

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591600

研究課題名(和文)非線形光学顕微鏡による水・脂質の直接観察に基づいた肺胞環境の維持・破綻機構の解明

研究課題名(英文) Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS), non-linear optical microscope revealed the kinetics of lipid and water by direct observation.

研究代表者

池田 一成 (Ikeda, Kazushige)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00193194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によりCARS顕微鏡を使用して、今までに得ることができなかった新しいタイプのデータ、すなわち生きた状態の肺胞型上皮細胞におけるサーファクタントと思われる脂質の動態を無染色でリアルタイムに観察した。また、脂質は低浸透圧刺激やテルブタリンに反応して細胞外へ分泌された。

本研究のCARS顕微鏡を用いた肺胞上皮細胞におけるサーファクタントの開口放出の観察とその制御因子の検索をさらに発展させることは肺胞の機能維持の理解を深め、新生児の慢性肺疾患の予防、治療にも大変重要な意味を持つと考える。

研究成果の概要(英文)： Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) microscope revealed the kinetics of lipid like surfactant, in real time without staining in live alveolar type II epithelial cells. This lipid image was a new type of data that could not get without CARS microscopy. We also observed exocytosis of lipid from alveolar type II epithelial cells by low osmotic stimulation or terbutaline.

Further study for the control factor of surfactant exocytosis in alveolar type II epithelial cells using CARS microscope, is required for understanding the functional maintenance of the alveoli, prevention of chronic lung disease of the newborn and treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：CARS顕微鏡 サーファクタント exocytosis 脂質

1. 研究開始当初の背景

新生児は出生後、新生児一過性多呼吸、呼吸窮迫症候群、慢性肺疾患などのさまざまな病態を呈することがある。肺胞環境の恒常性維持には肺水の除去、間質を含めた水の輸送、サーファクタント分泌など、水の輸送や脂質分泌が不可欠となっている。非線形光学顕微鏡の1つである Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡は細胞を固定することなく無染色で水や脂質を観察することができる新しい顕微鏡である。この CARS 顕微鏡を用いて、肺胞上皮細胞での水の移動、サーファクタントの分布変化および開口放出などの動態をリアルタイムで観察することが可能となる。本研究は肺胞の恒常性維持の理解を深め、新生児の慢性肺疾患の予防、治療にも大変重要な意味を持つと考える。

2. 研究の目的

(1) 研究の学術的背景

新生児は出生と同時に呼吸を開始し、胎内環境から胎外環境への変化に適応していく。特に胎盤を通してのガス交換から、胎内では全く使われていなかった肺での呼吸を行うという大きな変化が起こる。出生時の肺水の除去、その後の肺胞環境の恒常性維持には肺上皮細胞での水の輸送が重要であり、肺胞Ⅰ型上皮細胞、肺胞Ⅱ型上皮細胞上の水や電解質イオンの移動のためのチャンネル・ポンプ群が共同して働いている。一方、サーファクタントは界面活性剤であり、約90%のリン脂質と10%のサーファクタント蛋白より構成され、出生時に新生児が外界に適応する際、肺の表面張力を下げ、肺呼吸を可能にする。サーファクタントは肺胞Ⅱ型上皮細胞で産生され、lamellar body に層状に蓄積されている。lamellar body に蓄積されたサーファクタントは常に肺胞腔へ輸送、分泌されており、肺の表面張力を低下させている。出生時の肺水除去や新生児のショック後の肺水腫、また、慢性肺疾患でも肺の間質の浮腫が原因の1つであり、これらは水、電解質の輸送の異常により引き起こされている。一方、早産児ではサーファクタント欠乏による呼吸窮迫症

候群 (RDS) が知られているが、正期産児でも致死性の RDS 症状を呈することがある。サーファクタントの輸送に関連している ABCA3 の遺伝子異常による肺疾患の病態が示され、ABCA3 の様々な遺伝子変異による新生児期の呼吸窮迫から慢性肺疾患まで多様な病態が報告されている (Shulenin et al. N Engl J Med, 2004)。

このように、肺胞環境の機能維持には水や電解質イオンの移動のための水・イオンチャンネル群、界面活性剤であるサーファクタントが不可欠である。これらの機能異常により、多くの新生児が命を落としている。研究申請者は、この問題を解決すべく、9年前より Stat3 蛋白とサーファクタント蛋白の関連性、ABCA3 蛋白とサーファクタント脂質合成や肺胞Ⅱ型上皮細胞でのラメラ体形成に関する研究を行ってきた。

(2) 研究の目的

現在までの肺胞環境および機能についての知見は、組織学、生物物理学、生化学、分子生物学で示されたデータから類推、構築されたものであり、実際に肺胞で起きている現象を可視化することは不可能であった。Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡は、生きた細胞中の脂肪や水をそれぞれ無染色で可視化できる新しい非線形光学生物顕微鏡である。

今回、この CARS 顕微鏡を用いれば、肺胞上皮における水の移動、肺胞Ⅱ型上皮細胞内のサーファクタントの分布変化および開口放出の様子を無染色かつリアルタイムで観察できると考え、本研究を計画した。

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡

3次元像を得ることが可能な共焦点蛍光顕微鏡や2光子励起蛍光顕微鏡が開発され、生物、医学研究に広く用いられるようになってきた。しかしながら、これらは蛍光顕微鏡であるため、試料を蛍光色素で染色しなければならず、蛍光色素を介して試料の情報を得ている。

ラマン分光や赤外分光は無染色に分子

構造を知ることのできる方法である。しかし、水は赤外線を吸収するため、赤外分光は生体計測には応用しにくい。一方、自然放出ラマン散乱光は非常に微弱なため、生体試料の自己蛍光など不要なバックグラウンド光により検出が困難である。

一方、CARS は、非線形ラマン散乱の一種である。Pump 光(P)と Stokes 光(S)(P > S)を試料に入射すると、試料分子との相互作用によって、角周波数 $\omega_{\text{CARS}} = 2\omega_{\text{P}} - \omega_{\text{S}}$

のコヒーレントな光が放出される。このコヒーレントな光を CARS と呼ぶが、CARS 光は $\omega_{\text{P}} - \omega_{\text{S}}$ が試料のラマン活性振動数 ω_{R} に等しいとき極大となる。この振動数を 3200 cm^{-1} に合わせると、O-H 結合を持つ水分子の 2850 cm^{-1} に合わせると C-H 結合、主として C-H 結合を数多く持つ脂質からの CARS シグナル(イメージ)が観察される。CARS は、アンチストークス域の発光であるために蛍光などのストークス光の影響を回避でき、非常に信号強度が強いなどの利点がある。また、CARS は非線形な光学現象であり、2 光子励起蛍光顕微鏡と同様に、優れた奥行き分解能を持っている。

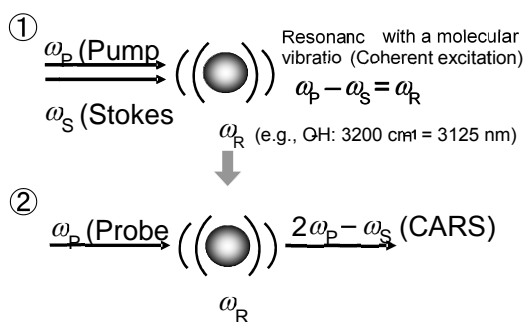


図1 CAR 光の発生原理

授)では、この CARS を利用した非線形光学顕微鏡を生物医学に応用すべく(株)オリンパスと共に共同開発を行っており、特に生命科学分野への応用研究に関しては世界でも進んでいる。

3. 研究の方法

(1) Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡は、生きた細胞・組織中での水および脂質のリアルタイムでの直接的イメージングを可能にする最新の非線形光学顕微鏡である(図2)。本研究では中央が薄いカバーガラス状になっているマイクロディッシュに対象の細胞をセットし、振動数が 2850 cm^{-1} になるように Pump 光(P)と Stokes 光(S)を細胞に入射し、脂質のシグナルを観察する。



図2 装置全景

(2) 肺胞 型上皮細胞の単離

野生型マウスから collagenase 処理した肺を取り出し、 $20 \mu\text{m}$ の網で肺の細胞を単細胞にばらす。その後、CD16/32/45 の抗体をあらかじめ付着させたシャーレで 12 時間培養し、培養液に浮遊した肺胞 型上皮細胞を単離する。この単離した細胞をマトリゲルをコートしたマイクロディッシュに BEGM/FBS/KGF で培養する。1-2 日の培養ではマトリゲル上に単細胞として存在するが、1 週間程度培養すると、肺胞 型上皮細胞のみの Cyst を形成する。

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡を用いて、生きた状態での肺胞上皮および肺胞上皮細胞における水および脂質の動きのリアルタイム観察を行い、下記の研究を行う。

肺胞上皮 型細胞におけるサーファクタントの細胞内動態観察

肺胞 型上皮細胞あるいは肺胞 型上皮細胞による Cyst をシャーレごと CARS 顕微鏡のステージ上にセットして、C-H モードでの CARS イメージを撮影し、その画像データをもとにラメラ体内のサーファクタントを観察する。

肺胞 型上皮細胞におけるサーファクタントの開口放出の観察とそれに影響を与える因子の探索

肺胞 型上皮細胞あるいは肺胞 型上皮細胞による Cyst をシャーレごと CARS 顕微鏡のステージ上にセットして、C-H モードでの CARS イメージを撮影し、その画像データをもとにラメラ体内のサーファクタントを観察する。さらに、低浸透圧刺激、テルブタリン刺激 ($3.5 \times 10^{-5} M$) を行い、サーファクタントの開口放出を観察する。

4. 研究成果

(1) 肺胞上皮 型細胞におけるサーファクタント細胞内動態観察

肺胞 型細胞はサーファクタント産生細胞で、肺胞の恒常性維持に重要な働きをしている。サーファクタントは肺胞 型上皮細胞内のラメラ体内に層状に蓄積されている。サーファクタントの組成の 90% はリン脂質が占めており、CARS 顕微鏡の C-H モードで肺胞 型上皮細胞を観察すると非常に強い CARS シグナルを発するラメラ体と思われる構造体を観察した (図 3)。

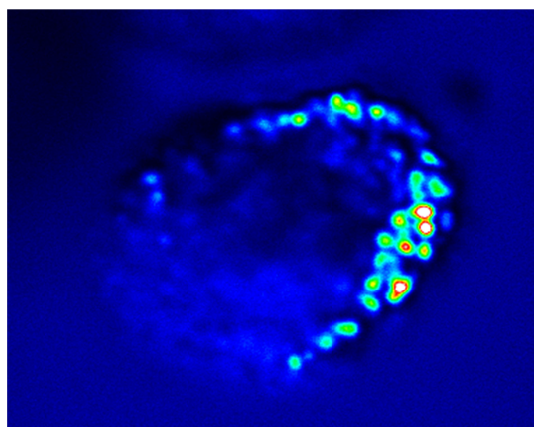


図3 肺胞 型上皮細胞内の Lipid
1 μm sliced Cross Section

CARS 顕微鏡は解像度に優れるため、細胞内の微小構造であるラメラ体 (1-2 μm) も観察可能であったと思われる。また、CT のように 1 μm のスライスで撮影を行った。その画像を合成することも可能であった (図 4)。

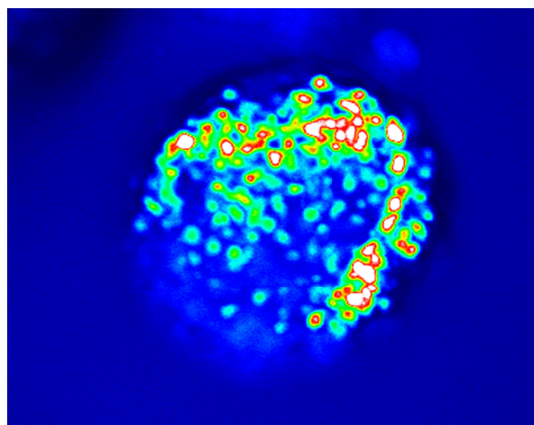


図4 肺胞 型上皮細胞内の Lipid
1 μm sliced を 1 細胞分合成したもの

肺胞 型上皮細胞の Cyst を CARS 顕微鏡で観察した (図 5)。脂質のシグナルは Cyst の内腔側に存在するように思われた。実際の肺胞では肺胞 型上皮細胞は肺胞側にサーファクタントを分泌する極性を持って、ガス交換を行う肺胞 I 型上皮細胞と混在して存在している。肺胞 型上皮細胞単体の Cyst も生体内の肺胞と同じような極性を持っている可能性がある。

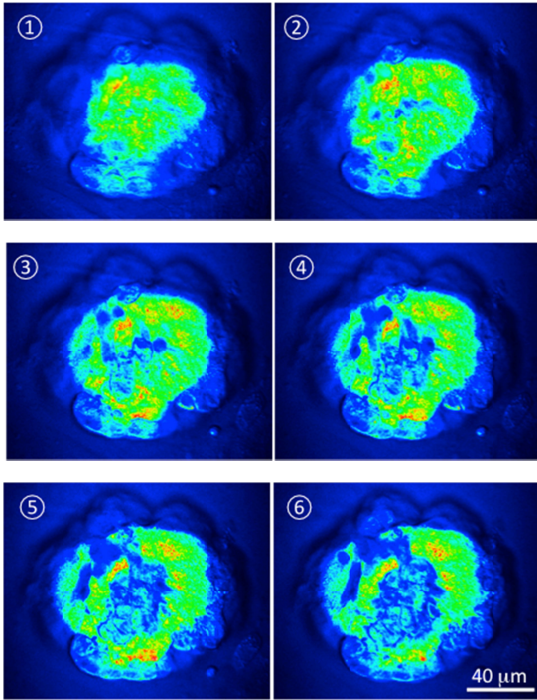


図5 肺胞 型上皮細胞の Cyst

(2) 肺胞 型上皮細胞におけるサーファクタントの開口放出の観察

マウス肺胞上皮 型細胞に低浸透圧刺激を行い、サーファクタント開口放出をリアルタイムに観察した(図6)。 ～ は3分間隔であり、CARS顕微鏡(C-Hモード)の全細胞の積算画像データを示している。(①～④は5つめの画像の部分拡大を示す。)

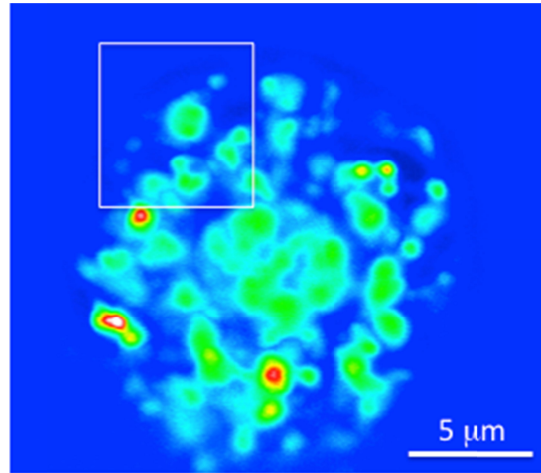
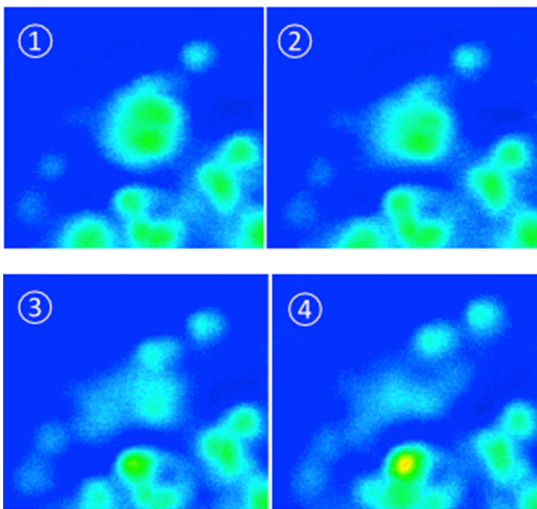


図6 低浸透圧刺激によるサーファクタントの開口放出

マウス肺胞上皮 型細胞に Terbutaline 刺激 (3.5×10^{-5} M)を行い、サーファクタント開口放出をリアルタイムに観察した(図7)。 ～ は48秒間隔であり、CARS顕微鏡(C-Hモード)の全細胞の積算画像データを示している。

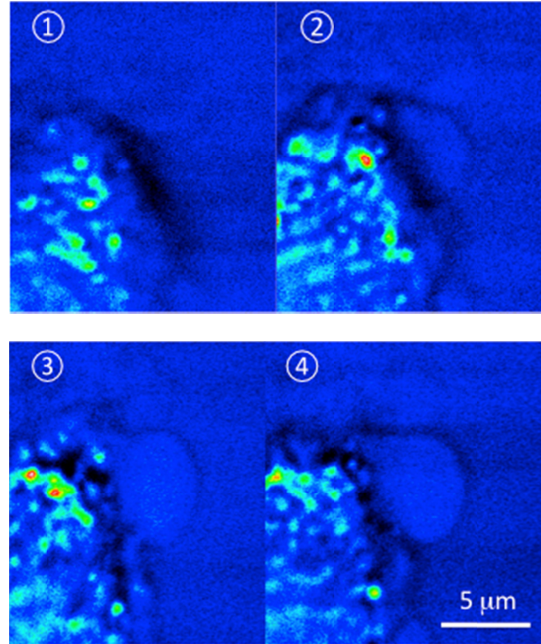


図7 Terbutaline 刺激によるサーファクタントの開口放出

学術的な特色・独創的な点

本研究の最大の特徴のひとつは、現在、開発中である CARS 顕微鏡を使用して、今までに得ることができなかった新しいタイプ

のデータ、すなわち生きた状態の肺胞上皮および上皮細胞におけるサーファクタントと思われる脂質の動態を無染色でリアルタイムに観察できた点である。本研究で得られる実験データは、前例のない極めて斬新なものであると考えられる。

予想される結果と意義

近年、新生児医療は急速に進展し、妊娠22 - 23 週の超早産児も成育出来るようになってきた。しかし、超早産児の生存率の上昇に伴い、未熟児網膜症、呼吸窮迫症候群、早期産に伴う慢性肺疾患、脳室周囲軟化症などの後障害が存在し、とりわけ、肺は胎内では使われておらず、早産児では出生後未熟な肺で無理にガス交換が行われること、子宮内感染などにより、慢性肺疾患を来し、児の成長、運動機能、精神運動発達に影響を及ぼす。本研究の CARS 顕微鏡を用いた肺胞上皮細胞におけるサーファクタントの開口放出の観察とその制御因子の検索をさらに発展させることにより、肺胞の機能維持の理解を深め、新生児の慢性肺疾患の予防、治療にも大変重要な意味を持つと考える。

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 2 件)

- 1) 松崎 陽平, 池田 一成, Coherent Anti-Stokes Raman Scattering 顕微鏡による II 型上皮細胞におけるサーファクタントの動態観察、日本周産期・新生児医学会雑誌、査読なし、49 巻 2 号、2013、P726
- 2) 松崎 陽平, 池田 一成 et al、肺の発生発達の分子メカニズム、Fetal & Neonatal Medicine、査読なし、5 巻、2013、P102-103

[学会発表](計 2 件)

- 1) 松崎 陽平, 池田 一成 et al、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering 顕微鏡による II 型上皮細胞におけるサーファクタン

トの動態観察、第49回日本周産期・新生児医学会学術集会、2013年7月14-16日、パシフィコ横浜(神奈川県)

- 2) 松崎 陽平, 池田 一成 et al、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering 顕微鏡を用いた肺胞 II 型上皮細胞におけるサーファクタントの観察、肺サーファクタント分子病態研究会、2012年6月23日、札幌医科大学 記念ホール(北海道)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

特にありません

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池田 一成 (Kazushige Ikeda)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00193194

(2) 研究分担者

松崎 陽平 (Yohei Matsuzaki)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60327583

(3) 連携研究者

安井 正人 (Masato Yasui)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90246637

相馬 義郎 (Yoshiro Sohma)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：60268183