

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19770163
 研究課題名 (和文) 単一細胞アポトーシス誘導・検出系の開発とそれを利用した血管石灰化機構の解明
 研究課題名 (英文) Development of detection and inducing method for single cell apoptosis and study on blood mineralization with these method
 研究代表者
 木原 隆典 (KIHARA TAKANORI)
 大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
 研究者番号：90436535

研究成果の概要 (和文)：本研究は、細胞現象の一つである自発的細胞死 (アポトーシス) を単一細胞レベルで検出・誘導する技術の開発を行った。細胞内酵素あるいは mRNA を検出可能なナノプローブを新規に作成し、細胞に直接挿入することで、単一細胞レベルでアポトーシスの検出に成功した。また、固定化アポトーシス誘導因子を用いて複数細胞にアポトーシスを誘導することに成功した。さらに単一細胞にアポトーシスを誘導する技術に発展させているところである。

研究成果の概要 (英文)：I have been developed the single cell apoptosis detection method using nanoprobe. The nanoprobe for enzyme or mRNA was newly constructed and I have succeeded in detection of apoptosis in a single cell by insertion the nanoprobe to the living cell. Moreover, I tried to develop the apoptosis inducing method in a single cell. As constructing the apoptosis ligand modified probe, I succeeded in detection of specific interaction between the apoptosis ligand and receptor on a single cell surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ナノプローブ、原子間力顕微鏡、アポトーシス、一細胞、TRAIL

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性維持においてプログラムされた細胞死すなわちアポトーシスは重要な役割を担っている。しかし、アポトーシスと疾患の関係については細胞数の増減が直接疾患に繋がるもの以外については十分な知見

がなく、アポトーシスが様々な疾患に関与しているといわれているにもかかわらず、直接的な因果関係についてはわからない。動脈硬化の症状の一つに血管の石灰化がある。血管が石灰化することで弾力性が失われ、粥状硬化巣の不安定化に繋がる。培養系の研究からア

ポトーシスが石灰化に関与することが示唆されているが、細胞がアポトーシスするという現象と組織の石灰化が直接どのように関係しているのかについては解っていない。

申請者はこれまで石灰化組織の形成について研究を行ってきた。ヒトの骨髄由来間葉系幹細胞から形成させた石灰化組織の構造は血管中で見られる石灰化構造に類似している。また、こうした石灰化が生じる際に細胞のアポトーシスが誘導されている。そのため、血管の石灰化には間葉系細胞が関与し、アポトーシスが関係している可能性がある。

しかしこうした細胞現象を解明するためには、これまでのような既存の細胞集団を用いた研究手法ではなく、単一細胞レベルでアポトーシス等の細胞現象を精度良く解析できる系が必要である。

2. 研究の目的

そこで、本研究では以下の2点を中心にアポトーシスと組織の石灰化について研究することを目的とした。

(1) どのような細胞に対しても利用可能な単一細胞レベルでのアポトーシス誘導と単一細胞内で生じているアポトーシスの進行を経時的に測定できる新規実験系の開発。

(2) 開発した単一細胞アポトーシス実験系を用いて、アポトーシスと血管の石灰化がどのように結びついているか解析する。

3. 研究の方法

(1) 単一細胞アポトーシス検出法の開発

アポトーシスの検出方法として細胞内の caspase3 の活性量、あるいは細胞内における mRNA の発現量を、検出する系を作成する。具体的には AFM 探針をエッチングにより先鋭化することで直径 400nm のナノ針を作成し、その表面に分子検出のためのプローブを固定化し、ナノプローブを作成した。作成したナノプローブを任意の単一細胞に直接挿入することにより、実際に細胞内でこれら分子の検出が可能か検証した。

(2) 単一細胞アポトーシス誘導法の開発

細胞のアポトーシスを誘導する因子として、TRAIL を利用し、TRAIL を AFM 探針表面上に固定化する。TRAIL 固定化 AFM 探針を細胞に接触させ、細胞表面上のレセプターである DR4・DR5 等の発現の検出、さらに TRAIL-DR4/DR5 の結合により DR4/DR5 を活性化させることで、任意の単一細胞のみにアポトーシスを誘導する系の構築を目指した。

(3) 間葉系幹細胞による石灰化形成とアポトーシスとの関係解析

ヒト間葉系幹細胞を用いて、石灰化形成時におけるアポトーシスの誘導の様子、さらにアポトーシス誘導により石灰化が誘導されるかについて解析した。

4. 研究成果

(1) 単一細胞アポトーシス検出法の開発

①細胞内分子検出に適したナノ針表面修飾の検討

直径 400nm のナノ針は細胞に対して低侵襲に長時間挿入が可能である。その一方で、ナノ針はシリコン単結晶からなり、細胞内のようなタンパク質等が高濃度で存在する空間においては、非特異的吸着によって、表面における分子制御が困難になる。そこで、細胞膜上にあるフォスファチジルコリンの類似構造体ポリマーである MPC ポリマーを用いた修飾方法を検討した。

MPC ポリマーを修飾することで、細胞内でのナノ針表面上への各種タンパク質の非特異吸着が抑制され、かつ効率のより酵素反応等の場が提供されることがわかった。

②単一細胞内 caspase-3 検出技術の開発

細胞内の caspase-3 は、プローブ修飾ナノ針 (ナノプローブ) を細胞に直接挿入することで検出する。そのため、ナノプローブ作成に適したプローブを新しく作成する必要がある。プローブは His タグ-GFP-caspase-3 cleavage site-Alexa という分子構成で FRET を生じるものを *in vitro* で作成した (図 1)。

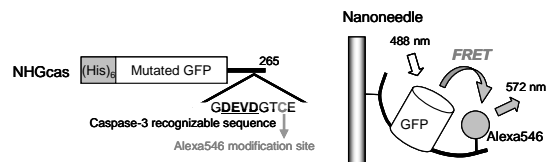


図 1 作成した FRET プローブ

作成したプローブはナノ針表面上に MPC ポリマーを介して特異的に修飾した。これにより、プローブ活性を保ったままナノ針上に固定化することに成功した。

作成したナノプローブを任意のアポトーシス誘導細胞に挿入したところ、アポトーシス細胞特異的にナノプローブが応答し、任意の単一細胞レベルでアポトーシスを検出する技術の開発に成功した (図 2)。その一方で、細胞内においてナノプローブの応答が細胞外に比べ低く、本法では高感度にアポトーシスを検出することが困難であることが示唆された。

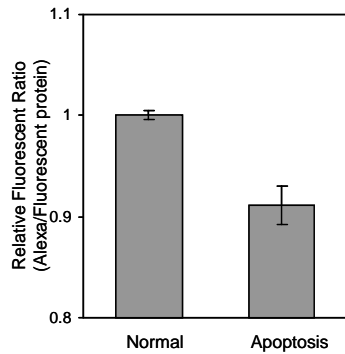


図2 ナノプローブを用いた単一細胞アポトーシスの検出

③単一細胞内 mRNA の検出

高感度に単一細胞のアポトーシスを検出することができるよう、生細胞内の mRNA をリアルタイムに検出するナノプローブの開発を行った。単一細胞において、生きたままリアルタイムに細胞内の mRNA を検出することができれば、アポトーシスのみならず、様々な細胞現象を正確に検出することができる。そこで、遺伝子の発現量が多く、なおかつアポトーシスとの関連が報告されている GAPDH をターゲットに新規技術の開発を行った。

プローブは mRNA に対して常温で特異性・反応性に富むモレキュラービーコンを利用した。ナノ針表面上に修飾するためビオチン結合モレキュラービーコンを作成し、ストレプトアビジンを介してナノ針表面上に修飾し、ナノプローブを作成した (図3)。

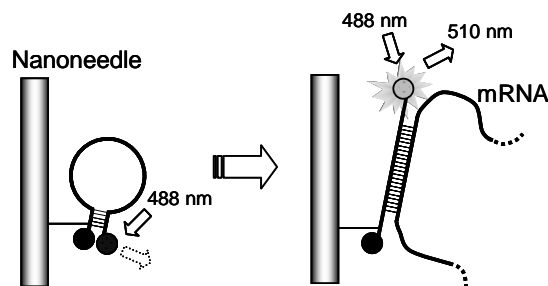


図3 mRNA 検出ナノプローブ

作成したナノプローブを AFM を用いて任意の細胞に挿入したところ、細胞内において速やかに応答し、GAPDH mRNA の検出に成功した (図4)。これにより、単一細胞内の mRNA を検出する新しい技術基盤が構築されたと同時に、アポトーシスはじめ多くの細胞現象を単一細胞レベルで高感度に検出することが可能になるとと思われる。

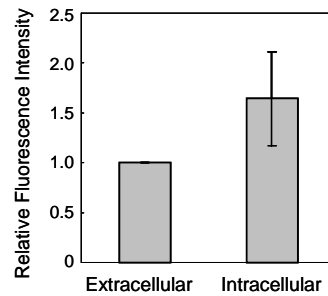


図4 mRNA 検出ナノプローブを用いた単一細胞 GAPDH mRNA の検出

(2) 単一細胞アポトーシス誘導法の開発

①TRAIL 修飾 AFM 探針の作成と細胞表面上での TRAIL-receptor 結合検出

AFM 探針にアポトーシス誘導因子の一つである TRAIL を修飾し、それを用いて TRAIL-receptor の結合を力学的に検出できるか検討した。

AFM 探針表面上に TRAIL を MPC ポリマーを介して修飾し、基板上に結合した DR4 および DR5 との結合を観察した。その結果、DR4・DR5 に固定化 TRAIL が特異的に結合する様子を力学的に確認することができた。

そこで、TRAIL 修飾探針を用いて細胞表面上でのレセプターとの結合を直接検出できるか検討した。TRAIL 修飾探針を細胞に接触させることで、特異的に TRAIL が細胞表面に結合する様子が観察された。一方で、失活した TRAIL は細胞表面上に結合しなかったことから、TRAIL の失活はタンパク質の構造的に変化することが明らかとなった。

②固定化 TRAIL によるアポトーシス誘導

AFM 探針に固定化した TRAIL が細胞表面上でレセプターと結合することが確認されたので、固定化した TRAIL でアポトーシスの誘導が可能か検討した。

TRAIL をアガロースビーズ上に共有結合で固定化、この TRAIL 修飾ビーズを用いてアポトーシスの誘導を行った。TRAIL 修飾ビーズを細胞に添加することで細胞のアポトーシス誘導が可能であった。今後、TRAIL 修飾 AFM 探針の細胞への接触により、特異的に単一細胞にアポトーシス誘導が可能か検証する。

(3) 間葉系幹細胞による石灰化形成とアポトーシスとの関係解析

ヒト間葉系幹細胞として、不死化細胞を用いた。この細胞を用いて石灰化時におけるアポトーシスの検出を行ったところ、石灰化過程におけるアポトーシス誘導を見出すことはできなかった。また、アポトーシス阻害剤及びアポトーシス誘導剤を用いて石灰化

を誘導したところ、アポトーシスが石灰化に関与する明確な結果を得る事ができなかった。これは不活化細胞を用いたためである可能性もあり、今後、複数の正常ドナー細胞を用いて解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

①Kihara, T., Nakamura, C., Suzuki, M., Han, S.W., Fukazawa, K., Ishihara, K., Miyake, J., Development of a method to evaluate caspase-3 activity in a single cell using a nanoneedle and a fluorescent probe, Biosensors and Bioelectronics, 2009, 25, 22-27, 査読有

②Sugitate, T., Kihara, T., Liu, X.Y., Miyake, J., Mechanical role of the nucleus in a cell in terms of elastic modulus, Current Applied Physics, 2009, 9, e291-e293, 査読有

③Kihara, T., Kano, F., Murata, M., Modulation of SRF-dependent gene expression by association of SPT16 with MKL1, Experimental Cell Research, 2008, 314, 629-637, 査読有

④Kihara, T., Yoshida, N., Mieda, S., Fukuzawa, K., Nakamura, C., Ishihara, K., Miyake, J., Nanoneedle surface modification with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer to reduce nonspecific protein adsorption in a living cell, NanoBiotechnology, 2007, 3, 127-134, 査読有

[学会発表] (計32件)

①木原隆典, 他, AFMを用いた細胞内分子検出技術の開発, 第2回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム, 京都, Jun 12, 2009

②Kihara, T., et al., Development of in situ molecular sensor by using nanoneedle technology, NanoBio Seoul 2008, Seoul, Korea, Oct 31, 2008

③Kihara, T., et al., Development of in situ FRET sensor for cell apoptosis by using nanoneedle technology, Biosensors 2008, Shanghai, China, May 14, 2008

④Kihara, T., et al., Development of nanoprobe for inner cell function, CNSI-CNBI Symposium on NanoBiotechnology, LA, USA, November 1, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 隆典 (KIHARA TAKANORI)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号：90436535

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：