

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650052

研究課題名(和文)次世代色素を用いた光第二高調波イメージングによる生体現象の可視化

研究課題名(英文)Visualization of biological phenomena by the second harmonic generation imaging using the next generation dye.

研究代表者

塗谷 睦生(Nuriya, Mutsuo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60453544

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):生命科学に非常に有用であることが明らかとなった2光子顕微鏡技術の一つである光第二高調波発生(Second Harmonic Generation: SHG)イメージングは、独自の発生条件から細胞膜における現象の解明などに大きな力を発揮する。本研究ではその応用を阻んできた色素の欠如という問題の打開のため、SHGに特化した色素の開発と応用を試みた。本研究により世界初となる無蛍光性SHG専用色素Ap3が合成され、初の純粋なSHGイメージング、そして他の2光子現象との完全独立な同時イメージングが可能となった。これにより、SHGイメージングの生命科学研究への応用が飛躍的に促進されるものと期待される。

研究成果の概要(英文):One of the two-photon imaging techniques, called the second harmonic generation (SHG) imaging, can visualize unique biological phenomena because of its specific requirements for signal generation. In this study, we attempted to develop an SHG-specific dye to overcome the limitations of SHG imaging associated with uses of currently available general fluorescent dyes. We have successfully developed a non-fluorescent SHG specific dye, Ap3, and realized pure SHG imaging and true multimodal two-photon imaging using this dye. This SHG-specific dye should greatly facilitate the applications of SHG imaging in biological researches.

研究分野：神経科学

キーワード：光第二高調波発生 2光子顕微鏡 SHG イメージング アストロサイト

### 1. 研究開始当初の背景

光第二高調波発生 (SHG) は二つの光子が分子と相互作用した後、光吸収の過程を経ずに元の光子の二倍のエネルギー、つまり半分の波長を持つ一つの光子へと変換される現象である。これは生物学の領域で多用されるようになった蛍光分子などの2光子励起と類似しているが、分子の配向に依らない2光子励起とは異なり SHG は色素が中心対称性を崩して存在する時にのみ発生するため、SHG イメージングは2光子励起とは全く異なる生体情報を可視化することができる非常に優れたイメージング技術である。実際、コラーゲンなど生体が持つ内因性 SHG 分子の可視化は基礎生物学から臨床医学まで幅広い分野で応用が模索され、非常に高い期待が寄せられている。

一方、多くの色素の開発によりその応用性の幅が飛躍的に広がり生体イメージングにとって今や欠かせない技術へと進化した2光子励起顕微鏡とは対照的に、適切な色素の欠落が主たる原因となって色素を用いた外因性 SHG イメージングの生物学への応用は滞ってきた。実際、これまでに発表された研究は全て既存の蛍光色素、或いはそれらの誘導体を用いたものであった。しかしこれらの色素は蛍光を発生することが主目的であり、SHG 性を考慮していない。それどころか、蛍光特性が優れていればいる程色素による光吸収が起こり、本来 SHG イメージングでは問題とならないはずの光吸収に伴う細胞毒性や色素の破壊が起こり易く、更に SHG の現象と競合してその効率を下げるなど、SHG イメージングにとっては多重の欠点を持つものであると言える。つまり、SHG イメージングにおいては色素の蛍光性は障害であり、無蛍光性かつ SHG 性を持つような色素こそが理想といえる。よって SHG イメージングの発展と生物学への応用には、これまでの概念の真逆を行く次世代の無蛍光性 SHG 色素の開発と応用が必要不可欠であった。

### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では従来の色素開発の方針とは真逆の、極力蛍光を抑えた次世代型 SHG 色素、無蛍光性 SHG 色素の開発と応用を行うことを目指した。共同研究者らにより合成された候補色素を用い、培養細胞、更には脳組織においてその特徴を解析し、世界初となる SHG 専用色素の開発を試みた。更にそのような色素を用い、これまで実現できなかった SHG 専用色素を用いた純粋な SHG イメージング、他の蛍光色素との併用による完全独立マルチモダル2光子顕微鏡システムの確立と応用を図り、ライフサイエンスに広く応用可能な新たな解析系へと展開することを試みた。

更に、解析系の確立と共に解析対象の探索

を試みた。特に、近年脳機能発現における重要性が示唆されながらその細胞生物学的な知見が神経細胞に比べて乏しく謎に包まれたグリア細胞、中でもアストロサイトに着目し、その生理学的な役割の解明を図った。これにより、今後 SHG 顕微鏡解析系による解析が有効と考えられる部位と現象の同定を試みた。

### 3. 研究の方法

次世代型無蛍光性 SHG 専用色素の開発と応用のため、合成された候補色素群の特性を評価し、同時に応用対象としてのグリア細胞の生理学的解析を進めた。

無蛍光性 SHG 専用色素の開発のため、光を吸収しても無輻射失活により速やかに元の状態に戻ることが知られているアゾベンゼン化合物に着目し、従来より SHG イメージングに用いられてきた色素 FM4-64 の構造改変を試みた。これにより得られた複数の候補化合物の蛍光性を溶液中で評価し、同時に均一性の高い培養細胞である CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞の細胞膜を細胞外から染色し、2光子顕微鏡によりその光学的特性を評価した。2光子顕微鏡はオリンパス社製 FV1000MPE システムを、光源としては Newport 社製 MaitaiHP フェムト秒超短パルスレーザーを 950nm の波長で用い、SHG および種々の2光子蛍光シグナルを適切なバンドパスフィルターを介した後に光電子増倍管により検出した。無蛍光 SHG 性の評価の後、更なる特性の評価をマウス大脳皮質より調製した急性脳スライスの神経細胞を用いて行った。ここでは色素を充てんした細胞内液で神経細胞をパッチクランプし、電気生理学的手法と2光子顕微鏡観察とを合わせることにより、SHG シグナルの膜電位依存性および光照射に応じた細胞毒性を膜電位の変化により評価した。

色素の評価に合わせ、その応用対象としてのアストロサイトの生理学的特性の評価を行った。特に、これまでの研究から SHG による生理学的解析が有効となる細胞内コンパートメントであることが明らかとなったアストロサイト足突起に着目し、その特性の変化をマウス大脳皮質急性スライスを用いたてんかん病態モデル標本を用いて評価した。解析には定量的ウェスタンブロッティングを中心とした生化学と2光子顕微鏡を用いた脳組織内分子動態解析を用い、てんかん病態時において足突起にどのような生理学的な変化が起こり得るのかを評価した。

### 4. 研究成果

まず、培養細胞を用い、候補色素を細胞外液から投与することで染色し、定性的な評価を行った。ここから、共同研究者らにより合成された複数の色素の中で、特に Ap3 色素が

可溶性と細胞膜染色性の観点から優れていることが明らかとなり、この色素の特性を更に解析した。

次に、定量的な評価のため、これまで一般的に用いられてきた FM4-64 色素を比較対照として新規 SHG 専用色素 Ap3 の解析を進めた。溶液での解析から Ap3 は FM4-64 とは対照的に蛍光を全く発さず、褪色へと繋がる光化学反応も非常に少ないことが明らかになった。更に、培養細胞を用いて 2 光子蛍光と SHG シグナルを同時に取得し定量的に評価したところ、新規 SHG 専用色素は細胞膜染色時にも蛍光を全く発さず SHG 性を持つ、無蛍光性 SHG 専用色素であることが示された。更に Ap3 と FM4-64 を大脳皮質の神経細胞にパッチクランプ・ピペットを介して細胞内に導入して比較したところ、Ap3 の SHG シグナルの方が照射による褪色が少なく、光毒性も大幅に軽減されていることが明らかとなった。また、Ap3 は細胞膜電位の変化に線形に反応した SHG シグナルを出すことが分かり、膜電位の計測に応用可能であることが分かった。

次に、無蛍光 SHG 性を利用した純粋なマルチモダル多光子顕微鏡観測の可能性を探索するため、他の蛍光色素との同時染色による SHG と蛍光シグナルの同時観測を試みた。CHO 細胞を細胞内形態マーカーとなる蛍光色素で予め染色した後に SHG 色素を加え、その添加前後のシグナルを比較したところ、FM4-64 が既に導入されている蛍光色素のシグナルを大きくゆがめてしまうのに対し、Ap3 は蛍光像を変えることなく、完全に独立かつ同時の SHG および 2 光子蛍光シグナル観測を可能にすることが明らかとなった。更に、神経細胞に Ap3 とカルシウム濃度感受性色素 rhod-2 を同時に導入した後、電流注入により神経活動を誘導したところ、その活動に応じた膜電位の変化と細胞内カルシウム濃度の変化を独立かつ同時に捉えることに成功した。

これらの結果から、今回開発に成功した Ap3 色素は細胞毒性や光安定性に優れたものであり、その無蛍光 SHG 性を利用することにより完全に独立したマルチモダル 2 光子顕微鏡観測が初めて可能となることが明らかとなった。これにより SHG 専用色素という新たな色素開発の領域が拓け、SHG 顕微鏡の細胞生物学への応用が飛躍的に展開されるものと期待される。

上述の色素の開発と並行して、SHG 計測の対象として優れていると考えられたアストロサイトの制御に関する解析を進めた。その結果、てんかん脳においてアストロサイト足突起に発現する  $\beta$ -dystroglycan が matrix metalloproteinase により特異的に分解され、それと共に水チャネル aquaporin 4 の発現量も減少していることが明らかとなった。2 光

子蛍光分子動態解析により、このような足突起の変化は足突起が通常果たすバリア機能の破綻を伴うことも明らかとなった。更に、このような変化は神経活動が正常に戻っても持続するものであり、てんかん病態脳においてアストロサイトが独自の病態生理学的な挙動を示し、それが病態形成に重要な役割を果たす事が示唆された。これらの結果はアストロサイト足突起の生理学的性質が疾患条件下において動的に変化することを示したものであり、SHG イメージングの応用による足突起の生理学的解析がアストロサイト、ひいては脳組織の生理・疾患条件下における機能の解析に非常に有効となるであろうことを示唆するものとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Nuriya M, Fukushima S, Momotake A, Shinotsuka T, Yasui, M and Arai T. (2016) Multimodal two-photon imaging using a second harmonic generation-specific dye. Nature Communications, 査読有、7:11557. doi: 10.1038/ncomms11557.

Nuriya M & Hirase H (2016) Involvement of astrocytes in neurovascular communication. Progress in Brain Research. 査読無、225: 41-62. doi: 10.1016/bs.pbr.2016.02.001.

塗谷 睦生 (2015) 「アストロサイト 血管相互作用」日本薬理学会雑誌 査読無、145, 326-8. doi: 10.1254/fpj.145.326

Gondo A, Shinotsuka T, Morita A, Abe Y, Yasui, M and Nuriya M. (2014) Sustained Downregulation of  $\beta$ -Dystroglycan and Associated Dysfunctions of Astrocytic Endfeet in Epileptic Cerebral Cortex. J. Biol. Chem., 査読有、289(44): 30279-88. doi: 10.1074/jbc.M114.588384.

〔学会発表〕(計 3 件)

塗谷睦生、(2015 年) 「蛍光だけじゃない! 多光子現象を利用した新規顕微鏡法」第 88 回日本薬理学会年会、「名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)」2015 年 3 月 20 日

塗谷睦生、(2014 年) 「2 光子顕微鏡の神経薬理学研究への応用」創薬薬理フォーラム 第 22 回シンポジウム、「長井記念会館(東京都渋谷区)」2014 年 9

月 26 日

Gondo A, Shinotsuka T, Morita A, Abe Y, Yasui M and Nuriya M. (2014)  
Sustained downregulation of -dystroglycan in astrocytic endfeet in epileptic cerebral cortex.  
Neuro 2014, 日本神経科学学会大会, 「パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)」 2014 年 9 月 13 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 3 件)

名称: 光第二高調波発生化合物、光第二高調波発生色素組成物及び細胞検査方法  
発明者: 塗谷 睦生、安井 正人、新井 達郎、百武 篤也、福嶋 瞬  
権利者: 国立大学法人筑波大学、学校法人慶應義塾  
種類: 特許出願  
番号: 2015-518307  
出願年月日: 2014-05-23  
国内外の別: 国内

名称: 光第二高調波発生化合物、光第二高調波発生色素組成物及び細胞検査方法  
発明者: 塗谷 睦生、安井 正人、新井 達郎、百武 篤也、福嶋 瞬  
権利者: 国立大学法人筑波大学、学校法人慶應義塾  
種類: 特許出願  
番号: 14/892,464  
出願年月日: 2014-05-23  
国内外の別: 国外 (米国)

名称: 光第二高調波発生化合物、光第二高調波発生色素組成物及び細胞検査方法  
発明者: 塗谷 睦生、安井 正人、新井 達郎、百武 篤也、福嶋 瞬  
権利者: 国立大学法人筑波大学、学校法人慶應義塾  
種類: 特許出願  
番号: 14801474.9  
出願年月日: 2014-05-23  
国内外の別: 国外 (欧州)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
研究グループのホームページ:  
<http://user.keio.ac.jp/~aa606547/homepage.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
塗谷 睦生 (Mutsuo Nuriya)

慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 60453544

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし