

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02614

研究課題名(和文) Physioxiaを対象にした酸素に対する真の生体応答機構の解析技術の創出

研究課題名(英文) Absolute quantitative analysis of in vivo oxygen concentration

研究代表者

西川 恵三 (Nishikawa, Keizo)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：30516290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：酸素は、多彩な細胞応答機構を通じて生体の恒常性維持にかかわる生命にとって必要不可欠な生体ガスである。しかしながら、生体内で個々の細胞が晒されている酸素濃度の情報は曖昧な現状にある。そこで、本研究では多光子励起顕微鏡を用いた最新の生体イメージング技術を発展・改良することで、生きた動物の組織内の個々の細胞が晒されている酸素濃度を1細胞レベルで解析した。本研究では、りん光寿命イメージング法を用いて、骨髄内の破骨細胞を蛍光標識したマウスを生かした状態で観察することで、りん光寿命の計測を行なった。その結果、破骨細胞の生理的な酸素濃度の範囲は2～5%であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素の働きを質の観点で解き明かしてきた従来知見に対して、本研究は酸素の量の情報を明らかにした。即ち、生体内で個々の細胞がどの程度の酸素濃度で維持され、それがどのくらい変動するかの定量的知見を明らかにした。本研究成果は、細胞生物学などの基礎研究だけでなく、がんや虚血性疾患などの低酸素状態が関係する様々な病気の基礎病態を定量的に理解するための重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Oxygen is essential for maintaining homeostasis of living organisms through various cell response mechanisms. However, the oxygen concentration to which individual cells are exposed in the living body is ambiguous. Here, by developing and improving the latest bioimaging technology using a multiphoton excitation microscope, we analyzed the oxygen concentration of individual cells in the tissues of living animals at the single cell level. We measured phosphorescence lifetime of osteoclasts in the bone marrow using the phosphorescence lifetime imaging method. As a result, we succeeded in determining the range of physiological oxygen concentration of osteoclasts is 2 to 5%.

研究分野：生化学、薬理学、骨代謝学

キーワード：破骨細胞 酸素 寿命イメージング 二光子励起顕微鏡 りん光 時間相関単一光子計数 イリジウム錯体 エネルギー代謝

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織内で細胞を取り巻く様々な環境因子は、特定の形質を細胞に誘導し、細胞がそれぞれの持ち場で独自の機能を発揮する上で重要な働きをする。なかでも、酸素は、ほぼすべての細胞にとって必要不可欠な分子であり、次に述べる種々の細胞内機序を通じて細胞の運命や機能の制御にかかわる。例えば、ミトコンドリアの呼吸鎖においては、酸素は最終的な電子受容体として作用し、エネルギー(ATP)産生にかかわる。また、酸素は、活性酸素種( $H_2O_2$ )へ変換されることで、細胞内の情報伝達を担うセカンドメッセンジャーとしても作用する。近年では、酸素供給の増減によって酸化還元酵素や水酸化酵素による酵素反応が影響を受ける知見が続々と見いだされており、酸素が低酸素誘導因子 HIF の発現・活性の調節に関与したり、ヒストン脱メチル化酵素や DNA 脱メチル化酵素の活性調節を介して遺伝子の発現制御にかかわることも知られている。これまで、酸素が果たす役割は、*in vitro* の実験系(様々な酸素濃度条件で培養した細胞を解析するなど)や *in vivo* 解析(低酸素関連遺伝子を欠損した動物を解析するなど)を駆使することで精力的に明らかにされており、一見、かなりのことが理解できているような錯覚に陥る。しかしながら、このような従来研究は、「酸素濃度が極端に高いあるいは低い」、「遺伝子が大過剰あるいは欠損」といった特殊な実験条件下で行われているために、酸素の働きが「質」の観点で明らかにされているだけで、「量」の知見はほとんど理解されていない現状にある。即ち、「生体内で酸素濃度がどの程度維持され、それがどのくらい変動することで細胞応答に変化を生じるのか」等の定量的知見からの酸素の役割は不明である。実際、生体内で細胞周囲の時事刻々と変化する酸素環境によってどのような生体応答が引き起こされるかは、単に細胞生物学などの基礎研究だけでなく、がんや虚血性疾患などの低酸素状態が関係する様々な病気の基礎病態を理解するためにも重要な知見であると言える。

### 2. 研究の目的

本研究では、生きた動物個体の組織内の酸素や細胞内の代謝状態を観察する多光子励起顕微鏡法を開発することで、骨髄内で種々の細胞が晒されている酸素濃度を定量解析するとともに、酸素環境に対する細胞内の代謝応答の *in vivo* 解析を実施した。

### 3. 研究の方法

生体組織内の酸素の解析法はこれまでに活発に開発が進められている。なかでも、不可逆的な蛍光プローブ(ニトロイミダゾール化合物など)を用いた免疫組織化学法は、生体組織の低酸素領域を解析する研究で汎用されているものの、定量解析や経時観察の用途には適さない。これらの欠点を克服する方法として、微小電極を用いた電気化学計測による酸素濃度測定法があるが、侵襲的方法であるために生体組織への応用には難がある。本研究では、非侵襲的に生体組織内の酸素濃度の変化をリアルタイムに観察するために、りん光を発する化学プローブ(イリジウム錯体)を使用した。当該プローブによる酸素検出の原理は、イリジウム錯体が発する近赤外部のりん光が、酸素によって消光される現象を利用したものである(参考文献 1)。このため、イリジウム錯体を取り込んだ細胞内の酸素分圧が高くなるにつれて、りん光は減弱することになる。さらに、本研究では、酸素を観察するだけでなく、酸素を定量計測するための手段として、時間相関単一光子係数法によるりん光寿命の計測を行った。従来のイメージングで汎用されている強度情報を用いた画像解析には定量性の点で問題がある。即ち、強度は、蛍光やりん光を発する分子の濃度のみではなく、光退色、寿命、励起光強度、そしてレンズやミラーといった光学系などの多くの要因によって変化する。そのために、種々の実験で取得される蛍光・りん光強度情報を用いて行われている画像解析は、定量性に乏しい。一方で、強度を補正するために、2つの異なる波長を用いて蛍光強度を補正するレシオ法が用いられることがあるが(例えば FRET 観察など)、色収差のために焦点位置が励起波長によって異なる。さらに、生体組織のような高散乱体を対象にした観察では、蛍光波長の違いによるレイリー散乱の影響もあるために、多光子顕微鏡などの Z 軸(深さ方向)の分解能をもつ顕微鏡では、レシオ法も十分な改善策とは言い難い現状にある。これに対して、本研究で主たるリードアウトとして取得する寿命情報は、分子種によってきまる化合物固有の物理化学的パラメーターである。とりわけ、本研究で使用するイリジウム錯体から発せられるりん光寿命は、イリジウム錯体を取り巻く酸素のみの影響によって変化し、濃度、光退色、励起光強度そして光学系などの実験条件の影響を一切受けない。そのために、寿命は、強度情報に比べてはるかに定量性に優れており、りん光を発するイリジウム錯体周囲の酸素環境の変化を定量的に測定できる。今回、時間相関単一光子計数法を採用し、Becker&Hickl 社の SPC-150 を搭載した二光子励起顕微鏡を用いて、寿命イメージングに取り組んだ。

イソフルラン麻酔後、イリジウム錯体 BTPDM1 を尾静脈投与したマウスの頭蓋骨を露出し、固定器具を装着した後に観察を行った。GFP 蛍光ならびにりん光は、850 nm で光励起を行った後に、 $525 \pm 25$  nm あるいは  $620 \pm 30$  nm のバンドパスフィルターを用いて画像取得を行った。顕微鏡観察の際には、パルスオキシメータを用いて呼吸数・心拍数・経皮的動脈血酸素飽和度( $SpO_2$ )を常時計測し、マウスの状態のモニタリングを行った。

マウスの骨髄細胞をサイトカイン M-CSF/RANKL で刺激を行い、成熟破骨細胞様細胞を分化誘導した。培地にイリジウム錯体 BTPDM1 を添加した後に、種々の酸素濃度条件下で培養を行い、850 nm で光励起後、 $620 \pm 30$  nm のバンドパスフィルターでりん光の画像取得を行った。

りん光や自家蛍光の時間分解光子計測によって取得されたデータは、解析ソフトウェア SPC-Image(Becker&Hickl 社)を用いて単一指数関数の減衰でフィッティングを行い、 $1/e$  の光子数になるりん光寿命の算出を行った( $\chi^2 \leq 1.34$ )。破骨細胞の初代培養で取得したりん光寿命情報を用いて、Stern-Volmer の式に従い、りん光寿命と酸素濃度の関係を示す検量線を作成した。そして、この検量線を用いて、生体内のりん光寿命を酸素濃度に換算することで、生きた骨組織内で種々の細胞が晒されている酸素濃度を絶対定量解析した。

#### 4 . 研究成果

破骨細胞特異的に緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するマウスに BTPDM1 を投与後、頭蓋骨に対して破骨細胞の生体イメージングを行った。マウスの矢状縫合近傍の頭頂骨に対して GFP の蛍光観察を行い、GFP 陽性細胞(破骨細胞)が 5 個以上局在する視野において、りん光の時間分解光子計測を実施し、りん光寿命の計算ならびに画像の取得を行った。パルスオキシメータを用いて経皮的動脈血酸素飽和度  $SpO_2$  が 95 ~ 98% の間に維持されるように正常状態における生体骨組織内の破骨細胞内のりん光寿命を計測したところ、約 3 マイクロ秒であることが明らかとなった。一方、観察に用いているマウスに対して低酸素暴露を行い、 $SpO_2$  が約 50% まで低下した場合における破骨細胞内のりん光寿命を計測したところ、約 4 マイクロ秒まで変化した。実際、破骨細胞の初代培養を用いてりん光寿命と酸素濃度との関係を示す検量線を作成し、りん光寿命を酸素濃度に換算を行ったところ、 $SpO_2$  98% の状態にあるマウスの破骨細胞の酸素濃度は約 5%、 $SpO_2$  50% の状態にあるマウスの破骨細胞の酸素濃度は約 2% となることが明らかとなった。以上、本研究では、時間相関単一光子計数法のための計測器を搭載した多光子励起顕微鏡を用いることで、生きた動物個体内の酸素濃度を 1 細胞レベルで解析することに成功した。即ち、骨組織において、破骨細胞の酸素濃度が約 5% で維持されていることが明らかとなった。さらに、観察に用いているマウスを低酸素暴露することで、破骨細胞の酸素環境に摂動を加えたところ、破骨細胞の酸素濃度は約 2% まで低下したことから、破骨細胞の生理的な酸素濃度の範囲は 2~5% であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakaguchi Y, Nishikawa K, Seno S, Matsuda H, Takayanagi H and Ishii M	4. 巻 14
2. 論文標題 Roles of enhancer RNAs in RANKL-induced osteoclast differentiation identified by genome wide cap analysis of gene expression using CRISPR/Cas9.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25748-3	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 Baba M, Endoh M, Ma W, Toyama H, Hirayama A, Nishikawa K, Takubo K, Hano H, Hasumi H, Umemoto T, Hashimoto M, Irie N, Esumi C, Kataoka M, Nakagata N, Soga T, Yao M, Kamba T, Minami T, Ishii M and Suda T	4. 巻 33
2. 論文標題 Folliculin regulates osteoclastogenesis through metabolic regulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1785-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3477	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 Suzuki Takafumi et al.,	4. 巻 3
2. 論文標題 Nrf2 contributes to the weight gain of mice during space travel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01227-2	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 Nishikawa Keizo, Ishii Masaru	4. 巻 7
2. 論文標題 Novel method for gain-of-function analyses in primary osteoclasts using a non-viral gene delivery system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-020-01161-7	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 Morimoto Akito, Kikuta Junichi, Nishikawa Keizo, Sudo Takao, Uenaka Maki, Furuya Masayuki, Hasegawa Tetsuo, Hashimoto Kunihiro, Tsukazaki Hiroyuki, Seno Shigeto, Nakamura Akira, Okuzaki Daisuke, Sugihara Fuminori, Ninomiya Akinori, Yoshimura Takeshi, Takao-Kawabata Ryoko, Matsuda Hideo, Ishii Masaru	4. 巻 12
2. 論文標題 SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22402-x	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10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西川恵三
2. 発表標題 骨吸収マクロファージ「破骨細胞」における環境応答を介した細胞分化制御機構の研究
3. 学会等名 第16回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川恵三、榎崎綾子、吉原利忠、坂口怜子、飛田成史、森泰生、石井優
2. 発表標題 二光子りん光・蛍光寿命イメージング法を用いた酸素に対する代謝応答のin vivo解析
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川恵三、榎崎綾子、吉原利忠、坂口怜子、飛田成史、森泰生、石井優
2. 発表標題 in vivo酸素環境の定量的理解
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川恵三、榑崎綾子、吉原利忠、坂口怜子、飛田成史、森泰生、石井優
2. 発表標題 二光子励起寿命イメージングによる生体内酸素分圧の定量的解析
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川恵三
2. 発表標題 破骨細胞の酸素生物学
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川恵三
2. 発表標題 骨粗鬆症の改善を目指したフードケミカルエピジェネティクスの研究
3. 学会等名 第22回日本フードファクター学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keizo Nishikawa
2. 発表標題 Immunometabolism: role of metabolic reprogramming in osteoclastogenesis
3. 学会等名 15th Bone Biology Forum Tokyo（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川恵三
2. 発表標題 骨吸収マクロファージ「破骨細胞」における代謝制御の重要性
3. 学会等名 第37回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 檜崎綾子、西川恵三、吉原利忠、坂口怜子、飛田成史、森泰生、石井優
2. 発表標題 Quantification of oxygen tension in bone marrow using intravital two-photon phosphorescence lifetime imaging
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 檜崎綾子、西川恵三、吉原利忠、坂口怜子、飛田成史、森泰生、石井優
2. 発表標題 二光子リン光寿命イメージングを活用した骨髓内細胞における酸素分圧の定量解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 武田 憲彦、田久保 圭誉	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	

1. 著者名 西川恵三	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 238
3. 書名 茶ポリフェノールの生理機能と応用展開(立花宏文 編集)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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