
ナノメディシン分子科学

領域番号 2306

平成23年度～平成27年度科学研究費助成事業
(科学研究費補助金)(新学術領域研究(領域提案型))

研究成果報告書

平成29年5月

領域代表者 石原 一彦

東京大学 大学院工学系研究科教授

目次

<はしがき>	1
1. 研究組織	1
2. 研究経費	3
3. 研究発表	3
ア・雑誌論文	3
イ・学会発表	2 2
ウ・図書	4 6
4. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況	5 6
5. 研究成果 研究領域の設定目的の達成度	5 8
6. 研究成果の概要	6 1
各研究グループにおける研究成果	6 5
【A01 班】 ナノメディシンの分子科学（分子情報測定）	6 5
【A02 班】 ナノメディシンのための分子科学（分子情報導出）	7 5
【A03 班】 ナノメディシンを用いた分子科学（分子情報応用）	8 5
【公募研究班】	9 5
別添資料	
国際学術雑誌特集号に関して	
Science and Technology of Advanced Materials	1 7 4
注目論文解説	1 7 6

<はしがき>

本研究成果報告書は、平成23年度から平成27年度の期間において、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)により行われた「ナノメディシン分子科学」(領域番号2306)に関する成果をまとめたものである。

1. 研究組織

計画研究	研究代表者	石原一彦	東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授
計画研究	研究分担者	井上祐貴	東京大学・大学院工学系研究科・助教
計画研究	研究代表者	樋口秀男	東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授
計画研究	研究分担者	茅元司	東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教
計画研究	研究代表者	福田紀男	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
計画研究	研究分担者	照井貴子	東京慈恵会医科大学・医学部・講師
計画研究	研究分担者	小比類巻生	東京慈恵会医科大学・医学部・助教
計画研究	研究分担者	大山廣太郎	東京慈恵会医科大学・医学部・特別研究員
計画研究	研究分担者	栗原敏	東京慈恵会医科大学・医学部・教授
計画研究	研究分担者	橋本和宏	東京慈恵会医科大学・医学部・教授
計画研究	研究分担者	本郷賢一	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
計画研究	研究分担者	草刈洋一郎	東京慈恵会医科大学・医学部・講師
計画研究	研究代表者	由井伸彦	東京医科歯科医大学・生体材料工学研究所・教授
計画研究	研究分担者	金野智浩	東京大学・工学系研究科・准教授
計画研究	研究分担者	徐知勲	東京医科歯科医大学・生体材料工学研究所・助教
計画研究	研究分担者	田村篤志	東京医科歯科医大学・生体材料工学研究所・助教
計画研究	研究代表者	三宅淳	大阪大学・基礎工学研究科・教授
計画研究	研究分担者	木原隆典	北九州市立大学・国際環境工学部・准教授
計画研究	研究分担者	新岡宏彦	大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
計画研究	研究分担者	田中信行	大阪大学・基礎工学研究科・助教
計画研究	研究代表者	丸山厚	東京工業大学・生命理工学研究科・教授
計画研究	研究分担者	嶋田直彦	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
計画研究	研究分担者	狩野有宏	九州大学・先導物質化学研究所・准教授
計画研究	研究代表者	岩田博夫	京都大学・再生医科学研究所・名誉教授
計画研究	研究分担者	岡本行広	大阪大学・基礎工学研究科・講師
計画研究	研究分担者	北村成史	京都大学・再生医科学研究所・研究員
計画研究	研究分担者	有馬祐介	京都大学・再生医科学研究所・助教
計画研究	研究代表者	権田幸祐	東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
計画研究	研究代表者	夏目敦至	名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
計画研究	研究分担者	千賀威	名古屋大学・医学系研究科・准教授
計画研究	研究分担者	宇理須恒雄	名古屋大学・工学研究科・客員教授
公募研究	研究代表者	中林孝和	北海道大学・電子科学研究所・准教授
公募研究	研究代表者	畠山浩人	北海道大学・薬学研究科(研究院)・その他
公募研究	研究代表者	上野裕則	愛知教育大学・教育学部・講師
公募研究	研究代表者	岡部弘基	東京大学・薬学研究科(研究院)・助教
公募研究	研究代表者	合田達郎	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

公募研究	研究代表者	中路 正	富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教
公募研究	研究代表者	小西慶幸	福井大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
公募研究	研究代表者	樫田 啓	名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
公募研究	研究代表者	加地範匡	名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
公募研究	研究代表者	湊元幹太	三重大学・工学(系)研究科(研究院)・講師
公募研究	研究代表者	中田栄司	京都大学・エネルギー理工学研究所・講師
公募研究	研究代表者	田中直毅	京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
公募研究	研究代表者	小倉裕介	大阪大学・情報科学研究科・准教授
公募研究	研究代表者	大槻高史	岡山大学・自然科学研究科・教授
公募研究	研究代表者	加藤功一	広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授
公募研究	研究代表者	南川典昭	徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
公募研究	研究代表者	原田敦史	大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
公募研究	研究代表者	板野 理	慶應義塾大学・医学部・講師
公募研究	研究代表者	鈴木 団	早稲田大学・重点領域研究機構・主任研究員 (研究院准教授)
公募研究	研究代表者	小暮健太郎	京都薬科大学・薬学部・教授
公募研究	研究代表者	岩崎泰彦	関西大学・工学部・教授
公募研究	研究代表者	三好大輔	甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授
公募研究	研究代表者	今井陽介	東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
公募研究	研究代表者	安井隆雄	名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・助教
公募研究	研究代表者	許 岩	大阪府立大学・公私立大学の部局等・講師
公募研究	研究代表者	岡村陽介	東海大学・付置研究所・講師
学術調査官		澁谷忠弘	横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授
学術調査官		熊田亜紀子	東京大学・大学院工学系研究科・准教授
学術調査官		濱島義隆	静岡県立大学・薬学部・教授
評価委員		和田昭允	理化学研究所
評価委員		神原秀記	日立製作所中央研究所
評価委員		岡野光夫	東京女子医科大学
評価委員		片岡一則	東京大学
評価委員		馬場嘉信	名古屋大学

2. 研究経費

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	211,673,000	63,501,000	275,174,000
平成 24 年度	253,700,000	76,110,000	329,810,000
平成 25 年度	196,300,000	58,890,000	255,190,000
平成 26 年度	160,800,000	48,240,000	209,040,000
平成 27 年度	157,300,000	47,190,000	204,490,000
平成 28 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	982,773,000	294,831,000	1,277,604,000

3. 研究発表

<ア・雑誌論文> (すべて査読あり)

【A01】ナノメディシンの分子科学 (分子情報測定)

【A01】「細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析」(代表者：樋口秀男・分担者：茅 元司)

1. K. Gonda, M. Miyashita, H. Higuchi, H. Tada, TM. Watanabe, M. Watanabe, T. Ishida, N. Ohuchi. Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging. *Sci Rep.* **5**, 14322 (2015)
2. C. Shingyoji, I. Nakano, Y. Inoue, H. Higuchi. Dynein arms are strain-dependent direction-switching force generators. *Cytoskeleton* **72**(8), 388-401 (2015)
3. R. Nakao, K. Kikushima, H. Higuchi, N. Obana, N. Nomura, D. Bai, M. Ohnishi, H. Senpuku. A novel approach for purification and selective capture of membrane vesicles of the periodontopathic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*: membrane vesicles bind to magnetic beads coated with epoxy groups in a noncovalent, species-specific manner. *PLoS One* **9**(5), e95137 (2014)
4. Y. Suzuki, CN. Roy, W. Promjunyakul, H. Hatakeyama, K. Gonda, J. Imamura, B. Vasudevanpillai, N. Ohuchi, M. Kanzaki, H. Higuchi, M. Kaku. Single quantum dot tracking reveals that an individual multivalent HIV-1 Tat protein transduction domain can activate machinery for lateral transport and endocytosis. *Mol Cell Biol.* **33**(15), 3036-49 (2013)
5. K. Kikushima, S. Kita, H. Higuchi. A non-invasive imaging for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils. *Sci Rep.* **3**, 1913 (2013)

【A01】「生体内ナノ分子計測を利用した心疾患病態の解析」(代表者：福田紀男・分担者：照井貴子、小比類巻生、大山廣太郎、栗原 敏、橋本和弘、本郷賢一、草刈洋一郎)

1. SA. Shintani, K. Oyama, N. Fukuda, S. Ishiwata. High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **457**, 165-170, (2015)
2. K. Oyama, T. Arai, A. Isaka, T. Sekiguchi, H. Itoh, Y. Seto, M. Miyazaki, T. Itabashi, T. Ohki,

- M. Suzuki, S. Ishiwata. Directional bleb formation in spherical cells under temperature gradient. *Biophys J.* **109**(2), 355-64 (2015)
3. K. Oyama, V. Zeeb, Y. Kawamura, T. Arai, M. Gotoh, H. Itoh, T. Itabashi, M. Suzuki, S. Ishiwata. Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater. *Sci Rep.* **5**, 16611 (2015)
 4. F. Kobirumaki-Shimozawa, K. Oyama, T. Shimozawa, A. Mizuno, T. Ohki, T. Terui, S. Minamisawa, S. Ishiwata, N. Fukuda. Nano-imaging of the beating mouse heart in vivo: Importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length per se, in the regulation of cardiac function. *J Gen Physiol.* **147**(1), 53-62 (2016)
 5. SA. Shintani, K. Oyama, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Ohki, S. Ishiwata, N. Fukuda. Sarcomere length nanometry in rat neonatal cardiomyocytes expressed with α -actinin-AcGFP in Z-discs. *Journal of General Physiology* **143**, 513-524 (2014)
 6. F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Inoue, SA. Shintani, K. Oyama, T. Terui, S. Minamisawa, S. Ishiwata, N. Fukuda. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *Journal of Physiological Sciences* **64**, 221-232 (2014)
 7. T. Inoue, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Kagemoto, T. Fujii, T. Terui, Y. Kusakari, K. Hongo, S. Morimoto, I. Ohtsuki, K. Hashimoto, N. Fukuda. Depressed Frank-Starling mechanism in the left ventricular muscle of the knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with troponin T deletion mutation Δ K210. *J Mol Cell Cardiol.* **63**, 69-78 (2013)
 8. F. Kobirumaki-Shimozawa, K. Oyama, T. Serizawa, A. Mizuno, T. Kagemoto, T. Shimozawa, S. Ishiwata, S. Kurihara, N. Fukuda. Sarcomere imaging by quantum dots for the study of cardiac muscle physiology. *J Biomed Biotechnol.* **2012**, 313814 (2012)
 9. K. Oyama, A. Mizuno, SA. Shintani, H. Itoh, T. Serizawa, N. Fukuda, M. Suzuki, S. Ishiwata. Microscopic heat pulses induce contraction of cardiomyocytes without calcium transients. *Biochem Biophys Res Commun.* **417**, 607 (2012)
 10. S. Higuchi, Y. Tsukasaki, N. Fukuda, S. Kurihara, H. Fujita. Thin filament-reconstituted skinned muscle fibers for the study of muscle physiology. *J Biomed Biotechnol.* **2011**, 486021 (2011)

【A01】「細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析」(代表者：由井伸彦・分担者：金野智浩、徐知勲、田村篤志)

1. M. Terauchi, T. Inada, A. Tonegawa, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui. Supramolecular inclusion complexation of simvastatin with methylated β -cyclodextrins for promoting osteogenic differentiation. *Int. J. Biol. Macromol.* **93**(Pt B), 1492-1498 (2016)
2. A. Tamura, N. Yui. β -Cyclodextrin-threaded biocleavable polyrotaxanes ameliorate impaired autophagic flux in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* **290**(15), 9442-9454 (2015)
3. K. Nishida, A. Tamura, N. Yui. Acid-labile polyrotaxane exerting endolysosomal pH-sensitive supramolecular dissociation for therapeutic applications. *Polym. Chem.* **6**(21), 4040-4047 (2015)
4. S. Yamada, Y. Sanada, A. Tamura, N. Yui, K. Sakurai. Chain architecture and flexibility of α -cyclodextrin/PEG polyrotaxanes in dilute solutions. *Polym. J.* **47**(6), 464-467 (2015)
5. M. Terauchi, G. Ikeda, K. Nishida, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui. Supramolecular polyelectrolyte complexes of bone morphogenetic protein-2 with sulfonated polyrotaxanes to induce enhanced osteogenic differentiation. *Macromol. Biosci.* **15**(7), 953-964

- (2015)
6. A. Tamura, G. Ikeda, K. Nishida, N. Yui. Cationic polyrotaxanes as a feasible framework for the intracellular delivery and sustainable activity of anionic enzymes: a comparison study with methacrylate-based polycations. *Macromol. Biosci.* **15**(8), 1134-1145 (2015)
 7. Y. Xu, K. Mawatari, T. Konno, T. Kitamori, K. Ishihara. Spontaneous packaging and hypothermic storage of mammalian cells with a cell-membrane-mimetic polymer hydrogel in a microchip. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**(41) 23089-23097 (2015)
 8. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara. Efficient differentiation of stem cells encapsulated in a cytocompatible phospholipid polymer hydrogel with tunable physical properties. *Biomaterials* **56** 86-91 (2015)
 9. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Building cell-containing multilayered phospholipid polymer hydrogels for controlling diffusion of bioactive reagent. *RSC Adv.* **5** 44408-44415 (2015)
 10. Y. Ueda, T. Konno, K. Ishihara, N. Sugimoto, D. Miyoshi. DNA structures under molecular crowding conditions with a phosphorylcholine derivative (MPC). *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **40**(2), 99-102 (2015)
 11. X. Lin, T. Konno, K. Ishihara. Redox-active cytocompatible phospholipid polymer hydrogels for three-dimensional electrical control of encapsulated living cells. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **40**(2) 119-122 (2015)
 12. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Phospholipid polymer multilayered hydrogels containing cells for cancer drug screening. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **40**(1) 59-63 (2015)
 13. A. Tamura, M. Tokunaga, Y. Iwasaki, N. Yui. Spontaneous assembly into pseudopolyrotaxane between cyclodextrins and biodegradable polyphosphoester ionomers. *Macromol. Chem. Phys.* **215**(7), 648-653 (2014)
 14. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara. Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for encapsulation to provide unified quality cells. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **39**(3), 279-282 (2014)
 15. X. Lin, T. Konno, K. Ishihara. Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobe conjugated with molecular beacons. *Biomacromolecules* **15**(1), 150-157 (2014)
 16. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Quantitating distance-dependent, indirect cell-cell interactions with a multilayered phospholipid polymer hydrogel. *Biomaterials* **35**(7), 2181-2187 (2014)
 17. J. Choi, T. Konno, K. Ishihara. Multilayered phospholipid polymer hydrogels for releasing cell growth factors. *Biomaterials and Biomedical Engineering* **1**(1), 1-12 (2014)
 18. N. Yokoyama, JH. Seo, A. Tamura, Y. Sasaki, N. Yui. Tailoring the supramolecular structure of aminated polyrotaxanes toward enhanced cellular internalization. *Macromolecular Bioscience* **14**(3), 359-68 (2014)
 19. A. Tamura, N. Yui. Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating Niemann-Pick type C disease. *Sci. Rep.* **4**, 4356 (2014)
 20. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. A simple procedure to prepare precise spatial multicellular phospholipid polymer hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **108**, 345-351 (2013)
 21. A. Tamura, G. Ikeda, JH. Seo, K. Tsuchiya, H. Yajima, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, N. Yui. Molecular logistics using cytoleavable polyrotaxanes for the reactivation of enzymes delivered

- in living cells. *Scientific Reports* **3**, 2252 (2013)
22. A. Tamura, N. Yui. A supramolecular endosomal escape approach for enhancing gene silencing of siRNA using acid-degradable cationic polyrotaxanes. *Journal of Materials Chemistry B* **1**, 3535-3544 (2013)
 23. I. Fukumoto, A. Tamura, M. Matsumura, H. Miura, N. Yui. Sensitization potential of dental resins: 2-hydroxyethyl methacrylate and its water-soluble oligomers induce immunostimulatory effect. *PLoS One* **8**, e8254 (2013)
 24. T. Aikawa, T. Konno, K. Ishihara, Phospholipid polymer hydrogel microsphere modulates the cell cycle profile of encapsulated cells, *Soft Matter* **9**(18), 4628-4634 (2013)
 25. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara, The use of the mechanical microenvironment of phospholipid polymer hydrogels to control cell behavior, *Biomaterials* **34**(24), 5891-5896 (2013)
 26. B. Byambaa, T. Konno, K. Ishihara, Detachment of cells adhered on the photoreactive phospholipid polymer surface by photoirradiation and their functionality, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **103**, 489-495 (2013)
 27. A. Tamura, N. Yui. Cellular internalization and gene silencing of siRNA polyplexes by cytocleavable cationic polyrotaxanes with tailored rigid backbones. *Biomaterials* **34**, 2480-2491 (2013)
 28. X. Lin, K. Nishio, T. Konno, K. Ishihara, The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices, *Biomaterials* **33**(33), 8221-8227 (2012)
 29. T. Aikawa, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, Spherical phospholipid polymer hydrogel for cell encapsulation prepared with a flow-focusing microfluidic channel device. *Langmuir* **28**(4), 2145-2150 (2012)

【A02】 ナノメディシンのための分子科学（分子情報導出）

【A02】「バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス」（代表者：石原一彦・分担者：井上祐貴）

1. B. Byambaa, T. Konno, K. Ishihara. Photoinduced detachment of cells adhered on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer via a cell-binding molecule by forming photocleavable linkage, *Funct React Polym.* **104**, 30–37 (2016)
2. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Phospholipid polymer multilayered hydrogels containing cells for cancer drug screening. *Trans Mat Res Soc Jpn.* **40**(1), 59-63 (2015)
3. X. Lin, T. Konno, K. Ishihara. Redox-active cytocompatible phospholipid polymer hydrogels for three-dimensional electrical control of encapsulated living cells. *Trans Mat Res Soc Jpn.* **40**(2), 119-122 (2015)
4. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Building cell-containing multilayered phospholipid polymer hydrogels for controlling diffusion of bioactive reagent. *RSC Adv*, **5**, 44408-44415 (2015)
5. S. Sakata, Y. Inoue, K. Ishihara. Molecular interaction forces generated during the protein adsorption to well-defined polymer brush surfaces. *Langmuir* **31**(10), 3108-3114 (2015)
6. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara. Efficient differentiation of stem cells encapsulated in a cytocompatible phospholipid polymer hydrogel with tunable physical properties. *Biomaterials* **36**, 86-91 (2015)
7. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Fabrication of a live cell-containing multilayered polymer

- hydrogel membrane with micrometer-scale thickness to evaluate pharmaceutical activity. *J Biomater Sci Polym Ed*, **26**(18), 1372-1385 (2015)
8. W. Chen, Y. Inoue, K. Ishihara. Preparation of photoreactive phospholipid polymer nanoparticles to immobilize and release protein by photoirradiation. *Colloid Surf B: Biointerfaces* **135**, 356-370 (2015)
 9. Y. Liu, Y. Inoue, K. Ishihara. Surface functionalization of quantum dots with fine-structured pH-sensitive phospholipid polymer chains. *Colloid Surf B: Biointerfaces* **135**, 490-496 (2015)
 10. Y. Xu, K. Mawatari, T. Konno, T. Kitamori, K. Ishihara. Spontaneous packaging and hypothermic storage of mammalian cells with a cell-membrane-mimetic polymer hydrogel in a microchip. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**(41), 23089-23097 (2015)
 11. J. Choi, T. Konno, K. Ishihara. Multilayered phospholipid polymer hydrogels for releasing cell growth factors. *Biomaterials & Biomedical Engineering* **1**(1), 1-12(2014)
 12. T. Goda, P. Kjall, K. Ishihara, A. Richter-Dahlfors, Y. Miyahara. Biomimetic interfaces reveal activation dynamics of C-reactive protein in local microenvironments. *Adv Healthcare Mater*, **3**(11), 1733-1738 (2014)
 13. S. Chantasirichot, Y. Inoue, K. Ishihara. Amphiphilic triblock phospholipid copolymers bearing phenylboronic acid groups for spontaneous formation of hydrogels with tunable mechanical properties. *Macromolecules* **47**(9), 3128-3135 (2014)
 14. H.I. Kim, K. Ishihara. Phospholipid polymer modification can reduce cytotoxicity of poly(lactic acid) nanoparticles in a high-content screening assay. *Biomaterials & Biomedical Engineering* **1**(2), 95-104 (2014)
 15. X. Lin, K. Ishihara. Water-soluble polymer bearing phosphorylcholine group and other zwitterionic groups for carrying DNA derivatives. *J Biomater Sci Polym Edn.* **25**(14-15), 1461-1478(2014)
 16. N. Machida, Y. Inoue, K. Ishihara. Phospholipid polymer-covered magnetic nanoparticles for tracking intracellular molecular reaction. *Trans Mat Res Soc Jpn.* **39**(4) 185-188 (2014)
 17. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara. Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for encapsulation to provide unified quality cells. *Trans Mat Res Soc Jpn.* **39**(3) 279-282 (2014)
 18. X. Lin, T. Konno, K. Ishihara. Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobe conjugated with molecular beacons. *Biomacromolecules* **15**(1), 150-157 (2014)
 19. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. Quantitating distance-dependent, indirect cell-cell interactions by using a multilayered phospholipid polymer hydrogel. *Biomaterials* **35**(7), 2181-2187 (2014)
 20. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara. A simple procedure to prepare precise spatial multicellular phospholipid polymer hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **108**, 345-351 (2013)
 21. T. Aikawa, T. Konno, K. Ishihara. Phospholipid polymer hydrogel microsphere modulates the cell cycle profile of encapsulated cells. *Soft Matter* **9**(18), 4628-4634 (2013)
 22. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara. The use of the mechanical microenvironment of phospholipid polymer hydrogels to control cell behavior. *Biomaterials* **34**(24), 5891-5896 (2013)
 23. B. Byambaa, T. Konno, K. Ishihara. Detachment of cells adhered on the photoreactive phospholipid polymer surface by photoirradiation and their functionality. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **103**, 489-495 (2013)

24. K. Ishihara, Y. Tsukamoto, Y. Goto, Y. Inoue. Enhanced and specific internalization of polymeric nanoparticles to cells. *IFMBE proceedings*, **40**, 262-265 (2013)
25. Y.R. Silberberg, S. Mieda, Y. Amemiya, T. Sato, T. Kihara, N. Nakamura, K. Fukazawa, K. Ishihara, J. Miyake, Chikashi Nakamura. Evaluation of the actin cytoskeleton state using an antibody-functionalized nanoneedle and an AFM. *Biosens Bioelectron.* **40**(1), 3-9 (2013)
26. X. Lin, K. Nishio, T. Konno, K. Ishihara. The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices. *Biomaterials* **33**(33), 8221-8227 (2012)
27. S. Mieda, Y. Amemiya, T. Kihara, T. Okada, T. Sato, K. Fukazawa, K. Ishihara, N. Nakamura, J. Miyake, C. Nakamura. Mechanical force-based probing of intracellular proteins from living cells using antibody-immobilized nanoneedles. *Biosens Bioelectron.* **15**(1) 323-329 (2012)
28. T. Aikawa, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara. Spherical phospholipid polymer hydrogel for cell encapsulation prepared with a flow-focusing microfluidic channel device. *Langmuir* **28**(4), 2145-2150 (2012)
29. K. Ishihara, Y. Goto, R. Matsuno. Biomimetic polymer nanoparticles embedding quantum dots. *MRS proceeding 1357*, mrss11-1357-1106-07 (2011)

【A02】「直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製」（代表者：三宅 淳・分担者：木原隆典、新岡宏彦、田中信行）

1. S. Fukushima, T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, T. Sannomiya, J. Miyake, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto. Synthesis of Y2O3 nanophosphors by homogeneous precipitation method using excessive urea for cathodoluminescence and upconversion luminescence bioimaging, *Optical Materials Express.* **6**, 813 (2016)
2. T. Furukawa, S. Fukushima, H. Niioka, N. Yamamoto, J. Miyake, T. Araki, and M. Hashimoto. Rare-earth-doped nanophosphors for multi-color cathodoluminescence nano-bioimaging using scanning transmission electron microscopy. *Journal of Biomedical Optics* **20**, 056007 (2015)
3. SMA. Haghparast, T. Kihara, J. Miyake. Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states. *PeerJ*, **3**, e1131 (2015)
4. K. Tachibana, SMS Haghparast, J. Miyake. Inhibition of cell adhesion by phosphorylated Ezrin/Radixin/Moesin. *Cell Adhesion & Migration* **9**, 502 (2015)
5. S. Fukushima, T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, J. Miyake, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto. Y2O3:Tm,Yb Nanophosphors for Correlative Upconversion Luminescence and Cathodoluminescence Imaging. *Micron*, **67**, 90-95 (2014)
6. T. Kihara, J. Ito, J. Miyake. Measurement of Biomolecular Diffusion in Extracellular Matrix Condensed by Fibroblasts Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *PLoS ONE* **8**, e82382 (2013)
7. SMA. Haghparast, T. Kihara, Y. Shimizu, S. Yuba, J. Miyake. Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **116**, 380-385 (2013)
8. T. Kihara, T. Yoshida, SMA. SHaghparast, J. Miyake. Elasticity Mapping Analysis of Apical Cell Periphery Actin Structures of Normal Fibroblasts and Cervical Cancer Cells, *Journal of Analytical Sciences. Methods and Instrumentation* **3**, 124-129 (2013)

【A02】「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」(代表者：丸山厚・分担者：嶋田直彦、狩野有宏)

1. A. Fujihara, N. Shimada, A. Maruyama, K. Ishihara, K. Nakai, SI. Yusa. Preparation of upper critical solution temperature (UCST) responsive diblock copolymers bearing pendant ureido groups and their micelle formation behavior in water. *Soft Matter* **11**, 5204-13 (2015)
2. J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama. Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers. *Biomaterials Science* **3**, 308-16 (2015)
3. K. Kawai, A. Maruyama. Triple helix conformation-specific blinking of Cy3 in DNA. *Chem. Commun.* **51**, 4861-4864 (2015)
4. J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama. MNAzyme-catalyzed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer. *Biomaterials Science* **3**, 716-20 (2015)
5. K. Kawai, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima. DNA microenvironment monitored by controlling redox blinking. *BioPhysBio.* **16**, 3590-3594 (2015)
6. N. Shimada, H. Kinoshita, S. Tokunaga, T. Umegae, N. Kume, W. Sakamoto, A. Maruyama. Inter-polyelectrolyte nano-assembly induces folding and activation of functional peptides. *J Controlled Release* **218**, 45-52 (2015)
7. A. Maruyama, N. Sonda, K. Yamasaki, M. Hirano, S. Kidoaki, N. Shimada, M. Maeshiro, M. Miyazaki. Cationic Comb-Type Copolymer Excludes Intercalating Dye from DNA Without Inducing DNA Condensation. *Current Nanoscience* **10**, 185-8 (2014)
8. D. Miyoshi, Y. M. Ueda, N. Shimada, S. I. Nakano, N. Sugimoto, A. Maruyama. Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine comb-type copolymer with hydrophilic graft chain. *ChemMedChem.* **9**, 2156-63 (2014)
9. N. Shimada, S. Kidoaki, A. Maruyama. Smart hydrogels exhibiting UCST-type volume changes under physiologically relevant conditions. *RSC Advances* **4**, 52346-8 (2014)
10. N. Shimada, W. Song, A. Maruyama. DNA strand exchange reaction activated by cationic comb-type copolymers having ureido groups. *Biomaterials Science* **2**, 1480-5 (2014)
11. A. Kano, Y. Taniwaki, I. Nakamura, N. Shimada, K. Moriyama, A. Maruyama. Tumor delivery of Photofrin® by PLL-g-PEG for photodynamic therapy. *J Contr Release* **167**, 315-21 (2013)
12. J. Du, L. Wu, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama. Polyelectrolyte-assisted transconformation of a stem-loop DNA. *Chem Commun.* **49**, 475-7 (2013)
13. N. Shimada, M. Nakayama, A. Kano, A. Maruyama. Design of UCST Polymers for Chilling Capture of Proteins. *Biomacromolecules* **14**, 1452-7 (2013)

【A03】ナノメディシンを用いた分子科学 (分子情報応用)

【A03】「多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御」(代表者：岩田博夫・分担者：岡本行広、北村成史、有馬祐介)

1. Y. Okamoto, Y. Tsujimoto, H. Umakoshi. Electrophoretic separation method for membrane pore-forming proteins in multilayer lipid membranes. *Electrophoresis* **37**(5-6), 762-768 (2016)
2. Y. Okamoto, T. Ikeda, K. Suga, Hiroshi Umakoshi. Development of in situ cell surface modification for surface enhanced Raman analysis of cell membrane. *Chem. Lett.* **45**, 622-624 (2016)

3. Y. Arima, H. Iwata. Preferential adsorption of cell adhesive proteins from complex media on self-assembled monolayers and its effect on subsequent cell adhesion. *Acta Biomater.* **26**, 72-81 (2015)
4. T. Itagaki, Y. Arima, R. Kuwabara, N. Kitamura, H. Iwata. Interaction between cells and poly(ethylene glycol)-lipid conjugates. *Colloids Surf. B.* **135**, 765-773 (2015)
5. T. Komura, K. Kato, S. Konagaya, T. Nakaji-Hirabayashi, H. Iwata. Optimization of surface-immobilized extracellular matrices for the proliferation of neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. *Biotechnol Bioeng.* **112**, 2388-2396 (2015)
6. M. Komatsu, S. Konagaya, EY. Egawa, H. Iwata. Maturation of human iPS cell-derived dopamine neuron precursors in alginate-Ca²⁺ hydrogel. *BBA-Gen. Subjects* **1850**, 1669-1675 (2015)
7. EY. Egawa, N. Kitamura, R. Nakai, Y. Arima, H. Iwata. A DNA hybridization system for labeling of neural stem cells with SPIO nanoparticles for MRI monitoring post-transplantation. *Biomaterials* **54**, 158-167 (2015)
8. T. Matsui, Y. Arima, N. Takemoto, H. Iwata. Cell patterning on polylactic acid through surface-tethered oligonucleotides. *Acta Biomater.* **13**, 32-41 (2015)
9. N. Takemoto, S. Konagaya, R. Kuwabara, H. Iwata. Co-aggregates of regulatory T cells and islet cells allow long-term graft survival in liver without immunosuppression. *Transplantation* **99**, 942-947 (2015)
10. 岡本行広, 日比野理人, 加地範匡, 渡慶次学, 馬場嘉信. マイクロ抽出場によるヒト腫瘍細胞由来のマイクロ RNA 抽出法. *分析化学* **64**, 9-13 (2015)
11. IT. Hoffecker, N. Takemoto, Y. Arima, H. Iwata. Sequence-specific nuclease-mediated release of cells tethered by oligonucleotide phospholipids. *Biomaterials* **53**, 318-329 (2015)
12. S. Konagaya, H. Iwata. Microencapsulation of dopamine neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochim Biophys Acta.* **1850**, 22-32 (2014)
13. S. Deno, N. Takemoto, H. Iwata. Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surfaces through DNA hybridization. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 350-357 (2014)
14. N. Takemoto, X. Liu, K. Takii, Y. Teramura, H. Iwata, Transplantation of co-aggregates of Sertoli cells and islet cells into liver without immunosuppression. *Transplantation* **97**, 287-293 (2014)
15. IT. Hoffecker, H. Iwata. Manipulation of cell sorting within mesenchymal stromal cell-islet cell multicellular spheroids. *Tissue Eng. Part A*, **20**, 1643-1653 (2014)
16. N. Kitamura, R. Nakai, H. Kohda, K. Furuta-Okamoto, H. Iwata. Labeling of islet cells with iron oxide nanoparticles through DNA hybridization for highly sensitive detection by MRI. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 7175-7181 (2013)
17. K. Sakurai, IT. Hoffecker, H. Iwata. Long term culture of cells patterned on glass via membrane-tethered oligonucleotides. *Biomaterials* **34**(2), 361-370 (2013)

【A03】「がんリンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発」（代表者：権田幸祐）

1. Y. Kobayashi, H. Matsud, T. Li, K. Shibuya, Y. Kubota, T. Oikawa, T. Nakagawa, K. Gonda. Fabrication of quantum dot/silica core-shell particles immobilizing Au nanoparticles and their dual imaging functions. *Applied Nanoscience* **6**, 301-307 (2016)

2. Y. Kobayashi, K. Shibuya, M. Tokunaga, Y. Kubota, T. Oikawa, K. Gonda. Preparation of high-concentration colloidal solution of silica-coated gold nanoparticles and their application to X-ray imaging. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **78**, 82-90 (2016)
3. Y. Kobayashi, T. Ayame, K. Shibuya, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi. Stabilization of Silica-Coated Silver Iodide Nanoparticles, *Pigment & Resin Technology* **45**(2), 99-105 (2016)
4. Y. Kobayashi, H. Morimoto, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi. Fabrication of gadolinium hydroxide nanoparticles using ion-exchange resin and their MRI property. *Journal of Asian Ceramic Societies* **4**(1) 138-142 (2016)
5. K. Gonda, M. Miyashita, H. Higuchi, H. Tada, TM. Watanabe, M. Watanabe, T. Ishida, N. Ohuchi. Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging. *Scientific Reports* **5**, 14322 (2015)
6. K. Gonda, Y. Hamada, N. Kitamura, H. Tada, M. Miyashita, T. Kamei, T. Ishida, N. Ohuchi. Highly sensitive imaging of cancer with functional nanoparticles. *Journal of Photopolymer Science and Technology* **28**, 731-736 (2015)
7. Y. Kobayashi, R. Nagasu, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi. Preparation of Au/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticle colloid solution and its use in x-ray imaging process. *Nanocomposites* **2**, 83-88 (2015)
8. Y. Kobayashi, H. Matsudo, Y. Kubota, T. Nakagawa, K. Gonda, N. Ohuchi. Preparation of silica-coated quantum dot nanoparticle colloid solutions and their application in in-vivo fluorescence imaging. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **48**, 112-117 (2015)
9. Y. Kobayashi, R. Nagasu, K. Shibuya, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi. Synthesis of a colloid solution of silica-coated gold nanoparticles for X-ray imaging applications, *J Nanopart Res.* **16**, 1-13 (2014)
10. K. Gonda, M. Miyashita, M. Watanabe, Y. Takahashi, H. Goda, H. Okada, Y. Nakano, H. Tada, M. Amari, N. Ohuchi. Development of a quantitative diagnostic method of estrogen receptor expression levels by immunohistochemistry using organic fluorescent material-assembled nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **426**, 409-414 (2012)

【A03】「遺伝子解析と分子トレーシングを基盤とした細胞標的分子の創製」（代表者：夏目敦至・分担者：千賀 威、宇理須恒雄）

1. MA. Mansour, T. Hyodo, KA. Akter, T. Kokuryo, K. Uehara, M. Nagino, T. Senga. SATB1 and SATB2 play opposing roles in c-Myc expression and progression of colorectal cancer. *Oncotarget* **7**, 4993-5006 (2016)
2. KA. Akter, MA. Mansour, T. Hyodo, S. Ito, M. Hamaguchi, T. Senga. FAM98A is a novel substrate of PRMT1 required for tumor cell migration, invasion, and colony formation. *Tumour Biol.* **37**(4), 4531-9 (2016)
3. KA. Akter, T. Hyodo, E. Asano, N. Sato, MA. Mansour, S. Ito, M. Hamaguchi, T. Senga. UBE2S is associated with malignant characteristics of breast cancer cells. *Tumour Biol.* **37**(1), 763-72 (2016)
4. M. Maeda, H. Hasegawa, M. Sugiyama, T. Hyodo, S. Ito, D. Chen, E. Asano, A. Masuda, Y. Hasegawa, M. Hamaguchi, T. Senga. Arginine methylation of ubiquitin-associated protein 2-like

- is required for the accurate distribution of chromosomes. *FASEB J.* **30**, 312-23 (2016)
5. S. Shiina, M. Ohno, F. Ohka, S. Kuramitsu, A. Yamamichi, A. Kato, K. Motomura, K. Tanahashi, T. Yamamoto, R. Watanabe, I. Ito, T. Senga, M. Hamaguchi, T. Wakabayashi, M. K. Kaneko, Y. Kato, V. Chandramohan, DD. Bigner, A. Natsume, CAR T Cells Targeting Podoplanin Reduce Orthotopic Glioblastomas in Mouse Brains. *Cancer Immunol Res.* **4**, 259-268 (2016)
 6. M. Kurimoto, H. Suzuki, K. Aoki, F. Ohka, G. Kondo, K. Motomura, K. Iijima, A. Yamamichi, M. Ranjit, T. Wakabayashi, S. Kimura, A. Natsume. Rapid sensitive analysis of IDH1 mutation in lower-grade gliomas by automated genetic typing involving a quenching probe. *Cancer Invest.* **34**(1), 12-5 (2016)
 7. H. Yuan, H. Kajiyama, S. Ito, D. Chen, K. Shibata, M. Hamaguchi, F. Kikkawa, T. Senga. HOXB13 and ALX4 induce SLUG expression for the promotion of EMT and cell invasion in ovarian cancer cells. *Oncotarget* **6**, 13359-70 (2015)
 8. MA. Mansour, T. Hyodo, S. Ito, K. Kurita, T. Kokuryo, K. Uehara, M. Nagino, M. Takahashi, M. Hamaguchi, T. Senga. SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling. *FEBS J.* **282**, 1394-405 (2015)
 9. S. Kuramitsu, M. Ohno, F. Ohka, S. Shiina, A. Yamamichi, A. Kato, K. Tanahashi, K. Motomura, G. Kondo, M. Kurimoto, T. Senga, T. Wakabayashi, A. Natsume. Lenalidomide enhances the function of chimeric antigen receptor T cells against the epidermal growth factor receptor variant III by enhancing immune synapses. *Cancer Gene Ther.* **22**(10), 487-95 (2015)
 10. S. Yamamuro, E. Sano, Y. Okamoto, Y. Ochiai, T. Ohta, A. Ogino, A. Natsume, T. Wakabayashi, T. Ueda, H. Hara, T. Nakayama, A. Yoshino, Y. Katayama. Antitumorogenic effect of interferon- β by inhibition of undifferentiated glioblastoma cells. *Int J Oncol.* **47**(5), 1647-54 (2015)
 11. M. Ranjit, K. Motomura, F. Ohka, T. Wakabayashi, A. Natsume. Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* **32**(3), 153-62 (2015)
 12. K. Tanahashi, A. Natsume, F. Ohka, K. Motomura, A. Alim, I. Tanaka, T. Senga, I. Harada, R. Fukuyama, N. Sumiyoshi, Y. Sekido, T. Wakabayashi. Activation of Yes-associated protein in low-grade meningiomas is regulated by merlin, cell density, and extracellular matrix stiffness. *J Neuropathol Exp Neurol.* **74**(7), 704-9 (2015)
 13. Y. Ohkawa, H. Momota, A. Kato, N. Hashimoto, Y. Tsuda, N. Kotani, K. Honke, A. Suzumura, K. Furukawa, Y. Ohmi, A. Natsume, T. Wakabayashi, K. Furukawa. Ganglioside GD3 enhances invasiveness of gliomas by forming a complex with platelet-derived growth factor receptor α and Yes kinase. *J Biol Chem.* **290**(26), 16043-58 (2015)
 14. H. Suzuki, K. Aoki, K. Chiba, Y. Sato, Y. Shiozawa, Y. Shiraishi, T. Shimamura, A. Niida, K. Motomura, F. Ohka, T. Yamamoto, K. Tanahashi, M. Ranjit, T. Wakabayashi, T. Yoshizato, K. Kataoka, K. Yoshida, Y. Nagata, A. Sato-Otsubo, H. Tanaka, M. Sanada, Y. Kondo, H. Nakamura, M. Mizoguchi, T. Abe, Y. Muragaki, R. Watanabe, I. Ito, S. Miyano, A. Natsume, S. Ogawa. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet.* **47**(5), 458-68 (2015)
 15. M. Sugiyama, H. Hasegawa, S. Ito, K. Sugiyama, M. Maeda, K. Aoki, T. Wakabayashi, M. Hamaguchi, A. Natsume, T. Senga. Paired related homeobox 1 is associated with the invasive

- properties of glioblastoma cells. *Oncol Rep.* **33**(3), 1123-30 (2015)
16. D. Umebayashi, A. Natsume, H. Takeuchi, M. Hara, Y. Nishimura, R. Fukuyama, N. Sumiyoshi, T. Wakabayashi. Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *J Neurotrauma* **31**, 1967-74, (2014)
 17. T. Tsujiuchi, A. Natsume, K. Motomura, G. Kondo, M. Ranjit, R. Hachisu, I. Sugimura, S. Tomita, I. Takehara, M. Woolley, NU Barua, SS. Gill, AS. Bienemann, Y. Yamashita, S. Toyokuni, T. Wakabayashi. Preclinical evaluation of an O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-siRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains. *Am J Transl Res.* **6**, 169-78 (2014)
 18. A. Natsume, M. Ito, K. Katsushima, F. Ohka, A. Hatanaka, K. Shinjo, S. Sato, S. Takahashi, Y. Ishikawa, I. Takeuchi, H. Shimogawa, M. Uesugi, H. Okano, SU. Kim, T. Wakabayashi, JP. Issa, Y. Sekido, Y. Kondo. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res.* **73**, 4559-70 (2013)

【前期公募】「人工細胞系に構成した細胞膜受容体・細胞骨格複合ナノ装置の動作解析」（代表者：湊元幹太）

1. T. Hattori, K. Nakanishi, T. Mori, M. Tomita, K. Tsumoto. The method used to culture host cells (SF9 cells) can affect the qualities of baculovirus budding particles expressing recombinant proteins. *Biotechnology, and Biochemistry* **80**(3), 445-451 (2016)
2. T. Shimizu, T. Mori, M. Tomita, K. Tsumoto. pH Switching That Crosses over the Isoelectric Point (pI) Can Improve the Entrapment of Proteins within Giant Liposomes by Enhancing Protein-Membrane Interaction. *Langmuir* **30**(2), 554-563 (2014)
3. T. Mori, K. Kamiya, M. Tomita, T. Yoshimura, K. Tsumoto. Incorporation of adenylate cyclase into membranes of giant liposomes using membrane fusion with recombinant baculovirus-budded virus particles. *Biotechnology Letters* **36**(6), 1253-1261 (2014)

【前期公募】「歩くナノ〇〇計の創成」（代表者：鈴木団）

【後期公募】「高精度の位置決めと環境測定を細胞内において一粒で可能にする粒状蛍光プローブ」（代表者：鈴木団）

1. Y. Hou, S. Arai, T. Kitaguchi, M. Suzuki. Intracellular bottom-up generation of targeted nanosensors for single-molecule imaging. *Nanoscale* **8**, 3218-3225 (2016)
2. S. Arai, Ferdinandus, S. Takeoka, S. Ishiwata, H. Sato, M. Suzuki. Micro-thermography in millimeter-scale animals by orally-dosed fluorescent nanoparticle thermosensors. *Analyst* **140**, 7534-7539 (2015) (Inside front cover)
3. M. Suzuki, V. Zeeb, S. Arai, K. Oyama, S. Ishiwata. The 105 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry. *Nat. Methods.* **12**, 802-803 (2015)
4. A. Marino, S. Arai, Y. Hou, E. Sinibaldi, M. Pellegrino, YT. Chang, B. Mazzolai, V. Mattoli, M. Suzuki, G. Ciofani. Piezoelectric nanoparticle-assisted wireless neuronal stimulation. *ACS Nano* **9**(7), 7678-7689 (2015)
5. K. Oyama, T. Arai, A. Isaka, T. Sekiguchi, H. Itoh, Y. Seto, M. Miyazaki, T. Itabashi, T. Ohki, M. Suzuki, S. Ishiwata. S. Directional bleb formation in spherical cells under temperature

- gradient, *Biophys. J.* **109**(2), 355-364 (2015)
6. K. Oyama, V. Zeeb, Y. Kawamura, T. Arai, M. Gotoh, H. Itoh, T. Itabashi, M. Suzuki, S. Ishiwata. Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater. *Sci. Rep.* **5**, 16611 (2015)
 7. S. Arai, S.C. Lee, D. Zhai, M. Suzuki, Y.T. Chang. A Molecular Fluorescent Probe for Targeted Visualization of Temperature at the Endoplasmic Reticulum. *Sci. Rep.* **4**, 6701 (2014)
 8. Ferdinandus, S. Arai, S. Ishiwata, M. Suzuki, H. Sato. Oral Dosing of Chemical Indicators for In Vivo Monitoring of Ca²⁺ Dynamics in Insect Muscle. *PLoS ONE* **10**(1), e0116655 (2015)
 9. Y. Takei, S. Arai, A. Murata, M. Takabayashi, K. Oyama, S. Ishiwata, S. Takeoka M. Suzuki. A Nanoparticle-Based Ratiometric and Self-Calibrated Fluorescent Thermometer for Single Living Cells. *ACS Nano* **8**(1), 198-206 (2014)
 10. S. Arai, S. Hirose, Y. Oguchi, M. Suzuki, A. Murata, S. Ishiwata, S. Takeoka. Mass Spectrometric Screening of Ligands with Lower Off-rate from a Clicked-based Pooled Library. *ACS Comb. Sci.* **14**(8), 451-455 (2012)

【前期公募】「三光子励起自家蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境変化のその場測定」
(代表者：中林孝和)

【後期公募】「蛍光寿命イメージングを用いた細胞内イオン濃度の動的変化の解明」(代表者：
中林孝和)

1. K. Awasthi, K. Yamamoto, K. Furuya, T. Nakabayashi, L. Li, N. Ohta, Fluorescence Characteristics and Lifetime Images of Photosensitizers of Talaporfin Sodium and Sodium Pheophorbide a in Normal and Cancer Cells. *Sensors* **15**, 11417-11430 (2015)
2. R. Maeda, H. Yaku, T. Nakabayashi, T. Murashima, N. Sugimoto, N. Ohta, D. Miyoshi, DNA G-Quadruplex Detection System Employing a Protein Fibril Ligand. *Telomere and Telomerase* **2** e691 (2015)
3. T. Nakabayashi, MdS. Islam, L. Li, M. Yasuda, N. Ohta. Studies on External Electric Field Effects on Absorption and Fluorescence Spectra of NADH. *Chem. Phys. Lett.* **595-596**, 25-30 (2014)
4. MdS. Islam, M. Honma, T. Nakabayashi, M. Kinjo, N. Ohta. pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1952-1963 (2013)

【前期公募】「細胞ナノ領域と生体微小環境における核酸送達システムの動態と機能発現解析」
(代表者：畠山浩人)

1. T. Watanabe, H. Hatakeyama, C. Matsuda-Yasui, Y. Sato, M. Sudoh, A. Takagi, Y. Hirata, T. Ohtsuki, M. Arai, K. Inoue, H. Harashima, M. Kohara. In vivo therapeutic potential of Dicer-hunting siRNAs targeting infectious hepatitis C virus. *Scientific Reports* **4**, 4750 (2014)
2. Y. Sakura, H. Hatakeyama, Y. Sato, H. Akita, N. Ohga, K. Hida, H. Harashima. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGDmodified liposomal-siRNA system. *J. Control. Release* **173**, 110-118 (2014)
3. H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Sato, M. Takahashi, N. Minakawa, A. Matsuda, H. Harashima. The systemic administration of an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice. *J. Control. Release* **173**,

43-50 (2014)

4. Y. Sato, H. Hatakeyama, Y. Sakurai, M. Hyodo, H. Akita, H. Harashima. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **163**, 267-276 (2012)
5. Y. Sakurai, H. Hatakeyama, Y. Sato, M. Hyodo, H. Akita, H. Harashima. Gene Silencing via RNAi and siRNA Quantification in Tumor Tissue Using MEND, a Liposomal siRNA Delivery System. *Mol. Ther.* **21**(6), 1195-1203 (2013)
6. M. Takahashi, N. Yamada, H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Sato, N. Minakawa, H. Harashima, A. Matsuda. In vitro optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* **41**(22), 10659-10667 (2013)

【前期公募】「イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」(代表者：合田達郎)

【後期公募】「イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」(代表者：合田達郎)

1. T. Goda, Y. Miyahara. Engineered zwitterionic phosphorylcholine monolayers for elucidating multivalent binding kinetics of c-reactive protein. *Acta Biomaterialia* **40**, 46-53 (2016)
2. T. Goda, E. Yamada, Y. Katayama, M. Tabata, A. Matsumoto, Y. Miyahara. Potentiometric responses of ion-selective microelectrode with bovine serum albumin adsorption, *Biosensors and Bioelectronics* **77**, 208-214 (2016)
3. T. Goda, M. Toya, A. Matsumoto, Y. Miyahara. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) bearing phosphorylcholine groups for metal-free, antibody-free, and low-impedance biosensors specific for C-reactive protein. *ACS Applied Materials and Interfaces* **7**(49), 27440-27448 (2015)
4. T. Goda, D. Higashi, A. Matsumoto, T. Hoshi, T. Sawaguchi, Y. Miyahara. Dual aptamer-immobilized surfaces for improved affinity through multiple target binding in potentiometric thrombin biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **73**, 174-180 (2015)
5. T. Goda. Specific interaction of phospholipid polymer with C-reactive protein. *Journal of Photopolymer Science and Technology* **28**(5), 715-718 (2015)
6. T. Goda, P. Kjall, K. Ishihara, A. Richter-Dahlfors, Y. Miyahara. Biomimetic interfaces reveal activation dynamics of C-reactive protein in local microenvironments. *Advanced Healthcare Materials* **3**(11), 1733-1738 (2014)
7. Y. Iwasaki, T. Kimura, M. Orisaka, H. Kawasaki, T. Goda, S. Yusa. Label-free detection of C-reactive protein using highly dispersible gold nanoparticles synthesized by reducible biomimetic block copolymers. *Chemical Communications* **50**(42), 5656-5658 (2014)
8. T. Goda, M. Tabata, M. Sanjoh, M. Uchimura, Y. Iwasaki, Y. Miyahara. Thiolated 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine for an antifouling biosensor platform. *Chemical Communications* **49**(77), 8683-8685 (2013)
9. T. Goda, Y. Miyahara. Label-free and reagent-less protein biosensing using aptamer-modified extended-gate field-effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics* **45**, 89-94 (2013)
10. T. Goda, Y. Miyahara. Interpretation of protein adsorption through its intrinsic electric charges: a comparative study using a field-effect transistor, surface plasmon resonance, and quartz crystal

microbalance. *Langmuir* **28**(41), 14730-14738 (2012)

11. T. Goda, Y. Maeda, Y. Miyahara. Simultaneous monitoring of protein adsorption kinetics using a quartz crystal microbalance and field-effect transistor integrated device. *Analytical Chemistry* **84**(17), 7308-7314 (2012)

【前期公募】「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」(代表者: 檜田 啓)

【後期公募】「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」(代表者: 檜田 啓)

1. M. Hasan, A. Nishimoto, T. Ohgita, S. Hama, H. Kashida, H. Asanuma, K. Kogure. Faint electric treatment-induced rapid and efficient delivery of extraneous hydrophilic molecules into the cytoplasm. *J. Control Release* **228**, 20-25 (2016)
2. H. Kashida, T. Osawa, K. Morimoto, Y. Kamiya, H. Asanuma. Molecular design of Cy3 derivative for highly sensitive in-stem molecular beacon and its application to the wash-free FISH. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 1758-1762 (2015)
3. H. Kashida, N. Higashiyama, T. Kato, H. Asanuma. Evaluation of intrinsic spectroscopic properties of chromophore assemblies by shielding with cyclohexyl base pairs within a DNA duplex. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 6191-6197 (2013)
4. T. Kato, H. Kashida, H. Kishida, H. Yada, H. Okamoto, H. Asanuma. Development of a Robust Model System of FRET using Base Surrogates Tethering Fluorophores for Strict Control of Their Position and Orientation within DNA Duplex. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 741-750 (2013)
5. H. Asanuma, M. Akahane, N. Kondo, T. Osawa, T. Kato, H. Kashida. Quencher-free linear probe with multiple fluorophores on an acyclic scaffold. *Chem. Sci.* **3**, 3165-3169 (2012)

【前期公募】「自己集合型ナノプローブによる細胞内酵素反応のリアルタイム解析」(代表者: 中田栄司)

【後期公募】「自己集合型ナノキャリアの創製」(代表者: 中田栄司)

1. E. Nakata, Y. Nazumi, Y. Yukimachi, Y. Uto, H. Hori, T. Morii. Self-Assembled Fluorescent Nanoprobe for the Detection of Fluoride Ions in Aqueous Solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **88**, 327-329 (2015)
2. T. Ohtsuki, S. Miki, S. Kobayashi, T. Haraguchi, E. Nakata, K. Hirakawa, K. Sumita, K. Watanabe, S. Okazaki. The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide cargophotosensitizer conjugates. *Scientific Reports* **5**, 18577 (2015)
3. E. Nakata, Y. Yukimachi, Y. Nazumi, M. Uwate, H. Maseda, Y. Uto, T. Hashimoto, Y. Okamoto, H. Hori, T. Morii. A novel strategy to design latent ratiometric fluorescent pH probes based on self-assembled SNARF derivatives. *RSC Adv.* **4**, 348 (2014)
4. TA. Ngo, E. Nakata, M. Saimura, T. Kodaki, T. Morii. A protein adaptor to locate a functional protein dimer on molecular switchboard. *Methods* **67**, 142 (2014)
5. C. Annoni, E. Nakata, T. Tamura FF. Liew, S. Nakano, ML. Gelmi, T. Morii. Construction of Ratiometric Fluorescent Sensors by Ribonucleopeptides. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 8767-8769 (2012)

【前期公募】「光増感によるエンドソーム脱出の分子科学」(代表者: 大槻高史)

【後期公募】「光増感剤修飾分子を用いたPGIの分子科学」(代表者: 大槻高史)

1. T. Ohtsuki, S. Miki, S. Kobayashi, T. Haraguchi, E. Nakata, K. Hirakawa, K. Sumita, K. Watanabe, S. Okazaki. The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide-cargo-photosensitizer conjugates. *Scientific Reports* **5**, 18577 (2015)
2. A. Akahoshi, Y. Doi, M. Sisido, K. Watanabe, T. Ohtsuki. Photo-dependent protein biosynthesis using a caged aminoacyl-tRNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **24**, 5369–5372 (2014)
3. Y. Matsushita-Ishiodori, M. Morinaga, K. Watanabe, T. Ohtsuki. Near-infrared light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1669–1673 (2013)

【前期公募】「エンドソーム脱出能チューニングによるウイルス様動的構造変化惹起ナノカプセルの構築」(代表者：原田敦史)

【後期公募】「細胞取込過程の環境変化を認識するナノカプセルの構築と超音波力学療法への展開」(代表者：原田敦史)

1. S. Yamamoto, E. Yuba, A. Harada, K. Kono. Effective condensation of multivalent anions into polyion complex micelles prepared from TiO₂ nanoparticles and polyallylamine bearing poly(ethylene glycol) grafts. *Langmuir* **31**, 8583-8588 (2015)
2. R. Aono, K. Nomura, E. Yuba, A. Harada, K. Kono. Gene expression of ternary complexes through the compaction of nanofiber-polyplexes by mixing with Lipofectamine. *Biomaterials Science* **3**, 764-770 (2015)
3. A. Harada, R. Matsuki, S. Ichimura, E. Yuba, K. Kono. Intracellular Environment-Responsive Stabilization of Polymer Vesicles Formed from Head-Tail type Polycations Composed of Polyamidoamine Dendron and Poly(L-lysine). *Molecules* **18**, 12168-12179 (2013)
4. A. Harada, M. Ono, E. Yuba, K. Kono. Titanium dioxide nanoparticles-entrapped polyion complex micelles generating singlet oxygen in the cells by ultrasound irradiation for sonodynamic therapy. *Biomaterials Science* **1**, 65-73 (2013)

【前期公募】「細胞の微弱電流環境下における物質取り込み変化の機構解明と革新的薬物送達への展開」(代表者：小暮健太郎)

【後期公募】「画像解析による微弱電流依存性の細胞内輸送亢進機構解明と革新的指向性DDSへの展開」(代表者：小暮健太郎)

1. M. Hasan, A. Nishimoto, T. Ohgita, S. Hama, H. Kashida, H. Asanuma, K. Kogure. Faint electric treatment-induced rapid and efficient delivery of extraneous hydrophilic molecules into the cytoplasm. *J. Control Release* **228**, 20-25 (2016)
2. S. Hama, Y. Kimura, A. Mikami, K. Shiota, M. Toyoda, A. Tamura, Y. Nagasaki, K. Kanamura, K. Kajimoto, K. Kogure. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *J. Biol. Chem.* **289**, 2450-2456 (2014)

【前期公募】「糖鎖改変技術を利用したセルベースデバイスの設計」(代表者：岩崎泰彦)

【後期公募】「糖鎖改変技術を利用したバイオ輸送システム」(代表者：岩崎泰彦)

1. R. Moriyama, Y. Iwasaki, D. Miyoshi. Stabilization of DNA Structures with Poly(ethylene sodium phosphate). *J. Phys. Chem. B* **119**, 11969-11977 (2015)
2. S. Sugimoto, R. Moriyama, T. Mori, Y. Iwasaki. Surface engineering of macrophages with

- nucleic acid aptamers for the capture of circulating tumor cells. *Chem. Commun.* **51**, 17428-17430 (2015)
3. A. Sangsuwan, H. Kawasaki, Y. Iwasaki. Thiolated-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine protected silver nanoparticles as novel photo-induced cell-killing agents. *Colloids Surf. B* **140**, 128-134 (2016)
 4. Y. Iwasaki, T. Kimura, M. Orisaka, H. Kawasaki, T. Goda, S. Yusa. Label-free detection of C-reactive protein using highly dispersible gold nanoparticles synthesized by reducible biomimetic block copolymers. *Chem. Commun.* **50**, 5656-5658 (2014)
 5. H. Kawasaki, S. Kumar, G. Li, C. Zeng, DR. Kauffman, J. Yoshimoto, Y. Iwasaki, R. Jin. Generation of Singlet Oxygen by Photoexcited Au₂₅(SR)₁₈ Clusters. *Chem. Mater.* **26**, 2777–2788 (2014)
 6. Y. Iwasaki, A. Matsunaga, S. Fujii. Preparation of Biointeractive Glycoprotein-Conjugated Hydrogels through Metabolic Oligosacchhalide Engineering. *Bioconjugate Chem.* **25**, 1626–1631 (2014)
 7. Y. Iwasaki, M. Sakiyama, S. Fujii, S. Yusa. Surface modification of mammalian cells with stimuli-responsive polymers, *Chem. Commun.* **49**, 7824 (2013)
 8. T. Goda, M. Tabata, M. Sanjoh, M. Uchimura, Y. Iwasaki, Y. Miyahara. Thiolated 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine for an antifouling biosensor platform. *Chem. Commun.* **49**, 8683 (2013)
 9. A. Tamura, M. Tokunaga, Y. Iwasaki, N. Yui. Spontaneous assembly into pseudopolyrotaxane between cyclodextrins and biodegradable polyphosphoester ionomers. *Macromol. Chem. Phys.* **215**, 648–653 (2014)

【前期公募】「細胞内分子環境の化学模倣系の構築とそれを用いたテロメア核酸プローブの開発」(代表者：三好大輔)

【後期公募】「細胞が産生する浸透圧調節分子と人工高分子化合物を用いた細胞モデル実験系の構築」(代表者：三好大輔)

1. R. Maeda, H. Yaku, T. Nakabayashi, T. Murashima, N. Sugimoto, D. Miyoshi. DNA G-quadruplex detection system employing a protein fibril ligand. *Telomere and Telomerase* **2**, e691 (2015).
2. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto. A mRNA-Responsive G-Quadruplex-Based Drug Release System, *Sensors* **15**(4), 9388-9403 (2015).
3. R. Moriyama, Y. Iwasaki, D. Miyoshi. Stabilization of DNA Structures With Poly(ethylene sodium phosphate). *J. Phys. Chem. B* **119**, 11969–11977 (2015)
4. D. Miyoshi, Y. Ueda, N. Shimada, S. Nakano, N. Sugimoto, A. Maruyama. Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine comb-type copolymer with hydrophilic graft chain. *ChemMedChem* **9**, 2156-2163 (2014)
5. Y. Ueda, T. Konno, K. Ishihara, N. Sugimoto, D. Miyoshi. DNA structures under molecular crowding conditions with a phosphorylcholine derivative (MPC). *Transactions Mater. Res. Soc.* **40**(2), 99-102 (2015)
6. H. Yaku, T. Murashima, H. Tateishi-Karimata S. Nakano, D. Miyoshi and N. Sugimoto. Study on Effects of Molecular Crowding on G-quadruplex-ligand Binding and Ligand-mediated

- Telomerase Inhibition. *Methods* **64**, 19-27 (2013)
7. V. Gabelica, R. Maeda, T. Fujimoto, H. Yaku, T. Murashima, N. Sugimoto, D. Miyoshi. Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe Thioflavin T with human telomere DNA G-quadruplex. *Biochemistry* **52**, 5620-5628 (2013)
 8. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto. A Highly Sensitive Telomerase Activity Assay that Eliminates False-Negative Results Caused by PCR Inhibitors. *Molecules* **18**, 11751-11767 (2013)
 9. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto. In Vitro Assays Predicting of Telomerase Inhibitory Effect of G-Quadruplex Ligands in Cell Nuclei. *J. Phys. Chem. B* **118**(10), 2605-14 (2014)
 10. T. Fujimoto, S. Nakano, N. Sugimoto, D. Miyoshi. Thermodynamics - Hydration Relationships within Loops that Affect G-Quadruplexes under Molecular Crowding Conditions. *J. Phys. Chem. B* **117**, 963-972 (2013)
 11. H. Yu, X. Gu, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto. The beads-on-a-string structure of long telomeric DNAs under molecular crowding conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20060-20069 (2012)

【前期公募】「革新的生体ナノイメージング技術による繊毛疾患の分子機構解明」（代表者：上野裕則）

1. H. Ueno, KH. Bui, T. Ishikawa, Y. Imai, T. Yamaguchi, T. Ishikawa. Structure of Dimeric Axonemal Dynein in Cilia Suggests an Alternative Mechanism of Force Generation. *Cytoskeleton* **71**, 412-422 (2014)
2. H. Ueno, T. Ishikawa, KH. Bui, K. Gonda, T. Ishikawa, T. Yamaguchi. Mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliary cells can generate overall directional flow. *Nanomedicine* **8**, 1081-1087 (2012)

【前期公募】「細胞内局所での分子反応と軸索変性との関連を明らかにする」（代表者：小西慶幸）

【後期公募】「軸索パターンの構築において空間情報伝達と構造的安定化を司る分子反応の解明」（代表者：小西慶幸）

1. Y. Konishi. Cellular mechanisms for the axonal pattern formation: Initiation and branch morphogenesis. *Forma* **29**, 51-54 (2014)
2. K. Kubota, T. Seno, Y. Konishi. A low-density culture method of cerebellar granule neurons with paracrine support applicable for the study of neuronal morphogenesis. *Brain Res.* **1539**, 15-23 (2013)

【前期公募】「抗原ペプチドナノファイバーの形態に由来するキャリア機能探索と樹状細胞機能の理解」（代表者：田中直毅）

1. T. Waku, Y. Kitagawa, K. Kawabata, S. Nishigaki, S. Kunugi, N. Tanaka. Self-assembled β -sheet Peptide Nanofibers for Efficient Antigen Delivery. *Chem. Lett.* **42**, 1441-1443 (2013)

【前期公募】「ケミカルデバイスを利用した siRNA によって誘起される分子反応の発現機

構解明」(代表者：南川典昭)

【後期公募】「ナノ核酸デバイスを用いた自然免疫応答発現機構の網羅的解析」(代表者：南川典昭)

1. Y. Saito, Y. Hashimoto, M. Arai, N. Tarashima, T. Miyazawa, K. Miki, M. Takahashi, K. Furukawa, N. Yamazaki, T. Ishida, N. Minakawa. Chemistry, properties, and in vitro and in vivo applications of 2'-O-methoxyethyl-4'-thioRNA, a novel hybrid type of chemically modified RNA. *ChemBioChem* **15**, 2535–2540 (2014)
2. H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Sato, M. Takahashi, N. Minakawa, A. Matsuda, H. Harashima. The systematic administration of an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice. *J. Control. Release* **173**, 43–50 (2014)
3. M. Takahashi, N. Yamada, H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Seto, N. Minakawa, H. Harashima, A. Matsuda, In vitro optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside-modified anti-microRNA oligonucleotides and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* **41**, 10659–10667 (2013)

【後期公募】「1細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いた細胞死に関わる生体分子の1分子計測」(代表者：許 岩)

1. Y. Xu, N. Matsumoto, Q. Wu, Y. Shimatani, H. Kawata. Site-Specific Nanopatterning of Functional Metallic and Molecular Arbitrary Features in Nanofluidic Channels. *Lab on a Chip* **15**, 1989-1993 (2015)
2. Y. Xu, M. Shinomiya, A. Harada. Soft Matter-Regulated Active Nanovalves Locally Self-Assembled in Femtoliter Nanofluidic Channels. *Advanced Materials* (2016)
3. Y. Xu, K. Mawatari, T. Konno, T. Kitamori, K. Ishihara. Spontaneous Packaging and Hypothermic Storage of Mammalian Cells with a Cell-Membrane-Mimetic Polymer Hydrogel in a Microchip. *ACS Applied Materials & Interfaces* **7**, 23089-23097 (2015)
4. Y. Xu, Q. Wu, Y. Shimatani, K. Yamaguchi. Regeneration of Glass Nanofluidic Chips through a Multiple-Step Sequential Thermochemical Decomposition Process at High Temperatures. *Lab on a Chip* **15**, 3856-3861 (2015)
5. Y. Xu, N. Matsumoto. Flexible and In-Situ Fabrication of Nanochannels with High Aspect Ratios and Nanopillar Arrays in Fused Silica Substrates Utilizing Focused Ion Beam. *RSC Advances* **5**, 50638-50643 (2015)
6. Y. Dong, Y. Xu, Z. Liu, Y. Fu, T. Ohashi, K. Mawatari, T. Kitamori. Determination of cattle foot-and-mouth disease virus by micro-ELISA method. *Analytical Sciences* **30**, 359-363 (2014)
7. Y. Dong, Y. Xu, W. Yong, X. Chu, D. Wang. Aptamer and its potential applications for food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **54**, 1548-1561 (2014)
8. M. Shinomiya, A. Harada, Y. Xu. Design, synthesis and characterization of a thiolated temperature-responsive polymer for smart nanofluidic control. *Proceedings of Micro Total Analysis Systems* 1841-1843 (2014)

【後期公募】「高分子超薄膜を用いた未活性浮遊細胞固定技術“ナノラッピング”の確立と機能解明」(代表者：岡村陽介)

1. Y. Okamura, Y. Nagase. Fabrication of Bio-friendly Polymer Nanosheets for Biomedical Applications. *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* **39**, 379-384 (2014)

【後期公募】「実験的に抽出された分子反応パラメータを導入したマラリア感染赤血球モデルの開発」(代表者：今井陽介)

1. S. Nix, Y. Imai, T. Ishikawa. Lateral migration of spherical capsules in parabolic flow, *Journal of Biomechanics* **49**(11), 2249-54 (2016)
2. N. Takeishi, Y. Imai, T. Yamaguchi, T. Ishikawa. Flow of a circulating tumor cell and red blood cells in microvessels, *Physical Review E* **92**, 063011 (2015)

【後期公募】「細胞機能解明のためのエクソソーム定量解析ナノデバイスの創製」(代表者：安井隆雄)

1. S. Rahong, T. Yasui, N. Kaji, Y. Baba. Recent developments in nanowires for bio-applications from molecular to cellular levels. *Lab Chip* **16**, 1126-1138 (2016)
2. D. Takeshita, T. Yasui, H. Yong, T. Yanagida, N. Kaji, M. Kanai, K. Nagashima, T. Kawai, Y. Baba. PDMS-anchored nanowires for high throughput micro-rna extraction from extracellular vesicles in body fluid, *Micro Total Analysis Systems 2015* **1**, 1516-1518 (2015)
3. K. Tabuchi, T. Yasui, H. Yong, T. Yanagida, N. Kaji, M. Kanai, K. Nagashima, T. Kawai, Y. Baba. Nanowire devices for extracellular vesicles analysis towards elucidation of intercellular communication. *Micro Total Analysis Systems 2015* **1**, 1510-1512 (2015)
4. T. Yasui, S. Ito, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba. Micropillars Fabricated on Poly(methyl methacrylate) Substrates for Separation of Microscale Objects. *Anal. Sci.* **31**, 1197-1200 (2015)
5. T. Yasui, S. Ito, T. Yanagida, Y. He, S. Rahong, M. Kanai, K. Nagashima, H. Yukawa, N. Kaji, T. Kawai, Y. Baba. Exosomal micro-RNA analysis in urine or serum using nanowire structures. *Micro Total Analysis Systems 2014* **1**, 680-682 (2014)
6. Y. Konakade, T. Yasui, T. Yanagida, N. Kaji, Y. He, M. Kanai, K. Nagashima, H. Yukawa, T. Kawai and Y. Baba. *Micro Total Analysis Systems 2014*, **1**, 2017-2019 (2014)

<イ・学会発表>

【A01】ナノメディシンの分子科学（分子情報測定）

【A01】「細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析」（代表者：樋口秀男）

1. H. Higuchi. Noninvasive in-vivo imaging of neutrophil and tumor cells in mouse auricles. PacifiChem Hawaii USA, December 2016. (Invited)
2. H. Higuchi. Toward Medical Biophysics, 3rd international nanomedicine symposium. Tokyo, November 2015. (Invited)
3. H. Higuchi. Motility of motor proteins, myosin, kinesin and dynein. Cooperation in Physics Workshop: LMU-UT, Tokyo, February, 2016. (Invited)
4. 樋口秀男, モータータンパク質運動の統合的理解, 第2回理工バイオの集い, 東京, 2016年3月 (招待講演)
5. H. Higuchi, K. Kikushima, and S. Kita. Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles. 8th Internal Symposium on Nanomedicine, Matsushima, December 2014. (Invited)
6. H. Higuchi. Single molecule biophysics towards “in vivo“.Cooperation in Physics Workshop: Todai-LMU. Germany, October 2014. (Invited)
7. H. Higuchi, K. Kikushima, and S. Kita. Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles. A3 Foresight Symposium on Nanomedicine, Sendai, September 2014. (Invited)
8. 樋口秀男, 階層を上る1分子モータータンパク質, 東北大学応用物理学専攻セミナー, 仙台, 2014年7月 (招待講演)
9. 樋口秀男, 細胞内の分子ダイナミックス, サブコースシンポジウム, 生物物理の新展開, 東京, 2014年4月
10. 茅元司, 1分子顕微鏡を用いて見えてきた筋肉の効率的な収縮メカニズム, 日本光学会年次学術講演会シンポジウム「バイオフィotonicsの展望」, 東京, 2014年11月 (招待講演)
11. 茅元司, 1分子計測技術を用いて効率的な筋収縮の仕組みを紐解く, 第87回日本生化学会大会シンポジウム「次世代型筋研究の夜明け」, 京都, 2014年10月 (招待講演)
12. M. Kaya. Intermolecular cooperativity of skeletal myosins in myofilaments. Gordon Research Conference (Muscle & Molecular Motors), VT USA, July, 2014 (Invited)
13. 宇理須恒雄, 樋口秀男, 分子研研究会「細胞核内反応の分子科学」, 岡崎, 2014年9月
14. H. Higuchi, K. Kikushima and S. Kita. Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles, Molecules view The International Symposium on Multi-Scale Muscle Mechanics, Kitakyusyu, November 2013 (Invited)
15. K. Kikushima, S. Kita and H. Higuchi. A non-invasive technique for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils. Jpn Biophysics, Kyoto, October 2013 (Invited)
16. H. Higuchi, K. Kikushima, S. Kita. Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles. Dynein 2013 International Workshop, Kobe, November 2013 (Invited)
17. M. Kaya. and H. Higuchi. Molecular properties and dynamics of single skeletal myosins designed for force generations in ensemble of myosin molecules, October 2013
18. H. Higuchi. Single molecule biophysics toward in vivo. The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Taipei, January 2013 (Invited)

19. H. Higuchi. Single molecule biophysics toward in vivo. 2nd Tokyo U-Korea U Joint Symposium, Korea, March 2013 (Invited)
20. H. Higuchi and M. Kaya. Single molecule biophysics in a in vivo and in vitro. Japan-Taiwan joint symposium, Kyoto, February 2012 (Invited)
21. K. Kikushima. A non-invasive method for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils. 6th International Symposium of Nanomedicine, Tottori, November 2012 (Invited)
22. H. Higuchi and M. Kaya. Single molecule biophysics in an in vitro and in vivo. 3rd Japan-Taiwan joint symposium, 2012 (Invited)
23. M. Kaya. Effect of non-linear elasticity of skeletal myosins on force generation in muscle. Subgroup meeting of Motility in Biophysical society Annual meeting, 2012 (Invited)
24. M. Kaya. Application of optical tweezers to understand molecular mechanism of muscle contractions. International Symposium on Nanomedicine, Nagoya Japan, 2012 (Invited)
25. 茅 元司, 「階層レベルを意識した筋収縮の分子機構の解明」 定量生物学の会, 名古屋, 2012年 (招待講演)
26. M. Kaya. Mechanism of muscular activities revealed by single molecule measurements. RIKEN Seminar in Institute of Physical and Chemical Research, Wako, December 2012 (Invited)
27. 樋口秀男, 骨格筋ミオシンの1分子計測から見えてきた筋肉の巧みな収縮メカニズム, 第2回イメージングワークショップ, 東京, 2011年 (招待講演)
28. M. Kaya. Non-linear elasticity and step size of single skeletal myosin molecules interacting with actin filaments. Gordon Research Conference on muscle contraction and motor proteins, 2011 (Invited)
29. M. Kaya. Effect of non-linear elasticity of skeletal myosins on force generation in muscle. Subgroup meeting of Motility in Biophysical society Annual meeting, 2012 (Invited)

【A01】「生体内ナノ分子計測を利用した心疾患病態の解析」(代表者: 福田紀男)

1. N. Fukuda. Real-time imaging of single sarcomeres in the mouse heart in vivo. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Nagoya, January 2014 (Invited)
2. 福田紀男, 高精度分子イメージングを用いた心臓拍動メカニズムの解析, 革新的分子イメージングで拓く医学新領域, 東京, 2014年4月 (招待講演)
3. 大山廣太郎, 新谷正嶺, 伊藤秀城, 石井秀弥, 福田紀男, 鈴木団, 石渡信一, 局所熱パルス法を用いて細胞の温度感受性を解明する, 第91回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014年3月
4. 福田紀男, 高精度分子イメージングを用いた生体内の心収縮メカニズムの解析, 第21回JSPPEECミーティング, 東京, 2013年5月 (招待講演)
5. 福田紀男, 高精度分子イメージングによる心筋収縮機序解明, 高精度分子イメージングで拓く医学新領域, 東京, 2013年6月 (招待講演)
6. N. Fukuda, Real-time imaging of single sarcomeres in the mouse heart in vivo, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Tokyo, October 2013 (Invited)
7. F. Kobirumaki. Real-time high-resolution cardiac imaging in vivo, 51th Biophysical Society of Japan, Kyoto, October 2013 (Invited)
8. 福田紀男, 生体内のナノイメージングによる心筋収縮機構の解析, 第35回日本バイオマ

テリアル学会，東京，2013年11月（招待講演）

9. N. Fukuda. Real-time imaging of single sarcomeres in the mouse heart in vivo. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Nagoya, January 2014 (Invited)
10. 大山廣太郎，局所熱パルス法を用いて細胞の温度感受性を解明する，第91回日本生理学会，鹿児島，2014年3月（招待講演）
11. 広川恵里沙，大山廣太郎，水野紅理，小比類巻生，下澤東吾，照井貴子，福田紀男，拍動心臓における心筋細胞内 Ca^{2+} のリアルタイムイメージング，第90回日本生理学会大会，東京，2013年3月
12. 福田紀男，心筋の収縮機構に関する最近の知見について—ナノとマクロの融合—，心筋会，東京，2012年7月（招待講演）
13. 福田紀男，高精度分子イメージングを用いた生体内の心筋収縮メカニズムの解析，高精度分子イメージングで拓く医学新領域～細胞・組織中での高精度分子機能解析とその医学的応用の紹介～，仙台（招待講演）
14. N. Fukuda Nano-imaging of sarcomeres in the heart in vivo—Basis for Cardiac Nanophysiology and Nanomedicine—, The Society of Nanomedicine of Japan, Taipei, January 2013 (Invited)

【A01】「細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析」（代表者：由井伸彦）

1. 金野智浩，細胞親和性ソフトバイオマテリアルが切り拓く未来型医工薬連携デバイス，第458回東北大学大学院薬学研究科セミナー，仙台，2015年9月
2. T. Konno. Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for advanced cell engineering. 2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials, Seattle USA, August 2015.
3. 田村篤志，インターロック高分子による希少難治性代謝疾患治療，第65回医用高分子研究会，東京，2015年3月。
4. 田村篤志，分解応答型インターロックポリマーによる細胞代謝機能の改善，新学術領域研究ナノメディシン分子科学第9回公開シンポジウム，東京，2015年7月
5. T. Konno. Cytocompatible Phospholipid Polymer Hydrogels for Cell Immobilization Matrix. 9th International Symposium on Nanomedicine, Mie Japan, December 2015.
6. A. Tamura. Polyrotaxane-based intracellular delivery of cyclodextrins for the therapy of intractable diseases. 8th Asian Cyclodextrin Conference, Kumamoto Japan, May 2015.
7. N. Yui. Hydrated molecular mobility of supramolecular surfaces directs stem cell fate. 5th Asian Biomaterials Congress, Taipei, 2015
8. N. Yui. A. Tamura. Therapeutic approach to lysosomal storage disorders based on acid-labile polyrotaxanes. 3rd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Tokyo, November 2015.
9. 金野智浩，細胞工学・再生医療のためのバイオインターフェース設計，第13回日本再生医療学会総会，京都，2014年3月。
10. T. Konno. Cytocompatible soft-biomaterials for cell engineering. 8th International Symposium on Nanomedicine, Matsuyama, December 2014.
11. 由井伸彦，ポリロタキサンの動的骨格を活かした細胞機能の調節，新たな治療法を目指して，第15回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム，東京，2014年10月
12. 由井伸彦，超分子材料の動的特性を活かした細胞機能の調節，近畿化学協会機能性色素・

- エレクトロニクス部会東京地区合同講演会，東京，2014年12月。
13. N. Yui. Designing cytoleavable polyrotaxanes as a vehicle for molecular logistics of biomacromolecular delivery into target cells. The 6th Forum on New Materials, Italy, June 2014
 14. N. Yui. Supramolecular biomaterials exploit new paradigm of modulating cellular functions. Annual Meeting of the Korean Society for Biomaterials, Seoul, November 2014.
 15. N. Yui. Hydrated molecular mobility at supramolecular surfaces dominates the fate of cellular adhesion. International Symposium of Catalysis Research Center (CRC), Sapporo Japan, February 2013.
 16. N. Yui, A. Tamura. Cytoplasmic small interfering RNA delivery using cytoleavable polyrotaxanes. The 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT2013), Singapore, July 2013.
 17. A. Tamura. Supramolecular polyelectrolyte complexes for enhancing the intracellular activity of delivered biomacromolecules, TMDU International Summer Program, Tokyo, August 2013.
 18. N. Yui, JH. Seo and A. Tamura. Emerging biomaterials functions through supramolecular polyrotaxanes. The 7th World Congress on Biomimetics, Artificial Muscles and Nano-Bio (BAMN2013), Jeju, August 2013.
 19. T. Konno. Cytocompatible phospholipid polymer hydrogels for cell engineering. 7th International Symposium on Nanomedicine, Kitakyushu, November 2013.
 20. N. Yui. Structures and Dynamics Hydrated molecular mobility at supramolecular surfaces dominates the fate of cellular adhesion. CRC International Symposium on New Challenges on the Biointerfaces, Sapporo, February 2013.
 21. T. Konno. Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for designing of artificial stem cell niche. 6th International symposium on Nanomedicine, Matsue, November 2012.
 22. 由井伸彦，超分子の動的特性を活かした有機系バイオマテリアルの機能創成，日本歯科理工学会関東支部冬季セミナー，東京，2012年3月
 23. 由井伸彦，動的構造によるバイオマテリアル機能設計，第56回高分子夏季大学，福井，2011年7月
 24. 由井伸彦，ポリロタキサンを用いた動的ナノ界面における生体応答，第12回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム，大阪，2011年11月
 25. 由井伸彦，超分子の動的特性を活かしたバイオマテリアル機能設計，櫻井靖久名誉教授追悼シンポジウム，東京，2011年12月

【A02】ナノメディシンのための分子科学（分子情報導出）

【A02】「バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス」（代表者：石原一彦）

1. 石原一彦、生体構造に倣ったバイオメディカルポリマーの創製-合成、物性、そして医療応用へ。第96回日本化学会でのシンポジウム 医療・ライフサイエンス材料の新展開，京都，2016年3月（基調講演）
2. K. Ishihara, Nano-scaled and functional particles for nanomedicine molecular science. MANA symposium, Tsukuba, March 2016 (Invited)
3. 石原一彦、ナノメディシン分子科学を基盤とする医療産業の展開：細胞機能の維持、保存、制御。ナノ学会シンポジウム「産業応用へ ナノサイエンスとテクノロジーの新展

- 開」，東京，2016年1月（招待講演）
4. K. Ishihara. Surface functionality of nanoparticles with stimuli-responsive and cytocompatible phospholipid polymers for intracellular devices, The 7th Japan-Taiwan Nanomedicine Symposium, Kyoto, January 2016 (Invited)
 5. K. Ishihara. Cytocompatible polymeric nanoparticles for delivery of biomolecules into cells, Pacifchem 2015, Honolulu, December 2015 (Invited)
 6. 石原一彦、細胞工学・組織再生医療を推進する細胞親和型バイオマテリアル-細胞機能の維持、保存、制御-。先端医療振興財団 神戸再生医療セミナー，神戸，2015年9月（招待講演）
 7. 石原一彦，ナノメディシン分子科学と未来医療，ナノメディシン分子科学シンポジウム「ナノバイオテクノロジーによる医学・医療研究の展開」，仙台，2015年9月（招待講演）
 8. 石原一彦，細胞工学に適用する細胞親和型ポリマーソフトマテリアル，生体分子素子技術を礎とするメディカルバイオ研究の最先端国際シンポジウム，仙台，2015年7月（招待講演）
 9. 石原一彦，バイオメディカルポリマーの設計法と実用化，高分子学会高分子夏季大学，新潟，2015年7月（招待講演）
 10. K. Ishihara. Phospholipid polymer biomaterials provide new generation medical devices-From molecules to implantable medical devices, 5th Asian Biomaterials Congress Taipei, May 2015 (Plenary)
 11. K. Ishihara. Nanomedicine Molecular Science based on the phospholipid polymer biomaterials, International Polymer Conference (IPC2014), Tsukuba, December 2014 (Invited)
 12. K. Ishihara, Y. Inoue. Bioinspired fabrication of artificial cell membrane with phospholipid polymer and biomolecules for nanomedicine molecular science, Japan-China Nanomedicine Symposium, Hiroshima, May 2014 (Plenary)
 13. 石原一彦，井上祐貴，リン脂質ポリマーバイオマテリアルを用いたナノメディシン分子科学，日中韓フォーサイト事業国際シンポジウム，東京，2014年10月（総会）
 14. K. Ishihara, Y. Tsukamoto and Y. Inoue. Bioinspired and cytocompatible phospholipid polymer nanoparticles. 7th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, Ha Long City, November 2014 (Plenary)
 15. K. Ishihara. Reversible forming/dissociating artificial extracellular matrices for cellular engineering. 7th World Congress of Preventive and Regenerative Medicine, Taipei Taiwan, November 2014 (Plenary)
 16. K. Ishihara, H. Oda and T. Konno. Controlling cellular functions in the cytocompatible phospholipid polymer hydrogels. International Conference on Regenerative Biomedical Materials (ICRBM), Wuhan China, June 2013 (Keynote)
 17. K. Ishihara, H. Oda, T. Aikawa and T. Konno. Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering. 15th IUPAC Macromolecular Complexes Meeting (MMC-15), Greenville USA, August 2013 (Plenary)
 18. 石原一彦，ナノメディシン分子科学，第3回CSJ化学フェスタ2013，東京，2013年10月（招待講演）
 19. K. Ishihara. Cell membrane permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanopores

- conjugated with molecular beacons. International Symposium on Nanomedicine 2013, Kitakyushu, November 2013 (Invited)
20. K. Ishihara, Y. Inoue. Cytocompatible polymeric nanoparticles for nanomedicine molecular science. 13th Pacific Polymer Conference (PPC2013), Kaohsiung, November 2013 (Invited)
 21. K. Ishihara, X. Lin. Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobe conjugated with molecular beacons. The 5th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Nagoya, January 2014 (Invited)
 22. K. Ishihara. Bioinspired Concepts for Surface Modification on Implantable Medical Devices. 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, June 2012 (Keynote)
 23. 石原一彦, 細胞内分子輸送デバイスの創製とナノメディシン, 日本バイオマテリアル学会九州地区講演会, 福岡, 2012年9月(基調講演)
 24. K. Ishihara. Specific interaction of polymeric nanoparticles to cells, 2012 Northeastern Asian Symposium, Sendai, September, 2012 (Keynote)
 25. K. Ishihara. Bioinspired Phospholipid Polymers for Nanobiodevices, Society for Biomaterials, Biomaterials Day at Clemson University, Clemson, September 2012 (Plenary)
 26. K. Ishihara. Self-forming polymeric biomaterials for cell-based engineering. Biomaterials Symposium in Korean Society for Biomaterials, Seoul, November 2012 (Plenary)
 27. 石原一彦, ナノメディシン分子科学とバイオマテリアルサイエンス, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 仙台, 2012年11月(特別講演)
 28. K. Ishihara. Oligopeptide-modified phospholipid polymer nanoparticles for specific internalization of cells, 6th International Symposium on Nano-Medicine, Matsue, December 2012 (Invited)
 29. K. Ishihara. Cell/Protein and Protein/Materials Interactions-Evaluation of Interaction Force by AFM Technology. The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Taipei, January 2013 (Invited)
 30. K. Ishihara. Biomimetic Polymer Nanoparticles Both Embedding Quantum Dots and Immobilized Biomolecules. Biomimetic Materials Processing 2012, Nagoya, January 2012 (Invited)
 31. K. Ishihara. Enhanced and specific internalization of polymeric nanoparticles to cells. The 4th International Conference on the Development of Biomedical Engineering, Vietnam (Invited)
 32. K. Ishihara. Oligopeptide-modified phospholipid polymer nanoparticles for specific internalization of cells. 6th International Symposium on Nano-Medicine, Matsue, December 2012 (Invited)
 33. K. Ishihara. Enhanced and specific internalization of polymeric nanoparticles to cells, The 4th International Conference on the Development of Biomedical Engineering, Ho-chi Minh, January 2012 (Invited)
 34. K. Ishihara. Biomimetic Polymer Nanoparticles Both Embedding Quantum Dots and Immobilized Biomolecules, Biomimetic Materials Processing 2012, Nagoya, January 2012 (Invited)

【A02】「直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製」(代表者：三宅淳)

1. 新岡宏彦, カソードルミネッセンス顕微鏡と近赤外光学顕微鏡を用いたマルチスケール

- バイオイメージング，異分野融合による新規分離分析法の創成のための若手講演会議，大阪，2015年11月（招待講演）
2. J. Miyake, S. Asatani and H. Niioka. Spectroscopy, Mechanics and Informatics for Cell Analysis, Nanomedicine International Symposium, Tokyo Japan, November 2015 (Invited)
 3. J. Miyake, S. Asatani, A. Yoshimura, S. Tagawa and H. Niioka. Deep Learning and Spectroscopy, for Cell Analysis, The 7th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Kyoto Japan January 2016 (Invited)
 4. 田中信行，バイオユーザーフレンドリーな流体活用システム，横浜市立大学 学内セミナー，2015年3月（招待講演）
 5. 田中信行，表面張力顕微鏡の創成と幹細胞マーカー解析への応用－液体親和性を可視化する－，株式会社池田理化主催再生医療分野若手研究者交流会，2015年1月（招待講演）
 6. 三宅淳，細胞場における RNA の動態解析・遺伝子発現の制御システムの解析，細胞核内反応の分子科学，分子科学研究所，2014年9月（招待講演）
 7. 田中信行，流体を活用したバイオメディカルインタフェース，日本機械学会東海学生会主催第201回講演会，三重，2014年11月（招待講演）
 8. 田中信行，流体を活用した再生医療支援技術，第5回次世代医療システム産業化フォーラム2014，大阪，2014年11月（招待講演）
 9. 田中信行，界面制御を利用したバイオメディカルユーザインタフェース，バイオメクフォーラム 第74回研究会，大阪，2014年7月（招待講演）
 10. 木原隆典，細胞によって形成される石灰化組織とその利用，地域連携による「ものづくり」継承支援人材育成協働プロジェクト特別講演会，大阪，2015年7月（招待講演）
 11. J. Miyake. Knowledge of the Asian next generation, Japan-Korea Bilateral Joint Seminar: Cross-Boundary Cancer Studies Toward the Cancer Cure in Asia, February 2014, Seoul (Invited)
 12. J. Miyake. T. Kihara, H. Niioka, C. Nakamura, Nanoprobes for measuring the molecular dynamics in living cells, The 6th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, January 2015, Taipei (Invited)
 13. 新岡宏彦，古川太一，福島昌一郎，一宮正義，三宅 淳，芦田昌明，荒木 勉，橋本 守，カソードルミネッセンス顕微鏡と光学顕微鏡の融合，顕微鏡学会分科会バイオメディカルニューマイクروسコープ，東京，2014年3月（招待講演）
 14. H. Niioka, T. Furukawa, S. Fukushima, M. Ichimiya, J. Miyake, M. Ashida, A. Araki, and M. Hashimoto, Rare-earth doped Y_2O_3 nanophosphors for biological cathodoluminescence imaging, International Conference on Small Science, Las Vegas USA, December 2013 (Invited)
 15. 木原隆典，三宅 淳，細胞の機械特性計測とそれを利用した細胞評価の可能性，第26回生体・生理工学シンポジウム，京都，2011年9月（招待講演）
 16. 木原隆典，三宅 淳，AFMによる細胞計測，日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会，大阪，2012年1月（招待講演）
 17. 三宅 淳，細胞の機械的特性，第38回バイオサロン，機械学会バイオエンジニアリング学会，大阪，2012年1月（招待講演）

【A02】「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」（代表者：丸山厚）

1. N. Shimada. Ureido-functionalized Polymers Exhibiting UCST-type Phase Separation Under Physiological Conditions, Pacificchem, 2015 (Invited)

2. 丸山厚, バイオ分子の個性を輝かせるソフト高分子複合体, 平成 27 年度日本化学会コロイドおよび界面化学部会先端技術講座, 2015 年 (招待講演)
3. 丸山厚, 合成高分子で生体高分子の構造と機能を操作する, サイエンスラブチケットパート 23 & 第 23 回 NMMS セミナー, 2015 年 (招待講演)
4. 丸山厚, 新しい感温性バイオマテリアルとしての側鎖尿素高分子, 附置研究所間ライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト, G3 分科会, 2015 年 (招待講演)
5. A. Maruyama. Interpolyelectrolyte nanoassembly to engineer DNA, peptides, and lipids, Pacificchem, 2015 (Invited)
6. A. Maruyama. Enhancement of DNA enzyme activity by nano-assembling with cationic copolymers, Pacificchem, 2015 (Invited)
7. A. Maruyama. MNAzyme-catalyzed Nucleic Acid Detection Enhanced by a Cationic Copolymer, The 3rd China-Japan Symposium on Nanomedicine, 2015 (Invited)
8. 丸山厚, カチオン性高分子による DNA 酵素の活性化, 平成 25 年度物質・デバイス領域共同研究拠点特定研究「次世代メディカル・バイオ機能材料への展開を指向した生体分子素子技術の開発」拡大シンポジウム, 2014 年 3 月, 仙台 (招待講演)
9. A. Maruyama. Cationic Comb-Type Copolymer Enhances DNAzyme Activity. International Symposium on Smart Biomaterials ~2nd Hoffman Family Symposium ~, March 2014, Tsukuba (Invited)
10. 丸山厚, 生体高分子を操るシャペロン型合成高分子設計—核酸から脂質膜まで—東京工業大学バイオマテリアルシンポジウム, 2013 年 9 月, 横浜 (招待講演)
11. 丸山厚, ペプチドシャペロニング材料による脂質膜構造制御, 繊維学会西部支部セミナー, 2013 年 10 月 (招待講演)
12. A. Maruyama. Chilling capture of proteins using functionalized UCST polymers. 4th International Advanced Biomaterials Symposium, Changchun China, September 2012 (Invited)
13. A. Maruyama. Smart Materials, Structures and Systems, Ureido-polymers Exhibiting UCST-type Phase Transition Behavior under Physiologically Relevant Conditions. 4th International Conference, June 2012, Italy (Invited)
14. A. Maruyama. Novel smart polymers for biological application. 1st International Symposium on Polymer Ecomaterials (PEM 2012), August 2012, China (Invited)
15. A. Maruyama. Polymeric materials to manipulate biopolymer assemblies and functions. International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, August 2012, Taipei (Invited)
16. A. Maruyama. Ureido-polymers exhibiting UCST phase behavior under physiological conditions. The 6th International Workshop on Advanced Materials Science And Nanotechnology, November 2012, Ha Long Vietnam (Invited)
17. A. Maruyama. Cationic Comb-type Copolymers as Bio-transformers for Biomolecular Nanomachines. IUMRS-ICA 2011, Taipei, September 2011 (Invited)
18. 丸山厚, 「医学・薬学・工学の融合を目指して」、「生体高分子の構造と機能を操る合成高分子」, 東京女子医科大学櫻井靖久名誉教授追悼シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 (招待講演)
19. A. Maruyama. Annealing activity of cationic comb-type copolymers for DNA assembly. 11th International Symposium on Biorelated Polymers At the ACS Spring 2012 National Meeting,

San Diego, March 2012 (Invited)

20. A. Maruyama. Manipulation of DNA Quadruplex Assembly with Cationic Copolymers. Korea-Japan joint symposium on recent trends of polymeric and self-assembling materials and their application to biotechnology, Kitakyushu, February 2012 (Invited)

【A03】ナノメディシンを用いた分子科学（分子情報応用）

【A03】「多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御」（代表者：岩田博夫）

1. Y. Arima, H. Iwata. Cell attachment to supported lipid bilayer mediated by oligonucleotide-phospholipid conjugates. E-MRS Spring Meeting, May 2015 (Invited)
2. 有馬祐介, 岩田博夫, 単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体を用いた細胞表面工学と支持脂質二分子膜によるモデル化, 2015 年真空・表面科学合同講演会, つくば, 2015 年 12 月, (招待講演)
3. 有馬祐介, 岩田博夫, 単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体を用いた細胞表面工学とその応用, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸, 2015 年 12 月 (招待講演)
4. 岡本行広, 生体分子の分離分析の高性能化を目指して, 日本分析化学会近畿支部, 異分野融合による新規分離分析法の創成のための若手講演会, 大阪, 2015 年 11 月 (招待講演)
5. Y. Arima, H. Iwata. Recruitment of DNA tethered to lipid bilayer upon DNA-mediated cell-cell attachment. 9th International Symposium on Nanomedicine, Tsu, December 2015 (Invited)
6. H. Iwata. Cells patterned on polylactic acid through surface tethered oligonucleotides. The 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, Taiwan, August 2014 (Invited)
7. 岩田博夫, 組織修復材料+細胞による糖尿病の治療. 京都市成長産業創造センター一周年記念フォーラム - 今を支え未来を創るケミストリー, 京都, 2014 年 11 月 (招待講演)
8. Y. Arima, T. Matsui, H. Iwata. Cell patterning on polylactic acid through surface tethered oligonucleotides. The 2nd Japan-China Symposium on Nanomedicine, Hiroshima, May 2014 (Invited)
9. 有馬祐介, モデル表面を用いた細胞-材料間および細胞-細胞間接着の解析, 2014 KIPS 若手高分子シンポジウム, 京都, 2014 年 12 月 (招待講演)
10. Y. Arima, H. Iwata, H. Cell adhesion to self-assembled monolayers and supported lipid bilayers for studying cell-substrate and cell-cell interaction. 7th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine (7th WCPRM), Taiwan, November 2014 (Invited)
11. Y. Arima, H. Iwata. Controlled cell attachment using oligonucleotide-poly(ethylene glycol)-lipid conjugates and their recruitment upon cell attachment. 8th International Symposium on Nanomedicine, Matsuyama, December 2014 (Invited)
12. 岩田博夫, Cell LEGO - 細胞から組織を作る -. MEDTEC Japan 2013, 東京, 2013 年 4 月 (招待講演)
13. 岩田博夫, 高分子による細胞表面の修飾と細胞の配置 - Cell LEGO -. 第 51 回関西バイオポリマー研究会, 京都, 2013 年 7 月 (招待講演)
14. 岩田博夫, 板垣亮, Hoffecker, I.T., 有馬祐介, ポリエチレングリコール-脂質複合体と細胞との相互作用. 日本化学繊維研究所 第 71 回講演会, 京都, 2013 年 11 月 (招待講演)

15. 岩田博夫, 高分子による細胞表面の修飾と細胞の配置 - Cell LEGO - . 平成 25 年度第 1 回次世代バイオナノ研究会「幹細胞研究と再生医療」, 大阪, 2013 年 11 月 (招待講演)
16. H. Iwata. Cell LEGO. Optical MEMS and Nanophotonics 2013, Kanazawa, August 2013 (Invited)
17. Y. Arima. Interaction of Proteins and Cells with Model Biomaterials Surfaces. Symposium on Biorecognition and Bioseparation Engineering, Kyoto, December 2013 (Invited)

【A03】「がんリンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発」(代表者：権田幸祐)

1. 蛍光ナノ粒子の 1 粒子イメージングによる定量的免疫組織化学法の技術開発, 第 104 回日本病理学会総会 ワークショップ 3, 名古屋, 2015 年 5 月 (招待講演)
2. ナノバイオイメージングで拓くがんや末梢動脈疾患の医学・医療研究, 第 11 回東北大学 REDEEM シンポジウム, 2015 年 9 月, 東京 (招待講演)
3. K. Gonda. Highly sensitive imaging of cancer with functional nanoparticles. 32nd International Conference of Photopolymer Science and Technology, June 2015, Chiba Japan (Invited)
4. K. Gonda. Prognostic Diagnosis of Breast Cancer with Immunohistochemistry by Single-Particle Quantum Dot Imaging. 9th International Symposium on Nanomedicine, Tsu, December 2015 (Invited)
5. K. Gonda. High Sensitive Imaging of Cancer with X-ray or Fluorescence. The 6th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Taipei Taiwan, January 2015 (Invited)
6. K. Gonda, Y. Hamada, K. Kawamura, Y. Kubota, Y. Kobayashi, N. Ohuchi. Nano-bioimaging of cancer and peripheral artery disease with highly-quantitative sensitivity. 7th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, Ha Kong City Vietnam, November 2014 (Invited)
7. K. Gonda, N. Ohuchi. Nano-biomaging of cancer and peripheral artery disease with X-ray CT and fluorescence. 8th International Symposium on Nanomedicine, Ehime, December 2014 (Invited)
8. K. Gonda. High Sensitive Imaging of Cancer with X-ray or Fluorescence. The 6th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Taipei Taiwan, January 2015 (Invited)
9. 権田幸祐, ナノ粒子を用いた高精度イメージングで拓くがん医学・医療研究の新展開, 第 14 回がん医療基盤科学技術研究センターセミナー, 東京, 2013 年 3 月 (招待講演)
10. K. Gonda, Y. Kobayashi, N. Ohuchi. High Accuracy Imaging of Cancer and Peripheral Artery Disease with X-ray CT and Fluorescence. 7th International Symposium on Nanomedicine, Kitakyusyu, November 2013 (Invited)
11. K. Gonda, H. Tada, M. Amari, N. Ohuchi. Nano-bio imaging of disease mechanisms with fluorescent nano-particles. 2012 Northeastern Asian Symposium, Sendai, September 2012 (Invited)
12. 権田幸祐, 中野寧, 大内憲明, 高精度蛍光ナノイメージングで拓くがん医学・医療研究の新展開, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 "S12 バイオマテリアルとイメージング", 仙台, 2012 年 11 月 (招待講演)
13. K. Gonda, T. Nakagawa, H. Tada, M. Amari, Y. Nakano, N. Ohuchi. Development of imaging technology for advanced cancer diagnosis. 6th International Symposium on Nanomedicine, Matsue, November 2012 (Invited)

14. K. Gonda. In vivo molecular imaging of cancer metastasis and angiogenesis in mice using fluorescent nano-particle. 3rd Global COE International Symposium "New Trends in Basic and Clinical Cancer Research for Innovative Therapy", Nagoya, December 2011 (Invited)
15. K. Gonda. Application of nanoimaging to mechanism analysis and diagnosis of cancer metastasis. Nanotechnology Cancer Asia-Pacific Network Meeting. Nagoya, February 2012 (Invited)
16. K. Gonda, M. Hikage, Y. Hamada, T. Nakagawa, N. Ohuchi. Development of imaging system for advanced nanomedicine. 5th International Symposium on Nanomedicine, Nagoya, March 2012 (Invited)

【A03】「遺伝子解析と分子トレーシングを基盤とした細胞標的分子の創製」(代表者：夏目敦至)

1. 夏目敦至, 日本における TSC 標準治療を目指して, TSCDays Japan2014, 2014 年 10 月 (招待講演)
2. 夏目敦至, テモダールの陰翳礼賛から学ぶ悪性神経膠腫の神秘, 第 32 回日本脳腫瘍学会, 2014 年 12 月 (招待講演)
3. 夏目敦至, 中外製薬富士御殿場研究所研修会, 脳腫瘍の基礎と臨床, 2014 年 9 月 (招待講演)
4. 夏目敦至, 脳腫瘍に対する臨床試験デザイン, 第 3 回 Neuro-Oncology West (招待講演)
5. 夏目敦至, 膠芽腫ガイドラインの目的と推奨レベルの設定根拠, 脳腫瘍診療ガイドラインを考える会, 2014 年 9 月 (招待講演)
6. 夏目敦至, 膠芽腫ガイドラインにおけるギリアデルなどの位置づけ, ギリアデル meet the expert, 2014 年 10 月 (招待講演)
7. 夏目敦至, グリオーマのゲノム、エピゲノムの進展と悪性化のメカニズムと治療介入, 第 3 回島根脳腫瘍学術講演会, 2014 年 10 月 (招待講演)
8. A. Natsume. Development of disease model neuron-network and its analyzing method, 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi Kenya, September 2014 (Invited)
9. A. Natsume. Epigenetic plasticity and mutational landscapes reveal intratumoral heterogeneity and clonal evolutions in gliomas, 3rd Cancer Stem Cell Symposium November 2014 (Invited)
10. T. Wakabayashi, A. Natsume, J. Mizusawa, H. Katayama, S. Shibui, R. Nishikawa and Members of Japan Clinical Oncology Group Brain Tumor Study Group (JCOG-BTSG). JCOG0911 INTEGRA study: a randomized screening phase II trial of chemoradiotherapy with interferon-b plus temozolomide versus chemoradiotherapy with temozolomide alone for newly-diagnosed glioblastoma. Society for Neuro-Oncology, 2014 (Invited)
11. JCOG0911 INTEGRA study: a randomized screening phase II trial of chemoradiotherapy with interferon-b plus temozolomide versus chemoradiotherapy with temozolomide alone for newly-diagnosed glioblastoma. Tokyo, 2014 (Invited)
12. 夏目敦至, 網羅的(エピ)ゲノム解析に基づく治療戦略, 癌治療学会, 8 月 (招待講演)
13. A. Natsume. Temporal and spatial evolution of clones in low grade gliomas. 20th International Conference of Brain Tumor Research and Therapy, U.S.A, July 2014 (Invited)
14. A. Natsume. Vaccine-based immunotherapy for malignant gliomas-current trends and future perspectives SymBioPharma, July 2014 (Invited)

15. 夏目敦至, 悪性脳腫瘍における遺伝子異常による多段階発がんメカニズムの解明, MERRO 第1回次世代若手研究会, 2015年1月(招待講演)
16. A. Natsume. Clinical application of Raman spectroscopy in Neurosurgery, 1st Raman-Bio-sensing Seminar, January 2015 (Invited)

<前期公募> 「生細胞イメージングによる内在性mRNA 分解過程の定量解析」(代表者: 岡部弘基)

<後期公募> 「内在性 mRNA の一分子イメージングによる RNA 代謝機構の解明」(代表者: 岡部弘基)

1. 岡部弘基, Imaging and manipulation of temperature in living single cells, 広島大学核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理解析拠点・拠点融合研究セミナー, 東広島, 2015年7月
2. 岡部弘基, Imaging and manipulation of temperature in single live cells, 第20回NMMSセミナー, 横浜, 2015年7月
3. 岡部弘基, 細胞内温度の計測と操作による温度生物学, 第7回光イメージング若手の会「光塾」, 東広島, 2015年9月
4. 岡部弘基, Imaging and manipulation of intracellular temperature for thermal biology, 日本生物物理学会第53回年会, 金沢, 2015年9月
5. 岡部弘基, 細胞内温度のイメージングと操作による温度生物学, 日本機械学会 第28回バイオエンジニアリング講演会, 横浜, 2016年1月
6. 岡部弘基, Advances in Live Single-Cell Thermal Imaging and Manipulation (ALSCTIM)
7. 岡部弘基, Imaging of Temperature in living cells, 第37回内藤コンファレンスポスター賞, ニセコ, 2014年7月
8. 岡部弘基, 定量的イメージングによる細胞機能の先端分析, 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2014), 東京, 2014年8月(招待講演)
9. 岡部弘基, Imaging of Temperature in a Living Cell Using Polymeric Thermometer and Quantitative Microscopy, Advances in Live Single-Cell Thermal Imaging and Manipulation (ALSCTIM), 沖縄, 2014年11月(招待講演)
10. 岡部弘基, 細胞内温度のイメージングと操作, 応用物理学会 量子エレクトロニクス研究会, 軽井沢, 2014年12月(招待講演)
11. 岡部弘基, ポリマー温度センサーと定量的顕微鏡法を用いた細胞内温度イメージング, 第9回NIBB バイオイメージングフォーラム, 岡崎, 2015年1月(招待講演)
12. 岡部弘基, 第90回日本生理学会大会, 東京, 2013年3月(招待講演)
13. 岡部弘基, 生細胞内の温度イメージング, 第17回酸素ダイナミクス研究会, 弘前, 2013年8月(招待講演)
14. 岡部弘基, Imaging of temperature in a living cell using a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy, 19th International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences", ベルリン, 2013年9月
15. 岡部弘基, Real-Time Monitoring of mRNA Decay in Living Cells, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013 (NMMS2013), 東京, 2013年10月

16. 岡部弘基, Real-Time Monitoring of mRNA Decay in Living Cells, Biophysical Society 58th Annual Meeting, サンフランシスコ, 2014年2月
17. 岡部弘基, 生きた細胞内の温度イメージング, 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012年12月(招待講演)
18. 岡部弘基, 2020年の光分子科学を語る, 分子科学研究所所長招聘研究会, 岡崎, 2013年1月(招待講演)
19. 岡部弘基, 定量的蛍光イメージングによる細胞機能解析, 第三回NMMSセミナー, 東京, 2013年1月(招待講演)

<前期公募>「人工細胞系に構成した細胞膜受容体・細胞骨格複合ナノ装置の動作解析」(代表者: 湊元幹太)

1. 湊元幹太, 組換えバキュロウイルスを用いた膜蛋白質の人工脂質膜ベシクルへの再構成, 分子ロボティクス研究会定例会, 2013年4月
2. 湊元幹太, 少数要素から構成する人工細胞ベシクルを用いた膜シグナル伝達モデル実験系の開発, 第86回日本生化学会大会 シンポジウム(生体膜の動態から見える新たな膜生物学), 2013年
3. K. Tsumoto. Baculovirus-Liposome Membrane Fusion for Construction of Artificial Cell Models Based on Giant Lipid Vesicles. 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (NMMS2013), Tokyo, November 2013.
4. K. Tsumoto, M. Nishigami, T. Mori and M. Tomita. Basic Structures for Mimicking Cell Systems. 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013), Tokyo, November 2013.
5. 湊元幹太, 巨大組換えプロテオリポソームによる人工細胞モデル構築の試み, 理学・化学専攻創製光分子科学セミナー, 神戸, 2013年12月
6. 湊元幹太, 多要素細胞膜シグナル伝達経路を構成した人工膜系の新規構築と機能評価, 物質・デバイス領域共同研究拠点特定研究分子分解能解析に基づくバイオ分子集積・ソフト界面構築と細胞操作技術への応用研究集会, 2013年9月
7. 湊元幹太, 三重大学医学部附属病院 IVR 科セミナー, 津, 2014年3月
8. 湊元幹太, バキュロウイルスを用いる人工細胞構築: 少数要素による細胞的機能の発現をめざして, 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会 第24回サマースクール, 2013年
9. K. Tsumoto, M. Nishigami, T. Mori, M. Tomita. Application of the Baculovirus-Liposome Membrane Fusion to Reconstitution of Membrane Protein Systems toward Functional Artificial Cells. 6th International Symposium on Nanomedicine (ISNM), 2012.
10. 湊元幹太, 人工膜系への細胞膜シグナル伝達経路構築とその機能評価, 平成24年度物質・デバイス領域共同研究拠点特定研究 バイオ分子集積体・バイオ界面の機能的構築のための分子分解能解析研究集会, 2013年

<前期公募>「フォトリックDNAプロセッサを用いた核酸機能の活性化制御」(代表者: 小倉裕介)

1. Y. Ogura, R. Fujii, T. Nishimura, Y. Kazayama, J. Tanida. Optically programmable molecular information processing. The 3rd Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2013), November 2013. (Invited)

2. Y. Ogura, R. Fujii, T. Nishimura, Y. Kazayama, J. Tanida. Optically programmable molecular information processing. The 3rd Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2013), Daejeon, November 2013. (Invited)
3. Y. Ogura, Y. Kazayama, and J. Tanida. Optofluidic DNA computation using holographic optical tweezers. International Workshop on Holography and related technologies (IWH2013), Hokkaido, October 2013. (Invited)
4. T. Nishimura, Y. Kazayama, Y. Ogura, J. Tanida. Optical manipulation of liquid-based microreactors in optofluidic DNA computation. Optical trapping applications 2013, Hawaii, April 2013. (Invited)
5. Y. Ogura, T. Nishimura, H. Yamamoto, K. Yamada, and J. Tanida. Functional molecular sensing using photonic DNA nano-processor. The 1st International Workshop on Information Physics and Computing in Nano-scale Photonics and Materials (IPCN), New Orleans, September 2012. (Invited)
6. Y. Ogura, T. Nishimura, H. Yamamoto, K. Yamada, and J. Tanida. Photonic nanoscale logic using fluorescence resonance energy transfer on a DNA scaffold. The Second Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP) 2012, Tokushima, November 2012. (Invited)

<前期公募> 「歩くナノ〇〇計の創成」(代表者：鈴木 団)

<後期公募> 「高精度の位置決めと環境測定を細胞内において一粒で可能にする粒状蛍光プローブ」(代表者：鈴木団)

1. 鈴木 団, Single-cell thermal perturbation and site-specific thermal imaging. The 9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015), 三重, 2015年12月 (招待講演)
2. 鈴木 団, Single-cell temperature sensing by fluorescence intensity- and FLIM-based methods, IMB-Olympus Advanced Microscopy Workshop 2015, シンガポール, 2015年11月 (招待講演)
3. 鈴木 団, Thermal activation and temperature measurement of single living cells, Advances in Live Single-Cell Thermal Imaging and Manipulation (ALSCTIM 2014), 2014年 (招待講演)
4. 鈴木 団, 細胞内温度計測, 分子科学研究所研究会「細胞核内反応の分子科学」, 2014年, (招待講演)
5. 鈴木 団, 1細胞サイズの温度を測る蛍光顕微鏡温度イメージング, 甲南大学サイエンスライブラリ/第13回NMMSセミナー, 2014年 (招待講演)
6. 鈴木 団, Microscopic Manipulation and Optical Imaging for Quantification in Biology, Asia Biofusion-Measurement Joint CoP Event, 2014年 (招待講演)
7. 鈴木 団, 一匹の細胞で温度を扱うこと&擬似組織系で細胞の力学負荷応答を見ること, 「細胞機能究明の最前線3」理研セミナー, 東京, 2013年
8. M. Suzuki. Temperature measurement in the scale of single cell with fluorescent temperature reporters. MBI Seminar, Singapore, 2013
9. M. Suzuki. Single cell-scale thermometry by fluorescent temperature reporters. 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM 2013), Kitakyushu, 2013
10. 鈴木 団, 蛍光顕微鏡を用いた単一細胞スケールの温度計測, 第91回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014年

11. M. Suzuki. Microscopic thermometry in a living cell by fluorescent nanoprobes. Japan-A*STAR Advanced Diagnostics Forum, Singapore, 2014

<前期公募>「三光子励起自家蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境変化のその場測定」
(代表者：中林孝和)

<後期公募>「蛍光寿命イメージングを用いた細胞内イオン濃度の動的変化の解明」(代表者：中林孝和)

1. T. Nakabayashi. Fluorescence Lifetime Imaging: Application to Intracellular Sensing. 2015 Tohoku University-Chungbuk National University-Sungkyunkwan University Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences, Suwon, December 2015
2. 中林孝和, 分子科学の細胞内への展開, 森野 Discussion, 東京, 2015年8月
3. 中林孝和, 蛍光寿命イメージングによる細胞内環境の理解, 第10回東北大学学際科学フロンティア研究所 FRIS セミナー, 仙台, 2015年8月
4. 中林孝和, 蛍光寿命イメージングによる細胞内環境測定, 新学術領域ナノメディシン分子科学公開シンポジウム, 東京, 2015年7月
5. 中林孝和, 太田信廣, 自家蛍光寿命を用いた生体分析化学の展開, 日本分析化学会第63年会, 広島, 2014年9月
6. 中林孝和, 蛍光寿命イメージングを用いた細胞計測: 寿命変化の機構解明, 日本光学会年次学術講演会, 東京, 2014年11月
7. 中林孝和, 蛍光寿命イメージングを用いた細胞観測の展開, 2013年度日本分光学会北海道支部シンポジウム, 札幌, 2014年1月
8. 中林孝和, 分光技術を用いて細胞内の環境を探る-蛍光寿命からのアプローチ-, 分光イノベーション研究会第2回シンポジウム, 大阪, 2013年11月
9. 中林孝和, 分光技術を用いて細胞内の環境を探る-蛍光寿命イメージング-, ニコンイメージングセンター・ナノテクノロジープラットフォーム学術講演会, 札幌, 2013年11月
10. 中林孝和, 蛍光寿命イメージングを用いた細胞計測の展開, 日本分光学会平成24年度生細胞分光部会シンポジウム, 2013年
11. T. Nakabayashi and N. Ohta. Application of Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) to Measure Intracellular Environments. RIES-CIS Joint Symposium, 2012

<前期公募>「細胞ナノ領域と生体微小環境における核酸送達システムの動態と機能発現解析」(代表者：畠山浩人)

1. 畠山浩人, 原島秀吉, 薬物をがん細胞・血管内皮細胞へ送り分ける DDS の開発, 第28回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012年7月

<前期公募>「イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」(代表者：合田達郎)

<後期公募>「イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」(代表者：合田達郎)

1. T. Goda. Specific interaction of phospholipid polymer with C-reactive protein. The 32nd International Conference on Photopolymer Science and Technology, Chiba, June 2015.
2. 合田達郎, アプタマートランジスタによるバイオセンシング, 第25回日本 MRS 年次大

- 会, 横浜, 2015 年 12 月
3. T. Goda, Y. Miyahara. Organic bioelectronics create ionic microenvironments mimicking inflammation and infection for elucidating activation dynamics of C-reactive protein. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Hawaii, December 2015. (Invited)
 4. T. Goda. Plasma membrane-mimicked polymers for biosensing and bioengineering. 14th Pacific Polymer Conference, Hawaii, December 2015
 5. 合田達郎, アプタマートランジスタによるバイオセンシング, 第 25 回日本 MRS 年次大会, 横浜, 2015 年 12 月 (招待講演)
 6. T. Goda. MPC as a synthetic ligand in C-reactive protein biosensing. 2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials (ICBZM 2015), Seattle, August 2015. (Invited)
 7. T. Goda. International Polymer Conferences (IPC) 2014, Tsukuba, December 2014.
 8. 合田達郎, 機能性ナノ界面の構築とバイオセンシング応用, 日本薬学会 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2014 年 8 月
 9. T. Goda. Cell Membrane-Mimetic Interfaces for Biomaterials and Bioengineering. International Polymer Conferences (IPC), December 2014. (Invited)
 10. T. Goda, K. Masuno, N. Kosaka, T. Ochiya, A. Matsumoto, Y. Miyahara. Label-free electrical detection of exosomal microRNAs using microelectrode array. NanoBio FIRST International Symposium between Sweden and Japan, Tokyo, 2013.

<前期公募>「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」(代表者: 檜田 啓)

<後期公募>「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」(代表者: 檜田 啓)

1. H. Kashida. Highly-sensitive RNA detection by using In Stem Molecular Beacon. China/Japan Young Chemists Forum, Beijing, August 2014. (Invited)
2. 檜田 啓, 機能性核酸材料の創製を目指した人工塩基対の開発, 第 63 回高分子学会年次大会, 名古屋, 2014 年 5 月 (招待講演)
3. 檜田 啓, Orientation-dependent FRET system for structural analyses of nucleic acids. NMMS セミナー, 東京, 2015 年 7 月 (招待講演)
4. H. Kashida. Development of a robust FRET system for structural analyses of DNA duplexes. BIT's 6th World Gene Convention-2015, China, November 2015. (Invited)
5. 檜田 啓, 人工塩基対の開発による機能性核酸の創製, 九州地区高分子若手研究会・夏の講演会, 北九州, 2013 年 7 月 (招待講演)
6. H. Kashida. Preparation of novel artificial base pairs for functionalization of DNA. The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), Tokyo, November 2012. (Invited)

<前期公募>「細胞環境を再現したフェムトリットル空間デバイスの創製とその生化学反応への展開」(代表者: 加地範匡)

1. N. Kaji. Nanobiodevices-based Single Biomolecule and single Cell Analysis for Cancer Diagnosis/Therapy and Stem Cell Therapy. LAB-ON-A-CHIIP ASIA 2013, Singapore, 2013.
2. N. Kaji. High speed and highly sensitive biomolecule measurements by nanopillar- and

nanopore-based nanobiodevices, 17th KAST International Symposium on "The Multi-Omics and Nano Biotechnology for Human Disease Research", Seoul, 2013.

3. 加地範匡, “大きな技術”で小さな生体分子を視る・操る, さかえサイエンストーク, 名古屋, 2012年10月
4. N. Kaji and Y. Baba. Micro- and Nanofabricated Structures on a Chip for Biomolecule Analysis in Artificial Intracellular Environments. ISMM2012, Hsinchu, June 2012. (Invited)
5. N. Kaji. Micro- and Nanofabricated Structures on a Chip for Biomolecule Analysis in Artificial Intracellular Environments. ISMM2012, Hsinchu, June 2012..

<前期公募> 「自己集合型ナノプローブによる細胞内酵素反応のリアルタイム解析」(代表者: 中田栄司)

<後期公募> 「自己集合型ナノキャリアの創製」(代表者: 中田栄司)

1. E. Nakata. The rational design of latent ratiometric fluorescent pH probes based on self-assembled SNARF derivatives. 7th Japan-Taiwan nanomedicine symposium, Kyoto, January 2016.
2. E. Nakata. The rational design strategy for latent ratiometric fluorescent pH probe. ISAMR 2015, Taipei. August 2015 (Invited)
3. E. Nakata. The Rational Design of Latent Ratiometric Fluorescent pH Probe for Intracellular pH Measurement. ISOMRM. (Invited)
4. ナノ粒子・構造応用研究会第9回公開講演会, 外部刺激応答性自己集合化蛍光プローブを用いたバイオイメージング、東京、2014年9月

<前期公募> 「光増感によるエンドソーム脱出の分子科学」(代表者: 大槻高史)

<後期公募> 「光増感剤修飾分子を用いたPCIの分子科学」(代表者: 大槻高史)

1. T. Ohtsuki. Light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Tokyo, October 2013.
2. 大槻高史, 光で細胞機能を操る, テラヘルツと生命科学融合による革新的イノベーションワークショップ, 2013年12月
3. 大槻高史, 光に応答する生体機能分子, バイオマテリアル学会 第2回中四国ブレインストリーミング, 2014年2月

<前期公募> 「エンドソーム脱出能チューニングによるウイルス様動的構造変化惹起ナノカプセルの構築」(代表者: 原田敦史)

<後期公募> 「細胞取込過程の環境変化を認識するナノカプセルの構築と超音波力学療法への展開」(代表者: 原田敦史)

1. 原田敦史, 非侵襲治療のための酸化チタン内包高分子ミセル開発, 大阪府立大学・大阪市立大学 新技術説明会, 大阪 2013年10月
2. 原田敦史, 異種高分子連結高分子電解質のポリイオンコンプレックス形成, ゲルワークショップ イン 名古屋, 名古屋 2012年9月
3. 原田敦史, 超音波照射により治療効果を発現するドラッグデリバリーシステム, 大阪府立大学・大阪市立大学ニューテクフェア 2012, 大阪, 2012年11月

<前期公募>「細胞の微弱電流環境下における物質取り込み変化の機構解明と革新的薬物送達への展開」(代表者：小暮健太郎)

<後期公募>「画像解析による微弱電流依存性の細胞内輸送亢進機構解明と革新的指向性DDSへの展開」(代表者：小暮健太郎)

1. K. Kogure. Anti-cancer vaccination by transdermal delivery of antigen peptide-loaded nanogels via iontophoresis. 1st Symposium for the Promotion of Applied Research Collaboration in Asia 2015, Taipei, 2015.
2. K. Kogure. Noninvasive and effective transdermal delivery of macromolecular medicines by faint electric treatment. 32nd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences held by the Chulalongkorn University Faculty of Pharmaceutical Sciences, Bangkok, March 2016.
3. K. Kogure. Anti-cancer vaccine by transdermal delivery of antigen peptides-loaded nanogel by faint electric treatment. The 7th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, Ha Long City, November 2014.
4. 小暮健太郎, 塩田佳菜子, 気賀澤郁, 梶本和昭, 濱進, イオントフォレシスによる抗酸化成分の皮内送達, 第6回経皮投与製剤FGシンポジウム, 東京, 2014年11月
5. M. Toyoda, S. Hama, Y. Ikeda, Y. Nagasaki, K. Kogure. Anti-cancer vaccine by transdermal delivery of antigen peptides-loaded nanogel by faint electric treatment. The 7th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, Ha Long City, November 2014.
6. K. Kogure, M. Toyoda, S. Hama, Y. Ikeda, Y. Nagasaki. Anti-cancer vaccination by transdermal delivery of antigen peptide-loaded nanogels via iontophoresis. 1st Symposium for the Promotion of Applied Research Collaboration in Asia 2015, Taipei, February 2015.
7. K. Kogure, S. Hama, K. Kigasawa, K. Kajimoto. Noninvasive and effective transdermal delivery of functional macromolecules by iontophoresis. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) 2013, Jeju, November 2013
8. 小暮健太郎, イオントフォレシスによる高分子物質の経皮送達メカニズム, 第5回経皮投与製剤FGシンポジウム, 東京, 2013年11月
9. K. Kogure. Noninvasive and effective transdermal delivery of functional oligonucleotides by iontophoresis. The 6th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, HaLong City, November 2012
10. 小暮健太郎, 微弱電流刺激による高分子物質の皮膚透過促進メカニズム, 第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 京都, 2012年11月
11. 小暮健太郎, 高分子物質のイオントフォレシス, 日本薬剤学会第4回経皮投与製剤FGシンポジウム, 東京, 2012年11月
12. 小暮健太郎, 微弱電気を用いた経皮ワクチンデリバリー技術の開発, シンポジウムーナノバイオテクノロジーに基づくDDS技術による新世代ワクチン技術, 東京, 2012年12月

<前期公募>「糖鎖改変技術を利用したセルベースデバイスの設計」(代表者：岩崎泰彦)

<後期公募>「糖鎖改変技術を利用したバイオ輸送システム」(代表者：岩崎泰彦)

1. Y. Iwasaki. Pacificchem 2015 Control of selectin-mediated cell adhesion on glycoprotein-conjugated matrices. (招待講演)
2. Y. Iwasaki. Design of mammalian cell-mediated biomaterials. International Biomaterials

- Symposium, Clemson, 2015. (Invited)
3. Y. Iwasaki. Photo irradiation-assisted preparation of biointeractive PC surfaces. ICBZM 2015, Seattle, August 2015 (Invited)
 4. Y. Iwasaki. Preparation of polymer-glycoprotein bioconjugates and their molecular recognition. 2014 ISOMRM (Invited)
 5. Y. Iwasaki. Surface modulation of carbohydrate ligands on cells Using Polymerization technique. CIMTEC 2014, Montecatini Terme, June 2014. (Invited)
 6. 岩崎泰彦, 細胞要素を組み込んだポリマーバイオマテリアルの設計, 第 78 回高分子若手研究会, 吹田, 2012 年 7 月
 7. 生体に倣ったリン含有ポリマーバイオマテリアルの設計, プラスチック技術者協会の定例講演会, 東京, 2012 年 10 月
 8. 細胞膜に倣ったポリマーバイオマテリアルの設計と応用, 第 54 回湘北地区懇話会, 平塚, 2012 年 11 月

＜前期公募＞「細胞内分子環境の化学模倣系の構築とそれを用いたテロメア核酸プローブの開発」(代表者：三好大輔)

＜後期公募＞「細胞が産生する浸透圧調節分子と人工高分子化合物を用いた細胞モデル実験系の構築」(代表者：三好大輔)

1. 三好大輔, 山口野乃花, 嶋田直彦, 中野修一, 杉本直己, 丸山厚, カチオン性高分子による細胞核内模倣環境における DNA が形成する二次構造の熱力学的安定性, 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会, 仙台, 2015 年 6 月
2. 上田侑美, 金野智浩, 石原一彦, 杉本直己, 三好大輔, 両性イオン分子によるクラウディング環境における DNA が形成する二次構造の熱力学的安定性, 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会, 仙台, 2015 年 6 月
3. R. Moriyama, D. Miyoshi, Y. Iwasaki. DNA structures stabilized with poly(ethylene sodium phosphate). International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015), Honolulu, December 2015.
4. D. Miyoshi, N. Yamaguchi, N. Shimada, N. Sugimoto, A. Maruyama. A comb-type cationic copolymer inducing a reversible B-A transition of DNA duplex. The 7th Japan –Taiwan Symposium on Nanomedicine, Kyoto, January 2016.
5. 三好大輔, 細胞内分子クラウディング環境で安定化する DNA の非標準構造, 医学研セミナー, 東京, 2015 年 5 月
6. 三好大輔, 分子クラウディング環境で機能する核酸四重らせん構造リガンドとその展開, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015 年 12 月
7. 三好大輔, 細胞の分子クラウディングによって誘起される核酸の構造多様性, 高分子学会九州支部フォーラム, 熊本, 2016 年 1 月
8. 丸山厚, 嶋田直彦, 三好大輔, 上田侑美, 中野修一, 杉本直己, カチオン性くし型共重合体の DNA 構造特異的相互作用: パラレル二重鎖選択的安定化, 第 63 回高分子学会年次大会, 名古屋, 2014 年 5 月
9. 前田龍一, 中林孝和, 村嶋貴之, 杉本直己, 三好大輔, 核酸四重らせん構造リガンドの新規スクリーニングシステムの開発, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 9 回年会, 大阪,

2014年6月

10. Y. Ueda, T. Konno, K. Ishihara, N. Sugimoto, D. Miyoshi. DNA structures under molecular crowding conditions with choline phosphate derivative (MPC). The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, August 2014.
11. R. Maeda, T. Nakabayashi, V. Gabelica, H. Yaku, T. Murashima, N. Sugimoto, N. Ohta, D. Miyoshi. DNA G-quadruplex detection system by use of a protein fibril ligand. The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, August 2014.
12. 前田龍一, 鮎澤隼哉, 中林孝和, 村嶋貴之, 杉本直己, 三好大輔, チオフラビン T を利用した新規四重らせん構造リガンドスクリーニングシステムの開発, 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山, 2014年9月
13. 三好大輔, 嶋田直彦, 中野修一, 杉本直己, 丸山厚, カチオン性くし型共重合体によるDNA 三重らせん構造の特異的安定化. 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山, 2014年9月
14. R. Maeda, H. Kashida, H. Asanuma, N. Sugimoto, and D. Miyoshi. FRET-based detection of G-quadruplexes in the 5'-UTR cancer related mRNAs. 第41回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014), 小倉, 2014年11月
15. Y. Ueda, T. Konno, Kazuhiko Ishihara, Naoki Sugimoto, and Daisuke Miyoshi. Thermodynamics of DNA structures under molecular crowding conditions with naturally-occurring biomolecules. 第41回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014), 小倉, 2014年11月
16. D. Miyoshi, Y. Ueda, N. Shimada, S. Nakano, N. Sugimoto, A. Maruyama. DNA structure and stability under molecular crowding conditions. Asian Chemical Biology Conference (ACBC) 2014, Singapore, December 2014.
17. D. Miyoshi. Structural polymorphism of DNA induced and regulated by molecular crowding. National University of Kaohsiung Dept of Applied Chemistry Seminar, Kaohsiung, January 2015.
18. 三好大輔, 細胞内分子環境でも機能する分子の合理設計指針, 第3回 エキゾチック自己組織化材料シンポジウム, 鳥取, 2014年12月
19. Daisuke Miyoshi. Non-canonical DNA structures under molecular crowding conditions. School of Physics & Mathematical Science Seminar, Singapore, December 2014.
20. 三好大輔, 細胞内でも活性を保持できる機能性分子の合理設計に向けた取り組み, 東京農工大学工学部講演会, 東京, 2014年9月
21. 三好大輔, 細胞模倣環境における DNA 四重らせん-リガンド相互作用, 東京農工大学大学院生命工学専攻講演会, 東京, 2013年4月
22. 三好大輔, DNA-グラフェン相互作用の定量解析による新規バイオセンシングプラットフォームの開発, BioJapan 2013 World Business Forum, 横浜, 2013年10月
23. 三好大輔, 細胞模倣環境における核酸の構造と安定性, 第7回 NMMS セミナー, 東京, 2014年1月
24. 三好大輔, 細胞内外で機能する核酸分子の設計開発, 日本生物工学会第104回醗酵学懇話会, 2014年2月
25. 三好大輔, 細胞内模倣環境におけるテロメア DNA の構造安定性とテロメラーゼ酵素の機能, ナノとバイオの最先端研究セミナー, 福岡, 2012年5月 (招待講演)

<前期公募>「革新的生体ナノイメージング技術による繊毛疾患の分子機構解明」(代表者：上野裕則)

1. H. Ueno, Khanh H. Bui, T. Ishikawa, Y. Imai, T. Yamaguchi, T. Ishikawa. An alternative force generation of dimeric dynein in cilia revealed by cryo-electron tomography. Dynein 2013, Kobe, November 2013.
2. H. Ueno, T. Ishikawa, K.H. Bui, K. Gonda, T. Yamaguchi, T. Ishikawa. Nano-imaging of ciliary motion and structure by light and electron microscopy. ナノメディシン分子科学国際シンポジウム, 東京, August 2013.
3. 上野裕則、気管繊毛ダイニンの軸糸内における構造変化, 日本機械学会 バイオエンジニアリング講演会, 仙台, 2014年1月
4. H. Ueno, Ciliary motion and the three dimensional structure of mouse respiratory cilia. 日本生物物理学会 「個体の生物物理学-分子・細胞・個体にブリッジ」 “Biophysics toward In Vivo work”, 京都, October 2013.
5. 上野裕則、気管の繊毛運動の定量化と3次元構造解析, ナノメディシン分子科学 第2回 若手の会、京都、2013年5月
6. 上野裕則、気管繊毛外腕ダイニンの3次元構造とヌクレオチドによる構造変化, 日本顕微鏡学会、大阪、2013年5月
7. 上野裕則、フイブイ、石川尚、石川拓司、山口隆美、気管繊毛外腕ダイニンの3次元構造とヌクレオチドによる構造変化, 第65回 日本細胞生物学会, 愛知, 2013年6月
8. H. Ueno, T. Ishikawa, K.H. Bui, K. Gonda, T. Yamaguchi, T. Ishikawa, Nano-imaging of ciliary motion and structure with light and electron microscopy. Japan-Taiwan Nanomedicine Symposium, Taiwan, January 2012.
9. H. Ueno, T. Ishikawa, K.H. Bui, K. Gonda, T. Yamaguchi, T. Ishikawa, Analysis of ciliary motion and the axonemal structure in the mouse respiratory cilia. ASME 2012 Summer Bioengineering Conference, Fajardo, June 2012.

<前期公募>「幹細胞制御機能を有するタンパク質担持基材の分子設計」(代表者：中路 正)

1. 中路 正, Gujral Chirag, 北野博巳, 藤本くる美, 皆川雄太, キメラタンパク質担持材料を用いた細胞機能の精密制御 ～キメラタンパク質製バイオマテリアルの創製～, 第26回 日本動物細胞工学会 2013年度大会, 福井, 2013年7月 (招待講演)
2. 中路 正, 藤本くる美, 古川彩希, 北野博巳, 井上祐貴, 石原一彦, タンパク質担持バイオマテリアルの細胞制御メカニズムの理解と高機能医用材料への展開, 第62回高分子討論会, 金沢, 2013年9月
3. 中路 正, 井上祐貴, 石原一彦, 基材に担持したタンパク質の作用機序の理解, 第62回高分子学会年次大会, 京都, 2013年5月
4. 中路 正, 幹細胞医療の実現に貢献するためのタンパク質複合化高分子材料の創製, 第2回医薬・バイオ応用を目指した高分子ナノ構造研究会, 富山, 2012年11月
5. 中路 正, 神経分化誘導にとって最適な細胞外環境構築のための材料特性の探索, 第61回高分子学会北陸支部研究発表会, 福井, 2012年11月

<前期公募>「細胞内局所での分子反応と軸索変性との関連を明らかにする」(代表者：小西

慶幸)

<後期公募> 「軸索パターンの構築において空間情報伝達と構造的安定化を司る分子反応の解明」(代表者: 小西慶幸)

1. 小西慶幸, 池野龍輝, 瀬野岳史, 面谷耕佑, 栗下雅行, 栄成美, 佐藤真, 高田宗樹, 微小管と軸索輸送の制御を介した軸索形態の維持システム, 第 121 回日本解剖学会総会・学術集会, 2016 (招待講演)
2. Y. Konishi, T. Seno, K. Kubota, N. Sakae, H. Takada. The region specific control of branch stability in axonal arbors mediated by kinesin mediated transport. 9th International Symposium on Nanomedicine, Tsu, December 2015
3. Y. Konishi, T. Seno, K. Kubota, N. Sakae, H. Takada. Local regulation of molecular reactions in maintaining axonal morphology. 7th International Symposium on Nanomedicine, Kitakyushu, November 2013.

<前期公募> 「固液界面におけるタンパク質間相互作用に及ぼす分子クラウディングの影響」(代表者: 加藤功一)

1. I. Hirata, K. Kato. Effect of molecular crowding on the dynamics of antigen-antibody interactions at solid/liquid interfaces. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science in Nagoya, Nagoya, January 2014.
2. 平田伊佐雄, 加藤功一, 固液界面における抗原-抗体反応に及ぼす分子クラウディングの影響, 第 42 回医用高分子シンポジウム, 2013 年 7 月
3. 平田伊佐雄, 加藤功一, Effect of molecular crowding on the dynamics of protein-protein interactions at solid/liquid interfaces, 第 46 回広島大学歯学会総会, 2013 年 3 月
4. I. Hirata, K. Kato. Effect of molecular crowding on antibody-antigen interactions at solid-liquid interfaces. The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Taipei, January 2013.
5. 平田伊佐雄, 加藤功一, 固液界面における抗原-抗体反応速度に及ぼす分子クラウディングの影響, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 仙台, 2012 年 11 月

<前期公募> 「ケミカルデバイスを利用した siRNA によって誘起される分子反応の発現機構解明」(代表者: 南川典昭)

<後期公募> 「ナノ核酸デバイスを用いた自然免疫応答発現機構の網羅的解析」(代表者: 南川典昭)

1. N. Minakawa. The 4th International Conference on Biotechnology and Bioengineering, 2015 年 12 月 (招待講演)
2. N. Minakawa. A New Approach For Gene Silencing Using 4'-ThioDNA. 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2015), Korea, October 2015. (Invited)
3. N. Minakawa. Development of RNAi Medicine Using 4'-ThioDNA. The 4th International Conference on Biotechnology and Bioengineering (ICBB2015), Singapore, December 2015. (Invited)
4. 南川典昭, Chemistry of 4'-selenonucleic acids. -Can 4'-selenonucleic acids exceed 4'-thionucleic acids?-, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014

5. 南川典昭, 4'-チオ核酸を用いる核酸創薬研究の展望, NMMS 第 15 回セミナー、京都、2014 年 9 月

＜前期公募＞「細胞内動態を応用した新規 DDS ナノキャリアーの検討」(代表者: 板野 理)

1. 松田祐子 実験と動物モデル、NMMS 第 11 回セミナー、神戸、2014 年 3 月

＜後期公募＞「1 細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いた細胞死に関わる生体分子の 1 分子計測」(代表者: 許 岩)

1. 許 岩, マイクロ化学チップのお話し: 髪の毛ほどの太さの流路を使って化学をする, 科学技術振興機構次世代科学者育成プログラム「未来の博士」育成ラボ H27 年度開講式, 2015 年 4 月
2. Y. Xu. Nanobio interfaces innovation enabling nanofluidics: general methodology, critical techniques, and nanobio applications. Lecture Series for the 100th Anniversary of the Birth of Lu Jiayi, Fuzhou, November 2015 (Invited)
3. Y. Xu. Site-specific working inside nanofluidic channels: general methodology, critical techniques, and nanobio applications. The 2nd FZU-OPU Joint International Symposium on Photocatalysis, Phot-functional Materials and Nano-Science & Technology, Fuzhou, November 2015 (Invited)
4. Y. Xu. Site-specific working inside nanofluidic channels: general methodology, critical techniques, and nanobio applications. The 5th International Conference on Optofluidics 2015, Taipei, July 2015 (Invited)
5. Y. Xu. Functionalization of Nanofluidic Channels and its Application to NanoBio Sciences. Summit of Biomedical and Health Engineering, Shenzhen, January 2015 (Invited)

＜後期公募＞「高分子超薄膜を用いた未活性浮遊細胞固定技術“ナノラッピング”の確立と機能解明」(代表者: 岡村陽介)

1. 岡村陽介, 生分解性超薄膜(ナノシート)の創製と新規医用材料への応用展開, 第 19 回 NMMS セミナー, 東京, 2015 年 5 月 (招待講演)
2. 岡村陽介, ナノ厚に加工した高分子超薄膜の不思議 ~新規医用材料への挑戦~, 日本接着学会粘着研究会 5 月度例会, 東京, 2015 年 5 月 (招待講演)
3. 岡村陽介, 高分子超薄膜の開発とユニークな特性を利用した医療領域への応用展開, 第 351 回ゴム技術フォーラム月例会, 2015 年 9 月 (招待講演)
4. 岡村陽介, マテリアルの厚みで組織接着性を制御する ~高分子超薄膜の創製と医用展開~, 日本接着学会生体材料接着研究会, 東京, 2016 年 2 月 (招待講演)

＜後期公募＞「実験的に抽出された分子反応パラメータを導入したマラリア感染赤血球モデルの開発」(代表者: 今井陽介)

1. Y.Imai, N.Takeishi, S.Ishida, T.Ishikawa. Graphics processing unit computing of cellular flow and adhesion in microvessels. 3rd International Workshops on Advances in Computational Mechanics, Tokyo, 2015 (Invited)
2. Y.Imai, H.Ito, D.Matsunaga, T.Omori, T.Yamaguchi, T.Ishikawa. Viscosity reduction in bimodal suspensions of two types of capsules. 13th U. S. National Congress on Computational

Mechanics, San Diego, 2015 (Invited)

3. 招待講演：今井陽介，武石直樹，阿見祥久，山口隆美，石川拓司「微小血管内の細胞流動・接着現象の計算力学モデル」第53回生体医工学会大会 (2014)
4. Y.Imai, A.Ami, T.Yamaguchi, T.Ishikawa. A numerical simulation on the motion of malaria-infected cells in microcirculatory blood flow. 7th World Congress on Biomechanics, Boston (2014) (Invited)

<後期公募>「細胞機能解明のためのエクソソーム定量解析ナノデバイスの創製」(代表者：安井隆雄)

1. 安井隆雄、ナノ構造体を利用した生体由来物質の解析、第12回生物計測化学懇談会、札幌、2015年2月
2. 安井隆雄、ナノバイオデバイスを用いた生体分子解析法の開発、第34回分析化学中部夏期セミナー、2015年8月(招待講演)
3. 安井隆雄、Nanowires for analyzing biomolecules, 2nd Asian Symposium for Analytical Sciences, Fukuoka, September 2015 (Invited)
4. 安井隆雄、ナノ構造体を用いた分析手法の開発、第9回日本化学会東海支部若手研究者フォーラム、2015年12月(招待講演)
5. 安井隆雄、Nanostructures for biomolecule analysis, Pacificchem 2015, Honolulu, December 2015. (Invited)
6. ナノ構造体を用いた生体分子解析、第29回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2014年5月
7. 安井隆雄、ナノワイヤ構造体を用いた生体分子解析、第33回分析化学中部夏期セミナー、富山、2014年9月
8. 安井隆雄、ナノ構造体を用いた生体分子解析、第29回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2014年5月(招待講演)
9. 安井隆雄、ナノワイヤ構造体を用いた生体分子解析、第33回分析化学中部夏期セミナー、2014年9月(招待講演)
10. 安井隆雄、ナノワイヤを用いたエクソソーム分離抽出技術、中部地区 医療・バイオ系シリーズ発表会、2014年12月(招待講演)
11. 安井隆雄、ナノ構造体を利用した生体由来物質の解析、第12回生物計測化学懇談会、2015年2月(招待講演)
12. T. Yasui, Nanowires for Functional Biomolecule Detection, Pittcon Conference & Expo 2015, New Orleans, March 2015. (Invited)

<ウ・図書>

【A01】ナノメディシンの分子科学（分子情報測定）

【A01】「細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析」（代表者：樋口秀男）

1. 樋口秀男, 多田隈尚史. 12 章 細胞内での運動. 1 分子生物学(編集 石渡信一, 原田慶恵) 化学同人, 2014 年 10 月
2. 茅元司. 2 章 筋肉ミオシン. 1 分子生物学 (編集 石渡信一, 原田慶恵) 化学同人, 2014 年 10 月
3. 樋口秀男, 神原丈敏. 歩行型分子モーター, ダイニン, パリティ, 2013 年 3 月
4. 茅元司, 樋口秀男. ビジュアルレビュー: 筋肉の巧みな収縮メカニズム. 感染・炎症・免疫, 42-2, 28-35
5. 樋口秀男, 神原丈敏. 歩行型分子モーター, ダイニン, パリティ, 2013 年
6. 樋口秀男, 権田幸祐. 量子ドットを用いたがん細胞の単一分子イメージング. バイオマテリアル(NTS 出版), 2012 年
7. Y.Toyoshima, H.Higuchi, Motile and Enzymatic properties of native dynein molecules
8. K. Hirose, LA Amos, Handbook of Dynein, (2012)
9. Y.Toyoshima, H.Higuchi, Motile and Enzymatic properties of native dynein molecules, Handbook of Dynein, (2012)
10. 樋口秀男. ナノバイオ. 理大科学フォーラム. 8 19-24, 2011 年
11. 樋口秀男. マウス個体内の 1 分子計測. 現代化学, 2011 年

【A01】「細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析」（代表者：由井伸彦）

1. K.Ishihara, H.Oda, T.Konno, Cytocompatible and reverse-transformable polymeric hydrogel matrices, Handbook of Intelligent Scaffolds for Regenerative Medicine 2nd Eds, Pan Stanford and CRC (Taylor & Francis) Singapore, (2016)
2. K. Ishihara, H. Oda, T. Aikawa, T. Konno, Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering, Macro Sympo, 351(1) 69-77 (2015)
3. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara, Cytocompatible and spontaneous forming phospholipid polymer hydrogel, Eur Polym J, 72 577-589 (2015)
4. 田村篤志, 由井伸彦. 細胞内分解性ポリロタキサンをを用いた薬物送達と超分子医薬への応用. DDS キャリア作成プロトコル集(監修 丸山一雄) シーエムシー出版, 80-88, 2015 年
5. 田村篤志, 由井伸彦. 細胞内分解性ポリロタキサンのによるニューマンピック病 C 型治療. 化学工業, 66(12) 925-932 (2015)
6. T. Konno. Cytocompatible phospholipid polymers for non-invasive nanodevices, Intracellular Delivery II Aleš Prokop, Springer Netherlands, 255-264 (2014)
7. 金野智浩. リン脂質ポリマーヒドロゲルを用いた細胞機能制御. ゲルテクノロジーハンドブック(監修 中野義夫) 株式会社エヌ・ティー・エス, 789-792, 2014 年 10 月
8. A.Tamura, N.Yui, Threaded macromolecules as a versatile framework for biomaterials, Chem Commun, 50 (88) 13433-13446 (2014)
9. 金野智浩. 生細胞を可逆的に固定化する細胞親和性リン脂質ポリマーヒドロゲル -細胞固定化ポリマーマトリックス・セルコンテナ-. バイオマテリアル研究の最前線, 2014 年

10. 田村篤志. 細胞内リリース効率改善による生理活性向上を企図した分解性超分子-生体高分子複合体の設計. バイオマテリアル—生体材料—. 32 (1) 33-34, 2014 年
11. 金野智浩. 細胞ソースをつくる:細胞親和性ポリマーによる細胞の機能保持・回収. バイオマテリアル, 30(3) 148-152, 2012 年
12. 由井伸彦. 「ポリロタキサン」の超分子構造による薬物キャリア. 未来医療を支える先端バイオマテリアル(編集 石原一彦, 秋吉一成, 山岡哲二) エヌティーエス東京, 2012 年
13. N.Yui, Emerging biomedical functions through “mobile” polyrotaxanes, *Supramolecular Polymer Chemistry*, Wiley-VCH, 195-204 (2012)
14. Kazuhiko Ishihara, Yan Xu, Tomohiro Konno, Cytocompatible hydrogel composed of phospholipid polymers for regulation of cell functions, *Adv Polym Sci.* 247 141–166 (2012)

【A02】 ナノメディシンのための分子科学 (分子情報導出)

【A02】「バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス」(代表者: 石原一彦)

1. K.Ishihara, H.Oda, T.Aikawa, T.Konno, Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering, *Macromol Symp*, 351(1) 69-77 (2015)
2. B.Gao, T.Konno, K.Ishihara, Cytocompatible and spontaneous forming phospholipid polymer hydrogels, *Eur Polym J*, 72 577-589 (2015)
3. Yasuhiko Iwasaki, Kazuhiko Ishihara, Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces, *Sci Technol Adv Mate*, 13 064101 (2012)
4. Kazuhiko Ishihara, Yan Xu, Tomohiro Konno, Cytocompatible hydrogel composed of phospholipid polymers for regulation of cell functions, *Adv Polym Sci*, 247 141–166 (2012)
5. Kazuhiko Ishihara, Yusuke Goto, Ryosuke Matsuno, Biomimetic polymer nanoparticles embedding quantum dots, *MRS Proceedings* 1357, mrss11-1357-1106-07 (2011)

【A02】「直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製」(代表者: 三宅淳)

1. 新岡宏彦, 古川太一, 橋本守. ナノ蛍光体を用いたカソードルミネッセンスイメージング技術. 顕微鏡 Vol.49, 2014 年
2. Sho Shinohara, Satoko Shinohara, Takanori Kihara, Jun Miyake, Regulation of differentiated phenotypes of vascular smooth muscle cells, *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans*, InTech, 331-344 (2012)
3. 木原隆典, 中村 史, 三宅 淳. ナノニードルによる細胞内分子評価と生体適合性高分子の利用. *ファインケミカル*, 40 33-40, 2011 年

【A02】「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」(代表者: 丸山厚)

1. 狩野有宏, 丸山厚. PEG をグラフトしたポリ-L-リシンの siRNA との相互作用および血中滞留性と腫瘍集積性の検討. *Antisense*. 15 3-11, 2011 年

【A03】 ナノメディシンのための分子科学 (分子情報応用)

【A03】「多点の弱い相互作用を利用した分子/細胞の制御」(代表者: 岩田博夫)

1. 有馬祐介. DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体を用いた細胞表面修飾. *表面科学*, 2017 年

2. 岡本行広, 辻本悠亮, 馬越大. ナノバイオ分析の新展開 ～新たな駆動力・分子認識場の活用～. 分離技術, 44 23-27, 2014 年
3. 岡本行広. 支持脂質膜を利用した膜タンパク質の電気泳動分離分析. ぶんせき, 691, 2014 年
4. 有馬祐介, 自己組織化単分子膜を用いた細胞－材料間相互作用の解析. Colloid & Interface Communication, 37 (2013)
5. Y.Teramura, H.Chen, N.Takemoto,, K.Sakurai, H.Iwata, Polymeric materials for surface modification of living cells. Polymeric Biomaterials, Volume II, Medicinal and Pharmaceutical Applications of Polymers: Third Edition, (2017)
6. 岩田博夫, 陳顥, 出野翔, 竹本直紘, 寺村裕治. 生細胞への低分子薬剤の担持とその移植医療への応用. 日本化学繊維研究所講演集, 69 120-129, 2012 年
7. 竹本直紘, 岩田博夫. インスリン分泌細胞の機能維持を目指したバイオ人工膵臓－細胞表面修飾－. 医学のあゆみ
8. 寺村裕治, 岩田博夫. 第3章 膵島細胞による再生医療 3.3 バイオマテリアルが切り開く新規膵島治療 再生医療叢書 第5巻 代謝系臓器. 朝倉書店, 2011 年
9. 有馬祐介, 寺村裕治, 岩田博夫. 表面修飾による生体反応のコントロール. 高分子, 717 733-735, 2011 年

【A03】「がんリンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発」(代表者：権田幸祐)

1. 小林芳男, 権田幸祐, 大内憲明. 第10節 ナノカプセル造影剤の開発 マイクロ/ナノカプセルの調製. 徐放性制御と応用事例 (技術情報協会), 264-271 2014 年
2. 権田幸祐. 第13章 個体のなかでの1分子機能解析は可能か. 1分子生物学 (編集 原田慶恵, 石渡信一) 化学同人, 2014 年
3. 久保田洋介, 権田幸祐, 小林芳男, 亀井尚, 中川智彦, 松戸寛武, 渋谷恭介, 大内憲明. X線 CT と蛍光を用いたリンパ節のデュアルイメージングナノ 学会会報, 12(2) 69-72, 2014 年
4. Kobayashi Y, Gonda K, Ohuchi N, Imaging processes using core-shell particle colloid solutions for medical diagnosis, Athens Journal of Natural & Formal Sciences, 1 (1) 31-41 (2014)
5. 権田幸祐, 中川智彦, 櫻井遊, 多田寛, 小林芳男, 大内憲明. X線 CT イメージングへのナノ粒子造影剤の応用. 東北大学医学部保健学科紀要 22 (2), 61-66, 2013 年
6. 多田寛, 権田幸祐, 大内憲明. がんの in vivo 1分子イメージング ここまで進んだバイオセンシング・イメージング Part II 研究最前線 18章 化学同人, 166-171, 2012 年
7. 中川智彦, 権田幸祐, 亀井尚, 叢莉蔓, 久保田洋介, 大内憲明. 金ナノ粒子を用いた CT イメージング ナノ学会会報, 11 (1) 27-30, 2012 年
8. 樋口秀男, 権田幸祐. 第4章 14節 量子ドットを用いたがん細胞の単一分子イメージング 先端バイオマテリアルハンドブック (NTS 出版), 478-481, 2012 年
9. 濱田庸, 権田幸祐, 佐藤成, 山家智之, 里見進, 大内憲明. 血管新生における血管内皮増殖因子受容体分布の生体分子イメージング ナノ学会会報, 10(1), 35-39, 2011 年
10. 上村想太郎, 小澤岳昌, 加地範匡, 権田幸祐. 見つけることに意義がある-1分子計測の可能性- 現代化学, 26-30, 2011 年
11. 権田幸祐, 樋口秀男, 渡邊朋信, 武田元博, 大内憲明. ナノイメージングで探るがん転移の仕組み. SURGERY FRONTIER, 18 (1) 50-57, 2011 年

【A03】「遺伝子解析と分子トレーシングを基盤とした細胞標的分子の創製」（代表者：夏目敦至）

1. 夏目敦至. 脳実質内腫瘍摘出術. 脳神経外科プラクティス
2. 夏目敦至. グリオーマの摘出. 脳神経外科ジャーナル
3. 夏目敦至,本村和也,大岡史治,鈴木啓道,若林俊彦. 神経膠芽腫のプロファイリング 病理と臨床
4. 出口彰一,近藤豊,夏目敦至. 神経膠腫におけるエピジェネティクス機構と non-coding RNAs
5. 夏目敦至. 脳腫瘍のゲノム解析に基づく新戦略. 臨床医のための脳神経外科
6. 夏目敦至, 棚橋邦明. 神経線維腫症 II 型. 日本臨床神経症候群
7. 夏目敦至. Pyrosequencing による MGMT メチル化解析. Clinical Neuroscience, 2014 年
8. 夏目敦至. グリオーマに対する化学療法の最新知見. 脳神経外科ジャーナル, 2014 年
9. 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第 3 版. 医学書院, 34-37, 2009 年
10. 夏目敦至. 遺伝子診療学—脳腫瘍—ゲノム異常の最新アトラス. 日本臨床, 56-62, 2010 年
11. 夏目敦至. 新時代の脳腫瘍学—脳腫瘍におけるエピジェネティクス, 日本臨床, 34-42, 2010 年
12. 夏目敦至. 脳腫瘍取扱い規約 (第 3 版) 金原出版, 50-55, 2010 年

公募研究【前期：2012（平成 24 年度）～2013（平成 25 年度）】

【A01】ナノメディシンの分子科学（分子情報測定）

<前期公募> 「生細胞イメージングによる内在性 mRNA 分解過程の定量解析」（代表者：岡部弘基）

<後期公募> 「内在性 mRNA の一分子イメージングによる RNA 代謝機構の解明」（代表者：岡部弘基）

1. 岡部弘基. 蛍光性ポリマー温度センサー. 生体の科学 66 (2) 163-168, 2015 年
2. 岡部弘基. 蛍光イメージング法による生細胞内温度計測法の開発と応用. 分析科学 BUNSEKI KAGAKU, 63 (6), 455-465, 2014 年
3. 岡部弘基. 細胞内部の温度をみたい—蛍光イメージングによる細胞内温度変化と分布の可視化. 実験医学(増刊号), 32 (15), 186-193, 2014 年
4. 岡部弘基. 細胞内温度イメージングで見えてきた熱と細胞の関係. 生体の科学, 65 (5) 400-401, 2014 年
5. 岡部弘基. 蛍光性ポリマー温度センサーを用いた生細胞内の温度測定とイメージング. 実験医学, 31 (11) 1799-1805, 2013 年
6. 岡部弘基. 観るだけでなく測る:定量的イメージングによる細胞機能解析. バイオイメージング. 22 (1) 2-9, 2013 年

<前期公募> 「人工細胞系に構成した細胞膜受容体・細胞骨格複合ナノ装置の動作解析」（代表者：湊元幹太）

1. 湊元幹太,富田昌弘. 10 章 次世代ハイブリドーマテクノロジー. 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線 (監修 熊谷泉) シーエムシー出版,197-202 (2012)
2. Hisanori Yagami, Hiroshi Kato, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita, Monoclonal antibodies based on hybridoma technology Pharmaceutical Patent Analyst 2, 249-263 (2013)

3. 湊元幹太. 人工細胞システム構成に役立てたい組換えプロテオリポソーム技術. 日本化学会・生体機能関連化学部会ニュースレター. 28 (3) 15-18, 2014 年 1 月

<前期公募>「フォトニックDNAプロセッサを用いた核酸機能の活性化制御」(代表者:小倉裕介)

1. 小倉裕介. オリゴDNAの使い方. 光学, 42 519-520, 2013 年
2. Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, Hirotsugu Yamamoto, Kenji Yamada, Jun Tanida, Photonic DNA nano-processor: a photonics-based approach to molecular processing mediated by DNA, Nanophotonic Information Physics, Chapter 4, 91-113 (2014)

<前期公募>「歩くナノ〇〇計の創成」(代表者:鈴木団)

<後期公募>「高精度の位置決めと環境測定を細胞内において一粒で可能にする粒状蛍光プローブ」(代表者:鈴木団)

1. 大山廣太郎,新井敏,鈴木団. 細胞内の温度測定に適した蛍光ナノ温度計. ナノ学会会報, 13(1) 49-56, 2014 年
2. 鈴木団. 熱パルスによる細胞機能の変調. 1 分子生物学 (編集:石渡信一, 原田慶恵) 化学同人, 2014 年
3. 鈴木団,大山廣太郎,石渡信一. 歩くナノ温度計 生物物理, 53(3) 158-159, 2013 年

【A02】ナノメディシンのための分子科学 (分子情報導出)

<前期公募>「三光子励起自家蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境変化のその場測定」(代表者:中林孝和)

<後期公募>「蛍光寿命イメージングを用いた細胞内イオン濃度の動的変化の解明」(代表者:中林孝和)

1. 中林孝和, 太田信廣. NADH の自家蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境計測. 光学, (2017)
2. Takakazu Nakabayashi and Nobuhiro Ohta, Sensing of Intracellular Environments by Fluorescence Lifetime Imaging of Exogenous Fluorophores, Analytical Sciences, (2017)
3. Nobuhiro Ohta, Takakazu Nakabayashi, Intracellular Autofluorescent Species: Structure, Spectroscopy, and Photophysics, Natural Biomarkers for Cellular Metabolism: Biology, Techniques, and Applications (Taylor & Francis Books) (2017).
4. 中林孝和. アップコンバージョン, 励起状態ダイナミクス, 蛍光寿命イメージング, 金属表面での radiative decay engineering, 発光の事典 (朝倉書店), 2017 年
5. 中林孝和. 「細胞イメージング」. 光化学の事典 -誰でもわかる光化学の初歩 - 朝倉書店, (2017)
6. 中林孝和, 太田信廣. ラベルフリー細胞内自家蛍光寿命イメージング研究の進展. 化学と工業, 67 262, 2014 年
7. 中林孝和, 太田信廣. 自家蛍光寿命イメージングによる細胞観察. 生物物理, 53 166, 2013 年
8. 中林孝和, 太田信廣. 自家蛍光寿命イメージングによる細胞観察. 生物物理, (2017)

<前期公募>「細胞ナノ領域と生体微小環境における核酸送達システムの動態と機能発現解

析」(代表者：畠山浩人)

1. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H, The Polyethyleneglycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors. *Biol. Pharm. Bull.* 36 892-899 (2013)
2. Yusuke Sato, Hiroto Hatakeyama, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima, Development of an efficient short interference RNA (siRNA) delivery system with a new pH-sensitive cationic lipid, *Yakugaku Zasshi*, 132 1355-1363 (2012)
3. Takashi Nakamura, Hidetaka Akita, Yuma Yamada, Hiroto Hatakeyama, Hideyoshi Harashima, A multifunctional envelope-type nano device for use in nanomedicine: concept and Applications, *Acc. Chem. Res.*, 45 1113-1121 (2012)
4. 櫻井遊,畠山浩人,秋田英万,原島秀吉. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体による siRNA デリバリー. *生体の化学*, 63 113-119 (2012)
5. 畠山浩人,秋田英万,原島秀吉. 第 2 章 核酸医薬への展開 1 DDS 技術を利用した核酸医薬の開発. *ファインケミカルシリーズ ドラッグデリバリーシステムの新展開 II - 核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術-* (監修 永井恒司, 岡田弘晃), 19-24, 2012 年

<前期公募>「イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」(代表者：合田達郎)

<後期公募>「イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」(代表者：合田達郎)

1. Tatsuro Goda, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, Critical Update on 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC) Polymer Science, *Journal of Applied Polymer Science*, 132 41766 (2015) DOI: 10.1002/app.41766
2. Tatsuro Goda, Miyuki Tabata, Yuji Miyahara, Electrical and Electrochemical Monitoring of Nucleic Acid Amplification, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3 29 (2015) DOI: 10.3389/fbioe.2015.00029
3. 合田達郎, 宮原裕二. バイオトランジスタによる生体分子計測. *ヘルスケアを支えるバイオ計測*(監修 植田充美) シーエムシー出版, 2016 年
4. Tatsuro Goda, Miyuki Tabata, Yuji Miyahara, Electrical and Electrochemical Monitoring of Nucleic Acid Amplification, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3 29 (2015)
5. Tatsuro Goda, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, Critical Update on 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC) Polymer Science, *Journal of Applied Polymer Science*, 132 41766 (2015)
6. 宮原裕二, 松元亮, 合田達郎, 前田康弘, 田畑美幸, 三條舞. 2.1.3 章 機能性超分子界面を用いるバイオトランジスタ. *超分子材料の設計と応用展開*(編集 原田明) シーエムシー出版, 78-90, 2014 年
7. 合田達郎, 宮原裕二. 2.6 章 バイオトランジスタ, *スマート・ヒューマンセンシング～健康ビッグデータ時代のためのセンサ・情報・エネルギー技術～*(編集 三林浩二) シーエムシー出版, 123-130, 2014 年
8. 田畑美幸, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二. 機能性ナノ界面を有するバイオトランジスタ. *Biotransistor with Functional Nanointerface Containing Biomolecules*. *電気学会論文誌 E. IEEJ*

Transactions on Sensors and Micromachines, 2013, 133(11), B314-B319, DOI: 10.1541/ieejsmas.133.B314

9. Tatsuro Goda, Yuji Miyahara. Chapter 12 Sensing of Biomolecular Charges at Designer Nanointerfaces, Manipulation of Nanoscale Materials: An Introduction to Nanoarchitectonics, The Royal Society of Chemistry, 302-317 (2012), DOI: 10.1039/9781849735124-00302
10. 合田達郎, 宮原裕二. Chapter 4.7 バイオ F E T センサ Bio-FET sensors. 先端バイオマテリアルハンドブック NTS Inc., 445-449 (2012)
11. Tatsuro Goda, Yuji Miyahara. Aptamer Nanostructures as Signaling Molecular Switches in Electrochemical Biosensing, Nanotechnology, Volume 8 Nanosensors, Studium Press LLC, USA, (2017)

<前期公募>「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」(代表者: 樫田 啓)

<後期公募>「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」(代表者: 樫田 啓)

1. 浅沼浩之, 樫田 啓. プローブへの応用を目指した人工ヌクレオチドの設計. 最先端メディカルエンジニアリング 第2版, 203-208, 2014年
2. Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma, Oligonucleotide Conjugates for Detection of Specific Nucleic Acid Sequences, DNA Conjugates and Sensors, RSC Publishing, 242-257 (2012)

<前期公募>「細胞環境を再現したフェムトリットル空間デバイスの創製とその生化学反応への展開」(代表者: 加地範匡)

1. 松尾保孝, 加地範匡, 畠山浩人, 渡慶次学, 小暮健太郎, 馬場嘉信, 原島秀吉. Nano packaging が拓く次世代核酸医療. 表面, 広信社. 51 1-14, 2013年
2. 加地範匡. 精密にサイズ制御したナノ空間内での分析化学. 化学と教育. 日本化学会, 61 290-291, 2013年
3. 岡本行広, 加地範匡, 湯川博, 林衆治. 量子ドットによる in vivo イメージング. 最先端メディカルエンジニアリング. 名古屋大学最先端メディカルエンジニアリング編集委員会. 一粒書房, 68-72, 2013年
4. 加地範匡. ナノバイオデバイスによる単一 DNA 分子解析技術の最前線. 化学と工業, 9 65-69 2012年
5. 加地範匡, 渡慶次学, 馬場嘉信. 超解像顕微鏡とは-Abbe の法則への挑戦-. 現代化学, 502 50-54, 2012年

<前期公募>「自己集合型ナノプローブによる細胞内酵素反応のリアルタイム解析」(代表者: 中田栄司)

<後期公募>「自己集合型ナノキャリアの創製」(代表者: 中田栄司)

1. 中田栄司. SNARF 誘導体の自己集合化戦略に基づいた外部刺激応答性のレシオ型蛍光 pH プローブの開発. ナノ学会会報. 12 (2), 2014年
2. 中田栄司. 細胞内レシオ型蛍光 pH プローブ開発のための自己集合化ナノプローブの合理的設計戦略. 和光純薬時報, 82 (4), 2014年

<前期公募>「光増感によるエンドソーム脱出の分子科学」(代表者: 大槻高史)

<後期公募>「光増感剤修飾分子を用いた PCI の分子科学」(代表者: 大槻高史)

1. K.Watanabe, T.Ohtsuki, Chapter 4 Photocontrolled intracellular RNA delivery using nanoparticles or carrier–photosensitizer conjugates, Nanotechnology Tools for the Study of RNA in a series Progress in Molecular Biology and Translational Science, Elsevier, 139 (2016)
2. 大槻高史. 光化学的に細胞質内に侵入するペプチド分子の設計. 月刊 化学工業7月号,66 34-39, 2015 年
3. 大槻高史. PCDR 法と CLIP-RNAi 法. 生命化学研究レター. 46 10-14, 2014 年
4. Y.Watanabe, T.Suematsu, T.Ohtsuki, Losing the stem-loop structure from metazoan mitochondrial tRNAs and co-evolution of interacting factors, Frontiers in Genetics, 5 109, (2014)
5. K.Watanabe, T.Ohtsuki, Chapter 19 Intracellular delivery of RNA via RNA-binding proteins or peptides, Fundamental Biomedical Technology , Intracellular Delivery, Prokop, 7 (2014).
6. Y.Matsushita-Ishiodori T.Ohtsuki, Photoinduced RNA interference, Acc Chem Res, 45 (7) 1039-1047 (2012)

<前期公募> 「エンドソーム脱出能チューニングによるウイルス様動的構造変化惹起ナノカプセルの構築」(代表者：原田敦史)

<後期公募> 「細胞取込過程の環境変化を認識するナノカプセルの構築と超音波力学療法への展開」(代表者：原田敦史)

1. 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, 「免疫治療のための DDS 最前線」, 高分子, 65, 435-440 2016 年

<前期公募> 「細胞の微弱電流環境下における物質取り込み変化の機構解明と革新的薬物送達への展開」(代表者：小暮健太郎)

<後期公募> 「画像解析による微弱電流依存性の細胞内輸送亢進機構解明と革新的指向性 DDS への展開」(代表者：小暮健太郎)

1. 小暮健太郎, 濱進, 梶本和昭. イオントフォレシスによる機能成分の皮内浸透メカニズム. Cosmetic Stage, 10 1-6, 2015 年
2. 小暮健太郎, 気賀澤郁, 濱進, 梶本和昭. 第2章 第1節 イオントフォレシスによる経皮デリバリー技術. 注射剤・経口製剤に代わる新しい薬剤投与デバイスの開発 (株) 技術情報協会, 49-52, 2014 年
3. 小暮健太郎, 気賀澤郁, 濱進, 梶本和昭. 第4章 第1節 [4]<3>バイオ・生物製剤の非侵襲的な経皮 DDS 技術. DDS 製剤の開発・評価と実用化手法 (株) 技術情報協会, 210-214, 2013 年

<前期公募> 「糖鎖改変技術を利用したセルベースデバイスの設計」(代表者：岩崎泰彦)

<後期公募> 「糖鎖改変技術を利用したバイオ輸送システム」(代表者：岩崎泰彦)

1. 岩崎泰彦. 細胞表面の改質技術. 高分子, 2015 年
2. 岩崎泰彦. 糖鎖改変技術による細胞表面の修飾と機能化. バイオマテリアル, 32 111-119, 2014 年
3. Y.Iwasaki, K.Ishihara, Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces, Sci Technol Adv Mater, 13 064101 (2012)

<前期公募>「細胞内分子環境の化学模倣系の構築とそれを用いたテロメア核酸プローブの開発」(代表者:三好大輔)

<後期公募>「細胞が産生する浸透圧調節分子と人工高分子化合物を用いた細胞モデル実験系の構築」(代表者:三好大輔)

1. S.Nakano, D.Miyoshi, N.Sugimoto, Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids, *Chem Rev*, 12 114 (5) 2733-58 (2014) doi: 10.1021/cr400113m
2. 三好大輔. グラフェンと生体分子を用いたバイオセンサー. バイオサイエンスとインダストリー(B&I) バイオインダストリー協会, 2014 年
3. H.Yaku, T.Murashima, D.Miyoshi, N.Sugimoto, Specific Binding of Anionic Porphyrin and Phthalocyanine to the G-quadruplex with a variety of in vitro and in vivo applications, *Molecules*, 17 10586-10613 (2012)

A03: ナノメディシンを用いた分子科学 (分子情報応用)

<前期公募>「革新的生体ナノイメージング技術による繊毛疾患の分子機構解明」(代表者:上野裕則)

1. H.Ueno, Flow on the surface of the tracheal lumen by ciliary motion of asymmetric axonemal structures, *Visualization and Simulation of Complex Flows 219 in Biomedical Engineering, Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics 12*, DOI: 10.1007/978-94-007-7769-9_13 Springer

<前期公募>「幹細胞制御機能を有するタンパク質担持基材の分子設計」(代表者:中路 正)

<前期公募>「細胞内局所での分子反応と軸索変性との関連を明らかにする」(代表者:小西慶幸)

<後期公募>「軸索パターンの構築において空間情報伝達と構造的安定化を司る分子反応の解明」(代表者:小西慶幸)

1. 小西慶幸. 神経細胞の形づくりの機構—分子細胞生物学的視点から. 形の科学会, 2012 年
2. 小西慶幸. 神経細胞の形態制御に関わる分子システム. 大学発・選り抜きバイオセミナー バイオインダストリー協会, 2013 年

<前期公募>「抗原ペプチドナノファイバーの形態に由来するキャリア機能探索と樹状細胞機能の理解」(代表者:田中直毅)

1. 田中直毅. 機能性アミロイドのバイオナノテクノロジーへの応用. *高分子*, 2012

<前期公募>「固液界面におけるタンパク質間相互作用に及ぼす分子クラウディングの影響」(代表者:加藤功一)

<前期公募>「ケミカルデバイスを利用した siRNA によって誘起される分子反応の発現機構解明」(代表者:南川典昭)

<後期公募>「ナノ核酸デバイスを用いた自然免疫応答発現機構の網羅的解析」(代表者:南川典昭)

1. 田良島典子,南川典昭. 生物学的等価性を指向した化学修飾 DNA による核酸創薬研究, 核酸医薬の創製と応用展開 シーエムシー出版, 70-77, 2015 年

＜後期公募＞「1細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いた細胞死に関わる生体分子の1分子計測」(代表者：許岩)

1. 許岩. マイクロ・ナノ空間の機能化表面・界面の構築と制御. 化学とマイクロ・ナノシステム, 13 (2) 20, 2014 年
2. 許岩. リン脂質ポリマーハイドロゲルを用いた On-Chip 細胞保存. 色素協会誌, 2016 年

＜後期公募＞「高分子超薄膜を用いた未活性浮遊細胞固定技術“ナノラッピング”の確立と機能解明」(代表者：岡村陽介)

1. Y.Nagase, Y.Okamura, Synthesis of New Biocompatible Polymers and Fabrication of Nanosheets, Biomedical Engineering, (2015)
2. 岡村 陽介. 生分解性高分子からなる超薄膜の医用展開. 化学工業, 67 (3) 48-54, 2016 年
3. 岡村 陽介. 生体組織や浮遊細胞を超薄膜でラッピング固定し可視化する. ナノメディシンの分子科学. 2016 年

＜後期公募＞「実験的に抽出された分子反応パラメータを導入したマラリア感染赤血球モデルの開発」(代表者：今井陽介)

1. T.Omori, Y.Imai, K.Kikuchi, T.Ishikawa, T.Yamaguchi, Hemodynamics in the microcirculation and in microfluidics, Ann Biomed Eng, 43 238-257 (2015).

4. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【A01】「細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析」(代表者：由井伸彦)

1. (発明者：田村篤志，由井伸彦)「ポリロタキサン，及び医薬組成物」PCT/JP2014/071553
2. (発明者：寺内正彦，池田剛，田村篤志，山口聰，原田清，由井伸彦)「骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、及び骨形成因子の活性化方法」特願 2014-224265
3. (発明者：田村篤志，由井伸彦) (ポリロタキサン、及びライソゾーム病に対する医薬組成物) 特願 2013-172994.

【A02】「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」(代表者：丸山厚)

1. (発明者：嶋田直彦，丸山厚)「温度応答性細胞塊作製方法」 国内出願 特願 2014-228156 出願日：2014年11月10日
2. (発明者：丸山厚，嶋田直彦)「Agent for accelerating nucleotide chain exchange reaction」(出願番号)61/645271 (出願日)2012年5月10日
3. (発明者：丸山厚，嶋田直彦，遊佐真一)「温度感応性材料及びその用途」 (出願番号) 特願 2012-270368 (出願日)2012年12月11日
4. (発明者：嶋田直彦，丸山厚)「高温膨潤型ゲル及びそれを調製するためのポリマー」(出願番号)特願 2012-285042 (出願日)2012年12月27日

【A03】「がんリンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発」(代表者：権田幸祐)

1. (発明者：宮下穰，権田幸祐，武田元博，大内憲明)「抗体を成分として含む医薬品の有効性の判定方法」(PCT/JP2011/004763)
2. (発明者：権田幸祐，宮下穰，武田元博，大内憲明)「がん発症又はがん発症リスクの判定方法」(PCT/JP2011/004762) (2011年8月26日)

<前期公募>「細胞ナノ領域と生体微小環境における核酸送達システムの動態と機能発現解析」(代表者：畠山浩人)

1. (発明者：原島秀吉，畠山浩人，佐藤悠介，兵藤守，櫻井遊，秋田英万)「脂質膜構造体に pH 依存性カチオン性を付与する剤、それにより pH 依存性カチオン性が付与された脂質膜構造体および脂質膜構造体の製造方法」(特願 2012-11952 出願日 2012年5月25日)
2. (発明者：丹下耕太，新井将也，久保和弘，秋田英万，原島秀吉，畠山浩人，石破諒平，鶴川真実)「細胞内動態を改善したカチオン性脂質」(PCT/JP2012/079160 出願日 2012年11月9日)

<前期公募>「自己集合型ナノプローブによる細胞内酵素反応のリアルタイム解析」(代表者：中田栄司)

<後期公募>「自己集合型ナノキャリアの創製」(代表者：中田栄司)

1. (発明者：中田栄司，掘均，宇都義浩，行待芳浩)登録番号 5578517「ナノ集合体」出願人 国立大学法人京都大学，登録日 平成 26 年 7 月 18 日
2. (発明者：中田栄司，森井孝)「セミナフトローダフルオル誘導体および蛍光プローブ」特願 2013-58923 出願人 国立大学法人京都大学，出願日 平成 25 年 3 月 21 日

＜前期公募＞「光増感によるエンドソーム脱出の分子科学」（代表者：大槻高史）

＜後期公募＞「光増感剤修飾分子を用いた PCI の分子科学」（代表者：大槻高史）

1. （発明者：大槻高史，松浦栄次，小渕浩嗣，赤星彰也，小関英一）PCT/JP2015/81352 「ポリ乳酸修飾 RNA を含有する分子集合体及びそれを用いた RNA 送達システム」出願日 2015 年 11 月 6 日
2. （発明者：大槻高史，小関英一，小渕浩嗣，松浦栄次）「ポリ乳酸修飾 RNA を含有する分子集合体及びそれを用いた RNA 送達システム」特願 2014-227611，2014 年 11 月 8 日出願
3. （発明者：大槻高史，宍戸昌彦，公文裕巳，柏倉祐司，落合和彦）「乳酸菌により二本鎖 RNA を生成するキット及びその利用」（特許第 5660537 号、2014 年 12 月 12 日登録）

＜前期公募＞「エンドソーム脱出能チューニングによるウイルス様動的構造変化惹起ナノカプセルの構築」（代表者：原田敦史）

＜後期公募＞「細胞取込過程の環境変化を認識するナノカプセルの構築と超音波力学療法への展開」（代表者：原田敦史）

1. （発明者：原田敦史，山本聡，小暮健太郎，濱進）「治療装置および治療システム」特願 2014-143268，出願日：2014 年 7 月 11 日

＜前期公募＞「細胞の微弱電流環境下における物質取り込み変化の機構解明と革新的薬物送達への展開」（代表者：小暮健太郎）

＜後期公募＞「画像解析による微弱電流依存性の細胞内輸送亢進機構解明と革新的指向性 DDS への展開」（代表者：小暮健太郎）

1. （発明者：原田敦史，山本聡，小暮健太郎，濱進）「治療装置および治療システム」特願 2014-143268，出願日：2014 年 7 月 11 日

＜前期公募＞「細胞内分子環境の化学模倣系の構築とそれを用いたテロメア核酸プローブの開発」（代表者：三好大輔）

＜後期公募＞「細胞が産生する浸透圧調節分子と人工高分子化合物を用いた細胞モデル実験系の構築」（代表者：三好大輔）

1. （発明者：三好大輔，前田龍一）「核酸鎖の四重螺旋構造の検出方法」特願 2013-199029(2013)

＜後期公募＞「1 細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いた細胞死に関わる生体分子の 1 分子計測」（代表者：許岩）

1. 「流路構造体および流路構造体の製造方法」特願 2014-101461 号 2014 年 5 月 15 日

5. 研究成果

研究領域の設定目的の達成度

高齢者人口の急速な増加は、旧来の対処療法に依存した医療体系そのものの変革を余儀なくしている。すなわち、疾病を発症する頻度の増加と罹患期間の長期化といった大きな社会問題を誘引してきており、これを解消するために、より効果的に低侵襲な医療の提供が求められる。疾病を分子反応の統合として理解・応用する医療技術系の構築には、細胞を反応場とした分子反応の一義的理解と普遍的考察が重要であるとの認識より、科学としての学術体系を創出することが不可欠であり、これが今後、我が国の医療を革新的に向上させる礎になることは間違いない。

これまで「ナノメディシン」という表現で研究がなされてきている。その多くは、ナノテクノロジーの医療応用ということであり、その代表例として、半導体加工技術で作成した医療チップや、薬剤を搭載できる微小デバイスなどが挙げられる。これらは先端技術として、大量の試料を短時間で分析する手法の提供や、安全に薬剤を患部に送達し、副作用のない化学治療を提供できるという点では、医療機器や技術の進歩を促すきっかけとなってきたが、その原理は1960年代から提唱されてきたバイオセンシングやドラッグデリバリーという範疇を超えるものではない。その理由は、新しい医療を提供するという観点が先行するあまり、現状の医療における根本的問題点の把握とその解決法の理解が不足していたからに他ならない。ここで、再度、「ナノメディシン」を定義し直し、その本質となる“ナノメディシン分子科学”を創成することが、医療技術の質の向上を目指す理学・工学には急務である。ここでの“ナノメディシン分子科学”とは、細胞にフォーカスし、分子反応を分子構造・電子構造の視点よりとらえ、その反応定数や活性化エネルギーなど化学反応パラメーターの理解と考察、分子拡散や分子間力などのパラメーターの理解と考察、さらにはこれらの分子反応パラメーターに基づく病態の理解と治療分子の構造の考察を根幹とする学術領域を意味する。

急速に発展しつつある医療関連技術に、分子科学に基づく学術的根拠を与え、基盤学理を創出することが、今後の安全かつ効率的な医療改革に結実し、医療体系を根本から変革できるとの考えより、細胞系での分子応答の解明を中心として、バイオ分子から組織までの範囲を対象とした領域を統合的に俯瞰する“ナノメディシン分子科学”を創成する。すなわち、これまで分子の関連する現象としてとらえられてきた細胞応答に対して、分子反応、分子認識、あるいは分子機能変換などの様々な分子が関わる領域まで掘り下げて解釈できる学術基盤を目指す。この過程で、細胞内への効率的分子送達や細胞内の1分子機能観察など新ナノ技術を創出し、細胞機能操作、細胞応答メカニズム解明に適用することで、細胞工学、組織再生医学にも貢献する汎用技術へと展開する。ナノメディシン分子科学で集積された細胞内分子反応パラメーターを整理し、生体組織を対象とする診断・治療を行うためのデバイス開発へと情報発信を行い、開発期間の短縮を導引する。

本学術領域は、我が国の科学技術基本計画の重要推進4分野のうち、ライフサイエンス、環境、ナノテク・材料の3分野に深く関わっている。

本研究領域は、最終的に医療技術の向上を目指すものである。すなわち、健康寿命の延長、疾病時の回復期間の短縮、さらには医療リスクの低減、医療デバイス開発の促進など高齢社会における医療革新を誘引する。この学術体系はそのまま生態系の維持、すなわち環境問題の解決にもつながる概念を現実に提供するものであり、これからの最重要課題である分野にも強く関連している。“ナノメディシン分子科学”をキーワードとして、既存の科学を統一し融合できる学術領域は、ナノテクノロジーの医療応用を掲げてきた従来の研究とは一線を画

し、ナノメディシンを新たに定義し直すとともに、これを実践する科学を系統的の構築することで、医療リスクや産業化へのリスクを払拭し、安全・安心社会構築に理論的根拠を提案できることで大きな寄与をする。

本学術領域では、異分野の研究者が互いにその領域の垣根を乗り越えて協調、融和して新たな学際的学術体系の構築を行い、これにより現在の科学技術の限界の突破をめざし、社会貢献を果たす。これは旧来の縦型科学技術分類区分に縛られない、新たな発想の研究者の輩出を継続できることにつながり、今後の科学技術、産業の発展の基盤となる。これはある意味、我が国の科学・学術領域における弱点をも解消できるため、新たな科学技術戦略の変革ともとらえられる。

これまで、日本は、ゲノム解析やナノテクノロジーの優れた技術を保有しながら、これらの統合概念を作り上げることができずに、世界のイニシアティブを取ることができなかった。本学術領域では、従来提案されてきた単純なナノテクノロジーの医療応用との考え方に大きな変換をもたらす必要があると判断した。そのためには、ナノメディシンに科学的視点から根拠を与えることが強く求められ、さらに将来この分野で世界的に活躍できる人材を輩出し続けなければならない。バイオ・医療分野における研究は、その研究水準からみると日米欧が三極を形成している。欧米においては、各国ともそれぞれの社会情勢を反映した研究戦略がとられている。米国では産業化を前提とし、バイオ・医療分野に関わる人材を学部レベルから育て、これを受け入れる企業を育成している。また、欧州では、基礎的研究に基づいた10年後のシーズ供給を目指すプロジェクトが進行している。したがって、欧米では実用化に直結した研究が中心となり、既存の技術を使用した研究が大半を占めるまでに至っている。すなわち、このような世界的趨勢の中でも、疾病の発症につながるような複雑な生体応答を、分子科学で理解・考察する学術創成により医療基盤を底上げし、先端医療に結実させることはなされていない。徐々ではありが、アジア諸国ではバイオ関連分野に多大な教育的投資を実施し、世界的なイニシアティブを継続的に獲得しようとする国家戦略を進めている。このように、日本がこの分野で先行していた優勢な状況は失われつつあることが現実である。この危機的状況に対応し、我が国におけるバイオ・医療分野の先進性を維持、拡大するためにも、現象論から始まる旧来の生命科学領域を突破し、より根本となる“ナノメディシン分子科学”の創成は急務である。

生体反応については、分子生物学や細胞生物学の観点から国内外において極めて精力的に研究が進められてきており、生命活動に関連する多くの現象の観察が可能になり、いくつものノーベル賞受賞につながってきている。一方、理学・工学的視点に立ってみると、生命現象論のみでは医療に用いる新規デバイス創製におけるスペックの決定、設計・開発には情報不足であり、明確な指針がないために長期間の試行錯誤を繰り返すしかない状況である。分析装置と遺伝子解析システム、データベースの進歩により、国内外でも一細胞、一分子計測を目指した研究が多く見られている。しかしながら、実際に開発を行おうとした際には、分子反応に関連する正確なパラメータ情報が欠如していることに気づく。例えば、細胞内の分子反応について、分子クラウディングに関する研究が挙げられ、国内外で活発化している。細胞内で認められる分子クラウディング環境下では、分子反応の追跡そのものが困難となっており、モデル化の域を出ていない。本学術領域では、信頼性と時空間的に優れた分子動態の追跡法を実現し、その本質的理解に資する。今この時点で本学術領域を創成し、工学的基礎となる明解な分子反応パラメータを提示できることは、今後の先端バイオ・医療産業に大きなアドバンテージを与えることにつながる。

“ナノメディシン分子科学”は、分子反応を科学的に理解するナノメディシンの基礎から、その反応場となる細胞系を通して、組織、生体全体へと高次元に連携する生体システムを、各次元で異分野に属する研究者が共通する言葉で考察できるようにする学術領域である。さらに、バイオ・医療産業の爆発的発展を誘引する基礎情報提供と、将来的にこれを支える人材育成までも視野に入れた構想であり、世界的に見ても全く例はなく極めて大きな特徴を持っている。

領域目標は、低侵襲・高度医療の創出を目指し、分子反応の一義的理解と普遍的考察をキーワードとして、生命活動の根源となる細胞を反応場とした一連の分子反応から、分子科学に基づく疾病の原因解明とその治療法の提案までを対象とした領域を統合的に俯瞰する「ナノメディシン分子科学」を創成することである。

(1) 領域全体でナノメディシン分子科学に関する研究会を創設した。

ナノメディシン分子科学研究会を主催できるようにし、関連学協会との連絡、協調を密にできるような形式とした（達成度 100%）。

(2) 各年 4 回（平成 23 年度は 2 回）の総括班を含めた計画研究・公募研究参加の研究報告会を開催し、課題に対する普遍的原理の探索、一般的理論の構築、汎用的技術の集約を実施した。併せて、総括班内会議を開催し、有望分野や連携可能分野の抽出を行なった。

各年度、全体会議、総括班会議を各 2 回、協賛国際会議 3 回（ナノ学会国際会議、日中ナノメディシンシンポジウム、日台ナノメディシンシンポジウム）、さらに公開シンポジウムを実施し、研究班間での情報交換を進めると共に、国際的にも情報発信できるようにした（達成度 100%）。

(3) 有望分野及び新たな連携分野に関しては、各学会誌での特集号や WEB を利用して積極的に研究成果を公表した。多数の連携分野を形成し、ネットワーク化した。

応用物理学会、日本バイオマテリアル学会、日本化学会、高分子学会、ナノ学会などとの協力で、各学会誌に特集記事を掲載すると共に、機会を得て年次大会においてシンポジウムを協賛した。研究領域独自の WEB サイトを設立し、トピックスの情報公開、研究成果報告書、News Letter などの研究活動情報の公開を実施した。同時期に実施されていた新学術領域 4 領域との合同シンポジウムの開催を企画し、関連分野の情報ネットワークの拡張を実施した（達成度 100%）。

(4) ナノメディシン分子科学研究会及び研究報告会を通して、研究成果・実験技術・試料の共有化を促進した。

研究者が研究領域内の研究機関に試料を持参して実験や議論することを促進するために、研究者の技術交流旅費の支援などを実施した（達成度 100%）。

(5) 有望分野、連携分野や公募研究に対しての支援を行なった。

関連分野の研究者を招待して若手研究会を企画、実施した際に、講演謝金などを援助した。公募研究者に関しては共通設備の利用に関して援助することができた。一方、研究費の競争的支援に関しては、共通実験のための旅費の支出は可能であったが、残念ながら完全に実現することができなかった（達成度 70%）。

(6) 領域共有の“細胞内分子拡散の解析機能を持つ共焦点レーザー走査型顕微鏡”の運用を行なった。また、計画研究で購入した設備備品や主要既存実験機器を全ての計画研究や公募研究で共同利用できるようにした。

東京大学内に細胞観察に不可欠な共焦点レーザー走査型顕微鏡設備を購入設置するととも

に、既存設備である細胞培養・機能解析設備を整備して、利用の便宜を図った。設備を管理するために、大学院博士課程学生を RA として採用して、研究者の実験補助をおこなった。これにより時間的な短縮、煩雑な処理の削減につながり、効率を上げることができた（達成度 100%）。

(7) 本領域研究終了後も継続的に実施できる若手シンポジウムを支援した。

若手研究者が独自に企画、設立した若手研究会での講演会開催などを支援した（達成度 100%）。

(8) 平成 25 年度と平成 27 年度に国際シンポジウムを開催した。

国際シンポジウムを 3 回主催、その他、関連学会での国際学会にてサテライトシンポジウムの提案、採択を経て、共催を可能な限り実施した。例えば、参加者総数 4,000 名におよぶ 10th World Biomaterials Congress（第 10 回世界バイオマテリアル会議）において、Intracellularly Acting Nano-structures Biomaterials のシンポジウムが採択され、実施した。また、環太平洋の化学系学協会の連合大会である International Chemical Congress of Pacific Basin Societies : PacifChem2015（環太平洋国際化学会議）において、Symposium on Nanomaterials and Nanomedicine が採択され、開催することができた。

(9) 今後 10 年間使用できる教科書「ナノメディシンの基礎科学」を和文、英文で出版した。

和文の教科書として「ナノメディシンの分子科学」を講談社より出版する予定（2017 年夏刊行）で、すでに原稿の収集は終了し、現在、編集作業中である。英文に関しては、国際学術雑誌” Science and Technology of Advanced Materials に特集号として、本新学術領域研究の研究成果を世界に広めることを意図して 18 編をまとめ” Focus on Nanomedicine Molecular Science” を出版した。そのうち、3 編が Highlight 論文に選定された。

(DOI: 10.1080/14686996.2016.1181824)（達成度 100%）。

6. 研究成果の概要

研究項目 A01 ナノメディシンの分子科学

新たに開発した非侵襲的生体蛍光イメージング技術では、マウス内好中球の小胞運動を、量子ドットを用いて非侵襲的に高時空間精度（4nm, 25ms）で追跡することができ、小胞の高速運動を検出できた。非侵襲法は、侵襲法に比べて蛍光強度が数十分の 1 に落ちることを考慮すると、当初の目的を超える成果が得られた。この方法を応用して、GFP を発現したマウス内がん細胞を非侵襲下にて分解能 100ms で観察できた。多量子ドットを用いて、蛍光像を運動方向に垂直に集積することで分解能 1ms、1nm を達成できた。さらに、量子ドットに比べて非常に暗い GFP 分子を培養心筋細胞内の筋節に多分子発現することにより輝度を上げたところ、分解能 1ms、2nm の分解能が得られた。心筋の温度を上げたとき高速振動を観察し、振動運動を高精度検出することができた。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る（A01 班樋口：達成度 120%）。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（20 nm、100 fps）で捉えることに成功した。これにより、心筋細胞に局所微熱を加えると 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：達成度 100%）。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 (β -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、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、DMAE-SS-PRX 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。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 による有効性は市販の遺伝子導入剤より数十倍高かった。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初めて示された。複数の機能を細胞内において発揮する超分子は、世界初で予想を上回る研究成果である（A01 班由井：達成度 100%）。

研究項目 A02 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/ mm^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検出感度・応答速度の改善を行い、A02 班石原の開発した細胞親和型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、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：達成度 100%）。細胞内へ、核酸プローブなどの高分子物質を送達する際、従来法ではエンドサイトーシス経路で送達されるため、効率が非常に低かった。そこで、両親媒性酸性ペプチド（E5）とカチオン性ペプチドシャペロン材料（PAA-*g*-Dex）を組み合わせることで、細胞膜透過性を劇的に向上し、細胞外から細胞質への直接的な分子導入を可能にした。MNA ザイムはターゲット核酸認識機能を付した核酸酵素（DNA ザイム）型核酸センサーであり、ターゲット核酸の存在を酵素活性により増幅し検出できる。これに人工核酸シャペロン（PLL-*g*-Dex）の添加によって、MNA ザイムのシグナル増幅活性を高め、ターゲット核酸検出感度を 1,000 倍向上させることができた。また、miRNA のような単鎖核酸に対する検出能も高められた。miRNA 等の細胞内機能調節を担っている RNA 分子を特異的に切断反応することで細胞内の遺伝子発現を制御することができる。DNA ザイム反応に PLL-*g*-Dex を添加することで、無添加に比べ活性が 17 倍向上し、さらに DNA ザイムの一部に修飾核酸（2' -OMe）を用いることで、切断活性を最大 30 倍上げることに成功した（A02 班丸山：達成度 100 %）。蛍光特性の優れた量子ドット（QD）を利用し、表面を細胞親和型ポリマーで被覆することで、従来にない細胞に全く取り込まれないナノ粒子を実現した。これを基盤として、表面に様々なオリゴペプチドを結合し、細胞内取り込みを定量的に解明する手法を開拓した。細胞内取り込みに関して、アルギニン、リシンなどのアミノ酸残基を持つオリゴペプチドが効果的で

あることを示した。特に、アミノ酸構造とそのシーケンスの双方が重要であるとの結論を得た。オリゴアルギニンを結合すると細胞内への取り込みが、エンドサイトーシスで生じることを示し、細胞膜への結合から細胞内に移行する過程が5~30分間で、150-250nm/minで生じること、その後の細胞内でのエンドソームの移動が100-150nm/minで生じることを明らかにした。この細胞親和型蛍光ナノ粒子は、研究領域内での共同研究に供し評価を行った。また、細胞内安定性を活かして細胞シート工学に適用し、細胞を積層して組織を作製する際、あるいは生体に埋め込んだ後の細胞識別がなされている。一方、細胞環境による細胞機能の向上に関しても成果を得た。細胞外マトリックスを細胞親和型ポリマーゲルで再現し、細胞を内包した場合、細胞の増殖過程がゲルの弾性率で制御できることがわかった。すなわち、幹細胞を用いた場合、1.0kPa以上になると細胞の増殖が生じないが、0.7kPa付近では細胞が増殖することがわかった。細胞周期を調べると、1.0kPaの場合にはG1、G0期の細胞が95%以上になり、均一な細胞種となることを示した。この状態で細胞分化誘導タンパク質細胞内へと輸送して分化誘導を行うと、従来の方法に比較して、4.2倍の骨細胞への分化誘導を観察した。この研究成果は国内企業に技術移転している(A02 班石原：達成度120%)。

研究項目 A03 ナノメディシンを用いた分子科学

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、細胞の表面へ薬剤、ナノ粒子、または別種類の細胞を修飾し、細胞への機能付与を試みた。具体的には、抗酸化剤ビタミン E 含有リポソームの修飾によって細胞内活性酸素を除去できること、磁性ナノ粒子の修飾によって細胞凝集体を1個単位かつ移植後1か月にわたり MRI 経過観察できることを示した。さらに制限酵素が切断できる DNA 配列を有する ssDNA-PEG-脂質を設計し、これによって細胞-基板もしくは細胞-細胞間接着を誘導した後に制限酵素をすると、接着細胞を選択的に回収できることを示した。(A03 班岩田：達成度100%)。がんの転移に関して、リンパ系が重要であるとの考えから、リンパ節とリンパ液の状態を定量的に解明する手法を開発した。マウスの後肢先端にがん細胞を移植して2週間後には膝下の転移リンパ節は、正常なリンパ節に比べ体積が4倍に腫大化していた。この転移リンパ節では、がん細胞の増殖・浸潤によりリンパ節構造が破綻しリンパ液の流れが正常の20%以下になるために、別のリンパ節への流れを活発化し、結果としてがんが転移し易くなることを発見した。さらに、リンパ節内の微小がんの検出が可能な蛍光能と X 線吸収能を併せ持つマルチモーダルナノ粒子を開発し、がん組織の位置と大きさを明確に捉えることに成功した。この成果は的確な転移リンパ節同定に役立つ。様々ながんの転移に関わる PAR1 蛋白質に注目し、抗 PAR1 抗体を蛍光ナノ粒子に担持させた組織診断用の蛍光プローブを合成した。このプローブと独自画像解析法を用い、手術で摘出したヒトがん組織の診断を行った結果、がん再発の危険度を高確度で予測する診断パラメーターを導出することに成功した (A03 班権田：達成度100%)。がん組織において、熱や活性酸素などのストレスにより形成されるストレス顆粒構造が、アルギニンとグリシンからなる配列 (RGG 配列) に関連することを発見し、これを分子パラメーターとして新たなストレス顆粒形成因子を同定し、その細胞内挙動を明らかにした。また、脳腫瘍治療は困難であるが、実際の患者から摘出した腫瘍組織のゲノム解析により、従来の脳腫瘍の分類をさらに検証し、新たな分類を設けた。これを基盤として、新たな治療標的を探索し、popoplanin (PDPN) 分子が悪性化に関与することを見出した。PDPN を標的とする遺伝子改変免疫細胞を構築し、効果的な治療法の開発の可能性を示した (A03 班夏目：達成度100%)。

各研究項目における共同研究を促進した結果、数多くの共同研究成果が認められた。その一部を示す。

①細胞内恒常性を担っている脱リン酸化酵素に着目し、細胞内酵素反応の解析および酵素応答ツール設計について研究された。リン酸エステルポリマーは脱リン酸化酵素により主鎖切断を惹起することができる。これを共同研究としポリロタキサン分子の軸として使用した。その結果、リン酸エステルポリマーがシクロデキストリンとからなる擬ポリロタキサンを調製することに成功した。これは世界初の成果であり、脱リン酸化酵素に応答する新しい物質輸送デバイスや細胞反応解析プローブとしての利用が期待できる。

②細胞内に存在している物質の自家蛍光を利用することで、細胞内の状態変化を無染色で評価することに成功し、さらに共同研究により、pH 範囲 5-9 における酵素活性のリアルタイム検出を可能とするレシオ型蛍光プローブが開発できた。

③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を調製し、これを用いてオクタアルギニン (R8) の膜透過能力を評価した。その結果、細胞内に取り込まれる際の機能が明らかとなった、また、細胞取り込み後、細胞分裂があっても安定であることから、領域外共同研究として細胞シート工学で細胞を積層する際の細胞識別に応用することが可能であった。

④細胞内在性 mRNA を直接計測するために、微小探針の表面に核酸検出プローブであるモレキュラービーコン (MB) を修飾した微小探針を作成した。細胞親和型の MPC ポリマーを表面修飾剤として利用し、複数の蛍光色素を導入した MB および核酸シャペロンの固定化を行った。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ることが直接検出によって明らかにした。

⑤クライオ電子線トモグラフィ法を用いることで、世界で初めて気管繊毛の内部構造を解明することに成功した。また、共同研究により運動の原動力であるダイニンの力発生メカニズムを解析することに成功した。繊毛運動の異常は様々な疾患に関与していることが知られており、本研究結果は疾患発症メカニズムの解明に繋がる。

各研究グループにおける研究成果
【A01 班】 ナノメディシンの分子科学（分子情報測定）

細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析

研究代表者：東京大学理学系研究科 樋口 秀男

分担研究者：東京大学理学系研究科 茅 元司

1. 研究の概要

我々は、細胞内やマウス体内で起こる生命現象を1分子あるいは1粒子レベルで解明することをやっている。今年度は、これらのがん細胞の除去するため、細胞内の活性酸素を発生させることで、特定のがん細胞を死滅させることができた。また今年度より、心筋細胞の不思議な振動現象を高精度で解析を行った。この振動が骨格筋の振動と関連していることも明らかとなった。

2. 研究の背景と目的

細胞内分子機能の理解は、蛍光蛋白質観察と分子生物学の進展によって劇的に深まった。しかしながら、分子生物学や蛍光蛋白質は個々の分子を観察するのではないため、分子反応や機能を直接的に理解することはできない。一方、分子機能を直接的に観察する1分子ナノ精度の計測が登場し、精製された実験系を用いて、分子機能の詳細が明らかにされた。さらに近年蛍光性ナノ粒子の登場により、高輝度で長時間の蛍光観察が可能となり、細胞内の分子位置を正確に測定できるようになった。しかしながら、これらの技術、すなわち蛍光蛋白質、分子生物学、1分子計測、蛍光性ナノ粒子を組み合わせ、細胞内の分子反応を観察する研究はほとんどない。そこで本研究では、これらの近年の技術革新を取り入れ、さらに新しい方法を開発して、マウス内や細胞内のナノメートル領域の分子や小器官の反応の高精度測定を行う。

3. 成果

がん幹細胞の選択的除去の試み

近年、がん細胞の中でもがん幹細胞は抗がん剤耐性や放射線耐性を示すため、抗がん剤治療が十分ながんを撲滅できない主要な要因となっている。我々は、脳の悪性腫瘍からライン化された細胞 (Brain tumor stem cells, BTSCs) の紫外線に対する耐性を調べた。がん幹細胞と幹細胞ではない腫瘍細胞 U87 に紫外線 (280nm) 10 分照射した後に、幹細胞に結合した量子ドット - EGFR の細胞膜上の運動を追跡した。その結果、がん幹細胞の EGFR の膜上の運動は、照射前とほとんど変化しなかった。それに対して、幹細胞ではない U87 では、膜上の運動は大きく阻害された (遅くなった)。これらのことから、がん幹細胞が、紫外線に対する耐性があること明らかとなった。がん幹細胞耐性について調べるもう一つの方法として、赤色 (700nm) の蛍光を発するとともに、活性酸素を発生する蛍光色素 IR700 を利用した。この IR700 にか

がん幹細胞特有の細胞膜タンパク質（CD133）に対する抗体を結合した．この IR700 と抗体との複合体をがん幹細胞と反応をさせた後、赤色（645nm）で照射を行った結果、5 分程度の照射によって、がん幹細胞がネクローシスを起こすことがあきらかとなった（図 1）．この方法を用いれば、選択的にターゲットとする細胞を死滅させることができると思われる．この IR700 の照射によって、小胞運動が遅くなることを指標として、細胞の活性化を定量的に評価できる新しい方法を開発した．これは、細胞の位相差像を撮影し、約 500nm x 500nm の面積内の強度ゆらぎの時系列を独自のプログラムにより解析を行った．その結果、接着がん細胞においては、揺らぎが時間とともに減少したのに対して、がん幹細胞においては、むしろ揺らぎが大きくなった．この揺らぎ減少は、モータータンパク質の不活性化によると思われる．一方、揺らぎが大きくなったのは、細胞がブレビングを起こしたことで、細胞内の自由空間がどうかしたためであると考えた．

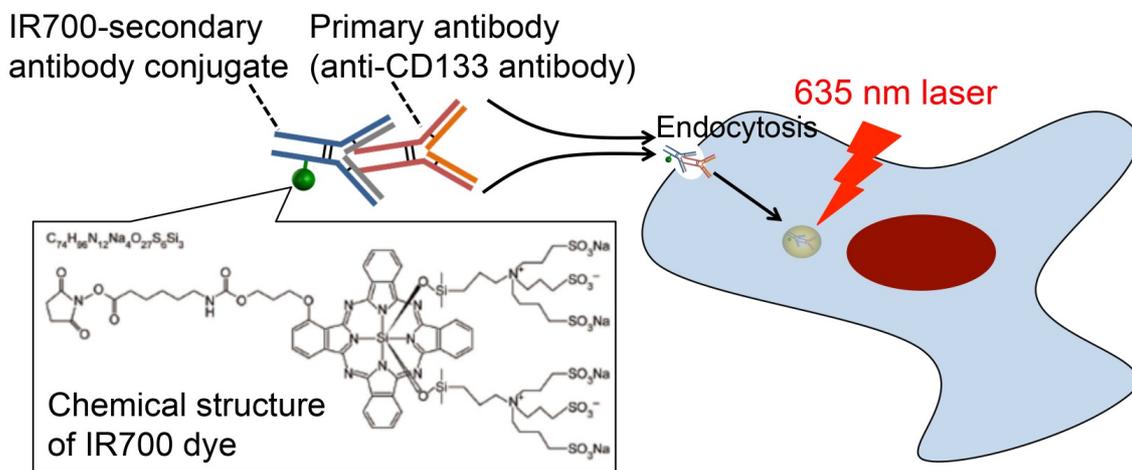


図 1. IR700 を細胞特異的に結合して、選択的除去の試み

心筋細胞の振動運動の解析とモデル計算

心筋より精製されたディッシュ上での心筋細胞は、自発的に周期的な収縮を行うことが知られている．我々は、心筋を 37°C から数°C 温度を上げることによって、高速の振動が観られる現象を高時空間分解能（ $\sim 5\text{nm}$, 2ms）で解析を行った．その結果、振動の振幅は、カルシウムの収縮の周期に同期して増減を繰り返すのに対して、振動の周期は、カルシウム濃度によらずほぼ一定であった．この現象を説明するためのモデル計算によって、振動は、収縮から弛緩に至る周期によって生み出されており、振幅の増減は、ストレッチアクティベーションと似た速度依存性を追加することで説明ができることを見出した．

このような振動現象が、心筋特有ではなく、骨格筋にもそのような機能が備わっていることを、少数分子のナノメートル精度の変位、pN レベルの力測定および、シミュレーション研究によって明らかにした．

Imaging and model analysis of molecular function in cells

Hideo Higuchi

Motoshi Kaya,

Department of Physics, the University of Tokyo, Japan

We image the vesicle transport in mice under a noninvasive condition. We developed a non-invasive technique for the *in vivo* imaging of neutrophils labeled with quantum dots, up to 100 μm below the skin surface of mice (Fig.1). The quantum dots were endocytosed into vesicles in the neutrophils, allowing us to track the vesicles with high spatiotemporal precision at ~ 10 msec per frame with 15 nm accuracy. When the neutrophils were moving within the interstitium, the speed of the vesicles was very fast. The speed is about four times faster than the *in vitro* velocity of a molecular motor, such as kinesin or dynein. This is the first report in which non-invasive techniques have been used to visualize the internal dynamics of neutrophils¹. The observed high-speed vesicle transport is likely important for the bactericidal function of neutrophils.

Noninvasive imaging method was developed to visualize GFP in tumor cells in xenograft model mice. We chose mouse auricles to prepare tumor because of very thin and limited hypodermal tissue. We prepared a novel xenograft model in the auricle of SCID mice with breast cancer expressing GFP and glioma cells. Tumors composed of these cells were successfully formed in mouse auricle by improving injection method. The structures of tumor, cells and tumor vessel were visualized by tissue staining. The GFP cells were observed by fluorescence of GFP in separated tumors, dissection of skin around tumor and without injuring. We successfully performed real time observation of GFP within breast cancer cells under noninvasive condition.

Sarcomere is an essential unit of cardiomyocyte. It is well known that sarcomere has three state (i.e. contraction, relaxation and spontaneous oscillation state) dependent of the solution condition. In intact cardiomyocytes, we found hyperthermal sarcomeric oscillations (HSOs) that is Ca^{2+} independent and high-frequency ($\sim 5\text{-}10$ Hz) auto-oscillations induced by a rapid increase in temperature to $> \sim 38^\circ\text{C}$. This finding suggest that the temperature shift the state from relaxation to oscillation. We found that the HSOs was occurred in skinned cardiac myofibrils. The skinned myofibrils are suitable for exchanging chemical compounds and proteins. Therefore using this system, we will understand the molecular aspect of HSOs.

細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析

研究代表者：東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 由井 伸彦
分担研究者：東京大学大学院工学系研究科 金野 智浩
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 田村 篤志

1. 研究の概要

シクロデキストリン (CD) 空洞部に線状高分子が貫通した超分子ポリロタキサン (PRX) を用いた細胞内分子反応解析、治療応用を推進している。これまでの研究で細胞内環境特異的に分解応答を示す PRX を利用した細胞内への治療用核酸、タンパク質の導入、ならびに希少難治性代謝疾患であるライソゾーム病治療薬としての PRX の応用を検討してきた。本年度は、ライソゾーム病モデルマウスに対する治療効果の評価、成長因子を用いたモデルマウスにおける骨再生など *in vivo* での有効性に関して評価を行った。以下に、ポリロタキサンと成長因子の複合体を用いた *in vivo* 骨再生に関して本年度の成果を概説する。

2. 研究の背景と目的

顎口腔領域において、歯槽骨の萎縮、腫瘍切除による顎骨の部分的欠損、疾患による顎骨欠損などに対する顎骨再建方法について様々な方法が検討されている。現在では、顎骨欠損部への自家骨移植が最も頻繁に行われている。自家骨のほとんどは腸骨からの採取によるものであり、顎骨再建術の他にも別途な手術が必要となるため患者への負担は大きくなる。骨形成成長因子である bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は強力に骨の再生を促すことが知られており、再生医療において広く注目されている。しかし、BMP-2 は不安定なタンパク質であり、また広範囲の骨再生には数ヶ月といった期間を要するため、多量の BMP-2 投与が必要となる。しかし、多量投与による炎症、異常骨形成、癌化等の報告がある。BMP-2 の投与量、投与頻度低減のためのアプローチとして、BMP-2 の活性を亢進する添加剤の利用が検討されている。硫酸化多糖類であるヘパリンを BMP-2 に添加することで、低濃度での骨分化や骨再生が可能となることが報告されている。しかしながらヘパリンは血液抗凝固作用を示すため、臨床応用は困難である。そこで本研究では、ヘパリンの代替材料として超分子構造を有するポリロタキサン (PRX) の利用を検討した。PRX の α -CD 部にヘパリンと同様の化学構造である硫酸基を導入した硫酸化 PRX を設計し、BMP-2 とのポリイオンコンプレックス形成、血液抗凝固作用、*in vitro* での骨分化に関して前年度まで評価を行い、硫酸化 PRX の添加により BMP-2 の骨分化効率が著しく向上することを見出している [1]。そこで本年度は、マウス頭蓋骨欠損モデルに対する骨再生能に関して評価した。

3. 成果

主軸高分子として分子量 2,200 のポリエチレングリコール (PEG)、環状分子として α -CD からなる PRX を調製した。本 PRX に 1,3-propanesultone を反応させることで α -CD 部位に sulfopropyl ether を導入した (α -CD 貫通数 10.5、硫酸基導入数 10.2、分子量 13,700)。得られた硫酸化 PRX と BMP-2 を混合することでポリイオンコンプレックスを調製した。本複合体はこれまでの報告と同様に *in vitro* での骨分化誘導、石灰化の促進作用を示すことを確認した。

BMP-2/硫酸化 PRX 複合体による骨分化促進作用が実際に *in vivo* での骨再生に対

しても有効化明らかとするため、マウス頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生の評価を行った。ICR マウス (5 週齢、雄) の頭蓋骨に 3.5 mm 径の骨欠損を作成し、コラーゲンスポンジに BMP-2 (10 ng/mice) を担持させ欠損部に埋入した。骨の形成は、一週間毎に X 線マイクロ CT 測定を行い骨形成の時間変化を評価した (図 1)。BMP-2 移植群では移植三週後よりわずかな骨形成が確認された。BMP-2/ヘパリン移植群では、ヘパリンにより外科処置に伴う出血が縫合後も止まらず生存率が低下したものの、生存したマウスでは約 50%程度の欠損部に骨再生が認められた。BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では、出血の問題もなく生存率も 100%であり、*in vitro* で得られた血液抗凝固作用は示さないことが *in vivo* でも確認された。驚くべきことに、BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では移植二週後より欠損部位全面におよぶ顕著な骨再生が確認された。すなわち、硫酸化 PRX の添加により骨再生までの時間を短縮するとともに、骨形成の範囲も拡大することが明らかとなった。

また、Alexa Fluor 680 で蛍光標識した BMP-2 を用いて *in vivo* での残存期間を *in vivo* imaging system (IVIS)にて評価した。その結果、BMP-2 移植群と。BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では 2 週間経過後も同程度の BMP-2 が移植部位に残存していることが明らかとなった。本結果より、硫酸化 PRX との複合化は移植部位でのリリースや体内動態には影響せず、成長因子の活性そのものを *in vivo* でも亢進していることが示唆された。

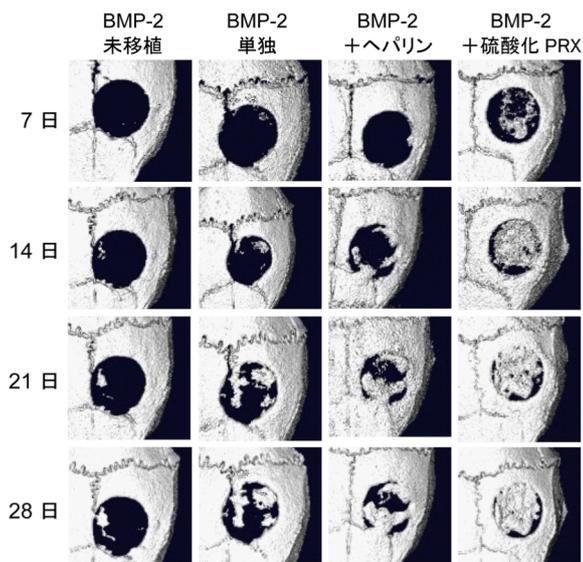


図 1. マウス頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生の時間変化. BMP-2 未移植群、BMP-2 移植群: BMP-2 10 ng、BMP-2/ヘパリン移植群: BMP-2 10 ng、ヘパリン 100 μ g、BMP-2/硫酸化 PRX 移植群: BMP-2 10 ng、硫酸化 PRX 100 μ g.

[1] M. Terauchi, G. Ikeda, K. Nishida, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui. *Macromol. Biosci.* **2015**, 15 (7):953-964.

Analysis of biomolecules using cyto-responsive supramolecular polymers

Nobuhiko Yui¹, Tomohiro Konno², Atsushi Tamura¹

¹*Institute of Biomaterials and Bionengineering, Tokyo Medical and Dental University, Japan*

²*Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Japan*

Autogenous bone grafts are widely used in the clinical treatment, i.e., in prosthetic implants, chronic osteomyelitis, and cranio-maxillofacial reconstruction. For substitution in bone grafts, artificial bone substitute materials (i.e., poly(lactic acid) and β -tricalcium phosphate) and various processes (i.e., cell-based tissue engineering, and the bone regeneration by growth factors) have been extensively studied. Bone morphogenetic factor-2 (BMP-2), a secreted growth factor that comprises the TGF- β subfamily, has attracted considerable attention for promotion of osteoinduction. To date, various clinical studies have been conducted, and BMP-2 has been applied for the treatment of spine fusion, bone fracture, and periodontal tissue regeneration therapy. However, because BMP-2 is unstable and readily deactivated under physiological conditions, high-doses of BMP-2 are required to maintain the activity of BMP-2 in the long term and to regenerate a wide range of bone defects. It has been reported that heparin and other sulfated polysaccharides promote the BMP-2-induced osteogenic differentiation, presumably due to the formation of a polyelectrolyte complex with positively charged BMP-2 (isoelectric point: 8.5). Although heparin is one of the most interesting polymers in enhancing the activity of BMP-2, clinical use of heparin is limited due to its strong anticoagulant effect. Therefore, the development of sulfonated polymers that can enhance the bioactivity of BMP-2 without anticoagulant activity or other toxic effects is of importance in the design of drug carriers and scaffolds for BMP-2.

Herein, we report sulfonated polyrotaxanes composed of sulfonated α -cyclodextrin threaded onto a linear polymer for the protection of BMP-2 through the polyelectrolyte complex formation. Note that the sulfonated PRXs showed negligible anticoagulant activity and cytotoxicity, whereas heparin showed strong anticoagulant activity. When MC3T3-E1 cells were treated with the sulfonated PRX/BMP-2 complexes, significantly high alkaline phosphatase production and mineralized matrix deposition were observed compared with that of free BMP-2 and heparin/BMP-2 complexes. Also, the sulfonated PRX/BMP-2 complexes showed significant bone regeneration in mouse calvarial defect model in comparison to free BMP-2 and heparin/BMP-2 complexes. Altogether, the sulfonated PRXs are promising candidates for enhanced osteoinduction of BMP-2 without toxicity and anticoagulant activity and would contribute to clinical bone regeneration.

心筋細胞内分子機能のナノイメージングと個体への応用

研究代表者：東京慈恵会医科大学 福田紀男

分担研究者：東京慈恵会医科大学 小比類巻 生

分担研究者：早稲田大学 大山廣太郎

1. 研究の概要

21世紀は「心臓病の時代」と呼ばれ、我が国においても心臓病は癌に次いで高い死亡率を示している。我々は、“Cardiac Nano-medicine”という新たな分野を創成し、nm精度で心疾患の病態診断や治療効果の判定を可能にする新しい技術の開発を目指している。本年度、“Cardiac Nano-medicine”の土台となる“Cardiac Nano-physiology”の研究を推進した。心筋における収縮の基本単位はサルコメア (~2.0 μm) と呼ばれる分子集合体であり、この長さが ~0.1 μm 変化しただけでも心臓のポンプ機能に非常に大きな影響を与える。したがって、サルコメア長とポンプ機能との関係を探ることは心臓の機能を探る上で最重要課題の一つである。我々は、GFPを *in vivo* 心筋細胞に発現させ、世界で初めて生きたマウスにおいてサルコメアの長さを nm 精度で測定することが可能な新たなシステムを開発することに成功した。

2. 研究の背景と目的

心筋細胞(長軸:~100 μm 、短軸:~20 μm)では、長軸方向に~2.0 μm の間隔で存在する横行小管(T管)周辺において細胞膜の電氣的興奮が細胞内 Ca^{2+} 濃度の局所の上昇を惹起し、 Ca^{2+} の拡散がアクチン分子とミオシン分子の結合、そしてATP加水分解反応を引き起こす。心筋細胞に特徴的なこの反応(興奮収縮連関)は、細胞内を一定の方向に伝播し、イオン通過性の高い介在板を介して隣接する心筋細胞へと伝達される。心筋研究の分野では、心筋細胞内の構造と機能との関係が長年に渡り調べられているが、ほとんどの研究が空間分解能にして100 nm以上の変化を対象としたものであった。我々の班では、心筋細胞内ナノ領域でのイオン動態や分子の挙動を *in vivo* において高時間・空間分解能で可視化し、心臓拍動リズム調節機構やそのリズム破綻、特に突然死に至る病態メカニズムを探ることを目的としている。従来の医学生物学的アプローチでは不可能であった心疾患病態やその程度を分子科学に基づいて定義し、心臓研究に独創的な新しい研究分野を創成することを目指している。

本研究では、動きをとまらぬ小動物個体の心臓から心筋細胞内局所の生体分子の挙動やイオン動態を nm 精度で抽出できる顕微システムを駆使することによって、生体分子の集団がどのようにして心臓拍動のリズム調節機構を生み出すかを明らかにする。また、各心臓病のモデル動物を使い、心筋細胞ナノ領域における生体分子の挙動やイオンの動態がどのように変化して心拍のリズム破綻につながるかを明らかにする。

3. 成果

本年度のハイライト：“Cardiac Nano-physiology”について、細胞および個体のレベルで

研究を行った。その結果、我々はマウス *in vivo* 心筋細胞内のサルコメア長 (~2.0 μm) を高空間 (20 nm)・時間 (100 fps) 分解能で計測する技術を開発することに世界で初めて成功した。また、培養心筋細胞に熱を負荷し、体温よりも $\sim 1^\circ\text{C}$ 高い条件において高速 (~10 Hz) のサルコメア振動 (HSOs) が惹起されることを見出した。以下、成果の詳細を簡潔にまとめる。

(I) 心筋細胞実験：我々は昨年度、ラットの幼若心筋細胞の Z 線に GFP を発現させ、心筋細胞内のサルコメアの挙動を 3 nm (カメラ速度：50 fps) の精度で測定することに成功している (*SL nanometry* : Shintani et al., *J Gen Physiol* 2014)。これは、現時点においては世界最高のサルコメア長計測精度であり、拍動中の任意の単一サルコメアの正確な解析を可能にする。本年度、*SL nanometry* を赤外 (IR) レーザー (波長：1455 nm) による熱刺激法と組み合わせ、体温よりもわずかに $\sim 1^\circ\text{C}$ 高い条件において高速 (~10 Hz) のサルコメア振動 (HSOs) が惹起されることを見出した (論文 1)。興味深いことに、HSOs は Ca^{2+} 依存性の心筋収縮 (~1 Hz) に重畳していた。HSOs は *in vivo* 心臓において不整脈の発生に関与している可能性がある。

(II) *In vivo* マウス実験：小動物 *in vivo* 心臓において、心筋細胞内のナノ分子情報を抽出できる新たな顕微システムを構築した。すなわち、マウス *in vivo* 心臓において、左心室心筋細胞内のサルコメアの動きを高空間 (20 nm)・時間 (100 fps) 分解能で捉えることに世界で初めて成功した (論文 4)。その結果、同一細胞内であってもサルコメア長には ~ 300 nm ものバラツキが存在すること、それらが同調することによって調和の取れた心拍が生み出されていることが明らかとなった。サルコメア長の変化分と (マクロパラメータである) 左心室内圧とは強く相関し、サルコメアの収縮機構と心臓のポンプ機構との間にタイトなカップリング機構が存在することが明らかとなった。さらに我々は、画像再構築法を独自に開発した。すなわち、心臓は拍動し続ける臓器であるため、収縮、もしくは拡張のピーク時点において Z 軸方向の焦点ズレが生じる。我々は、左心室内圧の波形を基準とし、これを 17 のフェーズに分割、各フェーズにおいて対物レンズを Z 軸方向に動かすことによって焦点の合った画像を抽出した。実験後、画像を再構築し、心臓サイクルのすべての時点において焦点の合った動画を作成することに成功した。本実験系は、今後、心臓の生理および病態の解析に幅広く使われてゆくものと考えられる。

(III) iPS 由来心筋細胞を用いた研究：マウス iPS 細胞を分化誘導し、拍動する iPS 心筋を得ることに成功した。これらの細胞には筋原線維が形成されており、サルコメア長は約 ~ 2.0 μm であった (論文作成中)。現在、iPS 心筋細胞を効率よく精製し、マウス心臓に移植、その機能を *in vivo* ナノ計測によって詳細に検討する手法を開発中である。

Nano-imaging of molecular functions in cardiac muscle

Norio Fukuda
Fuyu Kobirumaki-Shimozawa
Kotaro Oyama*

Department of Cell Physiology, the Jikei University School of Medicine, Japan
**Department of Physics, Waseda University, Japan*

In 2014, we reported a novel experimental system for simultaneous nano-scale analysis of single sarcomere dynamics and $[Ca^{2+}]_i$ changes via the expression of AcGFP in Z-disks in neonatal cardiomyocytes of the rat [i.e., sarcomere length (SL) nanometry]. In the present study, we investigated the effects of infra-red laser irradiation on sarcomere dynamics in living neonatal cardiomyocytes of the rat. A rapid increase in temperature to $>\sim 38^\circ\text{C}$ induced $[Ca^{2+}]_i$ -independent high-frequency ($\sim 5 - \sim 10\text{Hz}$) sarcomeric auto-oscillations (Hyperthermal Sarcomeric Oscillations; HSOs). In myocytes with the intact sarcoplasmic reticular functions, HSOs coexisted with $[Ca^{2+}]_i$ -dependent spontaneous beating in the same sarcomeres, with markedly varying frequencies (~ 10 and ~ 1 Hz for the former and latter, respectively). The present findings suggest that in the mammalian heart, sarcomeres spontaneously oscillate at higher frequencies than the sinus rhythm at temperatures slightly above the physiologically relevant levels.

Next, we developed a high-speed (100 fps) high-resolution (20 nm) imaging system for myocardial sarcomeres in living mice. Using this system, we conducted three-dimensional analysis of sarcomere dynamics during the cardiac cycle, simultaneously with electrocardiogram and left ventricular pressure measurements. We found that (1) the working range of sarcomere length (1.90 ± 0.06 and 1.68 ± 0.06 μm in diastole and systole, respectively) existed on the shorter resting distribution side and (2) the left ventricular developed pressure was linearly correlated with the sarcomere length change between diastole and systole on the order of 100 nm. Likewise, sarcomere length and left ventricular pressure changed in a reciprocal manner. This suggests that in the epicardial surface of the central part of the left ventricular wall, the pressure increases (decreases) when sarcomeric contraction commences (terminates) according to the cellular level of the excitation-contraction coupling. The present experimental system has a broad range of application possibilities for unveiling sarcomere dynamics in cardiomyocytes *in vivo* in health and disease.

各研究グループにおける研究成果
【A02 班】 ナノメディシンのための分子科学（分子情報導出）

バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス

研究代表者：東京大学工学系研究科 石原 一彦

分担研究者：東京大学工学系研究科 井上 祐貴

1. 研究の概要

細胞内にナノ粒子を輸送する際、細胞膜の透過およびエンドソームは障害となる。まず、イメージング性能の向上を目指し、量子ドット(QD)をリン脂質ポリマーである 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーで内包する手法を確立し、高輝度化を実現した。さらに表面に結合させるバイオ分子の種類と組成に関して検討し、最適な条件を確立し、細胞に対して高い親和性、低い侵襲性を持ちながらも、細胞膜を透過するナノ粒子系を創製した。また、MPC ポリマーの構造制御と機能化を、リビングラジカル重合を適用して実施し、これを利用したナノ粒子系を実現した。本年度は、細胞内器官への移行を連続的に追跡できる pH 応答性ナノ粒子システムを創製した。また、細胞内にタンパク質を輸送し、外部からの光信号で放出できる光応答性ナノ粒子システムの創製を中心に行った。

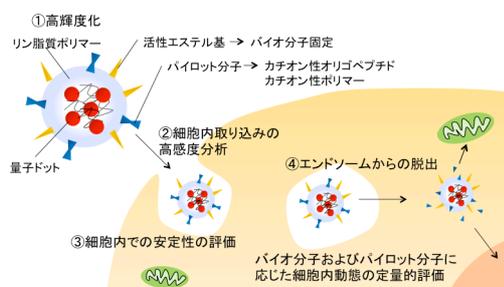


図 1. 細胞内取り込みと輸送過程を対象としたナ

2. 研究の背景と目的

細胞工学において、細胞内における分子反応を解明し、それらを調節する方法の確立が要求されている。とりわけ、細胞内の pH 変化は、細胞内分子反応の調節因子として考えられており、これを追跡する手法は重要と考えられる。本研究では、細胞内へのエンドサイトーシス過程、細胞内での物質動態に着目し、その調節因子である pH 変化をリアルタイムで追跡する生体親和型ナノデバイスの創製を目的とした。具体的には、pH 変化にตอบสนองして蛍光特性が変化するポリマー分子の設計概念の提示および精密重合法に基づき、直径が 20 nm 程度の量子ドット(QD)／ポリマー複合ナノ粒子を作製し、このナノ粒子の pH 応答性と細胞内移行、細胞内動態を検討した。

また、生体組織の再生や細胞工学の発展に伴い、十分に機能制御された細胞の提供が必要とされる。タンパク質は細胞のもっとも重要な分子の一つとして、細胞の機能を制御することができる。タンパク質は高分子量、酵素感受性および親水性などの問題があるため、細胞内に内在化の促進やタンパク質の酵素分解を抑制することに課題が残されている。これらの問題を解決するために、タンパク質の細胞導入および細胞内への拡散のためには、細胞親和性を有し、かつ適切なタイミングで分解する機能を持つキャリアーが必要である。そこで本研究はマテリアル工学の視点から、細胞内へ生理活性タンパク質を送達するための光反応性キャリアーを開発した。

3. 成果

1) ナノ粒子表面修飾ポリマーの精密合成を、長鎖アルキル基を末端に有する可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 剤 4-cyano-4-(dodecyl-sulfanylthiocarbonyl)sulfanyl pentanoic acid によるリビングラジカル重合により実施した。モノマーとして MPC、2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA)、および ω -4-nitrophenyloxy carbonyl(poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP) を選択し、poly(DEAEMA)-*block*-poly(MEONP) -*block*-poly(MPC) (PDbNbM) を合成した。これを用いて粒径 20-30 nm のナノ粒子 QD/PDbNbM を調製した。周辺の pH 変化による poly(DEAEMA)セグメントの伸長・収縮に伴い、粒径が変化することを見いだした。QD と有機蛍光色素 Alexa との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用し、蛍光スペクトルの pH 依存性およびその FRET 効率との関連を明らかにした。Alexa を結合したナノ粒子の蛍光スペクトルは、pH に応答して変化することを確認し、この変化は、poly(DEAEMA)セグメントの pH 応答による QD と Alexa 間の距離の変化に起因することを示した。ナノ粒子表面に細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン(R8)を固定化した R8-QD/PDbNbM-Alexa ナノ粒子はエンドサイトーシス経路による細胞内移行、エンドソーム内での移動、さらにエンドソームから脱出する一連の過程を、FRET 現象の変化として捉えた。これは、エンドソーム内の pH 低下と、その後のプロトンスポンジ効果によるエンドソーム破壊を連続的に観察した初めての事例である。

2) 光反応性タンパク質キャリアーとして MPC と、光照射により解離するユニットを利用して、光反応性リン脂質ポリマー (poly(MPC-*co*-BMA-*co*-PL) (PMB-PL)) を合成した。PMB-PL は光照射に反応し、1 分間以内に反応が完了した。PMB-PL を水溶液への分散剤として利用し、poly (L-lactic acid) (PLA) のナノ粒子を調製した。ナノ粒子のサイズは 130nm に制御することができた。タンパク質を PL ユニットに固定化し、光照射すると 1 分間で固定されたタンパク質の 90%以上がナノ粒子から放出された。細胞培地に PMB-PL/ PLA ナノ粒子を加え、6 時間培養したところ、細胞生存率は 97%以上であり、PMB-PL/ PLA の細胞毒性が低いことがわかった。細胞透過性ペプチド、R8 を固定することにより、ナノ粒子は細胞に取り込まれた。この状態で、光照射するとタンパク質は細胞の中で脱離し、細胞質内全体に拡散することがわかった。すなわち、R8 を固定化した光反応性 MPC ポリマーに覆われたナノ粒子は、細胞質内へタンパク質を送達し、その場でタンパク質を放出できるスマートキャリアーとして有用である。

従来の結果と合わせて考えると、表面を生体親和型のポリマーで被覆し、さらに細胞に特異的に作用するバイオ分子を固定化することで細胞内に容易に導入することができ、表面修飾理利用するポリマーに機能を導入すると、多岐にわたる細胞内観察、細胞への輸送、さらには細胞内に存在するバイオ分子を特異的に捕捉するなどが可能となることが結論できる。

Transport nanodevice immobilized specific biomolecules

Kazuhiko Ishihara

Yuuki Inoue

Department of Materials Engineering, The University of Tokyo, Japan

Polymer nanoparticles were as functional in-cell devices were prepared using cytocompatible phospholipid polymer. We have found that the polymeric nanoparticles embedding quantum dots (QDs) covered with the phospholipid polymers showed resistance to cellular uptake. On the other hand, when an arginine octapeptide (R8), which was one of the cell penetrating peptide, was immobilized at the surface of the nanoparticles, they could penetrate the membrane of HeLa cells effectively. Here, we investigate surface functionalization of the nanoparticles and transportation of the nanoparticle into cells.

To add novel functionality to QDs, we synthesized water-soluble and pH-responsive block-type polymers. The polymers were composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer segments, which contain a small fraction of active ester groups and can be used to conjugate biologically active compounds to the polymer, and pH-responsive poly(2-(N,N-diethylamino) ethyl methacrylate (DEAEMA)) segments. One terminal of the polymer chain had a hydrophobic alkyl group. The hydrophobic group located at one terminal of the polymer can bind to the hydrophobic layer on the QD surface. A fluorescent dye was conjugated to the polymer chains via the active ester group. The polymers were easily bound to the QD, yielding QD/fluorescence dye-conjugated polymer hybrid nanoparticles. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the QDs and the fluorescent dye molecules was used to obtain information on the conformational dynamics of the immobilized polymers. Higher FRET efficiency of the QD/fluorescent dye-conjugated polymer hybrid nanoparticles was observed at pH 7.4 (in early endosome and cytoplasm) as compared to pH 5.0 (in late endosome) due to a stretching–shrinking conformational motion of the poly(DEAEMA) segments in response to changes in pH. We concluded that the block-type MPC polymer-modified nanoparticles could be used to evaluate the pH of cells via FRET fluorescence based on the cytocompatibility of the MPC polymer.

Photoreactive polymer nanoparticles for immobilizing and releasing proteins were prepared. A water-soluble and amphiphilic phospholipid polymer, poly(MPC-co-n-butyl methacrylate-co-4-(4-(1-methacryloyloxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy) butyric acid (PL)) (PMB-PL) was synthesized. The PMB-PL underwent a cleavage reaction at the PL unit with photoirradiation at a wavelength of 365 nm. Additionally, the PMB-PL took polymer aggregate in aqueous medium and was used to modify the surface of biodegradable poly(L-lactic acid) (PLA) nanoparticle as an emulsifier. The morphology of the PMB-PL/PLA nanoparticle was spherical and approximately 130 nm in diameter. The carboxylic acid group in the PL unit could immobilize proteins by covalent bonding. The bound proteins were released by a photoinduced cleavage reaction. Within 60 sec, up to 90% of the immobilized proteins was released by photoirradiation. From these results and with an understanding of the fundamental properties of MPC polymers, we concluded that PMB-PL/PLA nanoparticles have the potential to be used as smart carriers to deliver proteins to biological systems, such as the inside of living cells.

We conclude that the surface modification of nanoparticles with functional and cytocompatible polymer is effective to develop in-cell nanodevices for analyzing chemical reactions in cells.

直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製

研究代表者：大阪大学基礎工学研究科 三宅 淳

分担研究者：大阪大学基礎工学研究科 木原隆典

分担研究者：大阪大学基礎工学研究科 新岡宏彦

1. 研究の概要

極微小探針を用いて接着細胞と浮遊細胞における力学特性の違いを定量的に評価した。接着細胞を主に3つの種類に区分することが可能であることを見出した。また、石灰化細胞の分泌するエクソソームが基質小胞のように石灰化に寄与することを発見し、非石灰化細胞由来エクソソームでも同様に石灰化形成起点となることを見出した。さらに、ディープラーニングを用いて非侵襲な細胞分化自動判別に成功した。

2. 研究の背景と目的

疾病を分子反応の統合として理解し、それを解決する技術系の構築には、細胞を反応場とした分子反応の統合的理解あるいは高次の体系化が欠かせない。特に細胞内は通常の化学実験と異なり、多くの繊維性構造体や膜構造体、様々なタンパク質複合体・巨大核酸が高密度に存在する分子クラウディング環境となっている。そのため、細胞内における分子反応を理解・考察するためには、通常の *in vitro* で行われるような希薄溶液中での分子反応研究ではなく、実際の細胞内環境下での分子反応研究、特に細胞内での分子拡散等に影響を与える高分子環境を明らかにし、その環境下での分子反応を研究することが必要となる。

しかしながら、細胞内空間は極度に複雑な高分子流体であり、これを簡易な形で定式化し、さらにその中で分子反応の定量的解析・分子反応パラメーターの同定を行うことは困難である。そのため、実際の細胞内環境下における分子動態・分子反応を解析可能な実験系の構築と、それを簡略的にも再現可能なモデルを構築することが出来れば、細胞内分子反応研究の重要なプラットフォームになると考えられる。

本研究は、細胞内環境下における分子反応の詳細な解析を可能とする「極微小探針」の創製を行い、それを用いた細胞内における分子反応および細胞骨格弾性の定量解析、新規の高分解能細胞イメージング手法の開発を行うことで、広く細胞内における分子動態・反応解析のプラットフォームの構築を目指す。

3. 成果

(1) 細胞表層力学特性の分類

力学特性は細胞が有する個別の物理特性である。細胞表層の力学特性は主に原子間力顕微鏡

(AFM) などを用いることで定量できる。こうした力学特性は細胞ごとで異なるのはもちろんであるが、細胞の接着状態でも変化する。特に接着細胞は接着状態と浮遊状態で異なる力学特性を示す。我々は、いくつかの種類の細胞の力学特性を検討した結果、接着細胞を主に3つの種類に区分することが可能であることを見出した。1つ目は、接着状態で大きくアクチン繊維が発達している線維芽細胞様細胞。2つ目は、細胞内部のアクチン繊維は大きく発達していないが、表層付近では比較的アクチン繊維が観察される癌様細胞。3つ目は、細胞内部・表層付近でほとんどアクチン繊維の発達が見られない HEK 様細胞。これら細胞の力学特性の挙動は接着状態と浮遊状態で異なっており、細胞内部と表層付近でのアクチン繊維の発達の違いの影響と考えられる。

(2) エクソソームによる細胞の石灰化

骨形成細胞は細胞外空間中に石灰化を形成させる細胞である。骨形成細胞の石灰化は基質小胞と呼ばれる分泌性の小胞が起点となって生じる。我々は、基質小胞は石灰化細胞の分泌するエクソソームと同様のものではないかと考え、骨形成細胞および通常の細胞からエクソソームを抽出し、エクソソームが基質小胞のように石灰化に寄与しうるか検討を行った。抽出したエクソソームの石灰化形成能を検討したところ、石灰化形成の起点になることを確認することができた。さらにこの石灰化起点となる能力は石灰化形成細胞由来のエクソソームのみならず、非石灰化細胞由来エクソソームでも同様に石灰化形成起点となることが見られた。一方で、石灰化形成由来エクソソームはアルカリフォスファターゼを有しており、局所的にリン酸イオン濃度を上昇させることが石灰化開始に重要であると考えられる。

(3) ディープラーニングを用いた細胞分化識別

再生医療において、ヒト臓器の構築には大量の細胞が必要であり、個々の細胞を人の手で扱っては多大なコストが必要になる。近年、細胞の自動培養装置については様々なものが登場しているが、今後、細胞の質や状態を非侵襲、自動的かつ高速に判断する装置が必要になると考えられる。我々は、Deep Learningの一種であるCNN (Convolutional Neural Network) を構築し、位相差顕微鏡像から細胞の分化判別を行なった。実験では、試料としてマウス骨格筋芽細胞 (C2C12)を用い、高速演算処理のために自作のPC (GPU: NVIDIA GTX980Ti、CPU: Intel Core i7-4790K、メモリ: 8GB)と、独自に開発したDeep Learning ライブラリ Sigmaを用いた。C2C12は分化誘導を行なうと、徐々に細長い形状に変化し、最終的に細胞核が融合し多核の筋管細胞へと分化する。分化誘導を開始した日をDay 0とし、Day 0および分化後であるDay 6それぞれの細胞位相差像(各1000枚、1枚の画像サイズは200x200 pixels)を取得した。各画像をCNNによって学習し、テストデータ(各100枚)の分類を行なったところ93%の精度で識別が可能であった。

Development of a nanoprobe for measuring the molecular dynamics in living cells

Jun Miyake¹
Takanori Kihara², Hirohiko Niioka¹,

¹*Department of Engineering Science, Osaka University, Japan*

²*Department of Life and Environment Engineering, The University of Kitakyushu, Japan*

In living cells, there are many large filamentous structures, organelles, protein complexes, and nucleic acids. The protein concentration in living cells is estimated to reach several hundred mg/mL. The complex intracellular environment rises from awful molecular crowding conditions in the cytosol. To learn about the dynamic molecular reactions in living cells, it is essential to clarify their physicochemical structure and features like disproportional macromolecular crowding structures, molecular diffusion, and excluded volume effect.

In this project, we aimed to analyze the macromolecular dynamics, simulate physical structures, and finally discuss the dynamic molecular reactions in cells. Particularly by developing a nanoprobe for intracellular macromolecules, we intended to quantitatively measure macromolecular dynamics and reactions inside cells. Our research will be a platform for better achievements in nanomedicine molecular science.

1) The cell surface mechanics reflects the structure of actin filaments vicinity of plasma membrane. Then we can evaluate cell characters or states by measuring cell mechanics. We found that there are 3 groups as a view point of cell mechanics. First is actin filaments well-developed mesenchymal cell type; second is membrane related actin filaments developed cancer cell type; third is actin filaments undeveloped HEK293 cell type. The mechanics of these cells and the actin filaments showed different behavior in each cell adherent state.

2) Osteogenic cells form mineralized tissue through secretion of matrix vesicles. We found that the exosome secreted from osteogenic cells work as a nucleus of mineralization. Furthermore, we found that the exosome secreted from non-osteogenic cells work as a nucleus of mineralization too. We think that exosomes secreted from many cells related with bone mineralization in our body.

3) To realize the industry of regenerative medicine, numerous numbers of cells are necessary and must be treated correctly, rapidly and automatically. We developed deep learning program based on Convolutional Neural Networks (CNN) to recognize cellular differentiations with phase contrast images. It was possible to classify C2C12 before and after differentiation with 93% accuracy.

細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節

研究代表者：東京工業大学大学院生命理工研究科 丸山 厚
分担研究者：東京工業大学大学院生命理工研究科 嶋田直彦

1. 研究の概要

DNA や RNA などの細胞内の核酸をイメージングする手法の実現は、生体内に多種多様に存在する細胞の機能発現を理解するために有用である。また、それらを標的とした医薬により、細胞機能の調節も可能となる。RNA 分解活性を持つ核酸酵素 (DNAzyme) の遺伝子発現制御や遺伝子解析への応用が期待されている。我々はこれまでに核酸間ハイブリダイゼーションを促す高分子材料、カチオン性くし形共重合体を実現した。さらにくし形共重合体により DNAzyme の活性を高められる事を明らかにした。本年度は、DNAzyme を核酸検出目的に改変した multicomponent nucleotide enzyme (MNAzyme) に対する共重合体の効果を検討し、共重合体が MNAzyme の核酸検出感度を顕著に高めることを明らかにした。

2. 研究の背景と目的

配列特異的な RNA 切断活性をもつ DNAzyme は、その特徴から様々な生物工学的応用が期待されており、特定の配列の核酸存在下でのみ DNAzyme 活性を発現する MNAzyme を用いた核酸の増幅検出法も提案されている[1]。一方で、その実用化にはさらなる反応性の向上が求められている。DNAzyme は一般にターンオーバー効率が低く、その改善が必要と考えられる。また、基質核酸が短鎖の場合には、それに対する結合性を高める必要がある。さらに MNAzyme の場合には、標的核酸に対する結合性も高めることが、核酸検出の高感度化に求められる。我々は、カチオン性くし形共重合体

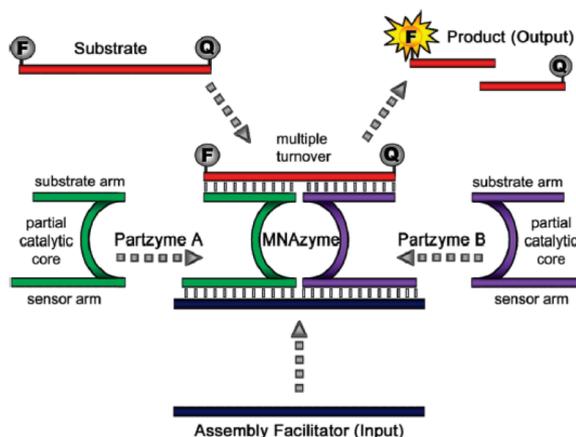


Fig. 1 核酸センサーとしての MNAzyme (文献 1 より引用)

体は核酸間の静電反発を軽減し、核酸のハイブリダイゼーションや鎖交換反応を促進することを報告してきた[2]。さらに、共重合体の添加により、マルチプルターンオーバー条件下 DNAzyme の反応速度を向上できることを見いだした[3]。そこで、本年は PLL-g-Dex による MNAzyme 活性の向上を検討した。

3. 成果

用いたカチオン性くし型共重合体 poly(L-lysine)-graft-dextran (PLL-g-Dex) の構造式および MNAzyme の配列を Fig. 2 に示す。Fig. 3 には、基質および標的核酸濃度をそれぞれ 200 nM、

2 nM と一定にし、MNAzyme 濃度を変化させたときの反応の経時変化を示す。共重合体が存在しないとき [MNAzyme] = 200 nM の時 60 分の反応で基質の約 3 割しか分解されないのに対し、共重合体存在下では 20 分以内に 5 割の基質が分解された。これは、共重合体がハイブリッド形成を促し、基質、MNAzyme および標的からなる核酸複合体の生成が進んだためと考えられる。

次に MNAzyme 濃度依存性を見ると、PLL-g-Dex 不在下では、MNAzyme 濃度の低下に伴い反応速度は顕著に低下し、[MNAzyme] = 2 nM の時にはほとんど反応が検出されなかった。つまり、ターンオーバー速度が遅いことを示す。一方、PLL-g-Dex 存在下では、いずれの MNAzyme 濃度においても、高い反応性を示し、ターンオーバーが効率的に行われたことを意味する。

次に、基質濃度 200 nM および MNAzyme 濃度 2 nM と固定し、ターゲット核酸濃度を変化させて反応をおこなった。共重合体不在下では、ターゲット濃度が 2 nM 以上で検出可能であったに対し、PLL-g-Dex 存在下では 20 pM のターゲットが検出できることがわかった。つまり、共重合体は MNAzyme の核酸検出感度を 100 倍以上向上することが見いだされた [5]。

- [1] E.Mokany, S.M.Bone, P.E.Young, T.B.Doan, A.V.Todd, MNAzymes, a Versatile New Class of Nucleic Acid Enzymes That Can Function as Biosensors and Molecular Switches, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1051-1059 (2010)
- [2] L.Wu, N.Shimada, A.Kano, A.Maruyama, *Soft Matter*, **4**, 744-747 (2008)
- [4] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, **3**, 308-316, (2015)
- [5] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, **3**, 308-316, (2015)

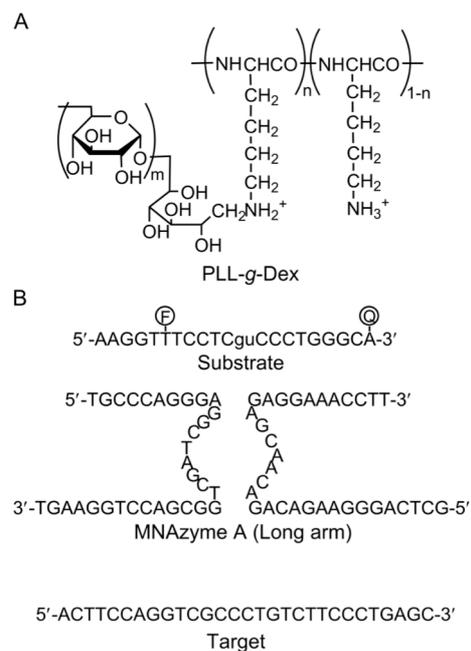


Fig. 2. (A) PLL-g-Dex の構造式 (B)用いた MNAzyme、基質 (Substrate) 及び標的 DNA (Target) の配列

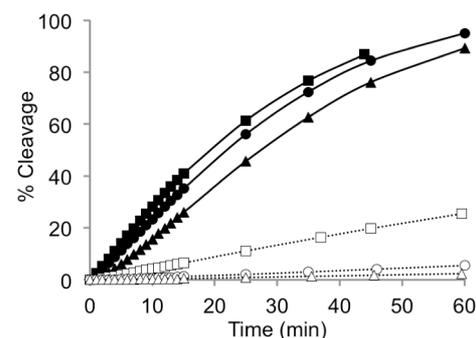


Fig. 3. PLL-g-Dex 不在下 (open) および存在下 (filled)における MNAzyme 反応の MNAzyme 濃度依存
□、■ 200 nM MNAzyme; ○、● 20 nM; △、▲ 2 nM. 反応条件: 50°C、25 mM MgSO₄、200 nM Substrate, 2 nM Target.

Evaluation and regulation of cellular functions through in-situ nucleic acid imaging

Atsushi Maruyama, Naohiko Shimada
Dept. of Biomol. Engineering, Tokyo Inst. of Tech.

Multi-component nucleic acid enzyme (MNAzyme)-based assays are one of isothermal, signal amplifying DNA-detection method.[1] MNAzymes are composed of short DNA oligonucleotides that function as partial enzymes or partzymes. Each partzyme includes a region of a catalytic core, a substrate-binding arm, and a sensor arm. The sensor arms recognize and bind to a target nucleic acid. When the partzymes are assembled in the presence of a target nucleic acid, they form an active MNAzyme assembly that catalytically produces signals. The signal results from substrate cleavage, generally upon release of a fluorophore from proximity to a quencher. As multiple signals can be generated from a single target molecule, isothermal signal amplification is possible. The MNAzyme integrated with various detection methods has been widely investigated.

We previously reported that a cationic comb-type copolymer consisting of a polycationic backbone and hydrophilic graft chains of dextran promoted hybridization of a pair of complementary DNAs. The copolymer also facilitates the strand exchange reaction between double-stranded DNA and homologous single-stranded DNA. Recently, we showed that the copolymer considerably enhanced ribonuclease activity of the 10-23 DNAzyme.[2] The copolymer facilitated turnover of the DNAzyme and stabilized the DNAzyme over a wide range of temperature.

In this study, we showed that the cationic copolymer also enhances activity of an MNAzyme derived from the 10-23 DNAzyme and increased MNAzyme sensitivity. Furthermore, the copolymer enabled us to shorten the substrate-binding arms of the MNAzyme, decreasing the optimum temperature of the MNA assay from 50 °C to physiological temperature.[3]

- [1] E.Mokany, S.M.Bone, P.E.Young, T.B.Doan, A.V.Todd, MNAzymes, a Versatile New Class of Nucleic Acid Enzymes That Can Function as Biosensors and Molecular Switches, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1051-1059 (2010)
- [2] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, **3**, 308-316, (2015)
- [3] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, MNAzyme-catalysed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer, *Biomater. Sci.*, **3**, 716-720 (2015)

各研究グループにおける研究成果
【A03 班】 ナノメディシンを用いた分子科学（分子情報応用）

がんリンパ行性転移の分子機構に解明基づく新治療法創発

研究代表者：東北大学 大学院医学系研究科 権田 幸祐

1. 研究の概要

本研究班の目標を達成するには、原発巣とセンチネルリンパ節の間のリンパ管ネットワークの高精度解析や、がん組織の悪性度を高確度で診断可能な方法開発が重要となる。本年度は、(1)がん転移やリンパ節摘出手術がリンパ管ネットワークへ与える影響の検討、(2)がん原発巣やリンパ節転移巣の性状を診断する方法の開発、を行った。その結果、がん患部に接続するセンチネルリンパ節経路は手術や転移の進行によりダイナミックに変化することを明らかにするとともに、がん転移活性化因子を分子マーカーとしたがん再発予測の診断法開発に成功したので報告する。

2. 研究の背景と目的

がんは原発巣での増殖とそこからの転移を通じて症状が進む。転移は脈管（リンパ管、血管）を通して起こるが、リンパ行性転移は血行性転移よりも病初期段階において進行が観測されるため、がん転移早期診断の格好の指標となる。センチネルリンパ節はがん患部から最初にリンパ流を受けるリンパ節として定義されており、リンパ節転移の有無を調べる際の診断基準となる。

近年、乳がん为代表されるように、がんではセンチネルリンパ節診断が臨床適用されている。よってがんにおけるリンパ管ネットワーク経路を正確に理解することは、転移リンパ節の高精度診断を施行する上で必須である。また同定した原発巣やリンパ節転移巣の組織を免疫染色法で病理診断し、がんの悪性度を正確に把握することは、予後診断にとって重要である。これまでの免疫染色法では、病理切片に対し標的因子特異的な抗体を反応させ、最終的にペルオキシダーゼの酵素反応により、標的因子存在部位を色素発色させていた。この方法は酵素反応を利用するため、発色強度が温度、時間、基質量に左右され、定量性が不十分であった。がん免疫染色の低い定量性は、がんの診断精度に大きな影響を及ぼすため、高定量性の免疫染色法の開発が課題となっていた。

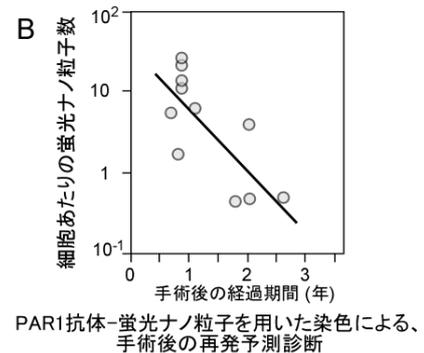
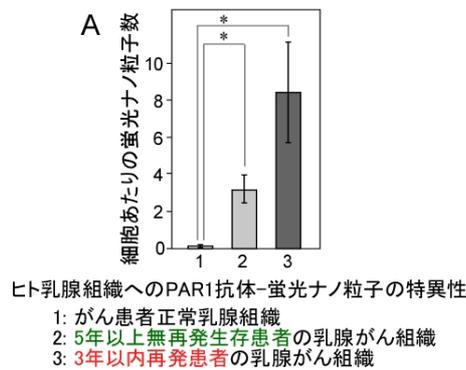
以上の問題を解決するため、本研究では、(1)がん転移やリンパ節摘出手術がリンパ管ネットワークへ与える影響の検討、(2)がんの原発巣やリンパ節転移巣の性状を高精度診断する方法の開発、を行ったので、それぞれに関して概説する。

3. 成果

(1)がん転移やリンパ節摘出手術がリンパ管ネットワークへ与える影響の検討：ルシフェラーゼを発現するマウス乳がん由来の培養細胞株を用い、この細胞をマウスの肢に移植す

ることにより、リンパ節転移モデルを作製した。ルシフェラーゼの発光を利用して、がん転移の進行を確認したところ、この担がんマウスでは、細胞移植後、1-2 週間で膝窩リンパ節への転移が見られ、引き続き1か月後には肺への転移が観察された。細胞を移植して2週間後に、転移リンパ節を摘出し、その大きさやがん転移の様態を調べたところ、正常なリンパ節(がん細胞を注入していない肢の膝窩リンパ節)の大きさが1.5mm程度なのに対し、転移リンパ節では3mm近くに腫大化していた。また転移リンパ節のパラフィン切片を作製し、がん細胞を認識するサイトケラチン抗体で染色したところ、がん細胞がリンパ節内で増殖・浸潤し、リンパ節構造を破壊させている様子が観察された。次に、がん転移に関わるリンパネットワーク経路を明らかにするために、膝窩リンパ節を切除したマウスの肢にがん細胞を移植し、同様に転移の様子を観察した。その結果、がん細胞はそれまでとは別のリンパ節へ転移する様子が観察された。このリンパ節は膝窩リンパ節が存在するマウスでは、主要な転移対象リンパ節にはなっていなかった。よって、リンパ節へのがん転移は、リンパ管・リンパ節の切除によって大きく変化することが予想された。リンパ節の摘出は臨床では再発を防ぐため、がん手術の手技として行われている。現在、リンパ節切除と転移リンパ節変化の関係を、X線 CT イメージング、蛍光イメージング、さらには計算科学的手法(東北大・今井班と共同研究)で解析を行っている。

(2) がんの原発巣やリンパ節転移巣の性状を診断する方法の開発: がん組織の免疫染色の課題を解決するために、蛍光ナノ粒子と画像解析を組合



せた新たながん免疫染色法の開発を東大・樋口班と協力しながら進めた。近年、がん転移活性化因子として注目されている PAR1 (Protease-activated receptor 1) に注目し、PAR1 を特異的に認識する抗体を独自に調製し、これと蛍光ナノ粒子を結合させた「PAR1 抗体-ナノ粒子」を作製した。この蛍光プローブでヒトがん組織を免疫染色した後、蛍光波長特性や蛍光強度をピクセル毎に高精度解析する独自の方法で、取得蛍光画像の評価を行った。その結果、自家蛍光が存在するヒトがん組織においても、標的因子発現量の相対量を高い定量性で算出する方法の開発に成功した。本方法を応用し、ヒト乳がんの手術後の予後予測を試みるために、乳腺正常組織、5年以上無再発の乳がん組織、3年以内再発の乳がん組織、の3種類のヒト組織を使って免疫染色と画像解析を行った。その結果、「PAR1 抗体-ナノ粒子」の蛍光スコアは、がん悪性度に強く相関するデータを得ることに成功した(図)。

Clarification of molecular mechanism of lymphatic metastasis and development of new therapy for cancer metastasis

Kohsuke Gonda

*Department of Medical Physics, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Japan
Department of Nano-Medical Science, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Japan*

Recently, sentinel lymph node diagnosis for cancer surgery is growing in importance because cancer cells metastasize to other parts of the body via lymph vessels or blood vessels. To diagnose sentinel lymph node tissues in cancer with high accuracy, development of imaging method of cancer tissues is important. The expression level of the targeted protein in tumor cells is generally measured by immunohistochemistry (IHC). However, in IHC with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (IHC-DAB), the intensity of DAB staining depends on the enzymatic activity of horseradish peroxidase (HRP). Therefore, the staining intensity of DAB is significantly influenced by the reaction time, temperature and HRP substrate concentrations. The fluorescent label increases the quantitative sensitivity of IHC because the intensity of the fluorescent materials is proportional to the intensity of the photon excitation energy in an irreversible chemical reaction. Additionally, the fluorescent label provides an image with a high signal-to-noise ratio through the use of dark background light and multistaining with various wavelengths. However, general organic fluorescent molecules such as FITC, Alexa Fluors, and Cy-5, have disadvantages arising from their poor photostability and autofluorescence interference. Recently, quantum dots (QDs) have been used in various bio-imaging techniques due to their greater photostability and brightness compared with general organic fluorescent molecules. However, the high intensity of tissue autofluorescence is comparable to that of QDs. This problem has impeded quantitative analysis using only the fluorescence intensity of QDs in the presence of autofluorescence.

Here, we targeted protease-activated receptor 1 (PAR1) as a new biomarker for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative patients and made anti-PAR1 antibody. To estimate PAR1 expression levels in HER2-negative patient tissues using the antibody, user-friendly immunohistochemistry with fluorescence nanoparticles or quantum dots (QDs) was developed. Previously, immunohistochemistry with QDs was affected by tissue autofluorescence, making quantitative measurement extremely difficult. We significantly improved the quantitative sensitivity of immunohistochemistry with QDs by using an autofluorescence-subtracted image and single-QD imaging. The immunohistochemistry showed that PAR1 expression was strongly correlated with relapse-free survival time in HER2-negative breast cancer patients. Therefore, the developed anti-PAR1 antibody is a strong candidate for use as an anticancer drug and a prognostic biomarker for HER2-negative patients.

遺伝子解析と分子トレーシングを基盤とした 細胞標的分子の創製

研究代表者：名古屋大学医学部脳神経外科 夏目敦至

研究分担者：名古屋大学医学部腫瘍生物学 千賀威

1. 研究の概要

ストレス顆粒は RNA と多くのタンパク質からなる凝集体であり、熱や活性酸素などのストレスにより形成される。その形成メカニズムは不明であり、RNA の翻訳停止やタンパク質の修飾が関与していると考えられている。また、ストレス顆粒の構成タンパク質の異常は神経疾患の発症と関連している。我々は分子生物学的手法とイメージングの手法を用いてストレス顆粒形成のメカニズムを解析している。ストレス顆粒の新たな構成因子を同定し、そのダイナミックな細胞内局在と複合体形成を解析し、関連する病態の解明につなげたいと考えている。

2. 研究の背景と目的

個体における細胞は常に外から様々な種類のストレスを受けている。表皮細胞は紫外線による化学的損傷、赤外線による熱刺激、また多くの化学物質によるストレスを受けている。消化管内の上皮細胞は化学物質、病原体、そして浸透圧によるストレスに常にさらされている。このようなストレスが加わると細胞内では非常に多くの異なる反応が起こることが知られている。ストレス顆粒の形成は、そのような多くのストレスに対する反応の1つである。

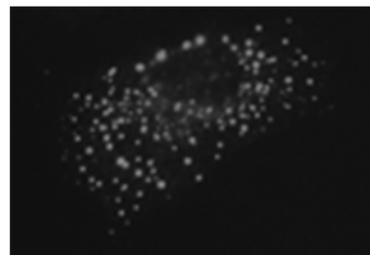
ストレス顆粒は主にヒ素、熱（42度から44度）、浸透圧、活性酸素などのストレスによる生じる直径1-5マイクロメートルほどの、タンパク質と mRNA からなる凝集体である。ストレスを加えて20分ほどでストレス顆粒は細胞全体にわたって多数形成され、刺激がなくなるとすみやかに消失していく。ストレス顆粒に局在するタンパク質のいくつかは、癌、炎症性疾患、ウイルス感染症、そして筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis ; ALS）や前頭側頭型認知症（*frontotemporal dementia* ; FTD）などの神経変性疾患などに関係することが分かっている。TDP-43 はストレス顆粒に局在する LC 配列を有する RNA 結合タンパク質であるが、ALS の患者の脳細胞に存在する凝集体に局在している。Ataxin2 もストレス顆粒局在タンパク質であるが、この遺伝子の変異は一部の家族性 ALS との関連が報告されている。ストレス顆粒と癌に関しても多くの研究がおこなわれており、抗がん剤に対する耐性や癌細胞の増殖や生存に関することが報告されている。

ストレス顆粒の形成メカニズムを明らかにすることは、神経疾患や抗がん剤耐性の分子機構の解明につながる可能性がある。そこで我々はストレス顆粒の新たな構成因子を同定し、その役割について解析をおこなった。

3. 成果

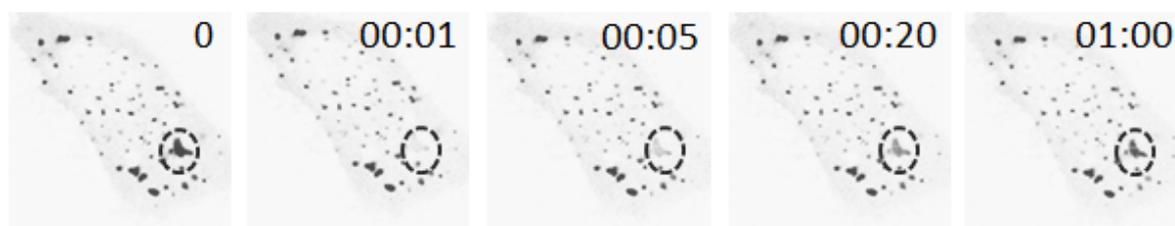
ストレス顆粒を形成する多くの因子はアルギニンとグリシンからなる配列 (RGG 配列) を有している。RGG 配列のアルギニンはメチル化酵素である PRMT1 によりメチル化される。そこで我々は新たなストレス顆粒形成因子を同定するため、PRMT1 との結合タンパク質の網羅的な解析をおこなった。その結果多くの RGG 配列を含む RNA 結合タンパク質が PRMT1 と結合し、ストレス顆粒に局在することが判明した。我々はその中のいくつかのタンパク質に関してさらに詳細な検討をおこなった。

図 1



UBAP2L はユビキチン結合領域と RGG を配列有する機能不明のタンパク質である。PRMT1 によりアルギニンがメチル化され、そしてストレス顆粒に局在することが観察された (図 1)。ストレス顆粒における GFP-UBAP2L の局在を (Fluorescence Recovery after Photobleaching; FRAP) を用いて観察したところ、ストレス顆粒における UBAP2L はダイナミックに動くことが分かった (図 2)。さらに siRNA を用いて UBAP2L の発現を抑制したところ、ストレス顆粒の形成が顕著に抑制された。

図 2



UBAP2L の機能をさらに検討するため、UBAP2L と複合体を形成するタンパク質を質量分析により検討した。その結果、FMR1 と G3BP1 というタンパク質が結合することが分かった。FMR1 は遺伝性の神経疾患の原因遺伝子であり、G3BP1 はストレス顆粒に局在するタンパク質である。結合を詳しく解析したところ、UBAP2L と G3BP1 は RNA を介して結合していることが明らかとなった。UBAP2 は UBAP2L のホモログであるが、興味深いことに UBAP2 は UBAP2L と異なる複合体を形成することが分かった。UBAP2 と UBAP2L は RNA を含む複合体を形成し、RNA の翻訳や RNA の代謝に関連していると予想される。また神経疾患に関連するタンパク質と複合体を形成することから、病気との関連性も考えられる。

Genetic analysis and imaging for elucidation of pathogenesis of human diseases

Atsushi Natsume¹

Takeshi Senga²

¹Department of Neurosurgery and ²Division of Cancer Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

Various serine/threonine kinases are activated in cells upon numerous extracellular stresses, such as heat, hypoxia and oxidation. These stresses activate four different types of kinases, EIF2AK1, EIF2AK2, EIF2AK3, EIF2AK4, which consequently promote phosphorylation of eIF2 α at Ser51. The phosphorylation inhibits initiation of translation and induces formation of granules that are composed of numerous mRNAs and proteins with specific domains or sequences rich in arginine and glycine (RGG motif). Some proteins that are localized in SG are associated with pathogenesis of neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis. Elucidation of molecular mechanisms of SG formation may give some insight for the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Our proteomics analysis of SG components revealed UBAP2L is a critical component of SG. UBAP2L contains ubiquitin-associated domain and RGG motif. UBAP2L is localized to SGs when cells are treated with heat, arsenite, hydrogen peroxide, and sorbitol. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis revealed that UBAP2L localization to the SG is dynamic. UBAP2L depletion by siRNA transfection showed that UBAP2L was critical for the organization of SG. Formation of SG is associated with cell survival in the presence of extracellular stresses. Consistently, a number of UBAP2L-knockdown cells underwent apoptosis after arsenite or hydrogen peroxide treatment. Further proteomics analysis revealed that UBAP2L was in complex with G3BP1 and FMR1, both of which are known to localize to SG. Mutation of FMR1 is associated with mental retardation of human. UBAP2L directly associated with FMR1, but the interaction of UBAP2L and G3BP1 was dependent on the presence of small RNAs, indicating that UBAP2L is a ribonucleoprotein. Interestingly, UBAP2, which is a homolog of UBAP2L, was also a component of SG but formed different protein complex. Further analysis of UBAP2L and UBAP2 functions in RNA processing and SG formation may give insight for the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御

研究代表者：京都大学再生医科学研究所 岩田 博夫

分担研究者：京都大学再生医科学研究所 有馬 祐介

分担研究者：大阪大学 大学院基礎工学研究科 岡本 行広

1. 研究の概要

我々は PEG 脂質の末端に一本鎖 DNA (ssDNA) を結合した ssDNA-PEG-脂質を細胞表面の修飾材料を用い、DNA の相補対形成を介した細胞表面への生理活性物質の固定化や細胞－基板間、細胞－細胞間接着の制御を行ってきた。本年度は ssDNA-PEG-脂質の合理的設計を目指し、塩基長が細胞間接着挙動へ及ぼす影響を調べた。塩基長 6 と 1 分子レベルでは弱い相互作用であっても、細胞膜間で多価効果が働くことで体温環境下でも細胞間接着を誘導できることが分かった。また、PEG-脂質を用いてタンパクの活性を損なわずに、迅速、簡便かつ高効率で細胞表面にタンパクを固定化する方法の開発を目指した。遺伝子組み換えタンパク質の精製に用いるタグ配列とリガンドとの相互作用を PEG-脂質技術に組み込むことで、細胞表面に遺伝子組み換えタンパク質を固定化することができた。また、この方法を用いて細胞へ新たな機能を付与できることが分かった。

2. 研究の背景と目的

生体内では二次結合、すなわち弱い結合を通じて分子がダイナミックに相互作用している。DNA の二重らせん、抗原・抗体反応、レセプター・リガンド相互作用、酵素・基質相互作用、細胞・細胞間相互作用、高次形態形成等々、生命活動の多くの局面で、二次結合は一つ一つの相互作用は弱いだがそれが協同することで極めて特異的で多様性を持った強い相互作用を行うことができるばかりでなく、ダイナミックに相互作用の on-off を行っている。生命活動の本質は“弱い相互作用の協同性”に潜んでいるといっても過言ではないと考えている。本研究では、細胞レベルのダイナミクスに着目する。初期の細胞集合体を形成させた後、細胞は予想外の速さでこの集合体の中でダイナミックに相互の位置を変えている。個体発生時、組織の再生時、がん細胞の転移という具合に生物のほとんどの局面でこの細胞のダイナミックな動きに遭遇する。この過程の研究法を確立するとともに、この過程に関与する分子を明らかにし、相互作用定数を決め、数理モデルを構築してそのダイナミックな過程の理解を進める。応用面では、再生医療への展開、また、iPS 細胞から誘導した機能細胞、その集合体である機能組織体の薬物スクリーニングへの供給が可能になる。

3. 成果

(1) 塩基長が細胞間接着へ及ぼす影響

6, 10, 21 塩基の ssDNA-PEG-lipid を合成し, DNA の設計が細胞表面での相互作用に及ぼす影響を調べた。相補対 1 対の相互作用パラメータ (T_m) はそれぞれ, 27, 38, 74°C であった。これら 3 種の ssDNA-PEG-lipid で修飾した細胞へ相補 DNA を 4°C で結合させた後, 温度上昇に伴う相補 DNA の解離を調べた。塩基長が短いほど低温で相補 DNA の解離が見られ, 細胞表面での DNA1 対の解離は液中と同程度であることが分かった。細胞間接着についてはどの ssDNA-PEG-lipid を用いても誘導することができ, 細胞間接着面に ssDNA-PEG-lipid が集積した。 T_m 値から考えると, 6 mer の ssDNA-PEG-lipid を用いて細胞間接着を誘導した場合, 37°C に昇温することで細胞間接着を脱離できると期待した。しかし, 37°C においても細胞間接着は維持された。これは, 細胞間接着面に ssDNA-PEG-lipid が集積し, 多価効果により相互作用パラメータが増強されたためと考えられる。このことから, 細胞間接着においては, 1 分子レベルの相互作用パラメータだけではなく多価効果による協同作用も考慮する必要があることが分かった。

(2) 細胞表面への遺伝子組み換えタンパク質の固定化

PEG-脂質による細胞表面修飾法は迅速, 簡便かつ高効率であるものの, 共有結合によって PEG の末端へタンパク質を固定化するとタンパクの活性が低下することがある。そこで PEG-脂質を用いて細胞表面にタンパクを活性を損なうことなく固定化することを目指した。遺伝子組み換えタンパク質合成では, 望みの位置にタグ配列を導入することができる。これと特異的に相互作用するリガンド分子を導入した ligand-PEG-lipid を用い, 細胞表面に導入されたリガンドとタグ配列との特異的相互作用によって, 細胞表面に遺伝子組み換えタンパク質を固定化することを試みた。タグ配列としては His タグまたは SNAP タグを用い, それぞれのリガンド (ベンジルグアニンまたは金属イオンをキレートしたニトリロ三酢酸) を有する ligand-PEG-lipid を合成した。細胞表面を ligand-PEG-lipid で修飾することで, 対応するタグ配列を持つタンパクを固定化することができた。また, この手法を用いて細胞間接着を担う膜タンパク質である E-cadherin の細胞外ドメインを固定化したところ, 異種細胞からなる細胞凝集体の構造制御に成功した (図)。本手法を用いることで細胞表面に目的タンパク質を迅速かつ高効率に修飾でき, これにより細胞機能を改変できることが分かった。

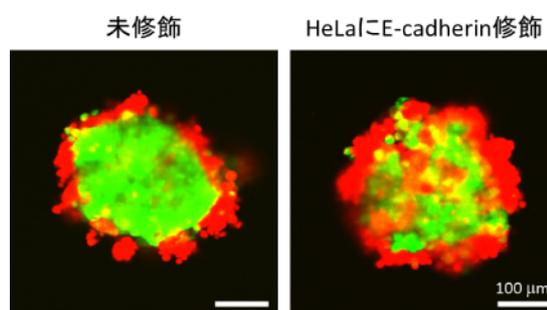


図. E-cadherin 表面修飾による, ヒト乳癌由来上皮細胞 (MCF-7, 緑) とヒト子宮頸癌由来上皮細胞 (HeLa, 赤) からなる細胞凝集体の構造制御

Three Dimensional Tissue Regeneration Through Multipoint Molecular Weak Association

Hiroo Iwata¹

Yusuke Arima¹, Yukihiro Okamoto²

¹ Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University,

² Graduate School of Engineering Science, Osaka University

We have employed single stranded DNA-poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates (ssDNA-PEG-lipids) for cell surface engineering. The ssDNA presented on the cell surface acts as an adhesive to immobilize functional molecules, materials and various cells on the cell surfaces. For rational design of ssDNA-PEG-lipids, it is important to understand structure-function relationship of ssDNA-PEG-lipids. We examined the effect of DNA length on intermolecular interactions at cell surface. We synthesized three ssDNA-PEG-lipids carrying different DNA length (6 mer, 10 mer, or 21 mer). The melting temperature (T_m) decreased with decreasing DNA length, indicating preparation of ssDNA-PEG-lipids with different interaction strength. Temperature-dependent binding of complementary ssDNA' to cells modified with ssDNA-PEG-lipids was observed in agree with T_m , indicating that single molecular hybridization at cell surface is similar to that in solution. In contrast, cell-cell attachment was induced by ssDNA-PEG-lipids independently their DNA length. This could be explained by local enhancement of hybridization since ssDNA-PEG-lipids were recruited at cell-cell contact region upon cell-cell attachment. This result suggests that it is necessary to consider intermembrane multivalency to design ssDNA-PEG-lipids for controlling cell-cell attachment.

We also aimed to develop a method to efficiently immobilize proteins onto cell surface with retained bioactivity of proteins. Although cell modification with proteins through physicochemical approaches is easy, rapid, efficient compared to biological approaches, it often results in loss of proteins' bioactivity. We employed ligand molecules which specifically interact with tag sequences of recombinant proteins. We synthesized PEG-lipids carrying metal ion-chelated nitrilotriacetic acid (NTA) or benzylguanine (BG), which interact with His-tagged or SNAP-tagged recombinant proteins, respectively. His-tagged or SNAP-tagged enhanced green fluorescent protein (EGFP) was immobilized onto cell surface with high efficiency and low cytotoxicity. We then examined cell surface modification with cell-cell adhesion molecule E-cadherin to engineer cell-cell adhesion. Modification of surface of T cell lymphoblast-like cell line with E-cadherin successfully induced formation of cell aggregates through homophilic interaction of E-cadherin. Additionally, E-cadherin modification could modulate structure of aggregates consisting of two types of epithelial cell lines. These results demonstrate functionalization of cell with recombinant proteins using ligand-PEG-lipids.

【 公 募 研 究 班 】

蛍光寿命イメージングを用いた細胞内イオン濃度の動的変化の解明

研究代表者：東北大学大学院薬学研究科 中林 孝和

1. 研究の概要

アミロイドβのオリゴマーと線維状態のその場検出についてチオフラビン(ThT)色素の蛍光を用いて検討した。オリゴマーと線維状態において ThT 色素の蛍光強度は異なるが、この違いは、蛍光寿命の変化ではなく、会合しているペプチド数の違いの寄与が大きいことがわかった。また、糖結合タンパク質であるヒトガレクチン-1(hGal-1)のファルネシル基結合によるクラスター形成について、糖結合ポケットを介して生じること、糖結合ポケットは主に2状態の平衡にあることを蛍光寿命から示唆する結果を得た。H-Ras の hGal-1 との相互作用によるクラスター形成は、hGal-1 の糖結合ポケット間による自己集合によって生じることが示唆される。

2. 研究の背景と目的

蛍光寿命の値は、光退色などの様々な実験条件に依存しないために、定量的な情報を得ることができる。申請者らは、製作した蛍光寿命イメージングシステムを用いて、細胞内 pH や細胞死のその場検出など、蛍光寿命を用いた様々な細胞内環境計測を提案している。本研究では、自家蛍光だけではなく、機能性色素分子などを用いて蛍光寿命を用いた細胞内環境計測手法の提案と細胞内分子の高感度計測を目指す。また共同研究を行うことによって、蛍光寿命を用いた様々な細胞内環境計測を行う。

3. 成果

(1) ThT 色素の蛍光寿命を用いた生体分子の高感度測定を検討している。DNA の四重らせん構造のその場検出のみではなく、アルツハイマー病関連物質であるアミロイドβ(Aβ)にも応用している。Aβについては、繊維化した状態ではなく、断片化したオリゴマー状態がアルツハイマーの発症に大きく寄与することが提案されている。我々は、溶液の Ca²⁺濃度を調整することによって、Aβのモノマー、オリゴマー、そして繊維状態を作り分けることに成功しており、ThT の蛍光寿命を用いた Aβの各状態の検出を検討した。Aβに染色された ThT は、モノマー、オリゴマー、そして繊維状態と変化するにつれて蛍光強度が強くなり、ThT の蛍光強度から各状態をその場検出することができる。しかし、蛍光減衰曲線を解析した結果、モノマー状態と繊維状態の ThT の蛍光寿命が約 10 ps 以下と 3 ns であるのに対し、オリゴマーの蛍光減衰曲線は 10 ps 以下と約 3 ns の2成分の重ね合わせとして観測された。更なる検討が必要であるが、オリゴマーの ThT の蛍光強度が繊維状態よりも小さいのは、会合状

態にあるペプチドの量が少ないことが原因であることが示唆される(三好大輔教授(甲南大)との共同研究)。

(2) GTP 分解酵素である H-Ras は、糖結合タンパク質 hGal-1 との結合によりクラスターを形成し、H-Ras のシグナル伝達を活性化する。そこで、hGal-1 と H-Ras との相互作用について蛍光寿命から検討した。H-Ras の結合部位のモデルとなる farnesyl thiosalicylic acid (FTS)を用いて、hGal-1 の糖結合ポケット内にあるトリプトファン(Trp)残基の蛍光寿命の FTS 濃度依存性を測定した。蛍光減衰曲線は 3 成分の指数関数を用いて再現し、3 成分から得られる平均蛍光寿命は、FTS の濃度が約 300 μM から増加し、約 800 μM の濃度領域において一定値となった (Fig. 1A)。Trp エステル体の蛍光寿命の溶媒依存性において、溶媒の極性の減少に伴い蛍光寿命が増加することから、FTS の濃度増加によって Trp 周囲の極性が減少し蛍光寿命が増加したと考えられる。native PAGE の測定から、FTS の濃度増加に伴い、会合数の小さい hGal-1 クラスターが生成し、さらに高濃度では会合数の大きなクラスターが生成する 2 段階のクラスター形成が生じることがわかった。2 段階のクラスター生成過程は、蛍光寿命の FTS 濃度依存性と対応し、小さなクラスターでは、糖結合ポケットを介してクラスターが生成し、Trp 周囲の極性が減少する構造変化を伴うのに

対し、大きなクラスターは、糖結合ポケットを介さずに生成し、Trp 周囲の極性環境が変化しないと考えられる。また、平均蛍光寿命の変化は、速い寿命成分と遅い寿命成分の割合の変化によって生じており (Fig. 1B)、糖結合ポケットの構造が 2 状態の平衡状態であることを示唆している。FTS の濃度増加に伴い、クラスターを形成しやすい状態に平衡が偏り、クラスター形成が誘起されるモデルが考えられる。

(3) 光感受性色素の蛍光寿命について、がんと正常細胞中において蛍光寿命が異なること、また細胞内での活性酸素種(ROS)の発生効率と蛍光寿命との間に相関があることを示す結果を得た。そこで、パルスレーザーと時間分解赤外吸収システムとを組み合わせ、ROS の検出および収率測定を行うシステム開発を行っている。変化量が小さいために、信号雑音比の向上について検討している。(太田信廣教授(台湾交通大), 李黎明教授(千歳科技大)との共同研究)。

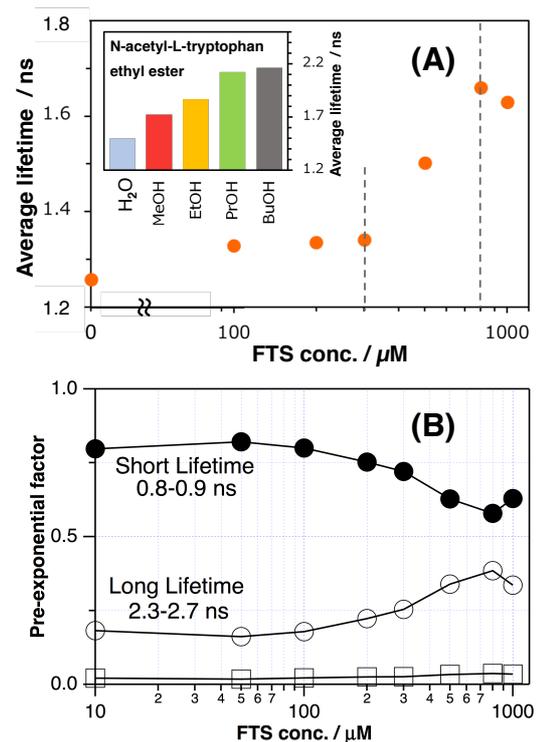


Fig. 1. (A) Average fluorescence lifetime of hGal-1 with changing FTS concentration. The fluorescence lifetime of the tryptophan model compound is also shown in the inset. (B) The pre-exponential factors of the three lifetime components of the fluorescence decay of hGal-1.

Application of Fluorescence Lifetime Imaging to the Evaluation of Intracellular Ion Concentrations

Takakazu Nakabayashi
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Japan

We have used fluorescence lifetime imaging (FLIM) to monitor cellular environments in a cell because the value of the fluorescence lifetime remains constant with photobleaching and optical conditions, performing quantitative measurements of cellular environments. In this project, we have applied FLIM to a variety of bioanalytical sciences including the evaluation of ion concentrations and the detection of biological molecules.

The formation of amyloid β ($A\beta$) aggregates is strongly related to Alzheimer's disease (AD) and the distinction between the fibril and oligomer states of $A\beta$ is important to clarify the mechanism of the pathogenesis of AD because the $A\beta$ oligomer is suggested to have high toxicity. Thioflavin T (ThT) exhibits strong fluorescence with binding to $A\beta$ aggregates, and the fluorescence intensity depends on the aggregate condition. Therefore, it is expected that FLIM of ThT is used to monitor the magnitude of the $A\beta$ aggregation, especially to distinguish the oligomer and fibril states. We have succeeded in separately preparing the oligomer and fibril states and analyzed the fluorescence decays of ThT in the monomer, oligomer, and fibril, respectively. The fluorescence lifetimes of < 30 ps and ~ 3 ns were calculated for ThT in the monomer and fibril, respectively, and the fluorescence decay of ThT in the oligomer was found to be the linear combination between the decays of the monomer and fibril states. Therefore, it may be considered that the decrease in the fluorescence intensity from the fibril to oligomer states comes from the decrease in the number of the site to which ThT is bound, not from the decrease in the fluorescence lifetime. (Collaboration with Prof. Miyoshi (Konan Univ.))

H-Ras forms clusters by binding to galectin-1 (hGal-1), which results in the activation of H-Ras. We have investigated the structural change of hGal-1 with binding to farnesyl thiosalicylic acid (FTS) that is a model of the interaction site of H-Ras. From the measurement of native PAGE, it is found that hGal-1 forms small-number aggregates in 300–800 μ M FTS and large-number aggregates in 800–1000 μ M FTS. This result indicates that hGal-1 exhibits the two-step formation of aggregates with FTS, which should be related with the formation of H-Ras clusters. The fluorescence lifetime of Trp in the carbohydrate binding pocket of hGal-1 increases with increasing concentration of FTS, and remains almost unchanged at a high concentration of 800–1000 μ M. This result is consistent with that of native PAGE, and it is considered that the interaction between the carbohydrate binding pockets is important for the formation of the small-number aggregates, and the carbohydrate binding pocket is not responsible for the formation of the large-number aggregates.

内在性 mRNA の一分子イメージングによる RNA 代謝機構の解明

研究代表者：東京大学大学院薬学系研究科 岡部 弘基

1. 研究の概要

本研究では、細胞内において RNA 代謝を直接観察し、その時空間的パラメータを決定することを旨とし、これまでに開発した蛍光標識線形アンチセンスプローブを用いた細胞内 mRNA のイメージングおよび定量解析法を応用して、細胞内 mRNA の一分子イメージング法を開発した。まず、任意の標的 mRNA に対して高い親和性を有するアンチセンスプローブを得るため、多数の mRNA のプローブ候補に対し、標的 mRNA との結合能の定量評価を行った。この結果、複数の優れた結合能を有するプローブを得るとともに、mRNA に対して高い親和性を有する配列の特徴を見出した。続いて、高親和性プローブを用いることで細胞質およびストレス顆粒内の内在性 mRNA の一分子イメージングに成功した。

2. 研究の背景と目的

近年、siRNA や miRNA などの小分子 RNA や非翻訳 RNA の発見により、mRNA は積極的に翻訳を介して遺伝子発現を調節する機能性分子であることが示された。これら小分子 RNA の作用標的は細胞質 mRNA が担う翻訳であり、タンパク質発現量の直接的調節を担っている。このような細胞質を舞台とした RNA 代謝は細胞運命の操作に基づく治療法の開発において有望な標的である。しかしながら、細胞内における翻訳制御研究についてはそれに関与する因子同定の域を超えず、メカニズムやダイナミクスは不明であった。このことから、本研究では細胞質において mRNA の発現量や振る舞いを一分子検出により直接かつ定量的にとらえることにより、RNA 代謝を理解し、細胞機能を操作する技術基盤の創成を目指した。

これまでの本領域研究において、我々は生細胞内における蛍光標識アンチセンス 2'O-methyl RNA プローブの mRNA との相補結合に伴う拡散運動の変化に着目した新規検出法を開発した。また、これを応用して生細胞内における内在性 mRNA の定量解析および追跡法を開発し、初めて生細胞内で mRNA 分解の実時間追跡に成功した。一方、細胞内における RNA 代謝のダイナミクスとメカニズムを解明するには、個々の mRNA の受ける制御（分解や翻訳抑制）を細胞内の局所環境において直接観察することが必須である。そこで、本研究ではこれまでに開発したアンチセンスプローブによる内在性 mRNA の定量的検出法を駆使することにより、内在性 mRNA の一分子イメージング法を開発した。これにより細胞内 RNA 代謝のダイナミクスとメカニズムを詳細に明らかにすることに加えて、アンチセンスプロー

ブの結合能に関する定量的かつ網羅的解析から、生細胞内における mRNA の構造や状態の理解することを目的とした。

3. 成果

生細胞内における mRNA を一分子感度で可視化するには、高い親和性を有するアンチセンスプローブが必要である。まず、GAPDH mRNA を標的として、高親和性のアンチセンスプローブを開発した。GAPDH mRNA コーディング領域の予測二次構造を得た後、比較的安定して形成される局所的な構造に基づき、複数の候補プローブを設計した。次に、細胞内アンチセンスプローブの拡散速度の定量解析から標的 mRNA との結合を評価することで、生細胞内での結合能に関するスクリーニングを行った。デジタルマイクロミラーデバイス (DMD) と共焦点蛍光顕微鏡法を用いた光褪色後蛍光回復 (FRAP) による細胞内拡散の定量的解析から、プローブと GAPDH mRNA との結合率を定量化した。得られた結合能に関する結果には、予想通り高い親和性を示すものもあったが、予想と相反する結果も得られた。そこでアンチセンスプローブの結合能に関して、配列と結合能を詳細に考察した。その結果、プローブ配列と結合能についての一般則を見出し、これに基づいて新規にアンチセンスプローブ候補を設計した。新たに設計したプローブ候補は高い確率で優れた結合能を示したことから、この知見が効率良くプローブを設計に関する際の指針となることを確認した。また、以上の検討から、GAPDH mRNA や β -actin mRNA に高い結合率で標識できるアンチセンスプローブを複数獲得した。

次に、高親和性アンチセンスプローブを用いた細胞内 mRNA の一分子検出に取りくんだ。mRNA 由来の信号を高い信号-背景比で検出するために、複数のアンチセンスプローブを用いたり、明滅型蛍光色素により標識したアンチセンスプローブを用いた。標識する蛍光色素の種類や細胞内イメージング条件を詳しく検討することにより、COS7 細胞の細胞質内 GAPDH mRNA の一分子イメージングに成功した。この方法を用いることで、ストレス環境において形成するストレス顆粒 (SG) 内の mRNA の一分子追跡 (SPT) に応用した。SPT から得られた mRNA の運動性を時間-平均二乗変位 (MSD-t) プロットにより定量的に解析した結果、細胞質内の mRNA と比べて SG 内の mRNA は運動性が制限されていることが分かった。また、一部の mRNA は SG 内においても自由拡散ないし制限された領域を拡散していたことから、SG 内における mRNA は多様な動態を示すことを明らかにした。これらは mRNA の貯蔵や翻訳抑制、選別といった SG の多面的な機能を反映していると考察している。

Single molecule imaging of endogenous mRNA in single living cells

Kohki Okabe

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Japan

In eukaryotic cells mRNA plays a key role in gene regulation through various step of processing throughout the cell. Direct observation of endogenous mRNA in living cells promises a significant comprehension of these refined regulation. Recently a number of fluorescent probes for mRNA have been developed including our fluorescent linear antisense probe. However, quantitative analysis and single molecule imaging of intracellular mRNAs has been difficult.

In this study, we quantitatively measured the molecular diffusion of antisense probes to determine their binding abilities in living cells. When antisense probes hybridize with mRNA, which forms large complexes with various RNA binding proteins, they have slower diffusion constants than unbound probes which is in a free state. Antisense 2'-*O*-methyl RNA probes for GAPDH mRNA labeled with Cy3 were microinjected into the cytoplasm of COS7 cells and the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of antisense probes was analyzed. As we expected, probes hybridized with mRNA showed slower diffusion times than those of unbound probes. Two fractions having different diffusion times were observed, suggesting that we could detect both antisense probes-mRNA hybrid and unbound probes. The fraction ratios of bound and unbound probes were different among probes, reflecting the different affinity of various antisense probes. Based on the result of binding ratio of various antisense probes against GAPDH mRNA, we found a rule about the sequence of the target mRNA and binding affinity.

Next, we performed single-molecule imaging of endogenous GAPDH mRNA in COS7 cells using high-affinity antisense probes. By optimizing the blinking-fluorophore and imaging conditions, we were able to detect single-molecule mRNA in the cytoplasm and inside of stress granule (SG). Single particle tracking (SPT) of GAPDH mRNA allowed to analyze the mode of movements of mRNA in these compartments, which suggests that mRNA in SG show a variety of dynamics reflecting its diverse functions. These results indicated that our method will be a powerful tool for detailed observation of RNA metabolism in real time.

軸索パターンの構築において時空間情報伝達と 構造的安定化を司る分子反応の解明

研究代表者：福井大学大学院工学研究科 小西 慶幸

1. 研究の概要

神経軸索は分岐した枝の局所的な伸長・退縮を伴いながら形態を構築する。本研究課題では、軸索パターンの調節を司る細胞内の分子反応について時間的・空間的变化を定量的に解析し、軸索内の空間的情報の伝搬と、微細構造の変化を介して領域に依存した伸長・退縮の違いを制御もたらす分子反応を解明する。これまでの解析でキネシンモーター領域(K5H)が多く分配される軸索分枝において退縮が抑制されることを見出しており、その機序の解明を試みる。特に本年度はキネシンの下流で構造安定化を担う因子として、軸索の成長円錐の機能において中心的な役割を担うアクチン繊維について中心的に解析を行った。その結果、分岐軸索の退縮に、Arp2/3を介したアクチンの制御が関与する可能性を明らかにした。

2. 研究の背景と目的

神経細胞は局所的な再構築を行いながら、複雑に分岐した軸索パターンを構築・維持する。単一の神経細胞が局所的な軸索の安定性を如何に制御するかは明らかにされていない。本領域におけるこれまでの研究により、分岐軸索の各枝の微小管の違いにより、キネシンが選択的に分配されることで局所的な枝の安定性を制御する可能性を示した。そこで本研究課題では、キネシンモーター領域(K5H)が多く分配される軸索分枝において、退縮が抑制される機構を明らかにする。キネシンの下流で構造安定化を担う因子として、主に微小管、アクチン繊維、ミトコンドリアを想定した。前年度の研究により軸索分枝末端におけるK5H量とアクチン繊維量の間に関係があることを見出したため、キネシンの下流でアクチン繊維を介した構造安定化が起こると仮定し、その機序を解明する。

3. 成果

・ 内在的キネシンの分布と機能阻害

内在性キネシンの分布は結合分子に依存して制御されることが報告されている。これまでの研究では強制発現したキネシンモーター領域(K5H)の分布を解析してきた。小脳顆粒細胞の低密度培養を行い抗キネシン抗体による免疫細胞染色を行った結果、軸索分枝末端にシグナルが検出され、長い枝ほど信号が強い傾向が観察された。次にキネシンのカーゴ結合領域(K5T)を神経細胞内に発現させ、キネシンによる輸送を阻害した。その結果、軸索枝長の有意な減少が示された。この結果から軸索パターン維持における内在型キネシンによる輸送が必要であることが示された。

- ・ アクチン阻害による軸索分枝の安定性の変化

これまでの解析で、軸索パターンニングにおけるキネシンモーター領域とアクチン繊維 (Lifeact) の同時観察を行い、両者の間に時間空間的に正の相関を見出した。アクチン繊維の機能とキネシンに依存した軸索安定性の因果関係を明らかにするため、アクチン脱重合阻害剤 Latrunculin A を培養神経細胞に投与し、タイムラプスイメージングにより軸索内の K5H の分布と各軸索分枝の退縮量を計測した。Latrunculin A の投与した軸索では K5H の少ない枝においても伸長のみならず退縮も抑制される傾向が見られ (Control: 0.019 $\mu\text{m}/\text{min}$, Latrunculin A: 0.009 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.005$)、キネシンによる軸索内の不均一な分布はアクチンの機能制御を介して軸索パターンを制御することが示唆された。

- ・ 軸索分枝の退縮に関わるアクチン制御分子の解析

アクチン制御に関わる、Rac1, Pak1, LIMK1, Arp2/3 等の機能を解析し、軸索輸送とアクチン制御の関連を示すことでシステムの全体像を描出することを試みた (図 1)。前回までに、タイムラプスイメージングにより、Latrunculin A を投与した軸索では各枝の伸長・退縮がともに阻害されることを示した。軸索末端における主なアクチン制御には Rac1 を経て Pak1-LIMK1 と続く経路と WAVE-Arp2/3 と続く経路が報告されている。そこで、これら経路の阻害による影響を解析した。その結果、Pak1, LIMK1 の阻害においては伸長のみ抑えられ (IPA3: 0.005 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.001$, LIMKi3: 0.010 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.05$) 退縮は変化しないのに対し、Arp2/3 の阻害では Latrunculin A と同様に伸長・退縮 (ck666: 0.010 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.05$) が共に抑えられることが示された。これにより、K5H の低下した軸索分枝の退縮に Arp2/3 を介したアクチンの制御が関与する可能性が示唆された。

分岐軸索の各枝の安定性の違いがいかんして生じるのかは不明であった。本年度の成果により、キネシン-アクチン制御系の相互作用により成長円錐の機能制御を介して軸索分枝の退縮が制御されることが示唆された。輸送効率と構造因子との関連が示されたことで、本課題で対象とした分岐軸索において局所的構造を制御するシステムの全体像が示された。今後直接的な分子間相互作用などの解析から、より詳細な分子反応の進行機序が明らかになることが期待される。

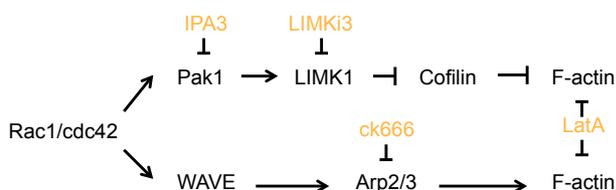


図 1 : 軸索成長円錐における主要なアクチン繊維の制御経路および本研究の解析に用いた阻害剤.

Local regulation of molecular reactions in maintaining axonal integrity

Yoshiyuki Konishi
Graduate school of Engineering, University of Fukui, Japan

The maintenance of cellular morphology is especially important for neurons to make connection with specific targets. The mechanisms by which neurons locally control cellular nanostructures, such as F-actin/microtubules remained unsolved. Our aim is to demonstrate molecular systems by which neurons process spatial information and regulate cellular structure at right position at right time. We have found that K5H-GFP (cleaved kinesin head domain fused to GFP) accumulates into subsets of axonal branches. Furthermore, we found that retraction of axonal branches that have high K5H-GFP signal is significantly lower compared with retraction of branches that have lower K5H signal. In this year, we investigated the mechanisms by which kinesin transport inhibits axonal branch retraction.

To analyze the function of kinesin mediated transport in axonal branch patterning, a cleaved tail region of kinesin is expressed in cerebellar granule neurons. This region interact with cargos, thereby inhibits endogenous kinesin. We found axonal branch length is significantly lower compared with that in control neurons. We have shown last year that there is a positive correlation between K5H-GFP signal and F-actin signal in each axonal branch terminals. To test if F-actin turnover is involved in the axonal branch retraction, we pharmacologically inhibited F-actin turnover with latrunculin A. We found that latrunculin A application significantly inhibit axonal branch retraction (Control:0.019 um/min, Latrunculin A:0.009 um/min, $p < 0.005$). It has been reported PAK1-LIMK1-cofilin pathway as well as WAVE-Arp2/3 pathway play major roles controlling F-actin at axonal growth cone. Thus, we next investigated the roles of these pathways in axonal branch retraction. Inhibition of PAK1 and LIMK1 with application of IPA3 and LIMKi3 significantly inhibited growth of branches (IPA3: 0.005um/min, $p < 0.001$, LIMKi3: 0.010um/min, $p < 0.05$), but did not affect on the retraction. On the other hand, inhibition of Arp2/3 with ck666 significantly inhibited the retraction (ck666: 0.010um/min, $p < 0.05$).

These results suggest that Arp2/3 dependent F-actin regulation at axonal branch terminal is involved in the control of axonal branch retraction.

光増感剤修飾分子を用いた PCI の分子科学

研究代表者：岡山大学大学院自然科学研究科 大槻高史

1. 研究の概要

細胞内で機能する医薬は、自発的に細胞内に侵入するものでない限り、キャリアによって細胞内まで届ける必要がある。キャリアによって細胞内に医薬や生理活性物質を細胞内に導入する際にしばしば問題となるのが、導入した物質のエンドソーム内トラップである。この問題の解決策の1つに Photochemical internalization (PCI) 法がある。本研究では、PCI 法の機構の解明、および、PCI 法において利用可能な光応答コンジュゲートの設計指針について検討した。

2. 研究の背景と目的

Cell-penetrating peptide (CPP) に蛋白質や核酸等の積荷を結合させて細胞内に導入する方法では、目的物質の多くがエンドソームに閉じ込められてしまう問題がしばしばおこる。このことは CPP 以外の各種キャリアを用いた動物細胞内への物質導入法においても、よく問題になることである。この問題の解決法の1つとして、近年、光と光増感剤を用いる方法 (PCI 法) が用いられている。これはキャリア分子と共に (1) キャリア分子により運ばれる物質と (2) 光増感剤とを同時に細胞培養液に加え、(1) と (2) とをエンドソーム内に蓄積させた後に、光をあててエンドソーム脱出させる方法である。筆者らの開発した光誘導 RNA 導入法も PCI 法の1つである。

PCI 法においてエンドソーム膜が崩壊するのは、エンドソームに集積した光増感剤が励起光照射により活性酸素種を放出することが理由と考えられているが、従来の研究では、PCI の成否に関わる光増感剤の性質として「細胞内局在」と「光増感反応」とがきちんと分けて議論されていなかった。また、PCI に用いられる光増感剤の性質と PCI の成否の相関を論じるには、まだ調べられた光増感剤の種類が少ない。そこで、本研究では光増感剤の「光増感反応」に着目して、光照射によるエンドソーム破壊機構の解明に取り組むことにした。また、光増感剤と蛋白質 (ペプチド) からなる光応答コンジュゲート設計指針の確立を目指し、光増感剤を付加する蛋白質 (ペプチド) 上の位置や近傍配列はどうすればいいかを検討した。

3. 成果

光応答 RNA キャリアにおける光増感剤部分について多数の候補物質を用いてみた結果、光照射後の RNA のエンドソーム脱出 (細胞質内拡散) の度合が大きく異なり、それが一重項酸

素 ($^1\text{O}_2$) 生成の割合と相関が高いことが示唆された。このことは $^1\text{O}_2$ クエンチャーの添加により RNA のエンドソーム脱出が抑制されたことから確認された。さらには $^1\text{O}_2$ の生成後、膜破壊までに何が起きているかを検討するため、 $^1\text{O}_2$ との反応性が高いことが報告されているコレステロールの関与を調べた。コレステロール阻害剤を用いた結果、光照射時のエンドソーム膜破壊の阻害が見られたため、コレステロールの関与が示唆された。また、一重項酸素の短寿命の割には長い時間をかけてエンドソーム膜破壊が起こること、エンドソーム破壊までの間に pH 上昇がみられること、などを明らかにした (図 1) (Ohtsuki *et al*, Scientific Reports, 2015)。

また、効率よく PCI を起こす光応答コンジュゲートの設計指針についても検討した。光増感剤を付加する蛋白質 (ペプチド) 上の位置は CPP (N 末 Tat) と逆側 (C 末) の方がよかった。光増感剤の近傍配列として好ましい配列も分かってきた。

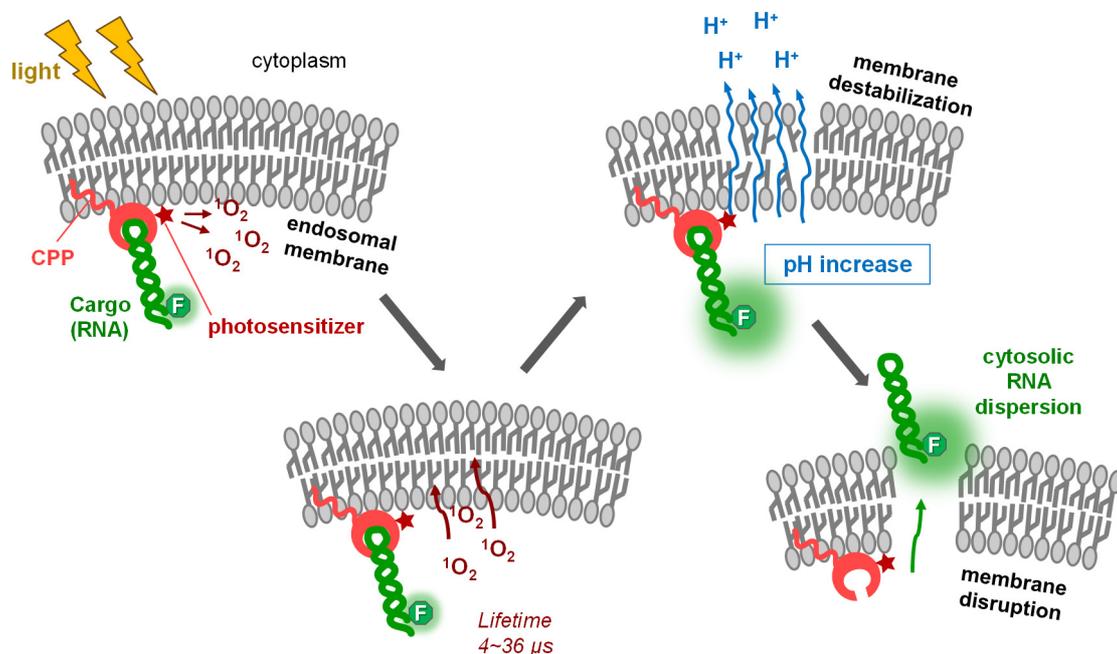


図 1. CPP-RNA-光増感剤コンジュゲートを用いたエンドソーム破壊機構

Mechanism of photochemical internalization using photosensitizing molecules

Takashi Ohtsuki

Department of Medical Bioengineering, Okayama University, Japan

The therapeutic efficacy of many drug delivery strategies is often limited by the inefficient transfer of cargo macromolecules such as proteins and nucleic acids to the cytosol consequential to their endosomal entrapment. One of the methods to overcome this problem is to use a photosensitizer and light to facilitate the endosomal escape of the macromolecules, termed photochemical internalization (PCI). It has been considered in this technique that the endosomes are disrupted by reactive oxygen species generated photo-dependently from the photosensitizer. However, “photosensitizing reaction” and “cellular localization” of photosensitizers have not been separately discussed in the previous reports. In addition, it is necessary to compare many kinds of photosensitizers to discuss their property important for PCI. In the photo-dependent cytosolic RNA delivery method that is one of the PCI strategies, an RNA carrier protein carrying a photosensitizer is used. The localization of the “small” photosensitizer is strongly affected by the “large” RNA carrier protein. Thus, by using this system, we can and focus can be placed on the “photosensitizing reaction” of the photosensitizers.

In this study, we measured the photophysical properties of eight dyes (photosensitizer candidates) and determined the respective endosomal escape efficiencies using these dyes. Correlation plots between these factors indicated that the photogenerated $^1\text{O}_2$ molecules from photosensitizers were highly related to the endosomal escape efficiencies. The contribution of $^1\text{O}_2$ was confirmed using $^1\text{O}_2$ quenchers. In addition, time-lapse fluorescence imaging showed that the photoinduced endosomal escape occurred at a few seconds to a few minutes after irradiation (much longer than $^1\text{O}_2$ lifetime), and that the pH increased in the endosome prior to the endosomal escape of the macromolecule. We also found that several dipeptide sequences were better as linker sequences for the attachment of a photosensitizer to a peptide in a photosensitizing peptide molecule for PCI strategy.

1 細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いた 細胞死に関わる生体分子の1分子計測

研究代表者：大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター 許 岩

1. 研究の概要

本研究では、細胞死を1分子精度1細胞レベルで定量的に理解するために、1細胞分析に最適かつ1細胞内環境の特徴を有するナノチャネルを用いて、細胞死に関わる最も重要なタンパク質の1つであるシトクロムc (cytochrome c) の1分子計測法を開発する。本年度は、シトクロムcの1分子検出に成功した。さらに、超微量の1細胞内容物（ピコリットルレベル、 $pL = 10^{-12} L$ ）をハンドリングするために、フェムトリットル ($fL = 10^{-15} L$) レベルの流体を自在に制御する技術を確立した。

2. 研究の背景と目的

細胞アポトーシス (apoptosis) すなわちプログラムされた細胞死に関わる生体分子の計測は、癌または免疫疾患や神経変性疾患などの疾患メカニズム解明と治療法の開発への応用に繋がる。現状では、アポトーシスの研究において、細胞集団レベルでのアポトーシスに関わる平均的な生体分子情報が利用されている。しかし、細胞集団のアポトーシスは細胞集団を構成する個々の細胞のアポトーシス進行および相互作用などによる結果であり、アポトーシスの誘発メカニズムや疾患との関連性などを精密に明らかにするために、アポトーシスを1細胞かつ1分子レベルで定量的に理解しなければならない。そこで本研究の目的は、細胞死を1細胞かつ1分子レベルで定量的に理解するために、アポトーシスに関わる最も重要なタンパク質の1つであるシトクロムcに着目し、独自に開発した1細胞分析に最適かつ1細胞内環境の特徴を有するナノチャネル技術に基づいて、シトクロムcの1分子計測法を開発し、アポトーシス進行とシトクロムcの量との相関関係を明らかにすることである。アポトーシスにおけるシトクロムcを1細胞かつ1分子レベルで定量することは、細胞死を起こす原点の究明に迫り、細胞死の初期段階における化学反応様式の定量的な理解を可能とし、ナノメディシン研究目標である細胞環境における分子反応への理解の推進に大きく貢献できる。

3. 成果

我々が開発したシトクロム c の 1 分子計測チップは、ナノ流体チップに配置された百本のナノチャンネル内に分子捕獲用金ナノアレイを有する構造となる。1 本のナノチャンネルは、細胞の体積 (数ピコリットル pL、 $pL = 10^{-12} L$) より 2 桁小さい数十フェムトリットル ($fL = 10^{-15} L$) 容積をもつため、細胞内容物を 1 分子レベルで解析するには最も適している。さらに、百本程度のナノチャンネルを配列することにより、1 細胞体積とほぼ同じ容積を有する細胞内環境のような狭い分子が込み合った空間を再現することができる。

本研究では、ポアソン分布理論に基づき免疫検出法を利用して、1 分子計測チップ内の金ナノアレイに形成した自己組織単分子膜 (SAM) において、標的分子のシトクロム c を 1 分子単位で捕獲する。1 分子計測チップ内でシトクロム c 用捕捉抗体を固定する為に、チオール基末端とカルボキシル基末端を合わせ持つ有機化合物を用いて SAM を形成させた。つまり、金表面とチオール基を化学結合させ、もう一方の末端であるカルボキシル基と抗体のアミノ基が結合することによって抗体を固定した。次に、SAM 表面に固定化した捕捉用抗体で、本研究の原理によって、シトクロム c を 1 分子単位で捕捉し、さらにビオチン修飾検出用抗体を結合させた。その後ビオチンとストレプトアビジンとの特異的な結合を利用して、ストレプトアビジン修飾量子ドット (QD) を検出用抗体と結合させ、蛍光イメージングでシトクロム c 由来の QD のドット状シグナルを観察できた。よって 1 分子計測チップを用いたシトクロム c の 1 分子検出に成功した。

このシトクロム c の 1 分子検出法をさらに 1 細胞内容物の網羅的な分析へ応用するには、1 細胞内容物 (pL レベル) の体積よりもっと小さいフェムトリットルの流体を自在にハンドリングできる技術が必要である。しかしながら、ナノ流体チップを用いてピコリットル以下の流体を自在に制御するためには、ナノチャンネル内に流体制御素子 (即ちバルブ・弁) の構築を必要とするが、ナノチャンネルが極めて小さくて閉じられた空間であるため、このような技術は確立されていなかった。以上の背景から、ナノチャンネルに開閉自由な超微小バルブ (弁) の構築が求められていた。我々は、精密な分子構造を有するソフトマテリアルと独自に開発した超高精度ナノ集積化技術を使って、ナノチャンネルに、外部温度の制御だけで開閉自由な超微小スマートバルブ (弁) を作製することに成功した。この超微小スマートバルブを利用することで、フェムトリットル ($fL = 10^{-15} L$) レベルの水を自在に制御することを世界で初めて実現した。この研究成果は、シトクロム c の 1 分子計測チップを用いた 1 細胞内容物の網羅的な分析に利用できるだけでなく、化学、バイオなどのプロセスに画期的な革新をもたらすと予想される。

Measurement of single cell apoptosis at the single-molecular level by using nanofluidic channels

Yan Xu

*Nanoscience and Nanotechnology Research Center, Research Organization for the 21st Century,
Osaka Prefecture University, Japan*

To precisely clarify the induction mechanism of apoptosis and its relations to diseases, it is necessary to quantitatively understand apoptosis of single cells at the single molecular level. The purpose of this study is to develop a method to measure cytochrome c in single cell at the single molecular level by using nanofluidic channels. Cytochrome c is one of the most important proteins involved in the initial stage of apoptosis. Quantification of cytochrome c in apoptosis of single cells at single molecular level enables to approach the origin of cell death and enable quantitative understanding of the biochemical reaction at the early stage of cell death.

Last year, we achieved the fabrication of the nanofluidic chip for measurement of cytochrome c at the single molecular level last year. In the nanofluidic chip, two side microfluidic channels are bridged by 100 parallel arrayed nanofluidic channels, with gold nanoarray in each nanofluidic channel. The structure provides 16000 nanodot-shaped gold array in the arrayed nanofluidic channels in the chip. Each nanofluidic channel has an ultra-small volume of approximately 96 fL ($\text{fL} = 10^{-15} \text{ L}$). Thus, the arrayed nanofluidic channels are appropriate to handle 9.6 pL ($\text{pL} = 10^{-12} \text{ L}$) liquid, which is approximately as same as the volume of a single mammalian cell.

This year, we succeeded in the detection of single cytochrome c molecules by using the nanofluidic chip. A quantum dot-based immunoassay detection scheme was used in the detection. According to Poisson distribution, single cytochrome c molecules were captured on gold nanoarray surfaces immobilized with cytochrome c capture antibodies, in the nanofluidic chip. After the formation of the immunocomplexes of captured cytochrome c molecules/biotin-conjugated cytochrome c detection antibodies/quantum-dot conjugated streptavidin, the detection of dot-shaped signals of single quantum-dots representing captured single cytochrome c molecules was achieved by using a fluorescence microscope with an EM-CCD camera.

In addition, to handle lysate of a single cell during the further detection of cytochrome c in single cells, we made a breakthrough in the active regulation of femtoliter ($\text{fL} = 10^{-15} \text{ L}$) -scale fluids. Accurate, local assembly of nanobrushes of a well-tailored short-chain thermoresponsive polymer in nanofluidic channels is achieved, using a site-specific nano-in-nano patterning technique developed by us in combination with nanofluidics. The assembled polymer nanobrushes enable the active regulation of femtoliter-scale fluids inside nanofluidic channels, in response to an external temperature change.

高分子超薄膜を用いた未活性浮遊細胞固定技術 “ナノラッピング”の確立と機能解明

研究代表者：東海大学工学部応用化学科 岡村 陽介

1. 研究の概要

生体組織や浮遊細胞のイメージングは、ガラス基板に乗せて緩衝液を滴下した状態で観察するのが常套手段である。しかし、緩衝液の蒸発に伴う生体組織や浮遊細胞の乾燥やステージを移動する際のぶれがしばしば課題となり、これらを解決するイメージング技術のソフト開発が急がれている。本研究では、生体組織や浮遊細胞を超薄膜で固定する技術「ナノラッピング」を提案し、新しいイメージングツールとしての応用を目指す。実際、生体組織用の撥水性超薄膜を用いて生体組織をラッピングする手法を確立し、超薄膜が有する撥水性と高い接着性を利用することで生体組織の保水・保定を実現できた。また、生分解性超薄膜を用いて浮遊細胞ラッピングにも成功した。

2. 研究の背景と目的

高分子を膜厚 100 nm 以下の超薄膜に加工すると、ナノ厚特有の柔軟性と高い接着性が発現する^[1]。このため、反応性官能基や接着剤を使用せず物理吸着のみで種々の界面(生体組織等)に貼付できるユニークな性質がうまれる。他方、生体組織をイメージングする際、ガラス基板に緩衝液を滴下した状態で観察するのが常套手段であるが、緩衝液の蒸発に伴う組織の乾燥やステージを移動するときのぶれが課題となる。血球を代表とする浮遊細胞では、ブラウン運動して焦点が定まらない他、ガラス基板上では活性化するため未活性状態からのイメージングは難しい。

本研究では、生体組織や浮遊細胞を超薄膜で固定する技術「ナノラッピング」を提案し、新しいイメージングツールとしての応用を図る(Fig. 1)。

前者では、撥水性超薄膜を創製して生体組織をラッピングし、生体組織の保水・保定を実現する。後者では、液性刺激因子が自由に透過できるように貫通孔を設けた超薄膜で浮遊細胞を基板にラッピングして固定する手法を検討する。

[1] Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* **21**, 4388 (2009).

3. 成果

3.1. 生体組織用ナノラッピング

(a) 生体組織用ナノラッピング



(b) 浮遊細胞用ナノラッピング

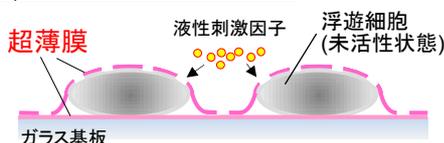


Fig. 1 本研究構想 (生体組織や浮遊細胞を「ナノラッピング」するためのイメージングツールとして応用)

SiO₂ 基板の上にポリビニルアルコール(PVA)水溶液、含フッ素高分子溶液(CYTOP, 旭硝子社製)の順にスピコートした(Fig. 2)。基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲層が瞬時に溶解し、基板の形状を維持した状態で超薄膜を回収できた(Fig. 3a)。得られた撥水性超薄膜の水接触角は $111 \pm 1^\circ$ と計測され、その表面は確かに撥水性であった(Fig. 3b)。また、超薄膜の膜厚はスピコート時の CYTOP 溶液の濃度に比例し、膜厚は任意に制御(ca. 20-800 nm)できることを確認した。

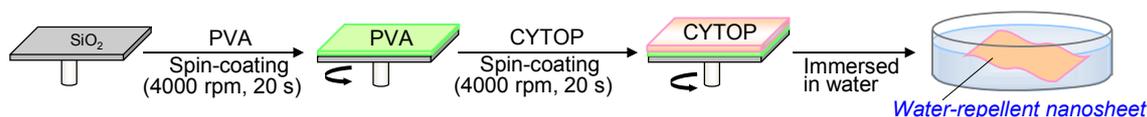


Fig. 2 撥水性超薄膜の調製法

アルギン酸ゲルを恒温恒湿下で静置したところ、約 10 時間後には完全に乾燥した。そこで、撥水性超薄膜でゲルをラッピングしたところ、膜厚の上昇と共にゲルの乾燥を抑制でき、保水効果が見られた。生体組織(脾臓等)でも同様に保水効果が観察された。これは、超薄膜の撥水性を保水能に転換した結果であり、撥水性超薄膜のユニークな特徴を見出した。

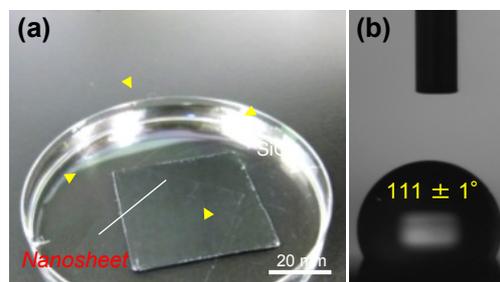


Fig. 3 (a) 水面に浮遊する撥水性超薄膜。(b) 撥水性超薄膜の水接触角。

蛍光標識ラテックスビーズ($1 \mu\text{m}\phi$)を内包したアルギン酸ゲルをガラス基板に乗せ、リン酸緩衝液を滴下し、蛍光顕微鏡にて観察したところ、ビーズは同一方向に移動し、ゲルが移動することを確認した。そこで撥水性超薄膜(膜厚: 133 nm)でゲルをラッピングしたところ、ビーズの移動は見られなかった。膜厚 250 nm 以上ではわずかに移動した。これは超薄膜の接着性に起因するものと考えられる。従って、撥水性超薄膜は保水・保定を実現する生体組織用イメージングツールへの応用の可能性を見出した。

3.2. 浮遊細胞用ナノラッピング

SiO₂ 基板の上に PVA 水溶液、ポリ乳酸溶液(10 mg/mL)の順にスピコートした。基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲層が溶解してポリ乳酸超薄膜が回収できた。この時、膜厚は約 60 nm であった。次いで、ポリ乳酸超薄膜を用いて血球系浮遊細胞のラッピングを試みた。ガラス基板に浮遊細胞の分散液を 10 - 50 μL 滴下し顕微鏡にてライブイメージングしたところ、ブラウン運動によって焦点が定まらないことを確認した。そこで、ガラス基板に滴下した浮遊細胞を金属棒にすくい取った超薄膜を用いてラッピングしたところ、ぶれずにイメージングできることを実証した。現在、液性刺激因子の透過を可能とするために、浮遊細胞は通過しない程度の貫通孔を有する超薄膜を調製し、刺激反応をライブイメージングしている。

Fabrication of Ultra-thin Films for Bio-imaging Tools of Floating Cells

Yosuke Okamura*

* *Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University, Japan*

We have developed free-standing ultra-thin films (so-called nanosheets) composed of biodegradable and biocompatible polymers for biomedical applications [1]. Such nanosheets have a thickness of less than 100 nm and exhibit unique characterizations such as high adhesiveness, flexibility and a high degree of transparency [1]. On the other hand, tissues and floating cells during imaging are often put on a glass substrate, to which physiological buffer is added to avoid drying. However, tissues and floating cells are dried during observation and it is difficult to be come into focus due to moving them into buffer. In this study, we develop the nanosheets for bio-imaging tools of tissues and floating cells to provide water retentivity and fixation on the substrate.

For tissue imaging, we fabricated a water-repellent nanosheet composed of fluorine-containing polymer (CYTOP, Asahi Glass Co., Ltd.). An aqueous solution of 10 mg/mL poly(vinyl alcohol) (PVA) as a water-soluble sacrificial layer was spin-coated for 20 s at 4,000 rpm onto a silicon wafer (SiO₂ substrate, typical size: 40 × 40 mm). The PVA-coated substrate was then spin-coated with CYTOP solution using the same procedure. When the substrate was immersed into water, the water-repellent nanosheet was detached from the substrate by dissolving only the PVA layer into water. The thickness was proportional to the concentration of CYTOP from ca. 20 nm to ca. 800 nm, which exhibited the water-repellent property (water-contact angle: 111 ± 1°). When alginate hydrogels as a model were incubated on the glass substrate for 24 h (25°C, RH: 50%), they were dried within 10 hours. However, the hydrogels wrapped with the water-repellent nanosheets were significantly prevented the evaporation of the water. Moreover, we demonstrated that the nanosheets were also prevented the drying of the mouse organs and firmly fixed on the substrate due to the high adhesiveness of the nanosheets. The water-repellent nanosheets therefore would be a helpful tissue-imaging tool to provide water retentivity and fixation.

For imaging of floating cells, we tested whether nanosheet wrapping works or not. To this end, biocompatible nanosheets composed of poly(lactic acid) (thickness: ca. 60 nm) were fabricated using the same procedures as shown above. When the floating cells were observed on the glass substrate, they were moved and blurred by the Brownian motion. However, the cells wrapped with the nanosheets were immobilized between the substrate. We will try to wrapping of cells by using porous nanosheets to be stimulated them.

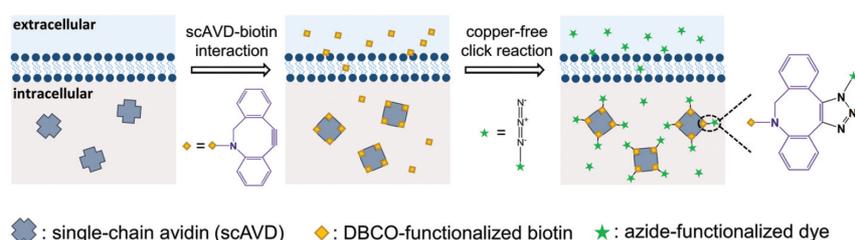
[1] Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* **21**, 4388 (2009).

高精度の位置決めと環境測定を細胞内において一粒で可能にする 粒状蛍光プローブ

研究代表者：早稲田大学重点領域研究機構 鈴木 団

1. 研究の概要

時々刻々とめまぐるしく変化する細胞内環境を、位置を特定しながら正しく測ることは、細胞内で起こる生命反応の正確な理解につながる技術となる。本年度に我々は、提案していたボトムアップ型ナノセンサーの開発に成功した（図、論文1）。特に「環境」パラメータとして「温度」を扱う研究では、動物個体での温度イメージングを指向した蛍光ナノ粒子型の温度センサーの開発（論文2）も行い、また一細胞温度計測において、計算と実験との間にある5桁のギャップを説明した（論文3）。開発した細胞内温度センサーを用いてナノ粒子が神経細胞内に生じる温度分布を計測する実験が発展的に展開し、ピエゾ特性を持つナノ粒子と超音波を組合わせて神経細胞を非接触に刺激する手法を提案することができた（論文4）。局所温度勾配が細胞に与える影響をさらに調べたところ、球状の細胞（論文5）および神経細胞（論文6）の新しい応答を見いだした。



2. 研究の背景と目的

細胞内では多数の異なる物質、構造体がひしめき合い、薄い溶液系とはまるで異なる特殊な細胞内環境を作り出している。さらに細胞内・間の情報伝達や細胞運動といった活動により、このような細胞内環境は空間的にも時間的にもめまぐるしく変動する。細胞生物学はもちろん、細胞を治療や診断の対象にしようとする革新的な医療技術や新しい産業技術においては、このように変化する細胞内環境を計測すること、細胞内分子や器官の働きを連続して捉えること、の2つが同時に求められる。

本研究では、細胞内環境に感受性を持ち、環境を記述するのに十分な空間分解能とリアルタイムで計測が可能な時間分解能とを併せ持つ新しいプローブ、またこれらプローブに適した計測技術をセットで開発することを目指す。この新しい方法を用いれば、細胞内の局所で、カルシウム濃度を初めとした細胞内環境の変化と分子や器官の位置の変化とを、これまでにない精度で測ることが可能となる。

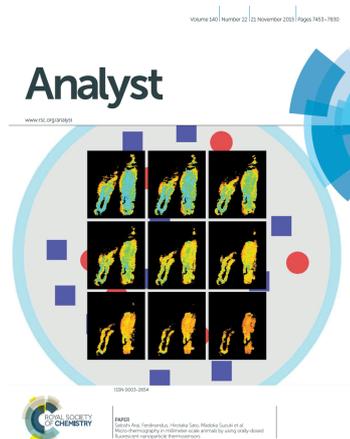
3. 成果

特定の場所で一粒子イメージングできる高輝度ナノセンサーを細胞内で作る方法

タンパク質一分子の計測から細胞の活動を定量化することを目指し、細胞内クリック反応を経て四個の蛍光色素が単一鎖アビジンに結合したナノセンサーを作成する、ボトムアップな方法を提案した(論文1)。一つの蛍光ナノセンサーの時空間分解能は、使用した光学顕微鏡の条件下では約 1Hz のときおよそ 10 nm だった。細胞内の任意の部位の局所的な環境を、標的一分子のレベルで計測する基盤技術を提供すると期待される。

蛍光ナノ粒子型温度計の経口投与による微小動物のマイクロサーモグラフィ

動物個体における一細胞温度計測を目指して、蛍光ナノ粒子型の温度計をショウジョウバエの幼虫へ経口投与し、モデル生物に限らず微小な個体で体内温度をマッピングする手法を提案した(図、論文2、Inside front cover として採用)。



一細胞温度計測における計算と実験との間の矛盾と、その解決案

単一細胞からの熱産生について、計算値と計測値との間にある 5 桁のギャップは、計算の前提条件に見直しが必要であること、またそれにより解決できる可能性を説明した(論文3)。

ピエゾナノ粒子を利用した神経細胞の非接触刺激

ピエゾ特性を持つナノ粒子を超音波刺激することで、神経様細胞の電位依存性チャネルタンパク質を直接活性化し、 Ca^{2+} および Na^{2+} 流入が引き起こせることを示した(論文4)。

局所熱励起へ即座に応答して細胞の形が変わる

局所温度勾配下で、球状の細胞が熱源に向かって bleb を伸展させること(論文5)、およびラット神経海馬細胞では神経突起が熱源へ向けて高速で伸長することを見だし(論文6)、いずれもその分子基盤として、アクチン系が応答の主要な役割を果たすことを明らかにした。大山廣太郎博士(A01 班、早稲田大)との共同研究。

Single fluorescent nanoparticles measuring the location and the environment in living cells

Madoka Suzuki

Organization for University Research Initiatives, Waseda University, Japan

Cellular functions are affected by externally applied stimuli such as electrical, chemical, or physical factors. In this project, we aim to develop probes and microscopy methods that can measure the intracellular environment.

In this fiscal year 2015, we successfully developed the method to fabricate targeted nanosensors for single-molecule imaging by a bottom-up approach [1]. Here the intracellular probes were created by conjugating four organic dyes with single-chain avidin proteins *via* a click reaction. The position of single probes could be determined with the accuracy of about 10 nm at 1 Hz. We demonstrated that the nanoprobe showed increased brightness and photostability, both of which contributed the successful single molecule imaging under conventional fluorescence microscope. By targeting ER with Cy5-probe, we tracked the remodeling processes of ER at nm spatial resolution. ER-targeted TAMRA-probes enabled the imaging of the temperature distribution on ER under externally applied local heating. The development of thermosensors was further extended to the achievement of a novel microthermography method inside small living organisms [2, inside front cover]. Regarding the temperature measurement, we proposed the way to bridge the 10^5 gap between calculation and measurement in single-cell thermometry [3]. The project has been extended to the development of piezoelectric nanoparticle-assisted wireless stimulation of neuronal cells when we tested our nanothermometers to map the intracellular temperature distribution under external heating [4]. We further investigated other cellular responses to local heating. In spherical cells, the plasma membrane extended towards the heat source upon heating [5]. The high-speed neurite elongation towards the heat source was found in neurites of rat hippocampal neuronal cells [6]. We revealed that the actomyosin interaction played major roles in both of these responses.

イオン応答性電界効果トランジスタによるナノ細胞毒性と ナノメディシンの評価

研究代表者：東京医科歯科大学生体材料工学研究所 合田 達郎

1. 研究の概要

免疫応答やアポトーシスに代表されるシステム化された生体反応はイオン・温度・pH 変化といった物理化学的微小環境変化や細胞膜自身の形質変化が引き金になっている。そこで、生体内での局所的な変化を引き金とする分子活性化機構の物理化学パラメータを明らかにする。また、遺伝子送達キャリアなどのナノ材料の細胞膜通過機構や治療効果・細胞膜障害性を定量的に解析する。先進治療にむけた細胞膜微小環境での生体分子動態の理解と、ナノ医療に伴う細胞毒性・治療効果の分子科学を構築し、将来的な医療イノベーションに向けた礎を構築する。

2. 研究の背景と目的

細胞の皮膚と例えられる細胞膜は、厚さ 6-10nm の脂質二重膜からなる自己組織化分子膜であり、酸素や水分子などは透過するが、電解質や高分子は透過できない半透膜としての性質を有する。細胞膜の破壊は、細胞内外でのイオン分配の解消や、それともなう膜電位の脱分極、ATP などエネルギー分子の細胞外漏出を引き起こし、細胞の持つ生命エネルギーを失わせる。一方で、近年の細胞工学では、遺伝子治療など細胞質に機能性分子を送達する需要が増しており、細胞膜透過ペプチドなどを始めとして、安全かつ高効率に細胞膜を透過するキャリア分子の開発が進められている。機能性キャリア分子の細胞膜透過機構を明らかにするためには高感度な細胞膜障害測定法の開発が必須の要件である。そこで、本研究ではイオン応答性電界効果トランジスタ (ISFET) 上に直接播種した細胞の脂質二重膜の状態をリアルタイム非侵襲に測定する方法を新たに開発した。本手法は、化合物の作用によって細胞膜上に形成された水素イオンなどの低分子量電解質が透過できる分子サイズの空孔を計測するという、これまでに無い新しい原理に基づく細胞膜障害性測定法である。

3. 成果

細胞膜障害性を有する化合物を細胞に作用させると、 NH_3 に加えて NH_4^+ と H^+ も透過するようになり、一時的な pH 変化は減少することが明らかとなった (図)。ピークの減少率をパラメータとして、カチオン性・アニオン性・非イオン性・両イオン性の 12 種類の化合物を作用させた際の膜障害性を計測した。従来法である赤血球溶血試験結果との比較を行ったところ、高い相関係数 ($r=0.88$) が得られ、ISFET - 細胞によ

るリアルタイム・非標識な膜障害性の定量化が可能であることが明らかとなった。さらに、本システムでは NH_4^+ と H^+ などサイズの小さい (流体力学半径 $< 0.33 \text{ nm}$) イオンの細胞膜透過を指標にしていることから、溶血試験におけるヘモグロビン (流体力学半径 $> 3.1 \text{ nm}$) の透過が観察できないような微小な空孔形成をも検出することが可能であった。

細胞膜に障害性が発現する時間は細胞毒性の作用機序によって変化することから、膜障害性が発現するまで時間を測定することにより細胞毒性機構を区別できる。実際、遺伝毒性を有する Tween®20 を細胞に作用させたところ、1 時間後から徐々に細胞膜障害が発現することを見出した。一方、遺伝毒性を持たない類似体 Tween®80 では、2 時間後も膜障害性が見られなかった。これらのシグナルはアポトーシス指標である Caspase-3 の発現量と一致した。これらの結果は、従来法のエンドポイントアッセイにはできなかった細胞毒性パスイの識別を行えることを示唆している。

細胞膜透過性ペプチド (TAT、R8) や細胞膜透過性リン脂質ポリマー (PMB30W) を作用させると、細胞膜は一時的にイオン透過性が亢進したことから、キャリア分子が細胞膜を透過する際に一時的に空孔が形成されていることが明らかとなった。こうしたわずかな細胞膜の乱れは従来の細胞膜障害性測定法では検出できない微小なものであり、水素イオンを指標とした ISFET 測定法によって初めて検出可能となった。

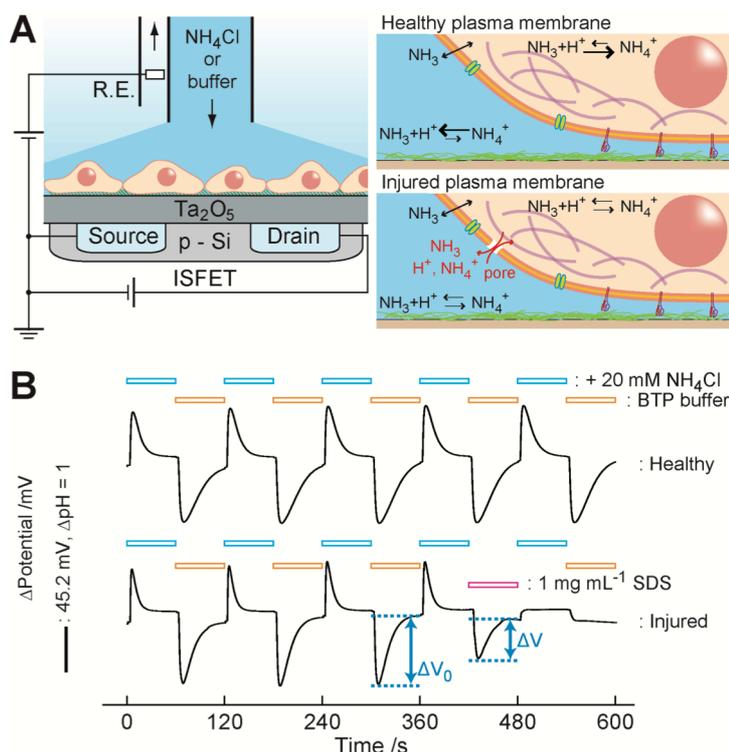


図. 細胞/ISFET 測定系。(A) ゲート絶縁膜上に培養した細胞近傍の緩衝液を、 NH_4Cl を含む緩衝液に瞬時に交換すると、 NH_3 の細胞膜受動拡散とアンモニア平衡反応により、過渡的に細胞外 pH が変動する。界面活性剤により細胞膜に空孔が形成されると、 NH_4^+ と H^+ も同時に細胞膜を拡散するため、過渡的な細胞外 pH 変動が減衰する。(B) NH_4Cl 含有・非含有溶液の交換ともなう細胞/ゲート絶縁膜界面の経時的 pH 変動。細胞に界面活性剤 SDS を作用させると、溶液交換時の過渡

Evaluation of nanoscaled cytotoxicity on plasma membranes using ion-sensitive field-effect transistors

Tatsuro Goda

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Japan

The plasma membranes (PMs) are extremely thin (6–10 nm), stable, and semi-permeable film that protect the cytosolic element from the extracellular space by blocking free diffusion of ions, charged molecules, and macromolecules. External stimuli/reagents occasionally disrupt the PM barrier by making transmembrane pores, leading to acute cytotoxicity as a result of uncontrolled diffusion of mobile ions, charged species, and biomolecules through the pores. Therefore, the PM toxicity and hemolysis are widely and routinely evaluated in biological and biomedical fields. Traditional assays measure the release of biomarker proteins or fluorescence from the cytosol through the pores across the PM in colorimetric manners. Despite the recent development of a variety of methods/materials for efficient gene/drug delivery systems to the cytosol, the hemolysis, membrane-toxicity, and cytotoxicity assays remain unchanged over 30 years, while leaving major issues for nanotoxicology testing; 1. The biomarker of interest cannot detect the pores whose size is smaller than itself, which makes it difficult to evaluate the true safety of recent nanoscale materials. 2. The fluorescent/biomolecular indicators often result in false-positive by passively permeating the plasma membrane due to the altered hydrophobic/hydrophilic balance of the PM as a result of the interaction with exogenous agents.

We discovered the generation of transient proton when we added a weak acid or base to the solution surrounding cells cultured on a solid surface in a stepped manner. The stepped addition of NH_4Cl or CH_3COONa induced pH transients in the local cell microenvironment as a result of free diffusion of neutral NH_3 or CH_3COOH across the PM and the proton sponge effect of the weak acid/base. Further, this phenomenon was applied to the development of a distinctly new system for detecting minute disorders of PMs in live mammalian cells. The system measures transient proton generated by free diffusion of low-molecular-weight electrolytes (H^+ and NH_4^+) through the pores in real time. These ions are ultimately small (hydrodynamic radii of ≤ 0.33 nm) so that they are sensitive even to the formation of molecularly sized pores which was otherwise not possible using conventional hemolysis because of the relatively large in size of hemoglobin (hydrodynamic radius > 3.1 nm) as an indicator. The relatively fast mass transport of these molecules effectively ruled out the activity of inherently expressed ion pumps on the plasma membrane. Silicon-based pH-sensitive transistors were used for signal transduction of protons at the cell/gate insulator interspace so that the complementary metal oxide semiconductor (CMOS)-compatible fabrication technique is straightforward to downsizing, mass production, and multi-parallelization in the application of screening toxicants.

細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発

研究代表者：名古屋大学大学院工学研究科 檜田 啓

1. 研究の概要

RNA が持つ生体機能が次々に明らかになりつつあることから、近年生細胞における RNA の動態解析が注目されている。我々はこれまでに RNA を高感度に検出可能なインステムモレキュラービーコン (ISMB) の開発に成功している。本研究では高感度かつ酵素耐性を持つ ISMB を開発し、これを用いた細胞内における RNA の蛍光イメージングを目指している。前年度は Cy3 を複数分子導入したインステムモレキュラービーコン (ISMB) を用いた細胞内イメージングについて検討を行った。今年度はステム構造を必要としない新たな Cy3 導入プローブについて開発を行った。

2. 研究の背景と目的

細胞内における様々な RNA の動態 (局在性・発現量) は細胞分裂や分化の過程において重要な役割を担っていることが近年明らかになりつつある。そのため、細胞内において RNA を可視化するプローブが求められている。このようなプローブにモレキュラービーコン (MB) があるが、従来の MB は末端に色素が結合されていたために、バックグラウンド発光による偽陽性が大きな問題となっていた。それに対し、我々はステム内部に色素を導入したインステムモレキュラービーコン (ISMB) を開発した。このプローブは従来型 MB と比べてバックグラウンド発光が小さいという利点がある。そこで、本研究ではこれらのプローブを更に改良することによって超高感度な核酸検出プローブを開発し、実際に細胞内イメージングへ展開

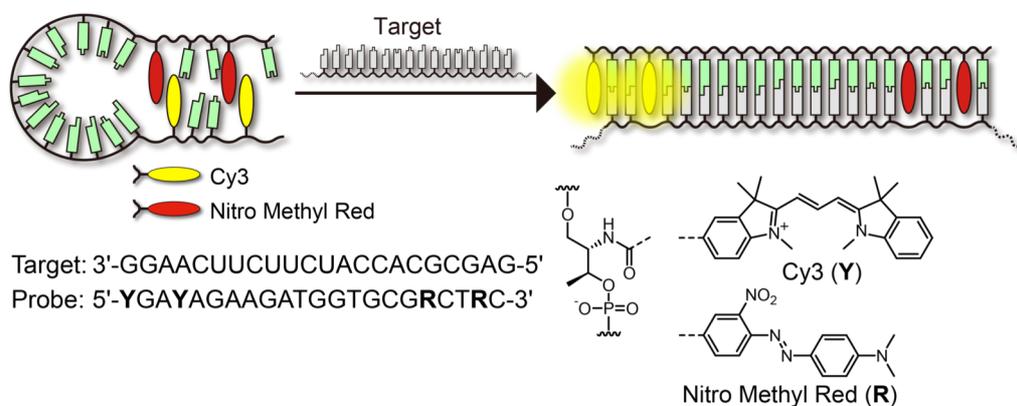


図1. Cy3 導入リニアプローブの模式図

することを目指す。昨年度は Cy3 を複数導入した ISMB を開発し、高感度に RNA を検出可

能であることを明らかにした。本年度は Cy3 と消光剤との自発的な会合を利用することによってステム構造不要なリニアプローブの開発を行った。

3. 成果

これまでに Cy3 複数導入 ISMB の開発に成功しているが、ターゲット結合時にステム構造の解離を必要とするため応答速度の低下を招く恐れがあった。そこで本研究ではステム構造をもたないリニアプローブの開発を行った。図1に設計を示す。DNA 鎖中に Cy3 を2分子導入し、消光剤として Nitro Methyl Red を2分子導入した。これまでの結果から Cy3 の発光を Nitro methyl Red が効率的に消光することが分かっている。またこれらの色素は安定な会合体を形成するために、自己相補的配列を導入しなくても発光が消光すると考えられる(図1左)。それに対して相補的な RNA 存在下では色素間相互作用が抑制されることによって発光が観察されることを期待した(図1右)。

実際に蛍光スペクトルを測定した結果を図2に示す。ターゲット非存在下では Cy3 の発光はほとんど観察されなかった。紫外可視吸収スペクトル測定の結果、Cy3 と Nitro Methyl Red が会合体を形成していることが明らかとなった。それに対し、相補的な標的 RNA を添加したところ非常に強い Cy3 による発光が観察された。このことは RNA と二重鎖を形成することによって色素間の相互作用が抑制されたことを示している。その結果、シグナルバックグラウンド (S/B) 比は 180 と非常に高感度であることが分かった。ターゲットに対する応答速度を従来の MB と比較したところ、合成したリニアプローブの方が10倍程度レスポンスが早いことが分かった。以上のように Cy3 と消光剤の安定な会合体形成を利用することによってステム構造不要なリニアプローブを開発することに成功した。

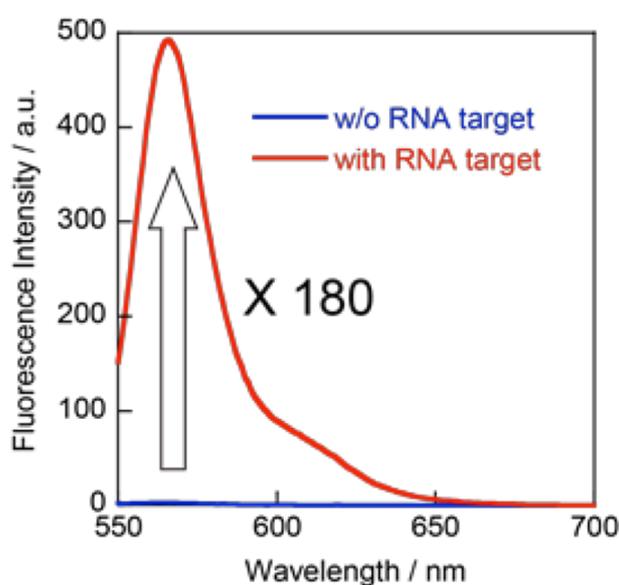


図2. Cy3 導入リニアプローブによる標的 RNA 検出結果

領域内共同研究として徳島大学の小暮健太郎先生と ISMB を用いた細胞内物質輸送評価について検討を進めており共著の論文が採択された。また、その他にもいくつかの領域内共同研究を進めている。

Development of a highly-sensitive nucleic acid probe for *in vivo* imaging

Hiromu Kashida

Graduate School of Engineering, Nagoya University, Japan

Spatiotemporal control of RNA expression has been attracted much attention due to its relevance to various kinds of cell function. To visualize RNA in cell, monitoring tools with high sensitivity are strongly required. Previously, we have developed In-Stem Molecular Beacons (ISMB) by incorporating fluorophores (perylene) and quenchers (anthraquinone) into stem portion of molecular beacon. ISMB could detect target RNA with higher sensitivity than conventional molecular beacons, which tether fluorophores and quenchers at their termini. In addition, incorporation of multiple fluorophores into ISMB drastically enhanced the sensitivity. In this project, we aim to develop highly sensitive MB for *in vivo* RNA imaging. Last year, we synthesized a novel Cy3 derivative and incorporated it into ISMB. As a result, ISMB tethering two Cy3 fluorophores showed higher detection sensitivity than ISMB with one Cy3 moiety. We also applied this ISMB to visualize GFP mRNA, which was transcribed from plasmids, in fixed HeLa cells. This year, we synthesized a linear probe without a stem-loop structure, which detected a target RNA with high sensitivity.

We selected Nitro Methyl Red as a quencher since it quenches Cy3 emission efficiently. In addition, incorporation of a pair between Cy3 and Nitro Methyl Red into a DNA duplex strongly stabilized the duplex. Therefore, we synthesized a probe DNA tethering two Cy3 residues and two Nitro Methyl Red residues. In the absence of the target, almost no emission of Cy3 was observed although the probe has no self-complementary sequence. UV-VIS spectrum indicated that Cy3 and Nitro Methyl Red formed a cluster. In contrast, Cy3 emission recovered upon the addition of target RNA because the interaction between dyes was suppressed. As a result, signal to background ratio (S/B ratio) of this probe was as high as 180. Interestingly, a probe tethering Cy3 and anthraquinone did not show such a high S/B ratio, indicating that a complex between these dyes are not sufficiently stable. Emission from this probe immediately increased upon the addition of the target RNA, indicating response speed of this probe was higher than conventional molecular beacons. From these results, a linear probe for efficient detection of RNA was successfully developed by using the spontaneous clustering between Cy3 and Nitro Methyl Red.

自己集合型ナノキャリアの創製

研究代表者：京都大学エネルギー理工学研究所 中田 栄司

1. 研究の概要

我々が見出した蛍光色素誘導体が水溶液中で自己集合したナノプローブは、血清含有培地および細胞内などの環境でも安定な自己集合体を形成している一方、酵素応答部位を適切な箇所を導入することで、細胞内のエステル加水分解酵素やニトロ還元酵素などの酵素反応を経て分散することが明らかとなっている。本研究では、このナノプローブ内に薬剤を内包した酵素応答性蛍光ナノキャリアを構築し、その細胞内動態と薬物放出性を評価することを目的とする。

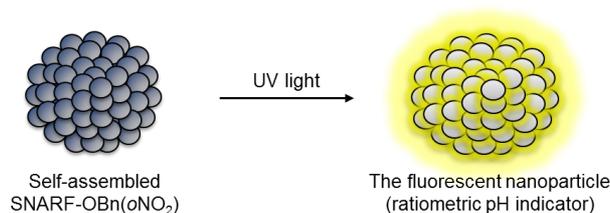
2. 研究の背景と目的

ドラッグデリバリーシステム(DDS)において、外部刺激応答性担体の開発は、薬剤送達の時空間的な制御をおこなう目的で非常に有用である。中でも酵素反応をトリガーとしたナノキャリアからの薬剤放出制御は、疾患特異的な酵素を標的とすることで、患部選択的な薬物送達を可能とするため有用である。これまで申請者らは、水溶液中で自己集合化した蛍光色素誘導体が、酵素との反応をトリガーとして分散し、蛍光強度や色調の変化を示すナノプローブの開発に成功している。^[1,3] このナノプローブは、ある種の蛍光色素(例えばSNARF)に対して疎水的な置換基を導入した誘導体が、水溶液中で100 nm程度の自己集合体を形成することに起因する。この自己集合体は、蛍光色素を骨格として有していながらも無蛍光で、細胞内や血液中などの集合体が不安定化する環境下においても極めて安定に存在している。その一方で、酵素反応に反応する脱離基を導入することで、酵素との反応後速やかに分散し、蛍光性を回復するユニークなナノプローブである(約100倍の蛍光変化)。既にこの自己集合型ナノプローブで、エステル加水分解酵素やニトロ還元酵素・グリコシド結合切断酵素などの細胞内酵素をリアルタイムに検出することに成功している。また、特筆すべき点として、本ナノプローブは超分子的自己集合体であることから、複数の要素を混ぜ合わせたマルチな応答性のナノプローブや他の有機化合物を内包したナノプローブの創製が出来ると期待される。そこで、本研究では、当該ナノプローブを利用して、自己集合型ナノキャリアを創製し、細胞内酵素や特定の波長の光照射で内包した薬剤を放出する過程を、ナノキャリアの動態及び分散過程と同時に可視化して評価することを目的としている。

3. 成果

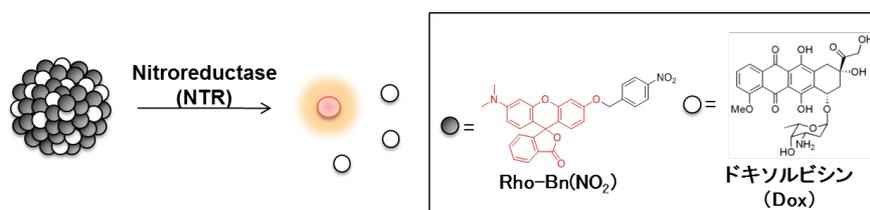
(その1) 光刺激で活性化されるpH応答性蛍光ナノプローブの開発

以前の成果である構造活性相関を基として、集合状態を形成すると予測された光分解性保護基を導入した自己集合型ナノプローブの詳細を検討した。光分解性保護基は、特定の波長の光によって脱保護することができる。実際の自己集合型ナノプローブは、照射前には自己集合体を形成しており、無蛍光でありながら、照射をおこなうことで蛍光性を回復し、pHプローブとして利用できるものの、自己集合状態を維持していることが明らかとなった。この細胞内での利用を検討し、細胞内への導入のプロセスの検討や、細胞内においても pH 応答能を試験管内と同様に示すことが確認され、光刺激をトリガーとする pH 応答性蛍光ナノプローブとして利用できることが明らかとなった。



(その2) 光刺激で活性化される pH 応答性蛍光ナノプローブの開発

自己集合型ナノプローブのナノキャリアとしての利用に関して検討した。自己集合型ナノプローブとしては、これまでに応答性等を改良してきた Rho-Bn(NO₂)を採用し、様々な薬剤の内包能を検討した。評価した薬剤のうち、ドキソルビシン(Dox)は、ゲルろ過クロマトグラフィーで、Rho-Bn(NO₂)の自己集合体と同一フラクションにおいて、Dox 由来の蛍光が確認され、Rho-Bn(NO₂)の自己集合体内に Dox が内包されていることが示唆された。Rho-Bn(NO₂)には、ニトロリダクターゼ(NTR)応答性が付与されているため、NTR による Rho 由来蛍光の回復により自己集合体の分散過程が評価可能である。実際に NTR で処理したところ、顕著な Rho 由来蛍光の回復と、Dox 由来の蛍光の存在が確認され、Rho-Bn(NO₂) 自己集合体に内包された Dox が NTR の存在により、放出されたことが示唆された。



(その他) 東北大学 中林孝和教授、岡山大学 大槻高史教授、大阪府立大学 原田敦史准教授、京都大学 岩田 博夫と教授・有馬 祐介助教の領域内共同研究。

[1] a) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6952 (2009). b) E. Nakata, et al., *Chem. Comm.*, **46**, 3526 (2010). c) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 1663 (2011). [2] E. Nakata, et al., *Chem. Lett.*, **39**, 734 (2010). [3] E. Nakata, et al., *RSC Adv.*, **4**, 348 (2014). [4] E. Nakata, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 327 (2015).

Development of the self-assembled nano-carrier

Eiji Nakata

Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan

In the field of nanomedicine molecular science, the enzymatic activity is one of the useful parameter to understand the condition of living system. And also, it is very important as the trigger of medicinal and biological agents. Thus, the methodology to monitor enzymatic activities in living system are very important. Recently, we developed a novel strategy to control the fluorescent property of asymmetric xanthene scaffold, such as SNARF, that enables rational design of fluorescent probe to monitor the cellular enzymatic activity.^[1] The mechanism underlying the fluorescence off/on switching is based on the lactone formation under a hydrophobic condition. A certain kind of derivatives formed self-assembly in an aqueous condition and existed as the lactone form. We explored the structure-activity relationship of the derivatives and developed a rational design strategy for self-assembled fluorescent nano probes to monitor the enzymatic activity.^[2] We hypothesized that the fluorescent nano probes could be applied as the enzyme responsible nano-carrier.

To demonstrate the versatility of the self-assembled nanoprobe as the enzyme responsible nano-carrier, the intensity of doxorubicin (Dox), as an example of drug, in self-assembled nanoprobe were confirmed. The nitroreductase (NTR) responsible nanoprobe Rho-Bn(NO₂) was selected as the candidate of nano-carrier. After treatment of NTR, the Dox were released from nano-carrier with the increment of the fluorescence from disassembled fluorophore. The result indicated the self-assembled nano-probe could be applied as the NTR responsible nano-carrier.

As the another results, a self-assembled fluorescent cluster comprising a seminaphthorhodafluor (SNARF) derivative protected by a photoremovable *o*-nitrobenzyl group were designed and demonstrated as a dual-emissive ratiometric fluorescent pH probe in cell cultures. By using these results in combination, we would like to rationally design the enzyme responsible nano-carrier based on our self-assembled nano probes.

[1] a) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6952 (2009). b) E. Nakata, et al., *Chem. Comm.*, **46**, 3526 (2010). c) E. Nakata, et al., *Chem. Lett.*, **39**, 734 (2010). d) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 1663 (2011). e) E. Nakata, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 327 (2015). [2] E. Nakata, et al., *RSC Adv.*, **4**, 348 (2014).

画像解析による微弱電流依存性の細胞内輸送亢進機構解明と革新的指向性 DDS への展開

研究代表者：徳島大学大学院医歯薬学研究部 小暮健太郎

1. 研究の概要

我々はこれまでに、微弱電流によって siRNA 等を非侵襲的に皮内細胞質まで送達する技術を確立している。我々は、微弱電流によって細胞の取り込み機構や細胞内輸送等が亢進していると仮説を立て、その検証と薬物送達への展開を目指して取り組んでいる。これまでに、微弱電流によって細胞膜電位が変化し、外来物質がエンドサイトーシスで取り込まれること、さらにエンドソームから細胞質に外来物質が漏出することを見出している。2015 年度は、共同研究による機能性核酸の細胞質送達メカニズムを解析し、微弱電流処理直後から細胞質に外来核酸が素早く漏出することを見出した。さらに、病因遺伝子レジスチンの発現制御により脂肪細胞の脂肪蓄積抑制に成功した。

2. 研究の背景と目的

我々はこれまでに、イオントフォレシス（微弱電流による経皮薬物送達促進技術）により siRNA や CpG オリゴ核酸など親水性高分子を皮膚内（in vivo）に効率よく浸透させるとともに、高い RNAi 効果や抗腫瘍免疫反応を誘起することに成功している（Kigasawa et al., Int. J. Pharm (2010), Kigasawa et al., J. Control. Release (2011)）。このことは、微弱電流によって核酸が細胞質まで送達されたことを意味している。さらに、微弱電流処理による細胞内タンパク質のリン酸化を網羅的に解析したところ、細胞取込みや細胞内輸送に関与する多くのタンパク質のリン酸化が亢進していることが明らかになっている。この結果から、微弱電流によって種々のシグナル伝達系が活性化されることで、エンドサイトーシス関連タンパク質が活性化され、エンドサイトーシスが誘起されることで機能性核酸などが取り込まれるとともに、取り込まれた外来物質の細胞内輸送が亢進することが示唆された。これらのことから我々は、「微弱電流により細胞シグナル伝達が活性化し、外来物質の取り込みと微小管を介した膜小胞輸送速度が亢進し効率よく細胞質に送達される」という仮説を立てた。本公募研究では、細胞内輸送活性化を可視化し、原因となる分子反応パラメータを見出すことで革新的 DDS へ展開することを目指している。今年度は、微弱電流処理時において In-stem molecular beacon (ISMB) の細胞質送達の詳細な解析を行うとともに、新規機能性核酸 iRed の細胞質送達と病因遺伝子の発現制御を検討した。

3. 成果

微弱電流処理によるエンドサイトーシスを解析するため、蛍光標識 siRNA の細胞取り込みに対する各種エンドサイトーシス阻害剤の影響を検討した。その結果、低温処理(4℃)、およびマクロピノサイトーシス阻害剤やカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤によって強力に抑制されたことから、微弱電流による細胞取り込みは、マクロピノサイトーシスのようなエンドサイトーシス経路であることが確かめられた。さらに、電位依存性非特異的カチオンチャネルである TRP チャネルの阻害剤 SKF96356 によって細胞取り込みが有意に抑制された。これらのことから、微弱電流処理によってカチオンチャネルを介してカチオンが流入し、細胞内シグナル経路が活性化されることでエンドサイトーシスが誘起され、細胞外物質が取り込まれることが推察された。さらに、

取り込まれた物質の細胞内挙動を解析するため、名古屋大・樫田准教授の開発した ISMB を用いて検討を行った。ルシフェラーゼ安定発現細胞に対して、微弱電流処理時にルシフェラーゼに対する ISMB を共存させたところ、全細胞の細胞質に蛍光を認めたことから(図1)、微弱電流による細胞質送達は、均質に対象細胞の細胞質に外来物質を送達可能であることが明らかとなった。さらに、微弱電流処理時および直後からの蛍光発生を検討したところ、微弱電流処理直後から全細胞の細胞質

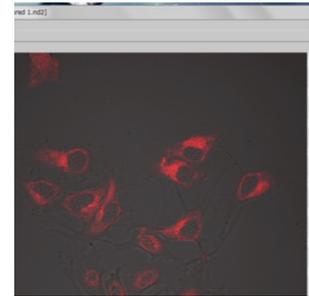


図1. 細胞質に送達された ISMB 蛍光観察像(処理後1時間) 白バーは 50 μm

で蛍光が観察された。このことから、微弱電流処理で生じるエンドソームは、極めてルーズな構造をしており、内容物が漏出しやすいことが推察された。これらのことから、微弱電流処理は、均質に素早く機能性核酸等を細胞質に送達できることが明らかとなった。そこで、疾患治療を指向した新規機能性核酸として徳島大・南川教授の開発した iRed と微弱電流を組合せることを検討した。iRed は、最小構成要素からなる shRNA 発現ベクターであり、4' チオ核酸を用いることで自然免疫誘起を回避できる特性を有している。そこで、ルシフェラーゼに対する iRed 存在下で細胞を微弱電流処理したところ、抑制活性は観察されなかった。リポフェクトアミン(LFN)を対照として蛍光標識 siRNA の細胞内取り込みを調べたところ、カチオン性 LFN/siRNA 複合体よりも、微弱電流処理による取り込みが数倍高い結果となり、細胞内には多くの核酸が取り込まれていることが明らかとなった。ISMB の分子量は 10,000 程度だが、iRed は 200,000 以上あることから、分子量がエンドソーム漏出に影響していると考え、異なる分子量の蛍光標識デキストラン(10,000 と 70,000)のエンドソーム漏出を検討した。その結果、微弱電流処理 24 時間後において、デキストラン 10,000 は細胞質漏出が確認されたが、デキストラン 70,000 はエンドソーム内にあり、微弱電流によるエンドソーム漏出は分子量で制限されることが示唆された。そこで、iRed とエンドソーム脱出促進試薬クロロキン共存下で微弱電流処理したところ、LFN/iRed 複合体よりも著しく高い遺伝子発現抑制活性が確認された。このシステムを用い病態関連遺伝子レジスチンに対する iRed とクロロキン共存下で脂肪細胞を微弱電流処理したところ、脂肪細胞分化に伴う脂肪蓄積が有意に抑制され、微弱電流と iRed を組み合わせることで病因遺伝子の発現制御が可能なが示唆された。

Clarification of mechanism of faint electricity-induced acceleration of intracellular transport, and expansion into innovative DDS

Kentaro Kogure

Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

Effective delivery of extraneous molecules into the cytoplasm of the target cells is important for several drug therapies. Previously, we showed effective *in vivo* transdermal delivery of naked siRNA into skin cells induced by faint electric treatment (fET) iontophoresis, and significant suppression of target mRNA levels (Kigasawa et al., *Int. J. Pharm.*, 2010). This result indicates that electricity promoted the delivery of siRNA into cytoplasm. In the present study, we analyzed the intracellular delivery of naked anti-luciferase siRNA by fET, and found that the luciferase activity of cells expressing luciferase was reduced by *in vitro* fET like *in vivo* iontophoresis. Cellular uptake of fluorescent-label siRNA was increased by fET, while low temperature exposure, inhibitors of macropinocytosis and caveolae-mediated endocytosis significantly prevented siRNA uptake. These results indicate that the cellular uptake mechanism involved endocytosis. In addition, the transient receptor potential channel inhibitor SKF96365 reduced siRNA uptake. Moreover, to analyze cytoplasmic delivery, we used in-stem molecular beacon (ISMB), which fluoresces upon binding to target mRNA in the cytoplasm. Surprisingly, cytoplasmic ISMB fluorescence appeared rapidly and homogeneously after fET, indicating that cytoplasmic delivery is markedly enhanced by fET.

Intelligent shRNA expression device (iRed) contains the minimum essential components needed for shRNA production in cells, and could be a novel tool to regulate target genes (Tarashima et al., *Mol. Ther. Nucl. Acid* 2015). However, general delivery carriers consisting of cationic polymers/lipids could impede function of a newly generated shRNA via electrostatic interaction in the cytoplasm. Thus, we examined fET of cells stably expressing luciferase in the presence of iRed encoding anti-luciferase shRNA. Transfection of lipofectamine 2000 (LFN)/iRed lipoplexes showed an RNAi effect, but fET-mediated iRed transfection did not, likely because of the endosomal localization of iRed after delivery. However, fET in the presence of lysosomotropic agent chloroquine significantly improved the RNAi effect of iRed/fET to levels that were higher those for the LFN/iRed lipoplexes. Furthermore, the amount of lipid droplets in adipocytes significantly decreased following fET with iRed against resistin in the presence of chloroquine. Thus, iRed could be a useful tool to regulate target genes following fET-mediated cytoplasmic delivery with endosomal escape devices.

糖鎖改変技術を利用したバイオ輸送システム

研究代表者：関西大学化学生命工学部 岩崎 泰彦

1. 研究の概要

細胞はその表面形態によって複雑な生体環境下の中での的確に分子や他の細胞を認識し、細胞種特有の機能を発揮する。そのため細胞を利用することにより、生体内での高選択的な物質輸送が可能になると考えられる。本研究では、細胞の最表面を形成する糖鎖を改変することにより、薬剤や他の機能分子を修飾することを試みた。糖鎖の生合成経路を経て糖鎖末端のシアル酸残基にメタクリロイル基を誘導した。この非天然糖鎖を利用して、合成高分子、タンパク質、核酸アプタマーなどを細胞の表面に修飾することに成功した。本技術は、細胞を担体とした薬物輸送や免疫系を亢進するための有効な手段として期待できる。

2. 研究の背景と目的

厚生労働省の統計にもあるように我が国の死因の一位は悪性新生物、すなわち癌であり、現在は3人に1人が癌で死亡し、その割合は年々増加している。そのため癌制圧に向けた新たな治療法の確立が望まれている。癌治療において最も基本的かつ効果的な処置法は外科的に癌組織を摘出する方法であり、癌のできた部位や進行度に応じて放射線療法や化学療法を併用しながら治療が進められる。手術手技の工夫や器具の創出、また新薬の開発によって高い治療効果が認められているが、手術にともなう侵襲や薬剤の副作用、また、局所的な外科的手術では体内に拡散した癌を壊滅できないことなど、克服すべき課題も残されている。このような背景から、近年、免疫細胞を用いた癌治療が注目を集めている。免疫細胞治療は自己の細胞を用いる全身療法であり、副作用を伴わず、採血と点滴による治療のため患者の負担を軽減できる。その一方で、生体内には免疫原性の低い癌細胞が存在することや癌細胞が免疫細胞の活性化を抑制することなど癌免疫が自己の体内で機能し難いことも明らかとなっている。そこで我々は、免疫細胞治療をより効果的にするために癌細胞と選択的に結合する分子を免疫細胞の表面に修飾することを検討し、高効率に癌細胞を捕捉することを試みた。

3. 成果

癌細胞の表面に過剰発現している protein tyrosine kinase 7 (PTK-7) に対して特異的に結合する核酸アプタマー(sgc8)を免疫細胞の表面に修飾した。N-アセチルマンノサン(ManNAc)の類縁体によるシアル酸の改変技術に倣い、メタクリロイル基をもつ ManNAc 誘導体、N-メタクリロイルマンノサミン(ManM, 図1)を合成した。所定濃度の ManM を含む培地でマウスマクロファージ(RAW264.7)を24時間培養し、RAW264.7細胞の表面にメタクリロイル基を誘導した。引き続き、末端をチオール化した

sgc8(sgc8-SH)と光ラジカル誘導剤(Eosin-Y)を添加し、可視光線を 10 分間照射した。細胞を血清培地で洗浄し、以降の実験に用いた。RAW264.7 の表面に修飾した sgc8 を Alexa Fluor 488 でラベル化された相補鎖を作用させることにより確認した。フローサイトメーターによる解析結果を図 2 に示す。ManM 処理した RAW264.7 細胞 (ManM(+))の蛍光強度が処理していない細胞(ManM(-))やネイティブの細胞の蛍光強度に比べ顕著に高く、ManM(+))の表面に sgc8 が修飾されていることを確認した。

ManM 処理からアプタマー修飾に至るまで RAW264.7 に対する毒性は認められず、ネイティブの細胞と同等の増殖活性と貪食活性を有していた。続いて、PTK-7 を過剰発現しているヒト白血病細胞(CCRF-CEM)を穏やかに振盪しながら 30 分間接触させた。結果を図 3 に示す。ネイティブの細胞や ManM(-))の表面にはほとんど CCRF-CEM 細胞が認められないのに対し、ManM(+))には多くの CCRF-CEM 細胞が粘着していることが認められた。一部の粘着した CCRF-CEM 細胞が RAW264.7 細胞に貪食されることも認められた。

さらに、sgc8-SH 修飾後に CCRF-CEM 細胞を 30 分接着させた RAW264.7 細胞から産生された炎症性サイトカイン TNF- α を定量したところ、ManM(+))では TNF- α 産生量が有意に高まり、CCRF-CEM 細胞と接着した ManM(+))の活性亢進がもたらされていることが明らかとなった。

糖代謝による細胞表面改質技術は細胞の生存率や機能を低下させることなく、糖鎖をもつ全ての動物細胞の表面操作を可能にする。細胞は人工のマテリアルでは到底再現できない高度な表面構造をもち、それにより複雑な要素が混在する生体内環境下で個々の役割を適切に果たしている。すなわち、細胞の構造や機能を理解し、それを利用することにより、生体内での物質輸送や細胞が担う生体反応の制御が可能になる。細胞資源の開拓と拡充が進められている現在において、細胞操作技術は新たな治療技術を創出する切り札になり得ると期待される。

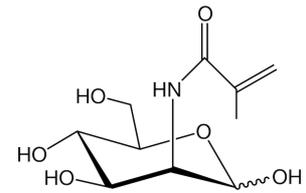


図 1 ManM の構造

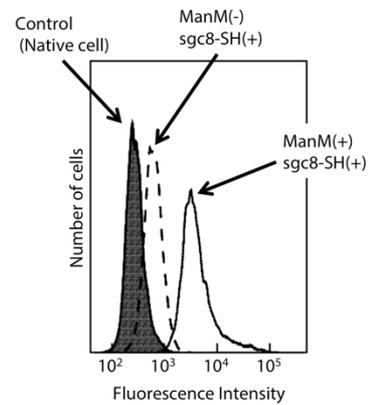


図 2 sgc8 に対する蛍光修飾相補鎖を作用させた RAW264.7 細胞の蛍光強度

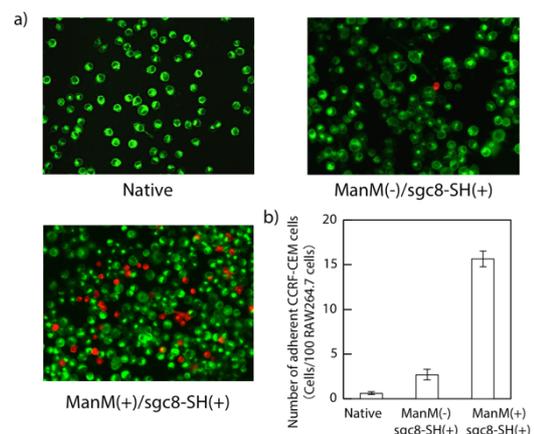


図 3 RAW264.7 細胞 (緑) に CCRF-CEM 細胞 (赤) を 30 分間接触させた後の蛍光顕微鏡像(a)と接着数(b)

Molecular transport system emerged from cell surface engineering

Yasuhiko Iwasaki

Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, Japan

Metastasis is the dominant trigger of cancer death. Cancer cells that have broken away from the primary tumor, termed circulating tumor cells (CTCs), are the main components of metastasis. Therefore, a system to eliminate CTCs from the metastatic routes is required for the reduction of metastatic cancer. In the present study, surface modification of macrophages with nucleic acid aptamers, so-called “eat-you” motifs, which can bind to membrane proteins of cancer cells, was performed to capture cancer cells. In order to immobilize nucleic acid aptamers on the living cell surface, synthetic reactive groups were metabolically delivered to the macrophages. The metabolic labelling process of sialic acid is robust for the surface engineering of living cells because this process can be applied for various mammalian cells. Recently, we synthesised a methacryloyl-modified *N*-Acetyl mannosamine (ManNAc) analogue, termed *N*-methacryloyl mannosamine (ManM), and succeeded in delivering methacryloyl groups to sialic acid residues of mammalian cells.

Murine macrophage-like cells (RAW264.7) were used as a model for macrophages. In order to deliver methacryloyl groups onto the carbohydrates of RAW264.7 cells, the cells were incubated with ManM. Sgc8, has affinity for PTK7, which is overexpressed on the cancer cell (CCRF-CEM) surface. Thiol-terminated nucleic acid aptamer (Sgc8-SH) was immobilized by a visible light-assisted thiol–ene reaction. Eosin Y (EY) was used as a photosensitizer because it is excited in visible light. Sgc8-immobilized on RAW264.7 cells were confirmed by treatment with the complementary Alexa Fluor 488 C₅-immobilized DNA. The surface modification did not show any adverse effect on the viability and phagocytic activity of RAW264.7 cells. CCRF-CEM cell capture by RAW264.7 cells was significantly induced by the nucleic acid aptamer immobilization on RAW264.7 cells. Nucleic acid aptamers can be freely designed for targeting specific cells, proteins or other biosubstances. Therefore, various ‘eat-you’ motifs could be immobilized on macrophages thorough the bio-orthogonal process established. This process would induce programmed cell removal and be a useful technology for the elimination of CTCs and other pathogenic factors.

細胞が産生する浸透圧調節分子と人工高分子化合物を用いた 細胞モデル実験系の構築

研究代表者：甲南大学フロンティアサイエンス学部 三好 大輔

1. 研究の概要

生体分子の機能に影響を及ぼす因子の一つに、周辺の分子環境がある。細胞内は生体分子が非常に混み合った分子クラウディング状態にあるに対し、生化学的な実験が行われる試験管内環境は分子濃度が極めて希薄である。そのため、試験管内での実験結果をもとにして、細胞での生体分子の物性を解明することが困難であることが明らかになりつつある。そこで本研究では、①細胞核の化学環境を模倣するために、領域内の共同研究者が設計した負電荷高分子を用いて核内に高濃度に存在するゲノムを模倣した。また、②細胞質を化学模倣するために、細胞質に数百 mM から数 M 程度も存在する浸透圧調節分子を用いて細胞を化学模倣した実験系を構築した。これらの分子環境において、核酸の構造安定性を定量解析したところ、核酸の非標準構造が特異的に安定化されることが明らかとなった。③さらにこれらの知見をもとにして、四重らせん構造リガンドを細胞内で放出するシステムを構築した。

2. 研究の背景と目的

薬剤のリード化合物やイメージングに使われるプローブ分子などを試験管内で開発しても、細胞で臨みの機能を発揮しないことがある。その要因に、生体分子の構造や機能などの分子物性、さらには、標的分子と開発した機能分子間の相互作用が、周辺の分子環境によって大きく変化することがある。そのため、細胞内の生体分子反応を解明するためには、生体分子反応パラメータと細胞内分子環境パラメータの相関を定量化することが有用である。本研究では、①細胞核内に大量に存在するゲノムを化学模倣するために、アニオン性高分子を用いて分子クラウディングを誘起し、その環境での核酸構造の熱力学的安定性を解析することを試みた。②また、細胞質を化学模倣するために、細胞質に大量に存在する浸透圧調節分子を用いて分子クラウディングを誘起した。その環境で、核酸構造の熱力学的安定性を評価することを試みた。③さらに、このようなシステムを活用することで、細胞内でも機能する分子システムの構築も試みた。

3. 成果

①リン酸ナトリウムを主鎖骨格にもつ高分子を用いた細胞核内環境の化学模倣（関西大岩崎先生との共同研究）：細胞核内では、DNA そのものが分子クラウディングを誘起している。このような環境を化学模倣するためには、負電荷のリン酸を主鎖骨格にもつ高分子

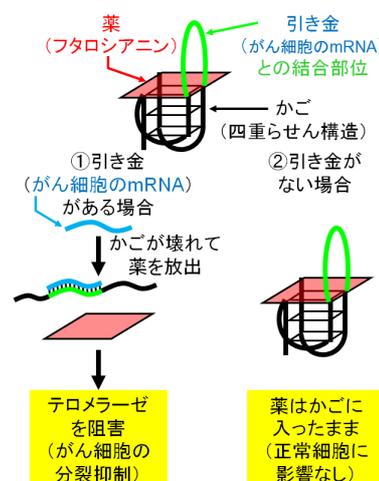
が必要である。本研究では、PEP・Na {Poly(ethylene sodium phosphate)}を用いた。また、二重らせん構造、三重らせん構造、四重らせん構造を形成する DNA 鎖を設計し、その構造安定性に及ぼす PEP・Na の効果を定量化した。その結果、すべての DNA の構造が、PEP・Na によって安定化した。特に、核酸の非標準構造である、三重らせん構造と四重らせん構造の安定化が顕著であった。さらに、塩濃度や高分子の濃度を系統的に変化させた結果、高分子が低濃度の場合、対イオン濃縮効果によって核酸構造を安定化することが示された。さらに中濃度領域では、これに加えて排除体積効果が観測された。高濃度領域においては、水分子の活量低下に伴う核酸の水和環境の変化が重要であることが示された。これらの成果は、当該雑誌の表紙として掲載された。



②浸透圧調節分子を用いた細胞質内環境の化学模倣(東工大丸山先生との共同研究):細胞質内に大量に存在する浸透圧調節分子

である尿素は生体分子の変性剤である。そのため尿素の変性効果を打ち消す分子が必要である。このような役割を果たすのが TMAO (トリメチルアミン-N-オキシド) である。そこで本研究では、核酸の標準構造である二重らせんと、非標準構造である四重らせんに対する、TMAO と尿素の効果を定量化した。その結果、尿素は両方の核酸構造を不安定化することが示された。TMAO は、四重らせん構造を顕著に安定化した。一方、二重らせん構造は、低濃度の TMAO によって安定化され、高濃度の TMAO では不安定化した。TMAO がもつトリメチルアミン基を含む低分子化合物は、二重らせん構造に対して同様の効果を及ぼすことも示された。このことから、TMAO に含まれるトリメチルアミン基が、二重らせん構造のグループに結合することが示唆された。細胞外部からの刺激によって、浸透圧調節分子の濃度が大きく変化することから、このような機構によって核酸の構造変化が引き起こされ、遺伝子発現などの制御が行われている可能性が示唆された。

③がん細胞特異的 mRNA に応答してテロメラーゼ阻害剤を放出するシステムの構築:細胞内でも四重らせん構造に対する親和性と特異性を保持するリガンド(フタロシアニン)と四重らせん構造を形成する DNA を用いて、がん細胞で高発現する mRNA に応答してリガンドを放出するシステムを構築した。このシステムを用いることで、がん細胞特異的にテロメラーゼ活性を阻害できる可能性が示された。これらの成果は、新聞紙面で紹介された。



Cell-mimicking systems based on naturally-occurring osmolytes and synthetic polymers

Daisuke Miyoshi

FIRST (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology) and FIBER (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research), Konan University, Japan

Molecular crowding is one of the most distinguishing features between *in vitro* and *in vivo*. The molecular conditions inside living cells is highly crowded with large and small biomolecules. The large biomolecules includes protein, nucleic acids, saccharides, and lipids. The osmolytes are typical small molecules occupying cytoplasm. However, most of the molecular crowding studies have been done by use of nonionic and inert synthetic polymers. Such molecular crowding conditions are not able to consider as precise cell mimicking systems. Therefore, in this study we focused on the following two projects: (1) Developing cell nucleus mimicking system by use of an anionic polymer. (2) Mimicking cell cytoplasm by use of naturally occurring osmolytes.

(1) Developing cell nucleus mimicking system: A poly(ethylene sodium phosphate) (PEP·Na), which has a nucleic acid phosphate backbone and created a cell nucleus-like environment. The effects of molecular crowding with PEP·Na on the thermodynamics of DNA duplexes, triplexes, and G-quadruplexes were systematically studied. Thermodynamic parameters indicated that the factors for the stabilization of the DNA structures were dependent on sodium ion concentration. At lower polymer concentrations, the stabilization was attributed to a shielding of the electrostatic repulsion between DNA strands by the sodium ions of PEP·Na. In contrast, at higher polymer concentrations, the DNA structures were entropically stabilized by volume exclusion, which could be enhanced by electrostatic repulsion between phosphate groups in DNA strands and in PEP·Na. Moreover, increasing PEP·Na concentration resulted in increasing enthalpy of the DNA duplex but decreasing enthalpy of DNA G-quadruplex, indicating that the polymers also promoted dehydration of the DNA strands.

(2) Mimicking cell cytoplasm: A We systematically investigated effects of molecular crowding with TMAO as a zwitterionic and protective osmolyte and urea as a nonionic denaturing osmolyte on conformation and thermodynamics of the canonical DNA duplex and the non-canonical DNA G-quadruplex. It was found that TMAO and urea stabilized and destabilized, respectively, the G-quadruplex. On the other hand, these osmolytes generally destabilize the duplex, however it was observed that osmolytes having the trimethylamine group stabilized the duplex at the lower concentrations because of a direct binding to a groove of the duplex. These results are useful to predict DNA structures and their thermodynamics under physiological environments in living cells.

実験的に抽出された分子反応パラメータを導入した マラリア感染赤血球モデルの開発

研究代表者：東北大学工学研究科 今井 陽介

1. 研究の概要

マラリアに感染した赤血球は膜表面に接着タンパクを発現する。この分子反応の発現によりマラリア感染赤血球は微小血管内に接着し、周囲の赤血球を巻き込んだ組織レベルの微小循環障害を引き起こす。我々は細胞の力学と生化学を連立する計算力学モデルを開発し、大規模パラメトリック計算によって、TSP や CD36 にみられる定常接着は離脱頻度 $1s^{-1}$ 以下で生じること、ICAM-1 は結合に作用する力にほとんど依存しない結合特性であることを明らかにした。また腫瘍細胞の接着に応用し、毛細血管における「Bullet」挙動はセレクチン上においても定常接着を可能にすることを示した。

2. 研究の背景と目的

マラリアは、分子反応の発現により組織レベルで細胞集団挙動の異常を生じる代表的な疾患である。熱帯熱マラリア原虫が寄生した赤血球は膜表面に接着タンパクである PfEMP1 を発現し、これは血管内皮細胞上の ICAM-1, TSP, CD36 など複数のタンパクと、また正常な赤血球上のタンパクとリガンド-レセプタ結合する。これによりマラリア感染赤血球は微小血管内に接着し、脾臓の免疫機構から逃れ安定に増殖し、最終的に周囲の赤血球を巻き込んだ大規模な微小循環障害を引き起こす。

我々は世界に先駆けてマラリア感染赤血球の細胞力学モデルを構築し、これを用いた数値計算によって、周囲の赤血球を伴う細胞集団挙動を明らかにしてきた。近年、リガンド-レセプタ結合に関わる分子反応パラメータの抽出がなされており、これを我々の開発してきた細胞力学モデルに導入することで、分子反応の発現に由来する組織レベルの微小循環障害を再現する数値計算が可能となる。

本研究では、第一に、実験的に抽出されたりガンド-レセプタ結合の分子反応パラメータを導入したマラリア感染赤血球の細胞力学モデルを開発する。第二に、これを用いた数値計算により、マラリア感染による分子反応の発現と赤血球の集団挙動の関係を解明する。

3. 成果

これまでに開発した計算力学モデルを用いて、マラリア感染赤血球挙動に対する大規模パラメトリック計算を実施した。図 1a はその例であり、様々なせん断速度およびリガンド-レ

セプタ結合の離脱頻度に対するマラリア感染赤血球挙動を示している。離脱頻度が 1 s^{-1} 以下の場合、生理学的なせん断速度の範囲のほとんどで血管壁と定常接着する。このことは、過去に TSP や CD36 に対して実施された AFM や Microfluidics を用いた実験結果と一致している。マラリア重症化に重要なレセプタであるとされる ICAM-1 についてはこれまで AFM 計測が成功しておらず報告例がないが、我々は ICAM-1 の結合特性について数値的に検討を行い、結合に作用する力にほとんど依存しない結合特性を有することを予想した。さらに、バネ定数や力感度、正常赤血球の影響など広いパラメータ空間に対する赤血球挙動を明らかにした。

また、開発した計算力学モデルをより一般的なカプセル懸濁液のレオロジー解析や白血球・腫瘍細胞の流動・接着の問題に応用した。マラリアと同様、白血球の接着は生体防御において、腫瘍細胞の接着はがん転移において重要な過程であり、古くから血管壁面の「Rolling」や定常接着が調べられてきた。一方、毛細血管では血管径が小さいため、物理的に捕捉されたような「Rolling」とは異なる挙動が観察されている。しかしながら、このような条件下における細胞の接着挙動はまだ十分に理解されていなかった。我々はセレクチンを発現した毛細血管内の細胞挙動を計算し、図 1b のような結果を得た。毛細血管径が細胞径より小さくなると、細胞は管の中央を移動する「Bullet」挙動を示す。このときリガンド-レセプタ結合によって細胞の移動速度は著しく減少し、レセプタ密度が十分低い領域においても定常接着とみなせるような速度となる。セレクチンは回転運動を生じる結合であり、定常接着にはインテグリンが必要であると考えられているが、毛細血管においてはセレクチンだけでも定常接着が可能であることを示唆している。

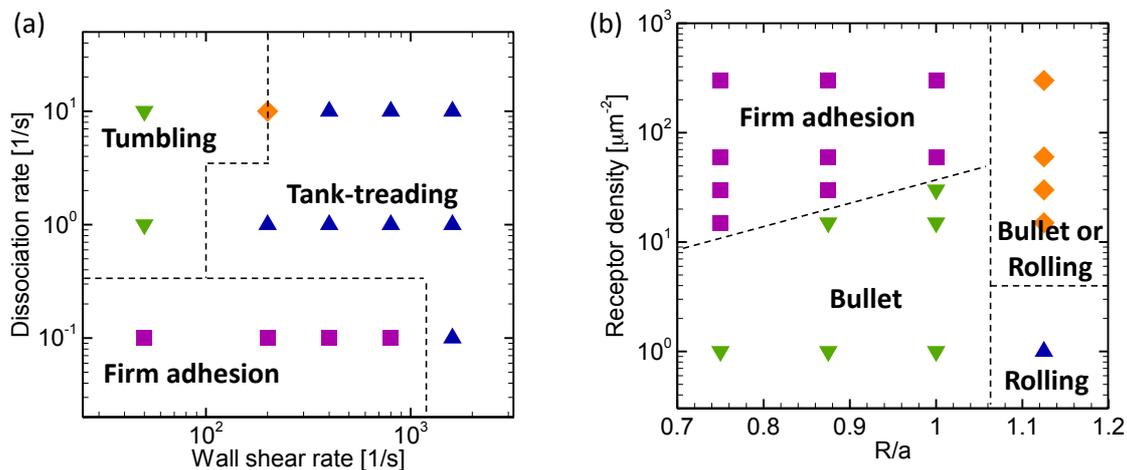


図 1: 大規模パラメトリック計算の例. (a) 血管壁上のマラリア感染赤血球の挙動. (b) 毛細血管中の腫瘍細胞の挙動.

A numerical model of red blood cells infected by *Plasmodium falciparum* malaria

Yohsuke Imai
School of Engineering, Tohoku University, Japan

Quantifying the relationship between the biochemical and biomechanical properties of a cell and its macroscopic behavior is important to understand cell function and related diseases. *Plasmodium falciparum* malaria is a typical example, in which red blood cells (RBCs) infected by *Plasmodium falciparum* (*Pf*-IRBCs) express adhesion molecules (PfEMP1) and sequester in the microvasculature through ligand-receptor interactions. We developed a numerical model of *Pf*-IRBCs, coupling the biochemical interactions with the fluid and solid mechanics of the cells and cellular environment. The boundary element method (or the lattice Boltzmann method) for fluid mechanics, the finite element method for membrane mechanics, and the Monte Carlo method for ligand-receptor interactions were used. We have performed a large-scale parametric analysis using graphics unit processing (GPU) computing. At shear rates found in capillaries and post-capillary venules, the *Pf*-IRBC model exhibited either tumbling or tank-treading on the wall for a dissociation rate constant greater than 1 s^{-1} , while it firmly adhered to the wall for a dissociation rate constant less than 1 s^{-1} . This is consistent with previous experiments, in which *Pf*-IRBCs firmly adhered on TSP and CD36 whose dissociation rates were reported to be less than 1 s^{-1} . We also examined *Pf*-IRBC rolling on ICAM-1. Our results suggested that the interaction between PfEMP1 and ICAM-1 is a nearly constant bond, with a dissociation rate ranging from 30 s^{-1} to 100 s^{-1} .

We have extended the numerical model to analyze the flow and adhesion of leukocytes and tumor cells. Cell adhesion to the vascular wall is an important process also for the immune function and cancer metastasis, and thus leukocyte and tumor cell rolling have been extensively studied. However, cell adhesion in capillaries whose diameter is smaller than the cell has been poorly understood yet. We investigated the behavior of a cell in capillaries, particularly focusing on a weak ligand-receptor bond condition. We found that an adherent cell exhibited “bullet” motion in capillaries. Bullet motion effectively reduced the velocity of the cell, and the cell had a nearly zero velocity under physiological shear rates. Our results suggested that even through the ligand-receptor interaction between PSGL-1 and P-selectin, which is mainly responsible for leukocyte rolling, a cell is able to establish the firm adhesion of the cell to the wall in a small capillary.

細胞機能解明のためのエクソソーム定量解析ナノデバイスの創製

研究代表者：名古屋大学 大学院工学研究科 安井 隆雄

1. 研究の概要

組織・生体全体において、生体システムや複雑な生命現象、細胞機能を解明するためには、細胞が分泌する直径 50-100 nm の脂質二重膜で覆われたエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームを解析することが重要である。エクソソームを定量的に解析するためには、煩雑な操作と長時間の測定、高価な実験設備が必要である等の多くの課題がある。本研究ではナノワイヤ構造体を微小流体デバイスに組み込むことで、新規ナノデバイスを創製し、エクソソームの定量的な解析から生体システム・複雑な生命現象・細胞機能の解明を行うことを目的とした。本年度は、尿中のエクソソームを 90%以上捕捉可能なデバイスを創製することに成功し、尿中エクソソームよりがんや糖尿病のバイオマーカー候補となる microRNA を検出することに成功した。

2. 研究の背景と目的

エクソソームは、その内部に生命の微調整役として機能する microRNA 等の核酸が、その表面には様々な膜タンパク質が存在しており、細胞間や個体間、生体システム全体の伝搬物質として機能していることが明らかになっている。特に、ヒトの生老病死という一連の生物学的な生命現象においては、「1. 生命の誕生：母乳中エクソソームの受け渡し」「2. 老化：加齢に伴うエクソソーム放出量の減少」「3. 疾患：エクソソームを媒介とするウィルス増殖」「4. 死：がん細胞由来エクソソームによる生体内免疫システムの低下」へのエクソソームの関与が報告されている。このような背景のもと、細胞機能の解明には、これまでに行われてきたサイトカイン等のタンパク質・核酸等の単一分子を中心とした研究から、細胞環境におけるエクソソームのタンパク質や核酸等のバイオ分子が関わる分子反応を定量的に理解する必要がある。エクソソームを定量的に解析するためには、煩雑な操作と長時間の測定、高価な実験設備が必要である等の多くの課題がある。エクソソームの解析において最も大きな課題の 1 つは、細胞培養上清・尿・血液等に含まれている直径 50-100 nm 程度のエクソソームを高効率に分離回収することである。現在までに報告されている手法では、エクソソームを沈殿凝集させる試薬を用いる手法であったり、超遠心分離を用いる手法であったりと、エクソソームを分離回収するためには長時間を要する作業が必要である。そこで本研究では、エクソソームを高効率に分離回収し、エクソソームの定量的な解析を行い、エクソソームを媒介とした生体システムや複雑な生命現象、細胞機能の解明や疾病診断を行うことを目的とした。

3. 成果

新規ナノデバイス(ナノワイヤデバイス)はポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロ流路内に酸化亜鉛ナノワイヤをアンカーのように埋め込ませて作製した。洗浄後のシリコン基板上に幅 2 mm、長さ 2 cm の流路をポジ型フォトリソでパターンニングし、そこに Cr 層をスパッタリングにより作製した後、レジストを除去し、その後、Cr 層を焼成させた。そこから水熱合成法によりナノワイヤの選択的成長を行った。ここに未硬化の PDMS を流し込み、硬化させた後にはがし取ることで Si 基板上のナノワイヤを折り取って PDMS に転写した。この PDMS に転写されたナノワイヤを新たなナノワイヤ成長の結晶核として水熱合成を行うことで PDMS 埋め込み型ナノワイヤを作製した。そしてナノワイヤを成長させた PDMS にマイクロミキサー構造体を持つ幅 2 mm、長さ 2.0 cm、高さ 50 μm の流路を接着することで、ナノワイヤデバイスを作製した。埋め込み型ナノワイヤ作製のそれぞれの段階における Si 基板と PDMS の SEM 観察画像より、シリコン基板上に成長していたナノワイヤの大部分が、PDMS に埋め込まれており、目的であった埋め込み型ナノワイヤの作製の成功を確認した。

続いてこの尿サンプル 1 mL をシリンジポンプにより流量 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ でナノワイヤデバイスへ送液し、尿中エクソソームをナノワイヤ表面に捕捉させた。送液後の尿サンプルを回収し、そして送液前後の尿サンプル中に含まれるエクソソームの粒径および濃度を測定した。その結果、ナノワイヤデバイス導入前の尿中エクソソームの濃度が 1.4×10^{12} particles/mL であったのに対して、マイクロミキサー構造体なしのナノワイヤデバイスに導入後の尿サンプル中のエクソソームでは 4.3×10^{11} particles/mL、マイクロミキサー構造体のあるナノワイヤデバイス導入後の尿サンプルでは 1.1×10^{11} particles/mL になった。このことよりマイクロミキサー構造体なしのナノワイヤデバイスでは 69%、マイクロミキサー構造体ありのナノワイヤデバイスでは 91%のエクソソームの捕捉に成功した。

尿サンプル導入後のエクソソームが捕捉されたナノワイヤデバイスに細胞溶解液 1 mL をシリンジポンプにより流量 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入することで、捕捉されたエクソソームを溶解し、そこに内包されている尿中エクソソーム由来 miRNA の抽出を行った。この結果より、本手法は従来法と比べて迅速・省サンプルにエクソソーム捕捉・miRNA 抽出を行えることがわかった。最後に、ナノワイヤデバイスの臨床における有効性を調べるために健常者、前立腺がん患者、糖尿病患者の尿サンプルからナノワイヤデバイスを用いて miRNA の抽出を行い、マイクロアレイによって miRNA 種の同定と抽出量の比較を行った。それら miRNA 種を比較したところ、それぞれの検体で特異的に検出される miRNA 種や、検出されなくなる miRNA 種が存在することが分かった。この結果より、本デバイスは尿中 miRNA による疾病診断を行うだけでなく、今までに報告のない新たなバイオマーカーの探索にも有効な新たな診断プラットフォームであるということが明らかとなった。

Quantitative exosome analysis nanodevices toward cellular function elucidation

Takao Yasui

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Japan

Since exosomes contain microRNA (miRNA) and membrane proteins in and on them, respectively, which can be a candidate to elucidate inter- and intra-cellular function, quantitative exosome analysis received a lot of attention from researchers. Massive data obtained from exosome analysis in less sample volume is of great importance to realize less invasive diagnosis and effective searching for unknown biomarkers based on exosome analysis, however, conventional methods can not fulfill such a requirement; it takes several mL of sample volume. Also, it is significantly difficult to attain highly efficient capture of exosomes using conventional methods due to exosome size ranging from 50 to 200 nm. In this research, we fabricated nanodevices by combining nanowire structures and microchannels and achieved highly-efficient separation of exosomes from small sample volume for a realization of quantitative exosome analysis

We fabricated PDMS-anchored ZnO nanowires in microchannel. For fabrication of the anchored nanowires (140 nm in diameter and 2-3 mm in length), we made patterned Cr seeds layer on Si substrates photolithography and sputtering, and then, we immersed the substrate into the nanowire growth solution to demonstrate a patterning of nanowire growth. We pored uncured PDMS resin on the substrate and cure the resin. When the cured PDMS was peeled off from the substrates, the nanowires were cracked and fully anchored in the PDMS, which could act as the seeds for the following nanowire growth. Then, we immersed the PDMS into the nanowire growth solution to grow PDMS-anchored nanowires. We conformed nanowire anchoring by SEM imaging of each device making steps.

We demonstrated that the PDMS-anchored nanowires could capture the exosomes from 1 mL urine sample. We extract microRNA from the captured exosomes via sequential introduction of lysis buffer, which break the membrane of the exosomes, into nanowire device. Comparison of the amounts of the extracted microRNA between using the PDMS-anchored nanowires and the conventional method showed that the microRNA extraction efficiency using the PDMS-anchored nanowires is much higher than that using the conventional method. This result indicates that we realized high throughput microRNA extraction from body fluid with little loss of the microRNA amount using the PDMS-anchored nanowires, leading to acceleration for discovering new biomarkers in body fluids.

ナノ核酸デバイスを用いた自然免疫応答発現機構の網羅的解析

研究代表者：徳島大学 大学院医歯薬学研究部 南川 典昭

1. 研究の概要

生体内現象は、生体分子が高度に相互作用することにより調節、維持されており、その相互作用様式の解明は、生命現象を理解する上で極めて重要である。研究代表者らは、自らが開発したナノ核酸デバイスを用いて、siRNA によって誘起される分子反応 (RNA 干渉効果による遺伝子発現抑制と TLR3 を介した自然免疫応答) の発現機構解明を行ってきた。さらに、このナノ核酸デバイス導入 siRNA を利用して whole Blood Assay (WBA) により包括的な自然免疫応答を評価したところ、TLR3 を介した場合は全く異なる活性変化が観察された。そこで本年度は、カスケード阻害剤ならびに光補足型ナノ核酸デバイスを用いることにより、siRNA により誘起される自然免疫応答発現の鍵となる受容体の同定を試みた。

2. 研究の背景と目的

核酸によるパターン認識受容体を介した自然免疫応答は、元来生物に備わる重要な生体防御機構である。しかし、その発現機構は極めて複雑であり、核酸とパターン認識受容体との分子認識メカニズムが明らかにされていないため予測が難しい。

研究代表者らは独自に開発したナノ核酸デバイス (図 1: デアザアデニン環の 7 位および 3 位に導入された臭素原子がメジャーおよびマイナーグループの立体障害として機能) を用いて siRNA によって誘起される分子反応の発現機構解明を行ってきた。すなわち、siRNA の様々な位置にこのデバイスを導入し、TLR3 を介した自然免疫応答の回避能について評価した結果、siRNA のセンス鎖の 5'末端付近にマイナーグループ側の立体障害となる 3Br-3-deazaA

(3Br-deA) を導入した場合、RNA 干渉効果の増強と TLR3 を介した自然免疫応答を軽減できることが明らかとなった。しかしこの研究において、すべてのパターン認識受容体との相互作用を一括して評価できる WBA では、逆に自然免疫応答を増強させることが明らかとなった。すなわち、ヒトにおいて siRNA の細胞内導入に伴う自然免疫応答発現の鍵となるパターン認識受容体は TLR3 ではないことが示唆され、これを同定するためにカスケード阻害剤を利用した WBA を実施するとともに標的受容体を補足可能な改良型ナノ核酸デバイスの開発に取り組んだ。

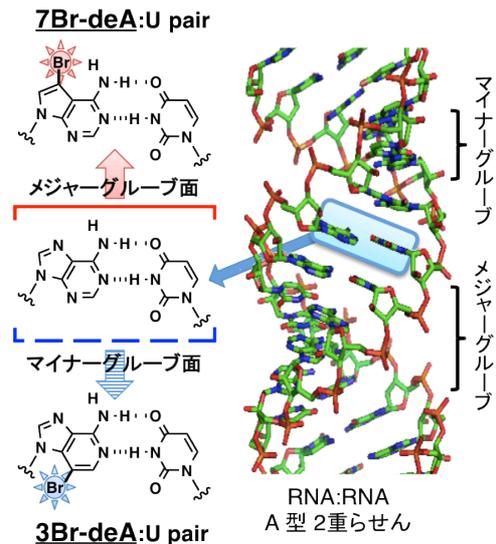


図 1 ナノ核酸デバイスのコンセプト

3. 成果

(1) Chloroquine 存在下での WBA による自然免疫

応答評価: ナノ核酸デバイス導入 siRNA の細胞内導入に伴う自然免疫応答変化を WBA により観察したところ、siR1, 2 および 4 においては顕著な TNF- α 誘導量変化が観察されないのに対し、センス鎖 5' 末端付近に 3Br-deA を導入した siR3 および 5 では自然免疫応答の増強が観察された (図 2a)。この結果は前述の TLR3 との相互作用解析により得られたものとは全く異なる。すなわち TLR3 の他に自然免疫応答発現の鍵となるパターン認識受容体が存在することが強く示唆された。ところで、外来性 RNA により惹起される自然免疫応答発現に関連することが示唆されているパターン認識受容体は TLR3 の他に TLR7/8 あるいは PKR、MDA5 などが知られている (図 3)。これらのいずれが鍵となる相互作用を担うかを明らかとするため、まずは TLR シグナルのカスケード阻害剤である chloroquine 存在下、再度 WBA を実施した。その結果、いずれのナノ核酸デバイス導入 siRNA を用いた場合にも、自然免疫応答の賦活化はほとんど観察されなことが明らかとなった (図 2b)。すなわち、siRNA により惹起される自然免疫応答の発現には TLR が大きな役割を担っていると考えられ、WBA における活性変化は TLR7/8 との相互作用による影響を強く受けていることが示唆された。

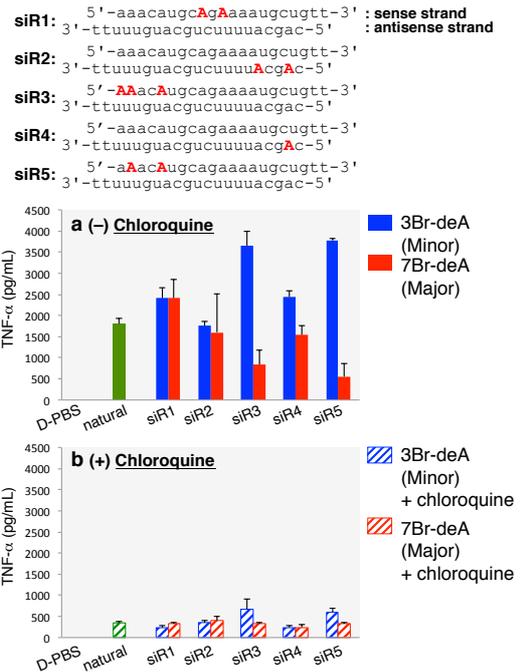


図 2 Chloroquine 存在下での WBA による自然免疫応答評価

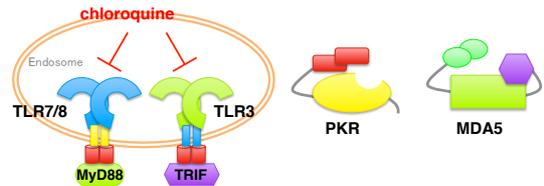


図 3 外来性 RNA を認識するパターン認識受容体

(2) 光補足型ナノ核酸デバイスの開発:

上述の WBA により観察された自然免疫応答変化をもたらす鍵となるパターン認識受容体を同定すべく、ナノ核酸デバイスを用いたパターン認識受容体の補足法開発を検討した。すなわち、臭素原子の代わりに光反応性基であるトリフルオロロジアジリン基を導入した新しいナノ核酸デバイス (図 4) を設計し、各ヌクレオシドユニットの合成法を確立した。図 2 に示した配列にて光補足型ナノ核酸デバイスを導入した siRNA を調製中であり、これらを用いて TLR7/8 の補足ならびに相互作用部位の同定を試みる予定である。

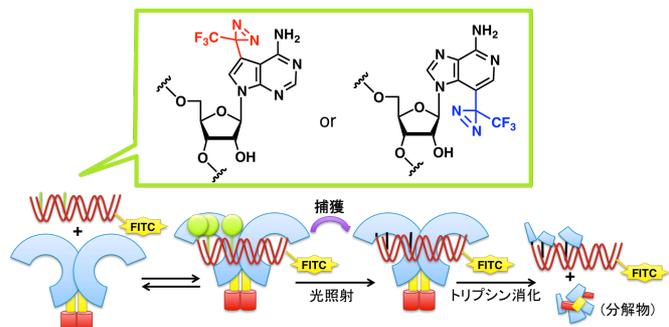


図 4 光補足型ナノ核酸デバイスの構造とコンセプト

Elucidation of the innate

immune systems activated by siRNA using a nano-chemical device.

Noriaki Minakawa

Institute of Biomedical Science, Tokushima University Graduate School, Japan

The interactions of nucleic acids with proteins such as enzymes and transcription factors play a central role in numerous biological processes including the regulation of gene expression. Because this interaction occurs in a strict and specific manner, an understanding of how proteins bind structurally to nucleic acids is valuable in determining the mechanisms of the biological process. In addition, this information is expected to provide clues for the development of nucleic acids-based therapeutics, such as siRNAs and aptamers.

In our previous report, we described about the utilities of the nano-chemical device consisting of a set of 3-bromo-3-deazaadenine (3Br-deA) and 7-bromo-7-deazaadenine (7Br-deA) nucleosides (Fig. 1), to elucidate molecular interaction between siRNA and RNA induced silencing complex (RISC) or toll-like receptor 3 (TLR3) proteins. Additionally, we studied innate immune responses induced by siRNA with nano-chemical device using whole Blood Assay (WBA). As a result, reductions of the TNF- α level were observed when the 3Br-3-deazaAs (3Br-deAs) were introduced into the 5'-end of the sense strand (Figure 2, siR3 and 5).

Thus, in this year, we attempted the WBA with chloroquine, which is a TLR-dependent cascade inhibitor. Each siRNA with nano-chemical device showed drastic attenuations of TNF- α level in the presence of chloroquine, indicating TLR7/8 might play a critical role in stimulating innate immune response depending of the siRNA. To further elucidate which is the most critical receptor to induce innate immune response, we explored a new nano-chemical device with a trifluoro diazirine group at C7 or C3 position of deazaadenine ring instead of a bromo group. Chemical syntheses of nano-chemical devices with a trifluoro diazirine groups are achieved using palladium couplings as a key reaction. With this new device, the studies of receptor protein detection are currently underway.

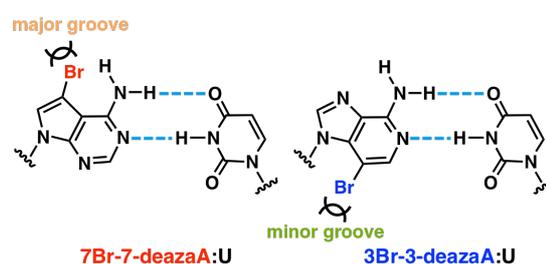


Fig. 1 Structures of nano-chemical device

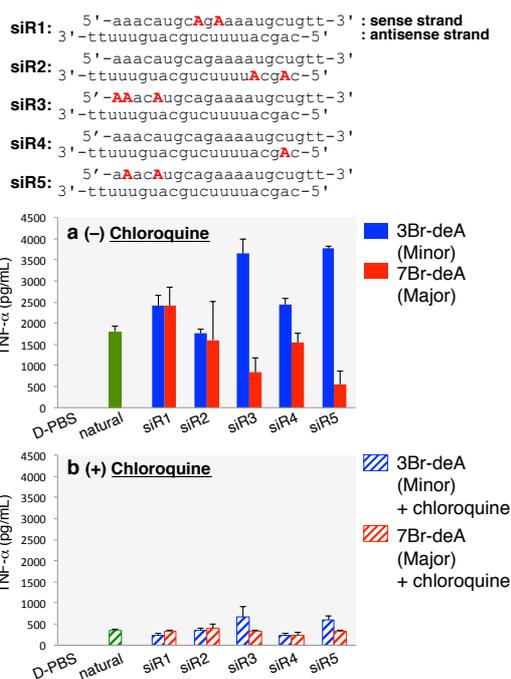


Fig. 2 WBA in the absence or presence chloroquine.

細胞取込過程の環境変化を認識するナノカプセルの構築と 超音波力学療法への展開

研究代表者：大阪府立大学工学研究科 原田 敦史

1. 研究の概要

細胞内還元環境を認識して不安定化するナノカプセルへ異なる細胞内分布を示す音増感剤を封入し、その HeLa cells への取り込み、動態、超音波力学療法効果を検討した。音増感剤は、ナノカプセルへの封入によりエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれ、ナノカプセルのエンドソーム脱出能により細胞質へ移行し、細胞質でのナノカプセルの不安定化によりリリースされることが確認された。その後、音増感剤の性質によって細胞内において異なる分布を示し、その結果、異なる部位へ超音波力学療法効果を与え、細胞死を誘導することが確認された。

2. 研究の背景と目的

生体系においては、生体高分子が的確に自己組織化した数十ナノメートルスケールの超分子集合体（ナノ集合体）が数多くみられ、環境に呼応した動的構造変化を通じて重要な生体機能の一翼を担っている。その代表例であるウイルスは、エンドサイトーシスによって細胞へ取り込まれる過程において、細胞内エンドソームにおける pH 低下をトリガーとする動的な構造変化を通じて膜融合を生起せしめ、更には、細胞質中を移動して核へと到達し、核膜孔から核内へと侵入してカプシド構造の崩壊に基づいてウイルス遺伝子を核内に放出する。このカプシドの二段階動的構造変化が、その機能発現において重要な過程となっている。本研究は、樹状高分子とポリペプチドからなるカチオン性高分子が、ポリペプチドテイル鎖のコンフォメーション変化により高分子鎖の三次元構造が制御される効果により自発的に単分散なポリマーベシクルを形成でき、さらに、架橋構造導入により分散安定性の優れたカチオン性ナノカプセルが得られるという発見をドラッグデリバリーシステム（DDS）へ展開するものである。カチオン性ナノカプセルを細胞質内の還元環境で開裂するジスルフィド結合により安定化することにより、樹状高分子内部三級アミンのプロトンスポンジ効果によるエンドソーム脱出能と組み合わせることにより細胞取込過程の微小環境変化を認識しうるナノカプセルを構築する。また、このナノカプセルへ音増感剤を内封することによって、超音波照射による音増感剤の活性酸素種生成を通じた殺細胞効果の発現により治療効果を示す超音波力学療法への展開を図る。

3. 成果

これまでに合成方法を確立し、細胞内分布が異なることが確認されている音増感剤 (doxorubicin, DOX; triphenylphosphonium 基導入 DOX, TPP-DOX) について、細胞内還元環境で不安定化するカチオン性ナノカプセルへの封入条件の検討を行い、いずれの音増感剤についても 60%程度の効率で封入できる条件を確認した。DOX 封入ナノカプセルについて HeLa 細胞への取り込み、細胞質での DOX リリースをレーザー共焦点顕微鏡観察により確認した (図)。1 時間後においては、DOX の蛍光が細胞質に輝点状に観察され、核への局在は認められなかったが、4 時間後においては DOX が核への分布していることが確認された。これは、1 時間後においては、ナノカプセルがエンドソーム内に存在し DOX はカプセル内に保持された状態ですが、4 時間後までの間にナノカプセルがエンドソームから脱出し、細胞質還元環境に応答したナノカプセルの不安定化により DOX がリリースされたと考えられる。リリースされた DOX はそれ自身の性質により核へと分布したと考えられる。

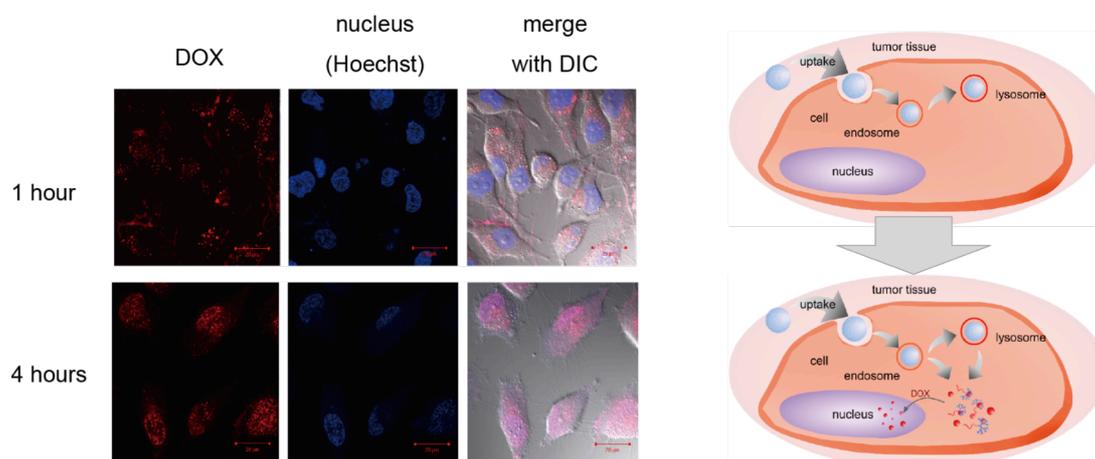


図 : DOX 封入ナノカプセルによって処理された HeLa cells のレーザー共焦点

超音波力学療法効果を MTT assay により評価した。HeLa cells に 4 時間ナノカプセルを接触させた後、取り込まれていないナノカプセルを除き、超音波照射を行い、さらに 20 時間培養後、細胞生存率を評価した。DOX は抗がん剤としての性質を有しているため超音波照射を行っていない場合にも細胞生存率の低下が確認されたが、超音波照射を行うと、さらに生存率が低下した。この低下は、核に局在した DOX から超音波照射により活性酸素種 (ROS) を生成し DNA に対して酸化ダメージを与えたためであると考えられる。TPP-DOX の場合、TPP 基の導入により核へ局在しなくなるため超音波照射を行っていないときには細胞生存率の低下は確認されなかったが、超音波照射により有意な細胞生存率の低下が確認された。これは、TPP-DOX が超音波照射によって生成する ROS がミトコンドリアへダメージを与えたためであると推測される。ナノカプセルへ封入する音増感剤の特性を選択することにより、異なる部位への作用によって超音波力学療法効果が誘導できると確認された。

Creation of nanocapsules recognizing environmental change in cellular uptake process for effective sonodynamic therapy

Atsushi Harada

Department of Applied Chemistry, Osaka Prefecture University, Japan

In the biological system, there are various types of supramolecular assemblies with dozens of nanometers scale in which biopolymers precisely organize, and they carry the part of important biological function through the dynamic structural change in response to micro-environment. The natural virus which is the representative example makes membrane fusion through the dynamic structural change in response to pH decrease in the endosome in cells in a process taken in cells by endocytosis. Further, they move into the cytoplasm and arrive at the nucleus, and then invade from pore of nuclear membrane a nucleus and it is intranuclear and releases a viral gene based on the collapse of the capsid structure. Two step dynamic structural changes, the detachment and the collapse of this capsid, becomes an important process in the function manifestation. On the other hand, the author investigated that head-tail type polycation composed of dendritic polymer and polypeptide could spontaneously form narrowly-distributed polymer vesicles and this polymer vesicle was stabilized by introduction of cross-linkages. In this study, the author develops the nanocapsules to sonodynamic therapy in drug delivery system (DDS) field through virus-inspired design.

Doxorubicin (DOX) and its derivative which introduced triphenylphosphonium moiety (TPP-DOX) were entrapped into hollow nanocapsules. The cellular uptake and intracellular behavior of nanocapsules were evaluated using a laser confocal microscopic observation. At 1 hour incubation, red fluorescence dots were observed only at cytosol, indicating that DOX-loaded nanocapsules located at endosome and/or lysosome. However, red fluorescence were distributed to nucleus at 4 hours incubation. This results indicates endosomal escape of nanocapsules between 1 and 4 hours incubation and the DOX release from the nanocapsules through the destabilization at cytosol response with reductive environment. Further, in vitro sonodynamic therapeutic effect to HeLa cells were evaluated by MTT assay. DOX-loaded nanocapsules could show both anticancer effect and sonodynamic therapeutic effect, and the cell viability effectively decreased with ultrasound irradiation. In the case of TPP-DOX-loaded nanocapsules, there was no anticancer effect due to no localization into nucleus and only sonodynamic therapeutic effect was confirmed. By changing intracellular distribution of sonosensitizers (DOX and TPP-DOX), therapeutic effect could be switched from anticancer/sonodynamic therapeutic effects to nucleus to sonodynamic therapeutic effect to mitochondria.

細胞内動態を応用した新規 DDS ナノキャリアーの検討

研究代表者：慶應義塾大学 板野 理

1. 研究の概要

ナノ粒子キャリアーの薬物細胞内動態の違いを利用した効果の高い医工融合型 DDS 製剤の開発を目指し、Poly(MPC-co-BMA)(PMB)や Poly(MPC-co-BMA-MEONP) (PMBN) 等の生体適合性高分子両親媒性ポリマーをナノキャリアーとして用いて疎水性薬剤の製剤化を行った。抗体付加 PMBN ベルテポルフィンを用いた光線力学療法では、抗原を発現している癌細胞に特に高い抗腫瘍効果を示した。また、PMB を利用したベルテポルフィン製剤はリンパ節に滞留する性質があり、光線力学療法が乳癌リンパ節転移に対して有効な新規低侵襲治療となる可能性を示した。さらに NF- κ B 阻害剤 DMEQ はナノ粒子キャリアーにより、溶解性や安定性などの問題点を克服し製剤化可能であり、臨床応用できる可能性が示された。

2. 研究の背景と目的

最近の高分子化学や工学的研究の進歩により、種々のナノサイズ粒子の作製と特性が明らかになり、医学領域や外科疾患への応用が期待されている。我々のグループでは、これまでの東京大学石原・金野研究室との共同研究により PMB や PMBN 等の生体適合性高分子両親媒性ポリマーを用い疎水性薬剤との会合体を作ることによって可溶化し、静注可能で副作用の少ない投与方法を目指して主に DDS の研究を中心に行ってきた。これらを踏まえ、拡散、エンドサイトーシス等、細胞への取り込み機序の違うポリマーを用い、作用機序の異なる薬剤の最適なデリバリー法を細胞内動態、及び生体内動態両面から検証し、動物モデルを用いてその効果の確認を行うことを目的とし、本研究を企画した。

3. 成果

光感受性物質封入ナノ粒子を用いた光線力学療法では、PMBN と光化学反応時間が短く、長波長領域 (689nm) での吸収端を有する疎水性のポリポルフィリンオリゴマー、ベルテポルフィンを用いた。ベルテポルフィンは 488nm のアルゴンレーザーで励起し、650-700nm の波長を観察することにより、In vitro における取り込みの検討を行った。抗 EGFR 抗体を付加したベルテポルフィン封入 PMBN が、EGFR 高発現株である A431 に作用させたとき、30 分後には抗体なしの群の取り込み量の 3 倍となる。これは抗体によって細胞に封入体が定着し、細胞内への取り込みが増えていると推察される。In vivo での取り込みは、A431 担癌免疫不全マウスに製剤を 6mg/kg の量にて投与した。抗体付加ベルテポルフィン封入 PMBN 投与群では、投与 1 時間後での腫瘍内ベルテポルフィン濃度は皮膚に比べ 9.4 倍の取り込み

がみられた。一方、抗体なしの群では、その差は 3.6 倍にとどまった。腫瘍内のベルテポルフィンの濃度同士を比較すると、抗体付加の群がなしの群よりも 1.74 倍取り込まれていた。さらに 75J/cm² のレーザーを照射した実験系で、抗体付加群での腫瘍体積は、149±44.2mm³、抗体なし群は 1200±224.3 mm³であり、無治療群では 1937±285.2 mm³であった。また、抗体付加群での中間生存期間は 54 日であり、抗体なし群での 35 日、無治療群での 25.5 日に比べ有意に延長していた。

乳癌における腋窩リンパ節郭清(ALND)が予後の改善につながっているかどうか議論されており、ALND が省略可能であれば、リンパ浮腫や上肢拳上障害などの後遺症を防ぐこともできる。そこで、ALND に代わる方法としてベルテポルフィン封入ナノ粒子のリンパ節への集積性及び光線力学療法の有用性も検討した。PMB 製剤 4mg/kg 投与 1 時間後、腋窩リンパ節には 23.9µg/g tissue のベルテポルフィンが集積していた。治療群と非治療群では、リンパ節転移率は 12.5%と 56.3%と有意差を認めた (p=0.01)。リンパ節微小転移モデルを用いた検討において、抗体付加による上乘せ効果は見られず、PMB による可溶化製剤がリンパ節転移治療に有用であると思われた。

NF-κB は癌細胞では恒常的に刺激され、浸潤・転移・apoptosis 抵抗性に関わる関連遺伝子の転写・活性化が亢進されていることが明らかにされており、その阻害により効果的な癌治療が期待されている。DHMEQ は強力な NFκ-B 阻害剤で、その特異性の高さや副作用の少なさから臨床応用への期待が大きい分子であるが、極度に疎水性であること、体内での半減期が短すぎることから未だ臨床応用には至っていない。CMC/DHMEQ 懸濁液を用いてヒト膵癌株 AsPC1 に対して細胞増殖試験を行ったところ、DHMEQ 1, 5, 10, 20 µg/ml それぞれの濃度において、PMB/DHMEQ 製剤群が CMC/DHMEQ 懸濁液群よりも高い細胞増殖抑制効果を示した。ただし、PMB ポリマー単独では使用した範囲の濃度では細胞毒性はほとんど見られなかった。1 回投与量を 12mg/kg とした in vivo 投与試験では、PMB/DHMEQ 製剤を 2 日おきに i.v.した群が、CMC/DHMEQ 懸濁液を連日 i.p.した群より高い腫瘍増殖抑制効果を示した。DHMEQ の血液中での安定性、組織内濃度及び血中滞留性を LS-MS 装置を用いて分析した結果、採取した血液に混和した時の DHMEQ の安定性には 2 群間で変化が見られなかったものの、12mg/kg の DHMEQ を担癌マウスに i.v.した実験系で、肺・肝臓などの臓器に CMC/DHMEQ 懸濁液群、癌部には PMB/DHMEQ 製剤群でより多くの DHMEQ が集積している傾向が見られた。

領域内共同研究として、マウス気管支炎モデルを作製し愛知教育大学・上野班に提供した。また、慈恵医大・福田班とも共同研究の計画・準備中である。

Study of nano-carrier for novel DDS method

Osamu Itano

Department of Surgery, Keio University

The poly(MPC-*co*-BMA)(PMB) and poly(MPC-*co*-BMA-MEONP) (PMBN) can solubilize poorly soluble drugs due to its amphiphilic character in aqueous media, and these polymer showed a good cytocompatibility. In addition, the MEONP unit in the PMBN chain is an active ester unit that can immobilize proteins, including antibody. Aim of this project is that to formulate hydrophilic substance using PMB and PMBN as a nano-carrier for intravenous injection.

Photodynamic therapy (PDT) of cancer is a noninvasive optical therapeutic method in which the topical or systemic delivery of photosensitizing drugs is followed by irradiation with broadband red light. Verteporfin, a hydrophobic photosensitizer, has not yet been applied in cancer treatment despite advantages such as longer wave length and a short photosensitivity period. PMBN was conjugated with an anti-EGFR antibody and mixed with verteporfin. The fluorescence intensity in A431 cells *in vitro* was threefold higher after exposure to verteporfin-PMBN-antibody complex than after exposure to verteporfin-PMBN. In A431 tumor-bearing mice, the intratumor concentration of verteporfin was 9.4 times higher than that of the skin, following administration of the verteporfin-PMBN-antibody complex. Tumor size significantly decreased within 8 days in mice treated with verteporfin-PMBN-antibody complex compared with those treated with verteporfin-PMBN. In addition, Verteporfin-PMB stayed in sentinel lymphnodes, and could treat metastasis on epidermis in animal model. 12.5% metastasis rate was observed in treated group while 56.3% in non-treated group.

The NF- κ B/Rel family of transcription factors is involved in the development of cancer. This family is constitutively activated in many human pancreatic cancers. DHMEQ inhibits NF- κ B activity by preventing nuclear translocation and has been shown anti-tumor effect. However, because of its hydrophobic property, DHMEQ has to be administered intraperitoneally or subcutaneously every day. Therefore, it is necessary to develop effective drug delivery system (DDS) of DHMEQ for clinical application. We used PMB to formulate DHMEQ and this formulation showed good stability and anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*. In AsPC-1 tumor-bearing mice, DHMEQ-PMB intravenous injection group (every three days) showed higher anti-tumor effect than control group (intraperitoneal injection of DHMEQ-CMC suspension, every day).

革新的生体ナノイメージング技術による繊毛疾患の分子機構解明

研究代表者：愛知教育大学 上野 裕則

1. 研究の概要

今年度は主に病気や疾患を持ったマウスを作成し、疾患の細胞運動パラメータを得ることを目標とした。これは、疾患によって破綻する細胞運動を定量的に記録・解析することで、将来的には疾患の分子機構解明や病気の診断にも応用したいと考えている。今年度の研究成果として、気管支炎モデルマウスの作成に成功し(慶応義塾大学、松田祐子先生との共同研究)、また、水頭症や気管繊毛に異常を示すノックアウトマウスの作成にも成功した(大阪大学、濱田研究室篠原助教との共同研究)。さらに、精子の鞭毛運動にも研究範囲を広げ、鞭毛運動の解析や構造解析も行うことができた。

2. 研究の背景と目的

真核生物の繊毛・鞭毛は、気管や精子をはじめ、ほぼすべての細胞に存在しているため、繊毛運動の異常は様々な疾患に関わる。申請者は昨年、ナノスケールの蛍光粒子を用い、マウス気管組織の繊毛運動の定量化(波形、振幅、周波数)、及び気管内腔組織表面の流体を高精度(7-9nmの空間分解能)で解析する系を確立し、さらにクライオ電子線トモグラフィ法により繊毛内部の3次元構造を明らかにすることにも成功した。しかし、これらはすべて健常のマウスを使った研究であった。今年度は主に病気や疾患を持ったモデルマウスを作成し、昨年開発した同様の系で解析を行い、健常マウスから得られたデータとの比較を行いたいと考えた。これは、通常の繊毛運動の定量データを基に、病気による繊毛運動の変化から、疾患による運動破綻のプロセスを数値で導き出し、将来的には疾患の分子機構解明や病気の診断にも応用したいと考えている。

3. 成果

本年度は気管支炎モデルマウスの作成、繊毛の構成分子のノックアウトマウスの作成、精子鞭毛の構造解析を行った。以下、それらの具体的な成果について記述する。

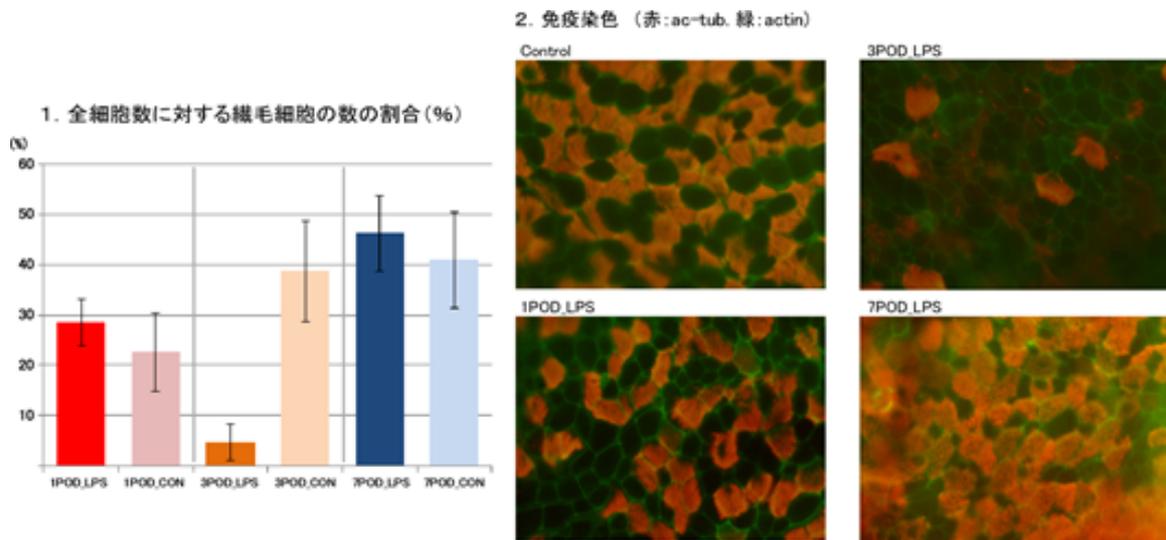
1. 気管支炎モデルマウスの作成

リポ多糖(LPS)をマウスの気管内腔に噴霧し、1日後、3日後、7日後にパラフォルムアルデヒドで固定後、アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色法によって気管組織の繊毛を可視化した。また、蛍光ファロイジンを用いてアクチン繊維を可視化し気管内腔組織の形態観察も同時に行った。その結果、LPS噴霧し1日後のマウスではほとんど変化が見られなかったのに対して、3日後では繊毛が抜け落ち、繊毛の観察される細胞の数は大きく減少していた(下図1)。LPS噴霧後7日目のマウスでは繊毛を持った細胞の数は回復して

いたものの、繊毛の長さが短くなり、未だ気管の炎症の効果が残っていることが分かった（下図2）。今後は、この気管支炎モデルマウスを用いて、昨年開発した繊毛運動の高精度解析、流体解析、及びクライオ電子線トモグラフィー法による繊毛の内部構造の3次元構造解析を行う予定である。この研究は慶應義塾大学医学部の松田祐子助教との共同研究である。

2. 繊毛内構成物質遺伝子のノックアウトマウスの作成

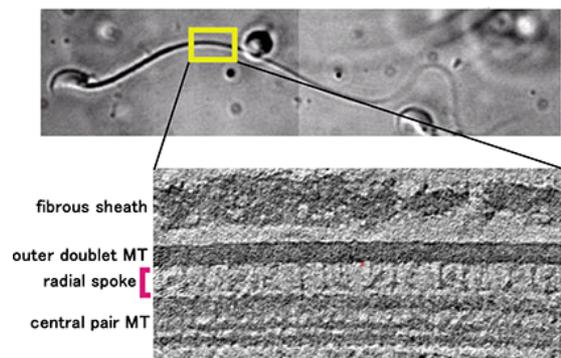
近年のプロテオミクス解析によって、繊毛内構成分子は約300程あることが分かっている。しかし、それぞれの分子がどのような機能を持っているかについては分かっていない。本研究では、繊毛内構成分子の遺伝子を欠失したノックアウトマウスを作成し、その表現系を詳



細に解析することによって、繊毛疾患の分子機構を解明しようと考えた。その結果、ある遺伝子を欠失したノックアウトマウスでは、水頭症を発症し、さらに気管の繊毛運動に異常が起こることが分かった。現在、繊毛内のどの構造に異常が現れるかをクライオ電子線トモグラフィー法を用い、気管繊毛内部の3次元構造解析を行うことによって明らかにしたいと考えている。この研究は大阪大学濱田研究室、篠原恭介助教と共同で研究を進めている。

3. 精子の鞭毛運動と鞭毛内部の3次元構造解析

精子は生殖に関わる細胞であり、精子の運動異常は不妊症などの病気に関わる。本研究ではマウスの精子鞭毛の運動を詳細に解析するとともに、精子鞭毛内部の3次元構造をクライオ電子線トモグラフィー法によって解析した。運動性の解析の結果、精子の中片部分と尾部では運動の周波数や波形が異なっていることがわかった。さらに精子鞭毛の3次元構造解析にも成功した（右図）。今後さらに詳細な構造解析が期待される。



Molecular mechanism of a ciliary disorder by bio-nano-imaging

Hironori Ueno
Aichi University of Education

Mucociliary clearance on the surface of the tracheal lumen is an important component of lung defense against dust mites and viruses. Fluid on the surface of the tracheal lumen flows from the lungs to the larynx as a result of effective ciliary motion. Though we developed the methods for nano-scale kinetics of ciliary motion and the three dimensional axonemal structure in the last year, we still don't know an influence of the disease such as bronchitis on ciliary function.

In this study, we examined the development of bronchitis mouse model using lipopolysaccharide (LPS) spray. In order to verify the LPS effect on respiratory cilia, we examined the immunofluorescence staining using anti-acetylated tubulin antibody, and also we stained actin filaments using phalloidin conjugated fluorescence to verify the cell shape in model mouse. Though respiratory cilia were remained on the ciliated cells after a day as the control experiment, most of them were missing from the ciliated cell after three days, whereas most of respiratory cilia were recovered on the ciliated cell after seven days. However, recovered cilia didn't have appropriate length. They seem to be shorter than it of the normal cilia.

Next, we also developed the knockout mice missing a gene of the ciliary components. The mice have abnormalities related to ciliary defects such as hydrocephalus. We will try to examine the ciliary motion using nano-precision imaging technic and the three dimensional structure by cryo electron tomography to clarify the missing component in cilia.

Finally, we are now examining the analysis of motion using high speed camera and three dimensional structure of mouse sperm flagella using cryo electron tomography. We already obtain the waveform and three dimensional structure of the sperm flagella, and compare with it of respiratory cilia to analyze the relationship between the structure and waveform of cilia and flagella.

フォトニック DNA プロセッサを用いた核酸機能の活性化制御

研究代表者：大阪大学大学院情報科学研究科 小倉 裕介

1. 研究の概要

多くの電化製品や機械では組み込み型のマイクロプロセッサにより電子制御が行われる。これと同様に、生体を構成する細胞系の計測や制御に対しても、その場で機能する組み込みナノプロセッサは有効であると考えられる。本研究では、光と DNA の特性を活用し、分子の計測、情報の処理、物理応答の三つの機能を集積化したフォトニック DNA プロセッサの開発を行っている。今年度は、ナノプロセッサのプログラミングに利用可能な、外部光信号による FRET 伝達の経路選択系を構築した。また、並列局所的なナノプロセッサ駆動のため、回折限界以下の光スポットのアレイを生成することができた。ナノプロセッサの物理応答の実装手法として、励起エネルギーの熱変換による DNA 放出機構の機能を示した。

2. 研究の背景と目的

生体を構成する細胞系は、多くの物質（分子）で構成された物理システムであると同時に、分子が情報キャリアとして働く情報システムとしても捉えられる。このような細胞系を効率的に計測・制御するためには、実体としての分子と抽象的な情報を一括して扱うナノプロセッサが有効である。DNA は結合や構造変化を高い精度で予測・制御することが可能であり、さまざまな生体分子との相互作用能力を有することから、ナノプロセッサの構成材料として優れている。ただし、分子のみの実装方式では分子系外部とのインターフェース機能が不足し、細胞形態等のマクロスケールで得られる情報をプロセッサ動作に反映させることは難しい。一方、細胞系は階層性をもったシステムであり、その理解には、さまざまなスケールでの情報を統合的に利用する仕組みが求められる。

我々は、ナノ世界（分子系）とマクロ世界の通信に光を活用したフォトニック DNA プロセッサの開発を進めてきた。光技術の活用により、時空間的な制御や適応制御、DNA 反応系の簡素化が期待される。その有望な実装方式である DNA スキャットホルド論理は、分子情報を入力、蛍光分子の励起／基底状態を出力とする分子論理演算法であり、足場 DNA 上への蛍光分子の配置と、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）により演算を実行する。本研究では、適切な時間、場所において所望の機能を得るプログラム可能性の実現のため、外部光信号により実行する演算を適宜設定可能な方式を開発する。また、核酸機能の活性化制御へ適用して性能を評価し、生体計測・制御のためのツールとしての能力を明らかにする。

3. 成果

DNA スキャットホルド論理による演算をプログラムする手法として、アクティベータ分子を用いた FRET の光制御系を2つ組み合わせ、制御光の波長による FRET エネルギー伝達の経路選択技術を構築した。図 1 に示すように、同一の DNA 構造体上に5つの蛍光分子を配置する。Alexa568 が共通のドナーとなっており、これより左側の系1と右側の系2のアクセプタ Cy5.5 および Cy5 の活性を、それぞれ対応するアクティベータ (Cy3 および Alexa405) を介して制御する。Cy5.5 のみを活性化したときには系 1、Cy5 のみを活性化したときには系 2 への経路が選択される。左右の系を順次アクティベートして各アクセプタからの蛍光強度を測定したところ、活性化した側の出力蛍光強度が高くなった。これは制御光の波長に依存して FRET 経路を選択できたことを示している。左右に異なる演算系を埋め込むことにより、外部信号による演算切り換えが実現できる。

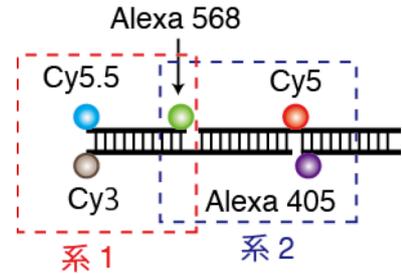


図 1 FRET 伝達経路選択系

ナノプロセッサを外部光でプログラムすることの利点は、同一ハードウェア (DNA) の遠隔操作により特定の時間・場所で所望の処理を実行できることにある。しかし、光をレンズで単純に集光する場合には、回折限界で制限されたサイズの単一の光スポットしか得られず、複数の極微小領域での制御に適さない。そこで、光の位相分布変調により、回折限界よりも小さな光スポットを多数生成することを試みた。位相分布設計は、反復最適化アルゴリズムに独自の拘束条件を導入して行った。一例として、「IPG」の形状のスポットアレイ生成の実験結果を図 2 に示す。サブ回折限界のさまざまなスポットアレイの生成を確認した。この技術の適用により、空間並列かつ領域限定的にナノプロセッサを駆動することが可能となる。

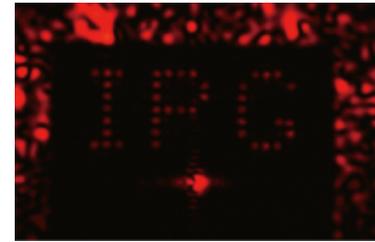


図 2 スポットアレイ生成結果

ナノプロセッサの出力は、レポーター分子の励起エネルギーとして得られる。このエネルギーは、蛍光放射による外界への情報伝送以外に、分子環境内での分子の機能制御にも利用できる。例えば、エネルギーの熱変換により、近傍の DNA を変性 (放出) できると考えられる。そこで、Black Hole Quencher (BHQ) を用いた局所的熱エネルギーの発生による DNA 放出について検討した。放出対象の DNA と BHQ を修飾した相補鎖 DNA で二本鎖を作製する。この機構を鎖交換反応に適用したところ、光照射により BHQ を励起すると反応速度が向上した (図 3)。この結果は、BHQ からの熱エネルギーが DNA 反応に寄与しており、ナノプロセッサの出力としての DNA 放出が可能であることを示している。

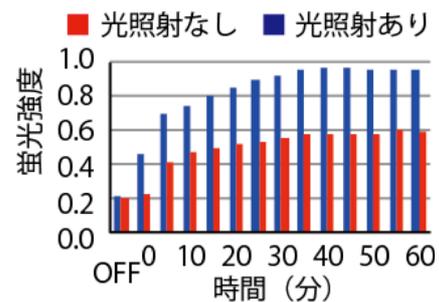


図 3 鎖交換反応における蛍光強度

Activation control of nucleic acids using photonic DNA processors

Yusuke Ogura

Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, Japan

A living organism is a physical system composed of many matters, and it is also considered as a sophisticated information system in which various molecules work as information carriers. Thus, an information system that can deal both with matters as real objects and with the associated information is useful to catch valuable information from the living organism or to control it effectively. As a solution we are studying about photonic DNA processors, which are capable of sensing biomolecular information in surrounding environment, computing the information, and actuating a physical action depending on the result. In the photonic DNA processor, light is utilized to bridge the molecular system (nano-world) and macro-world. In this project, we develop a photonic DNA processor whose operations can be programmed through external light signals and apply it to control of the activation of functional nucleic acids to demonstrate the capability of the processor as a tool for biological control.

DNA scaffold logic is a computing method based on self-assembly of fluorescence molecules according to molecular inputs and a signal transmission through fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the molecules. To achieve programming in the DNA scaffold logic, we developed a scheme for optical switching of FRET paths. The system consists of a common donor and two pairs of an acceptor and an activator. Because the energy transfers to activated acceptors, FRET path can be controlled by activating one of the acceptors selectively using external light with different wavelengths. Experimental results demonstrated that the output of the system was changed depending on the state of activation of the acceptors. This method can be applied to switch executed operations. To achieve such control of nanoprocessors in parallel and in local volumes, generation of suitable light patterns is important. We investigated a method for generating an array of light spots whose size was smaller than that determined by diffraction limit. An original algorithm was created to design phase modulation distributions for that purpose. Experimental results confirmed that a variety of sub-diffraction-limit spot arrays were generated in accordance with the design result.

We also constructed a method to activate a specific DNA by releasing it based on photothermal effect using black hole quenchers (BHQs) as a physical action in nanoprocessors. Double-stranded DNA composed of a strand modified with BHQs and its complimentary strand was prepared. This system was incorporated into a strand exchange reaction to confirm the validity. The reaction rate increased when the BHQs were excited to produce thermal energy. This result indicates that the thermal energy from the BHQs contributes to release and activate the specific DNA.

細胞環境を再現したフェムトリットル空間デバイスの創製と その生化学反応への展開

研究代表者：名古屋大学大学院工学研究科 加地 範匡

連携研究者：名古屋大学大学院工学研究科 馬場 嘉信

1. 研究の概要

本研究では、細胞と同程度の大きさを有する物理的空間を人工的に作り出し（フェムトリットル空間）、その中で生じる酵素反応のカイネティクスを解析することで *in vivo* における分子クラウディング効果の再現と検証を行った。これまでに再現性などの問題があった実験系を改善することで、フェムトリットル空間における各種パラメータを取得するとともに、単一の核を扱った研究へ応用するなど、新しい研究への展開を図った。

2. 研究の背景と目的

細胞1個が有する体積は、動物細胞で約 2 pL (2×10^{-12} L)、バクテリアでは約 2 fL (2×10^{-15} L) であり、このような極微小空間内で様々な化学・生化学反応が時空間的に制御された形で行われている。このような「超精密機械工場」ともとれる細胞を人工的に再現した系を構築し、生命機能の本質にせまるべく、これまでに微細加工技術により数十 μm 角の細胞程度、もしくは数百 nm 角のミトコンドリアをはじめとしたオルガネラ程度の空間場を作製し、分子の拡散が極度に制限された空間内で生化学反応がどのような影響を受けるのかを酵素反応速度を通じて解析を行ってきた。また、このような微小空間を用いた系と同時に、分子クラウディング剤を用いて細胞内環境を再現した系でも同様の実験を行い、比較検討することで、反応体積の制限が生化学反応に関わる各種パラメータ取得を目指した。

本年度は、初年度に確立してきた β -galactosidase (β -gal) の実験系の改善とともに、分子クラウディング剤を用いたバルク系での検討、さらにはマイクロチャンバードバイスの新しい利用法として、単離した核を解析する「場」として試みた。また、領域内共同研究として、名古屋大学の檜田先生とモレキュラービーコンを用いた核膜経由の物質輸送機構に関する検討を進めた。東京大学の石原先生・井上先生とは、MPC ポリマーで被覆された量子ドットの脂肪細胞由来幹細胞に対する毒性試験を行った。

3. 成果

これまで β -gal の基質として FDG (di-*O*- β -galactoside) を用いて酵素反応速度の測定を行ってきたが、これにはいくつかの問題点があった。ひとつは FDG が β -gal により加水分解されて Fluorescein が生成する過程は2段階反応であり、中間体である FMG (mono-*O*- β -galactoside)

もわずかではあるが蛍光を発すること、また 2 段階反応であるため、Fluorescein の生成に時間がかかることなどがあった。マイクロ・ナノチャンバーデバイスを用いた 1 分子酵素反応速度解析においては、測定時間の延長に従う蛍光の褪色が測定精度に大きな影響を与えることから、短時間で生じる 1 段階反応の結果を即時に計測できる系の方が望ましいため、基質を FDG から TG- β Gal (2-Me-4-OMe TokyoGreen *O*- β -galactoside) に変更することとした。その結果、酵素反応測定 5 分程度でも、十分な蛍光強度すなわち最大の酵素反応速度に達したため、これまでよりも精度の高い測定が可能となった。

バルク系の実験としては、これまでは分子クラウディング剤として PEG8000 や PEG20000 などを用いてきたが、PEG そのものが水の活性を低下させたり、酵素分子と相互作用を生じる可能性を否定できなかったため、Ficoll (平均分子量 400) を用いて酵素反応速度への影響について検討を行ったが、PEG を用いた際のような顕著な代謝回転数 V_{max} の低下やミカエリス定数 K_M の増加といった傾向は見られなかった。このことから、PEG そのものが水の活性に影響を与えることで酵素活性に間接的に影響を与えていることを明らかとした。

このような単一酵素分子を扱った実験の他に、新しいマイクロチャンバーデバイスの利用法として、細胞から単離した「核」を単一核レベルで各チャンバーへ配置することにより、核膜を介した物質輸送機構解明の実験に利用できないか検討を進めた。細胞として、白血病細胞株である HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) を用い、核単離試薬 (Nuclei EZ Prep, Sigma-Aldrich 社) を用いて核を単離することで、GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)の mRNA が核膜を介してどのようなカイネティクスで移行しているのかをモレキュラービーコンを用いて検出した。設計したモレキュラービーコンに相補的な配列をもつオリゴマーとランダム配列を有するオリゴマーや細胞から抽出した total RNA を添加したところ、蛍光の回復が確認された。(名大・樫田先生との共同研究)

また、MPC ポリマーで被覆された量子ドットの脂肪細胞由来幹細胞に対する毒性試験 (生存試験、増殖試験) を行った結果、特に量子ドット濃度上昇に伴う毒性は観察されず、逆に好意的に働いている例も見られた。これは、表面を被覆している MPC ポリマーに修飾されたアルギニンの影響が、量子ドットからの漏出するカドミウムの影響を上回った可能性が考えられる。(東京大学・石原先生、井上先生との共同研究)

以上、本新学術領域における公募研究、さらには領域内共同研究を通して、フェムトリットル空間で生じる酵素反応に関する各種パラメータを取得するとともに、新しい生化学反応 (核膜輸送機構) への展開を行い、ナノ粒子のナノメディシンとしての臨床応用を視野に入れた毒性評価を行うことで、ナノメディシンの新しい展開に寄与した。

Development of femto-liter space devices mimicking intracellular environment and its application for biochemical reaction

Noritada Kaji and Yoshinobu Baba

Department of Applied Chemistry, Nagoya University, Japan

Micro and nanometer-scale chamber array on a chip becomes a powerful new tool for bioanalysis since it could stochastically capture and measure biomolecules at a single molecule level. This experimental concept was introduced and elucidated by Prof. Noji at 2005 and applied for single molecule enzymology and measurements of ATP synthesis by F1-ATPase. This kind of small science inspires us proceed a next step of micro and nanofluidic research since at nearly the same time we had developed nanospace-based nanopillar array chips for high-speed DNA and protein separation. Our fundamental interests are how reaction-space size affects an enzyme activity and how small space we could extrapolate enzyme kinetics in small space from old enzyme kinetic data in bulk. So we have measured a single β -galactosidase activity in various sizes of micro and nanochambers, from 5 μm to 500 nm cubic, and found that the activity gradually decreased according to its chamber size. Because the specific surface area increases according to the decrease of the chamber volume, non-specific adsorption might be a factor to suppress the activity. However, several experiments including surface coating and repetition of the enzyme capturing elucidated that non-specific adsorption is not a major factor affecting the activity. To discuss these unexpected results of the enzyme activity in the small cavity, molecular crowding effect which confine the diffusion of enzyme molecules and change water activity in bulk was also investigated.

Another application of micro and nanochamber array was for a single nucleus analysis. In the field of gene delivery systems, it is still unknown that virus vector showed much higher transportation efficiency of plasmid DNA from cytoplasm to nucleus in contrast to non-virus vectors. To improve gene transportation efficiency, which directly lead to increase transfection efficiency, gene transportation mechanism through nucleus membrane should be cleared. But unfortunately there are no experimental protocol to quantitatively evaluate the transportation efficiency through the nucleus membrane. So, in this study, nuclei were extracted from cells by gentle detergent treatments and captured into a PDMA or PMMA microchamber at a single nucleus level. After the confirmation of capturing a single nucleus into a microchamber, nucleotides and nuclear membrane stained nuclei, transportation of mRNA by molecular beacon were observed.

These micro and nanochamber-based experimental system would bring a new insight of a single molecule science.

固液界面におけるタンパク質間相互作用に及ぼす 分子クラウディングの影響

研究代表者：広島大学大学院医歯薬保健学研究院 加藤 功一

分担研究者：広島大学大学院医歯薬保健学研究院 平田 伊佐雄

1. 研究の概要

生命活動の維持において、酵素反応やシグナル伝達、転写制御などのタンパク質間相互作用が重要な働きを担っている。これらの相互作用は、希薄系と濃厚系で反応性が変動する場合があることが知られている。例えば、多種類の生体分子が高濃度に溶解した分子クラウディング状態にある細胞内の環境下では、結合定数や反応速度が大きく変動すると推測される。我々は、細胞内の固液界面に焦点を当て、分子クラウディングが反応挙動に及ぼす影響を調べてきた。今年度は分子クラウディング剤の種類・固定化抗原の配向性および可動性が、拡散速度および複合体形成速度などの動力学に大きな影響を与えることを見出した。

2. 研究の背景と目的

細胞内の環境は多種類の生体分子が高濃度に溶解した分子クラウディング状態にある。このような環境下でさまざまなタンパク質間相互作用が効率よく起こることによって細胞システムは機能する。クラウディング環境下では、クラウディングの程度の上昇につれて、特定の種類のタンパク質の活量は増大する。一方、反応の動力学の観点では、反応分子の拡散速度が大幅に低下するため、拡散律速の反応では反応速度が低下するものと考えられる。したがって、細胞の振る舞いをより深く理解するには、これまで分析の中心であった希薄系でのタンパク質間反応ではなく、クラウディング環境下におけるタンパク質間反応について理解を深めることが極めて重要である。

細胞内では、細胞質中に溶存するタンパク質間の反応以外に、固液界面での反応も数多く存在する。例えば、不溶性の分子集合体である細胞骨格分子に輸送タンパクや細胞接着分子と複合化したアンカータンパクが結合する。また、リガンドの結合によって活性化された受容体の細胞内ドメインは細胞膜にアンカーリングされており、それにアダプター分子が結合することによって細胞内にシグナルが伝達される。これらの固液界面におけるタンパク質間の反応は生命活動にとって重要な意味をもつが、クラウディング環境下で起こる点についてはあまり注目されてこなかった。そこで本研究では、細胞内における固液界面でのタンパク質間相互作用に焦点を当て、分子クラウディングが反応の静的および動的挙動に及ぼす影響を調べることを目的とした。

3. 成果

表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析装置および解析プログラムは自作品を用いた。SPR センサーチップの金蒸着表面に自己組織化単分子膜(SAM)処理を行った。HS-(CH₂)₁₁-COOH およびエチレングリコール鎖(EG)を分子内に有する HS-(CH₂)₁₁-EG₃OH と HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OCH₂COOH を混合した溶液を用いて 2 種類の SAM(SAM-COOH, SAM-EGCOOH)を作製した。この分子末端のカルボキシル基を水溶性カルボジイミドおよび *N*-ヒドロキシスクシンイミドで活性化した。固定化する抗原として EGF (rhEGF-AF, Wako)と EGF-His (遺伝子導入大腸菌を培養後、抽出・精製)、抗体として抗 EGF 抗体 (MAB636, R&D System)を用いた。EGF 固定基板は、活性化した基板を 10 μg/mL の EGF 溶液に浸漬して作製した。EGF は分子中に複数存在するアミノ基を介して活性基と結合することで非秩序に固定化される。EGF-His 固定基板は、活性化した基板を 10 mM *N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid 溶液に浸漬して、表面に NTA 基を導入し、40 mM NiSO₄ 溶液を用いて Ni²⁺を NTA 基にキレートした後、10 μg/mL の EGF-His 溶液に浸漬して作製した。

ポリエチレングリコール (PEG 600, Wako, Mw = 8300)、dextran 70 (dextran, 東京化成, Mw = 70,000)、Ficoll PM70 (Ficoll, GE Healthcare, Mw = 70,000)を Dulbecco's Phosphate Buffered Saline に 0~10 wt%の濃度で溶解し、クラウディング溶媒とした。クラウディング溶媒に溶かした 2 μg/mL の抗体を抗原固定基板上に流し、SPR を用いて固定化抗原と抗体の結合・脱離過程を追跡した。

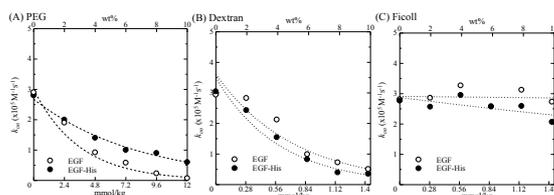


図 1. SAM-COOH 上での抗 EGF 抗体結合速度定数。
クラウディング剤 (A) PEG、(B) dextran、(C) Ficoll.

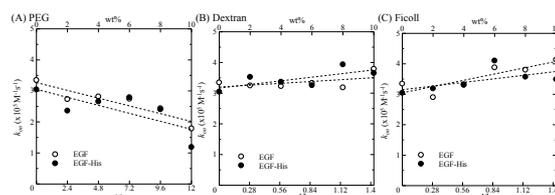


図 2. SAM-EGCOOH 上での抗 EGF 抗体結合速度定数。
クラウディング剤 (A) PEG、(B) dextran、(C) Ficoll.

EG 鎖の可動性により、SAM-EGCOOH は固定化抗原が向きをある程度自由に変えることができ、これよりクラウディング環境下での EGF と抗 EGF 抗体との結合反応について、固定化抗原の向きが固定化されている SAM-COOH と異なると予想された。そこで、SPR 分析法を用いて、この結合反応について動学的解析を行った。これまでに報告した SAM-COOH の結果 (図 1) では、結合速度定数 (k_{on}) はクラウディング剤の濃度が高くなるにつれて低下し、その程度はクラウディング剤の種類によって異なっていた。これは、クラウディング剤が抗体の移動を妨害するからであると考えられた。今回報告する SAM-EGCOOH の結果 (図 2) では、 k_{on} の低下は PEG 溶媒において観察されたが、その減少量は SAM-COOH と比べて緩やかとなった。また、また、dextran 溶媒と Ficoll 溶媒においては、 k_{on} の変化は小さく、若干の増加傾向が示唆された。このことは、表面に固定化された抗原の可動性が分子クラウディング環境下において k_{on} の低下を抑制することを示し、また、 k_{on} を少しながら増加させる可能性を示唆した。

以上のように、分子クラウディング剤の種類および固定化抗原の可動性が、拡散速度および複合体形成速度などの動力学に大きな影響を与えることが示唆された。

Effect of macromolecular crowding on antigen-antibody interactions at solid-liquid interfaces

Koichi Kato and Isao Hirata

Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan

The condition of macromolecular crowding is that macromolecules are dissolved at high concentrations. In the environment of molecular crowding, excluded volume effects of macromolecules alter activities of particular proteins, and then these reaction rates are subject to influence. There are a number of reactions at the microscopic solid-liquid interfaces in the internal of cells. The aim of this study is to analyze the molecular crowding effect on protein interactions at solid-liquid interfaces. We used here a surface plasmon resonance (SPR) analytical method for antigen-antibody interactions at an interface under macromolecular crowding conditions.

As a model surface, we prepared SAM-COOH and SAM-EGCOOH for surface-immobilization of antigen. SAM-COOH, as a monolayer of HS-(CH₂)₁₁-COOH, forms a rigid layer. And SAM-EGCOOH, as a mixed-monolayer of HS-(CH₂)₁₁-(OCH₂)₆-OCH₂COOH and HS-(CH₂)₁₁-(OCH₂)₃-OH, forms flexible tethers on a rigid layer. EGF and EGF-His were used as an immobilized antigen. After introducing and activating of carboxyl groups on the SPR chips, EGF or AB-NTA was immobilized. The NTA introduced chips were treated with Ni²⁺, and EGF-His was immobilized by chelating His-tag to Ni²⁺-NTA. On SAM-COOH, immobilized EGF was non-oriented, but EGF-His was oriented. On SAM-EGCOOH, EGF and EGF-His were immobilized with a flexible linker EG. Poly(ethylene glycol) (PEG; Mw = 8300), dextran (Mw = 70,000), and Ficoll (Mw = 70,000) were used as a crowding agent at a concentration of 0, 2, 4, 6, 8, and 10 wt% in phosphate buffered saline.

The association and dissociation processes of anti-EGF antibody on the EGF immobilized surfaces under crowding environment were measured by SPR. From these results, we obtained association rate constants (k_{on}). On SAM-COOH, k_{on} decreased with an increase in the concentration of the crowding agent. On SAM-EGCOOH, k_{on} decreased with an increase in the concentration of PEG, however this trend was not obvious than on SAM-COOH. And, in Dextran and Ficoll medium, k_{on} did not decrease clearly but rather slightly increased.

It was suggested that the crowding agents and the mobility of the immobilized antigen affect the kinetics of such antigen-antibody interactions.

抗原ペプチドナノファイバーの形態に由来するキャリア機能探索と樹状細胞機能の理解

研究代表者：京都工芸繊維大学工芸科学部 田中 直毅

1. 研究の概要

がんペプチドワクチン療法は、患者への負担や副作用が小さいことから、従来法に代わる新たながん治療法として注目されている。効率的ながん免疫誘導のためには、抗原ペプチドを抗原提示細胞の細胞質に送達することが重要である。本研究では、ペプチドナノファイバーを用いた抗原デリバリーシステムの開発に取り組んだ。本年度は、線維長の異なるナノファイバーを作製し、線維長が細胞取り込みに与える影響を評価した。その結果、線維長の長いナノファイバーはエンドサイトーシス機構で取り込まれるのに対して、短いナノファイバーは細胞膜を直接透過して細胞内へと取り込まれることを明らかにした。

2. 研究の背景と目的

薬物や抗原をターゲット細胞に効率的に送達するデリバリーシステムの構築を目的として、高分子ナノ粒子やリポソームなどの球状キャリアの開発が活発に進められてきた。一方で近年、キャリアの形態は①体内動態、②細胞による取り込み、③細胞内での局在などに影響を与える重要な因子であることが明らかとされ、球状のみならず異方性形態を持つナノ構造体が DDS キャリアとして注目されている。しかし、その報告例は少なく、形態とキャリア機能との相関に関する知見はまだ十分に蓄積されていない。

我々は、①高いアスペクト比、②設計の自在性および③生体適合性を有する点に着目し、 β -シートペプチドの自己組織化により形成するペプチドナノファイバーを異方性キャリアとして選択した。本研究では、ナノファイバーの形態に基づく新規な DDS キャリア機能を探索するとともに、その得られた知見を基にした新規な抗原デリバリーシステムを開発することを目的とした。具体的には、 β -シートナノファイバーの構造を精密に制御し、その形態や構造の違いが抗原提示細胞との相互作用（取り込み機構や細胞内動態）に与える影響について詳細な評価を行った。特に本年度は、線維長の異なるナノファイバーを作製し、線維長が細胞取り込みに与える影響を評価した。

3. 成果

β -OVA-EG₁₂ ナノファイバーの線維長制御

ナノ会合体のビルディングブロックとして、線維形成配列 (FVIFLD) に抗原配列 (SIINFEKL) と親水性鎖 (オリゴエチレングリコール, 12mer) を導入した β -OVA-EG₁₂ ペプチドを設計した。この

β -OVA-EG₁₂ ペプチドと蛍光基を導入した β -OVA-EG₁₂-FAM ペプチドを PBS 中 1:19 のモル比で混合し、60°C で 24 時間インキュベートすることでおよそ数 μ m オーダーの長さを持つ蛍光ラベル化 β -OVA-EG₁₂ ナノファイバー (NFs) を調製した。さらに、この NFs 分散液を孔径 1.2、0.45、0.20、0.02 μ m のシリンジフィルターで濾過することで、それぞれ 810 \pm 460、280 \pm 210、120 \pm 90、40 \pm 20 nm の平均線維長を持つ NFs を作製した。

線維長が細胞取り込みに与える影響

線維長の異なる 4 種類の β -OVA-EG₁₂ NFs (810、280、120、40 nm) を用いて、線維長の違いが細胞取り込みおよびその経路に与える影響を評価した。具体的には 4 種類の NFs を PBS 中で RAW264 細胞に取り込ませ、その取り込み量をフローサイトメーターにより評価した。さらに、無血清培地 (FBS (-)) および血清含有培地 (FBS (+)) 中での取り込み試験を行い、培地中の成分が β -OVA-EG₁₂ NFs の取り込みに与える影響について評価した。PBS、FBS (-) 中での取り込みは多い順に 280 nm = 120 nm > 40 nm > 810 nm であった。一方で、FBS (+) 中での細胞取り込みは線維長に因らずほぼ一定の値を示し、一樣に取り込み量が少なかった。以上より、NFs の細胞取り込みはその線維長に依存することが確認された。

次に、線維長の異なる NFs (810、280、120、40 nm) の細胞取り込み経路を調べることを目的として、エンドサイトーシス阻害剤が細胞取り込みに与える影響について評価した。NaN₃ 溶液中で 30 分プレインキュベートした RAW264 細胞に、各線維長の NFs を終濃度 50 μ M で 30 分取り込ませ、洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。エンドサイトーシス阻害条件下において、120、280、810 nm の NFs を取り込ませた場合、蛍光は主に細胞表面からのみ観察され、内部からの蛍光は観察されなかった。この結果より、120、280、810 nm の NFs は主にエンドサイトーシス経路で取り込まれていることが示された。一方、興味深いことに 40 nm の NFs はエンドサイトーシス阻害条件下においても確かに細胞内に取り込まれていることが認められた。以上の結果より、線維長の違いは NFs の細胞取り込み経路に大きく影響を与えることが示された(Fig. 1)。言い換えると、NFs の線維長によって、取り込み経路を合目的的に制御することが可能であることが示された。さらに、小角 X 線散乱、赤外分光、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡により、 β -OVA-EG₁₂ NFs の構造解析を詳細に行ったところ、NFs はフィラメント状ミセルのような円柱構造ではなく直方体構造をもち、親水性面と疎水性面の両方をもつ特殊な表面をもつことが示唆された。このような両親媒性の表面構造が β -OVA-EG₁₂ NFs の細胞取り込みに影響を与えていると考えられる。

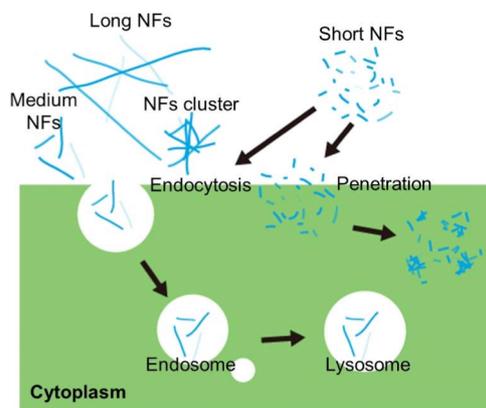


Figure 1. Schematic illustration of cellular uptake pathway for β -OVA-EG₁₂ nanofibers (NFs) with different length.

Novel Bio-function of Antigen-loaded Peptide Nano-assemblies with Anisotropic Morphology

Naoki TANAKA

Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology

Non-spherical particles, such as nanorods, nanotubes, and nanofibers, have attracted much attention as drug delivery carrier, since the particle shape may have a profound effect on their biological properties, such as bio-distribution, cellular uptake, and intracellular localization. Although the importance of controlling particle shape for nanomedicine applications is recognized, there still is a lack of systematic and fundamental understanding of how shape affects the biological properties.

Synthetic immunogenic peptides are ideal vaccine subunit components for cancer immunotherapy due to advances in safety, stability, and design. However, peptides on their own tend to be weak immunogens when administered alone. Cytoplasmic delivery system of antigenic peptides has been required for effective cancer immunotherapy. In this study, we develop the direct cytoplasmic delivery system of antigenic peptides by using β -sheet peptide nano-assemblies as carriers. The preparation of antigenic peptide-loaded nanofibers by self-assembly of β -sheet peptide containing T-cell epitope and hydrophilic block, and their cellular uptake are reported.

The building block peptides consisted of four minimum essential elements, and were designed as a simple model for the construction of antigenic peptide-loaded nanofibers. They were composed of a β -sheet forming block (FVIFLD; β), an antigen block (257 SIINFEKL 264 ; OVA $_{49-57}$), a flexible-linker block (GSG), and a hydrophilic block (oligo(ethylene glycol); oligo(EG) $_{12}$). The β -OVA-(EG) $_{12}$ solution in PBS was incubated at 60 °C for 24 hours, nanofibers with a length of a few micrometer were formed. The length of β -OVA-EG $_{12}$ was controlled to 810 ± 460 , 280 ± 210 , 120 ± 90 , and 40 ± 20 nm by extrusion through membrane filters with pore diameter 1.2, 0.45, 0.20, and 0.02 μ m, respectively. We investigated the effect of nanofiber length on their cellular uptake by RAW264 cells and the cellular internalization pathway. The amount of cellular uptake was significantly affected by the length of the nanofibers. Interestingly, the short nanofibers with a length of 40 nm was internalized by non-endocytosis pathway, in contrast that the longer nanofibers with a length of 120 nm – 800 nm via endocytosis pathway. The size-regulated peptide nanofibers are expected to be useful as a novel delivery carrier of antigenic peptides into cytoplasm of antigen-presenting cells.

人工細胞系に構成した細胞膜受容体・細胞骨格 複合ナノ装置の動作解析

研究代表者：三重大学工学研究科 湊元 幹太
連携研究者：名古屋大学理学研究科 瀧口 金吾

1. 研究の概要

細胞膜は、刺激の受容・応答、細胞内伝達の開始経路、などの現象で重要である。組換え膜タンパク質を挿入した人工界面により細胞膜機能の再構成をする手段の実現を試みている。細胞サイズの脂質2分子膜ベシクル（巨大リポソーム）に、膜受容体などの膜タンパク質を搭載したバキュロウイルス粒子を膜融合させ、膜機能をモデル膜に付与することを試みた。今年度は、昨年度に引き続き人工細胞系構築に適したリポソーム作製法の検討を行い、本研究で作出した膜受容体インテグリンをそのリポソーム膜に組込んだ。関連して、巨大リポソームを用い、内水相へのタンパク質封入の効率化、シグナル経路下流の膜酵素の組込み実験、にも取り組んだ。

2. 研究の背景と目的

巨大リポソーム膜に、細胞情報の受容/応答を行う膜タンパク質の一群（膜貫通受容体・細胞骨格など）からなるナノ分子システムを構築・研究することをめざしている。人工細胞モデルとして巨大リポソームに目的の膜タンパク質を（複数）組込むには、タンパク質の発現・精製、可溶化、2分子膜への再構成、というステップが必須であった。代表者らが発明した「組換えバキュロウイルス-膜融合によるプロテオリポソーム作製法」（特許 5266459（平 25.5.17）、US8563291 B2 の関連技術）では、cDNA 情報を利用し昆虫培養細胞で発現した組換え膜タンパク質をバキュロウイルス出芽粒子(budded virus, BV)に搭載された形で回収し、リン脂質膜へ膜融合させることで組み込める。昨年度に引き続き、今年度は、巨大リポソーム膜への膜受容体組込の直接観察、関連技術のリポソーム内水相への物質封入の特性調査、などにより本手法の可能性を広げることをねらう。最終目標として特にインテグリンを中心とする経路に着目し、人工細胞システムを設計する。具体的には、従来の静置水和法に加え、界面通過法（張合せ法、droplet-transfer 法）で調製した巨大リポソームを用いて BV の膜融合特性を調べた。さらに、膜タンパク質組込可視化、エフェクター活性評価、タンパク質封入を検討した。

3. 成果

組換え BV 感染 Sf9 細胞の培養上清からショ糖密度勾配遠心分離により、正常粒子と異常粒子（脱核粒子）の 2 画分に BV を分別回収、エンベロープを蛍光標識（R18）した。界面通過リポソーム（calcein で内水相標識）と BV との膜融合の pH 依存性を共焦点顕微鏡で調べ、融合曲線を得、膜融合に BV のもつ融合誘起因子 GP64 の活性が関わることを確認した。正常粒子と異常粒子の融合能の比較も行った（投稿準備中）。組換え膜タンパク質の逐次組込みへ活用しやすくなった。

膜受容体を構成するプロテオリポソーム調製の可視化確認も進展した。蛍光タンパク質タグ FP（TagRFP、TagGFP2 等）を同じ読み枠で繋いだ膜タンパク質遺伝子を組換えたウイルスを作り、回収した組換えタンパク質の BV への搭載と、膜融合によるリポソーム膜への組込み、を可視化確認できる。末端に FP を融合した膜貫通タンパク質遺伝子を複数組換え、BV として回収、蛍光、ウエスタンブロットにより発現を確認した（GP64（N 末）、GPCR（ADRB2、CRHR1）、ADCY6、ITGA2、ITGA3、ITGB1（以上 C 末））。

pH(4-5) 処理で GP64 を活性化し、BV を巨大リポソームへ膜融合、CRHR1、ADCY6、ITG の膜への組込みを直接観察した（図）（論文業績 2 および投稿準備中）。

本方法により受容体膜経路の終端に位置するエフェクタータンパク質の 1 つ、ADCY6（cAMP 合成酵素）の構成を行った。基質封入リポソームと出芽ウイルス粒子とを融合させ得たプロテオリポソームを用い活性を検出した（論文業績 2）。

界面通過法と異なり封入効率の低い静置水和法は、しかし、安定な脂質 2 分子膜をもつ巨大リポソームを得る簡便法として、今なお有用性・重要性が高く、封入効率を高める研究が広くなされている。水和時の pH を目的タンパク質の pI を跨ぎ調節し脂質膜への結合を促すことで、内水相封入の効率化が可能なることを明らかにした（論文業績 1）。

今後の課題として、①培養方法やプロモーター改変による BV 発現タンパク質量の検討、②受容体上下流の関連因子の相互作用系の構築、がある。さらに、組込まれた膜タンパク質機能に特徴的な膜のダイナミクスを引き出せるか、挑戦する。細胞外基質に見立てた環境におけるペプチドリガンドとインテグリン α 、 β 再構成膜との相互作用の解析、内水相への FERM タンパク質封入と再構成リポソーム膜との相互作用の解析、などを行えるモデル実験系の構築に引き続き取り組む。

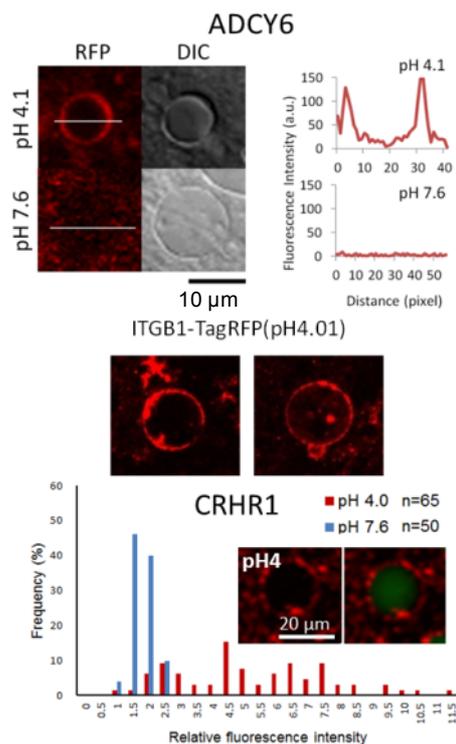


図. 膜タンパク質構成巨大リポソーム

Reconstitution of nanomachinery with membrane receptor/cytoskeletal elements on artificial cell systems

Kanta Tsumoto
Kingo Takiguchi*

Graduate School of Engineering, Mie University, Japan

** Graduate School of Science, Nagoya University, Japan*

Cell membrane proteins are important because extracellular signals are received and transmitted with the proteins on the interfaces. To investigate such biochemical and biophysical functions, giant liposomes (giant unilamellar vesicles (GUVs)), which have cell-sized diameters, have been used recently for reconstitution of cell membrane proteins as artificial cell systems. Particularly, researchers have a great interest in reconstitution of biological functions that would be expressed by multi-component protein systems related to cell-cell and cell-matrix communications. Transmembrane protein receptors are also interesting because of their work in transfer of cell signal molecules over such biological membrane interfaces. In the present project, we attempt to GUV-based artificial cell systems in which recombinant membrane proteins are reconstituted into a functional bio-nanomachinery. We have here selected model transmembrane proteins including G protein coupled receptors (GPCR), extracellular matrix receptors (integrin (ITG) α/β) or membrane enzyme effectors (adenylate cyclase (ADCY)) for the present demonstration. We used our novel method based on a baculovirus (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV)) /insect cell (Sf9) gene expression system that would enable us to prepare proteo-GUVs containing such desired recombinant membrane proteins.

First, we examined membrane fusion between baculovirus budded-virus particles (BVs) and droplet-transferred GUVs through direct observation on single GUVs using a confocal laser scanning microscope (CLSM) and obtained the fusion profiles of both intact and capsid-free BVs that showed the membrane fusion was caused by their GP64 activated under acidic conditions (pH 4-5). Second, we demonstrated that fluorescent protein-tagged (TagRFP, TagGFP2) transmembrane proteins were incorporated into membranes of giant liposomes that were generated using the droplet-transfer method or the gentle hydration (natural swelling) method; GP64 (in N-terminus) and GPCR (ADRB2, CRHR1), ADCY6, ITGA2, ITGA3 and ITGB1 (in C-termini) were directly observed on GUV membranes using CLSM. In addition, we verified enzymatic activities of recombinant ADCY incorporated to giant liposomes. Finally, we developed a procedure for efficient entrapment of proteins into inner phases of GUVs generated with the gentle hydration by switching pH of hydration solutions around the pI of such target proteins. The improvement would be of use to reconstitution of artificial membrane models.

幹細胞制御機能を有するタンパク質担持基材の分子設計

研究代表者：富山大学先端ライフサイエンス拠点 中路 正

1. 研究の概要

幹/前駆細胞の増殖や分化の厳密な制御に有効な「タンパク質担持材料（タンパク質－高分子複合体）」において、基材に担持させたタンパク質の細胞への作用に関して理解できていない部分が数多い。そこで、生物学的評価と分光学的評価を併用して、基材担持タンパク質の細胞制御メカニズムの全容を理解することを目的とした。これまでに仮説として言われてきた、シグナル伝達の連続性・継続性とそれに伴う効率的な細胞制御について実験的に立証することができた。加えて、担持タンパク質は、徐々にではあるが、細胞内へ取り込まれていること、そして、取り込まれることにも大きな意義があることを突き止めた。

2. 研究の背景と目的

再生医療の発展に向けた幹細胞の利用において、幹細胞の機能を厳密に制御できるような技術開発が必要不可欠である。本研究者は、幹細胞の自在な制御を目指し、機能タンパク質を担持させた材料創製に関する研究に取り組み、タンパク質担持材料を用いることで、幹細胞の増殖や分化を効率良く制御できることを見出した。

しかしながら、タンパク質担持材料を用いることによって細胞機能を効率良く制御できる理由について、すべてが明らかになっているわけではない。これまでに我々は、(i) 安定したアンカーリング、(ii) レセプターと反応しやすい向きでのアンカーリング、そして、(iii) アンカーリングに伴う活性維持の三点が、担持タンパク質の有意性であることを明らかにした。しかしながら、タンパク質担持がどのような経緯で、溶液中での作用よりも優位に働いているのかなど、理解できていない部分が多々存在する。特に、有意性の一つとして考えられている、基材への担持によってタンパク質が細胞内に取り込まれにくくなることによって継続的なシグナル伝達が起こっているという点は、証拠が未だ存在しない。さらに、生物学的には、機能タンパク質は細胞膜受容体に結合後、取り込まれることによってはじめてシグナル伝達を行うと考えられており、2つの見解が大きく乖離している。この点は、担持タンパク質のメカニズムの不明瞭さととらえられ、タンパク質担持材料の実用化にとって足枷となる。

そこで本研究課題では、(1) 基材担持タンパク質の細胞への作用機序とシグナル伝達経路の解明、(2) 作用タンパク質の運命（細胞内への取込みの有無）といった担持タンパク質が細胞機能を制御するまでにたどる過程について、一連の流れを理解することを目的とした。

3. 成果

基材担持タンパク質の表面の状態

モデルとして用いた表皮増殖因子キメラタンパク質 (EGF-His) 担持表面を原子間力顕微鏡 (AFM) により観察した (Fig. 1)。その表面は、微細な凹凸が密に配列しており、その凸部の直径が、EGF の長軸方向の断面直径と類似する値であった。よって、これまで、MicroBCA から求めたタンパク質表面密度 ($349 \pm 22 \text{ ng/cm}^2$, $3.38 \text{ nm}^2/\text{molecule}$) から予想してきたように、EGF-His がアンカーリングにより密に配列していると考えられる。また、エリプソメトリー測定から、膜厚が $1.89 \pm 0.01 \text{ nm}$ と分かり、EGF-His は単層であると示唆された。

この二つの結果から、基材担持タンパク質は、単層で且つアンカーリングにより密に配列していると結論付けられた。

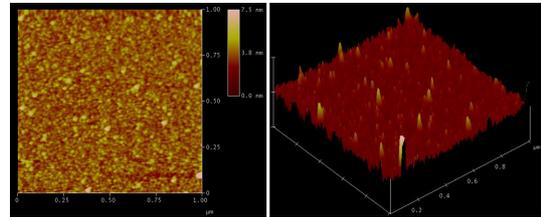


Fig. 1. AFM images of the substrate immobilized with EGF-His.

受容体と相互作用した担持タンパク質の追跡

昨年度までに、シグナル伝達の連続性・継続性に関して生物学的評価系を用いて立証してきた。特記すべき点として、EGF 受容体のリン酸化によるシグナル伝達の評価において、培養 4 日の細胞においてリン酸化量が大幅な減少する傾向が見られた点である。その現象が意味するものは何か、つまり、取込み阻害がシグナル伝達継続性につながっているが最終的には取込まれることによってシグナル量が減少しているのかを調べるべく、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) や共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) により担持 EGF-His の追跡を行った。

Fig, 2A および 2B●に示されるように、培養 21 h まででは、ほぼ減少が認められなかったのに対し、それを過ぎると明確な担持タンパク質の基材からの脱離が認められた。一方で、細胞を播種せず培養液中に存在させた場合では、ほぼ脱離は見られなかった (72 h で 1.5% 脱離)。

共焦点レーザー蛍光顕微鏡により、細胞内の A594-EGF-His の有無について追跡したところ、培養 2 日後あたりから、細胞内で赤色蛍光の輝点が観察され始め、その輝点が時間経過と共に増加することが分かった。これらの結果から、徐々にではあるが、細胞内へ担持 EGF-His は取込まれていることが判明した。

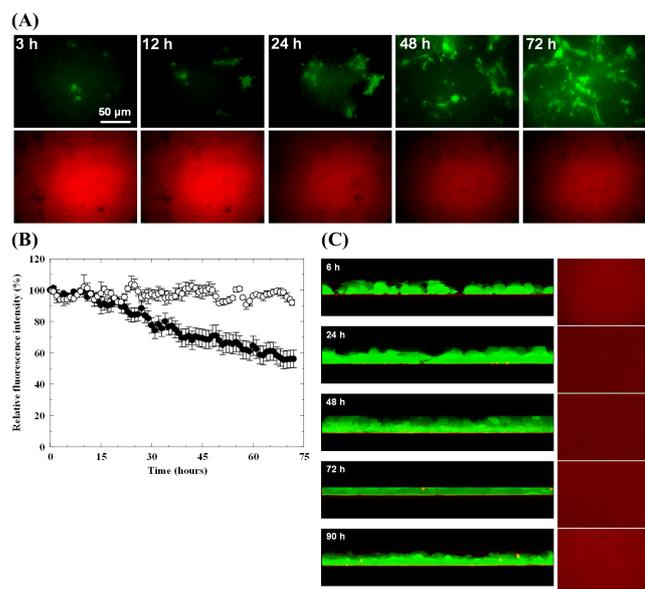


Fig. 2. (A) TIRFM images of EGFP-NSPCs (upper) and surface-immobilized A₅₉₄-EGF-His (bottom). (B) Relative fluorescence intensity (RFI) of surface-anchored A₅₉₄-EGF-His. We analyzed a RFI of A₅₉₄-EGF-His incubated with (●) and without (○) cells in the medium. (C) CLSM images of EGFP-NSPCs (green) and A₅₉₄-EGF-His (red). Left: cross-sectional images of X-Z axes, Right: Z-sectional images of substrate surface (red: A₅₉₄-EGF-His).

Molecular designing of protein-immobilized materials for regulating stem cell function

Tadashi Nakaji-Hirabayashi*

Frontier Research Core for Life Sciences, University of Toyama, Japan

Application of stem cells is important for development of regenerative medicine. However, the development of technique to strictly regulate the function of stem cells is necessary for its clinical application. We have designed biomaterials conjugated with functional proteins for regulating the stem cell morphology. For example, glass substrate and hydrogel immobilized with proteins can regulate growth and differentiation of various stem cells by applying the characteristics of chimeric proteins. However, the action mechanism of the immobilized proteins isn't understood clearly. These unclear points will constitute a serious obstacle to apply the protein-modified materials for clinical applications.

We have demonstrated three important points concerning action mechanism of the immobilized proteins; (1) stable immobilization (anchoring) of proteins to the substrate, (2) orientation of the immobilized proteins to easily react to receptor, (3) activity of proteins immobilized to substrate. ([1] *Biomaterials* 29, 4403-4408 (2008), [2] *Bioconjugate Chem.* 20, 102-110 (2009)) Moreover, it was shown that the immobilized proteins efficiently gave signaling to the cells in comparison with soluble proteins. However, it cannot be understood by what mechanism the immobilized proteins efficiently transduce the signaling to the cells. To clearly understand the action mechanism of the immobilized proteins, we evaluated the signaling transduction from immobilized proteins to cells and the uptake of immobilized proteins by cells after signal transduction.

To investigate the mechanism of cell regulation with protein immobilized to substrate, epidermal growth factor (EGF) fused with oligohistidine (His) were used as the model proteins (EGF-His). Moreover, EGF-His was labeled with Alexa Fluor 594 (A594) using active esterification for tracing the protein reacted to receptor on cell membrane with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Neural stem/progenitor cells (NSPCs) were used as a model stem cells for the assay concerning signaling transduction with surface-immobilized EGF. In this year, I investigated about surface characterization of EGF-His immobilized to substrate using MicroBCA analysis, atomic force microscopy, and ellipsometry measurement. And the detachment of EGF-His from the surface and the internalization of detached EGF-His into cells were evaluated using TIRFM and CLSM. From these results, it was shown that cells continuously received the signal from surface-anchored EGF-His. However, surface-anchored EGF-His were gradually detached by receptor, and finally internalized into the cells.

細胞ナノ領域と生体微小環境における 核酸送達システムの動態と機能発現解析

研究代表者：北海道大学大学院薬学研究院 畠山 浩人

1. 研究の概要

機能性核酸を癌疾患治療に応用するには、核酸を機能する場所である臓器の標的細胞の中にまで届ける必要があり、効率的なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が必須であり、標的臓器として肝臓や癌組織における DDS の活性や動態に大きな影響を及ぼす因子・パラメーターを同定することで、革新的なナノ粒子創製と肝疾患治療やがん治療への応用を目指す。昨年度合成に成功した pH 応答性脂質 YSK を組み込んだ MEND (YSK-MEND) を用いて、肝臓における活性に影響を及ぼす因子を同定し、最適化された YSK-MEND により肝特異的 miRNA の制御やヒト C 型肝炎ウイルス治療に成功した。

2. 研究の背景と目的

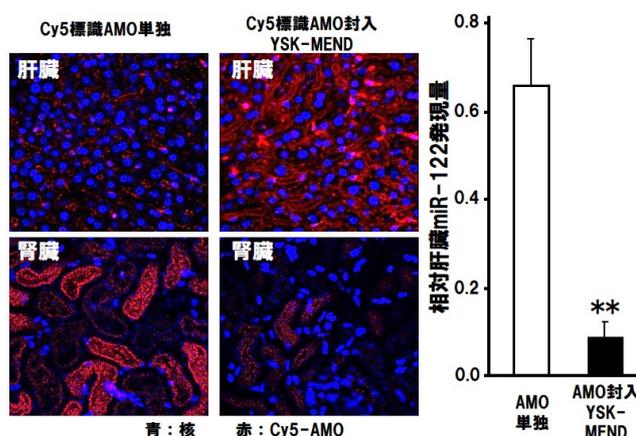
短鎖二本鎖 RNA (siRNA) によって特定のタンパク質の発現制御が可能となり、生命科学に不可欠なテクノロジーであるとともに、siRNA による疾患関連遺伝子の発現制御の治療への応用が期待されている。また、タンパク質をコードしない non-coding RNA の一つである microRNA(miRNA)は遺伝子の転写後発現調節に関与し多彩な生命現象を制御していることが明らかとなっている。この miRNA は一本鎖化学修飾型 RNA (anti-miRNA oligonucleotide:AMO) を用いることで制御可能であり、こちらも医薬への応用が期待されている。しかし、siRNA や AMO のような機能性核酸は負電荷の水溶性高分子で、そのままの形で生体に投与されても局所投与以外では、目的とする臓器の細胞の中には到達できない。従って、これらの医薬への応用は効率的な DDS 開発が大きな鍵となっている。我々は独自の核酸送達システムとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)の開発を進めている。MEND が投与部位から標的臓器への移行、標的組織中での局在、細胞内動態に至る、直列的な一連のナノ粒子の動態を 3 次元でまた時間軸に沿って正確に把握し、どのような課題が存在するか明らかとすることで、より効率的で安全性に優れた MEND を開発することが可能となる。これを実現するには、生体組織において高精度で長時間 DDS を観察する必要がある。本研究では、本学術領域において開発される優れたイメージング技術と組み合わせることが可能な核酸送達システムとして pH 応答性 YSK-MEND の開発を行い、肝臓や癌組織への送達において DDS が備えるべきパラメーターを検討し、さらに肝疾患治療への応用を行った。

3. 成果

1. anti-miRNA oligonucleotide (AMO) 搭載 pH 応答性 YSK-MEDN による肝臓への AMO 送達と機能評価

徳島大学南川典昭教授(公募班)らによって開発された 2'-OMe-4'-thio-RNA は標的 RNA 配列と高い親和性を示し、かつ生体内における安定性に優れた RNA である。この 2'-OMe-4'-thio-RNA を用いて、肝臓特異的 miR-122 に対する AMO122 を合成し、AMO122 を封入した YSK-MEND による肝臓への AMO 送達を試みた。従来 AMO はフリーの形で投与されているがほとんどが腎臓から排泄されるため、50 mg/kg という非常に高投与量で肝臓における miR-122 阻害効果が報告されている。

一方、YSK-MEND へ AMO122 を封入することで効率的に肝臓へ送達することが可能となり(図左側)、1mg/kg という低投与量でも miR-122 発現量を低下させることが可能であり(図右側)、またそれに伴う血中コレステロール濃度の低下も観察され、肝疾患治療への応用の可能性が示された(Takahashi M, et al. *Nucleic Acids Res.* (2013), Hatakeyama H, et al. *J. Control. Release* (2014))。



2. YSK-MEND による siRNA の肝臓への送達と C 型肝炎治療への応用

YSK-MEND の肝臓への送達効率に及ぼす MEND の物性の検討より、粒子径は 60~80 nm 程度、また脂質膜表面の pKa は 6.4 付近が最も肝臓の標的遺伝子のノックダウン効率に優れており、効率よく siRNA を送達可能であることが示唆された。上記検討により最適化された YSK-MEND の肝臓における 50%ノックダウン可能な投与量 ED₅₀ は 0.06mg/kg であり、非常に低い投与量でノックダウンが可能であった。そこで、最適化された YSK-MEND を用い肝炎治療への応用を試みた。ウイルス性肝炎は、肝臓の線維化や肝硬変を経て高い確率で肝癌を発症する。そこで YSK-MEND にヒト C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する siRNA (東京都臨床医学研究所 小原道法先生教授より供与)を搭載し、治療効果を検討した。ヒト肝臓キメラマウスに HCV を接種後、6 週間持続感染 HCV 肝炎モデルを作成し、HCV-siRNA 封入 YSK-MEND を尾静脈より投与したところ、肝臓における HCV コアタンパク質の消失が見られ、血清の HCV mRNA の 2 週間以上の持続的な抑制を観察し、肝炎治療効果が示された。以上より YSK-MEND はウイルス性肝炎治療への応用の可能性が示唆された(Watanabe T, Hatakeyama H, et al. submitted)。また最適化 YSK-MEND は腎細胞癌皮下移植担癌モデルにおいて、標的遺伝子をノックダウンすることに成功した。今後は癌治療の応用に向けた YSK-MEND の開発を進め予定である。

Development of a pH-sensitive lipid based nanoparticle for nucleic acids delivery to liver and tumor

Hiroto Hatakeyama
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

Small interfering RNA (siRNA) and is thought to be a new class of medicines because this can inhibit the expression and function of any genes of interest. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that influence diverse biological functions by regulating gene expression post-transcriptionally. The regulation of miRNA is also thought to be a potential mean to treat diseases. However, these functional nucleic acids show poor biodistribution due to their molecular weight and hydrophilicity and less function as it is. Therefore, drug delivery systems should be a key technology to realize nucleic acids therapy. We developed a lipid based nanoparticle, Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND) with pH-sensitive YSK lipid (YSK-MEND). Investigation of three-dimensional dynamics of MEND (Pharmacokinetics: PK) in target cells as well as target organs should identify rate-limited steps to deliver the cargo efficiently into target cells. The aim of this study is identification of the critical parameters, which influence the dynamics and functions of YSK-MEND in intra cells and liver and tumor microenvironment and application of YSK-MEND for liver disease and tumor therapy.

The critical parameters of YSK-MEND for efficient knockdown in liver were identified. According to the information, optimized YSK-MEND was systemically administered into mice which resulted in efficient target-gene knockdown in liver (ED50: 0.06 mg siRNA/kg). Anti-miRNA oligonucleotide (AMO) composed of 2'-OMe-4'-thio-RNA developed by Prof. Minakawa (The University of Tokushima) shows high affinity with target sequence and stability in biological condition. AMO against liver specific miR-122 (AMO122) was encapsulated in optimized YSK-MEND. The YSK-MEND(AMO122) significantly inhibited miR-122 expression in liver and reduced plasma cholesterol level for 2 weeks after i.v. injection (Hatakeyama H, et al. *J. Control. Release* (2014), Takahashi M, et al. *Nucleic Acids Res.* (2013)).

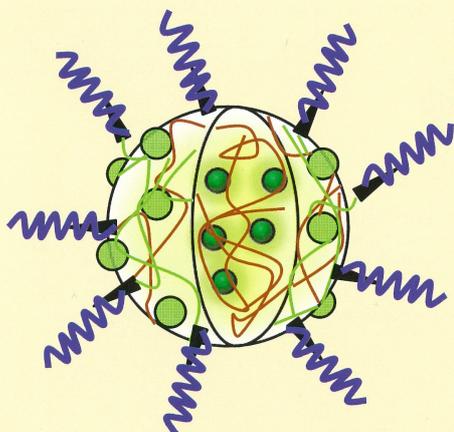
We also applied optimized YSK-MEND for hepatitis C virus (HCV) treatment. siRNA against HCV developed by Prof. Kohara (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) encapsulated YSK-MEND showed efficient knock down of HCV core protein in liver in HCV infected chimeric mice carrying human hepatocytes. Furthermore, the treatment of YSK-MEND showed long-term suppression of serum HCV mRNA level. These show the possibility of YSK-MEND for liver disease treatment (Watanabe T, Hatakeyama H, et al. submitted).

The optimized YSK-MEND also induced efficient gene knockdown in tumor in kidney cancer xenograft model. YSK-MEND could be applied for tumor treatment.

ISSN 1468-6996

STAM

Science and Technology of Advanced Materials



Supported by



Empa

Open access journal

Editor-in-Chief: Shu Yamaguchi

Focus on
Nanomedicine Molecular Science

SELECTED PAPERS FROM

Science and Technology of Advanced Materials
Vol 17 (2016)



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Focus on nanomedicine molecular science

Kazuhiko Ishihara^a and Nobuhiko Yui^b

^aThe University of Tokyo

^bTokyo Medical and Dental University

The development of effective and non-invasive medical treatment techniques, focusing on molecular reactions in the cells that constitute a living organism and control their biological activities, may provide new insights into intracellular molecular reactions and their parameters. These insights will help to improve medical devices, such as medical imaging equipment; they will promote computer-aided design of new drugs and reliable production of cells, including iPS cells; they may also advance research on molecular dynamics in the cellular environment, development of non-invasive diagnostic and therapeutic approaches for improving the quality of life, and growth of medical and pharmaceutical industries.

This interdisciplinary research target requires a worldwide collaboration of researchers from various fields of science and engineering, including materials science, chemistry, biology, and basic and clinical medicine. Since 2011 such collaboration was carried out within a project on “Nanomedicine Molecular Science” supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. This focus issue of *Science and Technology of Advanced Materials* is released on the occasion of completing the project in 2016. We would like to thank all the authors who contributed to this focus issue and hope that it will bring new ideas to their future research in the field of nanomedicine.

CONTACT Kazuhiko Ishihara  ishihara@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

© 2016 The Author(s) Published by National Institute for Materials Science in partnership with Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC-BY <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

注目の論文

■ 細胞内に生理活性分子を輸送する細胞親和型多機能ポリマーナノ粒子

Cytocompatible and multifunctional polymeric nanoparticles for transportation of bioactive molecules into and within cells

2016.02.29掲載 REVIEW ARTICLE Published : 2016.07.06 / DOI : 10.1080/14686996.2016.1190257

ポリマーナノ粒子は、その化学構造の多様性から、様々な分野で応用されている。中でも、イメージング技術の進歩に伴い、医療、生化学、あるいは細胞工学などいわゆるバイオ関連分野における利用が進んできている。また一方で半導体ナノ粒子である量子ドットや、磁性ナノ粒子との複合化は、ポリマーナノ粒子の機能をさらに高めることとなり、高度な応用がなされるようになってきた。

*Science and Technology of Advanced Materials*のNanomedicine Molecular Science特集に発表された石原一彦（東京大学）らによるレビュー論文 [Cytocompatible and multifunctional polymeric nanoparticles for transportation of bioactive molecules into and within cells](#) は、細胞の機能に影響を与えない性質を基本として、さらに高次の機能を有するポリマーナノ粒子に関連する研究を幅広く紹介している。特に、細胞親和型ポリマーとして、細胞膜を構成するリン脂質分子の極性基（ホスホリルコリン基）構造に着目して設計された2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC)を一成分とするポリマーを取り上げている。MPCポリマーは、基材表面を修飾すると人工細胞膜表面を構築することができ、生体反応を抑制できることから医療器具として世界的に応用されてきているバイオマテリアルである。本レビューで紹介されているようなナノメートルサイズの粒子においても、MPCポリマーによる表面処理は有効であり、タンパク質や細胞などとの相互作用が極めて弱いため、通常は生体反応により細胞毒性が生じることが問題となる長時間のイメージングにも利用することができる。著者らの研究として紹介されている例では、表面を被覆しているMPCポリマーに機能を持たせることにより、選択的な細胞取り込みやバイオ分子の認識、細胞内への物質輸送も可能となることが示されている。さらに、これらの特徴を利用して、ナノ粒子内に量子ドットを複合化した蛍光イメージングを利用した細胞内への取り込み過程や細胞内滞在性に関して、ナノ粒子表面に結合するペプチド分子の化学構造、組成などについて詳細にも紹介されている。このナノ粒子が細胞内に長期間滞在し、細胞分裂により細胞間に分配されていく様子は、世界でも例のない事象であり興味深い。

細胞機能の解明や応用は、山中伸弥博士のiPS細胞の製造法の発見、大隈良典教授の細胞のオートファジーの解明など、日本の独自の研究がノーベル賞受賞という形で認められてきている分野である。ここで紹介されているような新しい細胞イメージング材料技術が、さらにこの分野を進歩させると期待される。

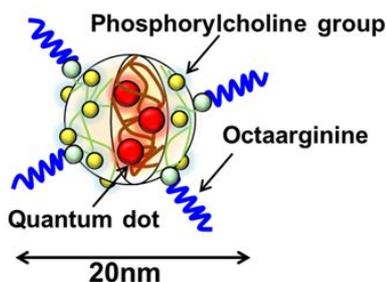


図1. 量子ドットを内包したポリマーナノ粒子表面を、細胞親和型のMPCポリマーで被覆し、さらに細胞膜透過ペプチドを固定化した。

注目の論文

■ 酸分解性ポリロタキサンによるコレステロール代謝の改善
 Improving cholesterol metabolism by acid-labile polyrotaxanes

2016.03.11掲載 **ARTICLE** Published : 2016.07.26 / DOI : 10.1080/14686996.2016.1200948

ニーマンピック病C型 (NPC病) は、リソソーム膜に局在するコレステロール輸送タンパク質の変異によって起こる先天的代謝疾患であり、神経変性などの重篤な病態を示す。NPC病患者細胞のリソソームにはコレステロールが蓄積することが知られており、この改善が治療の緒になると考えられている。近年、β-シクロデキストリン誘導体がNPC病コレステロール蓄積を改善することが明らかになり、NPC病に対する治療薬としてその利用が有望視されている。

*Science and Technology of Advanced Materials*のNanomedicine Molecular Science特集に発表された田村篤志、西田 慶、由井伸彦 (東京医科歯科大学) による論文 [Lysosomal pH-inducible supramolecular dissociation of polyrotaxanes possessing acid-labile N-triphenylmethyl end groups and their therapeutic potential for Niemann-Pick type C disease](#)は、細胞のリソソームにおける酸性pHに対して分解応答を示すポリロタキサンの設計と、NPC病治療への応用に関する基礎的検討について報告している (図1)。インターロック構造のポリロタキサンは細胞内のリソソームで分解することで、局所的にβ-シクロデキストリンを放出し、コレステロールの蓄積をより効果的に改善すると提唱している。

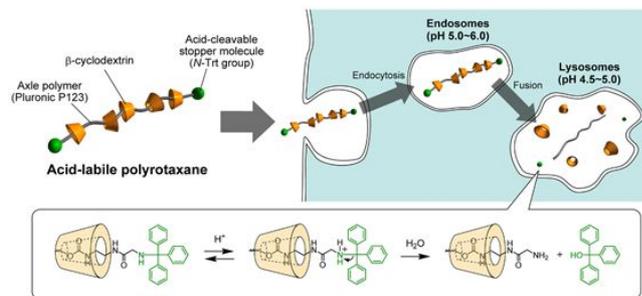


図1. 酸分解性ポリロタキサンとリソソームpHに応答した分解挙動のイメージ図

彼らは、N-トリフェニルメチル基をポリロタキサン合成のための封鎖基として利用した。N-トリフェニルメチル基で封鎖したポリロタキサンは弱アルカリ性~中性pHで長時間安定であったが、pH 6以下の弱酸性pHではN-トリフェニルメチル基の脱離が起こり、ポリロタキサン中の環状分子 (β-シクロデキストリン) が放出されることを明らかにした。

このようにして合成したポリロタキサンを用いて、ニーマンピック病C型由来細胞におけるコレステロール蓄積への影響を評価している。ポリロタキサンは現在臨床応用が進められているヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリンの約100~10分の1の濃度でNPC病由来細胞におけるコレステロール蓄積を改善することを明らかにした。また、彼らは、NPC病治療に有用なポリロタキサンの分子パラメーターについても論じている。ポリロタキサンを用いた本コンセプトはシクロデキストリンの医薬品応用にブレークスルーをもたらすと期待される。

著者	Atsushi Tamura, Kei Nishida, Nobuhiko Yui
本誌リンク	http://dx.doi.org/10.1080/14686996.2016.1200948
引用	Sci. Technol. Adv. Mater. 17 (2016) 361.

2016.03.11掲載 **ARTICLE** Published : 2016.07.26 / DOI : 10.1080/14686996.2016.1200948

▶ 注目の論文一覧はこちら

注目の論文

■ 分子内二重鎖形成が不要な新たなRNA検出プローブ

A stem-less probe using spontaneous pairing between Cy3 and quencher for RNA detection

2016.03.09掲載 | ARTICLE | Published : 2016.07.05 / DOI : 10.1080/14686996.2016.1182412

近年細胞内で多様な機能を持つRNAが数多く報告されており非常に注目されている。このRNAを細胞内で可視化することが出来ればRNAの機能解明やその作用機序について有用な知見が得られると期待される。RNAを可視化する蛍光プローブとしては通常モレキュラービーコンが用いられている。モレキュラービーコンは末端に蛍光色素と消光色素が結合したDNAであり分子内で二重鎖を形成するという特徴がある。しかしながら、標的RNAと二重鎖形成する際に分子内二重鎖が解離する必要があった。

*Science and Technology of Advanced Materials*のNanomedicine Molecular Science特集論文として櫻田啓准、浅沼浩之（名古屋大学）が発表した本論文 [A stem-less probe using spontaneous pairing between Cy3 and quencher for RNA detection](http://dx.doi.org/10.1080/14686996.2016.1182412)では、分子内二重鎖形成が不要な新たなRNA検出プローブについて報告している。著者らは会合能の高い蛍光色素（Cy3）-消光色素（アゾ化合物）ペアをDNAに導入することによって、分子内で二重鎖を形成しなくても蛍光が消光することを見出した（図1左）。一方、標的RNA存在下ではこの会合体が解離することによってCy3による強い蛍光が観察された（図1右）。その結果、標的RNAの添加時に蛍光強度が180倍増大することが分かった。このプローブは従来のプローブと比較して応答速度が速いという特徴がある。また、このプローブを利用することで固定化した細胞内におけるRNAを検出可能であることも示された。著者が開発したプローブは高感度RNA検出が可能であることから、病気の早期診断法やウイルス検出といった応用が期待できる。

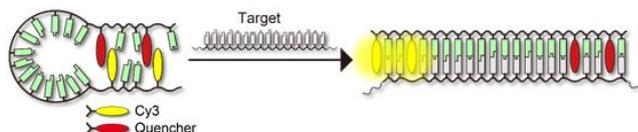


図1. 開発されたRNA検出プローブ

著者	Hiromu Kashida, Kazuhiro Morimoto, Hiroyuki Asanuma
本誌リンク	http://dx.doi.org/10.1080/14686996.2016.1182412
引用	Sci. Technol. Adv. Mater. 17 (2016) 267.

2016.03.09掲載 | ARTICLE | Published : 2016.07.05 / DOI : 10.1080/14686996.2016.1182412

▶ 注目の論文一覧はこちら

材料を数学する。

STAM 新設カテゴリ VISION 第1弾論文
Materials inspired by mathematics
 Motoko Kotani and Susumu Ikeda
 2016 *Sci. Technol. Adv. Mater.* **17** 1180233