

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286029

研究課題名(和文) 局所微小力荷重下における近接場蛍光検出による生体組織の生理学応答分析装置の開発

研究課題名(英文) Development of analyzer for physiological response of biological tissue under localized stress by near-field fluorescence microscopy

研究代表者

梅田 倫弘 (Norihiro, Umeda)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60111803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、活性酸素種(ROS)を産生する。特に、虚血再灌流障害の場合、再開血流によって誘起された物理ストレスがROS産生の原因となる。しかし、ミトコンドリアへの物理ストレスとROS産生の関係は全く解明されていない。本研究では、この関係を明らかにするため、力印加共焦点光学顕微鏡を開発し、単離ミトコンドリアに力を印加したときのMitoSOX蛍光強度を測定した。その結果、40nNの外力を印加したとき、10nNに比べて蛍光強度増加率が大きいことが明らかとなった。すなわち、ミトコンドリア内で産生されたROSは、印加された物理ストレスの大きさに依存することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria produce reactive oxygen species (ROS). Especially, in the case of ischemia-reperfusion injury, physical stress induced by blood flow at narrowing blood vessel causes ROS production from mitochondria in the living cell. However, the relationship between physical stress applied to mitochondrion and mitochondrial ROS production is absolutely unknown. To investigate this relationship, we developed a force-applying confocal laser scanning microscopy (F-CLSM). The ROS response of mitochondrion was measured by using MitoSOX fluorescent indicator. We confirmed 90% difference of fluorescence increase rates between inhibitor and activator injections. Finally, we monitored the fluorescence of MitoSOX while applying force onto single mitochondrion. In the case of applied force of 40 nN, fluorescence intensity rate was larger than that of 10 nN. Therefore, we revealed that the ROS produced in the mitochondrion depends on the magnitude of physical stress applied to mitochondrion.

研究分野：ナノフォトニクス

キーワード：ミトコンドリア ユートン ROS ベント型光ファイバー 局所微小荷重 蛍光色素 共焦点顕微鏡 ヤング率 ナノニ

1. 研究開始当初の背景

生体組織、特に細胞に対する力学的刺激に関する研究は多数報告されている。特に AFM の登場以降は、ナノメートルサイズの局所領域に 10nN 程度の微小な力を加えることができるようになり、様々な細胞に対する研究が進んでいる。これらの研究報告では、外力は AFM プロープで印加できるものの、生体組織の生理学応答の直接検出は不可能であるため、形態学的変化の観測が主な得られる情報となっており、十分な知見が得られているわけではない。というのも、一般に AFM と蛍光顕微鏡の横分解能には大きな隔たりがあり、前者が数 nm～数十 nm であるのに対して、後者は 200nm 程度が限界で、力学応答の位置分解能を十分発揮できておらず、蛍光顕微鏡の高解像度化が課題となっている。

これに対して、本研究で開発するシステムのコンセプトは、図 1 に示すように、先端を先鋭化させた光ファイバーを曲げてベントカンチレバーとして、その先端を生体組織に押し付けて応力を与えると同時に、その先端から蛍光励起光を射出させて蛍光色素を励起させ、その蛍光を検出することにより、生体組織の生理学応答を検出する。このため、荷重範囲が直径数十 nm、蛍光励起領域も数十 nm であるため、応力点と生理学応答検出範囲が完全に一致するとともに、その大きさも数十 nm 以内と AFM に匹敵するほど高分解能であることがこれまでにない独創的な手法である。

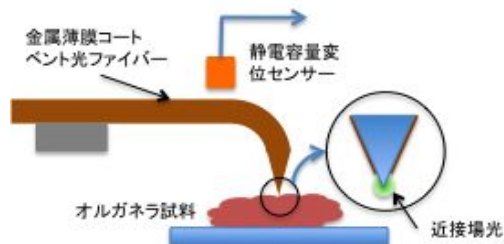


図1 開発する装置のコンセプト

2. 研究の目的

本研究は、細胞やオルガネラの力学刺激に伴う生理学応答を近接場光学顕微技術によって検出分析することで、これまで全く明らかにされてこなかった生体組織のダイナミクスを明らかにするとともに、それら生体組織を起源とする様々な疾病の機序の解明に

迫ることができる分析システムの構築を目的とする。その目的を達成するために、本研究ではミトコンドリアによって産生される活性酸素種 (ROS) と力学刺激の関係に着目する。

心筋梗塞の原因となる虚血再灌流障害は、虚血状態により狭小化された血管への血液再灌流によって、毒性物質である活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) が産生されることで生じる疾患である。狭小化された血管に対して血液再灌流が生じると、血圧による血管を広げる力が血管内皮細胞に加わる。この細胞への物理ストレスが ROS の産生を促すことが示唆されている。ROS の代表的なものとして、スーパーオキシドが挙げられ、強い酸化力を持ち、細胞を傷付けることで細胞死を引き起こす。

ROS の主な発生源は、細胞のエネルギーであるアデノシン三リン酸 (ATP) を合成するミトコンドリアである。ミトコンドリアは ATP 合成過程である電子伝達系で電子を受け渡すことで ATP を合成する。この ATP 合成過程で用いる酸素の 0.1～2% が ROS となる。よって、虚血再灌流障害のメカニズム解明の知見を得るためには物理ストレス負荷時のミトコンドリアにおける ROS を測定することが必要不可欠である。しかし、単一ミトコンドリアに直接物理ストレスを印加した際の ROS の応答は全く未解明である。

これに対して、本研究では単一ミトコンドリアに直接外力を印加することが可能なベント光ファイバープロープ (BOF) と共焦点顕微鏡を組み合わせた力印加共焦点顕微鏡 (F-CLSM) を開発した。

3. 研究の方法

(1) 力印加共焦点光学顕微鏡 (F-CLSM)

本研究で開発した F-CLSM システムの構成図を図 2 に示す。ミトコンドリアに一様に力印加するため、先鋭化した光ファイバーの先端 2～3 mm 部分を 90 度に曲げたベント光ファイバープロープ (BOF) を用いた。BOF 先端は、超音波カッターによって切断することで直径が 3～4 μm 程度の端面を形成した。BOF 端面をミトコンドリアに接触させ、押し込むとたわみが発生する。たわみ量は、BOF 上部に設置した静電容量変位センサー

(NCDS)によって測定した。BOFのたわみ量を Δd とすると、フックの法則によりBOFのたわみ量から印加力 $F=k\Delta d$ が求められる。測定された印加力 F とミトコンドリアの変形量 δ を用いて、ヘルツの弾性接触論によるフィッティングからミトコンドリアのヤング率 E を算出した。

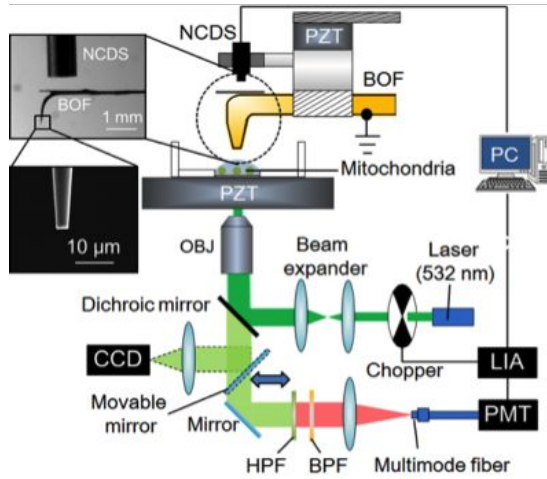


図2 F-CLSMの構成図

ミトコンドリアのROSは、蛍光色素による共焦点光学系を用いて測定した。対物レンズ(NA=0.55)によって $1\ \mu\text{m}$ のレーザースポットが形成され、単一ミトコンドリアを観察することが可能である。ミトコンドリアを観察するためには、位置を特定するため、2次元ピエゾステージを用いて、ROSによるミトコンドリア蛍光イメージングを行った。

(2)ミトコンドリア蛍光染色と試薬

豚心筋から単離したミトコンドリアを接着タンパク質であるセルタックによりガラスボトムディッシュ上に固定し、MitoSOX Red(Molecular Probes INC, 励起波長: 532 nm, 蛍光波長: 580 nm)で染色した。

本研究では、ミトコンドリアのスーパーオキシドの産生量を制御するため、以下の2つの試薬を使用した。

- ・ Antimycin-A(和光純薬工業)
- ・ Succinate(和光純薬工業)

4. 研究成果

(1)アンチマイシン添加に対するROS応答

単一ミトコンドリアの蛍光測定の最中にアンチマイシンを滴下し、その後の蛍光応答

を測定した。本研究では滴下したアンチマイシンの最終濃度を $0.4, 0.8, 1.2\ \mu\text{M}$ と設定した。

$0.4\ \mu\text{M}$ のアンチマイシンを滴下したときの蛍光強度電圧の時間変化を図3に示す。アンチマイシンを蛍光観察開始からおよそ150秒後に滴下すると、蛍光強度電圧の増大が確認された。アンチマイシンは、ATP合成過程である電子伝達系における電子の流れを止め、ミトコンドリア内に電子を漏出させる働きがある。その電子がミトコンドリア内の酸素と結合してスーパーオキシドが産生することから、蛍光が増大したと考えられる。

さらに、スーパーオキシド産生率を求めるため、アンチマイシン滴下後200秒での蛍光強度電圧変化を算出した。 $0.4\ \mu\text{M}$ のアンチマイシンを滴下したミトコンドリアにおける蛍光強度電圧変化を ΔI_{F1} 、アンチマイシン滴下後200秒間を T_{200} とすると、 T_{200} での ΔI_{F1} : $1.1\ \text{nV/s}$ であった。

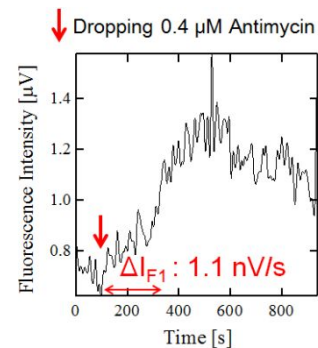


図3 Antimycin($0.4\ \mu\text{M}$)を添加した時の蛍光強度変化

阻害剤滴下によるミトコンドリアの活性低下時のスーパーオキシド産生率と比較するため、蛍光観察中に活性剤であるコハク酸を滴下する実験を行った。測定開始からおよそ600秒後にコハク酸を $1\ \text{mM}$ 滴下すると、わずかながら蛍光強度電圧の増大が確認された。 $1\ \text{mM}$ のコハク酸を滴下したミトコンドリアにおける蛍光強度電圧変化を ΔI_{F4} とすると、 T_{200} における ΔI_{F4} は ΔI_{F4} : $0.61\ \text{nV/s}$ であった。

濃度 $0.4 \sim 1.2\ \mu\text{M}$ のアンチマイシン及び、 $1\ \text{mM}$ のコハク酸の滴下実験をそれぞれサンプル数5個体において測定し、両者の結果を比較した結果を図4に示す。

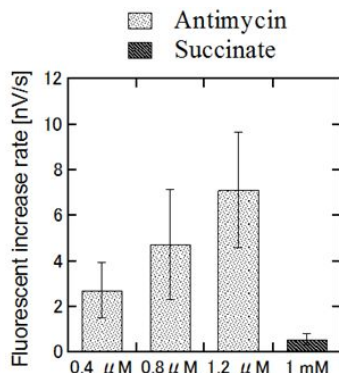


図4 アンチマイシンとコハク酸添加による蛍光強度増加率

滴下したアンチマイシン濃度 0.4, 0.8, 1.2 μM に対する ΔI_F は、それぞれ、2.7, 4.7, 7.1 nV/s であった。アンチマイシン濃度が 0.4 μM と 0.8 μM の場合では、およそ 75% の増加、アンチマイシン濃度が 0.8 μM と 1.2 μM の場合ではおよそ 50% の増加が確認された。これから、アンチマイシンの濃度増大によるミトコンドリアの活性低下に伴い、スーパーオキシドの産生率も増大することを確認した。

一方で、コハク酸を 1 mM 滴下した場合、 ΔI_F は 0.55 nV/s であった。アンチマイシンを滴下した際の ΔI_F と比較すると、およそ 90% 小さい値であった。コハク酸は ATP 合成過程の電子伝達系に電子を流す活性剤であり、電子伝達系からミトコンドリア内へ漏出する電子も増加する。その結果として、スーパーオキシド産生量も増加したが、活性阻害剤であるアンチマイシンよりも漏出する電子が少ないので、コハク酸を滴下した場合のスーパーオキシド産生率はアンチマイシンを滴下した場合よりも少なくなったと考えられる。

従って、ミトコンドリアの不活性化時と活性化時におけるスーパーオキシド産生を区別して測定することができたと考えられる。

(2)機械刺激による ROS 応答

MitoSOX による蛍光信号を収集しながら、BOF によってミトコンドリアに機械刺激を印加した結果を図 5 に示す。このミトコンドリアの名称を MitoA とした。

本実験では、BOF 端面とミトコンドリアとの接触に関して 4 つの領域 ~ が確認された。ピエゾステージによって BOF を移動させると、領域 においてミトコンドリアは弾

性変形を起こした。これに伴い蛍光強度が大きく増大した。領域 Ⅰ はミトコンドリアの外膜が損傷し、ミトコンドリア内の MitoSOX 蛍光分子が漏出したため蛍光強度が減少した。領域 Ⅱ では BOF にガラス基盤が接触し、ミトコンドリアが完全に破壊された。

同様の測定を別のミトコンドリアに対して行った場合の結果を図 6 に示す。このミトコンドリアの名称を MitoB とした。MitoA の場合と同じように、BOF 端面がミトコンドリアに接触すると、MitoSOX 蛍光強度電圧が増大したことが確認されたが、MitoA の場合よりも小さいことが分かる。

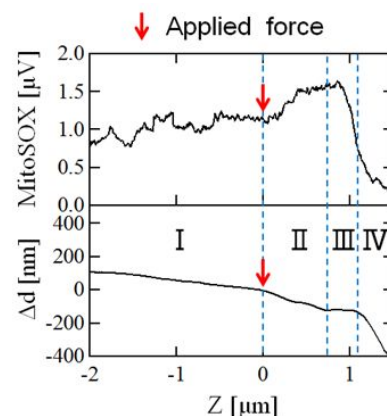


図5 MitoSOX 蛍光と BOF 変位の同時計測 (MitoA)

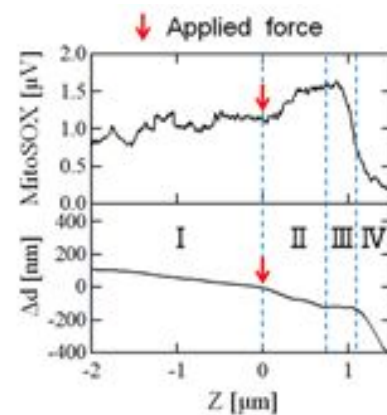


図6 MitoSOX 蛍光と BOF 変位の同時計測 (MitoB)

MitoA 及び MitoB の結果から、ミトコンドリアが破壊されるまで物理ストレスを印加したときのミトコンドリア内のスーパーオキシドの挙動を観察することができたと考えられる。その中で、ミトコンドリアに負荷された物理ストレスによるスーパーオキシド産生率に着目して考察を行う。

MitoA の場合について、領域 Ⅰ において加えた印加力に対して MitoA の変形量及び MitoSOX 蛍光強度電圧をプロットした結果

を図7に示す．これから，MitoAにおよそ40 nNの印加力を加えたことが分かる．また，40 nNの印加力をMitoAに印加したことでMitoSOX 蛍光強度電圧はおよそ1.6 μV 増大した．MitoAにおいて40 nNの物理ストレスを受けている際のスーパーオキシド産生率を算出した．40 nNの印加力を受けて弾性変形を起こしている領域での時間はおよそ15.4秒であり，その間の蛍光強度電圧変化を ΔI_{FA} とすると， $\Delta I_{FA} : 112.6 \text{ nV/s}$ であった．

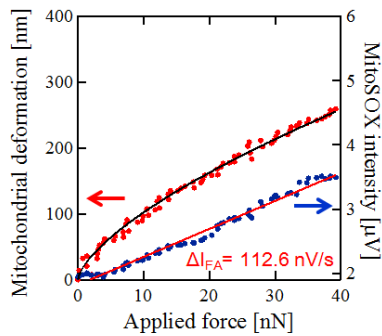


図7 MitoAへの応力に対する蛍光強度変化

同様にMitoBの場合について，領域において加えた印加力に対してMitoBの変形量及びMitoSOX 蛍光強度電圧をプロットした結果，MitoAにおよそ10 nNの印加力を加えたことが分かる．また，10 nNの印加力をMitoBに印加したことでMitoSOX 蛍光強度電圧はおよそ0.63 μV 増大した．10 nNの印加力を受けて弾性変形を起こしている領域での時間はおよそ11.5秒であり，その間での蛍光強度電圧変化を ΔI_{FB} とすると， $\Delta I_{FB} : 31.6 \text{ nV/s}$ であった．

以上の結果から，外部から物理ストレスを受けることによって，ミトコンドリア内におけるスーパーオキシド産生量は，阻害剤で処置をした場合と同様に増加することが分かった．さらに，ミトコンドリア内のスーパーオキシドの産生量は，ミトコンドリアに印加される物理ストレスの大きさに比例して増加することが初めて明らかになった．

(3)結論

本研究では，ミトコンドリアに物理ストレスが負荷された際のミトコンドリア内で産生されるスーパーオキシドの挙動を観察することを目的とした．これに関して実験及び考察を行い，以下のような結果を得た．

1) ミトコンドリアのスーパーオキシド産生

率は，活性剤及び活性阻害剤滴下の場合で90%程度の差異があることが示された．これから，ミトコンドリアの活性状態によるスーパーオキシド産生の差異を区別して測定することができた．

2) ミトコンドリアに40 nNの印加力を与えると蛍光強度電圧が60%増大した．一方で，10 nNの印加力を与えた場合では，蛍光強度電圧は38%増大した．これから，ミトコンドリアのスーパーオキシド産生量は，物理ストレスの大きさに依存することが明らかになった．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Y. Li, S. Honda, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “Analysis of mitochondrial mechanical dynamics using a confocal fluorescence microscope with a bent optical fibre”, *J. Microsc.*, 査読有, 206, 140-151, (2015).

DOI: 10.1111/jmi.12277

K. Haseda, K. Kanematsu, K. Noguchi, H. Saito, N. Umeda, Y. Ohta, “Significant correlation between refractive index and activity of mitochondria: single mitochondrion study”, *Biomed. Opt. Express*, 査読有, 6, 859-869, (2015).

DOI:10.1364/BOE.6.000859

D. Morikawa, K. Kanematsu, T. Shibata, K. Haseda, N. Umeda, Y. Ohta, “Detection of swelling of single isolated mitochondrion with optical microscopy”, *Biomed. Opt. Express*, 査読有, 5, 848-857, (2014)

DOI:10.1364/BOE.5.000848

〔学会発表〕(計10件)

本田諭志, 李永波, 上田雅, 長崎秀昭, 岩見健太郎, 太田善造, 梅田倫弘, 物理ストレスを受けたミトコンドリアの力印加共焦点光学顕微鏡による活性酸素応答測定, 第63回応用物理学会春季学術講演会, 2016/3/19~3/21 東京工業大学(東京都目黒区)

川島実紗, 松倉由幸, 長崎秀昭, 岩見健太郎, 梅田倫弘, 笹野哲郎, 黒川洵子, 多刺激ナノ触診アナライザーの開発~ピペット先

端局所加熱と温度計測～，日本光学会ナノオプティクス研究グループ第22回研究討論会，2016/3/1～3/2，東京農工大学工学部（東京都小金井市）

Y. Li, S. Honda, H. Nagasaki, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, Optical measurement of mitochondrial responses under nano-newton force, The 10th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics, 2015/7/9, 函館市国際水産・海洋総合研究センター（北海道函館市）

本田諭志, 李永波, 長崎秀昭, 岩見健太郎, 太田善浩, 梅田倫弘, 力印加共焦点光学顕微鏡によるミトコンドリア生理活性の力学応答測定, 第75回応用物理学会秋季学術講演会, 2014/9/13～9/16, 北海道大学（北海道札幌市）

Yongbo Li, Satoshi Honda, Kentaro Iwami, Yoshihiro Ohta and Umeda Norihiro, Studying mitochondrial mechanical dynamics using confocal laser scanning microscope with a bent optical fiber, The 9th International Symposium Precision Engineering Measurements and Instrumentation, 2014/8/8～8/11, Changsha(China)

李永波, 本田諭志, 岩見健太郎, 太田善浩, 吉松大輝, 梅田倫弘, ベント光ファイバを備えた共焦点レーザー顕微鏡によるミトコンドリアの力学特性と生理変化の同時計測, 第39回光学シンポジウム, 2014/6/26～6/27, 東京大学生産技術研究所（東京都目黒区）

李永波, 本田諭志, 田口敦清, 岩見健太郎, 太田善浩, 吉松大輝, 梅田倫弘, ベント光ファイバを備えたレーザー共焦点顕微鏡によるミトコンドリアの力学特性と生理変化の同時計測, 日本機械学会関東支部第20期総会・講演会, 2014/3/15, 東京農工大学工学部（東京都小金井市）

本田諭志, 李永波, 田口敦清, 岩見健太郎, 太田善浩, 吉松大輝, 梅田倫弘, 力印加・近接場光学顕微鏡を用いたミトコンドリアの機械特性と生理活性の同時計測, 2013年日本光学会年次学術講演会, 2013/11/13, 奈良県新公会堂（奈良県奈良市）

Y. Kanazashi, Y. Nomura, D. Yoshimatsu, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, Evaluation of mitochondrial activity by membrane

potential observation and pH measurement, The 9th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics, 2013/7/5～7/5, Singapore (Singapore)

Y. Li, S. Chai, Y. Kanazashi, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, Force scanning near-field microscope for studying mitochondrial mechanical dynamics, The 9th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics, 2013/7/5～7/5, Singapore (Singapore)

〔その他〕

ホームページ

<http://web.tuat.ac.jp/~umeda/lab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 倫弘 (UMEDA, Norihiro)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：60111803

(2) 研究分担者

太田 善浩 (OHTA, Yoshihiro)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：10223843

岩見 健太郎 (IWAMI, Kentaro)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80514710