

令和元年6月13日現在

機関番号：12608
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2015～2018
課題番号：15H03003
研究課題名(和文)細胞内酸素濃度のダイナミックイメージング

研究課題名(英文)Oxygen dynamic imaging of cell

研究代表者

蒲池 利章 (KAMACHI, Toshiaki)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30272694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：1細胞レベルの脂肪代謝機構の解明を目指し、脂肪細胞における酸素動態を明らかにした。3T3-L1の脂肪細胞への分化によって、前駆脂肪細胞と比べて、細胞内酸素濃度は低下することが明らかとなった。脂肪細胞を用いて、脂肪滴と酸素濃度の同時イメージングを行うことで、脂肪分解における活性酸素の影響を明らかにした。

また、細胞の酸素消費に低酸素ストレスが与える影響を明らかにするため、低酸素環境下における細胞の酸素消費の動的変化を観測し、低酸素ストレスにより、活性酸素消去系が更新することが分かった。ミトコンドリアの酸素消費変化は、急性的低酸素ストレスにより抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究では、既設の酸素濃度イメージング共焦点光学顕微鏡を用いて、細胞内酸素濃度のダイナミクスを明らかにすることを目的とする。一細胞内の酸素濃度のダイナミクスを測定することにより、これまで未開拓であった細胞内酸素濃度イメージングによる様々な細胞機能・生命現象の追跡を行った。本申請研究では、特に、外部刺激による酸素ダイナミクス測定を通して、様々な疾病、癌の難治療性などの現象の解明につながる研究が遂行できた。

研究成果の概要(英文)：Single cell analysis of lipid metabolism was investigated with phosphorescence lifetime confocal microscopy. 3T3-L1 cell was differentiated to adipocyte so that the oxygen consumption rate of adipocyte was higher than that of preadipocyte due to increase in the number of mitochondria in the cell. Lipid droplet degradation measurement was carried out with oxygen concentration measurement imaging to clarify the importance of oxygen. Effect of low oxygen stress on the oxygen consumption within cell was evaluated. Antioxidant enzyme systems were induced with the lowering oxygen concentration. Oxygen consumption rate was reduced by the accurate hypoxic stress.

研究分野：生物無機化学

キーワード：細胞イメージング りん光プローブ 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素は好気呼吸を行う生物にとって非常に重要な分子である。これらの生物では、解糖系、クエン酸サイクル、電子伝達系によって炭水化物が二酸化炭素と水に分解される。この過程で、生体内でエネルギーとして機能する ATP が合成される。酸素は電子伝達系の最終電子受容体として働く。すなわち、好気性生物は酸素を消費し、生命活動に必要なエネルギーを生産しているといえる。これに加え、細胞内の異化や同化など代謝反応において、酵素が触媒する酸化反応における酸化剤として酸素は機能する。このように、細胞環境において酸素の反応は非常に重要な役割を果たしている。一方、先天性遺伝子疾患や癌、さらには脳梗塞や心筋梗塞、腎臓病など多くの疾病において、細胞環境における活性酸素の増加が報告されている。活性酸素はタンパク質や核酸など多くの生体分子を酸化・変性させる。この活性酸素は細胞環境で酸素により生成するといえる。また、近年、低酸素環境下 (hypoxia) に存在する癌細胞が抗がん治療や放射線治療に対して抵抗性を示すことが報告されている。このように、酸素は生体で非常に重要な役割を担うのみならず、各種疾病の基礎的研究、治療、創薬さらに、癌の難治療性の理解にも細胞環境における酸素を定量的に理解・考察する必要がある。そのため、生体内の酸素濃度を可視化することができれば、多くの生体反応の解明や疾患の治療などに貢献できると考えられ、様々な酸素濃度イメージング法が開発されてきた。例えば、ピモニダゾールは細胞が低酸素になるとタンパク質に不可逆的に結合するため、低酸素領域の染色に用いられている。しかし、不可逆的な反応を利用しているためリアルタイムのイメージングは不可能である。また、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor、HIF) は細胞に対する酸素供給が不足状態に陥った際に誘導されてくるタンパク質

であり、HIF 活性を有する細胞のイメージングもおこなわれている。我々はこれまでに、可逆的な反応を利用した低酸素蛍光プローブなども開発しているが (Hanaoka K. et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2012)

酸素濃度の閾値が低すぎるなどの問題もある。さらに、一細胞での酸素濃度イメ

ージングをおこなうため、測定システムの開発もおこなってきている。このシステムでは倒立型顕微鏡にパルスレーザーを導入し、これとゲート付きイメージングインテンシファイアを同期させ、CCD カメラでリン光の減衰を取得、解析することにより、一細胞内の酸素濃度のイメージングを達成している。(Kamachi T. et al, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2007) 実際には細胞にリン光性化合物を取り込ませ、酸素によるリン光の消光現象を利用している。すなわち、酸素濃度が高い場合、リン光は強く消光され、酸素濃度が低い場合、リン光はあまり消光されない。リン光の消光を測定するには強度測定と、寿命測定があるが、本システムは寿命の測定をおこなっている。強度の測定と異なり、寿命測定ではリン光性化合物の濃度分布に非依存的な測定が可能であり、細胞内のようにリン光性化合物を均一に分布させるのが困難な場合に、有効

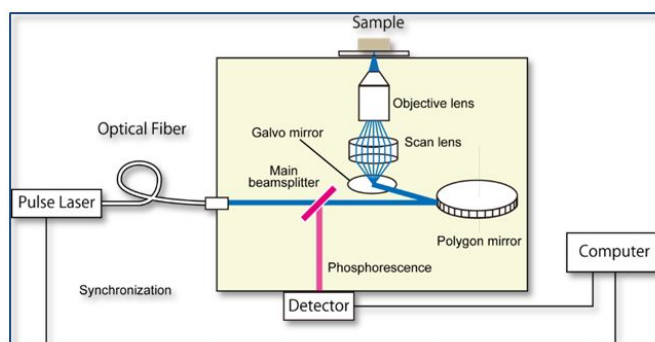


Figure. Outline of Phosphorescence Lifetime Imaging Confocal Microscope

である。このシステムは一細胞内の酸素濃度のイメージングは可能であるものの、共焦点光学系を有さないため、空間分解能が低く、細胞環境における酸素分子定量や応答を理解・考察するのは困難であった。そこで、最近、共焦点光学顕微鏡下で酸素濃度イメージングをおこなう装置を導入した。(前ページ図)このシステムは共焦点光学系を有しているため、高い空間分解能で細胞内の酸素濃度イメージングをおこなうことが可能である。本装置を用いれば、一細胞内の酸素濃度のダイナミクスを測定することが可能であるため、これまでに、未開拓であった細胞内酸素濃度イメージングによる様々な細胞機能・生命現象の追跡が可能であり、細胞環境における酸素ダイナミクスの理解を通して、様々な疾病、癌の難治療性などの現象の解明を目指す。

2. 研究の目的

本申請研究では、既設の酸素濃度イメージング共焦点光学顕微鏡を用いて、細胞内酸素濃度のダイナミクスを明らかにすることを目的とする。本装置を用いることで、一細胞内の酸素濃度のダイナミクスを測定することが可能であり、これまでに、未開拓であった細胞内酸素濃度イメージングによる様々な細胞機能・生命現象の追跡が可能となる。本申請研究では、細胞環境における酸素ダイナミクスの理解を通して、様々な疾病、癌の難治療性などの現象の解明を目指す。特に、本申請研究で、細胞内の酸素濃度のダイナミクスの解明を目指す。

3. 研究の方法

好気性生物のミトコンドリア内膜では、電子伝達に伴いプロトンの濃度勾配が形成し、これを解消する際に生体内でのエネルギーである ATP が合成される。電子伝達系の最終電子受容体は酸素であり、電子伝達系が亢進すれば、酸素消費が高くなるといえる。褐色脂肪細胞はほ乳類にみられる脂肪組織で、主な機能は熱生産である。通常の細胞に比べ多数のミトコンドリアが含まれており、電子伝達に伴うプロトンの濃度勾配を解消し、熱生産をおこなう Thermogenin (UCP1)が多く発現している(Kirichok Y. et al. *Cell* 2012)。この褐色脂肪細胞に、外部刺激として脱共役剤を添加し電子伝達系を亢進すれば、酸素消費が高まるといえる。また、通常の細胞に比べ、ミトコンドリアが多く含まれていることから、細胞内の酸素消費も検出しやすいといえる。そこで、リン光寿命イメージングマイクロスコプ(PLIM)を用いた褐色脂肪細胞の酸素濃度イメージングをおこない、脱共役剤の添加による細胞内酸素濃度変化を測定する。

リン光性化合物として水溶性の白金ポルフィリン (Platinum tetrakis-(4-carboxyphenyl)porphyrin, PtTCPP)を用いる。PtTCPP は水溶性であり、水溶液中のリン光寿命が 34 μs と比較的長寿命であるため、細胞内の酸素イメージングに適している (Okura I. and Kamachi T. *Handbook of Porphyrin Science* 2011)。上述の通り酸素消費が亢進し、酸素消費に比べ外部からの酸素供給が不足すれば、細胞内酸素濃度は低下すると考えられる。すなわち、PtTCPP の細胞内での寿命が短くなる。逆に酸素の供給が、細胞内酸素消費を上回れば、細胞内酸素濃度には変化がなく、PtTCPP の寿命は変化しないと予想される。このような外部刺激に応じた細胞内酸素濃度イメージングをおこなうことにより、細胞内の酸素濃度が動的に変化することを明らかにする。このような外部刺激に対する細胞内酸素濃度変化のダイナミクスを様々な細胞を用いて実施する。このような研究は本申請研究で用いるような可逆的な酸素との反応を利用し始めてイメージングできるといえる。また、リン光の酸素による消光現象は Stern-Volmer 式

$$(\tau_0/\tau=1+K_{sv}[O_2])$$

に従うため、酸素濃度を寿命から容易に算出できる。つまり、これまでに報告されている低酸素マーカーとは異なり酸素濃度の定量化も可能である。さらに、リン光寿命の測定は、リン光強度の測定とは異なりリン光性化合物の濃度分布に依存しないため、細胞や組織のように色素を均一に分布させるのが困難な場合でも、酸素濃度の分布のイメージングをとることが可能である。

低酸素環境下の癌細胞は抗がん剤あるいは放射線治療に対して難治療性を示すと言われている。癌組織あるいは Multicellular spheroid などは内部に低酸素領域 (Hypoxia) が存在する。既存の Hypoxia marker は低酸素と言うよりはむしろ無酸素状態 (Anoxia) に近い部位のみの染色が可能で、本来イメージングしたい Hypoxia の領域を染色するのは困難であった。そのため、Hypoxia の領域に存在する癌の難治療性の研究が困難であり、Anoxia の周囲が Hypoxia であろうと想像しているに過ぎなかった。さらに、腫瘍組織は正常組織に比べ血管透過性が高いと考えられている (Enhanced permeability and retention effect)。これは癌細胞が増殖が盛んであるため、外部からの物質の取り込みが亢進しているためと考えられる。実際、癌組織では血管新生が盛んであり、血管新生がおこなわれない場合、表面からおよそ 150 μm 程度の距離で壊死 (Necrosis) が起こると言われている。これは栄養分の不足に加え、酸素不足によるためと言われているが、実際にどの程度の低酸素になっているかは不明である。上述の通り、本申請研究で用いるリン光寿命イメージングマイクロスコプでの酸素濃度イメージングは、Stern-Volmer 式に従うため、酸素正常状態 (Normoxia) から Hypoxia、さらには Anoxia の領域を連続的に可視化可能である。このようなイメージングと、抗がん剤に対する難治療性の相関が得られれば、低酸素環境下の難治療性に関する研究が飛躍的に進むといえる。また、癌の進展イニシエーション、プロモーション、プログレッションなどにおける、細胞内酸素濃度の相関に関しても検討したいと考えている。

4. 研究成果

1 細胞レベルの脂肪代謝機構の解明を目指し、脂肪細胞における酸素動態を明らかにした。3T3-L1 細胞を用いて、脂肪細胞への分化前後で、細胞内酸素濃度や薬剤添加による細胞内酸素濃度への影響を調べた。3T3-L1 の脂肪細胞への分化によって、前駆脂肪細胞と比べて、細胞内酸素濃度は低下することが明らかとなった。また、薬剤添加による酸素濃度変化の時間変化を測定することで、脂肪細胞の薬剤応答を明らかにした。また、電子伝達阻害剤の機能解明を酸素イメージングにより行い、その酸素応答速度の違いにより阻害のメカニズム解明を行った。さらに、脂肪細胞を用いて、脂肪滴と酸素濃度の同時イメージングを行うことで、脂肪分解における活性酸素の影響を明らかにした。

また、ミトコンドリアおよびペルオキシソームの酸素消費に低酸素ストレスが与える影響を明らかにするため、低酸素環境下における細胞の酸素消費の動的変化を解明した。その結果、解糖系酵素や、酸化リン酸化に参与する酵素群が HIF の発現制御下に置かれていることが明らかとなった。また、急性的低酸素ストレスと、慢性的酸素ストレスにより、ミトコンドリアの酸素消費速度が変化することが分かった。

外部環境の酸素濃度 5% 以上では、細胞外酸素濃度が低下しても、酸素消費速度には影響があまりなことが分かった。また、低酸素ストレスにより、活性酸素消去系が更新するという結果も得られた。これらの結果から、ミトコンドリアの酸素消費変化は、急

性的低酸素ストレスにより抑制され慢性的低酸素ストレスにより減少することが明らかになった。

低酸素は癌や虚血性疾患に深く関与している。ミトコンドリアなど、低酸素応答がより詳細に明らかになることで、細胞内小器官をターゲットにした新たな治療法が生まれると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件、すべて査読あり)

- 1 [Hidehiro Ito](#), Ryuichi. Kondo, Kosei. Yoshimori, [Toshiaki Kamachi](#), Methane Hydroxylation with Water as an Electron Donor under Light Irradiation in the Presence of Reconstituted Membranes Containing both Photosystem II and a Methane Monooxygenase. ChemBioChem, (2018) (doi:10.1002/cbic.201800324).
- 2 Kenya Tanaka, Masahiro Kaneko, Masahito Ishikawa, Souichiro Kato, [Hidehiro Ito](#), [Toshiaki Kamachi](#), Kazuhide Kamiya, Shuji Nakanishi, Specific Interaction between Redox Phospholipid Polymers and Plastoquinone in Photosynthetic Electron Transport Chain. ChemPhysChem 18, 878-881 (2017) (doi:10.1002/cphc.201700065).
- 3 Mana Tsukada, Hong Sheng, Mika Tada, Takayuki Mokudai, Satomi Oizumi, [Toshiaki Kamachi](#), Yoshimi Niwano, Bactericidal Action of Photo-Irradiated Aqueous Extracts from the Residue of Crushed Grapes from Winemaking. Biocontrol Sci. 21, 113-121 (2016) (doi:10.4265/bio.21.113).
- 4 Mana Tsukada, Hong Sheng, [Toshiaki Kamachi](#), Yoshimi Niwano, Microbicidal action of photoirradiated aqueous extracts from wine lees. Journal of Food Science and Technology 53, 3020-3027 (2016) (doi:10.1007/s13197-016-2273-1).
- 5 Mana Tsukada, Takuji Nakashima, [Toshiaki Kamachi](#), Yoshimi Niwano, Prooxidative Potential of Photo-Irradiated Aqueous Extracts of Grape Pomace, a Recyclable Resource from Winemaking Process. PLoS ONE 11, e0158197 (2016) (doi:10.1371/journal.pone.0158197).

〔学会発表〕(計 30 件)

- 1 [Toshiaki Kamachi](#), Hiromi Kurokawa, [Hidehiro Ito](#), Oxygen Concentration Imaging Inside a Single Cell by PLIM,12th Advanced Imaging Methods Workshop,UC Berkeley, USA,2016/2/4-6,国際会議,招待
- 2 蒲池利章,細胞内の酸素濃度のイメージング,触媒学会横浜地区講演会,横浜市、神奈川大学,2016/12/3,国内,招待
- 3 [Toshiaki Kamachi](#), Hiromi Kurokawa, [Hidehiro Ito](#),Oxygen Concentration Imaging Inside a Single Cell by PLIM,8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference,Univ. Auckland, New Zealand,2016/12/4-9,国際会議,口頭
- 4 [Toshiaki Kamachi](#) and [Hidehiro Ito](#),Measurement of Oxygen Concentration Dynamics Inside a Single Cell by PLIM,14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry ,Toulouse, France,2017/6/7-10,国際会議,口頭
- 5 [Toshiaki Kamachi](#), Mai Matsuzaki and [Hidehiro Ito](#),PHOSPHORESCENCE LIFETIME MEASUREMENT FOR O2 CONCENTRATION IMAGING INSIDE A SINGLE CELL,The Ninth JSME-KSME Thermal and Fluids Engineering Conference (TFEC9),沖縄・那覇,2017/10/28-30,国際会議(国内開催),口頭

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
www.kamachi.bio.titech.ac.jp

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田畠 健治
ローマ字氏名：TABATA, Kenji
所属研究機関名：第一薬科大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：80312263

研究分担者氏名：伊藤 栄紘
ローマ字氏名：ITO, Hidehiro
所属研究機関名：東京工業大学
部局名：生命理工学院
職名：特任助教
研究者番号(8桁)：70707918

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。