

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05747

研究課題名（和文）骨代謝に関わる細胞機能を可視化する蛍光プローブの開発

研究課題名（英文）Development of fluorescent probe for imaging cell functions involved in bone metabolism

研究代表者

藁島 維文（Minoshima, Masafumi）

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：20600844

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では骨代謝に重要な役割をしている骨細胞の機能を明らかにするため、骨細胞が存在する骨組織深部に送達できる蛍光プローブを開発した。この蛍光プローブは低pH環境で光ることから、骨細胞による骨の溶解の検出を期待した。生体二光子イメージングにおいて骨細胞が存在する骨小腔からの蛍光シグナルを観察し、骨細胞が骨を溶かしている可能性を示す結果を得た。また、研究過程で可視光照射で効率よく分解する保護基の構造を見出し、この保護基を利用したケージドグルタミン酸を開発した。実際にNMDA型グルタミン酸受容体のイオンチャネル活性の可視光制御ができることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の代謝異常は骨疾患や免疫系の疾患に関与しており、今回開発した蛍光プローブによって骨細胞の溶解メカニズムをはじめとした未解明の機能の理解が進められるものと期待する。また、骨疾患の治療薬のスクリーニング法にも応用できるものと考えられる。可視光応答型ケージド化合物の開発は、神経細胞の光応答の深部における範囲を拡張できることが期待される。また、薬剤を連結することで、長波長光の放出を利用した治療法への応用も可能と考える。

研究成果の概要（英文）：To better elucidate the function of osteocytes, which play a vital role in bone metabolism, we have successfully developed a fluorescent probe capable of reaching deep bone tissue where osteocytes are located. This probe exhibits fluorescence in low pH environments, allowing us to detect bone resorption by osteocytes. Using two-photon excitation microscopy, we found the disc-shaped fluorescence signals from osteocytic lacunae in living mice, suggesting that osteocytes may produce acid in bone resorption.

During the course of this research, we synthesized a photolabile protecting group under visible light irradiation. We developed a caged glutamic acid with the visible-light responsive protective group. Notably, we have demonstrated visible light regulation of ion channel activity of NMDA-type glutamate receptors.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ 骨細胞 pH応答性色素 二光子励起 ケージド化合物

1. 研究開始当初の背景

骨はわれわれの体を支えるための重要な組織である。骨組織では骨の破壊と形成が繰り返し行われる骨代謝が進むことでその機能が維持されている。骨代謝の過程は、骨溶解を担う破骨細胞、骨形成を担う骨芽細胞、骨基質内部に広く分布する骨細胞をはじめ、他の免疫系細胞との多様な細胞集団が混在した環境下で行われている。このバランスが崩れると骨機能低下が起こり、骨そしょう症や関節リウマチといった疾患の原因につながるため、骨組織における細胞機能を理解することは重要である。元来生きたままの状態では骨組織を調べることは困難であったが、近年の二光子励起顕微鏡技術の発展により骨組織内部の蛍光観察が可能となり、蛍光タンパク質により標識された細胞の挙動が捉えられている。さらに、細胞機能を検出できる蛍光プローブを用いることで、細胞挙動と機能を同時にイメージングすることが可能となった。これまでに申請者らは破骨細胞の骨溶解活性を検出する有機小分子プローブを開発し、骨溶解に関する破骨細胞の機能を細胞から分子レベルにおいて明らかにしてきた(H. Maeda, *et al. Nat. Chem. Biol.*, 2016, 12, 579. M. Minoshima, *et al. ACS Cent. Sci.*, 2019, 5, 1059)。

一方で、骨組織では破骨細胞以外にも多様な細胞がはたしている(図1)。例えば、骨細胞は骨基質内部に広く分布する分化した骨芽細胞であり、骨溶解には関与しないものといわれてきた。しかしながら、骨を溶解してミネラル成分である Ca^{2+} 不足を補うはたらき(骨細胞性骨溶解)があるのではないかと提唱されている(A. Teti & A. Zallone, *Bone*, 2009, 44, 11)。また、骨芽細胞の基質小胞膜上にはアルカリホスファターゼが局在しており、ピロリン酸から骨ミネラルの材料となるリン酸を供給することにより骨形成を促進している。これらの骨細胞・骨芽細胞機能に関しては、直接イメージングできる蛍光プローブがなく、いまだ不明な点が多く残されている。

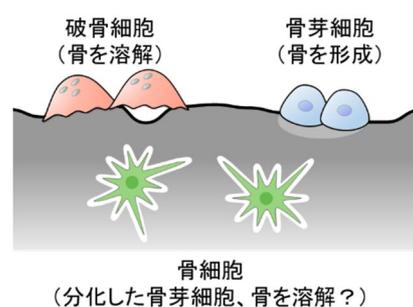


図1. 骨代謝に関わる細胞と機能

2. 研究の目的

本研究では骨組織における骨細胞、骨芽細胞の機能を可視化する有機小分子蛍光プローブを開発し、生体イメージングに適用することでこれらの細胞機能の動態を明らかにすることを目的とした。具体的には、骨細胞が骨基質内部を溶解する際に生じる低 pH 領域、骨芽細胞が骨を形成する際に分泌するアルカリホスファターゼ(ALP)の活性を検出する蛍光プローブを設計、合成する。これまでの検討で、ビスホスホネート基を用い、生体骨組織へ蛍光プローブを送達する技術を独自に確立している。そこで本知見を応用し、ビスホスホネート部位の改変により、骨細胞が存在する骨基質内部へ pH 感受性蛍光プローブを送達させる。また、骨芽細胞の機能を検出できる蛍光プローブを骨組織へと送達することを試みる。また、本研究を遂行する過程で、長波長の二光子励起によって分子を放出できる光分解性保護基を見出し、この保護基を利用したケージド化合物の開発も行った。

3. 研究の方法

蛍光プローブの合成は対応する蛍光色素にビスホスホネートの誘導体を縮合し、HPLC によって精製することで得た。pH 感受性に関しては各 pH における溶液中で吸収スペクトル、蛍光スペクトルを測定した。骨組織への結合は骨ミネラル成分であるヒドロキシアパタイト粒子と混合し、蛍光顕微鏡でイメージングすることによって確認した。この時、外液の pH を変えることで pH 応答性も確認した。骨組織の観察には、マウスに蛍光プローブを皮下注射によって3日間投与し、麻酔をかけた後に、露出した頭頂骨を二光子励起顕微鏡によって観察した。励起波長は 940 nm とした。骨基質由来の第二次高調波によるシグナル、蛍光プローブ由来のシグナルをそれぞれ画像化した。

ケージド化合物は、見出した光分解性保護基にアセチル基やグルタミン酸を結合させて合成した。合成したケージド化合物の光分解特性を評価するため、500 nm 近辺の光を照射して反応物を HPLC により測定した。また、光量を測定することで光分解における量子収率を算出した。ケージドグルタミン酸の放出を確認するため、アフリカツメガエル卵母細胞に NMDA 型グルタミン酸受容体を発現させた系を用意し、ケージドグルタミン酸およびグリシンを投与後、Voltage clamp 法により一定電圧にした状態で膜を介して流れる電流を計測した。光照射による電流値の変化を計測した。

4. 研究成果

(1)骨細胞の骨溶解を検出するプローブの開発

研究の主な成果：骨細胞による骨溶解を検出するため、これまでの研究で開発した pH 感受性蛍光色素、BODIPY 誘導体を基に、骨細胞が分布する骨基質内部まで送達可能な蛍光プローブを

新たに設計した。(図2)。この色素は中性ではアニリン部位から BODIPY 色素への光誘起電子移動により蛍光を示さないが、アニリン部位にプロトン化が起こると電子移動が抑えられ、蛍光を示す。また、骨基質内部へ送達するため、ビスホスホネートの誘導体を利用した。骨基質内部への送達は骨ミネラル成分への親和性に依存していることが知られているため、相互作用が比較的弱いリセドロネート誘導体を骨基質内部まで浸透させるために利用した。リセドロネートを縮合し、pH 応答性蛍光プローブ pHocas-RIS を合成した。

合成した蛍光プローブを各 pH の緩衝液中で蛍光スペクトルを測定したところ、pH の低下に伴い蛍光強度の上昇が見られた。また、ヒドロキシアパタイトに pHocas-RIS を吸着し、蛍光顕微鏡で観察したところ、ヒドロキシアパタイト表面上から蛍光シグナルが観察され、pH の低下に伴い蛍光強度が大きくなること分かった。二光子励起顕微鏡を用いたイメージングを行った。投与後のマウスを観察したところ、pHocas-RIS は骨組織に送達し、表面の一部から蛍光シグナルが検出された(図2)。この位置は破骨細胞の局在と一致しており、破骨細胞が放出する酸によって局所の pH が低下したことを示している。この結果は以前の研究で得られたものと同様であった。一方で、骨組織深部まで観察すると、骨組織の表面より内部の領域で円盤状の蛍光シグナルが観察された。この円盤状の形状は、骨組織内部における骨小腔を示しており、骨細胞が存在する区画と一致する。従って、この結果は骨細胞が低 pH 領域を形成している可能性を示している。投与後のマウスから骨組織切片を作成し、各 pH でイメージングを行ったところ、同様に pH 低下によって骨小腔からの蛍光シグナルが観察され、pHocas-RIS が送達されたことを確認した (R. Hashimoto, *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, 59, 20996)。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：骨細胞による骨溶解機構はこれまでの研究から示唆されていたが (A. Teti & A. Zallone, *Bone*, 2009, 44, 11) 生体内で検出する手法がなく議論の余地が残されていた。今回開発した pH 応答性蛍光プローブを、二光子励起顕微鏡による生体イメージングと組み合わせることで、はじめて生きたマウスの骨組織深部の低 pH 環境を可視化することに成功した。この成果は骨細胞のダイナミックな機能に迫るものであり、生体内の骨代謝の機構の理解につながり骨疾患の治療薬開発等に応用できるものと期待される。
今後の展望：骨細胞を蛍光タンパク質で標識したマウスを用いて、骨組織深部の骨細胞と低 pH 環境の変化を観察する。また、pH 環境を定量的に評価するためのレシオ型蛍光色素の導入を試みる。本色素の開発に合わせて、骨組織深部へのターゲティング効率を更に上げるためのリガンド(ビスホスホネート誘導体)の検討を進める。

(2)可視光照射に反応するケージド化合物の開発

研究の主な成果：可視光を吸収する核酸結合色素、チアゾールオレンジの構造の一部に、紫外光～青色光で高い光分解性を示す 7-ヒドロキシ-N-メチルキノリニウム-2-イル構造を導入した色素、HTO が可視光で分解する保護基になりうると考え、合成した。HTO でアセチル基を保護し、可視光を照射したところ、照射開始直後から分解が見られた。そこで、興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸に対し水溶性を高めた HTO (Sul-HTO) で保護したのも合成し同様に評価した。こちらでも光照射によって分解が見られた。Sul-HTO の光分解の量子収率は 100 以上の値と算出され、500 nm の波長領域、水溶液中ではたらくケージド化合物としては高い分解効率であることが示された。さらに二光子励起による近赤外光の分解も評価したところ、グルタミン酸の放出を利用した生理活性制御への応用について、NMDA 型グルタミン酸受容体の反応を電気生理学的手法により評価した。その結果、光照射によって電流応答が見られ、イオンチャネル活性の可視光制御を達成することができた (R. Hashimoto, *et al. Chem. Sci.* 2022, 13, 7462)。

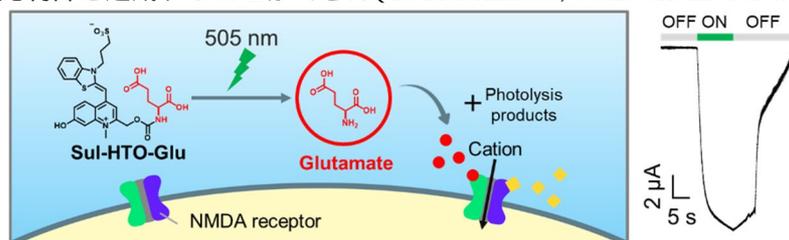


図 3. Sul-HTO-Glu による可視光照射に反応したグルタミン酸放出

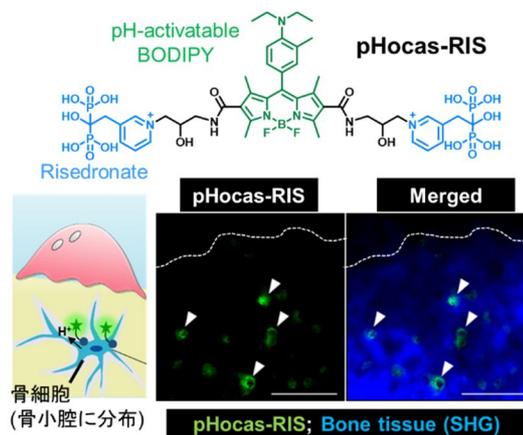


図 2. pHocas-RIS の構造と骨小腔における低 pH 環境のイメージング(白矢印に対応)

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：ケージド化合物の多くは紫外光が必要であり、500 nm 以上の長波長の可視光で効率よく分子を放出する例はほとんど報告されていない。この領域の可視光で分解する保護基は近年開発されつつあるが (R. Weinstain, *et al. Chem. Rev.* 2020, 120, 13135) 光分解効率が低い、水溶性に乏しく生体応用まで示されていない例がほとんどである。一方で、本研究で示した可視光ケージドグルタミン酸 Sul-HTO-Glu は水溶液中においても比較的高い分解効率でグルタミン酸を放出することができる。本成果は可視光を利用した生命機能の制御ツールとして、生物学や神経科学への応用が期待される。

今後の展望：本研究で見出した可視光応答性保護基を修飾し、さらに長波長の領域で分解する保護基やより高い光分解効率で分子を放出できるケージド化合物の開発を進める予定である。グルタミン酸の系においては、可視光および近赤外光 (二光子励起) を用いて神経細胞機能の制御ができるかどうかを進めていく予定である。また、本保護基を用いグルタミン酸以外の生理活性分子を保護したケージド化合物を開発し、可視光制御ツールの適用分子範囲を拡張する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Vicente Manuel, Salgado-Almario Jussep, Collins Michelle M., Martinez-Sielva Antonio, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Domingo Beatriz, Llopis Juan	4. 巻 9
2. 論文標題 Cardioluminescence in Transgenic Zebrafish Larvae: A Calcium Imaging Tool to Study Drug Effects and Pathological Modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9101294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsukazaki Hiroyuki, Kikuta Junichi, Ao Tomoka, Morimoto Akito, Fukuda Chie, Tsuda Eisuke, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Kaito Takashi, Ishii Masaru	4. 巻 152
2. 論文標題 Anti-Siglec-15 antibody suppresses bone resorption by inhibiting osteoclast multinucleation without attenuating bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116095 ~ 116095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Konishi Yuki, Okunishi Atsuya, Sugihara Fuminori, Nakamura Tatsuya, Akazawa Kazuki, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya	4. 巻 94
2. 論文標題 Development of Off-On Switching 19F MRI Probes for Cathepsin K Activity Detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1690 ~ 1694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Reja Shahi Imam, Minoshima Masafumi, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Near-infrared fluorescent probes: a next-generation tool for protein-labeling applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC04792A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小西祐輝、杉原文徳、蓑島維文、菊地和也	4. 巻 15
2. 論文標題 カテプシン K 活性の検出を目指した Off-On スイッチング 19F MRI ナノプローブの開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 分子イメージング学会機関誌 (JSMI Report)	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Ryu, Minoshima Masafumi, Kikuta Junichi, Yari Shinya, Bull Steven D., Ishii Masaru, Kikuchi Kazuya	4. 巻 59
2. 論文標題 An Acid Activatable Fluorescence Probe for Imaging Osteocytic Bone Resorption Activity in Deep Bone Cavities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 20996 ~ 21000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202006388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Imoto Takuma, Minoshima Masafumi, Yokoyama Tatsushi, Emery Ben P., Bull Steven D., Bito Haruhiko, Kikuchi Kazuya	4. 巻 6
2. 論文標題 A Photodeactivatable Antagonist for Controlling CREB-Dependent Gene Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1813 ~ 1818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.0c00736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomczyk Mateusz Michal, Boncel Slawomir, Herman Artur, Krawczyk Tomasz, Jakobik-Kolon Agata, Pawlyta Mirosława, Krzywiecki Maciej, Chrobak Artur, Minoshima Masafumi, Sugihara Fuminori, Kikuchi Kazuya, Kuznik Nikodem	4. 巻 15
2. 論文標題 Oxygen Functional Groups on MWCNT Surface as Critical Factor Boosting T2 Relaxation Rate of Water Protons: Towards Improved CNT-Based Contrast Agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 7433 ~ 7450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IJN.S257230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wyskocka-Gajda Marzena, Przypis Lukasz, Olesiejuk Monika, Krawczyk Tomasz, Kuznik Anna, Nawara Krzysztof, Minoshima Masafumi, Sugihara Fuminori, Kikuchi Kazuya, Kuznik Nikodem	4. 巻 211
2. 論文標題 A step towards gadolinium-free bioresponsive MRI contrast agent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 113086 ~ 113086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2020.113086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Reja Shahi Imam, Minoshima Masafumi, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Near-infrared fluorescent probes: a next-generation tool for protein-labeling applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC04792A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Masafumi Minoshima
2. 発表標題 Development of Optochemical Tools for Regulation of CREB-Dependent Transcriptional Activity
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蓑島維文、橋本 龍、坂田宗平、小野富三人、菊地和也
2. 発表標題 非対称シアニン色素を用いた可視光応答型ケージド化合物の開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shahi Imam Reja, Toshiyasu Sowa, Masafumi Minoshima, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Visualization of proteins in living cells through non-covalent reversible labeling
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryu Hashimoto, Masafumi Minoshima, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Development of visible-light-sensitive photoprotecting group based on unsymmetrical cyanine
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西祐輝、杉原文徳、蓑島維文、長池 航、内橋貴之、菊地 和也
2. 発表標題 パーフルオロカーボンを内包したポリマーナノ粒子型 ¹⁹ F MRI造影剤の開発
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 龍、蓑島維文、菊地和也
2. 発表標題 in vivoで骨細胞の機能を可視化するpH感受性蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本 龍、蓑島維文、菊地和也
2. 発表標題 可視光に応答する光分解性保護基の開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西祐輝、蓑島維文、杉原文徳、菊地和也
2. 発表標題 パーフルオロカーボンを含むポリマーナノ粒子型 ¹⁹ F MRI造影剤の開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shahi Imam Reja, Toshiyasu Sowa, Masafumi Minoshima, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Development of non-covalent protein labeling probes for visualization of intracellular proteins and application to single-molecule imaging
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門岡康平、梅野太朗、蓑島維文、菊地和也
2. 発表標題 ラクタマーゼ阻害剤を用いた細胞内タンパク質のラベル化プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 蓑島 維文、菊地 和也	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 1072
3. 書名 先端の分析法 第2版（原理編第3章プローブ, MRIプローブ）	

1. 著者名 蓑島維文、菊地和也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック（第5章2 MRIプローブ）	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ケージド化合物から化合物を放出させる方法	発明者 蓑島維文、橋本 龍、菊地和也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-022014	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------