

2B08

マウス内の1分子機能を計測する

(東京大学 理学系研究科) 樋口秀男

Measurement of single molecular function in mice

(Graduate School of Science, the University of Tokyo) Hideo Higuchi

細胞内分子機能の理解は、過去15年間の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、組換え蛍光蛋白質の登場とほぼ時を同じくして分子機能を直接的に観察する1分子イメージングと1分子ナノ精度計測が登場した(Svoboda et al Nature 1993, 船津ら Nature 1995)。この方法の登場によって、精製された実験系においてDNA及びRNAポリメラーゼ・リボゾーム・モーター蛋白質などの1分子運動、ATP加水分解反応、分子内構造変化、重合過程などが明らかにされた(Endow & 樋口 Nature 2001; 上村 et al Nature 2006; 茅 & 樋口 Science 2010)。さらに近年量子ドット(CdSe やダイヤモンド)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1nmの精度で測定できるようになった(渡邊&樋口 Biophys J. 2007)。さらに量子ドットを利用して、マウス内でも1分子の位置を追跡できるようになった(多田, 樋口ら Cancer Res 2007)。今回は、最近の研究であるマウス内の1分子あるいは少数分子のイメージングおよび機能計測に焦点を絞って話したい。

抗がん剤1分子のマウス内イメージング

量子ドットは、体内での単粒子のイメージングに用いるプローブとして最適である。我々は、細胞内ナノイメージングで用いたものと同様なテクノロジーを用いて、担癌マウスの生体腫瘍内で小胞に結合した単一量子ドットの追跡をすることに成功した。細胞での実験と同様に量子ドットに、転移性乳癌に対する抗癌剤である抗HER2モノクローナル抗体を約1分子結合させた。一方、マウスにはHER2発現乳癌を埋め込み腫瘍に成長させた、担癌マウスを作製した。この量子ドット-抗体を担癌マウスの尻尾の静脈に注射後、腫瘍内に集積した様子を背部の皮膚に固定した窓を通してイメージングした。単一量子ドット抗体の複合体は、まず、血管をすり抜けて血管とがん細胞の間の結合組織内に入った。結合組織内では数 μ m/secの早い移動と停止を繰り返し、拡散をした。量子ドット抗体ががん細胞に出会うと、細胞に結合し、細胞膜に沿って、移動をした。がん細胞に結合した量子ドット・抗体のいくつかは細胞内にエンドサイトーシスし、細胞内を、輸送された。細胞内をモーター蛋白質に乗っているとされる小胞は600nm/sec程度の動きを行い、動いては止まり、動いては止まりを繰り返した。最終的に、量子ドットを含んだ小胞は、細胞核の付近での遅い小さな動きとなった。今後、この方法が効率的なドラッグデリバリーの発展のための強力な手法になりうることを示した。

がん細胞膜の流動性のイメージング

がん細胞が転移する際に移動先端部の細胞膜を伸張することで仮足を形成するため、転移には膜の高い流動性が重要でありこれは膜蛋白質の流動性とも関係があるので、流動性の研究はがん転

移と結びつく点で重要である。そこで、我々は、多くのがん細胞の転移を活性化する膜蛋白質PAR1 (Protease activated receptor 1)の動きの変化を調べた。マウス内がん細胞の観察は、がんの転移過程を踏まえ、がん組織内で血管の遠方に位置するがん細胞、血管近傍のがん細胞、血流中のがん細胞、血管壁に接着しているがん細胞の順に行った。がん細胞に結合したがん細胞は、細胞膜上をランダムに拡散した。しかし、その拡散速度は細胞がどこにいるかで大きく変化した。すなわち、血管遠方のがん細胞では、PAR1は非常に遅い拡散速度 ($72\text{nm}^2/\text{s}$)を示したが、血管内浸潤に向かって拡散速度は増加し、血流中のがん細胞では血管遠方の細胞に比べ1000倍以上の $82000\text{nm}^2/\text{s}$ にまで増加した(図3C - G)。このように膜蛋白質の拡散速度が増加すると細胞は活発に動くことができることから、転移が活性化されると考えられる。血流中のがん細胞は、その後血管壁に接着し、PAR1の拡散速度が血流中に比べ約1/20にまで減少した。以上の結果から、がん細胞は細胞内や組織内の場所に依りて巧みに膜蛋白質の拡散速度を変化させることで、増殖・転移を活性化して、がん転移を効果的に引き起こしていると考えられる。

非侵襲 *in vivo* がん細胞・白血球のイメージング

これまでの *in vivo* イメージングでは、腫瘍部を切開して、癌腫瘍表面近くを観察できた。しかしながら、切開をすると、出血や免疫細胞の活性化などが起こり、生きたままの姿を観察する事は困難である。そこで、非侵襲で観察できる装置システムの改良と観察法の工夫をおこなった。明るくするため、倍率を下げ、レーザーの集光度を上げた。血量が見えるように、青い光の透過像を得られるようにした。観察法として、約 $200\mu\text{m}$ の厚さしかない耳をえらび、蛍光を発生する毛の脱毛をした。がん細胞をラベルするためにHerceptin-量子ドット複合体を尾静脈注射した。細胞膜に結合した量子ドットの観察に成功した。また、白血球の中でも運動能が高い好中球やマクロファージに結合した多粒子化量子ドットを結合することで、血管中の好中球をより鮮明に量子ドットを観察する事ができた。また、耳に刺激剤を塗りマクロファージを誘発したところ、貪食した量子ドットの詰まった小胞の運動を観察する事ができ、小胞の位置を 50nm 精度で追跡することができた(図)。また、細胞運動を観察でき、仮足が急速に伸びたのち、細胞体が仮足の方法に動き出した。好中球が生体内を動くメカニズムが解ってきた。

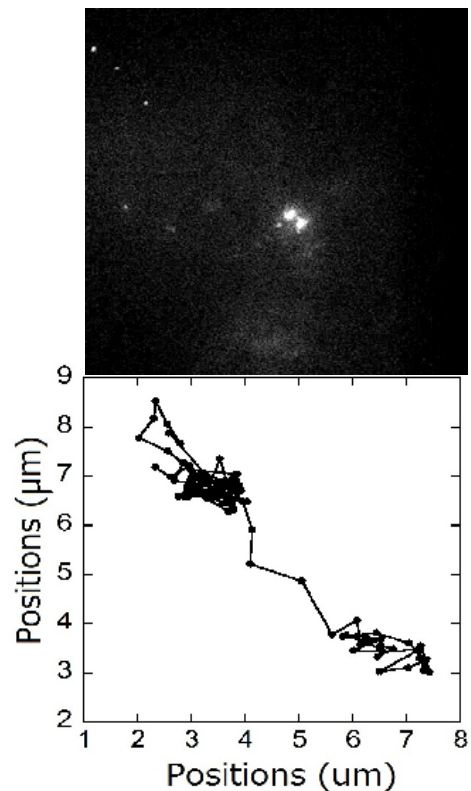


図: 非侵襲下で観察されたマクロファージ内に貪食された量子ドットの位置の解析結果