

新学術領域研究 領域代表者からの報告

2. 研究の進展状況及び成果の概要

【領域番号】 2306

【領域略称名】 ナノメディシン

【領域代表者（所属）】 石原一彦（東京大学・大学院工学系研究科・教授）

生体内、特に細胞環境で生じる反応を、分子・原子（イオン）のレベルで解析し、これらの反応に置き換えて理解する基盤研究と、これを出発点として医療を変革できる治療法、治療するための病体解析法、あるいは新医療技術の創発を基本戦略目標として掲げている。これを達成するために、タンパク質や遺伝子などバイオ分子から細胞間コミュニケーションが存在する組織に至る、細胞を中心とした生体反応系を扱う医療領域をナノメディシンと位置づけ、これに関連した学術創成を行う。

研究期間内には、研究分野(1) “ナノメディシンの分子科学 “では細胞を反応器とした分子系の反応パラメーターを分子状態の解釈で理解し、これを研究分野(2)” ナノメディシンのための分子科学 “で細胞内拡散、分子親和性の情報と合わせて考察する。また研究分野(3) ” ナノメディシンを用いた分子科学 “では、得られた分子反応パラメーター群を指標として捕え、疾病の病態を解釈し、さらに分子創薬に結実させる。

研究期間前半では、まず、各研究項目について、その基盤となる研究を進め精度の向上を目指すこととした（平成 23 年度）。特に各計画研究班が所有している基礎研究成果の情報交換することで、過不足を補い全体としての研究システムを構築した（平成 23-24 年度）。公募研究班も含めて研究領域に不可欠な基盤研究を確立することを遂行した（平成 24 年度以降）。以下にその状況を述べる。

研究分野(1) “ナノメディシンの分子科学 “

蛍光分光法による生体内イメージング解析を駆使して数十 μm の細胞内における分子の移動をリアルタイムで追跡できるシステムを構築した。免疫担当細胞として働く好中球に、半導体ナノ粒子で量子ドットを貪食させ、細胞内での運動を追跡した。その結果、小胞の運動を高時空間精度（15 nm、12 msec）で追跡することができた。小胞の運動速度は、大きいもので $4 \cdot \text{m}/\text{sec}$ 以上もあり、従来の報告例よりも 2-3 倍も大きな値であった。このような速い運動が起こるのは、運動のルールとなる微小管が多重にスライディングをしたためである。さらに、運動していた小胞は運動位置の制限を受けることを示した。これは、小胞の運動を阻害する分子がところどころ存在するためと考えた。非侵襲イメージング装置を開発すると、好中球全体の運動と好中球内部の小胞の運動を高精度に測定することができ、マウス内のタンパク質反応を運動という形で見ることができた。ここで得られた細胞内でイメージング精度は、申請時の高時空間精度 30 nm、33 msec を遥かに凌駕するものであり、着実な研究の進展と、それによる新しい現象の解明に結実している。（A01 班樋口）

さらに、このような蛍光分光イメージングシステムを利用して、生体組織の運動を観察することに成功した。具体的には、マウス *in vivo* 心臓において、心筋細胞内の最小の収縮ユニットである“サルコメア”の動きや収縮のトリガーとして働いている Ca^{2+} の動きを、世界最高水準の高時空間精度（10 nm、100 ps）で捉えることに成功した。これにより、心筋細胞に熱を加え、 Ca^{2+} 非依存的に収縮するという新しい現象を発見した。（A01 班福田）

一方、細胞内の反応を実際に想定し、これを解析できる新規プローブの創製を行った。酵素として β -ガラクトシダーゼ ($\beta \cdot \text{gal}$) を選択し、ジメチルアミノエチル基修飾ポリロタキサン (DMAE-SS-PRX) との静電複合体評価と細胞内輸送を行なった。細胞膜の分子透過現象は、細胞応答に極めて重要であるが、通常は高いバリア性に阻まれ、分子拡散による透過現象は生じない。そこで、プローブとなる

分子の運動特性と荷電状態を調節することで、これを実現した。すなわち、異種分子が貫通構造を持つ超分子体（ポリロタキサン）を適用し、ジメチルアミノエチル基修飾ポリロタキサンと酵素（DMAE-PRX/ β ・gal）複合体を調製した。これは、酵素単独の場合の200倍、従来利用されているタンパク質導入試薬（Xfect）と同等の細胞内導入効率を示した。蛍光性基質を用いて、各キャリアーを用いた際の細胞内酵素活性を蛍光イメージングにより評価した。その結果、DMAE-SS-PRX/ β ・gal複合体はXfectを使用した場合の5倍以上高い細胞内で高い酵素活性を示す事が明らかとなった。また、 β -galにより活性化する抗がん剤プロドラッグを用いた検討では、Xfectに比較して5倍もの細胞内活性を示す事も明らかとなった。さらに、siRNA導入効率とsiRNAによる有効性はポリロタキサン骨格の剛性とともに入進して市販の遺伝子導入剤より数十倍高かったことも判明している。こうしたことから、ポリロタキサン骨格の構造性と分解による解離性とは細胞膜上および細胞質内での生体分子の反応制御に有効であることが本研究により初めて示され、今後のナノメディシン設計のためのプラットフォームとして展開できることが明らかとなった。このように、複数の機能を細胞内において効果的に発揮する超分子キャリアーの創製は、世界初で、予想を上回る研究成果である。（A01 班由井）

このように、研究分野(1)「ナノメディシンの分子科学」において設定した研究戦略目標「細胞内での反応系を分子レベルで解明する」に対して、解析法の創出、細胞内反応の向上、分析精度の改善などを総合的に達成し、これにより新たな細胞内反応の定量化に足がかりをつけてきている。

研究分野(2) “ナノメディシンのための分子科学“

細胞の内在性 mRNA を直接計測するために、直径 200-400 nm に加工した探針の表面に高感度・高特異的な核酸検出プローブである分子ビーコンをビオチン-アビジン結合によって修飾を行い、mRNA に対する極微小探針の創製を行った。作成した極微小探針表面上における分子ビーコンの被覆密度は 1×10^4 分子/ μm^2 程度であり、ターゲットオリゴに対する検出限界は溶液系で 1 nM であった。さらに極微小探針の応答速度解析から、100 nM のターゲット分子中で飽和するのに 10 分以上の時間を要した。そこで極微小探針の検出感度・応答速度の改善を行い、A02 班石原の開発した MPC ポリマーを表面修飾剤として利用し、高感度・高応答性極微小探針を実現した。生細胞の内在性 mRNA を特異的に検出可能な極微小探針の作製と検出システムの構築に成功した。ヒト GAPDH は 1 細胞内に 1000 コピー、3 nM 程度の濃度で存在すると考えられるが、作製したナノプローブの蛍光輝度値からの見かけの濃度も 3 nM であった。一方で、ナノプローブの反応速度から見積もられるターゲット分子の見かけの濃度は 10^3 程度高く、細胞内における mRNA の応答機構が溶液系と大きく異なっていることが直接検出によって明らかとなった。（A02 班三宅）

分子ビーコンは、ステムループ構造を持つプローブ核酸であり、広く核酸解析に利用されているが、その感度および応答速度の向上が課題となっていた。A02 班丸山はこれまで核酸の分子認識を新たな合成ポリマー（カチオン性くし型共重合体）により増幅できることを示してきた。一方、感度向上のために通常ステム末端に配置される蛍光分子・消光分子ペアをステム内に配置する in-stem 型分子ビーコン（ISMB）の応用をすることで、消光効率の向上と複数の蛍光分子の導入による感度向上が期待される。しかし、応答速度の向上が課題として残されていた。そこで、ISMB の標的核酸とハイブリッド形成を共重合体存在下で行った結果、100 倍以上、ハイブリッド形成速度が向上できると共に、共重合体のハイブリッド安定化効果も奏して、感度を世界最高レベルに向上できることを明らかとした。この研究成果は、公募研究班樫田との共同研究成果である。（A02 班丸山）

バイオ分子のモデルとして、アルギニン残基を有するオクタアルギニン (R8) の膜透過能力を評価した。R8 は細胞膜透過機能を有することが知られており、アルギニンが細胞膜透過に有効なアミノ酸で

あることは自明であるが、そのシーケンスの効果については解明されていない。アルギニンを含むペプチドの細胞膜透過機構を推定すると、正電荷を有するアルギニンと細胞膜表面に存在するプロテオグリカンとの静電的相互作用およびアルギニンのグアニジノ基とプロテオグリカンの硫酸基との水素結合形成が考えられるが、取り込みがシーケンスのわずかな違いに強く依存することから、後者によるものと結論した。この研究成果は、細胞膜を透過により物質を輸送させる際に利用される TAT ペプチドや R8 の役割を、分子科学的に明確に示した世界初の例である。R8-PMBN/PLA/QD は細胞に取り込まれた後、細胞の分裂・増殖に影響を与えず細胞内に留まっており、30 時間の長時間観察が可能であった。このような長時間の連続観察に利用できる細胞親和型の蛍光ポリマーナノ粒子はこれまでに存在せず、PMBN/PLA/QD はイメージングツールとして有用である。R8-PMBN/PLA/QD は、研究領域内での共同研究 (A01 班樋口、公募研究班加地) に供し評価を行っている。また、細胞内安定性を活かして細胞シート工学 (東京女子医科大学岡野に提供: 総括班評価者メンバー) に適用し、細胞を積層する際の細胞識別が検討されている。(A02 班石原)

このように、研究分野(2)「ナノメディシンのための分子科学」において設定した研究戦略目標「細胞内拡散、分子親和性の情報を考察する」に対して、直接細胞内反応の解析と分子親和性の評価法の創出、新しい分子プローブの創製、および細胞内に長期間滞留できるナノプローブの創製により、分子反応の定量的解析、分子拡散特性との関連性評価などを達成し、関連分野への波及効果も現れてきている。

研究分野(3) “ナノメディシンを用いた分子科学”

この研究分野では、細胞環境における分子レベルでの反応を解明し、臨床医学、分子創薬分野へ貢献することを目標としている。また、細胞環境を制御することは、iPS 細胞や ES 細胞の臨床応用を考えると鍵となる技術の一つである。以下のように、新しい疾病診断・治療法開発が順調に進行中である。

新しい単鎖オリゴ DNA (ssDNA)、ポリエチレングリコール (PEG) とホスファチジルエタノールアミン (PE) からなる複合体 (ssDNA-PEG-PE) を細胞間接着分子として、免疫抑制能を有するセルトリ細胞を膵島表面に固定化した。両細胞機能を正常に維持したセルトリ細胞固定化膵島を薬物誘導糖尿病マウスの肝臓に経門脈的に移植したところ、移植膵島近傍にセルトリ細胞が存在し、免疫抑制効果が期待できる状態であった。免疫抑制剤を用いない膵島移植治療開拓への第一歩である。(A03 班岩田)

がん進行のメカニズム解明を考える上で、血管新生の状態を理解することはとても重要である。血管新生には血管内皮増殖因子 (VEGF) とその受容体 (VEGF-R) が重要な働きをしていると考えられており、これらの因子の分子パラメーターの導出は血管新生解明の鍵となる。腫瘍血管としての血管新生を理解するためには、がんと正常組織の間の血管新生の違いを解明しなければならない。この目的として、動脈硬化症の治療法開発にも応用可能な下肢虚血モデルマウスを新たに作製した。このマウスの血管新生を、VEGF と量子ドット (蛍光ナノ粒子) の結合したプローブを用いて、高精度分子イメージング装置で *in vivo* 解析を行った。その結果、先行研究では、虚血肢の血管新生には 10-20 倍程度の VEGF-R の発現が必要であると言われていたが、わずか 3 倍の VEGF-R 分子の発現増加が持続的な血管新生を導くことを明らかにした。得られた分子パラメーターは、がんの血管新生を考える際、極めて有効な数値であるばかりでなく、末梢動脈疾患の治療法開発にも応用可能な分子パラメーターとなった。(A03 班権田)

名古屋大学医学部脳神経外科にて摘出手術を行った計 111 症例の脳腫瘍検体を用いて DNA メチル化値を解析した。DNA ポリメラーゼによる伸長反応を基本とするシーケンス手法であるピロシーケンス

(Pyrosequencing)法は従来のメチル化／非メチル化 DNA 特異的 PCR (Methylation Specific PCR (MPS)) 法と比較して再現性が非常に高く、DNA メチル化の定量解析ができることから、より正確に DNA メチル化の定量評価をすることができる。Pyrosequencing 法にて MGMT 遺伝子と、DNA のグローバルなメチル化の評価のため LINE-1 遺伝子のメチル化を解析した。MGMT 遺伝子、LINE-1 遺伝子のメチル化はいずれも低悪性度神経膠腫において悪性脳腫瘍である膠芽腫と比較して高値を示した (MGMT: 31.9 % vs 18.9 %, LINE1: 66.2 % vs 68.8 %)。これより脳腫瘍において MGMT 遺伝子、LINE-1 遺伝子のメチル化値は有意に相関することを示し、腫瘍診断・治療への応用性を示すことに成功した。(A03 班夏目)