

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870007

研究課題名(和文) 個体中単一細胞内動態計測を目指した内視鏡蛍光相関分光計の開発

研究課題名(英文) Development of an endoscopic fluorescence correlation spectroscopy towards molecular dynamics measurements in situ

研究代表者

山本 条太郎 (YAMAMOTO, JOHTARO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究所(研究院)・特任助教

研究者番号：20585088

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)：本課題は、これまで不可能であった生物個体内における生体分子動態のin situ計測の実現に向け、内視鏡に導入可能な蛍光相関分光法(内視鏡FCS)装置の開発を行うものであった。この実現に向け、レンズファイバを用いた内視鏡FCS装置の開発と改良を行い、直径63nm以上の蛍光ビーズの動態計測に成功した。また、計測領域は短径1.0μm、長径7.1μmの回転楕円体型と、培養細胞よりも小さく、細胞内での内視鏡FCSの可能性が示された。内視鏡FCSにより、実際の動植物個体の薬物に対する応答などを生体分子レベルで生きたまま観測することが可能になると期待でき、生物学や医学に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to developing and demonstrating an endoscopic fluorescence correlation spectroscopy (ES-FCS), which enables to measure bio-molecular dynamics in situ. In order to realize this purpose, we constructed and improved ES-FCS. Finally, I was succeeded in the dynamics measurement of the fluorescent beads with the diameter of larger than 63 nm. The shape of measurement volume was an ellipsoid with the short radius of 1.0 micro meter and the long radius of 7.1 micro meter. This volume is smaller than cultured cells, therefore, a possibility of the molecular dynamics measurement in living cell was successfully shown.

It will be expected that the pharmacodynamics can be studied by ES-FCS measurements in live animals and plants. The ES-FCS will contribute to the development of biology and medical science.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞情報・動態 生体情報・計測 蛍光相関分光 内視鏡 ブラウン運動

1. 研究開始当初の背景

【学術的背景】

(1) 生物学的課題

生物学において、細胞中で発現するタンパク質等の生体分子が、如何に機能し、調節されているかを明らかにすることは重大な課題である。生体分子の機能を明らかにするアプローチとして、生体分子の動態解析がある。細胞内では様々な生体分子がブラウン運動しており、その激しさは生体分子の形状や相互作用と密接に関係しているためである。

(2) 研究代表者の研究背景

蛍光相関分光法 (FCS) [2010, 金城, 生化学, p.1103], 蛍光相互相関分光法 (FCCS) [2013, 山本, 金城, Medical Science Digest (2013), p.453], 光退色後蛍光回復法 (FRAP), ラスター画像相関分光法 (RICS) といった細胞内での動態解析を目的とした計測技術が多数提案されている。研究代表者が所属する研究グループでは、特に FCS/FCCS および RICS 計測に重点を置いて生体分子の機能解析を行っており、近年では培養細胞内における GR や NF B などの転写因子の二量体化の解離定数 (Kd) を初めて決定した [2013, M. Tiwari, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, p.430]。

(3) 生体分子の生物個体内動態計測の重要性

上記の様に、培養細胞内での生体分子の動態解析から、生体分子の動態や相互作用の強さが明らかにされつつあるが、生物個体中では培養細胞と異なり、多くの細胞は 3 次元的に接着し合って組織を形成し、多様な細胞が相互作用し、脳や臓器から指令を受けて生命活動を行っている。この様な個体中の細胞の中で、生体分子の発現量や動態、他分子との相互作用の強さが培養細胞におけるそれと異なる可能性が多々指摘されてきた。それにも関わらず、これまで個体中の細胞内動態計測が実現されなかったのは、従来の細胞内動態解析法のほぼ全てがレーザー走査顕微鏡を必要とするため、個体中の計測を行うには巨大過ぎ、かつ取り回しが効かず、システムが高価であり、高価な対物レンズを使用するため、血液等の付着を忌避するためであると考えられる。

(4) 申請までの取り組み

個体内計測の前段階として、研究代表者の所属する研究グループでは以前、正立顕微鏡に FCS 装置を組み込み、採取したラット肝臓を灌流しながら FCS 計測を試みた [2007, 斎藤, 金城, 動物実験代替の為にバイオマテリアル・デバイス, p.302] が、その後進展が無いのも、同様の理由であった。

2. 研究の目的

現在、様々な生体分子について生きた培養細胞中での動態や濃度、他分子との相互作用

の強さが解析可能となり、生体分子の機能やその程度が明らかにされつつある。しかし、生物個体中では培養細胞と異なり、多くの細胞は 3 次元的に接着し合って組織を形成し、多様な細胞が相互作用し、脳や臓器から指令を受け取って生命活動している。この様な個体組織環境中の細胞の中で、生体分子の発現量や動態、他分子との相互作用の強さが培養細胞におけるそれと同じであるとは考え難い。

本課題では、光ファイバを用いた蛍光相関分光 (FCS) 計測システムを構築することで、内視鏡に導入可能なシステムを実現することを目指した。この内視鏡 FCS の実現によって、これまで困難であった生きた個体中の単一細胞内で、蛍光標識した生体分子の動態、濃度、ならびに相互作用を定量解析可能となり、生体分子の真の姿に迫るものになると期待できる。

3. 研究の方法

研究代表者は経鼻内視鏡や上部消化管内視鏡に備わる直径 2~3mm 程度の鉗子口に挿抜可能なレンズドファイバを用いた蛍光相関分光装置 (内視鏡 FCS) を開発し、最終的には個体中の細胞内における生体分子の動態計測を実現することを目指す。本課題では、その前段階として、システム開発およびその動作実証としての溶液内計測と培養細胞内計測を行うと共に、最適なレンズドファイバの選択を行った。将来的に個体内単一細胞内動態計測を実現し、生物学の発展に大いに寄与することを期待する。

4. 研究成果

(1) 平成 26 年度

内視鏡 FCS 装置の構築

まず最初に内視鏡 FCS 装置の構築を行った。図 1 に装置の概要を示す。光源波長を 488 nm とし、緑色蛍光物質の測定が可能な装置とした。

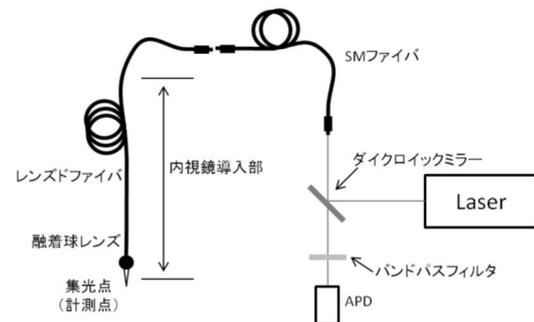


図 1 内視鏡 FCS 装置の構成

内視鏡 FCS の実証実験

上記で構築した装置を用いて、蛍光色素溶液に対して内視鏡 FCS 測定の実証を行った。試料は蒸留水で 10,000 倍に希釈した希釈した蛍光ペン (WKP1-G, ZEBRA) のインクとし、レンズドファイバはテーパードコーン型を

用いた。図2に示すように自己相関関数を取  
得することに成功し、内視鏡 FCS 計測の可能  
性を実証した。計測から、内視鏡 FCS におけ  
る計測領域の体積は、市販の FCS 装置で用い  
られる対物レンズ (C-Apochromat x40, NA1.2,  
Zeiss) の約 68 倍と推定された。また、蛍光  
溶液の希釈系列の測定から、自己相関関数の  
振幅が理論通りに溶液の濃度に反比例する  
ことを確認できた。

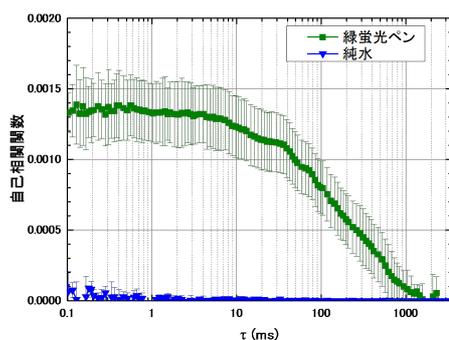


図2 10,000 倍希釈した緑蛍光ペンインク  
の内視鏡 FCS 測定結果

#### 最適なレンズドファイバの選定

上記実験を、ボールレンズ型レンズドファイ  
バ2種類とテーパードコーン型レンズドファイ  
バ1種類を用いて比較を行い、最も集光効  
率の良いファイバとして、テーパードコーン  
型レンズドファイバを選定した。

#### (2)平成 27 年度

##### 装置の性能向上

蛍光フィルタセットの最適化と、レンズドフ  
ファイバの更なる選定を行い、蛍光検出感度の  
向上を図った。この結果、特に GRIN レンズ  
を融着した光ファイバにおいて、蛍光検出感  
度を前年度の 4.3 倍に向上させ、かつ測定領  
域の体積を 1/18 にまで縮小するという大幅  
な改良に成功した。これによって、直径 63 nm  
まで小さな黄緑色蛍光ビーズにおいて FCS 計  
測が可能になった。

##### 培養細胞内計測の可能性の検証

測定試料作製の困難さから、実際に培養細胞  
内での計測は実現しなかったものの、内視鏡  
FCS 自体の性能としては、生細胞内計測は十  
分に可能であるという知見が得られた。

##### レンズドファイバの球面収差が計測結果 に与える影響の検証

計測によって得られた集光領域のサイズお  
よび形状が、理論上球面収差が無い時に得ら  
れる形状に相当した。このことから、内視鏡  
FCS において球面収差が大きな問題となら  
ないと確認できた。

#### (3)得られた成果の国内外における位置づけ とインパクト

内視鏡に導入可能な FCS 装置の開発に世界

に先駆けて成功した。これによって、生きた  
生物個体中における生体分子の動態測定の  
可能性が開かれた。

また、これまで FCS 計測には必須と考えら  
れていた高額な高 NA 対物レンズや特殊な顕  
微鏡 (レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡) を  
用いず、医療診断においては安価で使い捨て  
可能なレンズドファイバで代用可能である  
ことを示したことは、FCS 装置の普及・一般  
化に大きく寄与するものであると考えられ  
る。

#### (4)今後の展望

内視鏡 FCS 装置の改良をさらに進め、より  
小さな蛍光分子を測定可能とすることで、生  
きた生物個体中において生体分子の動態計  
測が可能になる。

抗原抗体反応や薬物動態を定量測定可能  
になり、医療診断や創薬に大きく寄与でき  
ると期待できる。今後は内視鏡 FCS による抗原  
抗体反応計測の可能性やその感度について  
研究を進めたい。

内視鏡 FCS 装置は、高価な対物レンズや特  
殊な顕微鏡を使用しないことから、安価かつ  
比較的的小型な装置であり、将来的に小規模な  
医院や家庭にも設置可能な装置となるほど  
の普及を目指したい。

#### 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 2 件)

J. Yamamoto, M. Oura, T. Yamashita, S.  
Miki, T. Jin, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, H.  
Terai, and M. Kinjo, "Rotational diffusion  
measurements using  
polarization-dependent fluorescence  
correlation spectroscopy based on  
superconducting nanowire single-photon  
detector", Opt. Express 23(25) (2015)  
pp.32633-42. (査読有)  
doi:10.1364/OE.23.032633

S. Oasa, A. Sasaki, J. Yamamoto, S.  
Mikuni, and M. Kinjo,  
"Homodimerization of glucocorticoid  
receptor from single cells investigated  
using fluorescence correlation  
spectroscopy and microwells", FEBS let.  
589 (2015) pp.2171-2178. (査読有)  
doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.003

[学会発表](計 3 件)

山本条太郎、北村直樹、金城政孝、「生体  
内蛍光相関分光計測の実現に向けて 2」第  
12 回バイオオプティクス研究会、  
2015/11/27 ~ 11/28、TKP 浜松アクトタワ

－CC（静岡県・浜松市）（招待講演）

J. Yamamoto and M. Kinjo,  
“Development of an endoscopic  
fluorescence correlation spectroscopy  
using a lensed fiber”, 第53回生物物理学  
学会年会, 2015/09/13～09/15, 金沢大学（石  
川県・金沢市）

山本条太郎、北村直樹、金城政孝、「生体  
内蛍光相関分光計測の実現に向けて」、第  
11回バイオオプティクス研究会、  
2014/12/05～12/06、大阪大学（大阪府・豊  
中市）（招待講演）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

(1)北海道大学プレスリリース（英語版）

<http://www.oia.hokudai.ac.jp/blog/expectations-for-early-diagnosis-of-alzheimer-disease/>

(2)北海道大学プレスリリース

[https://www.hokudai.ac.jp/news/151222\\_sci\\_pr.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/151222_sci_pr.pdf)

(3)細胞内タンパク質の動きを調べる新たな  
計測手法を開発

<http://www.nict.go.jp/press/2015/12/22-1.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 条太郎（YAMAMOTO, Johtaro）

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・  
特任助教

研究者番号：20585088