

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名: *in vivo* ナノイメージング技術の開発と生体運動機構の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

樋口 秀男 (東京大学大学院理学系研究科 教授)

主たる共同研究者

渡辺 賢 (東京医科大学細胞生理学教室 講師)(平成 18 年 10 月ー平成 21 年 3 月)

田口 隆久 ((独)産業技術総合研究所関西センター 所長)

春日 規克 (愛知教育大学教育学部 教授)

福田 紀男 (東京慈恵会医科大学細胞生理学講座 准教授)

3. 研究実施概要

生命科学における最終ゴールの1つは、身体の仕組みを分子レベルで理解することである。このゴールに向けて本課題では、動物個体の機能を分子レベルで理解するために、マウス *in vivo* での生体運動に関連する分子の挙動を 1 分子かつナノメートル精度でイメージング(ナノイメージング)する装置を開発し、*in vivo* における生体運動の機構解明を目指した。本課題の顕著な成果は、世界ではじめてマウス *in vivo* において 1 分子観察に成功を収め、その方法を発展させた事である。

マウス内分子観察の基礎的装置としてスピンドISK共焦点ユニットを備えた顕微鏡を用いて、システムの改良を行った。量子ドットあるいは多粒子量子ドットを観察対象の分子に結合し導入した。マウスのがん細胞のイメージングの実験に際しては、上記の培養細胞(KPL4 など)をマウスの背中に注入して、担がんマウスを作成した。マウスのがん組織を顕微鏡でできるだけ背景光を減らしかつ明るいイメージを得るために、血管を切ることなく、がん組織を覆う結合組織を細心の注意をはらい丁寧に剥離した。呼吸や心拍による振動を抑えるために、組織付近をプラスチックボードに手術糸あるいは最近ではアロンアルファを用いて固定し、このボードを顕微鏡ステージに固定した。

抗がん剤であるハーセプチン(抗 HER2 抗体)がどのような経路で腫瘍に到達するかを明らかにすることを目的として、担がんマウスの尾静脈からハーセプチン-量子ドットを細い針で注入し、数時間後に *in vivo* ナノイメージングを行った。その結果、ハーセプチン-量子ドットは、血管付近を流れ、血管をすり抜け、そして血管と腫瘍との間をさまよいながらがん細胞にたどり着き、がん細胞膜に結合し細胞内を輸送された(精度 30nm・33 ms)。これら全過程において、ハーセプチンは動いたり止まったりを繰り返すことを発見した。分子標的の薬物送達を考えたときに、送達の律速となる「Stop」状態の理解が重要である。

マウスの腫瘍が動かないようにして精度が向上したため、がん転移に伴う細胞膜タンパク質の流動性の変化を測定できた。がんの転移に重要である膜タンパク質 PAR1 に対する、分子標的薬としての抗体を独自に作成した(国際特許 2009)。この抗体の拡散係数を計測したところ、マウスの原発巣のがん細胞の細胞膜に結合した抗体は、 $72\text{nm}^2/\text{s}$ で小さく、転移のために移動している細胞では、30 倍大きくなり、血管がない細胞では 1100 倍も高くなることがはじめて明らかとなった。がん細胞は浸潤に際して、アクチン繊維網をダイナミック化して、細胞を柔らかくし、血管をすり抜け転移する可能性が示唆され、今後転移がん細胞の発見の指標になると期待される。

以上の *in vivo* 研究では、マウスの手術による侵襲を行ってがん細胞を観察した。この方法は長期間観察が困難であり免疫反応が起こるなどの欠点があった。そこで、耳に炎症を起こしてマウスに好中球(免疫細胞の一つ)の膜タンパク質に対する量子ドット-抗体(Ly6g)を注入し、耳の中の分子挙動を非侵襲観察した。その結果、興味ある動きを捉えることができた。まず仮足を $10\mu\text{m}$ 以上の長さに高速に伸ばし、次に細胞体全体が引っ張られてゆっくりと移動した。非侵襲イメージングでは解剖をしないため解剖に熟練する必要がなく実験が格段に簡単となった。さらに、目的部位の長期間観察も可能となった。

また本課題では、心筋、骨格筋のイメージングも行った。心筋と骨格筋内に α -アクチニン-GFP を発現して、筋節の動きを最高 4nm の精度で解析できた。特に心筋では *in vivo* の筋節長を世界ではじめて測定でき、筋節長が拡張期に $\sim 2.2 \mu\text{m}$ 、収縮期に $\sim 1.7 \mu\text{m}$ であることが明らかとなった。収縮期にはアクチン繊維が Z 線に衝突する筋節長まで収縮するのである。また、筋衛星細胞(幹細胞)が筋肉の損傷に伴い、どのような運動をするのかを筋衛星細胞特有の M-cadherin に対する抗体に量子ドット結合して *in vivo* 観察した。その結果、筋損傷部方向に約 900nm/min の速度で移動をした。以上のように、様々な細胞に *in vivo* イメージング技術が活用できることが明らかとなった。蛍光材料の改良として、直径 50nm のシリカ粒子に量子ドット(蛍光波長 620nm)を約 25 個詰め込むことで、ブリンキングがなく明るい粒子の合成ができた。このような粒子は、*in vivo* イメージングの新たな材料となるだろう。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

マウスでの *in vivo* 一分子イメージング技術を開発し、個体中で生体運動の機構の解明を目標に、3次元高速イメージング装置を開発し、ナノメートル精度の高分解能の 1 分子イメージングを *in vivo* で達成したことは高く評価できる。量子ドットに抗がん剤を結合したものを、がんを発病させたマウスの尾静脈から注入し、抗がん剤ががん細胞に到達する過程を 1 分子イメージングすることに成功した。また *in vivo* で、細胞膜や細胞内小器官さらには、アクトミオシンの動態を可視化し定量化した。心筋収縮中のサルコメア長の計測なども優れた成果であり、またがん細胞での流動性の計測など研究の進捗に従って定量的な成果が得られたことは、生体運動の機能解明に向かってまだ直接的な成果やブレイクスルーは得られてはいないものの、可能性が開けつつある。

がん細胞の膜たんぱく質の流動性が、原発巣、転移中、血管内で順に桁違いに大きくなってゆく現象を見出し、当初想定されていなかった成果で、今後がんの転移にたいする対処法に参考となる知見が得られたと考える。*in vivo* イメージングを薬の開発等にも発展させる糸口が見えてきている。

新規量子ドットの *in vivo* イメージングについては、要素技術開発としては評価できる。量子ドット細胞導入の改良、*in vivo* イメージングに必要な高輝度長波長の量子ドットの開発など今後の *in vivo* イメージングへの展開に期待する。

論文発表については、タイミングよく高いインパクトのジャーナルに多数の論文発表、国内、国際会議の発表をしており、きわめて適切といえる。引用件数が 100 を越える論文もあり、内容的にも優れている。また、口頭発表も積極的に行っており、招待講演も多い。一方、非常に多くの特許を出願(国内11, 国際 6)がなされている。国際出願については、企業への資料提供契約も締結しており、活用に向けた努力もきちんとされている。

研究の進行に関しては、優れた技術開発グループ、材料(量子ドット)開発グループ、医学医療メンバーがうまく配置され4つの研究グループは *in vivo* ナノイメージングの実現を目指して、お互いに補い合い、助け合ってその連携も非常にスムーズになされていた。その連携の良さと研究代表者の高い独創性とリーダーシップが成果に反映しており、高い質の研究まで到達できた。ただ、Q-Dot の開発がやや遅れたのが残念だった。特筆すべきは、共同研究の主要メンバーに医療に携わっている人たちが多く参加しており、*in vivo* ナノイメージングの成功に大きな貢献をした。同時に成果の医療、創薬への貢献を強く意識して研究推進が図られており、新しい展開に向けた推進力となっている。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

1 分子で *in vivo* イメージングは、世界に先駆けて研究成果を得ており、その成果の科学的・技術的インパクトは高い。また、他に類似研究は無く、その新規性・独創性は高い。今回の成果をふまえ、さらなる高精度化、さらには今後要求されるであろう分子の物理化学レベルでの知見を得る方向でも本研究の目指すところには期待がもたれる。ひとつの新しい学問分野を開くことができたとと言えるのではないかな。

in vivo イメージングの基本技術の構築に成功しているので、今後、生体内分子の動き等の解析を含め大

きく広がっていくと期待される。開発された量子ドットの *in vivo* イメージングへの展開や、1 分子 *in vivo* イメージングの医学領域での応用範囲の拡大など、他手法に比べて相対的に簡便であるため、今後の広がり期待でき、新たな研究の展開が大いに期待できる。また本研究では、解剖など医療技術なしに計測が進められるよう工夫がなされるなど様々な角度から技術の汎用化にも配慮がなされている。蛍光標識として開発に成功した量子ドット分散ガラスビーズは蛍光試薬以外の他の分野で応用も期待できる。

この手法によってのみ得られる新しい知見は、今後医学、生化学の分野において、広く影響を与えるようになると期待される。まだ、難病の治療などへの決定的な貢献はないものの、抗がん剤の送達機構の解明や、心臓筋肉細胞や筋衛星細胞のバイオイメージングなど新しい課題に取り組んだ。 *in vivo* での高精度なイメージング技術はがんなどの治療、創薬においてきわめて重要である。ただ深部の観察には向いていない。これまでの努力をさらに積み上げるにより、大きな社会的インパクトのある成果を得られるものと期待される。がん以外の疾患や生命科学の領域において、1 分子 *in vivo* イメージング技術が展開されることにより基礎科学から医療分野まで大きな社会的インパクトをもたらすことが期待される。

当初の目標である個体で生体分子の機能の解明については、まだスタートラインについたところである。技術的可能性は広がり、面白そうな現象は見つかりつつあるが、「生体の中での分子」固有の現象が見られるかどうか、そこから戦略目標への研究である。

4-3. 総合的評価

1 分子 *in vivo* ナノイメージングで世界に先駆けて実現し、がん細胞、骨格筋心筋など運動系にて高解像度の *in vivo* イメージングを実現したことは高く評価できる。生物学的、医学・薬学研究への応用への研究も発展しつつあり、今後インパクトの高い研究へ展開することが大いに期待される。この分野の研究が今後10年後、20年後には主流となると思われ、これを日本で先導してゆけることは意義深い。本研究をきっかけに世界中の様々な分野でこの研究が広がることが予想される。更に必要な技術革新を目指し、生命現象の解明に貢献するよう、しっかりと目標を持って、日本からさらに先駆的な研究発信できるよう期待したい。