「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 平成 21 年度 実績報告

樋口 秀男

東京大学大学院理学系研究科·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.この1年間の大きな進歩は、新たに強度の安定な量子マルチドットの合成に成功したこと、量子ドットを細胞内やマウスの中に入れる方法が完成したこと、がん細胞の動態の詳細をマウスの中で観察できたこと、心筋や平滑筋に量子ドットを導入して分子ダイナミックスを観察できたことである。マウスの *in vivo*を観察するための材料、導入方法そして実際の観測が進みつつある。

§2. 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(東京大学大学院、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)「量子ドット」グループ

①研究分担グループ長:

田口 隆久(独立行政法人 産業技術総合研究所、研究コーディネーター)

②研究項目

多色量子ドット材料の合成と計測解析技術の研究

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

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

in vivo(マウスなど)でイメージングするために、1. 我々は明るく安定な量子ドットを作り、2. これ に抗体や標的タンパク質を結合する. 3. この量子ドット-タンパク質複合体をマウス内の細胞に導 入して、4. 新たに開発した単一分子のイメージング装置にて、5. 骨格筋、心筋、平滑筋、がん細 胞の運動をin vivoで3次元的に観測することである. この1年でそれぞれの研究で得られた結果と 新たに出てきた問題点を述べる.

1. (田口班) 当初, 逆ミセル法により高発光効率(65%以上)の CdTe 量子ドットを封入したガ ラスナノビーズ(粒径 20~2000nm)を合成し, 生体分子の in vivo イメージングに役立つプローブ の開発に取り組んだ。合成に成功したが, この方法では粒子粒径の制御が困難であったため、別 の作製法であるストーバー法を導入して均一な粒子系を得た. さらにこの方法で作製した量子ドッ ト含有ガラスビーズは、希薄溶液中や生体内環境では市販の Qdots に比べ劣化が早く、また励起 光照射によっても著しく消光することが樋口研との共同研究によって明らかとなった.

これらの欠点を克服するために、材料組成から見直し、全く新しい二種類のマルチ量子ドット を開発した。すなわち、疎水性 CdSe/ZnS 量子ドットを改良ストーバー法でマルチ量子ドットをガラ スナノビーズにつめることに成功した.同時に水分散性のよいマルチ InP/ZnS 量子ドットをつめこ んだガラスナノビーズの作製にも成功した。 2. (樋口班) 昨年度開発した3次元単一分子のイメージング装置を厚い試料(細胞全体)でも観察できるように改良した. 従来の, 共焦点顕微鏡と対物レンズの移動を組み合わせて3次元像を得る方法の欠点は, 速度が遅いことである. 例えばビデオレートで1枚の共焦点像を取得して, 10枚から3次元像を得ると1立体当たり330msを要する. これを解決するための方法として, 2焦点光学系を1昨年開発した. この装置で観察できる範囲は厚さ1-2µm 程度なので, 細胞全体を一度に観察することが困難である. この困難を克服した新しい装置として多数切片を観察できる改良を施した.

3. 春日班 麻酔を行っているラットの筋肉に M-cadherin-Qdot 複合体を注入し incubation を行 い *in vivo* にて観察した. その結果, 生体上においても Qdot が導入されることが確認され, 筋衛星 細胞の *in vivo* real-time imaging が可能となった. 損傷を与えていないコントロール筋に対して M-cadherin-Qdot 複合体で incubation を行い, 30 分毎 90 分間の観察を行ったが, 筋衛星細胞の 移動は起きていなかった. 一方, 損傷 3 日後の筋に対して M-cadherin-Qdot 複合体で incubation を行い *in vivo* にて観察した結果, 経時的に移動する, M-cadherin+ 筋衛星細胞を確認することが 出来た. 15 分間の観察で 13 μ m の移動であったので平均移動速度は 14nm/sec あるいは 840nm/min であった. Intact な筋上にある筋衛星細胞は, 空間移動せず静態しているが, 骨格筋 が損傷することにより, 活性化し移動を開始するものと考えられる. 免疫組織化学で得られたデー ターより, 損傷 3 日後に 2600 μ m 遠位部で細胞周期を終了した筋衛星細胞が, 2 日間かけ 5 日後 に損傷部に移動し, 分化・融合(ミオシン発現)すると考えるなら, その移動速度は, ~900nm/min であり, Qdot 観察結果と矛盾しないものであった.

4. 福田班 <u>その 1</u>:心筋収縮系は、中間活性化条件で鋸波状の自励振動を示し(SPOC)、この 振動数は静止時の心拍数にほぼ匹敵する. 除膜処理したラットの単離心筋細胞の Z 線を a アクチ ニン抗体-量子ドット(QD) 複合体でラベルし、サルコメアが動的挙動(数 Hz)を示す中、これまでは 困難であった短いサルコメア長(SL) 領域においても、任意の単一サルコメアの長さ(SL)を正確に 測定する技術を開発した. SL の~50 nmの変化は、SPOC の振動特性を著しく変化させた. <u>その2</u>: 樋口班が開発した方法を応用し、細胞膜を有する生きた単離心筋細胞に a アクチニン抗体-QD 複合体を導入することに成功した. この心筋細胞は電気刺激(周波数:1–5 Hz)に応答し、収縮中、 任意の単一サルコメアは SPOOC に類似した鋸波状の振動特性を示すことが分かった. この結果 は、これまで物理現象と考えられていた SPOC が、心拍調節に積極的に関与していることを示して いる. <u>その3</u>:その2 で述べた手法を、 *in vivo* においてラットの心臓に応用した. 3~4 時間後、心臓を摘出して蛍光観察を行うと、部分的に約 2 μ m 周期の横紋様構造が認められた. 電顕にて観 察すると、多くの QD が T 管(心筋では Z 線に沿って存在)に局在しており、Z 線付近にも一部の QD が存在することが分かった. よって、この方法は、*in vivo* での心筋細胞の SL 計測に適している と考えられた.

5. 樋口班 平滑筋細胞内のミオシン 1 分子の動態を観察するため,量子ドット(Q-dot)を結合 した抗平滑筋ミオシン抗体(Anti-SMM-Qdot)を平滑筋細胞内に導入し,平滑筋ミオシンをラベル した. 平滑筋においては Q-dots の細胞膜透過性がほとんどないため,切り出した平滑筋束を化

学的スキンド処理を行った. Q-dots によって平滑筋 ミオシンはラベルされたが, サルコメアのような明確 な構造がない平滑筋ではミオシンの動きを予測す るのが困難であった. そこで, 平滑筋の細胞骨格 (dense body)に存在するα-actinin, 核, 高ミオシン 抗体-Qdot の同時染色を試み, 平滑筋細胞内での ミオシン1分子の経時的な追跡に成功した(右図).

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PAR1に対する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 ド)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.マウス内がん細胞の膜運 動は,部位によって1000倍もの拡散速度が異なる ことを発見した.





§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報
- Kawai M., <u>H. Higuchi</u>, M. Takeda, Y. Kobayashi and N. Ohuchi. Dynamics of different-sized solid-state nanocrystals as tracers for a drug-delivery system in the interstitium of a human tumor xenograf. Breast Cancer Research, 11: R43, doi:10.1186/bcr2330 (2009)
- Liou YM, <u>Watanabe M</u>, Yumoto M, Ishiwata S. Regulatory mechanism of smooth muscle contraction studied with gelsolin-treated strips of Taenia Caeci in Guinea Pig. Am J Physiol Cell Physiol. 296: 1024-1033. doi:10.1152/ajpcell.00565.2008 (2009)
- 3. <u>Minenori Ishido, Norikatsu Kasuga</u>, Mitsuhiko Masuhara, The expression patterns of Pax7 in satellite cells during overload-induced rat adult skeletal muscle hypertrophy. Acta

Physiologica, ,195(4):459-469. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01905.x (2009).

- Ogata T., <u>Machida S.</u>, Oishi Y., Higuchi M. and Muraoka I. Differential cell death regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. Mechanisms of Ageing and Development, 130: 328–336, doi:10.1016/j.mad.2009.02.001 (2009).
- Matsuba D, Terui T, O-Uchi J, Tanaka H, Ojima T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Protein kinase A-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in cardiac and fast skeletal muscles after reconstitution with cardiac troponin. J Gen Physiol. 133:571-581. doi:10.1085/jgp.200910206 (2009)
- <u>Fukuda N</u>, Terui T, Ishiwata S, Kurihara S. Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.11.013 (2009) [Epub ahead of print]
- K Gonda, T M. Watanabe NOhuchi, and *Hideo Higuchi In Vivo Nano-imaging of Membrane Dynamics in MetastaticTumor Cells Using Quantum Dots. J.Biol. chem. 22;285(4):2750-7 doi: 10.1074/jbc.M109.075374 (2010)