

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650047

研究課題名(和文) マウス内非侵襲1分子観察

研究課題名(英文) Noninvasive Single molecule imaging in mice

研究代表者

樋口 秀男 (Higuchi, Hideo)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90165093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲で1粒子レベルで小胞輸送を観察するため明るい量子ドットを作成を行った。量子ドットを40 nMで液体窒素によって急速に冷却することで、数10個～数100個程度の量子ドットによる凝集体を形成した。

マウス腫瘍に対して、量子ドットの蛍光が観察できるかを確認した。がん細胞に過剰に発現しているEGFRに対する抗体を量子ドットに結合して、マウスの尾静脈から注入した。約1時間後に腫瘍部位を非侵襲で、共焦点観察を行った。その結果プリンキングするような単一量子ドットを観察することができないが、多粒子であれば、観察が可能であることが明らかとなった。ナノ粒子の蛍光を元に細胞の輪郭を同定できた。

研究成果の概要(英文)：To image the single molecule in vivo, we prepared very bright multiple quantum dots including several particles of quantum dots. The solution of quantum dots was rapidly frozen in liquid nitrogen. The dots were aggregated in the frozen process. The number of quantum dots including in the multiple quantum dots were 10-100. The multiple quantum dots bound antibodies were bound to living cells. The bright fluorescence image was obtained.

We developed new imaging methods to visualize molecules under noninvasive condition. We developed new imaging methods to visualize molecules under noninvasive condition. Tumor was successfully formed using several cells line. To image the molecules, specific antibodies to recognize these cells were labeled with fluorescence quantum dots and then injected to tail vein after the formation of tumor. We successfully performed real time observation of quantum dots within breast cancer cells and on its membrane under noninvasive condition.

研究分野：生物物理学

キーワード：量子ドット 高輝度 マウス

1. 研究開始当初の背景

現代の生物学は生命現象を分子レベルで解明する方向に進んでいる。究極の分子レベルとは、個々の分子の局在や機能を調べることであるが、近年まで、哺乳類個体内の個々の分子を直接観察することは不可能であった。これに対して我々は、マウス内の個々の1分子を観察することを目指して種々の技術を開発おこなってきた。当初は精製したタンパク質の1分子観察の方法を確立した(石島,...樋口, 柳田敏雄 *Cell* 1998, Endow & 樋口 *Nature* 2000, 岡田, 樋口& 廣川信隆 *Nature* 2003)。さらに, スピンディスク式共焦点顕微鏡を改良して, 細胞1分子観察へと拡張した(Nguyen 神尾&樋口 *EMBO J* 2003, 渡辺&樋口 *Biophys J* 2007)。この装置をマウスに利用できるように改良した結果 2007年に世界ではじめてマウス腫瘍内の癌細胞に到達する抗がん剤(Herceptin)を単一分子でイメージングする事に成功した(多田, 樋口(責任著者), 渡辺 & 大内憲明 *Cancer Res.* 2007 被引用数 154回)。このイメージングでは, 皮膚や上皮組織を手術によって剥離し腫瘍の露出を行った。しかし, この方法は, 手術を伴い, 出血や免疫細胞の活性化, マウスの自身のダメージが大きく, また同じ箇所を長期にわたり観測することは不可能であった。したがって, 一回きりの数時間の観察しかできなかった。最近, 我々は, 手術の伴わない非侵襲下でマウスの耳殻(図1矢印)の観察を行った結果, 耳殻内の好中球が貪食した大量の量子ドットを貪食していれば, 観察が可能であることが明らかとなった。しかし, 少数の量子ドットでは, 観察が困難であった。

2. 研究の目的

スピンディスク共焦点を用いて, 非侵襲下に

マウス内の単一抗体分子の機能・運動を明らかにできるイメージング法の開発を目指す。

3. 研究の方法

蛍光波長の長い量子ドット(705, 800nm)の凝集体を得るために, 瞬間凍結, 加熱, クロスリンクするなどの処理を行い, 量子ドットの輝度や凝集の程度を評価した。

培養細胞にこれらの粒子を反応させて, イメージングを行った。また, 担癌マウスを作製して, 量子ドットを尾静脈から注射して, 腫瘍を共焦点顕微鏡で観察を行った。

その他の方法については, 研究成果の中で触れる。

4. 研究成果

1. 量子ドットの凝集体の作製と耳介内蛍光粒子の蛍光強度評価

非侵襲で1粒子レベルで小胞輸送を観察するためには, 計画にあるように明るい量子ドットをつくる必要がある。明るい量子ドットを作成するために, 量子ドットを40nm以下にして, これを液体窒素によって急速に冷却することで, 数10個~数100個程度の量子ドットによる凝集体を形成することが明らかとなった。その他の方法も検討した。97で数分間加熱することによっても大きな凝集体を形成した。しかし, 加熱によって個々のQDの蛍光強度は著しく(~1/100)減少することから, この方法は適していないものと考えた。三番目の方法はCOOH基を持つビーズにNH₂コーティングされた量子ドットをクロスリンカー(EDC)によって架橋することによってもQD凝集体を作製することにも成功した。しかしこの場合, 未反応のQDならびにビーズが多数混在しており, その後の精製が必要だけでなく, 非経済的である。

以上の方法によって得られた凝集QDの輝

度，及び位置精度を測定すると，どちらの因子においても，急速凍結により作製した凝集QDが，最も優れていることが示唆された．

一方，マウスの非侵襲条件下において，量子ドットが生体内ではどの程度暗くなるかを，既知の明るさの蛍光粒子を耳に注入をして，蛍光強度計測を行った．その結果，蛍光強度は数十分の1に落ちることが明らかとなった．一方，長波長のレーザー635nmにて量子ドットを観察したところ，蛍光強度が532nmにて励起した場合の2分の1程度に落ちてしまった．そこで，焦点を絞ったところ，数分の1程度まで強度が改善した．したがって，量子ドット1粒子を観察するためには，蛍光強度が，耳介内では，数十分の1に落ちることを考慮する必要があることが明らかとなった．

量子ドットの好中球内運動の観察：

QDを内包した明るい小胞を持つ，活性条件の良い好中球を精製する手法を編み出した．この精製した好中球内部における小胞の速度を解析したところ，マウス耳介内で観測された際と同様に，2 μ m/secを超える高速小胞輸送が頻繁に観測されることが確認された．

このようにして精製された好中球に微小管重合阻害剤であるノコダゾールを作用させたところ，2 μ m/sec以上での高速小胞輸送が観察されなくなった．一方で，アクチンのモータータンパク質であるmyosin IIの阻害剤であるblebbistatinや，myosin IIの上流で活性制御を行っているROCKの阻害剤であるY-27632を作用させた際にも，2 μ m/sec以上での高速小胞輸送の頻度は大きく減少することが観測された．

量子ドットを内包した小胞輸送速度と小胞サイズの関係について調べたところ，小胞の大きさが小さいほど輸送速度が速いこ

とも明らかとなった．エンドソームの各ステージに応じて，輸送形態が異なることではないかと考えられる．

マウス腫瘍内量子ドットの観察：

マウス内に腫瘍ができることを確認するためにKPL4-EB1-GFP，U87MG，MDA-MB-231 (WT)，MDA-MB-231-GFP-tubulin の4株の他にMDA-MB-231-EB1-GFPを加え，計5株における接種細胞数の検討を行った．その結果，ある一定以上の接種細胞数があればほぼ100%でゼノグラフトモデルが作製できるという結果が得られた．

この腫瘍に対して，量子ドットの蛍光を観察できるかを確認した．がん細胞に過剰に発現しているEGFRに対する抗体を量子ドットに結合して，マウスの尾静脈から注入した．約1時間後に腫瘍部位を非侵襲で，共焦点観察を行った．その結果プリンキングするような単一量子ドットを観察することができないが，多粒子であれば，観察が可能であることが明らかとなった．ナノ粒子の蛍光を元に細胞の輪郭を同定できた．

歯周病菌に量子ドットを結合し観察：

P. gingivalis は，歯周病の原因菌として非常に有名であるが，PG菌は動脈硬化症病変などからも分離されており，全身疾患にも関与していることが示唆されている．また，PG菌をはじめグラム陰性細菌はOMVと呼ばれる20-250nmの細胞外分泌小胞を算出することが知られている．OMVは宿主細胞への毒素のデリバリーを行なうことが明らかとなっているが，その重要性に反して，OMVは大きさが小さいことや，PG菌が偏性嫌気性細菌であることからイメージングは困難であり，OMVの産出機構はもとより，PG菌自身の生命活動に関しても不明な点が多い．

PG菌の外膜に多く含まれている

HBP35 を標的とした抗体を用いて,PG 菌を QD により標識することに成功した。また,この QD 標識された菌体を Ca9.22 細胞(口腔由来上皮細胞株)に作用させ,菌体が細胞内部に侵入している様子の撮影にも成功した。PG 菌が宿主細胞内で何をやっているのか,どういった機構で侵入するのか,といった基本的なことも実はまだよくわかっておらず,本研究により,これらの疑問に答えられるものと期待される。

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 2 件)

1. Ichimura T., T. Jin, H. Fujita, H. Higuchi and T.M. Watanabe. Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles. *Frontiers in Physiology*. 00273 (2014.7). 査読有
2. Ryoma Nakao, Kenji Kikushima, Hideo Higuchi, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Bai DongYing, Makoto Ohnishi, and Hidenobu Senpuku. Novel Approach for Purification and Selective Capture of Membrane Vesicles of Periodontopathic Bacteria, *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*. May; 9:e95137 (2014.5) 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. 菊島健児, 中尾龍馬, 樋口秀男
Imaging of *Porphyromonas gingivalis* infection using quantum dots 日本免疫学会 京都 (2014.12.10-12)
2. Hideo Higuchi, Kenji Kikushima and Sayaka Kita. Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in

mouse auricles. 8th Internal Symposium on Nanomedicine, Matsushima Miyagi (2014.12.7)

3. 菊島健児, 樋口秀男 蛍光量子ドットを用いた細胞内高速小胞輸送機構の解明, 第 52 回生物物理学会, 札幌 (2014,9.25-27)
4. 菊島健児, 樋口秀男 蛍光量子ドットを用いた細胞内高速小胞輸送機構解明, ナノ学会第 12 回大会, 京都 (2014,5.22-24)
5. Hideo Higuchi, Kenji Kikushima and Sayaka Kita “Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles ” *Molecules view The International Symposium on Multi-Scale Muscle Mechanics*. Kitakyusyu Fukuoka(2013.11. 7-9)
6. 菊島健児, 喜多清, 樋口秀男 A non-invasive technique for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都 (2013.10.28-30)
7. 喜多清, 樋口秀男 Noninvasive in vivo imaging of tumor cells in mouse auricle 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都(2013.10.28-30)
8. 喜多清, 樋口秀男 量子ドットを用いたマウス耳内における白血球内小胞運動の非侵襲イメージング, ナノ学会 第 11 回大会, 東京 (2013.6.6-8)

[図書](計 1 件)

樋口秀男, 多田隈尚史 分担執筆 「12 章 細胞内での運動」 化学同人「1 分子生物学」 石渡信一, 原田慶恵編(2014.10)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://bp.phys.s.u-tokyo.ac.jp/higuchipro/>

6．研究組織

(1)研究代表者

樋口 秀男（東京大学理学系研究科 教授）

研究者番号：90165093