

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15246

研究課題名（和文）生体深部の高速画像取得を実現する超高効率二光子励起蛍光ナノプローブの創成

研究課題名（英文）Development of two-photon excitable ultrabright fluorescent nanoprobes for in vivo high-speed deep imaging

研究代表者

仁子 陽輔 (Niko, Yosuke)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・助教

研究者番号：20782056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体二光子励起蛍光イメージング（2PM）における観察深度と観察速度の向上に向け、ピレン誘導体をナノエマルジョンに高密度集積させた新規超高輝度蛍光ナノプローブを開発した。高輝度な赤色発光性ピレン誘導体LipoPYF5を集積したナノプローブを用いてマウス脳血管の2PMを実施したところ、脳表面から1.5 mmの血管が観察され、汎用のローダミン誘導体を用いた場合（0.7 mm）と比べて飛躍的に観察深度を向上できた。また、第二近赤外光（1100 nm）で励起可能な新規ピレン誘導体NIR-LipoPYF5を用いたところ、最大で1.8 mm、すなわち海馬歯状回域の血管を観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、蛍光プローブの高輝度化が生体2PMにおける観察深度・観察速度の向上に重要であることを明らかにした。本研究中に開発したLipoPYF5集積型蛍光ナノプローブは、市販の二光子顕微鏡に備わっているレーザー・ディテクターにマッチしており、一般的なユーザーなら誰でも使用可能である。NIR-LipoPYF5集積型蛍光ナノプローブについては第二近赤外光を発振する高価なレーザーを必要とするものの、マウス脳海馬CA1領域全層の毛細血管を可視化する極めて高性能なものである。以上の点から、これら新規超高輝度蛍光ナノプローブは生物医学的研究、特に脳血管疾患の病態解明に有用なツールになると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed novel ultrabright fluorescent nanoprobes containing large numbers of pyrene-based fluorescent molecules to improve the observable depth and imaging speed in in vivo two-photon microscopy imaging (2PM). Nanoprobes encapsulating thousands of red-emissive pyrene derivative (LipoPYF5) could visualize the blood vasculature in hippocampus (at a depth of 1.5 mm from the brain surface) of mice, whereas a commonly used rhodamine dye could visualize brain vasculature only at a depth of 0.7 mm. Moreover, when a new pyrene dye (NIR-LipoPYF5) that can be excited by a laser oscillating second near-infrared light (1100 nm) was employed instead of LipoPYF5, brain blood vasculature at 1.5 mm depth was observed even under high speed condition (30 frames/s). Furthermore, by averaging 8 images, we succeeded in visualizing the brain blood vasculature at up to 1.8 mm, corresponding to the hippocampal dentate gyrus.

研究分野：光機能性物質

キーワード：二光子励起蛍光イメージング ナノエマルジョン ピレン 第二近赤外光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経疾患・血管障害を始めとする種々の難治性疾患の機構解明や治療法開発に取り組むためには、生きている動物の細胞・組織・器官を高い時空間分解能で観察する技術が不可欠である。この点において、二光子蛍光イメージング(2PM)は低侵襲的かつ空間分解能に優れるといった特徴をもち、既にマウスやコモンマーマウスといったモデル動物の脳神経・脳血管の観察などに広く利用されている。一方、2PMには、例えばマウスの脳の表面から1mm程度しか観察できないこと、また生体深部を撮影する際には1画像の取得に時間がかかってしまうなど、観察深度や観察速度(時間分解能)に問題があった。

2. 研究の目的

上記の背景の下、本研究では、2PMと併用する蛍光プローブに着眼し、その高性能化によって2PMの観察深度・時間分解能の飛躍的な向上を目指すこととした。

3. 研究の方法

2PMにおける観察深度や時間分解能を向上させるためには、蛍光プローブの高輝度化が重要だと予想される。輝度とは、蛍光プローブの二光子吸収断面積(二光子吸収効率を表す)と蛍光量子収率の積であり、二光子励起発光性とも呼ぶ。蛍光プローブの輝度が高い場合、励起レーザー光の照射時間が短くとも十分な蛍光シグナルが得られるため、1枚の画像を取得するための時間が短縮される(=時間分解能の向上)。同様に、生体深部のような励起レーザー光強度が著しく減衰してしまう箇所においても蛍光プローブを励起することができ、それは観察深度の向上に繋がる。

筆者はこれまでに、多環式芳香族であるピレンを基盤とした様々な蛍光発色団を開発しており、その中には優れた二光子励起発光性を示すものも見られてきた^[1,2]。そこで本研究では、それらピレン誘導体をナノエマルジョンに高密度集積させた『超高輝度蛍光ナノプローブ』を開発し、それらを用いたマウスの脳血管2PMを行った。ナノエマルジョンは生体適合性に優れた有機ナノ粒子であり、脂溶性分子を多量に包摂できる特徴がある。この材料を用いることで、高輝度なピレン誘導体を安全かつ大量にマウスへと投与できる。

4. 研究成果

A. 超高輝度赤色発光性蛍光ナノプローブの開発とマウス脳血管イメージングへの応用

筆者はこれまで、ピレンを基盤としたスチリル系色素PYを合成し、それらが大きな二光子励起発光性と赤色発光性を示すことを報告している^[1]。また、本研究開始以前より、このPYを基にした脂溶性誘導体であるLipoPYF5はナノエマルジョンへの高密度集積が可能であり、超高輝度な蛍光ナノプローブが得られることを報告している(図1)。本研究ではまず、このLipoPYF5集積型ナノプローブNE1と、2PMで汎用される蛍光プローブであるテトラメチルローダミンB-デキストラン複合体(TMR-dextran)を用いて、それらのマウスの脳血管観察における深部観察性を比較した。なお、NE1中のLipoPYF5は、テトラメチルローダミンBよりも数十倍もの二光子励起発光性を示すことが明らかになっている。また、動的光散乱法で求めたNE1の流体粒子直径は約63nmであり、一粒子当たりに含まれるLipoPYF5の平均数はおよそ2000個である。

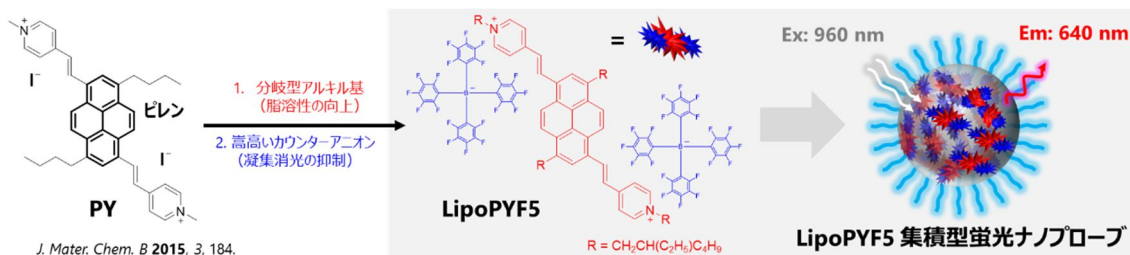


図1. 脂溶性高輝度ピレン誘導体LipoPYF5およびLipoPYF5集積型蛍光ナノプローブ

実験方法としてはまず、開頭したマウスに65nmolのTMR-dextranを静脈投与し、960nmの励起レーザー光照射のもと2PMを実施した。その後、同一のマウスにLipoPYF5集積型ナノプローブNE1を投与し、2PMを実施した。この際、LipoPYF5の物質も65nmolとなるよう調整している。その結果、図2左に示すように、TMR-dextranでは脳表面から0.7mm程度(大脳皮質第V層程度)の血管しか観察出来ないのに対し、LipoPYF5集積型ナノプローブを用いることで最大1.5mm程度(海馬CA1領域)の血管が観察できた。蛍光プローブの血中濃度が2倍程度になっても観察深度は大きく変化しないこと、同一マウスを用いていること、同じパワーの励起レーザーを用いていること、LipoPYF5とTMR-dextranの蛍光波長はいずれも検出器の高感度帯に当たることなどを考慮すると、上記の観察深度の差はTMR-dextranとLipoPYF5の輝度の差に由来していると考えられる。

次に、NE1 よりも少量の LipoPYF5 を集積したナノエマルジョン NE2 を作成した。NE2 の流体学直径は約 65 nm であり、一粒子あたりに含まれる LipoPYF5 の平均分子数はおよそ 20 個である。NE2 を用いて、上と同様の 2PM を実施した。この際、投与する“ナノエマルジョン濃度”が 30 pmol になるように調整している。図 2 右に示す通り、NE2 を用いた場合、マウスの脳表面から 0.7 mm 程度しか観察できなかった。他方、NE2 の 100 倍もの LipoPYF5 を含有する NE1 を追加投与すると、最大 1.5~1.6 mm 深度の脳血管が観察された。この結果は、図 2 左に示した実験と同様、高輝度な蛍光プローブを用いることで観察可能深度が飛躍的に向上することを表している。

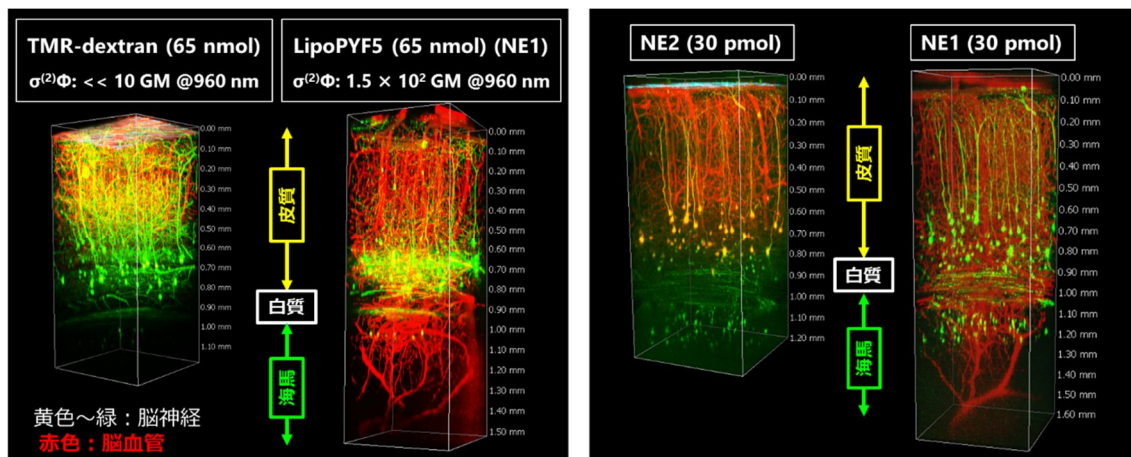


図 2 . マウス脳血管 2PM における観察深度に対する蛍光プローブの輝度の影響 : (左) TMR-dextran vs LipoPYF5 集積型蛍光ナノプローブ NE1 (右) NE2 vs NE1

また、NE1 投与後のマウスにおいて、レゾナントスキャナーを用いた高速イメージングを実施した。フレームレート (1 秒間に取得する画像数 : frames/sec (fps)) を 120 fps に設定し、2PM を実施したところ、マウスの脳表面から 1.1 mm、すなわち海馬 CA1 領域の血管を観察することができた (図 3)。この際、血管中を走る血球細胞が黒抜きの状態で見えたため、結果として海馬 CA1 領域の血流を動画として観察することに成功した。

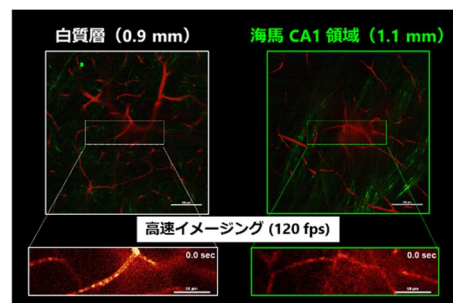


図 3 . マウス脳血管の高速イメージング

以上、本研究では、超高輝度な蛍光プローブを使用することで 2PM における観察深度や時間分解能が飛躍的に向上することを明らかにし、同時に、蛍光プローブ開発の重要性を明らかにすることができた。一見当然のことのように見えるが、図 1, 2 で示したような比較実験が行われた例は殆どない。また、本実験で用いたチタンサファイアレーザーおよび蛍光ディテクター (GaAsP) は市販の二光子励起顕微鏡において標準的なものであり、特別な光学機器を用いることなく 1.5~1.6 mm という深度の血管の観察に成功したのは本研究が初めてである。同様に、標準的な光学機器でもってマウスの脳海馬領域血管の血流観察に成功したのも本研究が初である。したがって、LipoPYF5 集積型蛍光ナノプローブは血管動態観察などを必要とする様々な生物医学的研究に役立つツールとなることが期待される^[3]。

B. 第二近赤外光照射のもと効率的な二光子励起発光性を示す新規蛍光ナノプローブの開発とマウス脳血管イメージングへの応用

上記 A における成果より、超高輝度な蛍光ナノプローブは脳深部血管の観察に有効な材料であることが判明した。他方、観察深度をさらに向上させるためには、より生体組織透過性の高い第二近赤外光 (NIR-II: 1100~1350 nm) を発振する励起レーザーの利用が不可欠である。そこで筆者らは、LipoPYF5 の電子共役系を拡張することで、NIR-II 領域で効率的な二光子励起発光性を示す蛍光発色団の開発に取り組んだ。

LipoPYF5 の電子共役系拡張体である NIR-LipoPYF5 を設計・合成したところ、同分子は 1100 nm において 225 GM という二光子吸収断面積を示した (図 4)。蛍光量子収率は 0.30 (30%) であり、したがって NIR-LipoPYF5 の二光子励起発光性は約 68 GM ということになる。この値は一般の 2PM 用蛍光プローブとしては決して大きくないものの、NIR-II 領域駆動する蛍光プローブの多くは 10 GM 未満であるため^[4]、NIR-II を利用するという点において NIR-LipoPYF5 は十分高輝度であると言える。NIR-LipoPYF5 は LipoPYF5 と同様、ナノエマルジョン内部のオイル部

分への溶解性が高く、1粒子当たり1000個以上のNIR-LipoPYF5を集積することが可能であった。

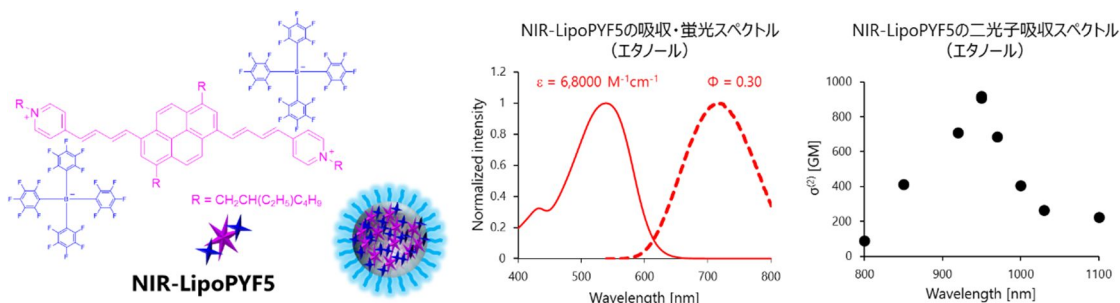


図4．脂溶性高輝度ピレン誘導体 NIR-LipoPYF5 とその光物理的性質

NIR-LipoPYF5 集積型蛍光ナノプローブを用いてマウスの脳血管 2PM を実施したところ、フレームレートが 30 fps (レゾナントスキャナー) という比較的高速条件であるにもかかわらず、脳表面から最大 1.5 mm 程度の深さの血管を観察することに成功した (図5)。このイメージング速度は先の LipoPYF5 集積型蛍光ナノプローブを用いたとき (1.5 mm) と比べて数百倍の速度である。また、8 画像を用いたアベレーシングをかける (実質: 3.75 fps) ことで、最大約 1.8 mm、すなわちマウスの脳海馬歯状回領域の血管まで観察することが可能となった。このイメージング速度でこれほどの深部を観察した例は他の 2PM あるいは三光子励起蛍光イメージングにおいても例はない。また、海馬 CA1 領域全層の毛細血管まで明瞭に描出できた点にも大きな特徴がある。以上の結果から、NIR-LipoPYF5 は NIR-II で発振する高価な励起レーザーが必要となるものの、LipoPYF5 と同様、脳血管動態観察に有用なツールとなることが期待される。なお、本成果は現在国際学術誌へと投稿中である。

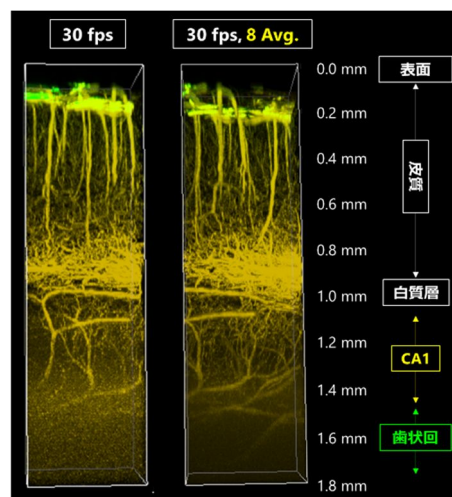


図5 .NIR-LipoPYF5 集積型蛍光ナノプローブを活用したマウス脳血管 2PM

5. まとめ

本研究において、蛍光プローブの高輝度化は 2PM の観察深度・観察速度の向上に有効であることが判明した。これは一見当然のことのように思えるが、比較実験等を通じてしっかりと確認された例は殆どなく、今後の高輝度蛍光プローブ開発を正当化する重要な事実である。蛍光プローブを設計する際には使用可能なレーザーやディテクターを考慮する必要があり、例えば LipoPYF5 集積型蛍光ナノプローブは一般の 2PM ユーザーなら誰でも使用できるものとなっている。NIR-LipoPYF5 集積型蛍光ナノプローブに関しては、先述の通り比較的高価なレーザーを必要としてしまう一方、今回筆者らが用いたものよりも高感度なディテクターを用いることができれば観察深度・観察速度のさらなる向上が期待される潜在性もある。

今後は、NIR-LipoPYF5 を遥かに凌駕する輝度をもつ NIR-II 駆動型蛍光発色団の開発に取り組む他、生体深部血管のみならず、狙った組織・器官、果ては細胞外小胞までも可視化できる革新的な蛍光プローブ群を開発していく予定である。

6. 参考文献

- [1] Niko, Y.; Moritomo, H.; Sugihara, H; Suzuki, Y.; Kawamata, J.; Konishi, G. *J. Mater. Chem. B* 2015, 3, 184.
- [2] Seki, H.; Onishi, S.; Asamura, N.; Suzuki, Y.; Kawamata, J.; Kaneno, D.; Hadano, S.; Watanabe, S.; Niko, Y. *J. Mater. Chem. B* 2018, 6, 7396.
- [3] Takezaki, M.; Kawakami, R.; Onishi, S.; Suzuki, Y.; Kawamata, J.; Imamura, T.; Hadano, S.; Watanabe, S.; Niko, Y. *Adv. Funct. Mater.* 2021, 31, 2101698.
- [4] Wang, S.; Liu, J.; Goh, C. C.; Ng, L. G.; B. Liu, *Adv. Mater.* 2019, 31, 1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Kazuki, Kawakami Ryosuke, Murakami Masamoto, Nakayama Taku, Yamamoto Shinkuro, Inoue Keiji, Tsuda Teruko, Sayama Koji, Imamura Takeshi, Kaneno Daisuke, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Synthesis and photophysical properties of a new push-pull pyrene dye with green-to-far-red emission and its application to human cellular and skin tissue imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1TB02728J	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 Takezaki Minami, Kawakami Ryosuke, Onishi Shozo, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Imamura Takeshi, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Integrated Fluorescent Nanoprobe Design for High Speed In Vivo Two Photon Microscopic Imaging of Deep Brain Vasculature in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2010698 ~ 2010698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.202010698	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Matsuura Hitomi, Kawakami Ryosuke, Imamura Takeshi, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke
2. 発表標題 Development of Novel Near-Infrared Fluorescent Dye for in vivo Two-photon Microscopic Imaging of Deep-Brain Vasculature of Mice
3. 学会等名 光化学討論会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上和貴、川上良介、村上正基、佐山浩二、今村健志、波多野慎悟、渡辺茂、仁子陽輔
2. 発表標題 新規ピレン誘導体の合成とその多光子蛍光顕微鏡による皮膚病診断への応用
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯江真綺、鈴木康孝、川俣純、川上良介、今村健志、波多野慎悟、渡辺茂、仁子 陽輔
2. 発表標題 In vivo 二光子蛍光イメージングを志向したピレン含有スクアライン誘導体の合成
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上和貴、川上良介、村上正基、佐山浩二、今村健志、波多野慎悟、渡辺茂、仁子陽輔
2. 発表標題 新規 Push-Pull 型ピレン色素の合成と多光子蛍光顕微鏡を利用した皮膚病診断への応用
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯江真綺、鈴木康孝、川俣純、川上良介、今村健志、波多野慎悟、渡辺茂、仁子 陽輔
2. 発表標題 ピレン含有スクアライン誘導体の合成と in vivo 二光子蛍光イメージングへの応用
3. 学会等名 2021年日本化学会中国四国支部大会高知大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上和貴、川上良介、村上正基、佐山浩二、今村健志、波多野慎悟、渡辺茂、仁子陽輔
2. 発表標題 新規ピレン誘導体の合成と皮膚組織の二光子励起蛍光イメージングへの応用
3. 学会等名 2021年日本化学会中国四国支部大会高知大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦瞳、鈴木康孝、川俣純、川上良介、今村健志、波多野慎吾、渡辺茂、仁子陽輔
2. 発表標題 マウス脳深部血管の高速イメージングを志向した近赤外発光性ピレン誘導体の開発
3. 学会等名 2021年日本化学会中国四国支部大会高知大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 化合物、蛍光色素剤、キット及び細胞の検出方法	発明者 仁子陽輔、村上正基、他8名	権利者 高知大学、愛媛大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-073923	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 化合物、組成物、蛍光色素剤、キット、及び細胞、組織、又は器官の検出方法	発明者 仁子陽輔、川上良介、他7名	権利者 高知大学、愛媛大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-073923	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 化合物、蛍光色素剤、キット及び細胞の検出方法	発明者 仁子陽輔、村上正基、他8名	権利者 高知大学、愛媛大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/008939	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 蛍光色素剤及び腫瘍細胞の検出方法	発明者 村上正基、川上良介、津田照子、佐山浩二、今村健志、仁子陽輔	権利者 愛媛大学、高知大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/32637	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

プレスリリース http://www.kochi-u.ac.jp/information/2021030300029/
--

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
研究協力者	川上 良介 (Kawakami Ryosuke)		
研究協力者	今村 健志 (Imamura Takeshi)		
研究協力者	村上 正基 (Murakami Masamoto)		
研究協力者	鈴木 康孝 (Suzuki Yasutaka)		
研究協力者	川俣 純 (Kawamata Jun)		
研究協力者	波多野 慎悟 (Hadano Shingo)		
研究協力者	渡辺 茂 (Watanabe Shigeru)		

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
---------	---------