

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22947

研究課題名(和文)りん光性分子と発光寿命顕微鏡を用いた生体組織内の酸素濃度マッピング法の開発

研究課題名(英文) In vivo oxygen mapping based on lifetime imaging microscopy using phosphorescent molecule

研究代表者

吉原 利忠 (Yoshihara, Toshitada)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：10375561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞や組織内の酸素分圧をイメージングするための赤色りん光イリジウム錯体と、マウスなどの小動物組織の酸素分圧をイメージングできるりん光寿命イメージング顕微鏡の開発を行った。これらを用いて、麻酔下にあるマウスの肝臓をイメージングしたところ、肝小葉のイメージングに成功し、肝小葉内に酸素分圧勾配があることを定量的に示した。さらに、同一視野における肝臓のりん光寿命イメージングから、酸素依存的な代謝過程をリアルタイム追跡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

酸素は、我々が生命活動を維持するために必要不可欠な分子です。本研究では、麻酔下にあるマウスの臓器内の酸素分圧を計測・イメージングする方法論の開発に取り組みました。得られた研究成果から、世界で初めて、光学的方法を用いて肝臓内の酸素分圧分布をイメージングすることに成功しました。この知見は、がん腫瘍など、細胞が異常増殖し血流が不十分な組織内の酸素分圧を明らかにすることに繋がり、がんの発見、診断、治療法の開発に貢献することができます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we designed and synthesized intracellular oxygen probes based on red phosphorescent iridium complexes for sensing of oxygen levels in living cells and tissues, and a confocal phosphorescence lifetime imaging microscope (PLIM) for the measurements of oxygen partial pressure of mice was developed. Using these oxygen probes and PLIM, the detection and visualization of oxygen levels of hepatic lobules were succeeded. The PLIM images clearly visualized the oxygen gradient in hepatic lobules with cellular level resolution. Furthermore, we succeeded in real-time tracking of oxygen-dependent metabolic processes based on phosphorescence lifetime imaging of the liver in the same field of view.

研究分野：光化学

キーワード：りん光 りん光寿命 酸素 イリジウム錯体 細胞 組織

1. 研究開始当初の背景

酸素は好気性生物の代謝過程において必要不可欠な分子であり、細胞は生命活動維持のために酸素を消費している。平面培養細胞では、酸素は各細胞に常に一定の割合で供給されるのに対して、組織では毛細血管を通して供給される。このため、組織を構成する各細胞の酸素濃度(分圧)は、毛細血管から遠い細胞ほど低下し(図1)、また、同じ毛細血管においても動脈から遠くなるほど酸素濃度は低下する。この考え方は、医学分野において指摘されていることではあるが、生きた肝臓や腎臓の酸素濃度分布を単一細胞レベルでリアルタイムにイメージングした報告はない。また、がんのように細胞が異常に増殖する疾患では、血管の生育が十分に追いつかないため、病態部位が低酸素状態になることが指摘されている。この低酸素環境は、放射線治療に対して耐性を示すため、外科的な治療や副作用が懸念される抗がん剤治療を選択せざるを得ないことがある。さらに、低酸素状態が関与する病態は、脳梗塞、心筋梗塞に加えて、肝臓病、腎臓病など非常に多くの病態で共通に見られる。

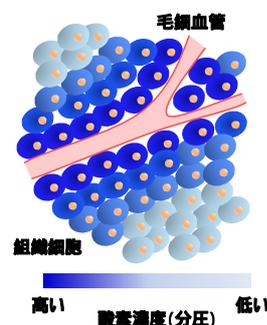


図1 組織内酸素濃度勾配の概念図

血中の酸素飽和度を計測する方法としては、パルスオキシメーターを用いる方法がある。これは酸素吸着ヘモグロビンと酸素脱着ヘモグロビンの深赤色波長域の光吸収効率の差を利用している。簡便な方法ではあるが、個体全体の血中酸素レベルの平均値のみの情報であり、組織内の酸素濃度はわからない。組織の動きを担っているのは組織細胞であり、細胞内の酸素濃度を明らかにすることが、正常組織の機能の理解だけでなく、様々な低酸素病態の発見、診断、治療において極めて重要である。

本研究では、血中から組織細胞に移行するりん光プローブ分子を、イリジウム錯体(Ir 錯体)を用いて開発し、共焦点りん光寿命イメージング顕微鏡(PLIM)を用いて、組織細胞の酸素濃度を単一細胞レベルでリアルタイムイメージングし、正常および病態組織内の酸素濃度分布の不均一性を描出する方法論の確立に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)生きた小動物組織内の酸素濃度(分圧)分布をイメージングするために、酸素濃度に依存して発光が顕著に変化する‘りん光’を利用した酸素検知試薬(りん光プローブ)を、イリジウム錯体(Ir 錯体)を用いて開発すること、(2)開発したIr 錯体と共焦点りん光寿命イメージング顕微鏡(PLIM)を用いて、組織内(肝臓、腎臓、腫瘍など)の酸素濃度(分圧)を単一細胞レベルの分解能でリアルタイムイメージングすることである。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、細胞内に取り込まれやすいIr 錯体の設計・合成を行った。開発したIr 錯体の光化学・光物理特性(吸収・発光スペクトル、発光量子収率、発光寿命)を溶液中で測定を行った。溶液中の溶存酸素濃度は、マスフローコントローラで制御した。

(2) 麻酔下にあるマウスの臓器(肝臓、腎臓、腫瘍など)内に分布しているIr 錯体のりん光寿命イメージング画像を取得できる顕微鏡(PLIM)を開発した。

(3) 赤色りん光Ir 錯体(BTPDM1)をマウスに投与して、肝臓のりん光寿命イメージング画像を取得し、肝臓の酸素分圧を算出した。

4. 研究成果

(1) 図1に合成したIr 錯体(Ir-1、Ir-2)の構造式を示す。アセトニトリル中においてIr-1およびIr-2の吸収・りん光スペクトルを測定したところ、吸収極大波長は、それぞれ503 nm、478 nmであり、りん光極大波長、それぞれ646 nm、632 nmであった。特にIr-1では、研究代表者が報告した赤色りん光Ir 錯体BTPDM1よりも、吸収・りん光極大波長が長波長シフトしており、in vivo イメージングに対してより適したIr 錯体である。また、脱酸素下におけるりん光量子収率、りん光寿命は、Ir-1では、0.28、5.2 μs、Ir-2では、0.32、7.7 μsであり、BTPDM1とほぼ同様な値であり、酸素プローブとして適していることが明らかとなった。

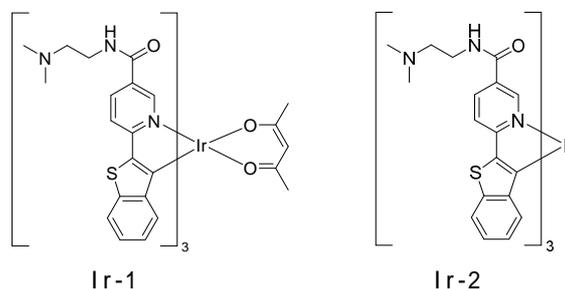


図1 Ir-1とIr-2の構造式

(2) 培養細胞や組織切片内に分布する酸素プローブ分子のりん光寿命の計測に加えて、小動物の臓器を寿命イメージングできる顕微鏡の開発を行った。新規に倒立顕微鏡を導入し、顕微鏡ステージにマウスを置くことのできる大型スライドガラスまたはカバーガラスを設置した。また、マウス直腸の温度を測定し、それをフィードバックさせることで、マウス体温を一定に保つシステムを取り付けた。さらに、励起光源として波長可変レーザーを用いることで、任意の波長の光(420-650nm)をプローブ分子に照射することができる。この顕微鏡は、りん光寿命イメージングに加えて、蛍光寿命イメージングも可能であるため、自家蛍光や蛍光プローブ分子を用いたイメージング画像を取得することにより、酸素以外のパラメータを同時に観測することもできる。

(3) 開発した培養細胞、組織切片、生きた小動物臓器を観察できるりん光寿命イメージング顕微鏡と、赤色りん光 Ir 錯体 (BTPDM1) を用いて、マウス肝臓の酸素分圧の定量的イメージングを実施した。麻酔下にあるマウスの尾静脈より、イリジウム錯体を 100~200 nmol 投与して 30 分後に腹部を開腹して、肝臓に分布する BTPDM1 のりん光寿命イメージング画像を取得した(図 2)。得られたりん光寿命を酸素分圧に変換するために、肝実質細胞を平面培養に必要なパラメータを取得した。これらを用いて、肝臓の酸素分圧を算出したところ、門脈辺縁領域では約 40 mmHg、中心静脈付近では約 25 mmHg、それらの中間領域では約 32 mmHg であった。これは針電極を用いて得られた値とほぼ一致しており、世界で初めて、光学的手法で肝臓の酸素分圧を定量的にイメージングすることに成功した。また、針電極では、各場所を '点' でしか計測できないのに対して、本手法では、'面' で計測できるため一度に多くの空間的情報を取得できる。さらに、同一個体を用いて、同じ場所の酸素分圧を数時間にわたって追跡できるため、個体の代謝過程を、単一細胞レベルで観測することもできる。これを確認するために、マウスに塩化アンモニウムを投与して肝臓の代謝に伴う酸素分圧変化を追跡した。塩化アンモニウム投与 10 分後において、一部の門脈および中心静脈付近のりん光寿命が投与前よりも長い値を示した。その後、数十分かけて投与前とほぼ同じ寿命に戻った。これは、肝臓の一部の領域において酸素分圧が、一時的に低下したことを示している。塩化アンモニウムは、門脈付近の細胞において尿素合成、中心静脈付近の細胞ではグルタミン合成によって代謝されることが知られている。これらの代謝では、酸素を必要とするため肝臓の一部の領域が、酸素を消費したため一時的に低酸素領域が見られたと考えられる。

以上の結果より、赤色りん光性 Ir 錯体を酸素プローブとし、顕微鏡下でりん光寿命イメージング画像を取得することにより、肝臓内の酸素分圧分布のイメージングや、代謝による酸素分圧変化を追跡できることが明らかとなった。本研究手法は、他の臓器や腫瘍においても適用できるため、今後、様々な臓器の酸素分圧や、がんなどの低酸素病態の酸素分圧をイメージングする予定である。

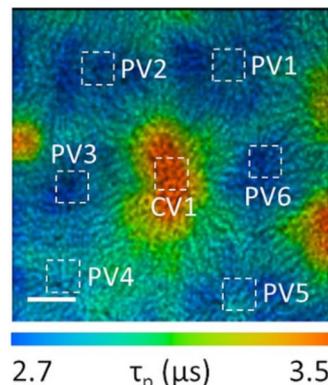


図2 BTPDM1を投与したマウス肝臓のりん光寿命イメージング画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasukagawa Mami, Shimada Aya, Shiozaki Shuichi, Tobita Seiji, Yoshihara Toshitada	4. 巻 11
2. 論文標題 Phosphorescent Ir(III) complexes conjugated with oligoarginine peptides serve as optical probes for in vivo microvascular imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84115-x	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 Tsuchida Naoyuki, Takagi Toshiyuki, Takahashi Hiroshi, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Sonoyama Masashi	4. 巻 1863
2. 論文標題 Membrane properties of amacrocyclic tetraether bisphosphatidylcholine lipid: Effect of a single membrane-spanning polymethylene cross-linkage between two head groups of ditetradecylphosphatidylcholine membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamen.2021.183569	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 Mizukami Kiichi, Katano Ayaka, Shiozaki Shuichi, Yoshihara Toshitada, Goda Nobuhito, Tobita Seiji	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo O2 imaging in hepatic tissues by phosphorescence lifetime imaging microscopy using Ir(III) complexes as intracellular probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76878-6	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 Takakura Hideo, Goto Yuto, Kitamura Akira, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Kinjo Masataka, Ogawa Mikako	4. 巻 408
2. 論文標題 Analysis of the triplet-state kinetics of a photosensitizer for photoimmunotherapy by fluorescence correlation spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 113094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotochem.2020.113094	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 Honda Tomoko, Hirakawa Yosuke, Mizukami Kiichi, Yoshihara Toshitada, Tanaka Tetsuhiro, Tobita Seiji, Nangaku Masaomi	4. 巻 9
2. 論文標題 A distinctive distribution of hypoxia inducible factor 1 in cultured renal tubular cells with hypoperfusion simulated by coverslip placement	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14689	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 Tachibana Ryo, Kamiya Mako, Morozumi Akihiko, Miyazaki Yoshiyuki, Fujioka Hiroyoshi, Nanjo Aika, Kojima Ryosuke, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Hanaoka Kenjiro, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Urano Yasuteru	4. 巻 56
2. 論文標題 Design of spontaneously blinking fluorophores for live-cell super-resolution imaging based on quantum-chemical calculations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13173 ~ 13176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC05126H	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 Morozumi Akihiko, Kamiya Mako, Uno Shin-nosuke, Umezawa Keitaro, Kojima Ryosuke, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Urano Yasuteru	4. 巻 142
2. 論文標題 Spontaneously Blinking Fluorophores Based on Nucleophilic Addition/Dissociation of Intracellular Glutathione for Live-Cell Super-resolution Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 9625 ~ 9633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c00451	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 Yoshihara Toshitada, Maruyama Ryo, Shiozaki Shuichi, Yamamoto Koji, Kato Shin-ichiro, Nakamura Yosuke, Tobita Seiji	4. 巻 92
2. 論文標題 Visualization of Lipid Droplets in Living Cells and Fatty Livers of Mice Based on the Fluorescence of -Extended Coumarin Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4996 ~ 5003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b05184	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉原 利忠・広瀬 達也・塩崎 秀一・飛田 成史
2. 発表標題 クマリン類を配位子に有するイリジウム錯体を用いた生体内酸素レベル計測
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshitada YOSHIHARA
2. 発表標題 Visualization of hypoxia cells in tissues by using phosphorescence lifetime imaging microscopy
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉原 利忠・丸山 凌・塩崎 秀一・飛田 成史
2. 発表標題 蛍光寿命イメージング顕微分光法を用いた細胞および組織内脂質滴のライブイメージング
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水上輝市, 片野彩花, 塩崎秀一, 吉原利忠, 飛田成史
2. 発表標題 イリジウム錯体を用いた生体組織 内微小環境の酸素イメージング
3. 学会等名 第17回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Purevsuren Khulan, 塩崎秀一, 吉原利忠, 飛田成史
2. 発表標題 Ir(III)錯体および共焦点りん光寿命イメージング法を用いた脂肪肝の酸素イメージング
3. 学会等名 第17回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 吉原利忠 (分担執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 86
3. 書名 BIO INDUSTRY2021年3月号	

1. 著者名 吉原利忠、飛田成史 (分担執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 1534
3. 書名 化学便覧 基礎編 改訂6版	

1. 著者名 吉原利忠、飛田成史 (分担執筆)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 147
3. 書名 実験医学2020年6月号	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 血管内皮イメージング試薬	発明者 吉原利忠、安力川真美、鷺見さくら、飛田成史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-211560	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 REAGENT FOR MEASURING OXYGEN CONCENTRATION IN CELL AND TISSUE	発明者 吉原利忠、広瀬達也、飛田成史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/032028	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

群馬大学理工学府分子科学部門 飛田研究室 https://tobita-lab.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/

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