

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500520

研究課題名(和文)量子ドットによる細胞酸素イメージング：腫瘍内低酸素のリアルタイムモニタを目指して

研究課題名(英文)Oxygen imaging by quantum dots for detection of intra-tumor hypoxia

研究代表者

高橋 英嗣 (TAKAHASHI, Eiji)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30206792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：固形腫瘍組織の内部には酸素不足領域(低酸素微小環境)が形成され、これは腫瘍の悪性度を決定する重要な要素である。本研究では直径数ナノメートルという極めて小さな半導体粒子(量子ドット、以下QD)を低酸素細胞の光学プローブとして利用できるかについて基礎的な検討を行った。新しく合成したシステイン被覆QDを培養細胞に導入し、細胞周囲の酸素濃度変化に応じてQDの蛍光強度が変化する事を確認した。一方で、細胞内に導入したQDの蛍光強度が低い事、蛍光観察に伴う蛍光強度の低下(褪色)が著しいこと等、QDを用いた細胞レベルの酸素イメージングに対する問題点も明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic cells in solid tumor define the malignancy. Thus, imaging of hypoxic cells in solid tumor is of significant importance. Here, we attempted to use nanometer-scale semiconductor particles called quantum dots (QDs) as an optical probe for hypoxic cells. Fluorescence intensity of the newly synthesized L-cysteine capped QD, loaded into cultured cells, changed according to the intracellular oxygen concentration. However, the fluorescence intensity was lower than expected from the in vitro study. We also found significant photo bleaching of the QD fluorescence. These appear to hinder the immediate use of the QD as a nanoscale optical oxygen probe.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：量子ドット 酸素 培養細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍の生物学的特徴を遺伝子発現を通じて決定する重要な要素が腫瘍組織内に **heterogeneous** に形成される“低酸素微小環境”であることが最近広く認識されるようになり、この“低酸素微小環境”が、がん治療のターゲットと考えられるようになった。この新しい治療法の開発に必須の基礎技術が、*in vivo*での腫瘍内酸素イメージングである。

しかしながら、担癌マウスのような丸ごとの動物を対象に、固形腫瘍内に **heterogeneous** に存在する低酸素領域を高い空間分解能で繰り返し(体表面から)イメージングする技術は、現在のところ存在しない。

一方、最近の急速なナノマテリアル技術の進展により実現した nm サイズの半導体粒子(量子ドット, **QD**)を、新しい蛍光プローブとして応用する試みがバイオ分野において活発に進行中である。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、実験動物(担癌マウス)に移植した腫瘍の内部に形成される低酸素領域を *in vivo*リアルタイムで光学的にイメージングする方法の開発である。

本研究においては、とくに、低酸素性細胞の光学プローブとして、量子ドットの可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 量子ドットの合成

先行研究で *in vitro* (バッファ溶液内)で蛍光強度の酸素依存性が報告されている L-cystein capped CdTe QD (cys QD) をボトムアップ法にて化学合成した。その際、cys QD のサイズ依存性蛍光特性を明らかにするため直径約 2 nm, 3 nm, 4 nm の 3 種類の cys QD を合成した。

(2) 細胞培養系の確立

cys QD の細胞内でのふるまいを明らかにするために、3種類の細胞株の培養を定常的に行えるよう当研究室大学院生の教育トレーニングを行った。使用した細胞株は腫瘍系細胞株の Hep3B および Hep G2 と非腫瘍系細胞株の COS-7 である。

(3) 培養細胞への cys QD 導入最適化

培養細胞を継代後 3 日目に濃度 10 nM または 50 nM の cys QD (蛍光波長 580 nm, 粒子径 約 4 nm) を含む培養液中で 0.5, 1, 3, 6, 12 時間インキュベートした。その後、培養液を交換し、継代後 4 日目に位相差顕微鏡を用いた形態観察を行った。これとは別に 10 nM cys QD を含む培養液中で細胞を 5, 15, 30, 60 分間インキュベートした後、細胞内の cys QD 蛍光強度を測定した。

(4) 酸素濃度と細胞内 cys QD 蛍光変化

培養細胞を 10 nM の cys QD を含む培養液中で 30 分間インキュベートした後、細胞外酸素濃度を 20 % (1 時間) → 0.5 % (1 時間) とした (“O₂ challenge”)。また、対照として

20 % (1 時間) → 20 % (1 時間) とした。これらの細胞内 cys QD 蛍光を測定した(励起波長 475 nm, 蛍光波長 595 nm)。次に酸素濃度依存性の蛍光波長シフトを検討するために、同様の酸素条件で 585 nm と 605 nm の二つの波長で蛍光強度を観察した。蛍光波長シフトはこれらの蛍光強度比 (F_{605}/F_{585}) から検討した。

(5) 2波長蛍光法による酸素レベルイメージング

上記(4)の実験プロトコルは煩雑であり、酸素濃度変化に伴う cys QD 蛍光変化は相対変化として得られるのみであった。この問題を解決するために、酸素濃度非依存性量子ドットである CdTe/ZnS 量子ドットを新たに合成(蛍光波長は 420 nm)しこれを先述の酸素依存性 cys QD と同時に細胞内に導入し、両者の蛍光比をとることで細胞内酸素レベルの推定を試みた。

4. 研究成果

(1) 量子ドットの合成

直径 2 nm, 3 nm, 4 nm の 3 種類の cys QD の蛍光波長は、それぞれ 525 nm, 550 nm, 575 nm であり、それぞれの蛍光波長間に十分な分離が確認され、マルチカラーイメージングの可能性が明らかとなった。

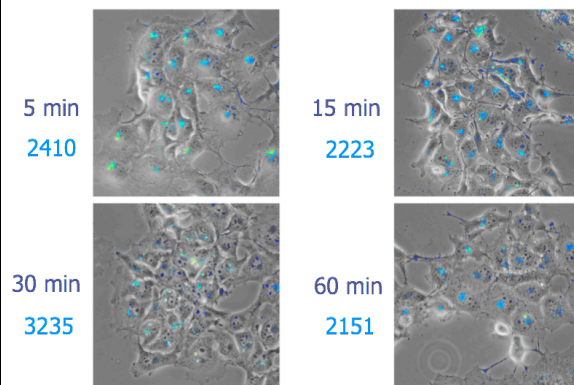
(2) 細胞培養系の確立

大学院生が単独で細胞培養の管理を行える環境を実現した。

(3) 培養細胞への cys QD 導入最適化

インキュベーション時間の増加とともに、細胞形態の異常および脱落細胞が増加した。特に 50 nM cys QD ではインキュベーション 1 時間以内に細胞形態の変化が見られた。

10 nM cys QD を用い、インキュベーション時間を 5~60 分間で変化させた時の細胞内蛍光分布および蛍光強度には大きな差は見られなかった(図1)。以上より、cys QD の培養細胞内導入条件として、濃度 10 nM, インキュベーション時間 30 分を最適とした。

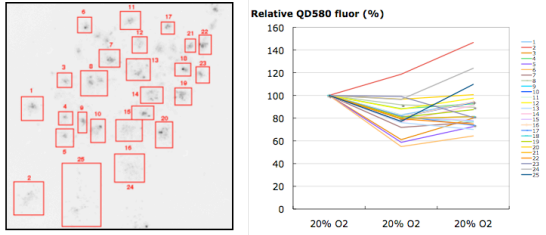


(図1) COS-7 細胞への cys QD 導入。インキュベーション時間および細胞内蛍光強度を合わせて示す。

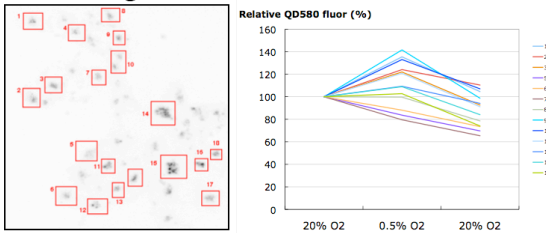
(4) 酸素濃度と細胞内 cys QD 蛍光変化

図 2 に細胞内蛍光強度が雰囲気酸素濃度に依存して変化の様子を示す。

Control

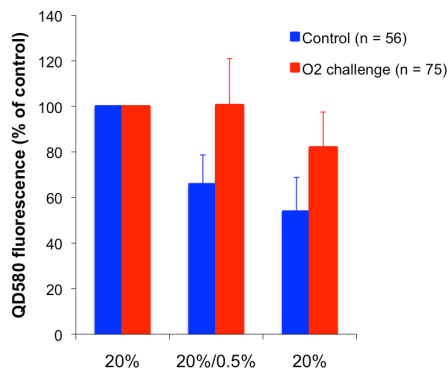


O2 challenge



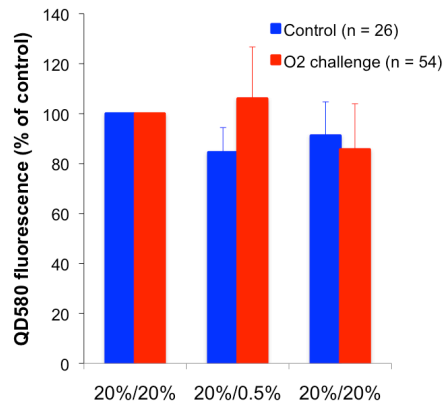
(図 2) 個々の蛍光強度の変化. 上段は雰囲気酸素濃度を 20% に固定して, 3 回の蛍光測定を行ったもの. 下段は雰囲気酸素濃度を 20% → 0.5% → 20% と変化させたもの.

Hep G2 細胞および COS-7 細胞に導入した cys QD の蛍光強度変化をそれぞれ図 3 および図 4 に示す. 酸素濃度を 0.5% に低下させると, どちらの細胞でも control 細胞に比べ cys QD 蛍光強度が有意 ($p < 0.01$, t -test) に増加した. 一方で, フォトブリーチングと思われる蛍光強度の低下も見られた.



(図 3) Hep G2 細胞内に導入した cys QD 蛍光の酸素濃度による変化. エラーバーは標準偏差を表す.

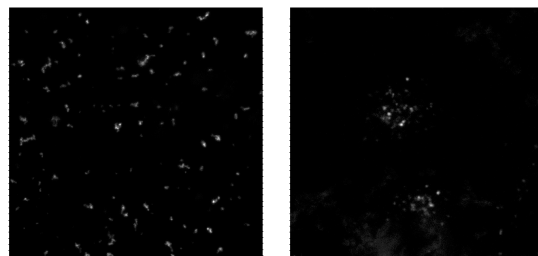
上に述べたように, 今回の実験では, フォトブリーチングを疑わせる蛍光強度低下が見られたので, 雰囲気酸素濃度および励起時間と蛍光強度減弱の関係を調べた.



(図 4) COS-7 細胞内に導入した cys QD 蛍光の酸素濃度による変化. エラーバーは標準偏差を表す.

酸素濃度を 20% または 0.5% として, 励起光 5 秒間照射, 励起間隔 1 分で 5 回蛍光画像を取得した際の蛍光強度変化を調べた. 励起を繰り返すと, 蛍光強度が大きく低下し, 5 回励起後の蛍光強度は, 1 回目の 50% 以下まで低下した. また酸素濃度が高いほど蛍光強度の低下は大きかった. 次に, 励起時間を 3 秒または 5 秒として, 酸素濃度 20% または 0.5% の時, 励起間隔 1 分で 2 回蛍光画像を撮影し, その時の蛍光強度を比較した. 酸素濃度 0.5% では, 励起時間は蛍光強度減弱に大きく関係しなかったが, 酸素濃度 20% では, 励起時間 5 秒で蛍光強度の低下がより大きかった. 以上の結果はいわゆるフォトブリーチングの存在を示唆したが, 一方で, 励起の間隔を 2 分以上にすることで, いったん減弱した蛍光強度の回復 ($89 \pm 8\%$) が観察された.

今回の実験では, 細胞内に導入した cys QD の蛍光強度が予想を裏切り低く, 正確な蛍光観察・定量化に困難が生じた. そこでバッファ溶液に分散した cys QD と細胞内に導入した cys QD の蛍光強度を比較した所, 図 5 に示すように後者の蛍光強度は約 1/35 に低下した. 一方, 市販の QD (蛍光の酸素依存性は見られない) である core-shell 型の Qtracker 525 (Invitrogen 社, CdSe/ZnS) では, このような細胞内における蛍光強度低下は見られなかった.



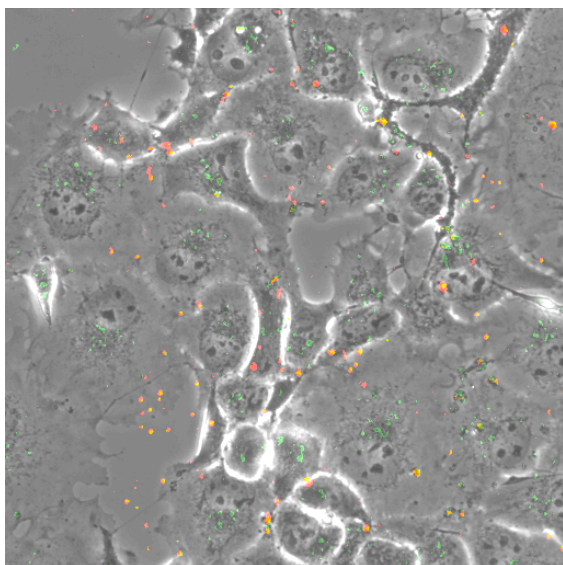
solution
(intensity ~3200,
exposure = 1 sec)

cell
(intensity ~450,
exposure = 5 sec)

(図 5) バッファ溶液中 (10 nM, solution) および細胞内 (cell) に導入した cys QD 蛍光.

(5) 2波長蛍光法による酸素レベルイメージング

上記の蛍光強度変化を利用した酸素レベル画像化の原理的問題は、酸素依存性の蛍光強度変化があくまで相対的な値として観測されることである。つまり、今回の実験のように、例えば 20%酸素環境での蛍光強度に対する変化をもって酸素依存性を評価せざるを得ないという点である。1回の測定で酸素依存性の蛍光を定量することはできず、2回以上の測定が必要ということである。この問題を解決する可能性のあるアプローチのひとつとして、同じ細胞にその蛍光が酸素反応性をもつ量子ドット（今回の蛍光波長 580 nm の L-cysteine capped CdTe）と酸素反応性をもたない量子ドットを同時に導入し、それらの蛍光強度比から酸素依存性蛍光変化を定量することが考えられる。その予備実験結果を図 6 に示す。ここでは、蛍光が酸素非依存性である量子ドットとしてコア/シェル構造をもつ CdSe/ZnSe 量子ドット（蛍光波長 540 nm）を用いた。これを L-cysteine capped CdTe と同時に細胞内に導入し、蛍光波長の違いからそれらを弁別したのが図 6 である。緑で表示したのが酸素依存性 L-cysteine capped CdTe 蛍光、赤で表示したのが酸素非依存性の CdSe/ZnSe 量子ドット蛍光である。このように内部リファレンスを設定することで、1回の蛍光観察で L-cysteine capped CdTe 量子ドット蛍光の定量化が可能になると思われる。



(図 6) 緑（擬似カラー）は蛍光強度が酸素に依存する L-cysteine capped CdTe（蛍光波長 580 nm）、赤（または黄）の擬似カラーで示したのは、蛍光強度が酸素に非依存の glutathione capped CdSe/ZnSe（蛍光波長 540 nm）。

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 8 件）

- ①. Takahashi E, Sato M. Anaerobic respiration sustains mitochondrial membrane potential in prolyl hydroxylase pathway activated cancer cell line in a hypoxic micro-environment. *Am J Physiol Cell Physiol* 306: C334-C342, 2014. (査読あり) DOI: 10.1152/ajpcell.00255.2013
- ②. 高橋英嗣. 生体の酸素ダイナミクス【総説】*日本伝熱学会雑誌* 53(222): 4-9, 2014. (査読なし) URL: http://www.htsj.or.jp/dennetsu/denpdf/2014_01.pdf
- ③. Higashi K, Jin T, Takahashi E. Oxygen sensitive quantum dots for possible nano-scale oxygen imaging in cultured cells. *Adv Exp Med Biol* 789: 179-383, 2013. (査読あり) DOI: 10.1007/978-1-4614-7411-1_50
- ④. Higashi K, Jin T, Takahashi E. Nano-scale imaging of intracellular oxygen in cultured cells using quantum dots. *Proc. JSMBE51*, 2012. (査読なし) URL: <http://www.congre.co.jp/jsmbe51/html/program/program.htm>

〔学会発表〕（計 23 件）

- ①. Takahashi E. Life with less oxygen: How cancer cells survive in hypoxic microenvironment. Research seminar at University of Toronto, 2013. 6. 21, Toronto, Canada 【invited lecture】
- ②. Takahashi E. Imaging the gradients of oxygen in cells and tissues using GFP. International symposium on metabolic imaging and spectroscopy - Honoring the 100th birthday of Britton Chance, 2013. 6. 18, Pennsylvania, USA 【invited lecture】
- ③. 高橋英嗣. 低酸素センシング機構. PCPC 研究会, 2012. 11. 6, 仙台【招待講演】
- ④. Higashi K, Jin T, Takahashi E. Oxygen sensitive quantum dots for possible nano-scale oxygen imaging in cultured cells. ISOTT2012, 2012. 8. 21, Brugge, Belgie
- ⑤. 高橋英嗣. 基礎から見た生体の酸素ダイナミクス. 第 16 回西日本小児循環器研究会, 2012. 8. 11, 京都【招待講演】
- ⑥. 東 健二, 神 隆, 高橋英嗣. 量子ドットを用いた細胞内酸素のナノスケールイメージング. 第 51 回日本生体医工学会

- 大会, 2012. 5. 10, 福岡
- ⑦. 東 健二, 神 隆, 高橋英嗣. 量子ドットによる細胞内酸素ナノスケールイメージングの試み. 平成 23 年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011. 12. 3, 熊本
 - ⑧. 高橋英嗣. 細胞内酸素輸送限界のバイオイメージング. 東京女子医大第 2 回最先端研究開発支援プログラム (FIRST) セミナー, 2011. 5. 23, 東京 【招待講演】

〔図書〕 (計 2 件)

1. 千原ほか編著. 呼吸のトリビア 2, 中外医学社, 2013, pp87-89.

〔その他〕

ホームページ等

- ①. http://www.ee.saga-u.ac.jp/sensor/ATF_Biomed_J/Introduction.html
- ②. http://www.ee.saga-u.ac.jp/sensor/ATF_Biomed/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋英嗣 (TAKAHSHI, Eiji)
佐賀大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号 : 30206792

(3) 連携研究者

神 隆 (JIN Takashi)
独立行政法人理化学研究所
研究者番号 : 80206367

研究協力者

東 健二 (HIGASHI, Kenji)
佐賀大学・大学院生