

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770171

研究課題名（和文）非侵襲観測による好中球の生体内 1 分子機能解析

研究課題名（英文）Functional and single-molecular analysis of neutrophil in vivo by non-invasive measurements

研究代表者

菊島 健児（KIKUSHIMA KENJI）

東京大学・大学院理学系研究科・研究員

研究者番号：50569142

研究成果の概要（和文）：半導体ナノ粒子（量子ドット：QD）を用いてマウス体内の非侵襲観測において十分な輝度を持つ蛍光粒子の開発に成功した。高解像度イメージング装置を開発し、量子ドットにより標識された好中球がマウス耳介内において遊走する様子を非侵襲観測することに成功した。更に、好中球内で小胞が高速に輸送される様子の観察・解析を行った。

また、大きさの不明な物質に関しても発生する運動量の変化を測定できる顕微鏡の開発・構築し、その正確性を検証した。この系によって、Hela 細胞中における小胞輸送の力は 2-38pN と広く分布していることを計測した。

研究成果の概要（英文）：I created a fluorescent dye enough bright for the non-invasive imaging of mice using quantum dots. I constructed a high-contrast imaging system and succeeded in non-invasive observation of neutrophil labeled by the quantum dots in mouse ear. Fast vesicle movements inside the neutrophils were also able to be observed and were analyzed. I constructed a new microscope that enables us to measure momentum of the particle that has an undetermined form. Using the system, I measured that vesicles in Hela cell were transported with 2-38 pN force.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

好中球は白血球全体の 50-70% を占め、自然免疫系による生体防御機構において主な役割を担っているが、それだけでなく、腫瘍の形成予防や排除にも関与していることが様々な *in vivo*、*in vitro* の実験を通じて示唆されている。しかし、その具体的なメカニズムはまだ明らかになっておらず、*in vivo* で好中球にある 1 分子の挙動をリアルタイムで観察した例はない。好中球の *in vivo* での挙動観察は、生体防御のメカニズム解明や様々な免疫疾患の治療に対して重要である。

現在までに、2 光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* での好中球の観察例はいくつか報告されているが、蛍光物質の特性から 1 分子観察に十分な明るさの蛍光を得ることができず、好中球全体の像を観測するものが主であった。

好中球は炎症反応に伴い、血管内をローリング、接着ならびに血管外遊走の段階を経て炎症部位に到達し食食作用を示す。それぞれの段階において、*cadherin*、*integrin* をはじめとして様々な因子が関与していることが示されてきたが、物理的にどのように好中球

の運動に作用しているかについては詳しいことはわかっておらず、特に *in vivo* での作用に関してはほとんど報告されてはいない。

量子ドット(QD)は従来の蛍光物質に比べて量子収率が高く、褪色を起こしにくいことから、生体内観察への応用が期待されている。これまでに、当研究室ではQDを結合させた抗がん剤が、リアルタイムでマウスにおいて作用する機構を1分子レベルで捉えることに成功している。しかし、従来のQDでは、時間分解能および平均発光強度が十分なものではなかったことから、細胞膜の動態の観察時間も数分と短いものであった。また、好中球観察においては炎症作用を起こさない条件で行う必要があり、同様の手術切開を用いた実験系を単に応用しただけでは *in vivo* での好中球の定常状態の観測は不可能である。さらに、生体組織内部に光は極めて浸透しにくいことから、非侵襲での観察には、より輝度の高いQDか、より感度の高いイメージング装置が必要である。

2. 研究の目的

本研究では高輝度量子ドット集合体の製作を行い、非侵襲条件で *in vivo* でのマウス好中球表面の1分子の挙動を観察する。

また、大きさが不明な物質に対しても力測定を行える新たな顕微鏡を開発・構築し、好中球の食食、遊走時に発生する力、ならびに血管壁や組織との間の結合力を測定し、接着分子の役割を明らかにする。さらに、マウスに形成させた腫瘍や損傷に対する好中球の作用を *in vivo* でイメージングすることを通じて、好中球がどのようなメカニズムを通じて腫瘍排除に関与しているのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

QDを化学架橋等の処理を行うことにより、より輝度の高い蛍光粒子の作製、精製を行うと同時に、このようにして作成した蛍光粒子を用いて特異的に好中球表面の分子を標識させる方法を検討する。

また、当研究室ではバルセロナ大学の M. Montes-Usategui 氏との共同開発により、レーザートラップの透過光を後焦点面においてフーリエ変換することにより、大きさの不明な物質に対しても発生する運動量の変化を測定できる新たな顕微鏡の開発を行っている。この顕微鏡を改良することにより、好中球の炎症反応に伴う各段階において、接着分子1分子の挙動、好中球の発生する力、ならびに組織との間の結合力を測定する。

4. 研究成果

QDを適切な濃度条件下で急速凍結、また

は加熱することにより、QD同士が凝集するといった性質を利用し、このようなQD集合体を用いて、blinking を克服すると同時に、高輝度のQD凝集体を作成することに成功した。更に、このようにして作成されたQD集合体を遠心、ゲル濾過等の手法を通じて、比較的、輝度ならびにサイズの揃ったQD集合体を精製する方法を確立した。この凝集QDは、単一QDの5~10倍程度の輝度を持ち、10%ミルク配合のアガロースゲル中で観察した結果、400 μm の深さまで輝点を観測することが出来た。このゲル中において、400 μm 深度において励起光 (@ 532 nm) 1/5、蛍光 (@ 800 nm) 1/3 に強度が減少する。これは、マウスの耳の透過率に相当するものであり、非侵襲 *in vivo* 観察が可能であるものと期待される。また、このQD集合体は、10 nm以下の精度での位置検出が可能であることが明らかとなった。

また、化学架橋を用いることにより、ポリスチレンビーズの周りに多数のQDを結合させるといった、高輝度QD集合体の新たな作製方法を樹立することにも成功した。前述の急速凍結法により作成したQD集合体は作成過程においてコーティングされていたポリマーが脱落しており、抗体結合などにより特異性を持たせることが困難であった。しかし、化学架橋法を用いて作成されたQD集合体は、avidin-biotin 反応を通じて生成されたものであり、容易に抗体等を付加することが可能である。実際に、このQD集合体を用いてガン細胞のラベリングを行うことに成功した。さらに、このQD集合体は急速凍結により精製されたQD集合体に比べて、輝度が明るくかつ質が揃っており、高い収率で生成することが可能であることが明らかとなった。現在、このQD集合体をより小型なものに改良する試みを行っており、非侵襲下での観察に十分な輝度を発するかどうか、また、マウス体内への投与において、健康への影響について検討を行っている。

また、マウス体内の好中球を多数の single QDによって明るく特異的に標識する手法を確立した。これらの標識された好中球は、独自に開発した高出力レーザーや高開口数対物レンズから構成される高コントラストイメージング装置によって、マウス耳介内の血管を流れる様子を非侵襲 *in vivo* にて観察することに成功した。好中球表面に結合したQDは小胞へと取り込まれ、細胞内部の小胞の動きを解析することも可能であった。測定の結果、小胞輸送は4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ と、*in vitro* で観測されるモータータンパク質の運動速度をはるかに超える速度で行われていることが明らかとなった。以上の成果に関して、査読論文にて発表を行った。さらにこの機構を解明すべく、精製した好中球においても小

胞を量子ドットによって標識する手法を開発し、現在も解析を進めている。

光ピンセット技術は pN の力測定、nm の位置計測が可能であり、これまでにタンパク質の力学的測定において広く用いられてきた。しかし、従来の光ピンセット技術は専ら精製したタンパク質に対して in vitro で用いられており、実際の細胞内での測定に応用するためには、トラップ対象の形状や屈折率、溶液の屈折率等を逐次行わなくてはならない。細胞内においてタンパク質はタンパク質同士で相互作用を行い、細胞骨格が複雑に張り巡らされた環境内で機能しており、細胞内での運動を観測することは重要な課題である。

本研究ではバルセロナ大学の M. Montes-Usategui 氏と共同開発により、レーザートラップの透過光を後焦点面においてフーリエ変換することにより、トラップ対象の形状や屈折率、溶液の屈折率に依存しないで運動量の変化を測定できる新たな顕微鏡の開発を行った。本研究では、このシステムをより高精度なものに改良を行うと同時に、従来から用いられてきたビーズの変位を測定することによって力を測定する方法との比較を行い、この系の各種パラメーターについてのキャリブレーションを行った。この系を用いることにより、Hela 細胞中における小胞輸送の力は 2-38pN と広く分布していることを見出した。今後、この系を応用することで、好中球内における小胞輸送機構の解明が進むものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kenji Kikushima, Sayaka Kita & Hideo Higuchi

A non-invasive imaging for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils

Scientific Reports 3, Article number: 1913 (2013) 査読あり

doi:10.1038/srep01913

[学会発表] (計 7 件)

(1) 菊島健児

第 41 回日本免疫学会学術集会

2012 年 12 月 05 日～2012 年 12 月 07 日神戸国際会議場 (兵庫)

Non-invasive in vivo tracking of high speed vesicle transport in mouse neutrophils

(2) 菊島健児

6th international symposium of

nanomedicine (招待講演)

2012 年 11 月 29 日～2012 年 12 月 01 日くびきメッセ (島根)

A non-invasive method for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils

(3) 菊島健児

第 34 回内藤コンファレンス

2012 年 10 月 16 日～2012 年 10 月 19 日シャトレーゼガトーキングダム札幌 (北海道)

Non-invasive in vivo imaging of vesicle movements of neutrophil in the mouse ear using quantum dots

(4) 菊島健児

第 50 回日本生物物理学会 2012 年 09 月 22 日～2012 年 09 月 24 日名古屋大学東山キャンパス (愛知)

A non-invasive method for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils

(5) 菊島健児

ナノ学会 第 10 回大会

2012 年 06 月 14 日～2012 年 06 月 16 日大阪大学・大阪大学会館 (大阪)

量子ドットを用いたマウス耳内における白血球内小胞運動の非侵襲イメージング

(6) 菊島健児

第 49 回日本生物物理学会年会 2011 年 9 月 16 日兵庫県立大学・姫路書写キャンパス

高輝度量子ドットを用いたマウス耳内血管の非侵襲イメージング

(7) 菊島健児

ナノ学会第 9 回大会 2011 年 6 月 3 日北海道大学・学術交流会館

高輝度量子ドットを用いたマウス耳内血管の非侵襲イメージング

[その他]

学内広報を通じて成果をホームページ等で発表した。

<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2013/24.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊島 健児 (KIKUSHIMA Kenji)

東京大学・大学院理学系研究科・研究員

研究者番号: 50569142

(4)研究協力者

三上 貴司(MIKAMI Takashi)

東京大学・大学院理学系研究科・大学院生