

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12754

研究課題名(和文)長波長蛍光及び光安定度の最適化による長時間観測用破骨細胞機能観測プローブ

研究課題名(英文)Chemical probes for long time imaging of osteoclasts function by optimization of emission wavelength and photostability

研究代表者

菊地 和也 (KIKUCHI, Kazuya)

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：70292951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞の活性化を可視化する化学プローブを開発し、動物個体としてマウスを用い二光子励起 in vivo イメージングを行った。蛍光プローブとして、pH応答性を有し長波長領域に蛍光を発するロダミン誘導体を設計・合成した。この蛍光プローブをマウスに投与し二光子励起顕微鏡を用いて観察したところ、骨組織の一部から蛍光が観察され、活性化した破骨細胞が作る酸性領域の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Chemical probes were developed for in vivo imaging of activated osteoclasts by using two-photon excitation microscopy. As fluorescent probes, rhodamine derivatives with pH-activatable property and red-shifted emission were designed and synthesized. The two-photon excitation microscopy images showed that fluorescence signals were observed at the specific regions in bone tissue in living mice.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：in vivo イメージング 蛍光プローブ 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨組織では、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが保たれ、恒常性が維持されている。このうち、破骨細胞が異常な活性を示すと、バランスが崩れ骨粗しょう症やリウマチのような疾患につながる。破骨細胞の活性化に伴う骨吸収メカニズムは不明な点が多く、その解明のために生体内での蛍光イメージング技術が求められている。現在、骨疾患の診断にはX線CTや生化学的な骨代謝マーカーが利用されているが、これらの技術では骨格の空間情報と細胞活性とを結び付けることはできない。また、骨粗鬆症治療薬のアッセイとして破骨細胞の機能が調べられているが、この手法ではまず象牙上で破骨細胞の培養を行い、培養細胞を除いた後の象牙のへこみを計測し骨吸収の指標としている。しかし、この手法は時間がかかり、また定量的評価も困難であった。そこで申請者は、即時的な患部の診断のために、「骨吸収を行う破骨細胞の蛍光イメージング手法」の確立を目指し研究に着手した。本研究は、分子プローブの尾静脈注射という簡便な実験系を可能とし、多くの薬物候補化合物のスクリーニングにおいて画期的な手法となることが期待される。

分子イメージングは現在では、盛んに研究される分野になっており、特に蛍光タンパク質を用いた実験系は汎用的に応用されている。しかし、今回の標的(破骨細胞の活性化機構)の様に、蛍光タンパク質の応用では可視化できない現象は多くある。そこで、合成分子を用いて機能を特化することにより、初めて解明できる生命現象にチャレンジできると考えた。また、今回のイメージング対象は、マウス個体を直接用いる。この理由は、破骨細胞の機能が培養細胞では再現できないためであり、骨吸収している破骨細胞は in vivo 観察によって初めて調べることが出来る。破骨細胞は骨の溶解時にプロトンを放出し、骨組織の主成分であるヒドロキシアパタイトを溶かす。そこでこの性質に着目し、低 pH 環境下で蛍光を発する蛍光プローブにより選択的に活性化している破骨細胞を検出できると考えた。しかしながら生細胞イメージングと比較し、動物個体イメージングは技術的に障壁が高い。特に、動物個体内の標的部位に対する効率的なデリバリーが、生体内イメージングの成否を担う重要な要素である。そこで、骨粗鬆症患者に臨床処方されているビスホスホネート構造を分子プローブに採用し、BODIPY 骨格を有する pH 感受性色素と結合した構造をデザインした。この結果マウスの生体イメージングを行い、骨吸収を行う破骨細胞が pH 変化により検出可能であることを、世界で初めて示した (*J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 17772, *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*, 579.) また、これまでの研究では二光子励起顕微鏡を用いてきたが、生体内の自家蛍光が観察の妨げになる、光の組織透過性

が低い、レーザー光への耐性が低い等の問題があった。今回、レーザー光耐性を有する長波長蛍光色素を用いた pH 感受性蛍光プローブを開発する事で、モデル動物を用いた長時間イメージングに取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞の活性化を可視化する化学プローブを開発し、動物個体内で二光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージングを行う。具体的には、生体内の低 pH 環境を可視化する蛍光プローブに用いる長波長蛍光かつレーザー耐性を有する色素を開発し、色素とデリバリー用構造を結合させたプローブをデザイン・合成し、長時間蛍光イメージングを行う。これまでの成果を踏まえ、生体内の自家蛍光の影響を受けにくい赤色蛍光を示す色素を母体にし、光安定性を有する色素デザインを行い、pH 感受性の蛍光 OFF/ON スイッチ機能と、ビスホスホネート基による骨組織への高いデリバリー能力とを兼ね備えた機能性蛍光プローブを開発する。このプローブを用い、生きたマウスの骨組織上における破骨細胞の挙動と機能を、長時間リアルタイムで可視化する手法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、(1) pH 感受性レーザー光耐性長波長蛍光プローブの開発(化学合成)(2) マウスを用いた破骨細胞イメージング(in vivo 実験)の2つの項目から構成される。

(1) レーザー光耐性長波長色素プローブのデザイン・合成

破骨細胞が生体内で作り出す低 pH 環境は約 4.5 と報告されている (S.L. Teitelbaum, *Science*, **2000**, *289*, 1504) 従って、 $pK_a = 4.5 \sim 6.0$ で蛍光の OFF/ON 応答を示すプローブを開発することで、中性状態では消光し、破骨細胞が活性し骨を溶解する時のみ発蛍光性になると考えられる。以前の BODIPY 骨格を有する色素より長波長領域に蛍光を示すプローブの開発にあたり、ローダミンを色素骨格として利用することに着目した。ローダミンは高い量子収率を示し光安定性が高く長時間のレーザー照射条件下でも退色することなくイメージングが可能な色素である。この色素骨格に低 pH 領域で蛍光を発するように構造の改変を行った。ローダミンはスピロ環化反応によって、無色で蛍光を発しない閉環状態を取りうる。しかしながら環が開くことで 560 nm 近辺の吸収が現れ、発蛍光性になる性質がある。この反応に着目し、中性では閉環しているが、弱酸性条件で開環し蛍光を発するようなプローブをデザイン・合成した。骨組織への送達能は、骨の成分であるヒドロキシアパタイトに強く結合するビスホスホネート基によって付与した。(2) マウス個体を用いた破骨細胞イメージング(in vivo 実験)

項目(1)で開発したプローブをマウスに投与し、二光子励起顕微鏡を用いて骨表面上の pH 変化の観察を行った。実験には、破骨細胞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) が導入されたマウスを用いた。今回開発する pH 感受性色素であるローダミンは、GFP との二光子吸収帯の重なりがあるため、単一光源で励起が可能である。加えてこれまでに開発した緑色蛍光プローブとは異なり、GFP でラベルされたマウスと蛍光波長領域の重複がないため同時にイメージングが可能である。本実験において GFP は酸を放出する役割をしているプロトンポンプに導入されており、破骨細胞が骨を溶解する時に見られるプロトンポンプの局と骨組織上の低 pH 領域をマッピングすることで、プロトンポンプの局と pH 変化との相関を調べることが可能である (図 1)。

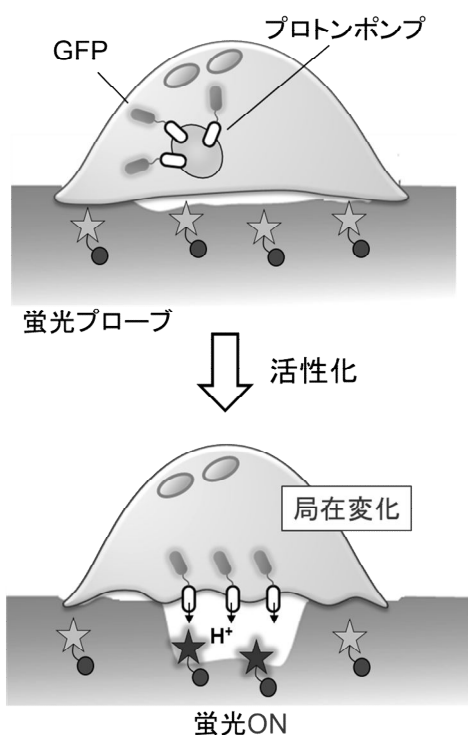


図 1. 低分子蛍光プローブと GFP 発現マウスを用いたタンパク質局在変化と破骨細胞活性の相関解析の模式図。

本研究においては、モデル動物を用いた実験ができる準備が整えられているため、プローブを作製し次第、随時動物実験を行うことができる。

4. 研究成果

3. で述べた指針に基づき、破骨細胞の活性を長時間観察可能なローダミンを色素骨格に有する蛍光プローブを合成した。pH 応答に関与するスピロ環化反応では、ベンゼン環上のカルボキサミドにおける置換基に応じて、形成されるスピロラクタム環が開く反応の pH 依存性が変化することが知られてい

る (W.L. Czaplyski *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 526.)。しかしながら、目的の pH 領域に応じた設計指針は十分に確立されていない。そこで、性質の異なる 3 つの置換基 R (シクロヘキシル基、2-トリフルオロエチル基、エチル基) をカルボキサミドの位置に導入した化合物 (Rh-1~3) の合成を行い、その pH 応答性について評価することとした (図 2)。Rh-1~3 には将来的に骨組織に送達できるビスホスホネート基を連結させるため、カルボキシ基が二箇所導入されている。これらの色素の合成は上記のローダミン色素の合成法を参考に行い、良好な収率で得ることができた。

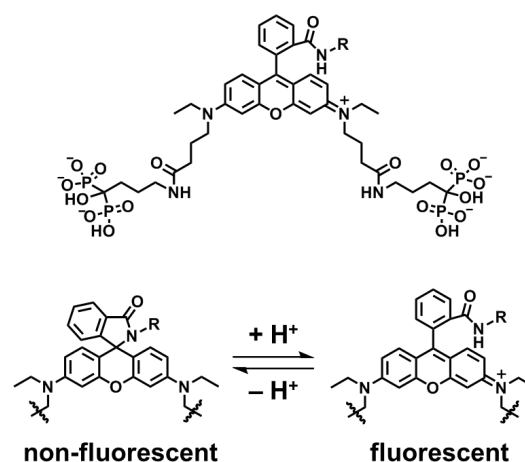


図 2. 設計した pH 応答性蛍光プローブの構造とその pH 応答のメカニズム

合成したそれぞれの色素について pH4.0~8.0 の緩衝液中で蛍光スペクトルを測定し、pH 依存的な蛍光特性の評価を行った。どの色素においても、pH が低くなるにつれて蛍光強度の増大が見られた (図 3 a)。得られた蛍光強度と pH を滴定曲線にフィッティングして pK_a を算出すると、それぞれいずれも 5~6 の範囲内に収まっており、破骨細胞の活性検出に適した pK_a (4.5~6.0) を有していることが示された。また、 pK_a の値は Rh-1 > Rh-2 > Rh-3 となり、置換基が立体的に嵩高くなるほど pK_a 値が上昇していく傾向が見られた。一方で置換基の性質に応じて、pH を 7.0 から 4.0 に変えた際の蛍光上昇の速度に大きな差が生じていることが観察された (図 3 b)。特に、電子供与基で置換された化合物 Rh-1 および Rh-3 では 1 時間経過しても蛍光強度の上昇がなお見られ続けたのに対し、電子求引基で置換された化合物 Rh-2 では 10 分以内で蛍光強度が飽和していた。この pH 変化に対する応答速度の差は、ローダミン色素のスピロラクタム環が開く速度の差に由来しているものと考えられる。スピロ環が開く反応は、アミド部位へのプロトンの結合した中間体形成を経て、キサンテン骨格からの電子の押し出しによる 9 位からの脱

離によって進行すると考えられている。したがってアミドへの電子求引基の導入は中間体を不安定化し、脱離反応の促進を引き起こしているものと考えている。

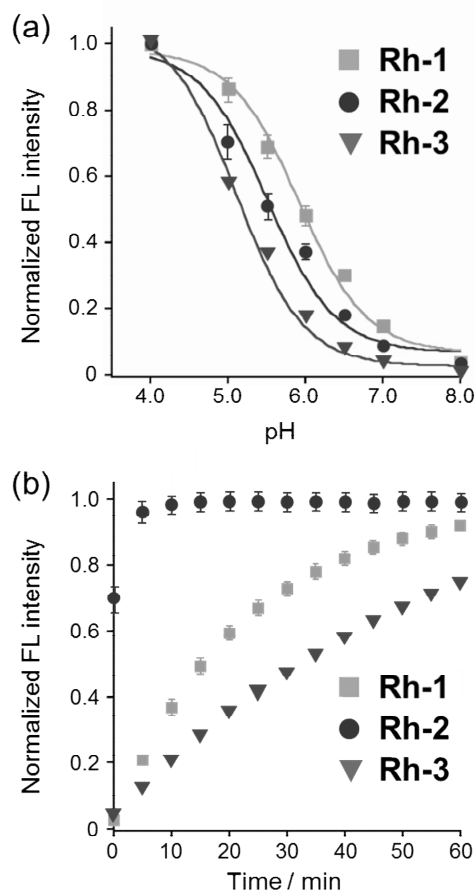


図3. (a)合成した各ローダミン色素のpHプロファイル、(b)緩衝液を低pH (pH = 4.0)に置換した際の蛍光強度の経時変化

上記の結果から、目標としたpH領域での応答と速い開環速度を共に有する色素Rh-2が破骨細胞の活性検出に適した性質を有していると考え、骨組織ターゲティング能を持つ蛍光プローブの合成を行った。上記の色素に対しビスホスホネート基を持つアレントロン酸を縮合させ、HPLCによる精製後、目的の蛍光プローブRh-2-ALNを得た。ビスホスホネート基導入後の蛍光プローブにおいてもpH依存的な蛍光強度の変化とその応答速度を測定した。その結果、蛍光強度変化における pK_a および開環速度は、ビスホスホネート基導入前の色素であるRh-2とほとんど同じであった。したがって、骨組織送達の役割を持つビスホスホネート基の導入は色素の性質自体には影響を与えないことが分かった。また、光安定性を評価するため、励起光にあたる550 nmの光を一定時間照射した後の蛍光スペクトルを測定したところ、30分の連続照射後でも蛍光強度の減衰は見られなかった。このことから、開発した蛍光プローブが高い光安定性を有していることが

示された。このpH応答性、および光安定性は溶液だけでなく、骨組織を模したヒドロキシアパタイト上に吸着させたプローブにおいても同様に観察された。これらの結果は、in vivoで骨組織表面のpH変化を長時間観察する目的に十分な性質であることを示している。

開発した赤色蛍光プローブRh-2-ALNをマウスに皮下投与し、二光子励起顕微鏡でイメージングを行った。マウスには先述の通り破骨細胞内のプロトンポンプがGFPでラベルされた個体を用いており、プロトンポンプの位置をGFPで、酸性領域を蛍光プローブ由来の赤色で検出した。また、GFPと今回開発した蛍光プローブ、Rh-2-ALNの二光子励起帯が一致しているため、1つのレーザーで同時に2つの色素を励起し観察することが可能であった。イメージング結果を解析することで、GFP由来の緑色の蛍光とプローブ由来の赤色蛍光の重なりが観察された。つまりこの領域では破骨細胞が骨を溶かしている状態であり、以前から提唱されている骨吸収モデルと合致する結果を得た。

以上を総括すると、本研究では新たに赤色領域にpH依存的な蛍光を示す破骨細胞活性検出蛍光プローブの開発に成功した。 pK_a 及び開環速度を適切に制御した蛍光プローブを合成し、in vivoで活性化した破骨細胞が作る低pH領域を検出できることを示した。今後はより長時間のタイムラプスイメージングを行った際の局在変化を追跡し、酸を放出するタンパク質の局在と酸性領域形成との相関を解析していきたい。

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 9件)

1. S. Mizukami, M. Kashibe, K. Matsumoto, Y. Hori, *K. Kikuchi, "Enzyme-triggered compound release using functionalized antimicrobial peptide derivatives", *Chem. Sci.* (2017). (査読有) DOI: 10.1039/C6SC04435B
2. S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki, *K. Kikuchi, "Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-glycosylation in Intracellular Trafficking", *Nat. Chem. Biol.*, 12, 853-859 (2016). (査読有) DOI: 10.1038/nchembio.2156
3. H. Maeda, T. Kowada, J. Kikuta, M. Furuya, M. Shirazaki, S. Mizukami, M. Ishii, *K. Kikuchi, "Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity and Motility Using Designed Small Molecular Probe", *Nat. Chem. Biol.*, 12, 579-585 (2016). (査読有) DOI: 10.1038/nchembio.2096

4. Y. Kamikawa, Y. Hori, K. Yamashita, L. Jin, S. Hirayama, D.M. Standley *K. Kikuchi, “Design of a Protein tag and Fluorogenic Probe with Modular Structure for Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins”, *Chem. Sci.*, 7, 308-314 (2016). (査読有) DOI: 10.1039/C5SC02351C

研究者番号 : 25220207

(2)研究分担者 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

(4)研究協力者 ()

5. Y. Hori, S. Hirayama, M. Sato, *K. Kikuchi, “Redesign of Fluorogenic Labeling System to Improve Surface Charges, Brightness, and Binding Kinetics for Imaging Functional Localization of Bromodomains”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 14368-14371 (2015). (査読有) DOI: 10.1002/anie.201506935

〔学会発表〕(計 57 件)

1. K. Kikuchi (invited), “Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity Using BODIPY Based Two Photon Excitation Probes”, *The 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC VIII)*, Auckland, New Zealand, Dec 5-9 (2016).

2. K. Kikuchi (invited), “Intracellular Protein Labeling by Functional Probes with Tunable Chemical Switches”, *Molecular Sensors & Molecular Logic Gate 2016*, Bath, U.K., Jul 24-28 (2016).

3. K. Kikuchi (invited), “Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity Using BODIPY Based Two Photon Excitation Probes”, *ICPP-9, 9th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines*, Nanjing, China, Jul 3-8 (2016).

4. K. Kikuchi, “Development of Multifunctional ¹⁹F MRI Contrast Agents with Fluorine-encapsulated Silica Nanoparticle”, *Pacificchem2015*, Honolulu HI, U.S.A., Dec 15-20 (2015).

5. K. Kikuchi, “Highly Sensitive ¹⁹F MRI Probes with Tunable Chemical Switches Using Metal Complexes”, *ICBIC-17, International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, Beijing, China, Jul 20-24 (2015).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊地 和也 (KIKUCHI, Kazuya)

大阪大学大学院・工学研究科・教授