

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750160

研究課題名(和文)低pH環境を可視化する蛍光プローブの開発と生体イメージングへの応用

研究課題名(英文)Development of fluorescent probes for visualizing low-pH environment and their application in intravital imaging

研究代表者

小和田 俊行(Kowada, Toshiyuki)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：40584397

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)：関節リウマチなどの骨疾患原因細胞である破骨細胞の生体蛍光イメージングを行うために、骨吸収時に形成される低pH環境を可視化する蛍光プローブの開発を行った。ビスホスフォネート構造と光誘起電子移動により、蛍光プローブの生体内デリバリーとpH応答性の蛍光ON/OFF制御を行った。さらに、蛍光プローブに電子求引基を導入することで光安定性を向上させ、破骨細胞活性の長時間イメージングを達成した。また、プローブ構造を改良することで、蛍光波長の長波長化にも成功した。

研究成果の概要(英文)：To perform intravital fluorescence imaging of osteoclasts, which relate to bone diseases such as rheumatoid arthritis and osteoporosis, we developed fluorescent probes that can visualize low-pH region created during bone resorption. A bisphosphonate group and photo-induced electron transfer mechanism were used for the delivery and controlling pH-dependent fluorescence of the probes. In addition, we achieved long-term imaging of osteoclast activity in vivo with improved probe that has electron-withdrawing groups to enhance its photostability. Furthermore, we succeeded to develop the fluorescent probes with red-shifted emission maxima.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：破骨細胞 蛍光プローブ イメージング pH感受性

1. 研究開始当初の背景

我々の体内では、骨強度や形状を維持するために、破骨細胞と骨芽細胞による骨吸収・骨形成が繰り返されている。関節リウマチや骨粗しょう症などの骨疾患部位では、破骨細胞の活性が異常に亢進していることが知られている。このような骨疾患の診断には、X線CTを用いた骨格・骨密度検査や、骨代謝産物を検出する手法が用いられている。しかしながら、これらの手法では、骨疾患の原因細胞である破骨細胞の活性がどの部位で上昇しているのか、という情報をリアルタイムに得ることができない。生体内での破骨細胞活性をリアルタイムに観察する手法を確立することで、新たな骨疾患診断法の開発に大きく貢献することが期待される。また、生体内における破骨細胞の機能には未だ未解明の部分が多いため、骨疾患の治療のためにも、破骨細胞活性のリアルタイムイメージング技術が強く求められている。

生体内の標的分子や細胞を可視化する技術として、蛍光イメージングは非常に有力な手法である。特に、機能性小分子蛍光プローブを利用することで、標的分子を蛍光標識するだけではなく、その機能や環境情報を読みとることが可能となる。しかし、培養細胞などを用いた生細胞イメージングで確立されたプローブを、そのままマウスなどの動物個体へと導入することは困難である。動物個体内における標的分子に対してプローブを送達すること、ならびに、生体組織の自家蛍光の影響を最小限に抑え、生体透過性の高い長波長蛍光を利用する、といったことに注意が必要である。

2. 研究の目的

我々は、破骨細胞の活性を可逆的に検出するために、骨溶解時に形成される酸性領域に着目した。pH変化に応じて光誘起電子移動(PeT)の効率が変化するように、蛍光団にアニリン構造を導入し、蛍光シグナルのON/OFFを制御する。さらに、マウスに投与した蛍光プローブを破骨細胞近傍に送達するためには、骨組織と強く結合することが知られているビスホスフォネート構造を利用することを考えた。蛍光団としては、光安定性が高いと言われているボロンジピロメテン(BODIPY)色素を母骨格とし、蛍光波長の長波長シフトさせるために共役系の伸長を行う。開発した蛍光プローブをマウスに投与し、生体内における破骨細胞動態の経時的な観察を行い、一細胞レベルでの破骨細胞活性と局在を同時に観察する技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞活性の生体内イメージング

これまでに開発したpH感受性の緑色蛍光プローブ「BAp-E」をマウスに投与し、マウス頭頂骨内の骨髓腔で活動する破骨細胞の

活性を検出する。観察には、生体透過性に優れた近赤外光を励起源とする二光子励起顕微鏡を用いることで、生体深部の硬い骨の中に存在する蛍光プローブを励起可能である。破骨細胞内に緑色または赤色蛍光タンパク質を発現するように改変されたマウスを併用することで、細胞の局在の情報が同時に得られる。

(2) 蛍光プローブの光安定性の向上と破骨細胞活性の長時間観察

下記の研究成果(4-1)に示す通り、破骨細胞活性を長時間に渡り観察するためには、蛍光プローブの光安定性を向上させる必要が生じた。そこでまず、光退色の原因を突き止めるべく、試験管内にてBAp-Eの光安定性評価を行った。結果として、光退色の主な原因は活性酸素種であることが明らかとなった。したがって、蛍光団に対して電子求引基を導入することで活性酸素種との反応性を下げ、蛍光プローブの光安定性の向上を狙った。また、蛍光団構造の変更はpH応答性に対して影響を与えることから、pH応答部位の最適構造を量子化学計算により選出した。以上の設計に基づき合成した改良型プローブに対して、光安定性や活性酸素種への反応性を評価した。さらに、改良型プローブを用いて、マウス体内の破骨細胞活性の長時間観察を行った。

(3) 蛍光波長の長波長化

遺伝子改変マウスを作製する際に広く汎用されている緑色蛍光タンパク質との併用を考え、570 nmより長波長に蛍光極大波長を有するpH感受性蛍光プローブの開発を目指した。これまでの緑色蛍光プローブの開発で得た知見を基に、光安定性も考慮した分子を設計するために、量子化学計算により種々の候補構造のフロンティア軌道のエネルギーを算出した。同様の計算により、破骨細胞活性を検出するのに最適と考えられるpKaを有するpH応答性部位を探索した。分子設計にしたがいプローブの合成を行い、蛍光特性ならびに光安定性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞活性の生体内イメージング

pH感受性蛍光プローブ「BAp-E」をマウスの皮下に投与し、二光子励起顕微鏡を用いて頭頂骨の破骨細胞を観察した。常時蛍光性の蛍光プローブを用いた際は骨表面全体から蛍光シグナルが検出されたのに対し、BAp-Eの蛍光シグナルは一部の破骨細胞から観測された。これは、全ての破骨細胞が常に骨吸収を行っているのではなく、骨吸収をしていない休止期が存在することを示している。さらに、破骨細胞の動きに着目すると、BAp-Eの蛍光シグナルが観測される破骨細胞の動きは遅いのに対し、蛍光プローブのシグナルが見られない細胞は活発に動き回っ

ている様子が観察された。このことから、破骨細胞の動きと活性には相関があることが考えられ、本プローブにより破骨細胞機能の更なる解明が期待される。しかしながら、実験を繰り返している中で、BAp-Eは光安定性が低く、長時間観察に適しているとは言えない、という問題点が浮き彫りとなった。

(2) 蛍光プローブの光安定性の向上と破骨細胞活性の長時間観察

BAp-Eの光退色の原因を明らかにするために、試験管内のBAp-E溶液に対して光を照射し続け、蛍光強度変化を測定した。BAp-Eの蛍光強度は5分で10分の1まで減少したが、溶存酸素を取り除き同様の実験を行うことで、光退色が大幅に抑制された。このことから、BAp-Eの光退色には活性酸素種が関与していると考え、蛍光団に電子求引基を導入したプローブを新たに設計した。改良型プローブは市販のアニリン誘導体から8段階の反応により合成し、最終生成物はHPLCにより精製した。改良型プローブの蛍光特性を評価したところ、BAp-Eと同程度の蛍光波長と pK_a を有しているだけでなく、蛍光量子収率が大きく向上していた。原因は明らかではないが、プローブ構造を変更したことで、分子内回転が抑制されたためであると考えている。続いて、光安定性を評価するために試験管内にてプローブ溶液に対して光を照射し続け、蛍光強度を測定した。BAp-Eの場合とは異なり、溶存酸素存在下において30分以上光照射したところ、蛍光強度の減少量は約5%であった。さらに、種々の活性酸素種に対する反応性を評価したところ、一重項酸素やヒドロキシラジカルに対する反応性が著しく低下していることが明らかとなった。

改良型蛍光プローブを遺伝子改変マウス(破骨細胞内に赤色蛍光タンパク質を発現)に対して皮下投与し、頭頂骨内の破骨細胞を二光子励起顕微鏡を用いて観察した。BAp-Eを用いた同様の実験では、光退色が問題となるため、励起光照射の回数を減らした条件で観察を行う必要があった。これに対し改良型プローブは、1分毎に励起光を当てイメージングを行った場合でも、2時間以上の経時的な観察が可能であった。本研究により、生体内破骨細胞の活性変化を長時間に渡って観測することが可能となった。今後、異種細胞間の相互作用と破骨細胞活性変化を詳細に解析することで、破骨細胞機能の解明に繋がると期待される。

(3) 蛍光波長の長波長化

一般的に、BODIPY骨格の3, 5位に対して共役系を伸長することで、吸収ならびに蛍光波長が長波長化することが知られている。そこで、3, 5位にフェニル基、4, 6位に電子求引基を導入したBODIPYを合成した。蛍光特性を評価したところ、蛍光波長は上述

の改良型プローブから50 nm以上長波長シフトしており、蛍光量子収率は約50%であった。さらに光安定性評価の結果、30分以上の連続的な光照射にも耐えることが示され、長時間の生体イメージングにも適用可能であると考えられる。

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1件)

1. Junichi Kikuta, Yoh Wada, Toshiyuki Kowada, Ze Wang, Ge-Hong Sun-Wada, Issei Nishiyama, Shin Mizukami, Nobuhiko Maiya, Hisataka Yasuda, Atsushi Kumanogoh, Kazuya Kikuchi, Ronald N. Germain, Masaru Ishii, "Dynamic visualization of RANKL-mediated functional control of multinucleate osteoclast function *in vivo*", *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 866–873. DOI: 10.1172/JCI65054. (査読有り)

[学会発表](計15件)

1. 前田拓樹, 小和田俊行, 菊地和也, 「長波長蛍光を有するpH感受性蛍光プローブの開発」, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月28日, 名古屋大学 東山キャンパス(名古屋, 愛知)
2. Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada, Kazuya Kikuchi, "Real-time Visualization of Osteoclast Activity in Living Mice with pH-Activatable Fluorescent Probe", Imaging and Sensing Biomolecular Function and Assembly, 14 March, 2014, Institut Européen de Chimie et Biologie, University of Bordeaux (Pessac, France)
3. Toshiyuki Kowada, Hiroki Maeda, Kazuya Kikuchi, "Development of pH-Activatable Fluorescent Probe and Intravital Imaging of Osteoclast", First Osaka University-EPFL International Symposium, 2 December, 2013, Icho Kaikan (Osaka University, Suita, Osaka, Japan)
4. Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada, Kazuya Kikuchi, "Development of Highly Photostable Fluorescent Probe for Visualizing Osteoclast Activity in Vivo", International Symposium Towards Comprehensive Understanding of Immune Dynamism (TCUID 2013), 19 November, 2013, Osaka University (Suita, Osaka, Japan)
5. Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada,

- Kazuya Kikuchi, “Real-time Visualization of Osteoclast Activity in Living Mice”, ICBS2013 (the 2nd official conference of the International Chemical Biology Society), 8 October, 2013, Shirankaikan (Kyoto, Japan)
6. 小和田俊行, 前田拓樹, 菊地和也, 「pH 感受性蛍光プローブの開発と破骨細胞イメージングへの応用」, 第22回日本バイオイメージング学会学術集会, 2013年9月15日, 東京大学薬学部講堂(東京)
 7. 小和田俊行, 前田拓樹, 菊地和也, 「pH 感受性蛍光プローブを用いた破骨細胞活性の生体イメージング」, 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会, 2013年6月21日, 東京医科歯科大学(東京)
 8. Toshiyuki Kowada, Kazuya Kikuchi, “Development of Chemical Probes for Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclast in Living Mice”, Gordon Research Conference on Bioorganic Chemistry, 12 June, 2013, Proctor Academy (Andover, New Hampshire, USA)
 9. Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada, Kazuya Kikuchi, “Design of pH-Activatable Fluorescent Probes with High Photostability”, Gordon Research Conference on Bioorganic Chemistry, 10 June, 2013, Proctor Academy (Andover, New Hampshire, USA)
 10. 前田拓樹, 小和田俊行, 菊地和也, 「生体内の破骨細胞活性を可視化する pH 感受性蛍光プローブの開発」, 日本分子イメージング学会第8回学術集会, 2013年5月31日, 横浜赤レンガ倉庫1号館(横浜, 神奈川)
 11. 前田拓樹, 小和田俊行, 菊地和也, 「破骨細胞の動態イメージングを目指した pH 感受性蛍光プローブの開発」, 日本化学会第93春季年会, 2013年3月23日, 立命館大学 びわこくさつキャンパス(草津, 滋賀)
 12. Toshiyuki Kowada, Hiroki Maeda, Kazuya Kikuchi, “Development of Chemical Probes for in Vivo Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclast”, International Symposium Towards Comprehensive Understanding of Immune Dynamism (TCUID 2012), 30 October, 2012, Icho Kaikan (Osaka University, Suita, Osaka, Japan)
 13. Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada, Kazuya Kikuchi, “Development of pH-activatable Fluorescence Probe for Bone-Resorbing Osteoclasts in Living Mice”, World Molecular Imaging Congress 2012, 8 September, 2012, Convention Centre Dublin (Dublin, Ireland)
 14. 小和田俊行, 前田拓樹, 菊地和也, 「マウス体内における破骨細胞の骨吸収を可視化する pH 感受性蛍光プローブの開発」, 第6回バイオ関連化学シンポジウム, 2012年9月6日, 北海道大学 高等教育推進機構(札幌, 北海道)
 15. 前田拓樹, 小和田俊行, 菊地和也, 「In vivo で破骨細胞活性を可視化する pH 感受性蛍光プローブの開発」, 日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会, 2012年6月7日, 京都大学百周年時計台記念館(京都, 京都)
- 〔図書〕(計1件)
1. 小和田俊行, 菊地和也, 「5. in vivo イメージングに適した化学プローブの選択」, pp.42-50, **2012**, 実験医学別冊「in vivo イメージング実験プロトコル 原理と導入のポイントから2光子顕微鏡の応用まで」石井優/編, 羊土社
- 〔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
小和田 俊行 (KOWADA, Toshiyuki)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教
研究者番号：40584397