

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620133

研究課題名(和文)破骨細胞活性化を可視化するマウス個体イメージングプローブ

研究課題名(英文) In vivo imaging probes for visualization of activated osteoclasts

研究代表者

菊地 和也(Kikuchi, Kazuya)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70292951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は骨表面に吸着し骨吸収を行う細胞であり、骨粗鬆症、関節リウマチなどの骨疾患に関係している。このため、その骨吸収メカニズムを明らかにすることは、疾患治療の観点から極めて重要である。本研究では、活性化した骨組織に特異的に送達され、破骨細胞が作る低pH環境下で蛍光強度が上昇し、レーザー強度に耐える安定性の高い蛍光プローブ、pHocas-3を開発した。マウス体内にこのプローブを投与し二光子蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、骨表面の破骨細胞基底膜下からの蛍光を長時間にわたって確認できた。本成果は活性化した破骨細胞の動態を調べる重要なツールになるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are resorptive cells of bone and their activity is involved in the development of osteoporosis and rheumatoid arthritis. Elucidation of the mechanism of the bone resorption is highly important for the therapeutic applications. In this study, we developed a novel fluorescent probe "pHocas-3" that has low-pH sensitivity, high photostability, and in vivo bone delivery efficiency. By administrating of this fluorescent probe in living mice, we achieved intravital fluorescence imaging of activated osteoclasts during a long time period using a two photon fluorescence microscopy. These results demonstrated that intravital fluorescence imaging using pHocas-3 will be a useful tool for investigating of the dynamics of activated osteoclasts in vivo.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：pH感受性プローブ 破骨細胞 二光子蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

我々の骨組織では、破骨細胞と骨芽細胞による骨破壊と骨形成が繰り返し行われている。この骨再構築メカニズムは損傷や老朽化した組織を除去し、新たな組織を形成するための重要な役割を果たしている。しかし、破骨細胞による骨吸収は、骨の恒常性を維持する上で必須であると同時に、様々な骨疾患、例えば骨粗鬆症や関節リウマチなどの原因となることが指摘されている。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的情報と破骨細胞活性とを結び付けることはできない。そこで申請者らは、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。

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、特に蛍光蛋白質(FP)を用いた実験系は汎用的に応用されている。しかし、今回の標的である破骨細胞の活性は、FPの応用では可視化できない現象である。一方で合成分子である化学プローブは化学の知見を基に、目的に応じた機能を付与することが可能である。われわれは活性化した破骨細胞が生体内で造り出す低 pH 環境(約 4.5)に着目し、低 pH 環境下で蛍光の OFF/ON 応答を示すプローブを開発することで、破骨細胞が活性化時のみ蛍光による可視化ができると考えた(Figure 1)。また、破骨細胞の機能は培養細胞では再現できないため、今回のイメージング対象としてはマウス個体を直接用いる必要がある。しかし、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。

従って上記の条件を満たす(蛍光団、pH 依存性な蛍光スイッチ機能、骨組織へのプローブ送達機能の3つを兼ね備えた)化学プローブを開発し、骨吸収している破骨細胞を *in vivo* 観察で初めて調べることが出来ると考えた。我々は蛍光団において BODIPY 色素を採用し、またアニリン誘導体を導入することで、pH 依存性な蛍光スイッチ機能を付与することとした。中性条件下では電子供与体であるアニリン誘導体が脱プロトン化されており、アニリン誘導体から BODIPY 色素への光誘起電子移動(PeT)によって蛍光が消光する。一方、酸性条件では、アニリン誘導体のプロトン化によって電子移動が抑制され蛍光が回復する。3つ目のプローブの骨組織への送達においては、骨を構成する成分であるヒドロキシアパタイトに対して特異的なキレート効果を示すビスフォスフォネート基に着目した。これらの官能基を導入した蛍光プローブをデザインし、マウス体内の骨表面で破骨細胞により酸性化した領域を可視化できることを示した。(J. Am. Chem.

Soc., 2011, 133, 17772)。しかしながら、生体イメージングの際に、励起光照射下において蛍光色素が顕著に退色することが観察されていた。

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、マウス個体の *in vivo* イメージングを行う。具体的には、骨組織にデリバリーされ、骨の溶解時に形成される低 pH 環境を可視化する蛍光プローブを開発し、生きた動物の蛍光イメージングを行う。レーザー照射に耐えうる2光子及び近赤外蛍光色素を導入することで、これまで不可能であった破骨細胞の機能・動態を生きた状態で示し、骨粗鬆症等の骨由来疾患の機構を明らかにする。

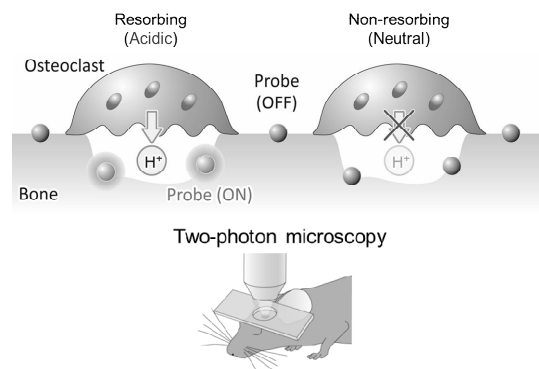


Figure 1. 活性化した破骨細胞の *in vivo* イメージング戦略

3. 研究の方法

(1) BODIPY 色素の退色機構の評価と安定性を向上させた新規プローブの開発
生体イメージング中での BODIPY 色素の退色について調べるため、酸性環境下、及び励起光レーザー照射時に生じる活性酸素種の BODIPY 色素の蛍光に対する影響を蛍光光度計(F-4500, Hitachi)によって測定した。励起光照射下での安定性においては Xe ランプ光源(MAX-302, 朝日分光)を用いて、顕微鏡観察における励起光レーザーの強度を指標として 5 mW/cm² の光を照射した。安定性を向上させた新規蛍光プローブの開発には、Gaussian03 を用いた量子化学計算によって候補化合物の絞り込みを行い、新規蛍光プローブ、"pHocas-3" を設計した。pHocas-3 は BODIPY 色素を構築後、ビスフォスフォネート基を縮合させることで合成した。合成したプローブの蛍光特性、pH 感受性は蛍光光度計によって評価した。

(2) 破骨細胞の *in vivo* イメージング

新たな開発したプローブを用い、*in vivo* における破骨細胞動態のイメージングへと応用した。破骨細胞を tdTomato で選択的に蛍光ラベルしたマウスを用い、プローブを尾静脈

から注入した。マウスに麻酔をかけ、頭頂骨部位を露出し、二光子レーザー蛍光顕微鏡 (LSM780, Carl Zeiss) で 940 nm の励起波長を用いて観察した。

(3) 赤色蛍光を発する pH 感受性プローブの開発

BODIPY 色素に π 共役系を拡張できる芳香環を導入し、pHocas-3 の設計と同様に量子化学計算を基にアニリン部位の最適化を行うことで、赤色蛍光を発する pH 感受性 BODIPY プローブを設計・合成した。合成したプローブの蛍光特性、pH 感受性、安定性は蛍光光度計によって評価した。骨組織への吸着能を評価するため、骨の主成分であるヒドロキシアパタイト (HA) と混合、洗浄後に共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Fv-10, Olympus) を用いてプローブ由来の蛍光の観察を行った。

4. 研究成果

(1) BODIPY 色素の退色機構に基づいた新規プローブ “pHocas-3” の開発

これまでの研究で生体イメージングの際に、蛍光色素が顕著な退色を示したため、顕微鏡観察中のプローブの安定性を向上させる必要があった。そこでプローブの蛍光が消失する原因として 低 pH 環境、励起光照射時、及び破骨細胞から生じる活性酸素種による BODIPY 色素の分解の 2 点について考察した。まずは中性及び酸性環境下における BODIPY 色素の安定性を比較したところ、pH の影響に関わらず分解が起きていることを確認した。一方で活性酸素種の発生が抑制される無酸素条件ではプローブの安定性の向上が見られた。これらの結果より、BODIPY 色素退色は活性酸素種が関わっていることが明らかとなった。活性酸素種の中でも特に一重項酸素はアルケンと同程度の求電子性を有し、電子豊富な BODIPY 色素と [2+2] 環状付加反応を引き起こすことが知られており、同様の経路で BODIPY 色素との反応が起きているものと考えられた。

これらの知見より、BODIPY 色素の電子密度を下げることで一重項酸素との反応が抑制されるものと期待し、BODIPY 色素に新たに電子求引基であるアミド基を導入することを考えた。この場合、電子求引基の導入による BODIPY 色素の電子状態変化に伴い、PeT 機構による pH 感受性を付与できるアニリン構造の最適化も必須である。すなわち、Rehm-weller 式から求められる電子移動の自由エネルギー変化量が以前のプローブと同等であること、プローブの pKa が 6.0 前後であることが要求される。そこで、量子化学計算によって各種アニリン誘導體構造と BODIPY 色素のエネルギー準位を算出し、条件を満たすようなアニリン構造の選択を行った。その結果、アニリン構造に *N*-ethyl-methyl-*o*-toluidine を導入すること

が最適であることを見出し、新規蛍光プローブ “pHocas-3” を設計した。

設計したプローブの合成を行い、各 pH 条件下での蛍光スペクトルを測定したところ、pH の低下と共に pHocas-3 の蛍光量子収率が増大し、その pKa は 6.2 であった (Figure 2a)。この値は、破骨細胞が作る酸性領域 (pH 4.7-6.8) に対して適切な値であると考えられる。また、pHocas-3 の蛍光量子収率は従来のプローブと比較して約 2 倍であり、酸性領域をより鮮明に可視化できることが期待された。次に光照射下における pHocas-3 の光安定性について評価した。5 mW/cm² の光をプローブ溶液に対して 30 分間連続的に照射したところ、pHocas-3 の蛍光強度は、ほとんど減少しておらず、従来のプローブより大きく光安定性が向上していた (Figure 2b)。また、一重項酸素発生剤を用いて、500 μ M の一重項酸素とプローブを反応させた後に蛍光強度を測定した。その結果、pHocas-3 は蛍光強度の減少が抑制されており、電子密度を低下させたことによって、pHocas-3 は一重項酸素との反応性が抑制されることが示された。

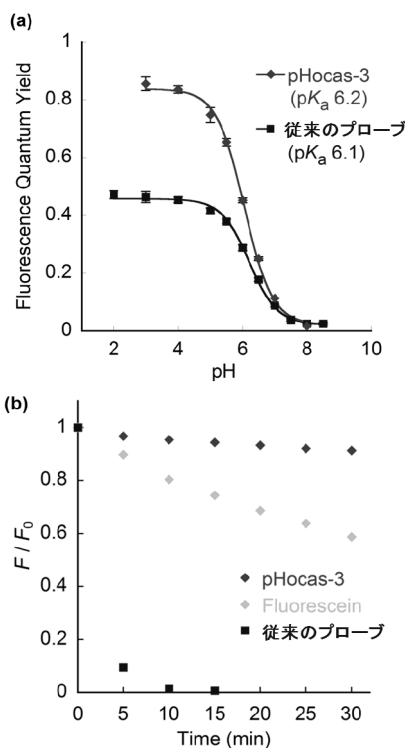


Figure 2. (a) pHocas-3 の蛍光量子収率の pH 依存性 (b) pHocas-3 の光照射時の安定性の評価

(2) pHocas-3 を用いた破骨細胞の in vivo イメージング

pHocas-3 を使って、マウス体内における破骨細胞活性の二光子励起顕微鏡による可視化を行った。投与するプローブはビスフォスフォネート基の効果によって、骨表面上に選択的に結合しているため、破骨細胞が活性化

している場所では、骨表面上にプローブ由来の緑色蛍光が確認できると期待される。破骨細胞を蛍光タンパク質でラベルしたマウスに pHocas-3 を投与したところ、破骨細胞基底膜下からプローブ由来の緑色の蛍光が観察された。一方で pH 感受性のない pHocas-3 誘導体を投与すると、骨組織全体に蛍光がわたっていた。従って pHocas-3 は活性化した破骨細胞が作る酸性領域のみを選択的に可視化できることが明らかとなった。また、8 時間に渡って連続的に破骨細胞活性イメージングを行ったところ、顕微鏡観察中に光退色に伴う蛍光強度の減少は確認されず、二光子励起顕微鏡の強いレーザー照射下においても、pHocas-3 はその蛍光強度を維持できることが明らかとなった。このように、電子求引基を導入した pHocas-3 を用いることで、長時間に渡る生体内の破骨細胞活性の追跡に初めて成功した。

(3) 赤色蛍光を発する pH 感受性プローブの開発

われわれは前述のように、pH に応答して緑色蛍光を発するプローブ、pHocas-3 を開発し、破骨細胞の活性を *in vivo* で検出することに成功した。一方で、プローブの蛍光波長領域が、GFP と同じ領域にあることから、GFP 発現細胞との併用ができないことは応用面での制限となっていた。また、厚みのある組織から蛍光検出するには、緑色蛍光よりも赤色蛍光を放つプローブの方が適している。そこで pH 変化に伴い、現在よりも長波長の赤色蛍光を放つプローブの開発も行った。

BODIPY 色素の α 位に π 共役系を拡張できる芳香環を導入し、pHocas-3 の設計と同様にアニリン部位の最適化を行うことで、赤色蛍光を発する pH 感受性 BODIPY プローブを設計・合成した。溶液中における蛍光特性について検討したところ、合成したプローブは 600 nm 周辺の赤色波長領域で蛍光を示した。加えて pH 滴定を行ったところ、pH の低下に伴い蛍光強度が上昇し、 pK_a は 5.8 と算出された。これは破骨細胞が作る酸性領域を可視化できる適切な機能である。励起光照射による蛍光への影響を調べたところ、pHocas-3 と同様に蛍光強度の減少がほとんど確認されなかったことから、プローブの光安定性が高いことが示された。また、骨組織への吸着能を評価するためプローブと HA を混合し洗浄後に蛍光顕微鏡で観察したところ、HA から赤色蛍光が観測されたことから、プローブは HA 吸着能を有していることが示された。以上の結果から、開発したプローブは、GFP よりも長波長の蛍光を発し、pH 低下に伴い蛍光強度が上昇し、骨組織の成分に吸着能を有していることが明らかとなった。今後はこのプローブをマウスに投与し、*in vivo* での破骨細胞活性の観察に取り組む予定である。

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 16 件)

T. Kowada, H. Maeda, & K. Kikuchi, "BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells", *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, in press. (査読有) DOI: 10.1039/C5CS00030K.

R. Baba, Y. Hori, & K. Kikuchi, "Intramolecular Long-Distance Nucleophilic Reactions as a Rapid Fluorogenic Switch Applicable to the Detection of Enzymatic Activity". *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 4695-4702. (査読有) DOI: 10.1002/chem.201406093.

M. Minoshima, T. Matsumoto, & K. Kikuchi, "Development of a Fluorogenic Probe Based on a DNA Staining Dye for Continuous Monitoring of the Histone Deacetylase Reaction" *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 7925-7930. (査読有) DOI: 10.1021/ac501881s.

H. Matsushita, S. Mizukami, F. Sugihara, Y. Nakanishi, Y. Yoshioka, & K. Kikuchi, "Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ^{19}F Magnetic Resonance Imaging". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 1008-1011. (査読有) DOI: 10.1002/anie.201308500.

E. Lindberg, S. Mizukami, K. Ibata, T. Fukano, A. Miyawaki, & K. Kikuchi, "Development of Cell-impermeable Coelenterazine Derivatives". *Chem. Sci.*, **2013**, 4395-4400. (査読有) DOI: 10.1039/C3SC51985F.

[学会発表](計 62 件)

Kazuya Kikuchi, "Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches", ICMAT 2013, 2013 年 6 月 30 日 ~ 7 月 5 日, Suntec, Singapore.

Kazuya Kikuchi, "Design, Synthesis and Biological Application of Molecular Imaging Probes with Tunable Chemical Switches", AIMECS 2013, 2013 年 10 月 15 日 ~ 18 日, Taipei, Taiwan.

Kazuya Kikuchi, "Intracellular Protein Labeling by Functional Probes with Tunable Chemical Switches", Labeling and Nanoscopy, 2014 年 9 月 24 日 ~ 26 日, Heidelberg, Germany.

〔その他〕

ホームページ:

<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

研究者番号：70292951