5 mm 径の骨欠損を作成し、コラーゲンスポンジに BMP-2 (10 ng/mice) を担持させ欠損部に埋入した。骨の形成は、一週間毎に X 線マイクロ CT 測定を行い骨形成の時間変化を評価した (図 1)。BMP-2 移植群では移植三週後よりわずかな骨形成が確認された。BMP-2/ヘパリン移植群では、ヘパリンにより外科処置に伴う出血が縫合後も止まらず生存率が低下したものの、生存したマウスでは約 50%程度の欠損部に骨再生が認められた。BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では、出血の問題もなく生存率も 100%であり、*in vitro* で得られた血液抗凝固作用は示さないことが *in vivo* でも確認された。驚くべきことに、BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では移植二週後より欠損部位全面におよぶ顕著な骨再生が確認された。すなわち、硫酸化 PRX の添加により骨再生までの時間を短縮するとともに、骨形成の範囲も拡大することが明らかとなった。

また、Alexa Fluor 680 で蛍光標識した BMP-2 を用いて *in vivo* での残存期間を *in vivo* imaging system (IVIS)にて評価した。その結果、BMP-2 移植群と。BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では 2 週間経過後も同程度の BMP-2 が移植部位に残存していることが明らかとなった。本結果より、硫酸化 PRX との複合化は移植部位でのリリースや体内動態には影響せず、成長因子の活性そのものを *in vivo* でも亢進していることが示唆された。

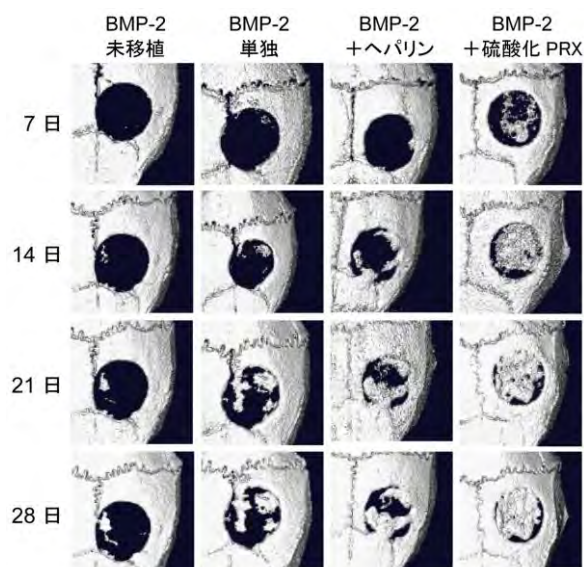


図 1. マウス頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生の時間変化. BMP-2 未移植群、BMP-2 移植群: BMP-2 10 ng、BMP-2/ヘパリン移植群: BMP-2 10 ng、ヘパリン 100 μ g、BMP-2/硫酸化 PRX 移植群: BMP-2 10 ng、硫酸化 PRX 100 μ g.

Analysis of biomolecules using cyto-responsive supramolecular polymers

Nobuhiko Yui¹, Tomohiro Konno², Atsushi Tamura¹

¹*Institute of Biomaterials and Bionengineering, Tokyo Medical and Dental University, Japan*

²*Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Japan*

Autogenous bone grafts are widely used in the clinical treatment, i.e., in prosthetic implants, chronic osteomyelitis, and cranio-maxillofacial reconstruction. For substitution in bone grafts, artificial bone substitute materials (i.e., poly(lactic acid) and β -tricalcium phosphate) and various processes (i.e., cell-based tissue engineering, and the bone regeneration by growth factors) have been extensively studied. Bone morphogenetic factor-2 (BMP-2), a secreted growth factor that comprises the TGF- β subfamily, has attracted considerable attention for promotion of osteoinduction. To date, various clinical studies have been conducted, and BMP-2 has been applied for the treatment of spine fusion, bone fracture, and periodontal tissue regeneration therapy. However, because BMP-2 is unstable and readily deactivated under physiological conditions, high-doses of BMP-2 are required to maintain the activity of BMP-2 in the long term and to regenerate a wide range of bone defects. It has been reported that heparin and other sulfated polysaccharides promote the BMP-2-induced osteogenic differentiation, presumably due to the formation of a polyelectrolyte complex with positively charged BMP-2 (isoelectric point: 8.5). Although heparin is one of the most interesting polymers in enhancing the activity of BMP-2, clinical use of heparin is limited due to its strong anticoagulant effect. Therefore, the development of sulfonated polymers that can enhance the bioactivity of BMP-2 without anticoagulant activity or other toxic effects is of importance in the design of drug carriers and scaffolds for BMP-2.

Herein, we report sulfonated polyrotaxanes composed of sulfonated α -cyclodextrin threaded onto a linear polymer for the protection of BMP-2 through the polyelectrolyte complex formation. Note that the sulfonated PRXs showed negligible anticoagulant activity and cytotoxicity, whereas heparin showed strong anticoagulant activity. When MC3T3-E1 cells were treated with the sulfonated PRX/BMP-2 complexes, significantly high alkaline phosphatase production and mineralized matrix deposition were observed compared with that of free BMP-2 and heparin/BMP-2 complexes. Also, the sulfonated PRX/BMP-2 complexes showed significant bone regeneration in mouse calvarial defect model in comparison to free BMP-2 and heparin/BMP-2 complexes. Altogether, the sulfonated PRXs are promising candidates for enhanced osteoinduction of BMP-2 without toxicity and anticoagulant activity and would contribute to clinical bone regeneration.

業績リスト

学術論文

1. A. Tamura, N. Yui. β -Cyclodextrin-threaded biocleavable polyrotaxanes ameliorate impaired autophagic flux in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* 290 (15), 9442-9454 (2015)
2. K. Nishida, A. Tamura, N. Yui. Acid-labile polyrotaxane exerting endolysosomal pH-sensitive supramolecular dissociation for therapeutic applications. *Polym. Chem.* 6 (21), 4040-4047 (2015)
3. S. Yamada, Y. Sanada, A. Tamura, N. Yui, K. Sakurai. Chain architecture and flexibility of α -cyclodextrin/PEG polyrotaxanes in dilute solutions. *Polym. J.* 47 (6), 464-467 (2015)
4. M. Terauchi, G. Ikeda, K. Nishida, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui. Supramolecular polyelectrolyte complexes of bone morphogenetic protein-2 with sulfonated polyrotaxanes to induce enhanced osteogenic differentiation. *Macromol. Biosci.* 15 (7), 953-964 (2015)
5. A. Tamura, G. Ikeda, K. Nishida, N. Yui. Cationic polyrotaxanes as a feasible framework for the intracellular delivery and sustainable activity of anionic enzymes: a comparison study with methacrylate-based polycations. *Macromol. Biosci.* 15 (8), 1134-1145 (2015)
6. Y. Xu, K. Mawatari, T. Konno, T. Kitamori, K. Ishihara. Spontaneous packaging and hypothermic storage of mammalian cells with acell-membrane-mimetic polymer hydrogel in a microchip. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7(41) 23089-23097 (2015)
7. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara. Efficient differentiation of stem cells encapsulated in a cytocompatible phospholipid polymer hydrogel with tunable physical properties. *Biomaterials.* 56 86-91 (2015)
8. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Building cell-containing multilayered phospholipid polymer hydrogels for controlling diffusion of bioactive reagent. *RSC Adv.* 5 44408-44415 (2015)
9. Y. Ueda, T. Konno, K. Ishihara, N. Sugimoto, D. Miyoshi. DNA structures under molecular crowding conditions with a phosphorylcholine derivative (MPC). *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 40(2), 99-102 (2015)
10. X. Lin, T. Konno, K. Ishihara. Redox-active cytocompatible phospholipid polymer hydrogels for three-dimensional electrical control of encapsulated living cells. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 40(2) 119-122 (2015)
11. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara, Phospholipid polymer multilayered hydrogels containing cells for cancer drug screening. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 40(1) 59-63 (2015)
12. M. Terauchi, T. Inada, A. Tonegawa, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui. Supramolecular inclusion complexation of simvastatin with methylated β -cyclodextrins for promoting osteogenic differentiation. *Int. J. Biol. Macromol.* in press (2016)

総説・解説・成書

1. 田村篤志, 由井伸彦. 細胞内分解性ポリロタキサンによるニーマンピック病 C 型治療. *化学工業*, 66(12), 925-932 (2015)
2. 田村篤志, 由井伸彦. 細胞内分解性ポリロタキサンを用いた薬物送達と超分子医薬への応用. *DDS キャリア作成プロトコル集* 丸山一雄監修, シーエムシー出版, p.80-88 (2015)
3. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara, Cytocompatible and spontaneous forming phospholipid polymer hydrogel. *Eur. Polym. J.*, 72 577-589 (2015)
4. K. Ishihara, H. Oda, T. Aikawa, T. Konno. Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering. *Macro Sympo.*, 351(1) 69-77 (2015)
5. K. Ishihara, H. Oda, T. Konno, Cytocompatible and reverse-transformable polymeric hydrogel matrices, *Handbook of Intelligent Scaffolds for Regenerative Medicine*, 2nd Eds, Ed G. Khang, Pan Stanford and CRC Press (Taylor & Francis) Singapore, in press (2016)

その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 授賞: 一般社団法人 未踏科学技術協会 インテリジェント材料・システム研究会, 第 25 回インテリジェント材料・システムシンポジウム 高木賞. 田村篤志, 由井伸彦. 酸分解性ポリロタキサンの設計とニーマンピック病 C 型に対する治療効果の評価. 2016 年 1 月.
2. 招待講演: N. Yui, A. Tamura. Therapeutic approach to lysosomal storage disorders based on acid-labile polyrotaxanes. *3rd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science*,

A01 班 (イ)

- Tokyo, Japan, Nov. 2015.
3. 招待講演：田村篤志. 分解応答型インターロックポリマーによる細胞代謝機能の改善. 新学術領域研究ナノメディシン分子科学第9回公開シンポジウム, 東京, 2015年7月.
 4. 招待講演：A. Tamura. Polyrotaxane-based intracellular delivery of cyclodextrins for the therapy of intractable diseases. *8th Asian Cyclodextrin Conference*, Kumamoto, Japan, May 2015.
 5. 招待講演：N. Yui. Hydrated molecular mobility of supramolecular surfaces directs stem cell fate. *5th Asian Biomaterials Congress 2015*, Chientan Youth Activity Center, Taipei, ROC, May 2015.
 6. 招待講演：T. Konno. Cytocompatible Phospholipid Polymer Hydrogels for Cell Immobilization Matrix. *9th International Symposium on Nanomedicine*, Mie Japan, December 10-12 (2015)
 7. 招待講演：金野智浩. 細胞親和性ソフトバイオマテリアルが切り拓く未来型医工薬連携デバイス, 第458回東北大学大学院薬学研究科セミナー, 仙台, 2015年9月
 8. 招待講演：T. Konno. Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for advanced cell engineering. *2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials*, Seattle USA, August 13-14 (2015)

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、我が国においても心臓病は癌に次いで高い死亡率を示している。我々は、“Cardiac Nano-medicine”という新たな分野を創成し、nm 精度で心疾患の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”の研究を推進した。心筋における収縮の基本単位はサルコメア ($\sim 2.0\ \mu\text{m}$) と呼ばれる分子集合体であり、この長さが $\sim 0.1\ \mu\text{m}$ 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* 心筋細胞に発現させ、世界で初めて生きたマウスにおいてサルコメアの長さを nm 精度で測定することが可能な新たなシステムを開発することに成功した。

2. 研究の背景と目的

心筋細胞(長軸: $\sim 100\ \mu\text{m}$ 、短軸: $\sim 20\ \mu\text{m}$)では、長軸方向に $\sim 2.0\ \mu\text{m}$ 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氣的興奮が細胞内 Ca^{2+} 濃度の局所の上昇を惹起し、 Ca^{2+} の拡散がアクチン分子とミオシン分子の結合、そしてATP加水分解反応を引き起こす。心筋細胞に特徴的なこの反応(興奮収縮連関)は、細胞内を一定の方向に伝播し、イオン通過性の高い介在板を介して隣接する心筋細胞へと伝達される。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 $100\ \text{nm}$ 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、動きをとまなう小動物個体の心臓から心筋細胞内局所の生体分子の挙動やイオン動態を nm 精度で抽出できる顕微システムを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で研究を行った。その結果、我々はマウス *in vivo* 心筋細胞内のサルコメア長 ($\sim 2.0 \mu\text{m}$) を高空間 (20 nm)・時間 (100 fps) 分解能で計測する技術を開発することに世界で初めて成功した。また、培養心筋細胞に熱を負荷し、体温よりも $\sim 1^\circ\text{C}$ 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。以下、成果の詳細を簡潔にまとめる。

(I) 心筋細胞実験: 我々は昨年度、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の挙動を 3 nm (カメラ速度: 50 fps) の精度で測定することに成功している (SL nanometry: Shintani et al., J Gen Physiol 2014)。これは、現時点においては世界最高のサルコメア長計測精度であり、拍動中の任意の単一サルコメアの正確な解析を可能にする。本年度、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 1)。興味深いことに、HSOs は Ca^{2+} 依存性の心筋収縮 ($\sim 1 \text{ Hz}$) に重畳していた。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、左心室心筋細胞内のサルコメアの動きを高空間 (20 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 4)。その結果、同一細胞内であってもサルコメア長には $\sim 300 \text{ nm}$ ものバラツキが存在すること、それらが同調することによって調和の取れた心拍が生み出されていることが明らかとなった。サルコメア長の変化分と (マクロパラメータである) 左心室内圧とは強く相関し、サルコメアの収縮機構と心臓のポンプ機構との間にタイトなカップリング機構が存在することが明らかとなった。さらに我々は、画像再構築法を独自に開発した。すなわち、心臓は拍動し続ける臓器であるため、収縮、もしくは拡張のピーク時点において Z 軸方向の焦点ズレが生じる。我々は、左心室内圧の波形を基準とし、これを 17 のフェーズに分割、各フェーズにおいて対物レンズを Z 軸方向に動かすことによって焦点の合った画像を抽出した。実験後、画像を再構築し、心臓サイクルのすべての時点において焦点の合った動画を作成することに成功した。本実験系は、今後、心臓の生理および病態の解析に幅広く使われてゆくものと考えられる。

(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。

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*

In 2014, we reported 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-disks in neonatal cardiomyocytes of the rat [i.e., sarcomere length (SL) nanometry]. In the present study, we investigated the effects of infra-red laser irradiation on sarcomere dynamics in living neonatal cardiomyocytes of the rat. A rapid increase in temperature to $>\sim 38^\circ\text{C}$ induced $[Ca^{2+}]_i$ -independent high-frequency ($\sim 5 - \sim 10\text{Hz}$) 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 (~ 10 and ~ 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.

Next, 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 ± 0.06 and 1.68 ± 0.06 μm 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. Likewise, sarcomere length and left ventricular pressure changed in a reciprocal manner. This suggests that in the epicardial surface of the central part of the left ventricular wall, the pressure increases (decreases) when sarcomeric contraction commences (terminates) according to the cellular level of the excitation-contraction coupling. The present experimental system has a broad range of application possibilities for unveiling sarcomere dynamics in cardiomyocytes *in vivo* in health and disease.

A01 班 (ウ)

業績リスト

学術論文

1. Shintani SA, Oyama K, Fukuda N, Ishiwata S.
High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat.
Biochem Biophys Res Commun 457, 165-70 (2015).
2. Oyama K, Arai T, Isaka A, Sekiguchi T, Itoh H, Seto Y, Miyazaki M, Itabashi T, Ohki T, Suzuki M, Ishiwata S.
Directional bleb formation in spherical cells under temperature gradient.
Biophys J 109(2), 355-64 (2015)
3. Oyama K, Zeeb V, Kawamura Y, Arai T, Gotoh M, Itoh H, Itabashi T, Suzuki M, Ishiwata S.
Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater.
Sci Rep 5, 16611 (2015)
4. Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Shimozawa T, Mizuno A, Ohki T, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N.
Nano-imaging of the beating mouse heart *in vivo*: Importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length *per se*, in the regulation of cardiac function.
J Gen Physiol 147(1), 53-62 (2016)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 井上天宏（慈恵医大、医師）、2015 年 10 月、東京慈恵会医科大学・大学院優秀論文賞、タイトル「Depressed Frank-Starling mechanism in the left ventricular muscle of the knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with troponin T deletion mutation $\Delta K210$: J Mol Cell Cardiol 63, 69-78 (2013)」
2. 大山廣太郎（慈恵医大、学術振興会博士研究員）：2016 年 3 月、日本生理学会、入澤 宏・彩記念若手研究奨励賞、タイトル「*In vivo* ナノイメージングによる心筋収縮の可視化と熱による制御」

学会シンポジウム企画

1. 第 92 回日本生理学会大会. 他学会連携シンポジウム（日本生物物理学会）. タイトル： *In vivo* ナノイメージングの最前線～細胞・組織から個体内へ～（Cutting-edge *in vivo* nano-imaging technologies）. オーガナイザー：福田紀男（慈恵医大）、岡田康志（理化学研究所）神戸. 2015 年 3 月.

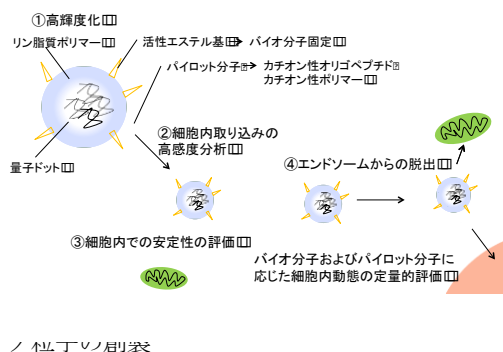
バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス

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、量子ドット (QD) をリン脂質ポリマーである 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーで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バイオ分子の種類と組成に



関して検討し、最適な条件を確立し、細胞に対して高い親和性、低い侵襲性を持ちながらも、細胞膜を透過するナノ粒子系を創製した。また、MPC ポリマーの構造制御と機能化を、リビングラジカル重合を適用して実施し、これを利用したナノ粒子系を実現した。本年度は、細胞内器官への移行を連続的に追跡できる pH 応答性ナノ粒子システムを創製した。また、細胞内にタンパク質を輸送し、外部からの光信号で放出できる光応答性ナノ粒子システムの創製を中心に行った。

2. 研究の背景と目的

細胞工学において、細胞内における分子反応を解明し、それらを調節する方法の確立が要求されている。とりわけ、細胞内の pH 変化は、細胞内分子反応の調節因子として考えられており、これを追跡する手法は重要と考えられる。本研究では、細胞内へのエンドサイトーシス過程、細胞内での物質動態に着目し、その調節因子である pH 変化をリアルタイムで追跡する生体親和型ナノデバイスの創製を目的とした。具体的には、pH 変化に応答して蛍光特性が変化するポリマー分子の設計概念の提示および精密重合法に基づき、直径が 20 nm 程度の量子ドット (QD) / ポリマー複合ナノ粒子を作製し、このナノ粒子の pH 応答性と細胞内移行、細胞内動態を検討した。

また、生体組織の再生や細胞工学の発展に伴い、十分に機能制御された細胞の提供が必要とされる。タンパク質は細胞のもっとも重要な分子の一つとして、細胞の機能を制御することができる。タンパク質は高分子量、酵素感受性および親水性などの問題があるため、細胞内に内在化の促進やタンパク質の酵素分解を抑制することに課題が残されている。これらの問題を解決するために、タンパク質の細胞導入および細胞内への拡散のためには、細胞親和性を有し、かつ適切なタイミングで分解する機能を

持つキャリアが必要である。そこで本研究はマテリアル工学の視点から、細胞内へ生理活性タンパク質を送達するための光反応性キャリアを開発した。

3. 成果

1) ナノ粒子表面修飾ポリマーの精密合成を、長鎖アルキル基を末端に有する可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 剤 4-cyano-4-(dodecyl-sulfanylthiocarbonyl)sulfanyl pentanoic acid によるリビングラジカル重合により実施した。モノマーとして MPC、2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA)、および ω -4-nitrophenoxy carbonyl (poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP) を選択し、poly(DEAEMA)-*block*-poly(MEONP)-*block*-poly(MPC) (PDbNbM) を合成した。これを用いて粒径 20-30 nm のナノ粒子 QD/PDbNbM を調製した。周辺の pH 変化による poly(DEAEMA) セグメントの伸長・収縮に伴い、粒径が変化することを見いだした。QD と有機蛍光色素 Alexa との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用し、蛍光スペクトルの pH 依存性およびその FRET 効率との関連を明らかにした。Alexa を結合したナノ粒子の蛍光スペクトルは、pH に応答して変化することを確認し、この変化は、poly(DEAEMA) セグメントの pH 応答による QD と Alexa 間の距離の変化に起因することを示した。ナノ粒子表面に細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン (R8) を固定化した R8-QD/PDbNbM-Alexa ナノ粒子はエンドサイトーシス経路による細胞内移行、エンドソーム内での移動、さらにエンドソームから脱出する一連の過程を、FRET 現象の変化として捉えた。これは、エンドソーム内の pH 低下と、その後のプロトンスポンジ効果によるエンドソーム破壊を連続的に観察した初めての事例である。

2) 光反応性タンパク質キャリアとして MPC と、光照射により解離するユニットを利用して、光反応性リン脂質ポリマー (poly(MPC-*co*-BMA-*co*-PL) (PMB-PL)) を合成した。PMB-PL は光照射に反応し、1 分間以内に反応が完了した。PMB-PL を水溶液への分散剤として利用し、poly (L-lactic acid) (PLA) のナノ粒子を調製した。ナノ粒子のサイズは 130nm に制御することができた。タンパク質を PL ユニットに固定化し、光照射すると 1 分間で固定されたタンパク質の 90%以上がナノ粒子から放出された。細胞培地に PMB-PL/ PLA ナノ粒子を加え、6 時間培養したところ、細胞生存率は 97%以上であり、PMB-PL/ PLA の細胞毒性が低いことがわかった。細胞透過性ペプチド、R8 を固定することにより、ナノ粒子は細胞に取り込まれた。この状態で、光照射するとタンパク質は細胞の中で脱離し、細胞質内全体に拡散することがわかった。すなわち、R8 を固定化した光反応性 MPC ポリマーに覆われたナノ粒子は、細胞質内へタンパク質を送達し、その場でタンパク質を放出できるスマートキャリアとして有用である。

従来の結果と合わせて考えると、表面を生体親和型のポリマーで被覆し、さらに細胞に特異的に作用するバイオ分子を固定化することで細胞内に容易に導入することができ、表面修飾理利用するポリマーに機能を導入すると、多岐にわたる細胞内観察、細胞への輸送、さらには細胞内に存在するバイオ分子を特異的に捕捉するなどが可能となることが結論できる。

Transport nanodevice immobilized specific biomolecules

Kazuhiko Ishihara

Yuuki Inoue

Department of Materials Engineering, The University of Tokyo, Japan

Polymer nanoparticles were as functional in-cell devices were prepared using cytocompatible phospholipid polymer. We have found that the polymeric nanoparticles embedding quantum dots (QDs) covered with the phospholipid polymers showed resistance to cellular uptake. 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. Here, we investigate surface functionalization of the nanoparticles and transportation of the nanoparticle into cells.

To add novel functionality to QDs, we synthesized water-soluble and pH-responsive block-type polymers. The polymers were composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer segments, which contain a small fraction of active ester groups and can be used to conjugate biologically active compounds to the polymer, and pH-responsive poly(2-(N,N-diethylamino) ethyl methacrylate (DEAEMA)) segments. One terminal of the polymer chain had a hydrophobic alkyl group. The hydrophobic group located at one terminal of the polymer can bind to the hydrophobic layer on the QD surface. A fluorescent dye was conjugated to the polymer chains via the active ester group. The polymers were easily bound to the QD, yielding QD/fluorescence dye-conjugated polymer hybrid nanoparticles. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the QDs and the fluorescent dye molecules was used to obtain information on the conformational dynamics of the immobilized polymers. Higher FRET efficiency of the QD/fluorescent dye-conjugated polymer hybrid nanoparticles was observed at pH 7.4 (in early endosome and cytoplasm) as compared to pH 5.0 (in late endosome) due to a stretching–shrinking conformational motion of the poly(DEAEMA) segments in response to changes in pH. We concluded that the block-type MPC polymer-modified nanoparticles could be used to evaluate the pH of cells via FRET fluorescence based on the cytocompatibility of the MPC polymer.

Photoreactive polymer nanoparticles for immobilizing and releasing proteins were prepared. A water-soluble and amphiphilic phospholipid polymer, poly(MPC-co-*n*-butyl methacrylate-co-4-(4-(1-methacryloyloxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy) butyric acid (PL)) (PMB-PL) was synthesized. The PMB-PL underwent a cleavage reaction at the PL unit with photoirradiation at a wavelength of 365 nm. Additionally, the PMB-PL took polymer aggregate in aqueous medium and was used to modify the surface of biodegradable poly(L-lactic acid) (PLA) nanoparticle as an emulsifier. The morphology of the PMB-PL/PLA nanoparticle was spherical and approximately 130 nm in diameter. The carboxylic acid group in the PL unit could immobilize proteins by covalent bonding. The bound proteins were released by a photoinduced cleavage reaction. Within 60 sec, up to 90% of the immobilized proteins was released by photoirradiation. From these results and with an understanding of the fundamental properties of MPC polymers, we concluded that PMB-PL/PLA nanoparticles have the potential to be used as smart carriers to deliver proteins to biological systems, such as the inside of living cells.

We conclude that the surface modification of nanoparticles with functional and cytocompatible polymer is effective to develop in-cell nanodevices for analyzing chemical reactions in cells.

業績リスト

学術論文

1. B.Gao, T.Konno, K.Ishihara, Phospholipid polymer multilayered hydrogels containing cells for cancer drug screening, *Trans Mat Res Soc Japan*, **40**(1), 59-63 (2015), DOI: doi.org/10.14723/tmrj.40.59
2. X.Lin, T.Konno, K.Ishihara, Redox-active cytocompatible phospholipid polymer hydrogels for three-dimensional electrical control of encapsulated living cells, *Trans Mat Res Soc Japan*, **40**(2), 119-122 (2015), DOI: doi.org/10.14723/tmrj.40.119
3. B.Gao, T.Konno, K.Ishihara, Building cell-containing multilayered phospholipid polymer hydrogels for controlling diffusion of bioactive reagent, *RSC Adv*, **5**, 44408-44415 (2015), DOI: 10.1039/C5RA05299H
4. S.Sakata, Y.Inoue, K.Ishihara, Molecular interaction forces generated during the protein adsorption to well-defined polymer brush surfaces, *Langmuir*, **31**(10), 3108-3114 (2015), DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b00351
5. H.Oda, T.Konno, K.Ishihara, Efficient differentiation of stem cells encapsulated in a cytocompatible phospholipid polymer hydrogel with tunable physical properties, *Biomaterials*, **36**, 86-91 (2015), DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.051
6. B.Gao, T.Konno, K.Ishihara, Fabrication of a live cell-containing multilayered polymer hydrogel membrane with micrometer-scale thickness to evaluate pharmaceutical activity, *J Biomater Sci Polym Ed*, **26**(18), 1372-1385 (2015), DOI: 10.1080/09205063.2015.1095025
7. W. Chen, Y.Inoue, K.Ishihara, Preparation of photoreactive phospholipid polymer nanoparticles to immobilize and release protein by photoirradiation, *Colloid Surf B: Biointerfaces*, **135**, 356-370 (2015), DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.073
8. Y.Liu, Y.Inoue, K.Ishihara, Surface functionalization of quantum dots with fine-structured pH-sensitive phospholipid polymer chains, *Colloid Surf B: Biointerfaces*, **135**, 490-496 (2015), DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.001
9. Y.Xu, K.Mawatari, T.Konno, T.Kitamori, K.Ishihara, Spontaneous packaging and hypothermic storage of mammalian cells with a cell-membrane-mimetic polymer hydrogel in a microchip, *ACS Appl Mater Interfaces*, **7**(41), 23089-23097 (2015), DOI:10.1021/acsami.5b06796

総説・解説・成書

1. K.Ishihara, H.Oda, T.Aikawa, T.Konno, Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering, *Macromol Symp*, 351(1), 69-77 (2015), DOI: 10.1002/masy.201300118
2. B.Gao, T.Konno, K.Ishihara, Cytocompatible and spontaneous forming phospholipid polymer hydrogels, *Eur Polym J*, **72**, 577-589 (2015), DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.03.030

その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. Yihua Liu (石原研究室) The 5th Asian Biomaterials Congress Best Student Oral Presentation Award, 2015.05.29 (受賞)
2. 小田悠加 (石原研究室) 第64回高分子年次大会 優秀ポスター賞, 2015.05.29 (受賞)
3. 坂田 翔 (石原研究室) 第64回高分子年次大会 優秀ポスター賞, 2015.05.29 (受賞)
4. Xiaojie Lin (石原研究室) 2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials Best Presentation Award, 2015.08.14 (受賞)
5. 小田悠加 (石原研究室) 日本バイオマテリアル学会 日韓若手研究者交流アワード, 2015.11.9 (受賞)
6. Kazuhiko Ishihara, 5th Asian Biomaterials Congress 2015(Taipei), 2015.5.7(Penary Lecture)
7. Kazuhiko Ishihara, 2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials (Seattle) 2015.08.14 (Penary Lecture)
8. Kazuhiko Ishihara, Pacifchem 2015 (Honolulu), 2015.12.17 (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 木原隆典

分担研究者：大阪大学基礎工学研究科 新岡宏彦

1. 研究の概要

極微小探針を用いて接着細胞と浮遊細胞における力学特性の違いを定量的に評価した。接着細胞を主に3つの種類に区分することが可能であることを見出した。また、石灰化細胞の分泌するエクソソームが基質小胞のように石灰化に寄与することを発見し、非石灰化細胞由来エクソソームでも同様に石灰化形成起点となることを見出した。さらに、ディープラーニングを用いて非侵襲な細胞分化自動判別に成功した。

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) 細胞表層力学特性の分類

力学特性は細胞が有する個別の物理特性である。細胞表層の力学特性は主に原子間力顕

微鏡 (AFM) などを用いることで定量できる。こうした力学特性は細胞ごとで異なるのはもちろんであるが、細胞の接着状態でも変化する。特に接着細胞は接着状態と浮遊状態で異なる力学特性を示す。我々は、いくつかの種類の細胞の力学特性を検討した結果、接着細胞を主に3つの種類に区分することが可能であることを見出した。1つ目は、接着状態で大きくアクチン繊維が発達している線維芽細胞様細胞。2つ目は、細胞内部のアクチン繊維は大きく発達していないが、表層付近では比較的アクチン繊維が観察される癌様細胞。3つ目は、細胞内部・表層付近でほとんどアクチン繊維の発達が見られない HEK 様細胞。これら細胞の力学特性の挙動は接着状態と浮遊状態で異なっており、細胞内部と表層付近でのアクチン繊維の発達の違いの影響と考えられる。

(2) エクソソームによる細胞の石灰化

骨形成細胞は細胞外空間中に石灰化を形成させる細胞である。骨形成細胞の石灰化は基質小胞と呼ばれる分泌性の小胞が起点となって生じる。我々は、基質小胞は石灰化細胞の分泌するエクソソームと同様のものではないかと考え、骨形成細胞および通常の細胞からエクソソームを抽出し、エクソソームが基質小胞のように石灰化に寄与しうるか検討を行った。抽出したエクソソームの石灰化形成能を検討したところ、石灰化形成の起点になることを確認することができた。さらにこの石灰化起点となる能力は石灰化形成細胞由来のエクソソームのみならず、非石灰化細胞由来エクソソームでも同様に石灰化形成起点となることが見られた。一方で、石灰化形成由来エクソソームはアルカリフォスファターゼを有しており、局所的にリン酸イオン濃度を上昇させることが石灰化開始に重要であると考えられる。

(3) ディープラーニングを用いた細胞分化識別

再生医療において、ヒト臓器の構築には大量の細胞が必要であり、個々の細胞を人の手で扱ってはいは多大なコストが必要になる。近年、細胞の自動培養装置については様々なものが登場しているが、今後、細胞の質や状態を非侵襲、自動的かつ高速に判断する装置が必要になると考えられる。我々は、Deep Learningの一種であるCNN (Convolutional Neural Network)を構築し、位相差顕微鏡像から細胞の分化判別を行なった。実験では、試料としてマウス骨格筋芽細胞 (C2C12)を用い、高速演算処理のために自作のPC (GPU: NVIDIA GTX980Ti、CPU: Intel Corei7-4790K、メモリ: 8GB)と、独自に開発したDeep Learning ライブラリ Sigmaを用いた。C2C12は分化誘導を行なうと、徐々に細長い形状に変化し、最終的に細胞核が融合し多核の筋管細胞へと分化する。分化誘導を開始した日をDay 0とし、Day 0および分化後であるDay 6それぞれの細胞位相差像(各1000枚、1枚の画像サイズは200x200 pixels)を取得した。各画像をCNNによって学習し、テストデータ(各100枚)の分類を行なったところ93%の精度で識別が可能であった。

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

Jun Miyake¹
Takanori Kihara², Hirohiko Niioka¹,

¹*Department of Engineering Science, Osaka University, Japan*

²*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) The cell surface mechanics reflects the structure of actin filaments vicinity of plasma membrane. Then we can evaluate cell characters or states by measuring cell mechanics. We found that there are 3 groups as a view point of cell mechanics. First is actin filaments well-developed mesenchymal cell type; second is membrane related actin filaments developed cancer cell type; third is actin filaments undeveloped HEK293 cell type. The mechanics of these cells and the actin filaments showed different behavior in each cell adherent state.

2) Osteogenic cells form mineralized tissue through secretion of matrix vesicles. We found that the exosome secreted from osteogenic cells work as a nucleus of mineralization. Furthermore, we found that the exosome secreted from non-osteogenic cells work as a nucleus of mineralization too. We think that exosomes secreted from many cells related with bone mineralization in our body.

3) To realize the industry of regenerative medicine, numerous numbers of cells are necessary and must be treated correctly, rapidly and automatically. We developed deep learning program based on Convolutional Neural Networks (CNN) to recognize cellular differentiations with phase contrast images. It was possible to classify C2C12 before and after differentiation with 93% accuracy.

A02 班 (オ)

業績リスト

学術論文

1. Furukawa, T., Fukushima, S., Nioka, H., Yamamoto, N., Miyake, J., Araki T., Hashimoto, M., Rare-earth-doped nanophosphors for multi-color cathodoluminescence nano-bioimaging using scanning transmission electron microscopy, Journal of Biomedical Optics, **20**, 5, 056007 (2015)
2. Haghparast, S.M.A., Kihara, T., Miyake, J., Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states, PeerJ, **3**, e1131 (2015)
3. Tachibana, K., Haghparast, S.M.A., and Miyake, J., Inhibition of cell adhesion by phosphorylated Ezrin/Radixin/Moesin” Cell Adhesion & Migration **9**(6), 502-512 (2015)
4. Fukushima, S., Furukawa, T., Nioka, H., Ichimiya, M., Sannomiya, T., Miyake, J., Ashida, M., Araki, T., Hashimoto, M., Synthesis of Y₂O₃ nanophosphors by homogeneous precipitation method using excessive urea for cathodoluminescence and upconversion luminescence bioimaging, Optical Materials Express. **6**, 813 (2016)

その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

受賞

1. 第 26 回リバネス研究費富士フィルム賞, 木原隆典, 「石灰化に対する各種細胞外基質分子の効果」, リバネス, Dec 7 (2015)
2. SI2015 優秀講演賞
○金下 裕平, 杉山 佳奈子, 浅谷 学嗣, 新岡 宏彦, 平野 隆, 三宅 淳
「Deep Learning を用いたヒトミトコンドリア DNA の分類 (Classification of Mitochondrial DNA with using deep learning)」
第 16 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (2015/12/14-16, 名古屋国際会議場)

招待講演

1. ○新岡宏彦
“カソードルミネッセンス顕微鏡と近赤外光学顕微鏡を用いたマルチスケールバイオイメーキング”
異分野融合による新規分離分析法の創成のための若手講演会議(大阪大学, 2015/11/7)
2. Jun Miyake, Satoshi Asatani and Hirohiko Nioka
“Spectroscopy, Mechanics and Informatics for Cell Analysis”
Nanomedicine International Symposium (University of Tokyo, Tokyo, Japan, 2015/11/26)
3. Jun Miyake, Satoshi Asatani, Aina Yoshimura, Seiichi Tagawa and Hirohiko Nioka
“Deep Learning and Spectroscopy, for Cell Analysis”
The 7th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, (Kyoto University, Kyoto, Japan 2016/01/21)

アウトリーチ活動

一般向け講演: 市民公開シンポジウム, 木原隆典
高校生向け模擬実験: タンパク質の変性と再生実験, 木原隆典
ニワトリ胚の解剖実験, 木原隆典
展示: 北九州ゆめみらいワーク, 木原隆典

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

DNA や RNA 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、カチオン性くし形共重合体を実現した。さらにくし形共重合体により DNAzyme の活性を高められる事を明らかにした。本年度は、DNAzyme を核酸検出目的に改変した multicomponent nucleotide enzyme (MNAzyme) に対する共重合体の効果を検討し、共重合体が MNAzyme の核酸検出感度を顕著に高めることを明らかにした。

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 MNAzyme を用いた核酸の増幅検出法も提案されている[1]。一方で、その実用化にはさらなる反応性の向上が求められている。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。また、基質核酸が短鎖の場合には、それに対する結合性を高める必要がある。さらに MNAzyme の場合には、標的核酸に対する結合性も高めることが、核酸検出の高感度化に求められる。我々は、カチオン性くし形共重合体が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や鎖交換反応を促進することを報告してきた[2]。さらに、共重合体の添加により、マルチプルターンオーバー条件下 DNAzyme の反応速度を向上できることを見いだした[3]。そこで、本年は PLL-g-Dex による MNAzyme 活性の向上を検討した。

3. 成果

用いたカチオン性くし型共重合体 poly(L-lysine)-*graft*-dextran (PLL-*g*-Dex) の構造式および MNAzyme の配列を Fig. 2 に示す。Fig. 3 には、基質および標的核酸濃度をそれぞれ 200 nM、2 nM と一定にし、

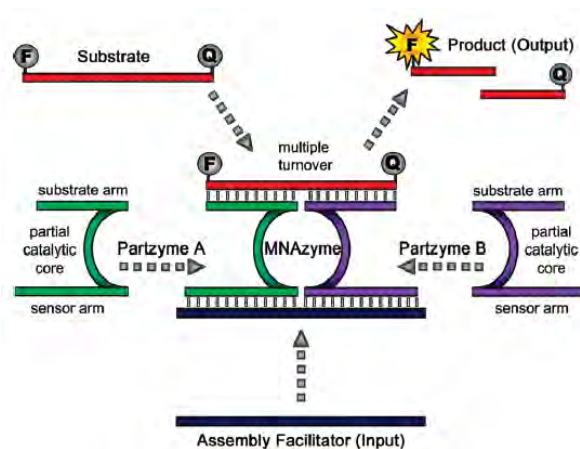


Fig. 1 核酸センサーとしての MNAzyme
 (文献 1 より引用)

MNAzyme 濃度を変化させたときの反応の経時変化を示す。共重合体が存在しないとき $[MNAzyme] = 200 \text{ nM}$ の時 60 分の反応で基質の約 3 割しか分解されないのに対し、共重合体存在下では 20 分以内に 5 割の基質が分解された。これは、共重合体がハイブリッド形成を促し、基質、MNAzyme および標的からなる核酸複合体の生成が進んだためと考えられる。

次に MNAzyme 濃度依存性を見ると、PLL-g-Dex 不在下では、MNAzyme 濃度の低下に伴い反応速度は顕著に低下し、 $[MNAzyme] = 2 \text{ nM}$ の時にはほとんど反応が検出されなかった。つまり、ターンオーバー速度が遅いことを示す。一方、PLL-g-Dex 存在下では、いずれの MNAzyme 濃度においても、高い反応性を示し、ターンオーバーが効率的に行われたことを意味する。

次に、基質濃度 200 nM および MNAzyme 濃度 2 nM と固定し、ターゲット核酸濃度を変化させて反応をおこなった。共重合体不在下では、ターゲット濃度が 2 nM 以上で検出可能であったに対し、PLL-g-Dex 存在下では 20 pM のターゲットが検出できることがわかった。つまり、共重合体は MNAzyme の核酸検出感度を 100 倍以上向上することが見いだされた [5]。

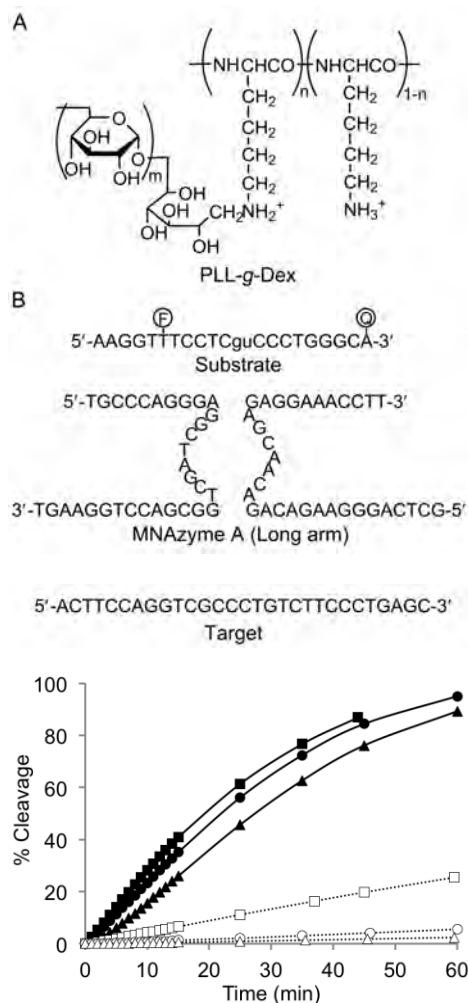


Fig. 3. PLL-g-Dex 不在下 (open) および存在下 (filled)における MNAzyme 反応の MNAzyme 濃度依存
□、■ 200 nM MNAzyme; ○、● 20 nM; △、▲ 2 nM. 反応条件: 50°C 、25 mM MgSO_4 、200 nM Substrate, 2 nM Target.

- [1] E.Mokany, S.M.Bone, P.E.Young, T.B.Doan, A.V.Todd, MNAzymes, a Versatile New Class of Nucleic Acid Enzymes That Can Function as Biosensors and Molecular Switches, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1051-1059 (2010)
- [2] L.Wu, N.Shimada, A.Kano, A.Maruyama, *Soft Matter*, **4**, 744-747 (2008)
- [4] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, **3**, 308-316, (2015)
- [5] 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.

Multi-component nucleic acid enzyme (MNAzyme)-based assays are one of isothermal, signal amplifying DNA-detection method.[1] MNAzymes are composed of short DNA oligonucleotides that function as partial enzymes or partzymes. Each partzyme includes a region of a catalytic core, a substrate-binding arm, and a sensor arm. The sensor arms recognize and bind to a target nucleic acid. When the partzymes are assembled in the presence of a target nucleic acid, they form an active MNAzyme assembly that catalytically produces signals. The signal results from substrate cleavage, generally upon release of a fluorophore from proximity to a quencher. As multiple signals can be generated from a single target molecule, isothermal signal amplification is possible. The MNAzyme integrated with various detection methods has been widely investigated.

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 10-23 DNAzyme. [2] The copolymer facilitated turnover of the DNAzyme and stabilized the DNAzyme over a wide range of temperature.

In this study, we showed that the cationic copolymer also enhances activity of an MNAzyme derived from the 10-23 DNAzyme and increased MNAzyme sensitivity. Furthermore, the copolymer enabled us to shorten the substrate-binding arms of the MNAzyme, decreasing the optimum temperature of the MNA assay from 50 °C to physiological temperature.[3]

- [1] E.Mokany, S.M.Bone, P.E.Young, T.B.Doan, A.V.Todd, MNAzymes, a Versatile New Class of Nucleic Acid Enzymes That Can Function as Biosensors and Molecular Switches, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1051-1059 (2010)
- [2] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, **3**, 308-316, (2015)
- [3] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, MNAzyme-catalysed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer, *Biomater. Sci.*, **3**, 716-720 (2015)

業績リスト

学術論文

1. Ami Fujihara, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama, Kazuhiko Ishihara, Keita Nakai, Shinichi Yusa, Preparation of upper critical solution temperature (UCST) responsive diblock copolymers bearing pendant ureido groups and their micelle formation behavior in water. *Soft Matter.*, **11**, 5204-5213 (2015)
2. Jueyuan Gao, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers. *Biomater. Sci.*, **3**, 308-316 (2015)
3. Kiyohiko Kawai, Atsushi Maruyama, Triple helix conformation-specific blinking of Cy3 in DNA, *Chem. Commun.*, 51, 4861-4864 (2015)
4. Jueyuan Gao, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama, MNzyme-catalyzed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer. *Biomater. Sci.*, **3**, 716-720 (2015)
5. Kiyohiko Kawai, Kenji Higashiguchi, Atsushi Maruyama, Tetsuro Majima, DNA microenvironment monitored by controlling redox blinking, *BioPhysBio.*, 16, 3590-3594 (2015)
6. Naohiko Shimada, Hirotaka Kinoshita, Shuichi Tokunaga, Takuma Umegae, Nozomi Kum, Wakako Sakamoto, Atsushi Maruyama, Inter-polyelectrolyte nano-assembly induces folding and activation of functional peptides. *J. Control. Release.*, **218**, 45-52 (2015)

総説・解説・成書

1. 嶋田直彦、丸山厚 「第 5 章 熱可逆性ハイドロゲル」 DDS キャリア作製プロトコール集 (2015)
2. 嶋田直彦 「注目の論文」 化学, (2015)
3. Atsushi Maruyama, Naohiko Shimada, “Cationic graft copolymers to engineer DNA assembly and functions” in “Synthesis and Characterization of Polymers for Biomedical Applications”. Carmen Scholz ed., Wiley, in press.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

招待講演

1. Atsushi Maruyama “Interpolyelectrolyte nanoassembly to engineer DNA, peptides, and lipids” Pacificchem (2015)
2. Atsushi Maruyama 「Enhancement of DNA enzyme activity by nano-assembling with cationic copolymers」 Pacificchem (2015)
3. 丸山 厚 「バイオ分子の個性を輝かせるソフト高分子複合体」、平成 27 年度日本化学会コロイドおよび界面化学部会先端技術講座 (2015)
4. 丸山 厚 「合成高分子で生体高分子の構造と機能を操作する」 Science Live Ticket Part 23 & The 23th NMMS Seminar, (2015)

A02 班 (カ)

5. 丸山 厚「新しい感温性バイオマテリアルとしての側鎖尿素高分子」附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト、G3 分科会 (2015)
6. Atsushi Maruyama「MNAzyme-catalyzed Nucleic Acid Detection Enhanced by a Cationic Copolymer」 The 3rd China-Japan Symposium on Nanomedicine (2015)
7. Naohiko Shimada「Ureido-functionalized Polymers Exhibiting UCST-type Phase Separation Under Physiological Conditions」Pacifichem (2015)

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、原発巣とセンチネルリンパ節の間のリンパ管ネットワークの高精度解析や、がん組織の悪性度を高確度で診断可能な方法開発が重要となる。本年度は、(1)がん転移やリンパ節摘出手術がリンパ管ネットワークへ与える影響の検討、(2)がん原発巣やリンパ節転移巣の性状を診断する方法の開発、を行った。その結果、がん患部に接続するセンチネルリンパ節経路は手術や転移の進行によりダイナミックに変化することを明らかにするとともに、がん転移活性化因子を分子マーカーとしたがん再発予測の診断法開発に成功したので報告する。

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。

近年、乳がん为代表されるように、がんではセンチネルリンパ節診断が臨床適用されている。よってがんにおけるリンパ管ネットワーク経路を正確に理解することは、転移リンパ節の高精度診断を施行する上で必須である。また同定した原発巣やリンパ節転移巣の組織を免疫染色法で病理診断し、がんの悪性度を正確に把握することは、予後診断にとって重要である。これまでの免疫染色法では、病理切片に対し標的因子特異的な抗体を反応させ、最終的にペルオキシダーゼの酵素反応により、標的因子存在部位を色素発色させていた。この方法は酵素反応を利用するため、発色強度が温度、時間、基質量に左右され、定量性が不十分であった。がん免疫染色の低い定量性は、がんの診断精度に大きな影響を及ぼすため、高定量性の免疫染色法の開発が課題となっていた。

以上の問題を解決するため、本研究では、(1)がん転移やリンパ節摘出手術がリンパ管ネットワークへ与える影響の検討、(2)がんの原発巣やリンパ節転移巣の性状を高精度診断する方法の開発、を行ったので、それぞれに関して概説する。

3. 成果

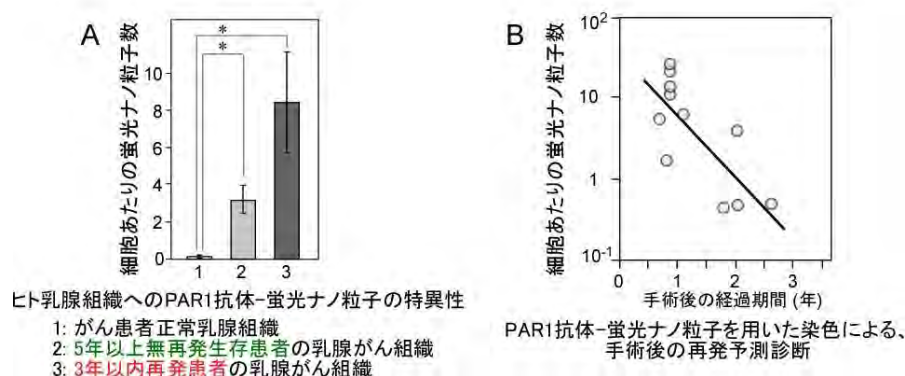
(1)がん転移やリンパ節摘出手術がリンパ管ネットワークへ与える影響の検討：ルシフェラーゼを発現するマウス乳がん由来の培養細胞株を用い、この細胞をマウスの肢に移

A03 班 (キ)

植することにより、リンパ節転移モデルを作製した。ルシフェラーゼの発光を利用して、がん転移の進行を確認したところ、この担がんマウスでは、細胞移植後、1-2 週間で膝窩リンパ節への転移が見られ、引き続き 1 か月後には肺への転移が観察された。細胞を移植して 2 週間後に、転移リンパ節を摘出し、その大きさやがん転移の様態を調べたところ、正常なリンパ節(がん細胞を注入していない肢の膝窩リンパ節)の大きさが 1.5mm 程度なのに対し、転移リンパ節では 3mm 近くに腫大化していた。また転移リンパ節のパラフィン切片を作製し、がん細胞を認識するサイトケラチン抗体で染色したところ、がん細胞がリンパ節内で増殖・浸潤し、リンパ節構造を破綻させている様子が観察された。次に、がん転移に関わるリンパネットワーク経路を明らかにするために、膝窩リンパ節を切除したマウスの肢にがん細胞を移植し、同様に転移の様子を観察した。その結果、がん細胞はそれまでとは別のリンパ節へ転移する様子が観察された。このリンパ節は膝窩リンパ節が存在するマウスでは、主要な転移対象リンパ節にはなっていなかった。よって、リンパ節へのがん転移は、リンパ管・リンパ節の切除によって大きく変化することが予想された。リンパ節の摘出は臨床では再発を防ぐため、がん手術の手技として行われている。現在、リンパ節切除と転移リンパ節変化の関係を、X 線 CT イメージング、蛍光イメージング、さらには計算科学的手法(東北大・今井班と共同研究)で解析を行っている。

(2) がんの原発巣やリンパ節転移巣の性状を診断する方法の開発：がん組織の免疫染色の課題を解決するために、蛍光ナノ粒子と画像解析を組合せた新たながん免疫染色法の開発を東大・樋口班と協力しながら進めた。近年、がん転移活性化因子として注目されている PAR1 (Protease-activated receptor 1) に注目し、PAR1 を特異的に認識する抗体を独自に調製し、これと蛍光ナノ粒子を結合させた「PAR1 抗体-ナノ粒子」を作製した。この蛍光プローブでヒトがん組織を免疫染色した後、蛍光波長特性や蛍光強度をピクセル毎に高精度解析する独自の 방법으로、取得蛍光画像の評価を行った。その結果、自家蛍光が存在するヒトがん組織においても、標的因子発現量の相対量を高い定量性で算出する方法の開発に成功した。本方法を応用し、ヒト乳がんの手術後の予後予測を試みるために、乳腺正常組織、5 年以上無再発の乳がん組織、3 年以内再発の乳がん組織、の 3 種類のヒト組織を使

って免疫染色と画像解析を行った。その結果、「PAR1 抗体-ナノ粒子」の蛍光スコアは、がん悪性度に強く相関するデータを得ることに成功した(図)。



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 diagnose sentinel lymph node tissues in cancer with high accuracy, development of imaging method of cancer tissues is important. The expression level of the targeted protein in tumor cells is generally measured by immunohistochemistry (IHC). However, in IHC with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (IHC-DAB), the intensity of DAB staining depends on the enzymatic activity of horseradish peroxidase (HRP). Therefore, the staining intensity of DAB is significantly influenced by the reaction time, temperature and HRP substrate concentrations. The fluorescent label increases the quantitative sensitivity of IHC because the intensity of the fluorescent materials is proportional to the intensity of the photon excitation energy in an irreversible chemical reaction. Additionally, the fluorescent label provides an image with a high signal-to-noise ratio through the use of dark background light and multistaining with various wavelengths. However, general organic fluorescent molecules such as FITC, Alexa Fluors, and Cy-5, have disadvantages arising from their poor photostability and autofluorescence interference. Recently, quantum dots (QDs) have been used in various bio-imaging techniques due to their greater photostability and brightness compared with general organic fluorescent molecules. However, the high intensity of tissue autofluorescence is comparable to that of QDs. This problem has impeded quantitative analysis using only the fluorescence intensity of QDs in the presence of autofluorescence.

Here, we targeted protease-activated receptor 1 (PAR1) as a new biomarker for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative patients and made anti-PAR1 antibody. To estimate PAR1 expression levels in HER2-negative patient tissues using the antibody, user-friendly immunohistochemistry with fluorescence nanoparticles or quantum dots (QDs) was developed. Previously, immunohistochemistry with QDs was affected by tissue autofluorescence, making quantitative measurement extremely difficult. We significantly improved the quantitative sensitivity of immunohistochemistry with QDs by using an autofluorescence-subtracted image and single-QD imaging. The immunohistochemistry showed that PAR1 expression was strongly correlated with relapse-free survival time in HER2-negative breast cancer patients. Therefore, the developed anti-PAR1 antibody is a strong candidate for use as an anticancer drug and a prognostic biomarker for HER2-negative patients.

業績リスト

学術論文

1. Gonda K, Miyashita M, Higuchi H, Tada H, Watanabe TM, Watanabe M, Ishida T, Ohuchi N. Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging. *Scientific Reports* 5: 14322 (2015).
2. Gonda K, Hamada Y, Kitamura N, Tada H, Miyashita M, Kamei T, Ishida T, Ohuchi N. Highly sensitive imaging of cancer with functional nanoparticles. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 28: 731-736 (2015).
3. Kobayashi Y, Nagasu R, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Preparation of Au/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticle colloid solution and its use in x-ray imaging process. *Nanocomposites* 2: 83-88 (2015).
4. Kobayashi Y, Matsudo H, Kubota Y, Nakagawa T, Gonda K, Ohuchi N. Preparation of silica-coated quantum dot nanoparticle colloid solutions and their application in in-vivo fluorescence imaging. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 48: 112-117 (2015).
5. Kobayashi Y, Matsudo H, Li T, Shibuya K, Kubota Y, Oikawa T, Nakagawa T, Gonda K. Fabrication of quantum dot/silica core-shell particles immobilizing Au nanoparticles and their dual imaging functions. *Applied Nanoscience* 6: 301-307 (2016).
6. Kobayashi Y, Shibuya K, Tokunaga M, Kubota Y, Oikawa T, and Gonda K. Preparation of high-concentration colloidal solution of silica-coated gold nanoparticles and their application to X-ray imaging. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 78: 82-90 (2016).
7. Kobayashi Y, Ayame T, Shibuya K, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Stabilization of Silica-Coated Silver Iodide Nanoparticles. *Pigment & Resin Technology* in press.
8. Kobayashi Y, Morimoto H, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Fabrication of gadolinium hydroxide nanoparticles using ion-exchange resin and their MRI property. *Journal of Asian Ceramic Societies* in press (2016).

招待講演

1. 権田幸祐 「蛍光ナノ粒子の1粒子イメージングによる定量的免疫組織化学法の技術開発」、第 104 回日本病理学会総会 ワークショップ 3、2015 年 5 月 1 日、名古屋国際会議場
2. Gonda K. Highly sensitive imaging of cancer with functional nanoparticles. 32nd International Conference of Photopolymer Science and Technology. June 24, 2015, Makuhari Messe, Chiba, Japan.
3. 権田幸祐 「ナノバイオイメージングで拓くがんや末梢動脈疾患の医学・医療研究」、第 11 回東北大学 REDEEM シンポジウム 2015 年 9 月 12 日、東京堂ホール
4. Gonda K Ohuchi N. Prognostic Diagnosis of Breast Cancer with Immunohistochemistry by Single-Particle Quantum Dot Imaging. 9th International Symposium on Nanomedicine. December 11, 2015, Mie University, Sansui Hall.

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：名古屋大学医学部脳神経外科 夏目敦至

研究分担者：名古屋大学医学部腫瘍生物学 千賀威

1. 研究の概要

ストレス顆粒は RNA と多くのタンパク質からなる凝集体であり、熱や活性酸素などのストレスにより形成される。その形成メカニズムは不明であり、RNA の翻訳停止やタンパク質の修飾が関与していると考えられている。また、ストレス顆粒の構成タンパク質の異常は神経疾患の発症と関連している。我々は分子生物学的手法とイメージングの手法を用いてストレス顆粒形成のメカニズムを解析している。ストレス顆粒の新たな構成因子を同定し、そのダイナミックな細胞内局在と複合体形成を解析し、関連する病態の解明につなげたいと考えている。

2. 研究の背景と目的

個体における細胞は常に外から様々な種類のストレスを受けている。表皮細胞は紫外線による化学的損傷、赤外線による熱刺激、また多くの化学物質によるストレスを受けている。消化管内の上皮細胞は化学物質、病原体、そして浸透圧によるストレスに常にさらされている。このようなストレスが加わると細胞内では非常に多くの異なる反応が起こることが知られている。ストレス顆粒の形成は、そのような多くのストレスに対する反応の 1 つである。

ストレス顆粒は主にヒ素、熱（42 度から 44 度）、浸透圧、活性酸素などのストレスによる生じる直径 1－5 マイクロメートルほどの、タンパク質と mRNA からなる凝集体である。ストレスを加えて 20 分ほどでストレス顆粒は細胞全体にわたって多数形成され、刺激がなくなるとすみやかに消失していく。ストレス顆粒に局在するタンパク質のいくつかは、癌、炎症性疾患、ウイルス感染症、そして筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis ; ALS）や前頭側頭型認知症（frontotemporal dementia ; FTD）などの神経変性疾患などに関係することが分かっている。TDP-43 はストレス顆粒に局在する LC 配列を有する RNA 結合タンパク質であるが、ALS の患者の脳細胞に存在する凝集体に局在している。Ataxin2 もストレス顆粒局在タンパク質であるが、この遺伝子の変異は一部の家族性 ALS との関連が報告されている。ストレス顆粒と癌に関しても多くの研究がおこなわれており、抗がん剤に対する耐性や癌細胞の増殖や生存に関することが報告されている。

ストレス顆粒の形成メカニズムを明らかにすることは、神経疾患や抗がん剤耐性の分子機構の解明につながる可能性がある。そこで我々はストレス顆粒の新たな構成因子を同定し、その役割について解析をおこなった。

3. 成果

ストレス顆粒を形成する多くの因子はアルギニンとグリシンからなる配列 (RGG 配列) を有している。RGG 配列のアルギニンはメチル化酵素である PRMT1 によりメチル化される。そこで我々は新たなストレス顆粒形成因子を同定するため、PRMT1 との結合タンパク質の網羅的な解析をおこなった。その結果多くの RGG 配列を含む RNA 結合タンパク質が PRMT1 と結合し、ストレス顆粒に局在することが判明した。我々はその中のいくつかのタンパク質に関してさらに詳細な検討をおこなった。

UBAP2L はユビキチン結合領域と RGG を配列有する機能不明のタンパク質である。PRMT1 によりアルギニンがメチル化され、そしてストレス顆粒に局在することが観察された (図 1)。ストレス顆粒における GFP-UBAP2L の局在を (Fluorescence Recovery after Photobleaching; FRAP) を用いて観察したところ、ストレス顆粒における UBAP2L はダイナミックに動くことが分かった (図 2)。さらに siRNA を用いて UBAP2L の発現を抑制したところ、ストレス顆粒の形成が顕著に抑制された。

図 1

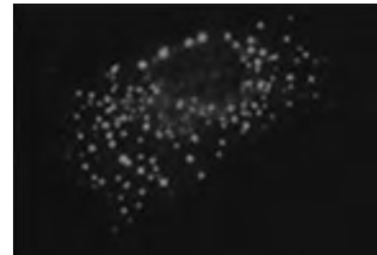
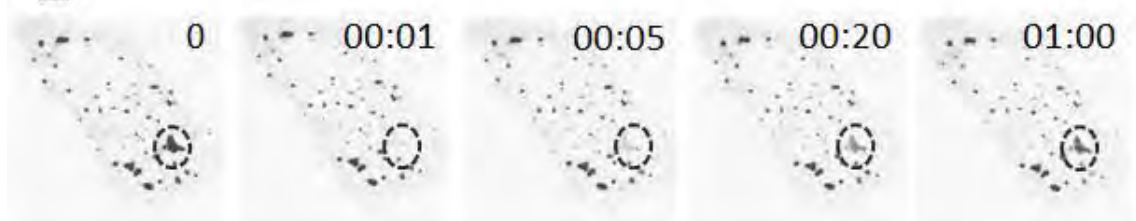


図 2



UBAP2L の機能をさらに検討するため、UBAP2L と複合体を形成するタンパク質を質量分析により検討した。その結果、FMR1 と G3BP1 というタンパク質が結合することが分かった。FMR1 は遺伝性の神経疾患の原因遺伝子であり、G3BP1 はストレス顆粒に局在するタンパク質である。結合を詳しく解析したところ、UBAP2L と G3BP1 は RNA を介して結合していることが明らかとなった。UBAP2 は UBAP2L のホモログであるが、興味深いことに UBAP2 は UBAP2L と異なる複合体を形成することが分かった。UBAP2 と UBAP2L は RNA を含む複合体を形成し、RNA の翻訳や RNA の代謝に関連していると予想される。また神経疾患に関連するタンパク質と複合体を形成することから、病気との関連性も考えられる。

Genetic analysis and imaging for elucidation of pathogenesis of human diseases

Atsushi Natsume¹

Takeshi Senga²

¹Department of Neurosurgery and ²Division of Cancer Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

Various serine/threonine kinases are activated in cells upon numerous extracellular stresses, such as heat, hypoxia and oxidation. These stresses activate four different types of kinases, EIF2AK1, EIF2AK2, EIF2AK3, EIF2AK4, which consequently promote phosphorylation of eIF2 α at Ser51. The phosphorylation inhibits initiation of translation and induces formation of granules that are composed of numerous mRNAs and proteins with specific domains or sequences rich in arginine and glycine (RGG motif). Some proteins that are localized in SG are associated with pathogenesis of neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis. Elucidation of molecular mechanisms of SG formation may give some insight for the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Our proteomics analysis of SG components revealed UBAP2L is a critical component of SG. UBAP2L contains ubiquitin-associated domain and RGG motif. UBAP2L is localized to SGs when cells are treated with heat, arsenite, hydrogen peroxide, and sorbitol. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis revealed that UBAP2L localization to the SG is dynamic. UBAP2L depletion by siRNA transfection showed that UBAP2L was critical for the organization of SG. Formation of SG is associated with cell survival in the presence of extracellular stresses. Consistently, a number of UBAP2L-knockdown cells underwent apoptosis after arsenite or hydrogen peroxide treatment. Further proteomics analysis revealed that UBAP2L was in complex with G3BP1 and FMR1, both of which are known to localize to SG. Mutation of FMR1 is associated with mental retardation of human. UBAP2L directly associated with FMR1, but the interaction of UBAP2L and G3BP1 was dependent on the presence of small RNAs, indicating that UBAP2L is a ribonucleoprotein. Interestingly, UBAP2, which is a homolog of UBAP2L, was also a component of SG but formed different protein complex. Further analysis of UBAP2L and UBAP2 functions in RNA processing and SG formation may give insight for the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

業績リスト

学術論文

1. Mansour MA, Hyodo T, Akter KA, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Senga T. SATB1 and SATB2 play opposing roles in c-Myc expression and progression of colorectal cancer. *Oncotarget* (In press)
2. Akter KA, Mansour MA, Hyodo T, Ito S, Hamaguchi M, Senga T. FAM98A is a novel substrate of PRMT1 required for tumor cell migration, invasion, and colony formation. *Tumour Biol.* (In press)
3. Akter KA, Hyodo T, Asano E, Sato N, Mansour MA, Ito S, Hamaguchi M, Senga T. UBE2S is associated with malignant characteristics of breast cancer cells. *Tumour Biol.* (In press)
4. Maeda M, Hasegawa H, Sugiyama M, Hyodo T, Ito S, Chen D, Asano E, Masuda A, Hasegawa Y, Hamaguchi M, Senga T. Arginine methylation of ubiquitin-associated protein 2-like is required for the accurate distribution of chromosomes. *FASEB J.* 30: 312-23. (2016)
5. Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Chen D, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Senga T. HOXB13 and ALX4 induce SLUG expression for the promotion of EMT and cell invasion in ovarian cancer cells. *Oncotarget.* 6: 13359-70. (2015)
6. Mansour MA, Hyodo T, Ito S, Kurita K, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling. *FEBS J.* 282: 1394-405. (2015)
7. Kuramitsu S, Ohno M, Ohka F, Shiina S, Yamamichi A, Kato A, Tanahashi K, Motomura K, Kondo G, Kurimoto M, Senga T, Wakabayashi T, Natsume A: Lenalidomide enhances the function of chimeric antigen receptor T cells against the epidermal growth factor receptor variant III by enhancing immune synapses. *Cancer Gene Ther*, 2015, Oct;22(10):487-95.
8. Yamamuro S, Sano E, Okamoto Y, Ochiai Y, Ohta T, Ogino A, Natsume A, Wakabayashi T, Ueda T, Hara H, Nakayama T, Yoshino A, Katayama Y: Antitumorigenic effect of interferon- β by inhibition of undifferentiated glioblastoma cells. *Int J Oncol*, 2015, Nov;47(5):1647-54.
9. Ranjit M, Motomura K, Ohka F, Wakabayashi T, Natsume A: Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol*, 2015, Jul;32(3):153-62.
10. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Motomura K, Alim A, Tanaka I, Senga T, Harada I, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Sekido Y, Wakabayashi T: Activation of Yes-associated protein in low-grade meningiomas is regulated by merlin, cell density, and extracellular matrix stiffness. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2015, Jul;74(7):704-9.
11. Ohkawa Y, Momota H, Kato A, Hashimoto N, Tsuda Y, Kotani N, Honke K, Suzumura A, Furukawa K, Ohmi Y, Natsume A, Wakabayashi T, Furukawa K: Ganglioside GD3 enhances invasiveness of gliomas by forming a complex with platelet-derived growth factor receptor α and Yes kinase. *J Biol Chem*, 2015, Jun 26;290(26):16043-58.
12. 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 S, Natsume A, Ogawa S: Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet*, 2015, May;47(5):458-68.
13. 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.* 2015 Mar;33(3):1123-30.

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 ssDNA-PEG-脂質の合理的設計を目指し、塩基長が細胞間接着挙動へ及ぼす影響を調べた。塩基長 6 と 1 分子レベルでは弱い相互作用であっても、細胞膜間で多価効果が働くことで体温環境下でも細胞間接着を誘導できることが分かった。また、PEG-脂質を用いてタンパクの活性を損なわずに、迅速、簡便かつ高効率で細胞表面にタンパクを固定化する方法の開発を目指した。遺伝子組み換えタンパク質の精製に用いるタグ配列とリガンドとの相互作用を PEG-脂質技術に組み込むことで、細胞表面に遺伝子組み換えタンパク質を固定化することができた。また、この方法を用いて細胞へ新たな機能を付与できることが分かった。

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

(1) 塩基長が細胞間接着へ及ぼす影響

6, 10, 21 塩基の ssDNA-PEG-lipid を合成し, DNA の設計が細胞表面での相互作用に及ぼす影響を調べた。相補対 1 対の相互作用パラメータ (T_m) はそれぞれ, 27, 38, 74°C であった。これら 3 種の ssDNA-PEG-lipid で修飾した細胞へ相補 DNA を 4°C で結合させた後, 温度上昇に伴う相補 DNA の解離を調べた。塩基長が短いほど低温で相補 DNA の解離が見られ, 細胞表面での DNA1 対の解離は液中と同程度であることが分かった。細胞間接着についてはどの ssDNA-PEG-lipid を用いても誘導することができ, 細胞間接着面に ssDNA-PEG-lipid が集積した。 T_m 値から考えると, 6 mer の ssDNA-PEG-lipid を用いて細胞間接着を誘導した場合, 37°C に昇温することで細胞間接着を脱離できると期待した。しかし, 37°C においても細胞間接着は維持された。これは, 細胞間接着面に ssDNA-PEG-lipid が集積し, 多価効果により相互作用パラメータが増強されたためと考えられる。このことから, 細胞間接着においては, 1 分子レベルの相互作用パラメータだけではなく多価効果による協同作用も考慮する必要があることが分かった。

(2) 細胞表面への遺伝子組み換えタンパク質の固定化

PEG-脂質による細胞表面修飾法は迅速, 簡便かつ高効率であるものの, 共有結合によって PEG の末端へタンパク質を固定化するとタンパクの活性が低下することがある。そこで PEG-脂質を用いて細胞表面にタンパクを活性を損なうことなく固定化することを目指した。遺伝子組み換えタンパク質合成では, 望みの位置にタグ配列を導入することができる。これと特異的に相互作用するリガンド分子を導入した ligand-PEG-lipid を用い, 細胞表面に導入されたリガンドとタグ配列との特異的相互作用によって, 細胞表面に遺伝子組み換えタンパク質を固定化することを試みた。タグ配列としては His タグまたは SNAP タグを用い, それぞれのリガンド (ベンジルグアニンまたは金属イオンをキレートしたニトリロ三酢酸) を有する ligand-PEG-lipid を合成した。細胞表面を ligand-PEG-lipid で修飾することで, 対応するタグ配列を持つタンパクを固定化することができた。また, この手法を用いて細胞間接着を担う膜タンパク質である E-cadherin の細胞外ドメインを固定化したところ, 異種細胞からなる細胞凝集体の構造制御に成功した (図)。本手法を用いることで細胞表面に目的タンパク質を迅速かつ高効率に修飾でき, これにより細胞機能を改変できることが分かった。

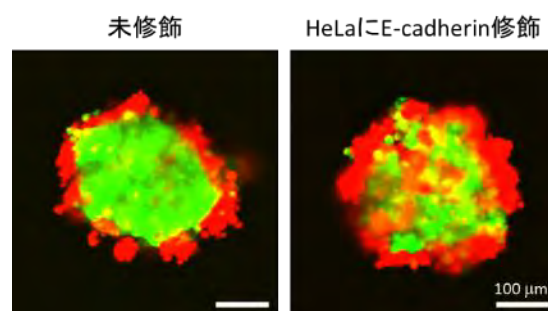


図. E-cadherin 表面修飾による, ヒト乳癌由来上皮細胞 (MCF-7, 緑) とヒト子宮頸癌由来上皮細胞 (HeLa, 赤) からなる細胞凝集体の構造制御

Three Dimensional Tissue Regeneration Through Multipoint Molecular Weak Association

Hiroo Iwata¹

Yusuke Arima¹, Yukihiro Okamoto²

¹ Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University,

² Graduate School of Engineering Science, Osaka University

We have employed single stranded DNA-poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates (ssDNA-PEG-lipids) for cell surface engineering. The ssDNA presented on the cell surface acts as an adhesive to immobilize functional molecules, materials and various cells on the cell surfaces. For rational design of ssDNA-PEG-lipids, it is important to understand structure-function relationship of ssDNA-PEG-lipids. We examined the effect of DNA length on intermolecular interactions at cell surface. We synthesized three ssDNA-PEG-lipids carrying different DNA length (6 mer, 10 mer, or 21 mer). The melting temperature (T_m) decreased with decreasing DNA length, indicating preparation of ssDNA-PEG-lipids with different interaction strength. Temperature-dependent binding of complementary ssDNA' to cells modified with ssDNA-PEG-lipids was observed in agree with T_m , indicating that single molecular hybridization at cell surface is similar to that in solution. In contrast, cell-cell attachment was induced by ssDNA-PEG-lipids independently their DNA length. This could be explained by local enhancement of hybridization since ssDNA-PEG-lipids were recruited at cell-cell contact region upon cell-cell attachment. This result suggests that it is necessary to consider intermembrane multivalency to design ssDNA-PEG-lipids for controlling cell-cell attachment.

We also aimed to develop a method to efficiently immobilize proteins onto cell surface with retained bioactivity of proteins. Although cell modification with proteins through physicochemical approaches is easy, rapid, efficient compared to biological approaches, it often results in loss of proteins' bioactivity. We employed ligand molecules which specifically interact with tag sequences of recombinant proteins. We synthesized PEG-lipids carrying metal ion-chelated nitrilotriacetic acid (NTA) or benzylguanine (BG), which interact with His-tagged or SNAP-tagged recombinant proteins, respectively. His-tagged or SNAP-tagged enhanced green fluorescent protein (EGFP) was immobilized onto cell surface with high efficiency and low cytotoxicity. We then examined cell surface modification with cell-cell adhesion molecule E-cadherin to engineer cell-cell adhesion. Modification of surface of T cell lymphoblast-like cell line with E-cadherin successfully induced formation of cell aggregates through homophilic interaction of E-cadherin. Additionally, E-cadherin modification could modulate structure of aggregates consisting of two types of epithelial cell lines. There results demonstrate functionalization of cell with recombinant proteins using ligand-PEG-lipids.

A03 班 (ケ)

業績リスト

学術論文

1. Yusuke Arima, Hiroo Iwata. Preferential adsorption of cell adhesive proteins from complex media on self-assembled monolayers and its effect on subsequent cell adhesion. *Acta Biomater.*, **26**, 72-81 (2015).
2. Toru Itagaki, Yusuke Arima, Rei Kuwabara, Narufumi Kitamura, Hiroo Iwata. Interaction between cells and poly(ethylene glycol)-lipid conjugates. *Colloids Surf. B*, **135**, 765-773 (2015).
3. Takashi Komura, Koichi Kato, Shuhei Konagaya, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Hiroo Iwata. Optimization of surface-immobilized extracellular matrices for the proliferation of neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. *Biotechnol Bioeng.*, **112**, 2388-2396 (2015).
4. Mitsue Komatsu, Shuhei Konagaya, Edgar Yuji Egawa, Hiroo Iwata. Maturation of human iPS cell-derived dopamine neuron precursors in alginate-Ca²⁺ hydrogel. *BBA-Gen. Subjects*, **1850**, 1669-1675 (2015)
5. Edgar Yuji Egawa, Narufumi Kitamura, Ryusuke Nakai, Yusuke Arima, Hiroo Iwata. A DNA hybridization system for labeling of neural stem cells with SPIO nanoparticles for MRI monitoring post-transplantation. *Biomaterials*, **54**, 158-167 (2015).
6. Yukihiro Okamoto, Yusuke Tsujimoto, Hiroshi Umakoshi. Electrophoretic separation method for membrane pore-forming proteins in multilayer lipid membranes. *Electrophoresis*, in press
7. Yukihiro Okamoto, Takumi Ikeda, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi. Development of in situ cell surface modification for surface enhanced Raman analysis of cell membrane. *Chem. Lett.*, accepted.

総説・解説・成書

1. 有馬 祐介, DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体を用いた細胞表面修飾, 表面科学, accepted

その他(報道, 受賞, 特許, 主な招待講演, 活動など)

1. 受賞: 岩田博夫, 日本バイオマテリアル学会 科学功績賞, 「高分子バイオマテリアルを用いた医療デバイスの開発とその解析」
2. 受賞: 岡本行広, 東海化学工業会賞 学術賞, 「マイクロ・ナノ空間/ナノ材料の特性を利用した分離分析法の創成」
3. 招待講演: Y. Arima, H. Iwata. Cell attachment to supported lipid bilayer mediated by oligonucleotide-phospholipid conjugates. E-MRS Spring Meeting (2015.5.11-15, Lille)
4. 招待講演: Y. Arima, H. Iwata. Recruitment of DNA tethered to lipid bilayer upon DNA-mediated cell-cell attachment. 9th International Symposium on Nanomedicine (2015.12.10-12, Tsu)
5. 招待講演: Y. Okamoto. The Pittsburgh Conference & Exposition (2016.3.10, Atlanta)
6. 招待講演: 有馬祐介, 岩田博夫: 単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体を用いた細胞表面工学と支持脂質二分子膜によるモデル化, 2015 年真空・表面科学合同講演会 (2015.12.1, つくば)
7. 招待講演: 有馬祐介, 岩田博夫: 単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体を用いた細胞表面工学とその応用, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) (2015.12.2, 神戸)
8. 招待講演: 岡本行広: 生体分子の分離分析の高性能化を目指して, 日本分析化学会近畿支部, 異分野融合による新規分離分析法の創成のための若手講演会 (2015.11.7, 大阪)

蛍光寿命イメージングを用いた細胞内イオン濃度の

動的变化の解明

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

アミロイド β のオリゴマーと線維状態のその場検出についてチオフラビン(ThT)色素の蛍光を用いて検討した。オリゴマーと線維状態において ThT 色素の蛍光強度は異なるが、この違いは、蛍光寿命の変化ではなく、会合しているペプチド数の違いの寄与が大きいことがわかった。また、糖結合タンパク質であるヒトガレクチン-1(hGal-1)のファルネシル基結合によるクラスター形成について、糖結合ポケットを介して生じること、糖結合ポケットは主に 2 状態の平衡にあることを蛍光寿命から示唆する結果を得た。H-Ras の hGal-1 との相互作用によるクラスター形成は、hGal-1 の糖結合ポケット間による自己集合によって生じることが示唆される。

2. 研究の背景と目的

蛍光寿命の値は、光退色などの様々な実験条件に依存しないために、定量的な情報を得ることができる。申請者らは、製作した蛍光寿命イメージングシステムを用いて、細胞内 pH や細胞死のその場検出など、蛍光寿命を用いた様々な細胞内環境計測を提案している。本研究では、自家蛍光だけではなく、機能性色素分子などを用いて蛍光寿命を用いた細胞内環境計測手法の提案と細胞内分子の高感度計測を目指す。また共同研究を行うことによって、蛍光寿命を用いた様々な細胞内環境計測を行う。

3. 成果

(1) ThT 色素の蛍光寿命を用いた生体分子の高感度測定を検討している。DNA の四重らせん構造のその場検出のみではなく、アルツハイマー病関連物質であるアミロイド β ($A\beta$)にも応用している。 $A\beta$ については、繊維化した状態ではなく、断片化したオリゴマー状態がアルツハイマーの発症に大きく寄与することが提案されている。我々は、溶液の Ca^{2+} 濃度を調整することによって、 $A\beta$ のモノマー、オリゴマー、そして繊維状態を作り分けることに成功しており、ThT の蛍光寿命を用いた $A\beta$ の各状態の検出を検討した。 $A\beta$ に染色された ThT は、モノマー、オリゴマー、そして繊維状態と変化するにつれて蛍光強度が強くなり、ThT の蛍光強度から各状態をその場検出することができる。しかし、蛍光減衰曲線を解析した結果、モノマー状態と繊維状態の ThT の蛍光寿命が約 10 ps 以下と 3 ns であるのに対し、オリゴマーの蛍光減衰曲線は 10 ps 以下と約 3 ns の 2 成分の重ね合わせとして観測された。更なる検討が必要であるが、オリゴマーの

ThT の蛍光強度が繊維状態よりも小さいのは、会合状態にあるペプチドの量が少ないことが原因であることが示唆される(三好大輔教授(甲南大)との共同研究)。

(2) GTP 分解酵素である H-Ras は、糖結合タンパク質 hGal-1 との結合によりクラスターを形成し、H-Ras のシグナル伝達を活性化する。そこで、hGal-1 と H-Ras との相互作用について蛍光寿命から検討した。H-Ras の結合部位のモデルとなる farnesyl thiosalicylic acid (FTS)を用いて、hGal-1 の糖結合ポケット内にあるトリプトファン(Trp)残基の蛍光寿命の FTS 濃度依存性を測定した。蛍光減衰曲線は 3 成分の指数関数を用いて再現し、3 成分から得られる平均蛍光寿命は、FTS の濃度が約 300 μM から増加し、約 800 μM の濃度領域において一定値となった (Fig. 1A)。Trp エステル体の蛍光寿命の溶媒依存性において、溶媒の極性の減少に伴い蛍光寿命が増加することから、FTS の濃度増加によって Trp 周囲の極性が減少し蛍光寿命が増加したと考えられる。native PAGE の測定から、FTS の濃度増加に伴い、会合数の小さい hGal-1 クラスターが生成し、さらに高濃度では会合数の大きなクラスターが生成する 2 段階のクラスター形成が生じることがわかった。2 段階のクラスター生成過程は、蛍光寿命の FTS 濃度依存性と対応し、小さなクラスターでは、糖結合ポケットを介してクラスターが生成し、Trp 周囲の極性が減少する構造変化を伴うのに対し、大きなクラスターは、糖結合ポケットを介さずに生成し、Trp 周囲の極性環境が変化しないと考えられる。また、平均蛍光寿命の変化は、速い寿命成分と遅い寿命成分の割合の変化によって生じており (Fig. 1B)、糖結合ポケットの構造が 2 状態の平衡状態であることを示唆している。FTS の濃度増加に伴い、クラスターを形成しやすい状態に平衡が偏り、クラスター形成が誘起されるモデルが考えられる。

(3) 光感受性色素の蛍光寿命について、がんと正常細胞中において蛍光寿命が異なること、また細胞内での活性酸素種(ROS)の発生効率と蛍光寿命との間に相関があることを示す結果を得た。そこで、パルスレーザーと時間分解赤外吸収システムとを組み合わせ、ROS の検出および収率測定を行うシステム開発を行っている。変化量が小さいために、信号雑音比の向上について検討している。(太田信廣教授(台湾交通大), 李黎明教授(千歳科技大)との共同研究)。

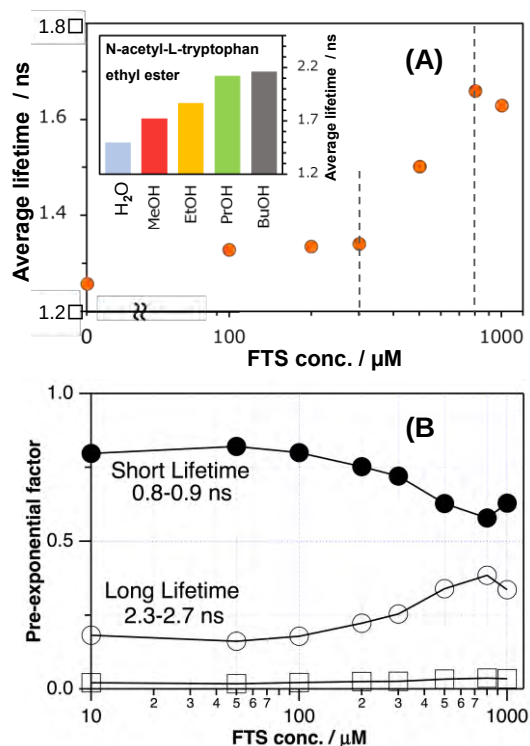


Fig. 1. (A) Average fluorescence lifetime of hGal-1 with changing FTS concentration. The fluorescence lifetime of the tryptophan model compound is also shown in the inset. (B) The pre-exponential factors of the three lifetime components of the fluorescence decay of hGal-1.

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

Takakazu Nakabayashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Japan

We have used fluorescence lifetime imaging (FLIM) to monitor cellular environments in a cell because the value of the fluorescence lifetime remains constant with photobleaching and optical conditions, performing quantitative measurements of cellular environments. In this project, we have applied FLIM to a variety of bioanalytical sciences including the evaluation of ion concentrations and the detection of biological molecules.

The formation of amyloid β ($A\beta$) aggregates is strongly related to Alzheimer's disease (AD) and the distinction between the fibril and oligomer states of $A\beta$ is important to clarify the mechanism of the pathogenesis of AD because the $A\beta$ oligomer is suggested to have high toxicity. Thioflavin T (ThT) exhibits strong fluorescence with binding to $A\beta$ aggregates, and the fluorescence intensity depends on the aggregate condition. Therefore, it is expected that FLIM of ThT is used to monitor the magnitude of the $A\beta$ aggregation, especially to distinguish the oligomer and fibril states. We have succeeded in separately preparing the oligomer and fibril states and analyzed the fluorescence decays of ThT in the monomer, oligomer, and fibril, respectively. The fluorescence lifetimes of < 30 ps and ~ 3 ns were calculated for ThT in the monomer and fibril, respectively, and the fluorescence decay of ThT in the oligomer was found to be the linear combination between the decays of the monomer and fibril states. Therefore, it may be considered that the decrease in the fluorescence intensity from the fibril to oligomer states comes from the decrease in the number of the site to which ThT is bound, not from the decrease in the fluorescence lifetime. (Collaboration with Prof. Miyoshi (Konan Univ.))

H-Ras forms clusters by binding to galectin-1 (hGal-1), which results in the activation of H-Ras. We have investigated the structural change of hGal-1 with binding to farnesyl thiosalicylic acid (FTS) that is a model of the interaction site of H-Ras. From the measurement of native PAGE, it is found that hGal-1 forms small-number aggregates in 300–800 μ M FTS and large-number aggregates in 800–1000 μ M FTS. This result indicates that hGal-1 exhibits the two-step formation of aggregates with FTS, which should be related with the formation of H-Ras clusters. The fluorescence lifetime of Trp in the carbohydrate binding pocket of hGal-1 increases with increasing concentration of FTS, and remains almost unchanged at a high concentration of 800–1000 μ M. This result is consistent with that of native PAGE, and it is considered that the interaction between the carbohydrate binding pockets is important for the formation of the small-number aggregates, and the carbohydrate binding pocket is not responsible for the formation of the large-number aggregates.

業績リスト

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

（原著論文(前年度の3月(成果報告書提出後)に投稿または掲載許可)）

1. Kamlesh Awasthi, Kazuhito Yamamoto, Kazunari Furuya, Takakazu Nakabayashi, Liming Li and Nobuhiro Ohta
Fluorescence Characteristics and Lifetime Images of Photosensitizers of Talaporfin Sodium and Sodium Pheophorbide a in Normal and Cancer Cells
Sensors **15**, 11417-11430 (2015)
2. Ryuichi Maeda, Hidenobu Yaku, Takakazu Nakabayashi, Takashi Murashima, Naoki Sugimoto, Nobuhiro Ohta and Daisuke Miyoshi
Fluorescence Characteristics and Lifetime Images of Photosensitizers of Talaporfin Sodium and Sodium Pheophorbide a in Normal and Cancer Cells
Telomere and Telomerase **2**, e691 (2015)

（招待・依頼講演）

1. Takakazu Nakabayashi, 2015 Tohoku University-Chungbuk National University-Sungkyunkwan University Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences December 2015, Suwon (Korea)
"Fluorescence Lifetime Imaging: Application to Intracellular Sensing"
2. 中林孝和, 森野 Discussion 2015 年 8 月, 東京
「分子科学の細胞内への展開」
3. 中林孝和, 第 10 回東北大学学際科学フロンティア研究所 FRIS セミナー
2015 年 8 月, 仙台
「蛍光寿命イメージングによる細胞内環境の理解」
4. 中林孝和, 新学術領域ナノメディシン分子科学公開シンポジウム 2015 年 7 月, 東京
「蛍光寿命イメージングによる細胞内環境測定」

（アウトリーチ活動）

1. 中林孝和, 仙台西ロータリークラブでの研究成果の特別講演 2015 年 11 月, 仙台
2. 中林孝和, サイエンスカフェ 2015 年 10 月, 仙台
「光のちからで生体を見る・測る・治療する ～光を用いた生命科学の最前線～」

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、細胞内において 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ことを目指し、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 のイメージングおよび定量解析法を応用して、細胞内 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ため、多数の mRNA のプローブ候補に対し、標的 mRNA との結合能の定量評価を行った。この結果、複数の優れた結合能を有するプローブを得るとともに、mRNA に対して高い親和性を有する配列の特徴を見出した。続いて、高親和性プローブを用いることで細胞質およびストレス顆粒内の内在性 mRNA の一分子イメージングに成功した。

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た。

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 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した。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 を一分子感度で可視化するには、高い親和性を有するアンチセンスプローブが必要である。まず、GAPDH mRNA を標的として、高親和性の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。デジタルマイクロミラーデバイス (DMD) と共焦点蛍光顕微鏡法を用い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、プローブと GAPDH mRNA との結合率を定量化した。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。また、以上の検討から、GAPDH mRNA や β -actin mRNA に高い結合率で標識できるアンチセンスプローブを複数獲得した。

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組んだ。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、明滅型蛍光色素により標識したアンチセンスプローブを用いた。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 (SPT) に応用した。SPT から得られた mRNA の運動性を時間-平均二乗変位 (MSD-t) プロットにより定量的に解析した結果、細胞質内の mRNA と比べて SG 内の mRNA は運動性が制限されていることが分かった。また、一部の mRNA は SG 内においても自由拡散ないし制限された領域を拡散していたことから、SG 内における mRNA は多様な動態を示すことを明らかにした。これらは mRNA の貯蔵や翻訳抑制、選別といった SG の多面的な機能を反映していると考察している。

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 their binding abilities 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 probes, reflecting the different affinity of various antisense probes. Based on the result of binding ratio of various antisense probes against GAPDH mRNA, we found a rule about the sequence of the target mRNA and binding affinity.

Next, we performed single-molecule imaging of endogenous GAPDH mRNA in COS7 cells using high-affinity antisense probes. By optimizing the blinking-fluorophore and imaging conditions, we were able to detect single-molecule mRNA in the cytoplasm and inside of stress granule (SG). Single particle tracking (SPT) of GAPDH mRNA allowed to analyze the mode of movements of mRNA in these compartments, which suggests that mRNA in SG show a variety of dynamics reflecting its diverse functions. These results indicated that our method will be a powerful tool for detailed observation of RNA metabolism in real time.

業績リスト

学術論文

1. Kazuki H, Naguro I, Okabe K, Funatsu T, and Ichijo H, ASK1 signaling regulates brown and beige adipocyte maturation, *Nature Communications*, in press.

総説・解説・成書

1. 岡部弘基 「蛍光性ポリマー温度センサー」 生体の科学 66 巻 2 号 pp. 163-168 (2015)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 活動（一般セミナー）：岡部弘基, 「生きた細胞内における温度のイメージング」, GE ヘルスケア・ジャパン, はじめてのライフサイエンス基礎講座, 蚕糸科学研究所 (新宿区), 2015 年 5 月 29 日.
2. 招待講演：岡部弘基, " Imaging and manipulation of temperature in living single cells", 広島大学核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理解点・拠点融合研究セミナー, 広島大学先端物質科学総合研究棟 (東広島市), 2015 年 7 月 24 日.
3. 招待講演：岡部弘基, " Imaging and manipulation of temperature in single live cells ", 第 20 回 NMMS セミナー, 東京工業大学 すずかけキャンパス B2 棟 (横浜市), 2015 年 7 月 30 日.
4. 招待講演：岡部弘基, 「細胞内温度の計測と操作による温度生物学」, 第 7 回 光イメージング若手の会「光塾」, 広島大学理学部 (東広島市), 2015 年 9 月 5 日.
5. 招待講演：岡部弘基, "Imaging and manipulation of intracellular temperature for thermal biology", 日本生物物理学会第 53 回年会, 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (金沢市) 2015 年 9 月 13 日.
6. 招待講演：岡部弘基, 「細胞内温度のイメージングと操作による温度生物学」, 日本機械学会 第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 東京工業大学 大岡山キャンパス (横浜市), 2016 年 1 月 9 日.

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、軸索内の空間的情報の伝搬と、微細構造の変化を介して領域に依存した伸長・退縮の違いを制御もたらす分子反応を解明する。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、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中心的に解析を行った。その結果、分岐軸索の退縮に、Arp2/3を介したアクチンの制御が関与する可能性を明らかにした。

2. 研究の背景と目的

神経細胞は局所的な再構築を行いながら、複雑に分岐した軸索パターンを構築・維持する。単一の神経細胞が局所的な軸索の安定性を如何に制御するかは明らかにされていない。本領域におけるこれまでの研究により、分岐軸索の各枝の微小管の違いにより、キネシンが選択的に分配されることで局所的な枝の安定性を制御する可能性を示した。そこで本研究課題では、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、退縮が抑制される機構を明らかにする。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、アクチン繊維、ミトコンドリアを想定した。前年度の研究により軸索分枝末端におけるK5H量とアクチン繊維量の間に時間空間的に正の相関があることを見出したため、キネシンの下流でアクチン繊維を介した構造安定化が起こると仮定し、その機序を解明する。

3. 成果

・ 内在的キネシンの分布と機能阻害

内在性キネシンの分布は結合分子に依存して制御されることが報告されている。これまでの研究では強制発現したキネシンモーター領域(K5H)の分布を解析してきた。小脳顆粒細胞の低密度培養を行い抗キネシン抗体による免疫細胞染色を行った結果、軸索分枝末端にシグナルが検出され、長い枝ほど信号が強い傾向が観察された。次にキネシンのカーゴ結合領域(K5T)を神経細胞内に発現させ、キネシンによる輸送を阻害した。その結果、軸索枝長の有意な減少が示された。この結果から軸索パターン維持における内

在型キネシンによる輸送が必要であることが示された。

- ・ アクチン阻害による軸索分枝の安定性の変化

これまでの解析で、軸索パターンニングにおけるキネシンモーター領域とアクチン繊維 (Lifeact) の同時観察を行い、両者の間に時間空間的に正の相関を見出した。アクチン繊維の機能とキネシンに依存した軸索安定性の因果関係を明らかにするため、アクチン脱重合阻害剤 Latrunculin A を培養神経細胞に投与し、タイムラプスイメージングにより軸索内の K5H の分布と各軸索分枝の退縮量を計測した。Latrunculin A の投与した軸索では K5H の少ない枝においても 伸長のみならず退縮も抑制される傾向が見られ (Control: 0.019 $\mu\text{m}/\text{min}$, Latrunculin A: 0.009 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.005$)、キネシンによる軸索内の不均一な分布はアクチンの機能制御を介して軸索パターンを制御することが示唆された。

- ・ 軸索分枝の退縮に関わるアクチン制御分子の解析

アクチン制御に関わる、Rac1, Pak1, LIMK1, Arp2/3 等の機能を解析し、軸索輸送とアクチン制御の関連を示すことでシステムの全体像を描出することを試みた (図 1)。前回までに、タイムラプスイメージングにより、Latrunculin A を投与した軸索では各枝の伸長・退縮がともに阻害されることを示した。軸索末端における主なアクチン制御には Rac1 を経て Pak1-LIMK1 と続く経路と WAVE-Arp2/3 と続く経路が報告されている。そこで、これら経路の阻害による影響を解析した。その結果、Pak1, LIMK1 の阻害においては伸長のみ抑えられ (IPA3: 0.005 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.001$, LIMKi3: 0.010 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.05$) 退縮は変化しないのに対し、Arp2/3 の阻害では Latrunculin A と同様に伸長・退縮 (ck666: 0.010 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.05$) が共に抑えられることが示された。これにより、K5H の低下した軸索分枝の退縮に Arp2/3 を介したアクチンの制御が関与する可能性が示唆された。

分岐軸索の各枝の安定性の違いがいかんして生じるのかは不明であった。本年度の成果により、キネシン-アクチン制御系の相互作用により成長円錐の機能制御を介して軸索分枝の退縮が制御されることが示唆された。輸送効率と構造因子との関連が示されたことで、本課題で対象とした分岐軸索において局所的構造を制御するシステムの全体像が示された。今後直接的な分子間相互左様などの解析から、より詳細な分子反応の進行機序が明らかになることが期待される。

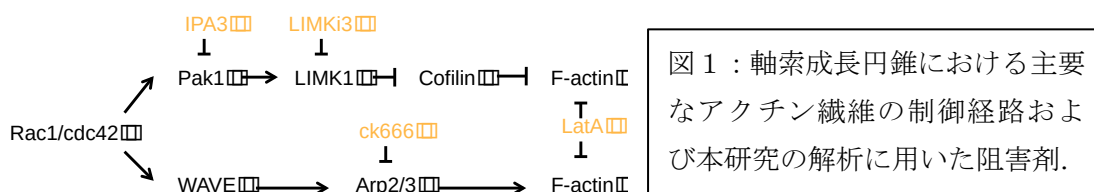


図 1 : 軸索成長円錐における主要なアクチン繊維の制御経路および本研究の解析に用いた阻害剤。

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 have found that K5H-GFP (cleaved kinesin head domain fused to GFP) accumulates into subsets of axonal branches. Furthermore, we found that retraction of axonal branches that have high K5H-GFP signal is significantly lower compared with retraction of branches that have lower K5H signal. In this year, we investigated the mechanisms by which kinesin transport inhibits axonal branch retraction.

To analyze the function of kinesin mediated transport in axonal branch patterning, a cleaved tail region of kinesin is expressed in cerebellar granule neurons. This region interact with cargos, thereby inhibits endogenous kinesin. We found axonal branch length is significantly lower compared with that in control neurons. We have shown last year that there is a positive correlation between K5H-GFP signal and F-actin signal in each axonal branch terminals. To test if F-actin turnover is involved in the axonal branch retraction, we pharmacologically inhibited F-actin turnover with latrunculin A. We found that latrunculin A application significantly inhibit axonal branch retraction (Control:0.019 um/min, Latrunculin A:0.009 um/min, $p < 0.005$). It has been reported PAK1-LIMK1-cofilin pathway as well as WAVE-Arp2/3 pathway play major roles controlling F-actin at axonal growth cone. Thus, we next investigated the roles of these pathways in axonal branch retraction. Inhibition of PAK1 and LIMK1 with application of IPA3 and LIMKi3 significantly inhibited growth of branches (IPA3: 0.005um/min, $p < 0.001$, LIMKi3: 0.010um/min, $p < 0.05$), but did not affect on the retraction. On the other hand, inhibition of Arp2/3 with ck666 significantly inhibited the retraction (ck666: 0.010um/min, $p < 0.05$).

These results suggest that Arp2/3 dependent F-actin regulation at axonal branch terminal is involved in the control of axonal branch retraction.

公募

業績リスト

学術論文

投稿中論文 2 件

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 招待講演：Konishi Y, Seno T, Kubota K, Sakae N, Takada H. 「The region specific control of branch stability in axonal arbors mediated by kinesin mediated transport」 9th International Symposium on Nanomedicine (2015)
2. 活動：小西慶幸 数学協働プログラム ワークショップ「細胞システムの理解と制御にむけた幾何学的方法の検討」
3. 招待講演：小西慶幸、池野龍輝、瀬野岳史、面谷耕佑、栗下雅行、栄成美、佐藤真、高田宗樹「微小管と軸索輸送の制御を介した軸索形態の維持システム」第 121 回 日本解剖学会総会・学術集会 (2016)

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

細胞内で機能する医薬は、自発的に細胞内に侵入するものでない限り、キャリアによって細胞内まで届ける必要がある。キャリアによって細胞内に医薬や生理活性物質を細胞内に導入する際にしばしば問題となるのが、導入した物質のエンドソーム内トラップである。この問題の解決策の1つに Photochemical internalization (PCI) 法がある。本研究では、PCI 法の機構の解明、および、PCI 法において利用可能な光応答コンジュゲートの設計指針について検討した。

2. 研究の背景と目的

Cell-penetrating peptide (CPP) に蛋白質や核酸等の積荷を結合させて細胞内に導入する方法では、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おこる。このことは CPP 以外の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も、よく問題になることである。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光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ことにした。また、光増感剤と蛋白質 (ペプチド) からなる光応答コンジュゲート設計指針の確立を目指し、光増感剤を付加する蛋白質 (ペプチド) 上の位置や近傍配列はどうすればいいかを検討した。

3. 成果

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 ($^1\text{O}_2$) 生成の度合と相関が高いことが示唆された。このことは $^1\text{O}_2$ クエンチャーの添加により RNA のエンドソーム脱出が抑制されたことから確認された。さらには $^1\text{O}_2$ の生成後、膜破壊までに何が起きているかを検討するため、 $^1\text{O}_2$ 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調べた。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、一重項酸素の短寿命の割には長い時間をかけてエンドソーム膜破壊が起こること、エンドソーム破壊までの間に pH 上昇がみられること、などを明らかにした (図 1) (Ohtsuki *et al*, Scientific Reports, 2015)。

また、効率よく PCI を起こす光応答コンジュゲートの設計指針についても検討した。光増感剤を付加する蛋白質 (ペプチド) 上の位置は CPP (N 末 Tat) と逆側 (C 末) の方がよかった。光増感剤の近傍配列として好ましい配列も分かってきた。

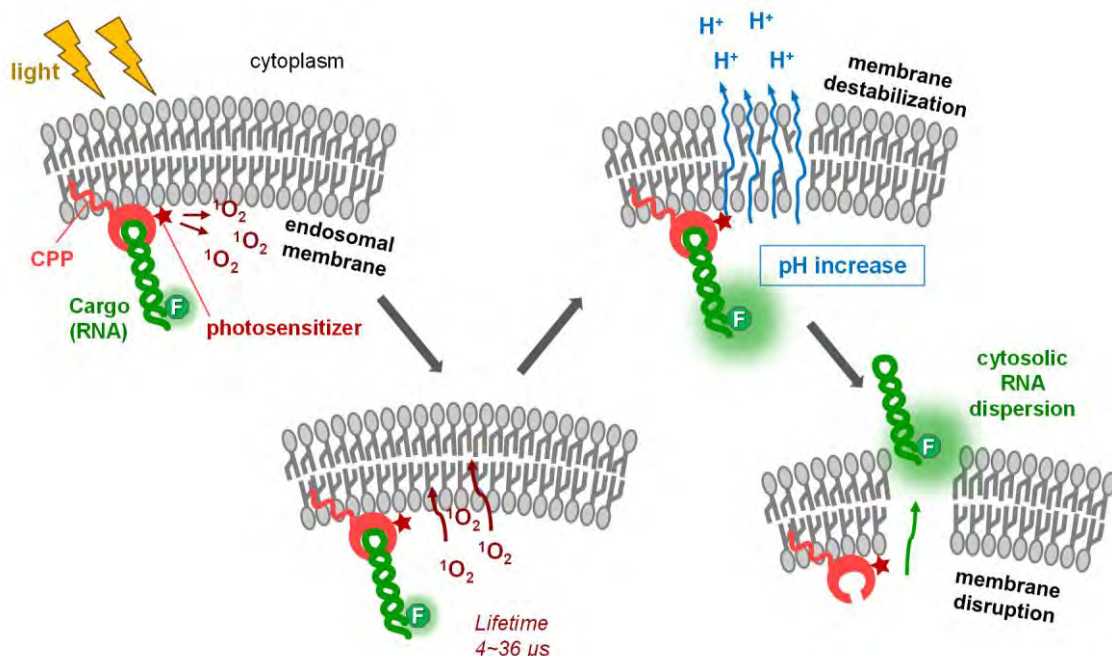


図 1. CPP-RNA-光増感剤コンジュゲートを用いたエンドソーム破壊機構

Mechanism of photochemical internalization using photosensitizing molecules

Takashi Ohtsuki

Department of Medical Bioengineering, Okayama University, Japan

The therapeutic efficacy of many drug delivery strategies is often limited by the inefficient transfer of cargo macromolecules such as proteins and nucleic acids to the cytosol consequential to their endosomal entrapment. One of the methods to overcome this problem is to use a photosensitizer and light to facilitate the endosomal escape of the macromolecules, termed photochemical internalization (PCI). It has been considered in this technique 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 and focus can be placed on the “photosensitizing reaction” of the photosensitizers.

In this study, we measured the photophysical properties of eight dyes (photosensitizer candidates) and determined the respective endosomal escape efficiencies using these dyes. Correlation plots between these factors indicated that the photogenerated $^1\text{O}_2$ molecules from photosensitizers were highly related to the endosomal escape efficiencies. The contribution of $^1\text{O}_2$ was confirmed using $^1\text{O}_2$ quenchers. In addition, time-lapse fluorescence imaging showed that the photoinduced endosomal escape occurred at a few seconds to a few minutes after irradiation (much longer than $^1\text{O}_2$ lifetime), and that the pH increased in the endosome prior to the endosomal escape of the macromolecule. We also found that several dipeptide sequences were better as linker sequences for the attachment of a photosensitizer to a peptide in a photosensitizing peptide molecule for PCI strategy.

業績リスト

学術論文

1. Ohtsuki, T., Miki, S., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Nakata, E., Hirakawa, K., Sumita, K., Watanabe, K., Okazaki, S. The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide-cargo-photosensitizer conjugates. Scientific Reports, 5, 18577 (2015)

総説・解説・成書

1. Watanabe, K., Ohtsuki, T., Photocontrolled intracellular RNA delivery using nanoparticles or carrier-photosensitizer conjugates. Nanotechnology Tools for the Study of RNA (Yoshizawa, S. eds) in a series Progress in Molecular Biology and Translational Science (Elsevier) Vol. 139, Chapter 4 (2016)
2. 大槻高史, 光化学的に細胞質内に侵入するペプチド分子の設計, 月刊 化学工業, 7月号(66巻) pp34-39 (2015)

その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 特許:PCT/JP2015/81352、大槻高史、松浦栄次、小渕浩嗣、赤星彰也、小関 英一「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」出願日 2015 年 11 月 6 日

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

本研究では、細胞死を1分子精度1細胞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、シトクロムcの1分子検出に成功した。さらに、超微量の1細胞内容物（ピコリットルレベル、 $pL = 10^{-12} L$ ）をハンドリングするために、フェムトリットル ($fL = 10^{-15} L$) レベルの流体を自在に制御する技術確立した。

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

我々が開発したシトクロム c の 1 分子計測チップは、ナノ流体チップに配置された百本のナノチャ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、ポアソン分布理論に基づき免疫検出法を利用して、1 分子計測チップ内の金ナノアレイに形成した自己組織単分子膜（SAM）において、標的分子のシトクロム c を 1 分子単位で捕獲する。1 分子計測チップ内でシトクロム c 用捕捉抗体を固定する為に、チオール基末端とカルボキシル基末端を合わせ持つ有機化合物を用いて SAM を形成させた。つまり、金表面とチオール基を化学結合させ、もう一方の末端であるカルボキシル基と抗体のアミノ基が結合することによって抗体を固定した。次に、SAM 表面に固定化した捕捉用抗体で、本研究の原理によって、シトクロム c を 1 分子単位で捕捉し、さらにビオチン修飾検出用抗体を結合させた。その後ビオチンとストレプトアビジンとの特異的な結合を利用して、ストレプトアビジン修飾量子ドット（QD）を検出用抗体と結合させ、蛍光イメージングでシトクロム c 由来の QD のドット状シグナルを観察できた。よって 1 分子計測チップを用いたシトクロム c の 1 分子検出に成功した。

このシトクロム c の 1 分子検出法をさらに 1 細胞内容物の網羅的な分析へ応用するには、1 細胞内容物（pL レベル）の体積よりもっと小さいフェムトリットルの流体を自在にハンドリングできる技術が必要である。しかしながら、ナノ流体チップを用いてピコリットル以下の流体を自在に制御するためには、ナノチャネル内に流体制御素子（即ちバルブ・弁）の構築を必要とするが、ナノチャネルが極めて小さくて閉じられた空間であるため、このような技術は確立されていなかった。以上の背景から、ナノチャネルに開閉自由な超微小バルブ（弁）の構築が求められていた。我々は、精密な分子構造を有するソフトマテリアルと独自に開発した超高精度ナノ集積化技術を使って、ナノチャネルに、外部温度の制御だけで開閉自由な超微小スマートバルブ（弁）を作製することに成功した。この超微小スマートバルブを利用することで、フェムトリットル（fL = 10^{-15} L）レベルの水を自在に制御することを世界で初めて実現した。この研究成果は、シトクロム c の 1 分子計測チップを用いた 1 細胞内容物の網羅的な分析に利用できるだけでなく、化学、バイオなどのプロセスに画期的な革新をもたらすと予想される。

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.

Last year, we achieved the fabrication of the nanofluidic chip for measurement of cytochrome c at the single molecular level last year. In the nanofluidic 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.

This year, we succeeded in the detection of single cytochrome c molecules by using the nanofluidic chip. A quantum dot-based immunoassay detection scheme was used in the detection. According to Poisson distribution, single cytochrome c molecules were captured on gold nanoarray surfaces immobilized with cytochrome c capture antibodies, in the nanofluidic chip. After the formation of the immunocomplexes of captured cytochrome c molecules/biotin-conjugated cytochrome c detection antibodies/quantum-dot conjugated streptavidin, the detection of dot-shaped signals of single quantum-dots representing captured single cytochrome c molecules was achieved by using a fluorescence microscope with an EM-CCD camera.

In addition, to handle lysate of a single cell during the further detection of cytochrome c in single cells, we made a breakthrough in the active regulation of femtoliter ($\text{fL} = 10^{-15} \text{ L}$) -scale fluids. Accurate, local assembly of nanobrushes of a well-tailored short-chain thermoresponsive polymer in nanofluidic channels is achieved, using a site-specific nano-in-nano patterning technique developed by us in combination with nanofluidics. The assembled polymer nanobrushes enable the active regulation of femtoliter-scale fluids inside nanofluidic channels, in response to an external temperature change.

公募

業績リスト

学術論文

1. Yan Xu, Misato Shinomiya, Atsushi Harada, Soft Matter-Regulated Active Nanovalves Locally Self-Assembled in Femtoliter Nanofluidic Channels, *Advanced Materials*, doi:10.1002/adma.201505132 (2016)
2. Yan Xu, Kazuma Mawatari, Tomohiro Konno, Takehiko Kitamori, Kazuhiko Ishihara, Spontaneous Packaging and Hypothermic Storage of Mammalian Cells with a Cell-Membrane-Mimetic Polymer Hydrogel in a Microchip, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7**, 23089-23097 (2015).
3. Yan Xu, Qian Wu, Yuji Shimatani, Koji Yamaguchi, Regeneration of Glass Nanofluidic Chips through a Multiple-Step Sequential Thermochemical Decomposition Process at High Temperatures, *Lab on a Chip*, **15**, 3856-3861 (2015). (Featured on the back cover)
4. Yan Xu, Nobuhiro Matsumoto, Flexible and In-Situ Fabrication of Nanochannels with High Aspect Ratios and Nanopillar Arrays in Fused Silica Substrates Utilizing Focused Ion Beam, *RSC Advances*, **5**, 50638-50643 (2015).

総説・解説・成書

1. 許岩 「リン脂質ポリマーハイドロゲルを用いた On-Chip 細胞保存」 色素協会誌 in press (2016)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 報道：朝日新聞 「超微量の水、制御できるバルブ 大阪府立大が開発」 2016 年 3 月 3 日
2. 報道：マイナビチューデント 「大阪府立大学 世界初、水を一兆分の 1ml の微小単位で自在に制御する技術を開発」 2016 年 1 月 25 日
3. 報道：OPTRONICS ONLINE 「府大、一兆分の 1ml の水を制御する技術を開発」 2016 年 1 月 22 日
4. 報道：マイナビニュース 「大阪府立大、ナノ流体チップで 1 兆分の 1ml の水を自在に制御できる技術を開発」 2016 年 1 月 21 日
5. プレスリリース：大阪府立大学 「世界初、一兆分の 1ml の微小単位の水を自在に制御する技術を開発」 2016 年 1 月 21 日
6. 受賞：許岩 「大阪府立大学平成 27 年度学長顕彰」 2015 年 8 月 12 日
7. 招待講演：許岩 The 5th International Conference on Optofluidics 2015 「Site-specific working inside nanofluidic channels: general methodology, critical techniques, and nanobio applications」 (2015) .
8. 招待講演：許岩 The 2nd FZU-OPU Joint International Symposium on Photocatalysis, Phot-functional Materials and Nano-Science & Technology 「Site-specific working inside nanofluidic channels: general methodology, critical techniques, and nanobio applications」 (2015).
9. 招待講演：許岩 CAS Lecture Series for the 100th Anniversary of the Birth of Lu Jiaxi 「Nanobio interfaces innovation enabling nanofluidics: general methodology, critical techniques, and nanobio applications」 (2015).
10. 招待講演：許岩 科学技術振興機構次世代科学者育成プログラム「未来の博士」育成ラボの H27 年度開講式 「マイクロ化学チップのお話し：髪の毛ほどの太さの流路を使って化学をする」 (2015).

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：東海大学工学部応用化学科 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課題となり、これらを解決するイメージング技術のソフト開発が急がれている。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、新しいイメージングツールとしての応用を目指す。実際、生体組織用の撥水性超薄膜を用いて生体組織をラッピングする手法を確立し、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・保定を実現できた。また、生分解性超薄膜を用いて浮遊細胞ラッピングにも成功した。

2. 研究の背景と目的

高分子を膜厚 100 nm 以下の超薄膜に加工すると、ナノ厚特有の柔軟性と高い接着性が発現する^[1]。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(生体組織等)に貼付できるユニークな性質がうまれる。他方、生体組織をイメージングする際、ガラス基板に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ときのぶれが課題となる。血球を代表とする浮遊細胞では、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。

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、新しいイメージングツールとしての応用を図る(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で浮遊細胞を基板にラッピングして固定する手法を検討する。

[1] Okamura, Y. et al. *Adv. Mater.* **21**, 4388 (2009).

(a) 生体組織用ナノラッピング



(b) 浮遊細胞用ナノラッピング

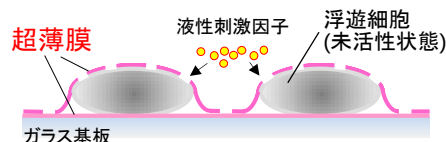


Fig. 1 本研究構想 (生体組織や浮遊細胞を「ナノラッピング」するためのイメージングツールとして応用)

3. 成果

3.1. 生体組織用ナノラッピング

SiO₂ 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, 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状態で超薄膜を回収できた(Fig. 3a)。得られた撥水性超薄膜の水接触角は $111 \pm 1^\circ$ と計測され、その表面は確かに撥水性であった(Fig. 3b)。また、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(ca. 20-800 nm)できることを確認した。

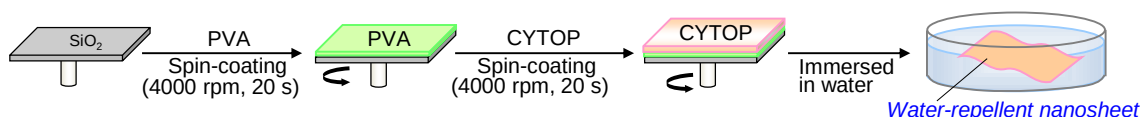


Fig. 2 撥水性超薄膜の調製法

アルギン酸ゲルを恒温恒湿下で静置したところ、約 10 時間後には完全に乾燥した。そこで、撥水性超薄膜でゲルをラッピングしたところ、膜厚の上昇と共にゲルの乾燥を抑制でき、保水効果が見られた。生体組織(脾臓等)でも同様に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。

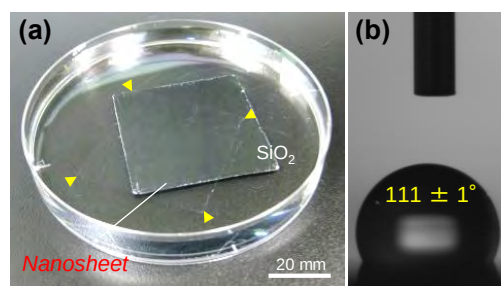


Fig. 3 (a) 水面に浮遊する撥水性超薄膜。(b) 撥水性超薄膜の水接触角。

蛍光標識ラテックスビーズ($1 \mu\text{m}\phi$)を内包したアルギン酸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し、ゲルが移動することを確認した。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。膜厚 250 nm 以上ではわずかに移動した。これは超薄膜の接着性に起因するものと考えられる。従って、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。

3.2. 浮遊細胞用ナノラッピング

SiO_2 基板上に PVA 水溶液、ポリ乳酸溶液(10 mg/mL)の順にスピコートした。基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲層が溶解してポリ乳酸超薄膜が回収できた。この時、膜厚は約 60 nm であった。次いで、ポリ乳酸超薄膜を用いて血球系浮遊細胞のラッピングを試みた。ガラス基板に浮遊細胞の分散液を 10 - 50 μL 滴下し顕微鏡にてライブイメージングしたところ、ブラウン運動によって焦点が定まらないことを確認した。そこで、ガラス基板上に滴下した浮遊細胞を金属棒にすくい取った超薄膜を用いてラッピングしたところ、ぶれずにイメージングできることを実証した。現在、液性刺激因子の透過を可能とするために、浮遊細胞は通過しない程度の貫通孔を有する超薄膜を調製し、刺激反応をライブイメージングしている。

Fabrication of Ultra-thin Films for Bio-imaging Tools of Floating Cells

Yosuke Okamura*

* *Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University, Japan*

We have developed free-standing ultra-thin films (so-called nanosheets) composed of biodegradable and biocompatible polymers for biomedical applications ^[1]. Such nanosheets have a thickness of less than 100 nm and exhibit unique characterizations such as high adhesiveness, flexibility and a high degree of transparency ^[1]. On the other hand, tissues and floating cells during imaging are often put on a glass substrate, to which physiological buffer is added to avoid drying. However, tissues and floating cells are dried during observation and it is difficult to be come into focus due to moving them into buffer. In this study, we develop the nanosheets for bio-imaging tools of tissues and floating cells to provide water retentivity and fixation on the substrate.

For tissue imaging, we fabricated a water-repellent nanosheet composed of fluorine-containing polymer (CYTOP, Asahi Glass Co., Ltd.). An aqueous solution of 10 mg/mL poly(vinyl alcohol) (PVA) as a water-soluble sacrificial layer was spin-coated for 20 s at 4,000 rpm onto a silicon wafer (SiO₂ substrate, typical size: 40 × 40 mm). The PVA-coated substrate was then spin-coated with CYTOP solution using the same procedure. When the substrate was immersed into water, the water-repellent nanosheet was detached from the substrate by dissolving only the PVA layer into water. The thickness was proportional to the concentration of CYTOP from ca. 20 nm to ca. 800 nm, which exhibited the water-repellent property (water-contact angle: $111 \pm 1^\circ$). When alginate hydrogels as a model were incubated on the glass substrate for 24 h (25°C, RH: 50%), they were dried within 10 hours. However, the hydrogels wrapped with the water-repellent nanosheets were significantly prevented the evaporation of the water. Moreover, we demonstrated that the nanosheets were also prevented the drying of the mouse organs and firmly fixed on the substrate due to the high adhesiveness of the nanosheets. The water-repellent nanosheets therefore would be a helpful tissue-imaging tool to provide water retentivity and fixation.

For imaging of floating cells, we tested whether nanosheet wrapping works or not. To this end, biocompatible nanosheets composed of poly(lactic acid) (thickness: ca. 60 nm) were fabricated using the same procedures as shown above. When the floating cells were observed on the glass substrate, they were moved and blurred by the Brownian motion. However, the cells wrapped with the nanosheets were immobilized between the substrate. We will try to wrapping of cells by using porous nanosheets to be stimulated them.

[1] Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* **21**, 4388 (2009).

業績リスト

学術論文

該当なし

総説・解説・成書

1. 岡村 陽介*. 生分解性高分子からなる超薄膜の医用展開. 化学工業 **67** (3), 48-54 (2016).
2. 岡村 陽介*. 生体組織や浮遊細胞を超薄膜でラッピング固定し可視化する. ナノメディシンの分子科学トピックス分担執筆 (2016) 印刷中.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

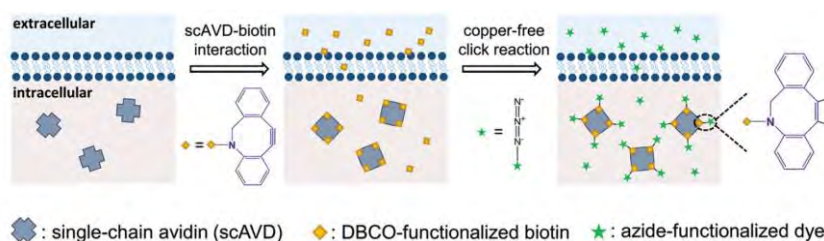
1. 学会発表・受賞: Yosuke Okamura*, Takuya Komachi, Ami Masuda, Shinji Takeoka, and Yu Nagase. Fabrication of Bio-friendly Nanosheets for Biomedical Applications. The 5th Asian Biomaterials Congress (Taipei, 2015.5.8.) (Best Young Investigator Poster Award 受賞)
2. 招待講演: 岡村 陽介*. 生分解性超薄膜(ナノシート)の創製と新規医用材料への応用展開. 第 19 回 NMMS セミナー (東京大学, 2015.5.12.)
3. 招待講演: 岡村 陽介*. ナノ厚に加工した高分子超薄膜の不思議 ～新規医用材料への挑戦～. 日本接着学会粘着研究会 5 月度例会 (東京大学, 2015.5.15.)
4. 学会発表: 岡村 陽介*, 増田 愛美, 奥山 一生, 保科 貴宏, 幸谷 愛, 長瀬 裕. 生体組織イメージング用撥水性超薄膜の創製 ～保水・保定を実現するナノラッピング～. 第 64 回高分子学会年次大会 (札幌コンベンションセンター, 2015.5.27.)
5. 招待講演: 岡村 陽介*. 高分子超薄膜の開発とユニークな特性を利用した医療領域への応用展開. 第 351 回ゴム技術フォーラム月例会 (日本ゴム協会東部ビル, 2015.9.10.)
6. 学会発表: Yosuke Okamura*, Ami Masuda, Riku Saito, and Hong Zhang. Water-repellent ultra-thin films to protect from drying and blurring for tissue imaging. The 3rd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (The University of Tokyo, 2015.11.25.)
7. 学会発表: Yosuke Okamura*, Ami Masuda, Kazuki Okuyama, Ai Kotani, and Yu Nagase. Fabrication of water-repellent nanosheets to provide abilities of water retentivity and fixation for tissue imaging. PACIFICHEM2015 (Hawaii Convention Center, 2015.12.15.)
8. 学会発表: Yosuke Okamura*, Ami Masuda, Riku Saito, and Hong Zhang. Nano-wrapping of water-repellent nanosheets for tissue imaging. The 7th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (Kyoto University, 2016.1.21.)
9. 招待講演: 岡村 陽介*. マテリアルの厚みで組織接着性を制御する ～高分子超薄膜の創製と医用展開～. 日本接着学会生体材料接着研究会 (東京医科歯科大学, 2016.2.1.)

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、提案していたボトムアップ型ナノセンサーの開発に成功した（図、論文1）。特に「環境」パラメータとして「温度」を扱う研究では、動物個体での温度イメージングを指向した蛍光ナノ粒子型の温度センサーの開発（論文2）も行い、また一細胞温度計測において、計算と実験との間にある5桁のギャップを説明した（論文3）。開発した細胞内温度センサーを用いてナノ粒子が神経細胞内に生じる温度分布を計測する実験が発展的に展開し、ピエゾ特性を持つナノ粒子と超音波を組合わせて神経細胞を非接触に刺激する手法を提案することができた（論文4）。局所温度勾配が細胞に与える影響をさらに調べたところ、球状の細胞（論文5）および神経細胞（論文6）の新しい応答を見いだした。



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、これまでにない精度で測ることが可能となる。

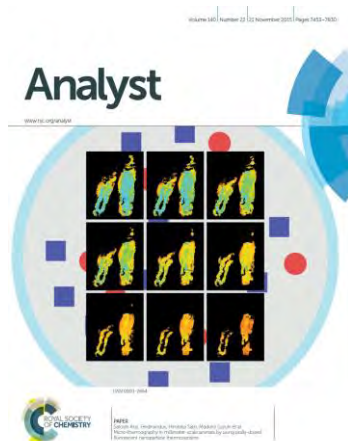
3. 成果

特定の場所で一粒子イメージングできる高輝度ナノセンサーを細胞内で作る方法

タンパク質一分子の計測から細胞の活動を定量化することを目ざし、細胞内クリック反応を経て四個の蛍光色素が単一鎖アビジンに結合したナノセンサーを作成する、ボトムアップな方法を提案した(論文1)。一つの蛍光ナノセンサーの時空間分解能は、使用した光学顕微鏡の条件下では約 1Hz のときおよそ 10 nm だった。細胞内の任意の部位の局所的な環境を、標的一分子のレベルで計測する基盤技術を提供すると期待される。

蛍光ナノ粒子型温度計の経口投与による微小動物のマイクロサーモグラフィ

動物個体における一細胞温度計測を目ざして、蛍光ナノ粒子型の温度計をショウジョウバエの幼虫へ経口投与し、モデル生物に限らず微小な個体で体内温度をマッピングする手法を提案した(図、論文2、Inside front cover として採用)。



一細胞温度計測における計算と実験との間の矛盾と、その解決案

単一細胞からの熱産生について、計算値と計測値との間にある 5 桁のギャップは、計算の前提条件に見直しが必要であること、またそれにより解決できる可能性を説明した(論文3)。

ピエゾナノ粒子を利用した神経細胞の非接触刺激

ピエゾ特性を持つナノ粒子を超音波刺激することで、神経様細胞の電位依存性チャネルタンパク質を直接活性化し、 Ca^{2+} および Na^{2+} 流入が引き起こせることを示した(論文4)。

局所熱励起へ即座に応答して細胞の形が変わる

局所温度勾配下で、球状の細胞が熱源に向かって bleb を伸展させること(論文5)、およびラット神経海馬細胞では神経突起が熱源へ向けて高速で伸長することを見だし(論文6)、いずれもその分子基盤として、アクチン系が応答の主要な役割を果たすことを明らかにした。大山廣太郎博士(A01 班、早稲田大)との共同研究。

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 2015, we successfully developed the method to fabricate targeted nanosensors for single-molecule imaging by a bottom-up approach [1]. Here the intracellular probes were created by conjugating four organic dyes with single-chain avidin proteins *via* a click reaction. The position of single probes could be determined with the accuracy of about 10 nm at 1 Hz. We demonstrated that the nanoprobe showed increased brightness and photostability, both of which contributed the successful single molecule imaging under conventional fluorescence microscope. By targeting ER with Cy5-probe, we tracked the remodeling processes of ER at nm spatial resolution. ER-targeted TAMRA-probes enabled the imaging of the temperature distribution on ER under externally applied local heating. The development of thermosensors was further extended to the achievement of a novel microthermography method inside small living organisms [2, inside front cover]. Regarding the temperature measurement, we proposed the way to bridge the 10^5 gap between calculation and measurement in single-cell thermometry [3]. The project has been extended to the development of piezoelectric nanoparticle-assisted wireless stimulation of neuronal cells when we tested our nanothermometers to map the intracellular temperature distribution under external heating [4]. We further investigated other cellular responses to local heating. In spherical cells, the plasma membrane extended towards the heat source upon heating [5]. The high-speed neurite elongation towards the heat source was found in neurites of rat hippocampal neuronal cells [6]. We revealed that the actomyosin interaction played major roles in both of these responses.

業績リスト

学術論文

1. Hou, Y., Arai, S., Kitaguchi, T. and Suzuki, M. Intracellular bottom-up generation of targeted nanosensors for single-molecule imaging, *Nanoscale*, **8**, 3218-3225 (2016)
2. Arai, S., Ferdinandus, Takeoka, S., Ishiwata, S., Sato, H.* and Suzuki, M.* Micro-thermography in millimeter-scale animals by orally-dosed fluorescent nanoparticle thermosensors, *Analyst*, **140**, 7534-7539 (2015) (Inside front cover)
3. Suzuki, M.,* Zeeb, V., Arai, S., Oyama, K. and Ishiwata, S.* The 10^5 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry, *Nat. Methods*, **12**, 802-803 (2015)
4. Marino, A.,* Arai, S., Hou, Y., Sinibaldi, E., Pellegrino, M., Chang, Y.-T., Mazzolai, B., Mattoli, V., Suzuki, M.* and Ciofani, G.* Piezoelectric nanoparticle-assisted wireless neuronal stimulation, *ACS Nano*, **9(7)**, 7678-7689 (2015)
5. Oyama, K.,* Arai, T., Isaka, A., Sekiguchi, T., Itoh, H., Seto, Y., Miyazaki, M., Itabashi, T., Ohki, T., Suzuki, M.* and Ishiwata, S.* Directional bleb formation in spherical cells under temperature gradient, *Biophys. J.*, **109(2)**, 355-364 (2015)
6. Oyama, K.,* Zeeb, V., Kawamura, Y., Arai, T., Gotoh, M., Itoh, H., Itabashi, T., Suzuki, M.* and Ishiwata, S.* Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater, *Sci. Rep.*, **5**, 16611 (2015)

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 Single-cell thermal perturbation and site-specific thermal imaging. The 9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015), Mie, Japan, December 10-12, 2015
2. 招待講演：鈴木 団 Single-cell temperature sensing by fluorescence intensity- and FLIM-based methods IMB-Olympus Advanced Microscopy Workshop 2015, Singapore, Singapore, November 17-20, 2015

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

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、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パラメータを明らかにする。また、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。先進治療にむけた細胞膜微小環境での生体分子動態の理解と、ナノ医療に伴う細胞毒性・治療効果の分子科学を構築し、将来的な医療イノベーションに向けた礎を構築する。

2. 研究の背景と目的

細胞の皮膚と例えられる細胞膜は、厚さ 6-10nm の脂質二重膜からなる自己組織化分子膜であり、酸素や水分子などは透過するが、電解質や高分子は透過できない半透膜としての性質を有する。細胞膜の破壊は、細胞内外でのイオン分配の解消や、それにとともなう膜電位の脱分極、ATP などエネルギー分子の細胞外漏出を引き起こし、細胞の持つ生命エネルギーを失わせる。一方で、近年の細胞工学では、遺伝子治療など細胞質に機能性分子を送達する需要が増しており、細胞膜透過ペプチドなどを始めとして、安全かつ高効率に細胞膜を透過するキャリア分子の開発が進められている。機能性キャリア分子の細胞膜透過機構を明らかにするためには高感度な細胞膜障害測定法の開発が必須の要件である。そこで、本研究ではイオン応答性電界効果トランジスタ (ISFET) 上に直接播種した細胞の脂質二重膜の状態をリアルタイム非侵襲に測定する方法を新たに開発した。本手法は、化合物の作用によって細胞膜上に形成された水素イオンなどの低分子量電解質が透過できる分子サイズの空孔を計測するという、これまでに無い新しい原理に基づく細胞膜障害性測定法である。

3. 成果

細胞膜障害性を有する化合物を細胞に作用させると、 NH_3 に加えて NH_4^+ と H^+ も透過するようになり、一時的な pH 変化は減少することが明らかとなった (図)。ピークの減少率をパラメータとして、カチオン性・アニオン性・非イオン性・両イオン性の 12 種類の化合物を作用させた際の膜障害性を計測した。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 ($r=0.88$) が得られ、ISFET - 細胞によるリアルタイム・非標識な膜障害性の定量化が可能であることが明らかとなった。さらに、本システムでは NH_4^+ と H^+ などサイズの小さい (流体力学半径 $<0.33 \text{ nm}$) イオンの細胞膜透過を指標にしていることから、溶血試験におけるヘモグロビン (流体力学半径 $>3.1 \text{ nm}$) の透過が観察できないような微小な空孔形成をも検出することが可能であった。

細胞膜に障害性が発現する時間は細胞毒性の作用機序によって変化することから、膜障害性が発現するまで時間を測定することにより細胞毒性機構を区別できる。実際、遺伝毒性を有する Tween®20 を細胞に作用させたところ、1 時間後から徐々に細胞膜障害が発現することを見出した。一方、遺伝毒性を持たない類似体 Tween®80 では、2 時間後も膜障害性が見られなかった。これらのシグナルはアポトーシス指標である Caspase-3 の発現量と一致した。これらの結果は、従来法のエンドポイントアッセイにはできなかった細胞毒性パスイの識別を行えることを示唆している。

細胞膜透過性ペプチド (TAT, R8) や細胞膜透過性リン脂質ポリマー (PMB30W) を作用させると、細胞膜は一時的にイオン透過性が亢進したことから、キャリア分子が細胞膜を透過する際に一時的に空孔が形成されていることが明らかとなった。こうしたわずかな細胞膜の乱れは従来の細胞膜障害性測定法では検出できない微小なものであり、水素イオンを指標とした ISFET 測定法によって初めて検出可能となった。

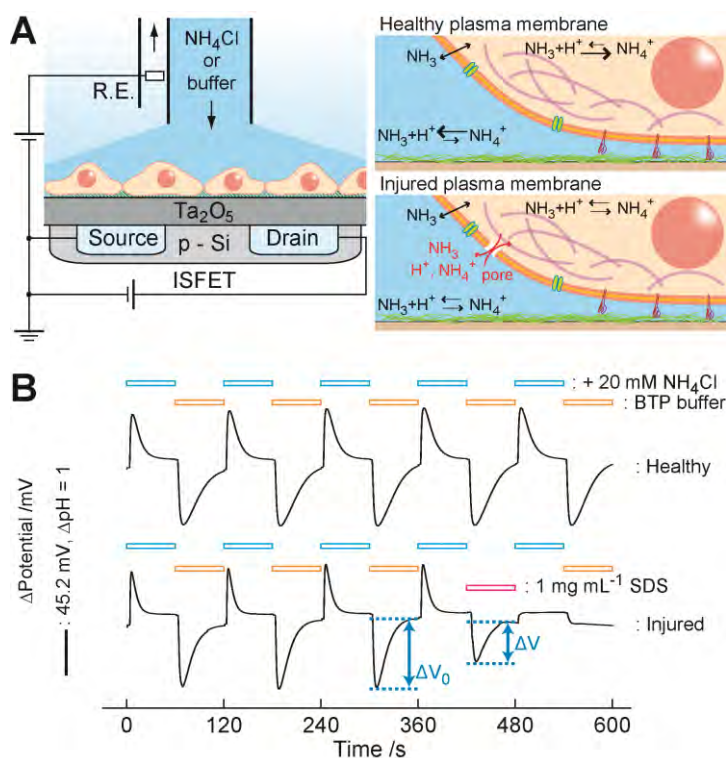


図. 細胞/ISFET 測定系。(A) ゲート絶縁膜上に培養した細胞近傍の緩衝液を、 NH_4Cl を含む緩衝液に瞬時に交換すると、 NH_3 の細胞膜受動拡散とアンモニア平衡反応により、過渡的に細胞外 pH が変動する。界面活性剤により細胞膜に空孔が形成されると、 NH_4^+ と H^+ も同時に細胞膜を拡散するため、過渡的な細胞外 pH 変動が減衰する。(B) NH_4Cl 含有・非含有溶液の交換にともなう細胞/ゲート絶縁膜界面の経時的 pH 変動。細胞に界面活性剤 SDS を作用させると、溶液交換時の過渡的な pH 変動量 (ΔV) が減少する。

Evaluation of nanoscaled cytotoxicity on plasma membranes using ion-sensitive field-effect transistors

Tatsuro Goda

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

The plasma membranes (PMs) are extremely thin (6–10 nm), stable, and semi-permeable film that protect the cytosolic element from the extracellular space by blocking free diffusion of ions, charged molecules, and macromolecules. External stimuli/reagents occasionally disrupt the PM barrier by making transmembrane pores, leading to acute cytotoxicity as a result of uncontrolled diffusion of mobile ions, charged species, and biomolecules through the pores. Therefore, the PM toxicity and hemolysis are widely and routinely evaluated in biological and biomedical fields. Traditional assays measure the release of biomarker proteins or fluorescence from the cytosol through the pores across the PM in colorimetric manners. Despite the recent development of a variety of methods/materials for efficient gene/drug delivery systems to the cytosol, the hemolysis, membrane-toxicity, and cytotoxicity assays remain unchanged over 30 years, while leaving major issues for nanotoxicology testing; 1. The biomarker of interest cannot detect the pores whose size is smaller than itself, which makes it difficult to evaluate the true safety of recent nanoscale materials. 2. The fluorescent/biomolecular indicators often result in false-positive by passively permeating the plasma membrane due to the altered hydrophobic/hydrophilic balance of the PM as a result of the interaction with exogenous agents.

We discovered the generation of transient proton when we added a weak acid or base to the solution surrounding cells cultured on a solid surface in a stepped manner. The stepped addition of NH_4Cl or CH_3COONa induced pH transients in the local cell microenvironment as a result of free diffusion of neutral NH_3 or CH_3COOH across the PM and the proton sponge effect of the weak acid/base. Further, this phenomenon was applied to the development of a distinctly new system for detecting minute disorders of PMs in live mammalian cells. The system measures transient proton generated by free diffusion of low-molecular-weight electrolytes (H^+ and NH_4^+) through the pores in real time. These ions are ultimately small (hydrodynamic radii of ≤ 0.33 nm) so that they are sensitive even to the formation of molecularly sized pores which was otherwise not possible using conventional hemolysis because of the relatively large in size of hemoglobin (hydrodynamic radius > 3.1 nm) as an indicator. The relatively fast mass transport of these molecules effectively ruled out the activity of inherently expressed ion pumps on the plasma membrane. Silicon-based pH-sensitive transistors were used for signal transduction of protons at the cell/gate insulator interspace so that the complementary metal oxide semiconductor (CMOS)-compatible fabrication technique is straightforward to downsizing, mass production, and multi-parallelization in the application of screening toxicants.

業績リスト

学術論文

1. Tatsuro Goda, Yuji Miyahara, Engineered zwitterionic phosphorylcholine monolayers for elucidating multivalent binding kinetics of c-reactive protein, *Acta Biomaterialia*, in press (2016).
2. Tatsuro Goda, Eriko Yamada, Yurika Katayama, Miyuki Tabata, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Potentiometric responses of ion-selective microelectrode with bovine serum albumin adsorption, *Biosensors and Bioelectronics*, **77**, 208-214 (2016).
3. Tatsuro Goda, Masahiro Toya, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) bearing phosphorylcholine groups for metal-free, antibody-free, and low-impedance biosensors specific for C-reactive protein, *ACS Applied Materials and Interfaces*, **7(49)**, 27440-27448 (2015).
4. Tatsuro Goda, Daiki Higashi, Akira Matsumoto, Toru Hoshi, Takashi Sawaguchi, Yuji Miyahara, Dual aptamer-immobilized surfaces for improved affinity through multiple target binding in potentiometric thrombin biosensing, *Biosensors and Bioelectronics*, **73**, 174-180 (2015).
5. Tatsuro Goda, Specific interaction of phospholipid polymer with C-reactive protein, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, **28(5)**, 715-718 (2015).

総説・解説・成書

1. 合田達郎、宮原裕二 バイオトランジスタによる生体分子計測、【監修】植田充美、ヘルステクを支えるバイオ計測、シーエムシー出版 4.11, in press (2016).
2. Tatsuro Goda, Miyuki Tabata, Yuji Miyahara, Electrical and Electrochemical Monitoring of Nucleic Acid Amplification, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **3**, 29 (2015).
3. Tatsuro Goda, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, Critical Update on 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC) Polymer Science, *Journal of Applied Polymer Science* **132**, 41766 (2015).

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 招待講演：Goda T., Miyahara Y, Organic bioelectronics create ionic microenvironments mimicking inflammation and infection for elucidating activation dynamics of C-reactive protein, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Hawaii, USA, December 15-20 (2015)
2. 招待講演：Goda T., Plasma membrane-mimicked polymers for biosensing and bioengineering, 14th Pacific Polymer Conference, Hawaii, USA, December 9-13 (2015)
3. 招待講演：合田達郎, アプタマートランジスタによるバイオセンシング, 第 25 回日本 MRS 年次大会, 横浜市開港記念会館, 2015 年 12 月 8-10 日
4. 招待講演：Goda T., MPC as a synthetic ligand in C-reactive protein biosensing, 2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials (ICBZM 2015), University of Washington, Seattle, USA, Aug 13-14 (2015)
5. 招待講演：Goda T., Specific interaction of phospholipid polymer with C-reactive protein, The 32nd International Conference on Photopolymer Science and Technology, Makuhari, Chiba, Japan, Jun 24 (2015)
6. 活動：合田達郎 第 17 回次世代医工学研究会 「細胞トランジスタによるナノ細胞膜障害性のリアルタイム評価」 7 月 30-31 日 (2015)

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、近年生細胞における 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。前年度は Cy3 を複数分子導入したインステムモレキュラービーコン (ISMB) を用いた細胞内イメージングについて検討を行った。今年度はステム構造を必要としない新たな Cy3 導入プローブについて開発を行った。

2. 研究の背景と目的

細胞内における様々な RNA の動態 (局在性・発現量) は細胞分裂や分化の過程において重要な役割を担っていることが近年明らかになりつつある。そのため、細胞内において RNA を可視化するプローブが求められている。このようなプローブにモレキュラービーコン (MB) があるが、従来の MB は末端に色素が結合されていたために、バックグラウンド発光による偽陽性が大きな問題となっていた。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。このプローブは従来型 MB と比べてバックグラウンド発光が小さいという利点がある。そこで、本研究ではこれらのプローブを更に改良することによって超高感度な核酸検出プローブを開発し、実際に細胞内イメージングへ展開することを目指す。昨年度は Cy3 を複

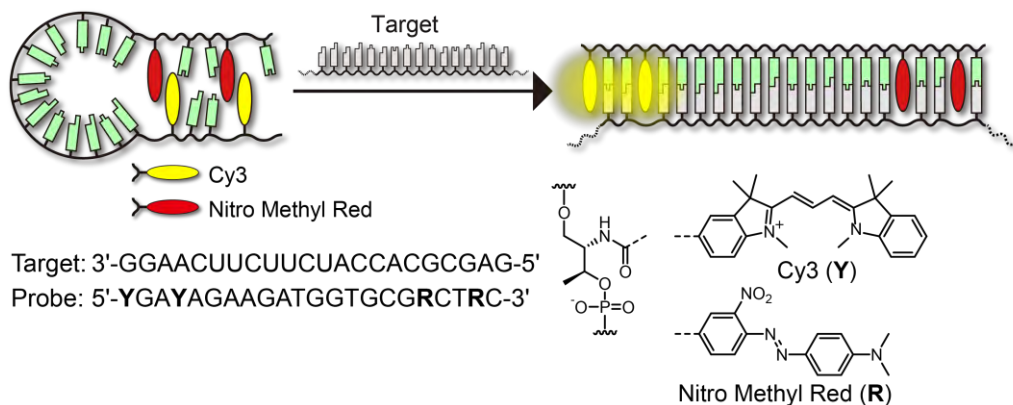


図1. Cy3 導入リニアプローブの模式図

公募

数導入した ISMB を開発し、高感度に RNA を検出可能であることを明らかにした。本年度は Cy3 と消光剤との自発的な会合を利用することによってステム構造不要なリニアプローブの開発を行った。

3. 成果

これまでに Cy3 複数導入 ISMB の開発に成功しているが、ターゲット結合時にステム構造の解離を必要とするため応答速度の低下を招く恐れがあった。そこで本研究ではステム構造をもたないリニアプローブの開発を行った。図1に設計を示す。DNA 鎖中に Cy3 を2分子導入し、消光剤として Nitro Methyl Red を2分子導入した。これまでの結果から Cy3 の発光を Nitro methyl Red が効率的に消光することが分かっている。またこれらの色素は安定な会合体を形成するために、自己相補的配列を導入しなくても発光が消光されると考えられる(図1左)。それに対して相補的な RNA 存在下では色素間相互作用が抑制されることによって発光が観察されることを期待した(図1右)。

実際に蛍光スペクトルを測定した結果を図2に示す。ターゲット非存在下では Cy3 の発光はほとんど観察されなかった。紫外可視吸収スペクトル測定の結果、Cy3 と Nitro Methyl Red が会合体を形成していることが明らかとなった。それに対し、相補的な標的 RNA を添加したところ非常に強い Cy3 による発光が観察された。このことは RNA と二重鎖を形成することによって色素間の相互作用が抑制されたことを示している。その結果、シグナルバックグラウンド (S/B) 比は 180 と非常に高感度であることが分かった。ターゲットに対する応答速度を従来の MB と比較したところ、合成したリニアプローブの方が10倍程度レスポンスが早いことが分かった。以上のように Cy3 と消光剤の安定な会合体形成を利用することによってステム構造不要なリニアプローブを開発することに成功した。

領域内共同研究として徳島大学の小暮健太郎先生と ISMB を用いた細胞内物質輸送評価について検討を進めており共著の論文が採択された。また、その他にもいくつかの領域内共同研究を進めている。

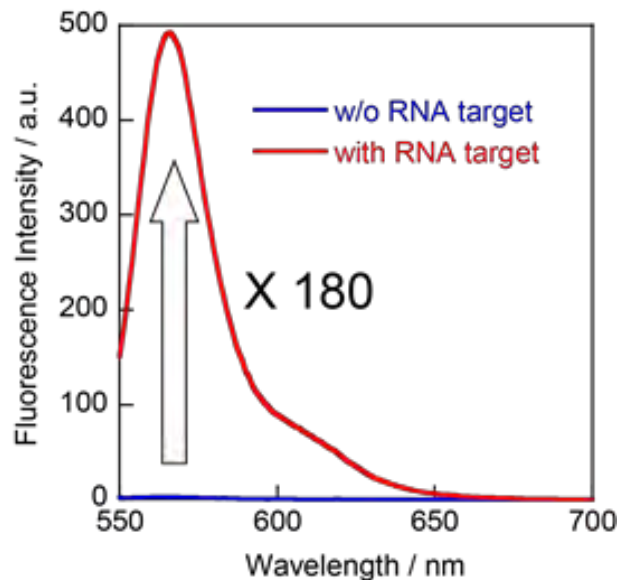


図2. Cy3 導入リニアプローブによる標的 RNA 検出結果

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 a linear probe without a stem-loop structure, which detected a target RNA with high sensitivity.

We selected Nitro Methyl Red as a quencher since it quenches Cy3 emission efficiently. In addition, incorporation of a pair between Cy3 and Nitro Methyl Red into a DNA duplex strongly stabilized the duplex. Therefore, we synthesized a probe DNA tethering two Cy3 residues and two Nitro Methyl Red residues. In the absence of the target, almost no emission of Cy3 was observed although the probe has no self-complementary sequence. UV-VIS spectrum indicated that Cy3 and Nitro Methyl Red formed a cluster. In contrast, Cy3 emission recovered upon the addition of target RNA because the interaction between dyes was suppressed. As a result, signal to background ratio (S/B ratio) of this probe was as high as 180. Interestingly, a probe tethering Cy3 and anthraquinone did not show such a high S/B ratio, indicating that a complex between these dyes are not sufficiently stable. Emission from this probe immediately increased upon the addition of the target RNA, indicating response speed of this probe was higher than conventional molecular beacons. From these results, a linear probe for efficient detection of RNA was successfully developed by using the spontaneous clustering between Cy3 and Nitro Methyl Red.

公募

業績リスト

学術論文（領域内共同研究）

1. Mahdi Hasan, Akinori Nishimoto, Takashi Ohgita, Susumu Hama, Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma and Kentaro Kogure Faint electric treatment-induced rapid endosomal escape for efficient delivery of functional macromolecules into the cytoplasm *J. Control Release* ***in press***.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

受賞（1件）

1. 榎田啓 「核酸アナログを用いた機能性超分子材料の創製」 平成 26 年度高分子研究奨励賞 2015 年 5 月

招待講演（2件）

1. Hiromu Kashida “Orientation-dependent FRET system for structural analyses of nucleic acids” (Invited) NMMS セミナー, 2015 年 7 月, 東京工業大学
2. Hiromu Kashida “Development of a robust FRET system for structural analyses of DNA duplexes” (Invited) BIT's 6th World Gene Convention-2015, 2015 年 11 月, China

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

我々が見出した蛍光色素誘導体が水溶液中で自己集合したナノプローブは、血清含有培地および細胞内などの環境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することが明らかとなっている。本研究では、このナノプローブ内に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を評価することを目的とする。

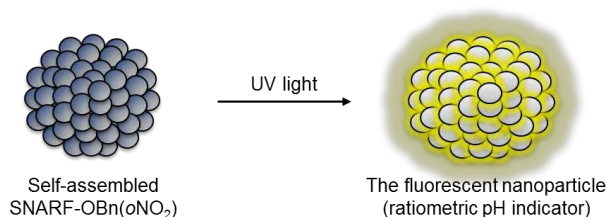
2. 研究の背景と目的

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、酵素との反応をトリガーとして分散し、蛍光強度や色調の変化を示すナノプローブの開発に成功している。^[1,3] 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した誘導体が、水溶液中で100 nm程度の自己集合体を形成することに起因する。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

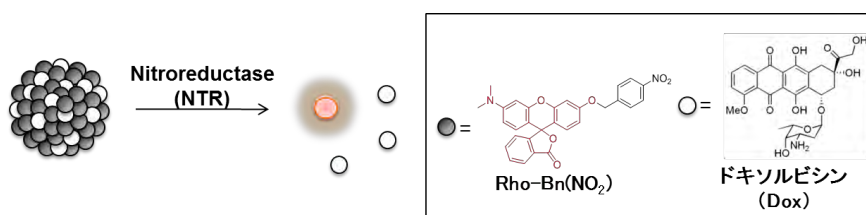
(その1) 光刺激で活性化されるpH応答性蛍光ナノプローブの開発

以前の成果である構造活性相関を基として、集合状態を形成すると予測された光分解性保護基を導入した自己集合型ナノプローブの詳細を検討した。光分解性保護基は、特定の波長の光によって脱保護することができる。実際の自己集合型ナノプローブは、光照射前には自己集合体を形成しており、無蛍光でありながら、光照射をおこなうことで蛍光性を回復し、pH プローブとして利用できるものの、自己集合状態を維持していることが明らかとなった。この細胞内での利用を検討し、細胞内への導入のプロセスの検討や、細胞内においても pH 応答能を試験管内と同様に示すことが確認され、光刺激をトリガーとする pH 応答性蛍光ナノプローブとして利用できることが明らかとなった。



(その2) 光刺激で活性化される pH 応答性蛍光ナノプローブの開発

自己集合型ナノプローブのナノキャリアとしての利用に関して検討した。自己集合型ナノプローブとしては、これまでに応答性等を改良してきた **Rho-Bn(NO₂)**を採用し、様々な薬剤の内包能を検討した。評価した薬剤のうち、ドキソルビシン(Dox)は、ゲルろ過クロマトグラフィーで、**Rho-Bn(NO₂)**の自己集合体と同一フラクションにおいて、Dox 由来の蛍光が確認され、**Rho-Bn(NO₂)**の自己集合体内に Dox が内包されていることが示唆された。**Rho-Bn(NO₂)**には、ニトリリダクターゼ(NTR)応答性が付与されているため、NTR による Rho 由来蛍光の回復により自己集合体の分散過程が評価可能である。実際に NTR で処理したところ、顕著な Rho 由来蛍光の回復と、Dox 由来の蛍光の存在が確認され、**Rho-Bn(NO₂)**自己集合体に内包された Dox が NTR の存在により、放出されたことが示唆された。



(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、京都大学 岩田 博夫と教授・有馬 祐介助教の領域内共同研究。

[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.^[1] 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.^[2] We hypothesized that the fluorescent nano probes could be applied as the enzyme responsible nano-carrier.

To demonstrate the versatility of the self-assembled nanoprobe as the enzyme responsible nano-carrier, the intensional property of doxorubicin (Dox), as an example of drug, in self-assembled nanoprobe were confirmed. The nitroreductase (NTR) responsible nanoprobe Rho-Bn(NO₂) was selected as the candidate of nano-carrier. After treatment of NTR, the Dox were released from nano-carrier with the increment of the fluorescence from disassembled fluorophore. The result indicated the self-assembled nano-probe could be applied as the NTR responsible nano-carrier.

As the another results, a self-assembled fluorescent cluster comprising a seminaphthorhodafluor (SNARF) derivative protected by a photoremovable *o*-nitrobenzyl group were designed and demonstrated as a dual-emissive ratiometric fluorescent pH probe in cell cultures. 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). e) E. Nakata, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 327 (2015). [2] E. Nakata, et al., *RSC Adv.*, **4**, 348 (2014).

業績リスト

学術論文

1. Takashi Ohtsuki, Shunya Miki, Shouhei Kobayashi, Tokuko Haraguchi, **Eiji Nakata**, Kazutaka Hirakawa, Kensuke Sumita, Kazunori Watanabe Shigetoshi Okazaki
“The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide cargophotosensitizer conjugates”
Scientific Reports, 2015, 5, 18577.

※岡山大学大槻先生との共著論文

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**, 2015. 08.18, ISAMR, Taiwan
“The rational design strategy for latent ratiometric fluorescent pH probe”
2. **Eiji Nakata**, 2016. 01.22, 7th Japan-taiwan nanomedicine symposium, Japan
“The rational design of latent ratiometric fluorescent pH probes based on self-assembled SNARF derivatives”

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：徳島大学大学院医歯薬学研究部 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、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、微弱電流によって細胞膜電位が変化し、外来物質がエンドサイトーシスで取り込まれること、さらにエンドソームから細胞質に外来物質が漏出することを見出している。2015 年度は、共同研究による機能性核酸の細胞質送達メカニズムを解析し、微弱電流処理直後から細胞質に外来核酸が素早く漏出することを見出した。さらに、病因遺伝子レジスチンの発現制御により脂肪細胞の脂肪蓄積抑制に成功した。

2. 研究の背景と目的

我々はこれまでに、イオントフォoresis（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機能性核酸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 In-stem molecular beacon (ISMB) の細胞質送達の詳細な解析を行うとともに、新規機能性核酸 iRed の細胞質送達と病因遺伝子の発現制御を検討した。

3. 成果

微弱電流処理によるエンドサイトーシスを解析するため、蛍光標識 siRNA の細胞取り込みに対する各種エンドサイトーシス阻害剤の影響を検討した。その結果、低温処理 (4℃)、およびマクロピノサイトーシス阻害剤やカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤によって強力に抑制されたことから、微弱電流による細胞取り込みは、マクロピノサイトーシスのようなエンドサイトーシス経路であることが確かめられた。さらに、電位依存性非特異的カチオンチャネルである TRP チャネルの阻害剤 SKF96356 によって細胞取り込みが有意に抑制された。これらのことから、微弱電流処理によってカチオンチャネルを介してカチオンが流入し、細胞内シグナル経路が活性化されることでエンドサイトーシスが誘起され、細胞外物質が取り込まれることが推察された。さらに、取り込まれた物質の細胞内挙動を解析するため、名古屋大・樫田准教授の開発した ISMB を用いて検討を行った。ルシフェラーゼ安定発現細胞に対して、微弱電流処理時にルシフェラーゼに対する ISMB を共存させたところ、全細胞の細胞質に蛍光を認めたことから (図1)、微弱電流による細胞質送達、均質に対象細胞の細胞質に外来物質を送達可能であることが明らかとなった。さらに、微弱電流処理時および直後からの蛍光発生を検討したところ、微弱電流処理直後から全細胞の細胞質で蛍光が観察された。このことから、微弱電流処理で生じるエンドソームは、極めてルーズな構造をしており、内容物が漏出しやすいことが推察された。これらのことから、微弱電流処理は、均質に素早く機能性核酸等を細胞質に送達できることが明らかとなった。そこで、疾患治療を指向した新規機能性核酸として徳島大・南川教授の開発した iRed と微弱電流を組合せることを検討した。iRed は、最小構成要素からなる shRNA 発現ベクターであり、4' チオ核酸を用いることで自然免疫誘起を回避できる特性を有している。そこで、ルシフェラーゼに対する iRed 存在下で細胞を微弱電流処理したところ、抑制活性は観察されなかった。リポフェクトアミン (LFN) を対照として蛍光標識 siRNA の細胞内取り込みを調べたところ、カチオン性 LFN/siRNA 複合体よりも、微弱電流処理による取り込みが数倍高い結果となり、細胞内には多くの核酸が取り込まれていることが明らかとなった。ISMB の分子量は 10,000 程度だが、iRed は 200,000 以上あることから、分子量がエンドソーム漏出に影響していると考え、異なる分子量の蛍光標識デキストラン (10,000 と 70,000) のエンドソーム漏出を検討した。その結果、微弱電流処理 24 時間後において、デキストラン 10,000 は細胞質漏出が確認されたが、デキストラン 70,000 はエンドソーム内にあり、微弱電流によるエンドソーム漏出は分子量で制限されることが示唆された。そこで、iRed とエンドソーム脱出促進試薬クロロキン共存下で微弱電流処理したところ、LFN/iRed 複合体よりも著しく高い遺伝子発現抑制活性が確認された。このシステムを用い病態関連遺伝子レジスチンに対する iRed とクロロキン共存下で脂肪細胞を微弱電流処理したところ、脂肪細胞分化に伴う脂肪蓄積が有意に抑制され、微弱電流と iRed を組み合わせることで病因遺伝子の発現制御が可能であることが示唆された。

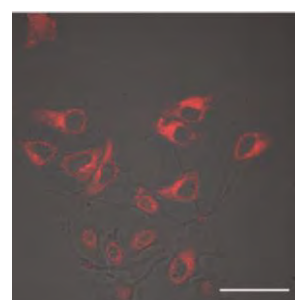


図1. 細胞質に送達された ISMB 蛍光観察像 (処理後 1 時間) 白バーは 50 μm

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

Kentaro Kogure

Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

Effective delivery of extraneous molecules into the cytoplasm of the target cells is important for several drug therapies. Previously, we showed effective *in vivo* transdermal delivery of naked siRNA into skin cells induced by faint electric treatment (fET) iontophoresis, and significant suppression of target mRNA levels (Kigasawa et al., *Int. J. Pharm.*, 2010). This result indicates that electricity promoted the delivery of siRNA into cytoplasm. In the present study, we analyzed the intracellular delivery of naked anti-luciferase siRNA by fET, and found that the luciferase activity of cells expressing luciferase was reduced by *in vitro* fET like *in vivo* iontophoresis. Cellular uptake of fluorescent-label siRNA was increased by fET, while low temperature exposure, inhibitors of macropinocytosis and caveolae-mediated endocytosis significantly prevented siRNA uptake. These results indicate that the cellular uptake mechanism involved endocytosis. In addition, the transient receptor potential channel inhibitor SKF96365 reduced siRNA uptake. Moreover, to analyze cytoplasmic delivery, we used in-stem molecular beacon (ISMB), which fluoresces upon binding to target mRNA in the cytoplasm. Surprisingly, cytoplasmic ISMB fluorescence appeared rapidly and homogeneously after fET, indicating that cytoplasmic delivery is markedly enhanced by fET.

Intelligent shRNA expression device (iRed) contains the minimum essential components needed for shRNA production in cells, and could be a novel tool to regulate target genes (Tarashima et al., *Mol. Ther. Nucl. Acid* 2015). However, general delivery carriers consisting of cationic polymers/lipids could impede function of a newly generated shRNA via electrostatic interaction in the cytoplasm. Thus, we examined fET of cells stably expressing luciferase in the presence of iRed encoding anti-luciferase shRNA. Transfection of lipofectamine 2000 (LFN)/iRed lipoplexes showed an RNAi effect, but fET-mediated iRed transfection did not, likely because of the endosomal localization of iRed after delivery. However, fET in the presence of lysosomotropic agent chloroquine significantly improved the RNAi effect of iRed/fET to levels that were higher those for the LFN/iRed lipoplexes. Furthermore, the amount of lipid droplets in adipocytes significantly decreased following fET with iRed against resistin in the presence of chloroquine. Thus, iRed could be a useful tool to regulate target genes following fET-mediated cytoplasmic delivery with endosomal escape devices.

業績リスト

学術論文

1. Mahadi Hasan, Akinori Nishimoto, Takashi Ohgita, Susumu Hama, Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma and Kentaro Kogure Faint electric treatment-induced rapid and efficient delivery of extraneous hydrophilic molecules into the cytoplasm J. Control. Release in press

総説・解説・成書

1. 小暮健太郎、濱 進、梶本和昭 「イオントフォoresisによる機能成分の皮内浸透メカニズム」 Cosmetic Stage 10, 1-6 (2015)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 招待講演：Kogure K. 「Noninvasive and effective transdermal delivery of macromolecular medicines by faint electric treatment」 32nd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences held by the Chulalongkorn University Faculty of Pharmaceutical Sciences (Bangkok, Thailand) 2016年3月10日

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

細胞はその表面形態によって複雑な生体環境下の中での的確に分子や他の細胞を認識し、細胞種特有の機能を発揮する。そのため細胞を利用することにより、生体内での高選択的な物質輸送が可能になると考えられる。本研究では、細胞の最表面を形成する糖鎖を改変することにより、薬剤や他の機能分子を修飾すること試みた。糖鎖の生合成経路を経て糖鎖末端のシアル酸残基にメタクリロイル基を誘導した。この非天然糖鎖を利用して、合成高分子、タンパク質、核酸アプタマーなどを細胞の表面に修飾することに成功した。本技術は、細胞を担体とした薬物輸送や免疫系を亢進するための有効な手段として期待できる。

2. 研究の背景と目的

厚生労働省の統計にもあるように我が国の死因の一位は悪性新生物、すなわち癌であり、現在は3人に1人が癌で死亡し、その割合は年々増加している。そのため癌制圧に向けた新たな治療法の確立が望まれている。癌治療において最も基本的かつ効果的な処置法は外科的に癌組織を摘出する方法であり、癌のできた部位や進行度に応じて放射線療法や化学療法を併用しながら治療が進められる。手術手技の工夫や器具の創出、また新薬の開発によって高い治療効果が認められているが、手術にともなう侵襲や薬剤の副作用、また、局所的な外科的手術では体内に拡散した癌を壊滅できないことなど、克服すべき課題も残されている。このような背景から、近年、免疫細胞を用いた癌治療が注目を集めている。免疫細胞治療は自己の細胞を用いる全身療法であり、副作用を伴わず、採血と点滴による治療のため患者の負担を軽減できる。その一方で、生体内には免疫原性の低い癌細胞が存在することや癌細胞が免疫細胞の活性化を抑制することなど癌免疫が自己の体内で機能し難いことも明らかとなっている。そこで我々は、免疫細胞治療をより効果的にするために癌細胞と選択的に結合する分子を免疫細胞の表面に修飾することを検討し、高効率に癌細胞を捕捉することを試みた。

3. 成果

癌細胞の表面に過剰発現している protein tyrosine kinase 7 (PTK-7) に対して特異的に結合する核酸アプタマー(sgc8)を免疫細胞の表面に修飾した。N-アセチルマンノサン(ManNAc)の類縁体によるシアル酸の改変技術に倣い、メタクリロイル基をもつ ManNAc 誘導体、N-メタクリロイルマンノサミン(ManM, 図1)を合成した。所定濃度の ManM を含む培地でマウスマクロフ

アージ(RAW264.7)を24時間培養し, RAW264.7 細胞の表面にメタクリロイル基を誘導した. 引き続き, 末端をチオール化した sgc8(sgc8-SH)と光ラジカル誘導剤(Eosin-Y)を添加し, 可視光線を10分間照射した. 細胞を血清培地で洗浄し, 以降の実験に用いた. RAW264.7の表面に修飾した sgc8 を Alexa Fluor 488 でラベル化された相補鎖を作用させることにより確認した. フローサイトメーターによる解析結果を図 2 に示す. ManM 処理した RAW264.7 細胞(ManM(+))の蛍光強度が処理していない細胞(ManM(-))やネイティブの細胞の蛍光強度に比べ顕著に高く, ManM(+)の表面に sgc8 が修飾されていることを確認した. ManM 処理からアプタマー修飾に至るまで RAW264.7 に対する毒性は認められず, ネイティブの細胞と同等の増殖活性と食食活性を有していた. 続いて, PTK-7 を過剰発現しているヒト白血病細胞(CCRF-CEM)を穏やかに振盪しながら 30 分間接触させた. 結果を図 3 に示す. ネイティブの細胞や ManM(-)の表面にはほとんど CCRF-CEM 細胞が認められないのに対し, ManM(+)には多くの CCRF-CEM 細胞が粘着していることが認められた. 一部の粘着した CCRF-CEM 細胞が RAW264.7 細胞に食食されることも認められた. さらに, sgc8-SH 修飾後に CCRF-CEM 細胞を 30 分接着させた RAW264.7 細胞から産生された炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ を定量したところ, ManM(+)では $\text{TNF-}\alpha$ 産生量が有意に高まり, CCRF-CEM 細胞と接着した ManM(+)の活性亢進がもたらされていることが明らかとなった.

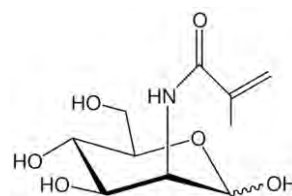


図 1 ManM の構造

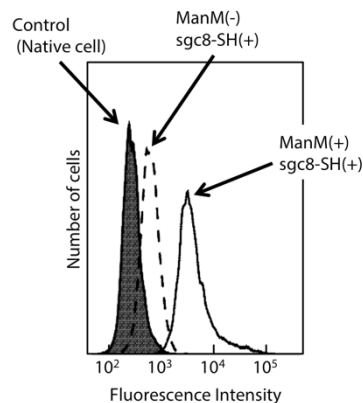


図 2 sgc8 に対する蛍光修飾相補鎖を作用させた RAW264.7 細胞の蛍光強度

糖代謝による細胞表面改質技術は細胞の生存率や機能を低下させることなく, 糖鎖をもつ全ての動物細胞の表面操作を可能にする. 細胞は人工のマテリアルでは到底再現できない高度な表面構造をもち, それにより複雑な要素が混在する生体内環境下で個々の役割を適切に果たしている. すなわち, 細胞の構造や機能を理解し, それを利用することにより, 生体内での物質輸送や細胞が担う生体反応の制御が可能になる. 細胞資源の開拓と拡充が進められている現在において, 細胞操作技術は新たな治療技術を創出する切り札になり得ると期待される.

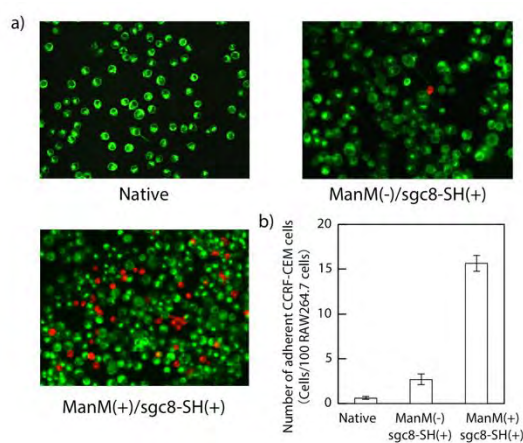


図 3 RAW264.7 細胞 (緑) に CCRF-CEM 細胞 (赤) を 30 分間接触させた後の蛍光顕微鏡像 (a) と接着数 (b)

Molecular transport system emerged from cell surface engineering

Yasuhiko Iwasaki

Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, Japan

Metastasis is the dominant trigger of cancer death. Cancer cells that have broken away from the primary tumor, termed circulating tumor cells (CTCs), are the main components of metastasis. Therefore, a system to eliminate CTCs from the metastatic routes is required for the reduction of metastatic cancer. In the present study, surface modification of macrophages with nucleic acid aptamers, so-called “eat-you” motifs, which can bind to membrane proteins of cancer cells, was performed to capture cancer cells. In order to immobilize nucleic acid aptamers on the living cell surface, synthetic reactive groups were metabolically delivered to the macrophages. The metabolic labelling process of sialic acid is robust for the surface engineering of living cells because this process can be applied for various mammalian cells. Recently, we synthesised a methacryloyl-modified *N*-Acetyl mannosamine (ManNAc) analogue, termed *N*-methacryloyl mannosamine (ManM), and succeeded in delivering methacryloyl groups to sialic acid residues of mammalian cells.

Murine macrophage-like cells (RAW264.7) were used as a model for macrophages. In order to deliver methacryloyl groups onto the carbohydrates of RAW267.4 cells, the cells were incubated with ManM. Sgc8, has affinity for PTK7, which is overexpressed on the cancer cell (CCRF-CEM) surface. Thiol-terminated nucleic acid aptamer (Sgc8-SH) was immobilized by a visible light-assisted thiol–ene reaction. Eosin Y (EY) was used as a photosensitizer because it is excited in visible light. Sgc8-immobilized on RAW267.4 cells were confirmed by treatment with the complementary Alexa Fluor 488 C₅-immobilized DNA. The surface modification did not show any adverse effect on the viability and phagocytic activity of RAW264.7 cells. CCRF-CEM cell capture by RAW264.7 cells was significantly induced by the nucleic acid aptamer immobilization on RAW264.7 cells. Nucleic acid aptamers can be freely designed for targeting specific cells, proteins or other biosubstances. Therefore, various ‘eat-you’ motifs could be immobilized on macrophages thorough the bio-orthogonal process established. This process would induce programmed cell removal and be a useful technology for the elimination of CTCs and other pathogenic factors.

業績リスト

学術論文

1. Junya Yoshimoto, Arunee Sangsuwan, Issey Osaka, Kazuko Yamashita, Yasuhiko Iwasaki, Mitsuru Inada, Ryuichi Arakawa and Hideya Kawasaki Optical properties of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-protected Au₄ nanoclusters and their fluorescence sensing of C-reactive protein *J. Phys. Chem. C* **119**, 14319-14325 (2015)
2. Rui Moriyama, Yasuhiko Iwasaki and Daisuke Miyoshi Stabilization of DNA Structures with Poly(ethylene sodium phosphate) *J. Phys. Chem. B* **119**, 11969-11977 (2015)
3. Shunsuke Sugimoto, Rui Moriyama, Takeshi Mori and Yasuhiko Iwasaki *Chem. Commun.* **51**, 17428-17430 (2015)
4. Arunee Sangsuwan, Hideya Kawasaki and Yasuhiko Iwasaki Thiolated-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine protected silver nanoparticles as novel photo-induced cell-killing agents *Colloids Surf., B* **140**, 128-134 (2016)

総説・解説・成書

1. 岩崎泰彦 「細胞表面の改質技術」 高分子 (2015)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Invited lecture: Yasuhiko Iwasaki 「Design of mammalian cell-mediated biomaterials」 International Biomaterials Symposium at Clemson University (2015).
2. Invited lecture: Yasuhiko Iwasaki 「Photo irradiation-assisted preparation of biointeractive PC surfaces」 ICBZM 2015 (2015).
3. Invited lecture: Yasuhiko Iwasaki 「Control of selectin-mediated cell adhesion on glycoprotein-conjugated matrices」 Pacificchem 2015 (2015)
4. 受賞：第 64 回高分子学会年次大会 優秀ポスター賞
発表者：杉本 駿介, 森山 塁, 森 健, 岩崎 泰彦
5. 関西地区大学合同研究発表会の開催 場所：じばさんビル（姫路）
共催：新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」・「元素ブロック高分子材料の創出」
「生物多様性を規範とする革新的材料技術」・「ソフトインターフェイスの分子科学」

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

生体分子の機能に影響を及ぼす因子の一つに、周辺の分子環境がある。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に対し、生化学的な実験が行われる試験管内環境は分子濃度が極めて希薄である。そのため、試験管内での実験結果をもとにして、細胞での生体分子の物性を解明することが困難であることが明らかになりつつある。そこで本研究では、①細胞核の化学環境を模倣するために、領域内の共同研究者が設計した負電荷高分子を用いて核内に高濃度に存在するゲノムを模倣した。また、②細胞質を化学模倣するために、細胞質に数百 mM から数 M 程度も存在する浸透圧調節分子を用いて細胞を化学模倣した実験系を構築した。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。③さらにこれらの知見をもとにして、四重らせん構造リガンドを細胞内で放出するシステムを構築した。

2. 研究の背景と目的

薬剤のリード化合物やイメージングに使われるプローブ分子などを試験管内で開発しても、細胞で臨みの機能を発揮しないことがある。その要因に、生体分子の構造や機能などの分子物性、さらには、標的生体分子と開発した機能分子間の相互作用が、周辺の分子環境によって大きく変化することがある。そのため、細胞内の生体分子反応を解明するためには、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定量化することが有用である。本研究では、①細胞核内に大量に存在するゲノムを化学模倣するために、アニオン性高分子を用いて分子クラウディングを誘起し、その環境での核酸構造の熱力学的安定性を解析することを試みた。②また、細胞質を化学模倣するために、細胞質に大量に存在する浸透圧調節分子を用いて分子クラウディングを誘起した。その環境で、核酸構造の熱力学的安定性を評価することを試みた。③さらに、このようなシステムを活用することで、細胞内でも機能する分子システムの構築も試みた。

3. 成果

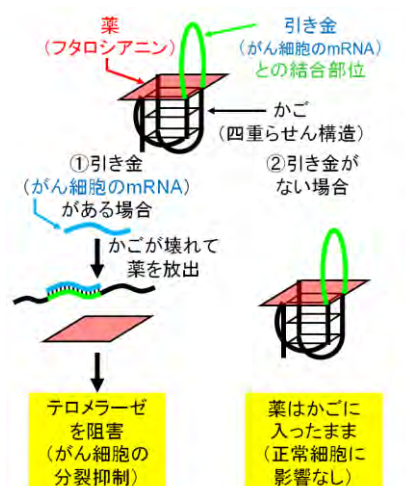
①リン酸ナトリウムを主鎖骨格にもつ高分子を用いた細胞核内環境の化学模倣(関西大岩崎先生との共同研究)：細胞核内では、DNA そのものが分子クラウディングを誘起し

ている。このような環境を化学模倣するためには、負電荷のリン酸を主鎖骨格にもつ高分子が必要である。本研究では、 $\text{PEP} \cdot \text{Na}$ {Poly(ethylene sodium phosphate)}を用いた。また、二重らせん構造、三重らせん構造、四重らせん構造を形成する DNA 鎖を設計し、その構造安定性に及ぼす $\text{PEP} \cdot \text{Na}$ の効果を定量化した。その結果、すべての DNA の構造が、 $\text{PEP} \cdot \text{Na}$ によって安定化した。特に、核酸の非標準構造である、三重らせん構造と四重らせん構造の安定化が顕著であった。さらに、塩濃度や高分子の濃度を系統的に変化させた結果、高分子が低濃度の場合、対イオン濃縮効果によって核酸構造を安定化することが示された。さらに中濃度領域では、これに加えて排除体積効果が観測された。高濃度領域においては、水分子の活量低下に伴う核酸の水和環境の変化が重要であることが示された。これらの成果は、当該雑誌の表紙として掲載された。



②浸透圧調節分子を用いた細胞質内環境の化学模倣（東工大丸山先生との共同研究）：細胞質内に大量に存在する浸透圧調節分子である尿素は生体分子の変性剤である。そのため尿素の変性効果を打ち消す分子が必要である。このような役割を果たすのが TMAO（トリメチルアミン-N-オキシド）である。そこで本研究では、核酸の標準構造である二重らせんと、非標準構造である四重らせんに対する、TMAO と尿素の効果を定量化した。その結果、尿素は両方の核酸構造を不安定化することが示された。TMAO は、四重らせん構造を顕著に安定化した。一方、二重らせん構造は、低濃度の TMAO によって安定化され、高濃度の TMAO では不安定化した。TMAO がもつトリメチルアミン基を含む低分子化合物は、二重らせん構造に対して同様の効果を及ぼすことも示された。このことから、TMAO に含まれるトリメチルアミン基が、二重らせん構造のグループに結合することが示唆された。細胞外部からの刺激によって、浸透圧調節分子の濃度が大きく変化することから、このような機構によって核酸の構造変化が引き起こされ、遺伝子発現などの制御が行われている可能性が示唆された。

③がん細胞特異的 mRNA に応答してテロメラーゼ阻害剤を放出するシステムの構築：細胞内でも四重らせん構造に対する親和性と特異性を保持するリガンド（フタロシアニン）と四重らせん構造を形成する DNA を用いて、がん細胞で高発現する mRNA に応答してリガンドを放出するシステムを構築した。このシステムを用いることで、がん細胞特異的にテロメラーゼ活性を阻害できる可能性が示された。これらの成果は、新聞紙面で紹介された。



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

Daisuke Miyoshi

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

Molecular crowding is one of the most distinguishing features between *in vitro* and *in vivo*. The molecular conditions inside living cells is highly crowded with large and small biomolecules. The large biomolecules includes protein, nucleic acids, saccharides, and lipids. The osmolytes are typical small molecules occupying cytoplasm. 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 the following two projects: (1) Developing cell nucleus mimicking system by use of an anionic polymer. (2) Mimicking cell cytoplasm by use of naturally occurring osmolytes.

(1) Developing cell nucleus mimicking system: A poly(ethylene sodium phosphate) (PEP·Na), which has a nucleic acid phosphate backbone and created a cell nucleus-like environment. The effects of molecular crowding with PEP·Na on the thermodynamics of DNA duplexes, triplexes, and G-quadruplexes were systematically studied. Thermodynamic parameters indicated that the factors for the stabilization of the DNA structures were dependent on sodium ion concentration. At lower polymer concentrations, the stabilization was attributed to a shielding of the electrostatic repulsion between DNA strands by the sodium ions of PEP·Na. In contrast, at higher polymer concentrations, the DNA structures were entropically stabilized by volume exclusion, which could be enhanced by electrostatic repulsion between phosphate groups in DNA strands and in PEP·Na. Moreover, increasing PEP·Na concentration resulted in increasing enthalpy of the DNA duplex but decreasing enthalpy of DNA G-quadruplex, indicating that the polymers also promoted dehydration of the DNA strands.

(2) Mimicking cell cytoplasm: A We systematically investigated effects of molecular crowding with TMAO as a zwitterionic and protective osmolyte and urea as a nonionic denaturing osmolyte on conformation and thermodynamics of the canonical DNA duplex and the non-canonical DNA G-quadruplex. It was found that TMAO and urea stabilized and destabilized, respectively, the G-quadruplex. On the other hand, these osmolytes generally destabilize the duplex, however it was observed that osmolytes having the trimethylamine group stabilized the duplex at the lower concentrations because of a direct binding to a groove of the duplex. These results are useful to predict DNA structures and their thermodynamics under physiological environments in living cells.

公募

業績リスト

学術論文（4 件）（1 件投稿中）

1. Ryuichi Maeda, Hidenobu Yaku, Takakazu Nakabayashi, Takashi Murashima, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi, DNA G-quadruplex detection system employing a protein fibril ligand *Telomere and Telomerase.*, 2, e691 (2015).
2. Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Daisuke Miyoshi, and Naoki Sugimoto. A mRNA-Responsive G-Quadruplex-Based Drug Release System, *Sensors*, 15(4), 9388-9403 (2015).
3. R. Moriyama, Y. Iwasaki, D. Miyoshi, Stabilization of DNA Structures With Poly(ethylene sodium phosphate), *J. Phys. Chem. B*, 119, 11969-11977 (2015). (Highlighted as the cover)
4. Yu-mi Ueda, Atsushi Maruyama, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi, Effects of TMAO and urea on DNA duplex and G-quadruplex, *submitted to Sci. Tech. Adv. Mater. (STAM)*.

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（2 件）

1. 日刊工業新聞 2015 年 5 月 22 日 17 面（DNA 四重らせん構造を用いた DDS）
2. 神戸新聞 2015 年 6 月 6 日（がん細胞内だけで薬放出）

招待講演（3 件）

1. 三好大輔 細胞内分子クラウディング環境で安定化する DNA の非標準構造 医学研セミナー（東京都医学総合研究所），東京都医学総合研究所, 2015/5
2. 三好大輔 分子クラウディング環境で機能する核酸四重らせん構造リガンドとその展開 BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会），神戸ポートアイランド, 2015/12
3. 三好大輔 細胞の分子クラウディングによって誘起される核酸の構造多様性 高分子学会九州支部フォーラム，熊本大学黒髪南キャンパス物質生命棟, 2016/1

特許（0 件）

受賞など（0 件）

活動（3 件）

1. 医学研セミナーでナノメディシンの紹介を行った（東京都医学総合研究所 2015 年 5 月）
2. 高分子学会九州支部フォーラムでナノメディシンの紹介を行った（熊本大学 S2016 年 1 月）
3. 兵庫県立高砂高等学校への模擬講義でナノメディシンの紹介を行った（甲南大学 2015 年 11 月）

領域内共同研究成果の発表（7 件）

学術論文（3 件）

1. Ryuichi Maeda, Hidenobu Yaku, Takakazu Nakabayashi, Takashi Murashima, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi, DNA G-quadruplex detection system employing a protein fibril ligand *Telomere and Telomerase.*, 2, e691 (2015).
2. Rui Moriyama, Yasuhiko Iwasaki, Daisuke Miyoshi, Stabilization of DNA Structures With Poly(ethylene sodium phosphate), *J. Phys. Chem. B*, 119, 11969-11977 (2015). (Highlighted as the cover)（関西大学岩崎先生の成果）
3. Yu-mi Ueda, Atsushi Maruyama, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi, Effects of TMAO and urea on DNA duplex and G-quadruplex, *submitted to Sci. Tech. Adv. Mater. (STAM)*.

学会発表（4 件）

公募

1. 三好大輔、山口野乃花、嶋田直彦、中野修一、杉本直己、丸山厚、カチオン性高分子による細胞核内模倣環境における DNA が形成する二次構造の熱力学的安定性 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会(6/12), 東北大学川内キャンパス, 2015/6
2. 上田侑美、金野智浩、石原一彦、杉本直己、三好大輔 両性イオン分子によるクラウド環境における DNA が形成する二次構造の熱力学的安定性 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会(6/11), 東北大学川内キャンパス, 2015/6
3. Rui Moriyama, Daisuke Miyoshi, Yasuhiko Iwasaki, DNA structures stabilized with poly(ethylene sodium phosphate) International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015), Honolulu, Hawaii, 2015/12 (関西大学岩崎先生の成果)
4. Daisuke Miyoshi, Nonoka Yamaguchi, Naohiko Shimada, Naoki Sugimoto, Atushi Maruyama, A comb-type cationic copolymer inducing a reversible B-A transition of DNA duplex The 7th Japan –Taiwan Symposium on Nanomedicine, International Science Innovation Building, Kyoto University, 2016/1

その他 (1 件)

1. 2015 年 9 月発刊の *J. Phys. Chem. B* (volume 119, issue 36) 裏表紙に研究成果が掲載された (関西大学岩崎先生の成果)

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。我々は細胞の力学と生化学を連立する計算力学モデルを開発し、大規模パラメトリック計算によって、TSP や CD36 にみられる定常接着は離脱頻度 $1s^{-1}$ 以下で生じること、ICAM-1 は結合に作用する力にほとんど依存しない結合特性であることを明らかにした。また腫瘍細胞の接着に応用し、毛細血管における「Bullet」挙動はセレクトイン上においても定常接着を可能にすることを示した。

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

これまでに開発した計算力学モデルを用いて、マラリア感染赤血球挙動に対する大規

模パラメトリック計算を実施した．図 1a はその例であり，様々なせん断速度およびリガンド・レセプタ結合の離脱頻度に対するマラリア感染赤血球挙動を示している．離脱頻度が 1 s^{-1} 以下の場合，生理学的なせん断速度の範囲のほとんどで血管壁と定常接着する．このことは，過去に TSP や CD36 に対して実施された AFM や Microfluidics を用いた実験結果と一致している．マラリア重症化に重要なレセプタであるとされる ICAM-1 についてはこれまで AFM 計測が成功しておらず報告例がないが，我々は ICAM-1 の結合特性について数値的に検討を行い，結合に作用する力にほとんど依存しない結合特性を有することを予想した．さらに，バネ定数や力感度，正常赤血球の影響など広いパラメータ空間に対する赤血球挙動を明らかにした．

また，開発した計算力学モデルをより一般的なカプセル懸濁液のレオロジー解析や白血球・腫瘍細胞の流動・接着の問題に応用した．マラリアと同様，白血球の接着は生体防御において，腫瘍細胞の接着はがん転移において重要な過程であり，古くから血管壁面の「Rolling」や定常接着が調べられてきた．一方，毛細血管では血管径が小さいため，物理的に捕捉されたような「Rolling」とは異なる挙動が観察されている．しかしながら，このような条件下における細胞の接着挙動はまだ十分に理解されていなかった．我々はセレクトインを発現した毛細血管内の細胞挙動を計算し，図 1b のような結果を得た．毛細血管径が細胞径より小さくなると，細胞は管の中央を移動する「Bullet」挙動を示す．このときリガンド・レセプタ結合によって細胞の移動速度は著しく減少し，レセプタ密度が十分低い領域においても定常接着とみなせるような速度となる．セレクトインは回転運動を生じる結合であり，定常接着にはインテグリンが必要であると考えられているが，毛細血管においてはセレクトインだけでも定常接着が可能であることを示唆している．

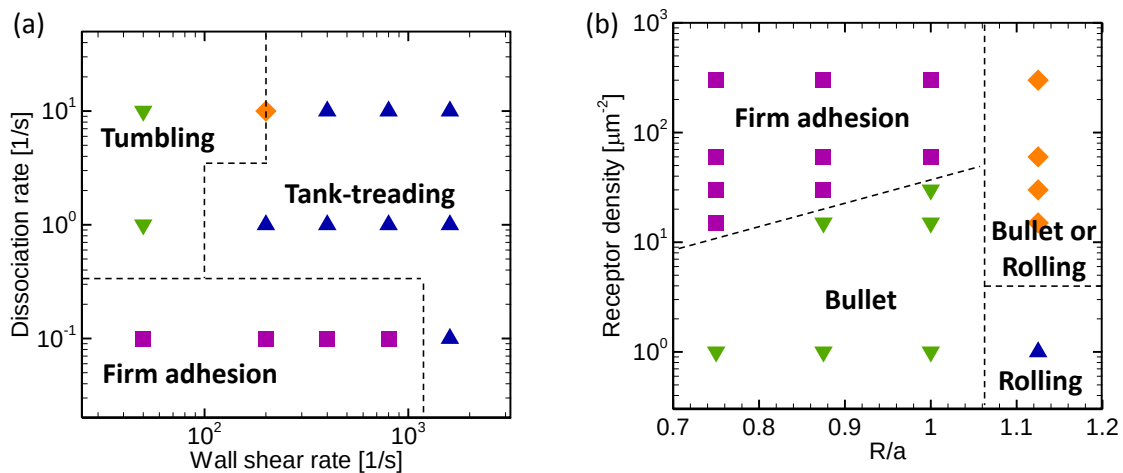


図 1：大規模パラメトリック計算の例．(a) 血管壁上のマラリア感染赤血球の挙動．(b) 毛細血管中の腫瘍細胞の挙動．

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

Yohsuke Imai

School of Engineering, Tohoku University, Japan

Quantifying the relationship between the biochemical and biomechanical properties of a cell and its macroscopic behavior is important to understand cell function and related diseases. *Plasmodium falciparum* malaria is a typical example, in which red blood cells (RBCs) infected by *Plasmodium falciparum* (*Pf*-IRBCs) express adhesion molecules (PfEMP1) and sequester in the microvasculature through ligand-receptor interactions. We developed a numerical model of *Pf*-IRBCs, coupling the biochemical interactions with the fluid and solid mechanics of the cells and cellular environment. The boundary element method (or the lattice Boltzmann method) for fluid mechanics, the finite element method for membrane mechanics, and the Monte Carlo method for ligand-receptor interactions were used. We have performed a large-scale parametric analysis using graphics unit processing (GPU) computing. At shear rates found in capillaries and post-capillary venules, the *Pf*-IRBC model exhibited either tumbling or tank-treading on the wall for a dissociation rate constant greater than 1 s^{-1} , while it firmly adhered to the wall for a dissociation rate constant less than 1 s^{-1} . This is consistent with previous experiments, in which *Pf*-IRBCs firmly adhered on TSP and CD36 whose dissociation rates were reported to be less than 1 s^{-1} . We also examined *Pf*-IRBC rolling on ICAM-1. Our results suggested that the interaction between PfEMP1 and ICAM-1 is a nearly constant bond, with a dissociation rate ranging from 30 s^{-1} to 100 s^{-1} .

We have extended the numerical model to analyze the flow and adhesion of leukocytes and tumor cells. Cell adhesion to the vascular wall is an important process also for the immune function and cancer metastasis, and thus leukocyte and tumor cell rolling have been extensively studied. However, cell adhesion in capillaries whose diameter is smaller than the cell has been poorly understood yet. We investigated the behavior of a cell in capillaries, particularly focusing on a weak ligand-receptor bond condition. We found that an adherent cell exhibited “bullet” motion in capillaries. Bullet motion effectively reduced the velocity of the cell, and the cell had a nearly zero velocity under physiological shear rates. Our results suggested that even through the ligand-receptor interaction between PSGL-1 and P-selectin, which is mainly responsible for leukocyte rolling, a cell is able to establish the firm adhesion of the cell to the wall in a small capillary.

業績リスト

学術論文

1. Stephanie Nix, Yohsuke Imai, and Takuji Ishikawa, Lateral migration of spherical capsules in parabolic flow, *J. Biomech.* in press.
2. Naoki, Takeishi, Yohsuke Imai, Takami Yamaguchi, and Takuji Ishikawa, Flow of a circulating tumor cell and red blood cells in microvessels, *Phys. Rev. E* **92**, 063011 (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 第9回青葉工学振興会賞「複雑な生体流れ問題に対する計算バイオメカニクスの開発」2015年12月4日.
2. 報道：「New model shows how circulating cancer cells flow and accumulate, and could help with better diagnosis」highlighted in *Inside Science* produced by the American Institute of Physics, 2015年12月15日
3. 招待講演：Yohsuke Imai, Naoki Takeishi, Shunichi Ishida, and Takuji Ishikawa 「Graphics processing unit computing of cellular flow and adhesion in microvessels」 3rd International Workshops on Advances in Computational Mechanics, Tokyo, Japan (2015).
4. 招待講演：Yohsuke Imai, Hiroki Ito, Daiki Matsunaga, Toshihiro Omori, Takami Yamaguchi, and Takuji Ishikawa 「Viscosity reduction in bimodal suspensions of two types of capsules」 13th U. S. National Congress on Computational Mechanics, San Diego, USA (2015).

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、尿中のエクソソームを 90%以上捕捉可能なデバイスを創製することに成功し、尿中エクソソームよりがんや糖尿病のバイオマーカー候補となる microRNA を検出することに成功した。

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フィジカルな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、細胞機能の解明や疾病診断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)はポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロ流路内に酸化亜鉛ナノワイヤをアンカーのように埋め込ませて作製した。洗浄後のシリコン基板上に幅 2 mm、長さ 2 cm の流路をポジ型フォトリソでパターンニングし、そこに Cr 層をスパッタリングにより作製した後、レジストを除去し、その後、Cr 層を焼成させた。そこから水熱合成法によりナノワイヤの選択的成長を行った。ここに未硬化の PDMS を流し込み、硬化させた後にはがし取ることで Si 基板上のナノワイヤを折り取って PDMS に転写した。この PDMS に転写されたナノワイヤを新たなナノワイヤ成長の結晶核として水熱合成を行うことで PDMS 埋め込み型ナノワイヤを作製した。そしてナノワイヤを成長させた PDMS にマイクロミキサー構造体を持つ幅 2 mm、長さ 2.0 cm、高さ 50 μm の流路を接着することで、ナノワイヤデバイスを作製した。埋め込み型ナノワイヤ作製のそれぞれの段階における Si 基板と PDMS の SEM 観察画像より、シリコン基板上に成長していたナノワイヤの大部分が、PDMS に埋め込まれており、目的であった埋め込み型ナノワイヤの作製の成功を確認した。

続いてこの尿サンプル 1 mL をシリンジポンプにより流量 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ でナノワイヤデバイスへ送液し、尿中エクソソームをナノワイヤ表面に捕捉させた。送液後の尿サンプルを回収し、そして送液前後の尿サンプル中に含まれるエクソソームの粒径および濃度を測定した。その結果、ナノワイヤデバイス導入前の尿中エクソソームの濃度が 1.4×10^{12} particles/mL であったのに対して、マイクロミキサー構造体なしのナノワイヤデバイスに導入後の尿サンプル中のエクソソームでは 4.3×10^{11} particles/mL、マイクロミキサー構造体のあるナノワイヤデバイス導入後の尿サンプルでは 1.1×10^{11} particles/mL になった。このことよりマイクロミキサー構造体なしのナノワイヤデバイスでは 69 %、マイクロミキサー構造体ありのナノワイヤデバイスでは 91%のエクソソームの捕捉に成功した。

尿サンプル導入後のエクソソームが捕捉されたナノワイヤデバイスに細胞溶解液 1 mL をシリンジポンプにより流量 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入することで、捕捉されたエクソソームを溶解し、そこに内包されている尿中エクソソーム由来 miRNA の抽出を行った。この結果より、本手法は従来法と比べて迅速・省サンプルにエクソソーム捕捉・miRNA 抽出を行えることがわかった。最後に、ナノワイヤデバイスの臨床における有効性を調べるために健常者、前立腺がん患者、糖尿病患者の尿サンプルからナノワイヤデバイスを用いて miRNA の抽出を行い、マイクロアレイによって miRNA 種の同定と抽出量の比較を行った。それら miRNA 種を比較したところ、それぞれの検体で特異的に検出される miRNA 種や、検出されなくなる miRNA 種が存在することが分かった。この結果より、本デバイスは尿中 miRNA による疾病診断を行うだけでなく、今までに報告のない新たなバイオマーカーの探索にも有効な新たな診断プラットフォームであるということが明らかとなった。

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, quantitative exosome analysis 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 200 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

We fabricated PDMS-anchored ZnO nanowires in microchannel. For fabrication of the anchored nanowires (140 nm in diameter and 2-3 μ m in length), we made patterned Cr seeds layer on Si substrates photolithography and sputtering, and then, we immersed the substrate into the nanowire growth solution to demonstrate a patterning of nanowire growth. We pored uncured PDMS resin on the substrate and cure the resin. When the cured PDMS was peeled off from the substrates, the nanowires were cracked and fully anchored in the PDMS, which could act as the seeds for the following nanowire growth. Then, we immersed the PDMS into the nanowire growth solution to grow PDMS-anchored nanowires. We confirmed nanowire anchoring by SEM imaging of each device making steps.

We demonstrated that the PDMS-anchored nanowires could capture the exosomes from 1 mL urine sample. We extract microRNA from the captured exosomes via sequential introduction of lysis buffer, which break the membrane of the exosomes, into nanowire device. Comparison of the amounts of the extracted microRNA between using the PDMS-anchored nanowires and the conventional method showed that the microRNA extraction efficiency using the PDMS-anchored nanowires is much higher than that using the conventional method. This result indicates that we realized high throughput microRNA extraction from body fluid with little loss of the microRNA amount using the PDMS-anchored nanowires, leading to acceleration for discovering new biomarkers in body fluids.

業績リスト

学術論文

1. Daiki Takeshita, Takao Yasui, He Yong, Takeshi Yanagida, Noritada Kaji, Masaki Kanai, Kazuki Nagashima, Tomoji Kawai and Yoshinobu Baba, PDMS-anchored nanowires for high throughput micro-rna extraction from extracellular vesicles in body fluid, *Micro Total Analysis Systems* 2015, **1**, 1516-1518 (2015).
2. Keiko Tabuchi, Takao Yasui, He Yong, Takeshi Yanagida, Noritada Kaji, Masaki Kanai, Kazuki Nagashima, Tomoji Kawai and Yoshinobu Baba, Nanowire devices for extracellular vesicles analysis towards elucidation of intercellular communication, *Micro Total Analysis Systems* 2015, **1**, 1510-1512 (2015).
3. Takao Yasui, Satoru Ito, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi and Yoshinobu Baba, Micropillars Fabricated on Poly(methyl methacrylate) Substrates for Separation of Microscale Objects, *Anal. Sci.*, **31**, 1197-1200 (2015).
4. Sakon Rahong, Takao Yasui, Noritada Kaji and Yoshinobu Baba, Recent developments in nanowires for bio-applications from molecular to cellular levels, *Lab Chip*, in press (2016).

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 中部分析化学奨励賞「ナノバイオデバイスを用いた生体分子解析法の開発」2015年8月31日
2. 受賞：安井隆雄 平成27年度赤崎賞「自己組織化ナノワイヤ構造体を用いた超早期がん診断技術の開発」2016年2月24日
3. 招待講演：安井隆雄 「ナノバイオデバイスを用いた生体分子解析法の開発」 第34回分析化学中部夏期セミナー (2015年8月31日)
4. 招待講演：安井隆雄 「Nanowires for analyzing biomolecules」 2nd Asian Symposium for Analytical Sciences (2015年9月10日)
5. 招待講演：安井隆雄 「ナノ構造体を用いた分析手法の開発」 第9回日本化学会東海支部若手研究者フォーラム (2015年12月3日)
6. 招待講演：安井隆雄 「Nanostructures for biomolecule analysis」 Pacifichem 2015 (2015年12月16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 大学院医歯薬学研究部 南川 典昭

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。さらに、このナノ核酸デバイス導入 siRNA を利用して whole Blood Assay (WBA) により包括的な自然免疫応答を評価したところ、TLR3 を介した場合とは全く異なる活性変化が観察された。そこで本年度は、カスケード阻害剤ならびに光補足型ナノ核酸デバイスを用いることにより、siRNA により誘起される自然免疫応答発現の鍵となる受容体の同定を試みた。

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 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 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った。すなわち、ヒトにおいて siRNA の細胞内導入に伴う自然免疫応答発現の鍵となるパターン認識受容体は TLR3 ではないことが示唆され、これを同定するためにカスケード阻害剤を利用した WBA を実施するとともに標的受容体を補足可能な改良型ナノ核酸デバイスの開発に取り組んだ。

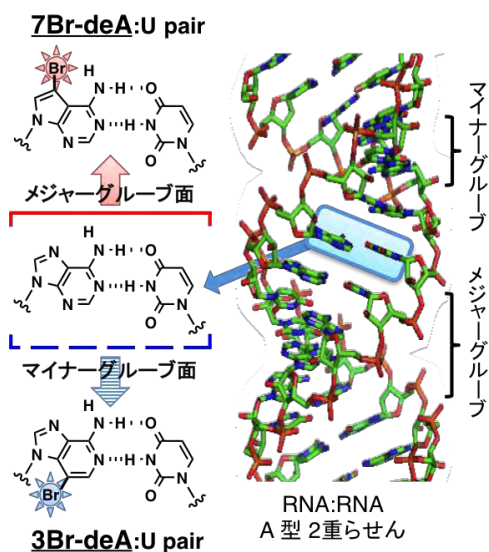


図 1 ナノ核酸デバイスのコンセプト

3. 成果

(1) Chloroquine 存在下での WBA による自然

免疫応答評価: ナノ核酸デバイス導入 siRNA の細胞内導入に伴う自然免疫応答変化を WBA により観察したところ、siR1, 2 および 4 においては顕著な TNF- α 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 2a)。この結果は前述の TLR3 との相互作用解析により得られたものとは全く異なる。すなわち TLR3 の他に自然免疫応答発現の鍵となるパターン認識受容体が存在することが強く示唆された。ところで、外来性 RNA により惹起される自然免疫応答発現に関連することが示唆されているパターン認識受容体は TLR3 の他に TLR7/8 あるいは PKR、MDA5 などが知られている (図 3)。これらのいずれが鍵となる相互作用を担うかを明らかにするため、まずは TLR シグナルのカスケード阻害剤である chloroquine 存在下、再度 WBA を実施した。その結果、いずれのナノ核酸デバイス導入 siRNA を用いた場合にも、自然免疫応答の賦活化はほとんど観察されないことが明らかとなった (図 2b)。すなわち、siRNA により惹起される自然免疫応答の発現には TLR が大きな役割を担っていると考えられ、WBA における活性変化は TLR7/8 との相互作用による影響を強く受けていることが示唆された。

(2) 光補足型ナノ核酸デバイスの開発: 上述の 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パターン認識受容体の補足法開発を検討した。すなわち、臭素原子の代わりに光反応性基であるトリフルオロロジ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、各ヌクレオシドユニットの合成法を確立した。図 2 に示した配列にて光補足型ナノ核酸デバイスを導入した siRNA を調製中であり、これらを用いて TLR7/8 の補足ならびに相互作用部位の同定を試みる予定である。

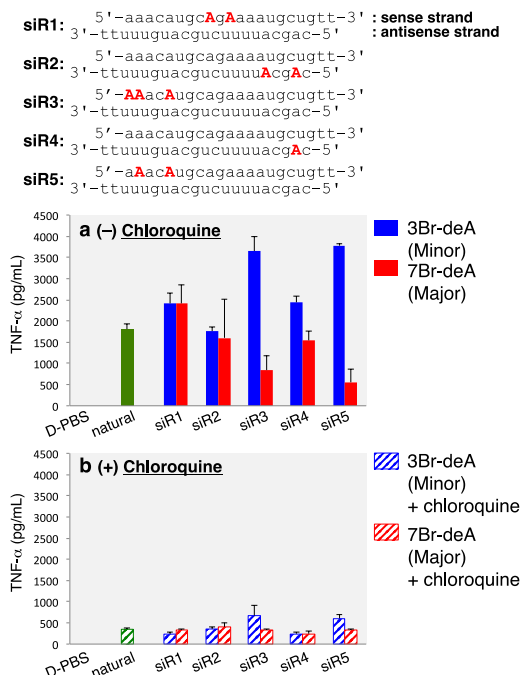


図 2 Chloroquine 存在下での WBA による自然免疫応答評価

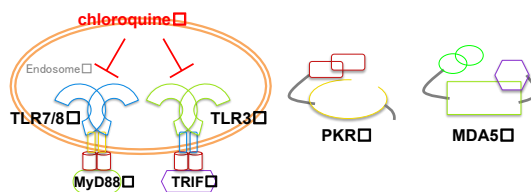


図 3 外来性 RNA を認識するパターン認識受容体

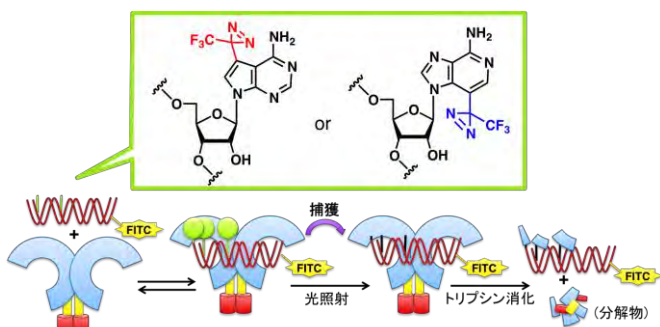


図 4 光補足型ナノ核酸デバイスの構造とコンセプト

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

Noriaki Minakawa

Institute of Biomedical Science, Tokushima University Graduate School, 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. Because this interaction occurs in a strict and specific manner, an understanding of how proteins bind structurally to nucleic acids is valuable 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. Additionally, we studied innate immune responses induced by siRNA with nano-chemical device using whole Blood Assay (WBA). As a result, reductions of the TNF- α level were observed when the 3Br-3-deazaAs (3Br-deAs) were introduced into the 5'-end of the sense strand (Figure 2, siR3 and 5).

Thus, in this year, we attempted the WBA with chloroquine, which is a TLR-dependent cascade inhibitor. Each siRNA with nano-chemical device showed drastic attenuations of TNF- α level in the presence of chloroquine, indicating TLR7/8 might play a critical role in stimulating innate immune response depending of the siRNA. To further elucidate which is the most critical receptor to induce innate immune response, 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. Chemical syntheses of nano-chemical devices with a trifluoro diazirine groups are achieved using palladium couplings as a key reaction. With this new device, the studies of receptor protein detection are currently underway.

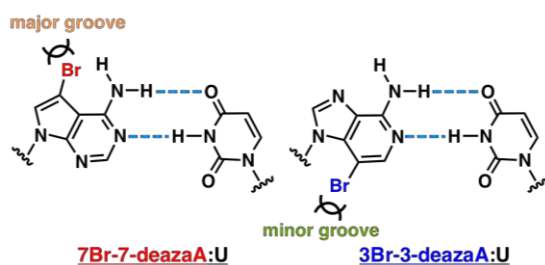


Fig. 1 Structures of nano-chemical device

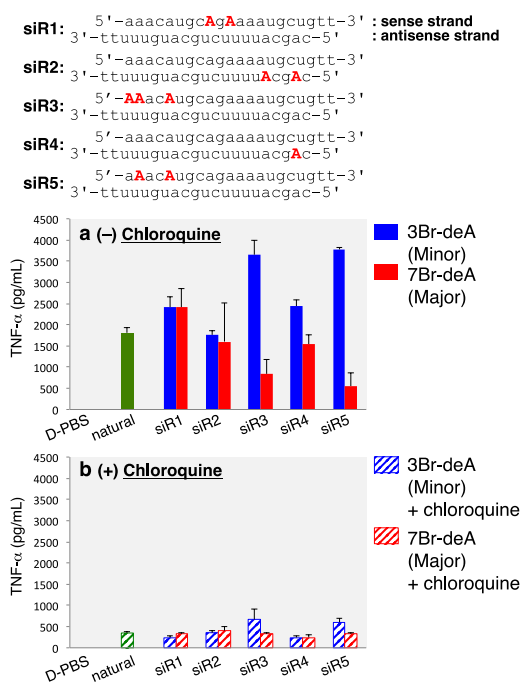


Fig. 2 WBA in the absence or presence chloroquine.

公募

業績リスト

学術論文

なし

総説・解説・成書

1. 田良島典子、南川典昭 「生物学的等価性を指向した化学修飾 DNA による核酸創薬研究」、シーエムシー出版、『核酸医薬の創製と応用展開』、70-77 (2015)

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、小島孝允、金城望、古川和寛、安藤英紀、石田竜弘、南川典昭 日本化学会第 95 回春季年会 (2015) 学生講演賞「Intelligent RNA expressing device (iRed) を利用した新規遺伝子発現抑制法の開発」、2015 年 5 月 1 日
2. 招待講演: Noriaki Minakawa, 「A New Approach For Gene Silencing Using 4'-ThioDNA」, 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2015), 2015 年 10 月 19 日, Korea
3. 招待講演: Noriaki Minakawa, 「Development of RNAi Medicine Using 4'-ThioDNA」, The 4th International Conference on Biotechnology and Bioengineering (ICBB2015), 2015 年 12 月 12 日, Singapore

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

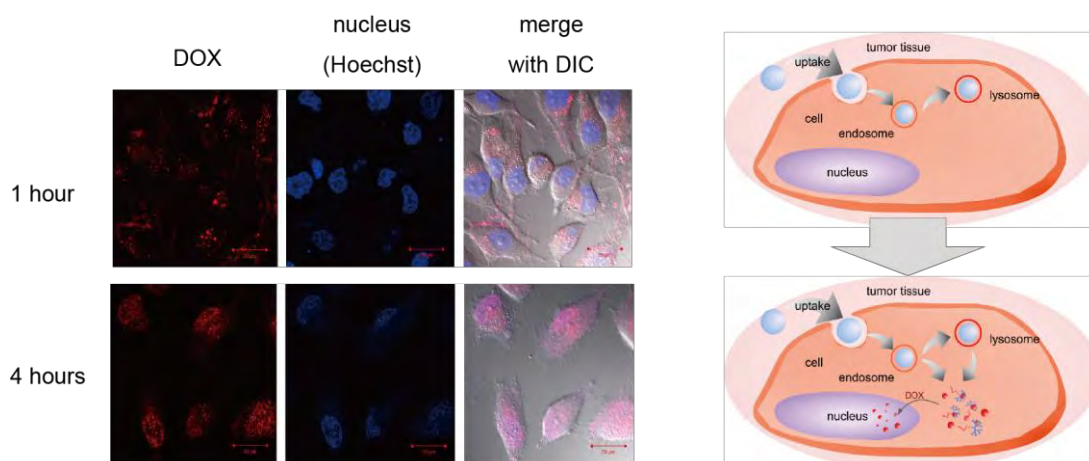
細胞内還元環境を認識して不安定化するナノカプセルへ異なる細胞内分布を示す音増感剤を封入し、その HeLa cells への取り込み、動態、超音波力学療法効果を検討した。音増感剤は、ナノカプセルへの封入によりエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれ、ナノカプセルのエンドソーム脱出能により細胞質へ移行し、細胞質でのナノカプセルの不安定化によりリリースされることが確認された。その後、音増感剤の性質によって細胞内において異なる分布を示し、その結果、異なる部位へ超音波力学療法効果を与え、細胞死を誘導することが確認された。

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

これまでに合成方法を確立し、細胞内分布が異なることが確認されている音増感剤 (doxorubicin, DOX; triphenylphosphonium 基導入 DOX, TPP-DOX) について、細胞内還元環境で不安定化するカチオン性ナノカプセルへの封入条件の検討を行い、いずれの音増感剤についても 60%程度の効率で封入できる条件を確認した。DOX 封入ナノカプセルについて HeLa 細胞への取り込み、細胞質での DOX リリースをレーザー共焦点顕微鏡観察により確認した (図)。1 時間後においては、DOX の蛍光が細胞質に輝点状に観察され、核への局在は認められなかったが、4 時間後においては DOX が核への分布していることが確認された。これは、1 時間後においては、ナノカプセルがエンドソーム内に存在し DOX はカプセル内に保持された状態ですが、4 時間後までの間にナノカプセルがエンドソームから脱出し、細胞質還元環境に応答したナノカプセルの不安定化により DOX がリリースされたと考えられる。リリースされた DOX はそれ自身の性質により核へと分布したと考えられる。



図：DOX 封入ナノカプセルによって処理された HeLa cells のレーザー共焦点顕微鏡像

超音波力学療法効果を MTT assay により評価した。HeLa cells に 4 時間ナノカプセルを接触させた後、取り込まれていないナノカプセルを除き、超音波照射を行い、さらに 20 時間培養後、細胞生存率を評価した。DOX は抗がん剤としての性質を有しているため超音波照射を行っていない場合にも細胞生存率の低下が確認されたが、超音波照射を行うと、さらに生存率が低下した。この低下は、核に局在した DOX から超音波照射により活性酸素種 (ROS) を生成し DNA に対して酸化ダメージを与えたためであると考えられる。TPP-DOX の場合、TPP 基の導入により核へ局在しなくなるため超音波照射を行っていないときには細胞生存率の低下は確認されなかったが、超音波照射により有意な細胞生存率の低下が確認された。これは、TPP-DOX が超音波照射によって生成する ROS がミトコンドリアへダメージを与えたためであると推測される。ナノカプセルへ封入する音増感剤の特性を選択することにより、異なる部位への作用によって超音波力学療法効果が誘導できると確認された。

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.

Doxorubicin (DOX) and its derivative which introduced triphenylphosphonium moiety (TPP-DOX) were entrapped into hollow nanocapsules. The cellular uptake and intracellular behavior of nanocapsules were evaluated using a laser confocal microscopic observation. At 1 hour incubation, red fluorescence dots were observed only at cytosol, indicating that DOX-loaded nanocapsules located at endosome and/or lysosome. However, red fluorescence were distributed to nucleus at 4 hours incubation. This results indicates endosomal escape of nanocapsules between 1 and 4 hours incubation and the DOX release from the nanocapsules through the destabilization at cytosol response with reductive environment. Further, in vitro sonodynamic therapeutic effect to HeLa cells were evaluated by MTT assay. DOX-loaded nanocapsules could show both anticancer effect and sonodynamic therapeutic effect, and the cell viability effectively decreased with ultrasound irradiation. In the case of TPP-DOX-loaded nanocapsules, there was no anticancer effect due to no localization into nucleus and only sonodynamic therapeutic effect was confirmed. By changing intracellular distribution of sonosensitizers (DOX and TPP-DOX), therapeutic effect could be switched from anticancer/sonodynamic therapeutic effects to nucleus to sonodynamic therapeutic effect to mitochondria.

公募

業績リスト

学術論文

1. Satoshi Yamamoto, Eiji Yuba, Atsushi Harada and Kenji Kono Effective condensation of multivalent anions into polyion complex micelles prepared from TiO_2 nanoparticles and polyallylamine bearing poly(ethylene glycol) grafts *Langmuir* **31**, 8583-8588 (2015)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 基調講演 : Atsushi Harada “Head-tail polycation as materials for drug delivery system”
2015 International Symposium for Advanced Materials Research (2015)