

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」  
平成 18 年度採択研究代表者

樋口 秀男

東北大学先進医工学研究機構・教授

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

## 1. 研究実施の概要

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。本研究では、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を解明する。本研究の鍵となる技術は、蛍光粒子の細胞内導入と様々な器官（骨格筋、心筋、平滑筋、がん腫瘍）のイメージングの可能性を、新しい装置を用いて検討を行った。特に、蛍光性ナノ粒子(量子ドット)を積極的に利用し、この量子ドットの細胞内取り込み技術の開発とマウス組織への取り込みを行わせた。細胞内取り込みでは大きな成果が得られた。この技術をマウスに応用するための検討も行った。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

1. (樋口班) 癌細胞の転移能を上昇させる膜蛋白質の分子活性を阻害する PAR 標的治療薬としてモノクローナル抗体を合成した。作製したモノクローナル抗体の乳癌細胞に対する浸潤能のテストや増殖阻害テストを行った。さらに、作製した抗体の効用をマウスを用いてリアルタイムでイメージングを行った。細胞運動のナノメートル精度の分子挙動を解析するため、培養細胞の膜を蛍光性ナノ粒子(量子ドット)でラベルし、マウスの腫瘍付近での細胞運動をおこなう動画が得られた。

また抗体に量子ドットをつけて、膜親媒性の分子を結合して、細胞内に取り込ませることに成功した、この方法を用いれば、タンパク質を自由に細胞内に輸送できる。さらに細胞内に取り込んだ量子ドットの位置を3次的に計測する装置を開発した。その装置を用いて、細胞内小胞の運動を数 nm 精度で3次的に追跡して、ダイニンが微小管の1本のプロトフィラメント上を運動すること

を明らかにした(文献1)。

2. (春日班) 生体内で骨格筋サテライトセルが幹細胞に融合する動きをナノレベルで観察することに最終的目標をおき、そのための基礎的研究を行った。連続性の伸張性収縮による筋損傷からの回復に働く筋衛生細胞(サテライトセル)様相をマウスの筋を用いて蛍光抗体染色で調べようと試みたが、anti-mouse モノクロー抗体を用いた染色では鮮明な画像が得られず、従来から用いてきたF344系ラットの筋に切り替え観察した。特に、サテライトセルの分裂・増殖期を、MyoD、myogenin等の制御遺伝子により確認し、損傷部におけるサテライトセルの動態を接着タンパクであるM-cadherinをマーカーとして観察した。この結果、増殖時期M-cadherinは1つのサテライトセルを取り囲むのではなく複数のサテライトセルを含み、損傷線維部に幅広く分布し、既存筋線維と融合を開始している可能性が示された。

また、マウスを用いてギプス固定による骨格筋の萎縮と薬物投与による筋損傷から再生、肥大に関する分子メカニズムを解明するための実験モデルの妥当性について検討を行った。この実験では雄性 C57BL/6 マウスを用いた。その結果、筋の萎縮率や萎縮後の筋重量の回復、さらに筋損傷後の再生がラット実験モデルと同様の傾向が認められた。これらの結果は、マウスを用いて当該の研究課題を遂行するにあたり、実験モデルとして妥当であることが示唆された。

3. (福田班) 心筋収縮系は中間活性化条件で自発的に振動し(SPOC)、この振動数は静止時の心拍数にほぼ匹敵する。In vivo心筋イメージングの基礎条件を確立するため、除膜処理したラットの単離心筋細胞を量子ドットでラベルし、SPOCのイメージングを行った。振動波形や振動周期について、位相差顕微鏡下で得られた結果とほぼ合致した。さらに、単離心筋細胞の細胞膜をCa<sup>2+</sup>イオノフォアにて処理を施し、Ca<sup>2+</sup>濃度を外部からコントロールすることによって、細胞内膜構造を保持した条件でSPOCを誘起させることに成功した。

4. (渡辺班) (渡辺班) 平滑筋組織におけるナノメートル精度の分子挙動を解析するため、細胞膜を破壊したスキンド平滑筋標本を用いて、筋収縮タンパク質のミオシンを蛍光性ナノ粒子(量子ドット; Q-dot655)を用いてラベルし、1分子イメージングを行った。細胞外に遊離しているQ-dotシグナルは非常に速い運動を行ったのに対し、細胞内に導入されたQ-dotのシグナルは、0.1Hzの間に数~10nm程度を振動するような運動をした。この緩やかなシグナルの動きは細胞内の濃いタンパク質溶液の中でQ-dotのパーティクルが移動している様子を表していると推測された。

5. (田口班) 「タイプ II」半導体ナノ粒子は発光効率が向上し、安定性も高まるが、我々は、従来法とは異なり、安全・簡便な水溶液法を用い、ZnSeナノ粒子をCdとSで修飾し、高効率で青色発光を示すナノ粒子を作製することに成功した(文献6、7)。また、発光ナノ粒子の水溶液中での安定化手法の開発も進んだ。発光効率の向上も実現したが、さらなる向上に向けて条件検討を行った。顕微鏡下での分光検出手法についても検討を加え、上記ナノ粒子の検出が可能になった。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「技術」グループ

① 研究分担グループ長:樋口 秀男(東北大学、教授)

② 研究項目

- ・ *In vivo* ナノイメージング装置の開発と生体運動のイメージング
- ・ 技術開発

#### (2)「骨格筋」グループ

① 研究分担グループ長:春日 規克(愛知教育大学、教授)

② 研究項目

- ・ 骨格筋の機能と分子挙動解析
- ・ 骨格筋電子顕微鏡解析
- ・ 骨格筋蛍光抗体像の解析

#### (3)「心筋」グループ

① 研究分担グループ長:福田 紀男(東京慈恵会医科大学、講師)

② 研究項目

- ・ *In vivo* 心筋ナノイメージング解析

#### (4)「平滑筋」グループ

① 研究分担グループ長:渡辺 賢(東京医科大学、講師)

② 研究項目

- ・ 平滑筋 *in vivo* ナノイメージング
- ・ 分光計測

#### (5)「量子ドット」グループ

① 研究分担グループ長:田口 隆久(産業技術総合研究所、副部門長)

② 研究項目

- ・ 多色量子ドット材料研究と計測解析技術研究
- ・ 細胞内導入技術研究
- ・ 量子ドット材料研究
- ・ 計測解析技術研究

## 4. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表(原著論文)

1. Watanabe, T.M., T. Sato, K. Gonda and H. Higuchi. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in a living cell using dual-focus imaging optics. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 359 1-7 (2007).
2. Watanabe, T.M. and H. Higuchi. Stepwise Movements in Vesicle Transport of HER2 by Motor Proteins in Living Cells. *Biophysical J.* 92, 4109-4120 (2007).
3. Udaka J, Ohmori S, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *J Gen Physiol.* 2008;131:33-41.
4. Terui T, Sodnomtseren M, Matsuba D, Udaka J, Ishiwata S, Ohtsuki I, Kurihara S, Fukuda N. Troponin and titin coordinately regulate length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle. *J Gen Physiol.* 2008;131:275-283.
5. Fukuda N, O-Uchi J, Kurihara S. Neuronal NO synthase-derived NO: a novel relaxing factor in myocardium? *Circ Res.* 2008;102:148-150.
6. P. Yang, M. Ando and N. Murase, Encapsulation of emitting CdTe QDs within silica beads to retain initial photoluminescence efficiency, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 316, pp. 420-427 (2007).
7. M. Ando, C. Li, P. Yang and N. Murase, Blue-emitting small silica particles incorporating ZnSe-based nanocrystals prepared by reverse micelle method, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2007, Article ID 52971, pp. 1-7 (2007). doi: 10.1155/2007/52971. (web 発行済。冊子体のページ番号は未確定。)
8. McGrath, K.F., Yamashita, S., Tamaki, H., Saito, K. and Takekura, H. (2007) Cellular adaptations and shortening properties of  $Ca^{2+}$ -tolerant cardio- myocytes from run trained rat heart. in press.
9. Yamashita, S., McGrath, K.F., Yuki, A., Tamaki, H., Kasuga, N. and Takekura, H. (2007) Assembly of transverse tubule architecture in the middle and myotendinous junctional regions in developing rat skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **28**, 141-151.
10. 石道峰典、春日規克。「自発走トレーニングを伴う慢性過負荷が骨格筋の形態特性、筋線維タイプ構成比に及ぼす影響」、*日本運動生理学雑誌*、*日本運動生理学会* (in press)
11. 町田修一、岡本武志、分子レベルからみた力学的ストレスに対する筋・骨格系の細胞応答、*体育の科学*、57: 357-364, 2007.
12. 町田修一、加齢性筋萎縮と骨格筋幹細胞、*基礎老化研究*、31: 23-25, 2007.