

研究終了報告書

「生体内エクソソーム動態を可視化する革新的蛍光プローブの創成」

研究期間: 2021年10月~2024年3月

研究者: 仁子 陽輔

1. 研究のねらい

蛍光イメージングは生物試料を高い時空間分解能かつマルチカラーで低侵襲的に観察できるため、生物医学的研究において必要不可欠な技術となっている。特に、**二光子励起蛍光イメージング(2PM)**は近赤外光による蛍光プローブの励起とするため、生体組織深部の観察にも有利となる。本筆者はこれまで、高輝度な蛍光色素およびそれらを高密度集積させた蛍光ナノ粒子(輝度: 二光子吸収性×蛍光量子収率)を開発することで、従来色素では困難であった2PMによるマウス脳深部領域の高速血流観察を実現し、蛍光プローブの高輝度化が生体蛍光イメージングの質向上に大きく貢献することを示してきた。

細胞外小胞の一つである「**エクソソーム**」は近年、蛍光イメージング対象として大きな関心を集めている。エクソソームは内部に様々な機能性分子を含み、体液中を移動することで細胞間の遠距離情報伝達を担っており、例えば、腫瘍の転移・進行に関与することが知られている。こうしたエクソソームの働きはその血中濃度に依存することも知られており、したがってエクソソームの生体内動態、特に血中での分布や取り込み機構を理解することは、エクソソームが関与する種々の疾患の病態解明や治療法の開発に極めて重要となる。実際、最近では蛍光イメージングによるエクソソームの生体内挙動観察が注目されており、例えばメラノーマ由来エクソソームを投与したゼブラフィッシュ胚を観察することで、同エクソソームの血中移動経路や受容細胞が特定され、さらにその転移性増殖への関与が明らかにされている。しかし、これまでにエクソソームの生体マウスの血中における挙動を高時空間分解能でもって観察した例は非常に少ない。その理由の一つとして、既存プローブではエクソソームを十分な輝度でもって染色できず、2PMのような高い時空間分解能を誇る生体イメージング技術を活かせなかったことが挙げられる。

そこで本研究では、**生体マウスの血中を走るエクソソームのリアルタイムトラッキングを実現するような革新的な生体イメージング、特に 2PM 技術の構築を目指すこととした。**より具体的には、① 既存のエクソソーム染色色素 Exosparkler (ESP) を凌駕する新しい高輝度蛍光プローブの創成と、② 同プローブ群を活用したマウス血中を走るエクソソームのリアルタイム観察、の2点を達成目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

達成目標①「高輝度蛍光プローブの開発」のための前段階として、ピレンを基盤とした新しい蛍光発色団の開発に取り組んだ。具体的には、ピレン縮環型インドレニン₄を四角酸で連結したスクライン型色素(SQ系)群を合成した。赤から近赤外にかけての複数種の色素を得ることに成功し、これらはESPの発色団であるカルボンアニン類よりも高い輝度と光安定性を示した。また、SQ色素群の一部を併用することで、マウス脳深部域や骨髄組織のマルチカラーイメージングが可能であることが判明している。

続いて、上記の SQ 系色素を活用し、脂質膜を染色するための新しい蛍光プローブ群を合成した。同プローブ群は、液晶相(Ld)および液体秩序相(Lo)を形成するモデル脂質膜(リポソーム)の両方を効率的に染色することができた。既存色素の ESP は Lo 相の染色性が非常に低いこと、さらにエクソソーム膜は Lo 相に類似した領域が大きな割合を占めるという報告があることを考慮すると、本 SQ プローブは ESP よりも効率的にエクソソーム膜を染色できると期待された。また、SQ プローブをマウスの血中に投与し、2PM を実施したところ、血中を走る細胞や骨髄細胞、さらには皮膚組織細胞の細胞膜が明瞭に描出された。

さらに、上記 SQ プローブおよび ESP 活用してヒト前立腺がん細胞(PC-3)由来エクソソームの染色性比較を行った。その結果、SQ プローブは ESP よりも3倍以上(励起波長依存)の輝度でもってエクソソームを染色できたものの、モデル脂質膜で得られた実験結果から期待されたほどの差は見られなかった。この原因については現在も検討中である。また本実験では、SQ プローブや ESP は、それらのエクソソーム1粒子あたりの色素数を 10^2 個程度に抑えなければ、エクソソーム上で容易に消光してしまうことが判明した。他方、過去の研究成果からは、目標②「2PM による血中エクソソームの動態観察」の達成のためにはエクソソームに同程度の輝度の蛍光色素を $10^3 \sim 10^4$ 個の蛍光色素を修飾する必要があると予想されており、残念ながら SQ プローブはそれには至らないことが示唆された。現在では方針を転換し、冒頭で述べた蛍光ナノ粒子をエクソソーム膜でコーティングする様式でエクソソームの超高輝度染色を目指している。

(2) 詳細

【ピレンを基盤とした新しい蛍光発色団の開発】

既存のエクソソーム染色色素の多くはカルボシアニン類が採用されているが、これらは特に生体透過性が高いと言われる第二近赤外(1000~1350 nm)域における二光子吸収性が低い¹。一方筆者らは、ピレンを π 電子共役系に組み込んだ色素系は比較的長波長域に二光子吸収性を示すことを見出していた。そこで本研究ではまず、ピレンを基盤とした蛍光発色団の開発に取り組んだ。具体的には、二つのピレン縮環型インドレニンを四角酸で連結したスクライン型色素(SQ系)群を合成した。これらの色素、特に、ピレンの1,2位でもってインドレニンと縮環したのから得られた PYSQ-N1 は、極めて高い光安定性やと1300 nm 付近での高効率二光子吸収性を示し、また赤色発光性の SQ(通常のインドレニンと四角酸から得られる発色団)との蛍光スペクトルの重なりが少ないことから SQ-PYSQ-N1 でのマルチカラーイメージングへの応用性が示唆された。実際、2PM 応用のデモンストレーションとして、SQ の水溶性誘導体と、PYSQ-N1 の脂溶性誘導体を集積した蛍光ナノ粒子を併用した生体 2PM を実施したところ、マウスの骨髄中の血管(PYSQ-N1、赤色)とその中を走る血球細胞(SQ、青色)、ならびに骨髄組織(第二高調波、緑色)のトリカラー高速イメージングに成功した。血球細胞はフローサイトメトリーによって単球と同定されており、それらが血管外へと遊走する姿を捉えることにも成功している。したがって、本色素群を利用することで、血管中を走るエクソソーム、およびエクソソームとマクロファージや腫瘍細胞との相互作用が観察できるようになるのではと期待された。

【SQ系色素を基盤とした脂質膜染色用蛍光プローブ群の開発】

続いて、SQ および PYSQ-N1 を基盤とした新規蛍光プローブの開発に取り組んだ。具体的には、SQ や PYSQ-N1 に対し、長鎖アルキル基を含む両性イオンもしくはアニオン性のリンカー分

子を導入し、蛍光発色団の脂質膜への局在性の向上を狙った²。両性イオン型のリンカーを導入したものはそれぞれ SQ-EV および PYSQ-N1-EV、そしてアニオン性方のリンカーを導入したものはそれぞれ SQ-EV2 および PYSQ-N1-EV2 と命名した。

SQ-EV1 と SQ-EV2 は、いずれも緩衝溶液中では凝集して H 会合体を形成し、非蛍光性となった。一方、脂質二重膜であるリポソーム(エクソソームモデル)の存在下で強力な蛍光発光を示したことから、リポソームの膜に吸着していることが示唆された。

PYSQ-N1-EV はリポソーム存在下でもほとんど蛍光性を示さなかった。これは、同プローブは疎水性が高すぎるためであった。実際、より高い水溶性を有する PYSQ-N1-EV2 は、上記の SQ-EV や SQ-EV2 と同様の機能を示した。

また、本蛍光プローブの 2PM による生体イメージングへの有用性のデモンストレーションも行った。SQ-EV2 を生体マウスに静脈投与したところ、血中から漏出した SQ-EV2 が、生体皮膚組織の真皮構造および表皮にある細胞(ケラチノサイト)の膜を極めて明瞭に描出することが判明した(図3左)。これは、従来のヘマトキシリン・エオジン染色とは異なる“生体”皮膚組織の形態学的観察手法として極めて有用な技術になる可能性がある。また、SQ-EV2 は骨髄組織細胞の膜をも染色し、さらには骨髄内の血管中を走る細胞膜まで明瞭に描出し、これによりユニークな動画を得ることができた。これら SQ プローブは 2023 年 7 月に特許出願済みである。

【SQ プローブと既存色素 ESP のエクソソーム染色性比較】

上記 SQ-EV2 や PYSQ-EV2、および既存のエクソソーム染色色素である ESP の比較を行った。これに先立ち、上記の蛍光プローブ群の脂質膜染色性を改めて検討した。SQ-EV2 は、液晶相(Ld, DOPC)相および液体秩序相(Lo, SM/Chol)を形成するモデル脂質膜に迅速に吸着するとともに高い蛍光量子収率($\Phi \sim 30\%$)を示した。PYSQ-N1 については蛍光性が低下($\sim 10\%$)したものの、近赤外発光色素としては比較的高い蛍光量子収率を Ld および Lo 相にて維持している。ESP については、Ld 相においては SQ-EV2 とほとんど同等の蛍光量子収率を示したものの、Lo 相にはほとんど吸着せず、測定不可となった。先行研究から、エクソソームは細胞膜と類似した脂質組成、すなわち Lo 相と類似したドメインが豊富に存在することが示唆されていることから³、Ld も Lo も染色できる新規プローブ群は ESP よりも優位であると期待された。

続いて、ヒト前立腺がん細胞(PC-3)由来のエクソソームを用いて上記蛍光プローブのエクソソーム染色性を比較した。その結果、SQ-EV2 は ESP よりも倍程度の蛍光量子収率を示した。すなわち、モル吸光係数や二光子吸収断面積を考慮すると、(励起波長に依存するが)SQ-EV2 は ESP よりも 3~4 倍程度、高い輝度でもってエクソソームを染色することができると言える。しかし、これはモデル膜の結果から予想されたほど大きな差ではない。しかも、PYSQ-EV2 についてはほとんど蛍光を観察できなかった。これらの原因については未だ検討中であるが、滴定試験や消光材を用いた実験も含めて、以下の点が判明しつつある。

- (1)ESP による染色が可能であったことから、エクソソーム膜外葉には Ld 相的領域も存在する。
- (2)いずれのプローブも、エクソソームに対する濃度が大きいと消光する。これは、エクソソームの膜上でプローブが凝集し、消光することがあることを意味している。
- (3)SQ-EV2 が ESP よりも高い蛍光量子収率を示したのは、図5の実験条件下では ESP は Ld 相的領域で既に一部凝集に伴う消光が起きており、一方で SQ-EV2 は一部が Lo 相的領域に分配されるためにそうした凝集消光が避けられたためだと考えられる。

(4) SQ-EV2 や PYSQ-EV2 は、いずれも Ld と Lo のモデル膜が同時に存在した場合はより Ld へと分配される。したがって、SQ-EV2 も PYSQ-EV2 も、ESP 同様、エクソソームの膜中の Ld 相的なドメイン上に集中しやすい。PYSQ-EV2 がエクソソーム存在下でほとんど蛍光性を示さなかったのは、この凝集による影響と、そもそも蛍光分光光度計が近赤外光に対する感度が低い、という結果が合わさったものだと考えられる。

これらの実験から得られた事実として、「SQ-EV2 などの蛍光プローブでエクソソーム膜を染色する場合、凝集消光を避けるために、エクソソーム1粒子あたりの色素数を 10^2 個程度に抑える必要がある」という点が挙げられる。一方先行研究から、マウスの血管中を走るナノ構造を 2PM で捉えるためには、同ナノ粒子に対し、十分な輝度をもつ蛍光色素が $10^3 \sim 10^4$ 個ほど修飾されている必要があると予想されている。実際、上記エクソソームをマウスに投与しても 2PM にてほとんどシグナルを得ることができなかった(ただし、エクソソームが血管内被細胞に取りついた場合、観察できる可能性は否定できない)。したがって、本研究の中で得られた蛍光プローブでは、残念ながら達成目標②を満足することは極めて難しいと結論付けた。

3. 今後の展開

前項の末にて述べたように、本研究で得られた蛍光プローブでは、マウス血中での挙動を捉えられるほど($10^3 \sim 10^4$ 色素分子/1 エクソソーム)にエクソソームを高輝度化できない。これは同時に、本研究目的を達成するために、(現時点において)外在的染色法は最適ではないことを示唆している。そこで方針を大きく転換し、DDS 分野の技術を参考に^{4,5}、超高輝度な蛍光ナノ粒子をエクソソーム膜でコーティングする方法を着想した(図6)。

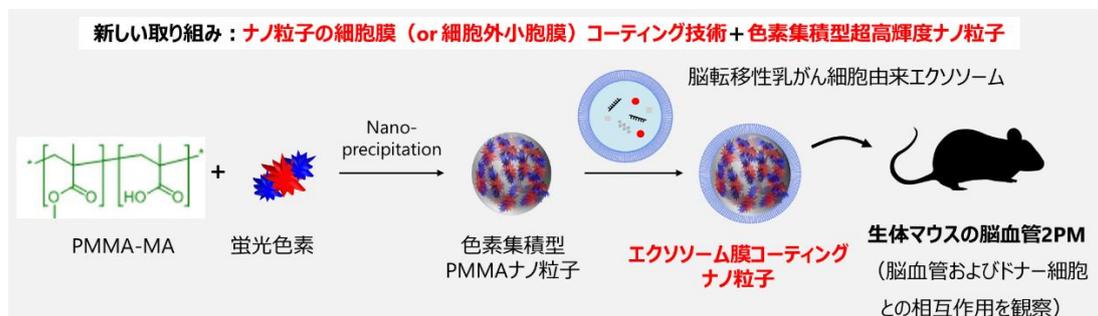


図6. エクソソーム膜を用いた超高輝度色素集積型蛍光ナノ粒子のコーティング

冒頭で述べたように、本著者は高輝度色素とそれらを高密度集積させた蛍光ナノ粒子 ($10^3 \sim 10^4$ 色素分子/1 粒子)の開発、および同ナノ粒子を用いた生体 2PM に関する実績がある^{6,7}。既に、高分子微粒子 (PMMA ナノ粒子、蛍光色素を包摂するキャリアとして利用可能)を作成し、モデル脂質膜によってコーティングする方法の検討を始めている。動的光散乱法 (DLS) による粒径測定およびゼータ電位測定からは、脂質膜による PMMA ナノ粒子のコーティングができていることが示唆されており、今後クライオ電顕によってさらなる証拠を得る予定である。

モデル膜による PMMA ナノ粒子のコーティング技術を確立した後は、(A)脳転移性乳がん細胞 (MDA-BD2a, 東京医科大学 落谷孝広教授と MTA を締結済み) からエクソソームを抽出し、同エクソソーム脂質膜によってコーティングされた超高輝度ナノ粒子を作製する。最終的には、(B)本ナノ粒子をとドナー細胞をマウスの血中に投与し、脳血管中での動態をマルチカラー2PM

によって観察する。これにより、がん転移を誘導するエクソソームの挙動のリアルタイム観察を実現する。

これらの一連の研究は今後、2024年度に上記の(A)を、2025年度中に上記(B)を達成することを目途に実施していく。本研究が達成されれば、それは「超高輝度なエクソソーム“ミミック”の創成」といってよく、様々なエクソソームの血管中の分布や取り込みを追跡できるようになる。これは、エクソソームが媒介するとされる様々な疾患(腫瘍の脳転移・進行、神経・精神疾患など)の病態解明や、エクソソームをキャリアとした治療法開発分野に貢献できる革新的な技術になると期待される。

(参考文献)

1. Fu, J. et al. *J. Opt. Soc. Am. B* **2007**, *24*, 56.
2. Klymchenko, A. S. *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 1, 1.
3. Yasuda, T. et al. *Langmuir* **2022**, *38*, 48, 14695.
4. Lehto, V-P. et al. *Nat. Commun.* **2022**, 13:6181.
5. Makvandi, P. et al. *Matter* **2023**, *6*, 761.
6. Niko, Y. et al. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, 2010698.
7. Niko, Y. et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2022**, *4*, 40481.

4. 自己評価

「研究目的に対する達成状況」という観点から見ると、残念ながら到達目標②は達成できなかったため、5段階中の3ほどしかつげられない。到達目標②を達成できなかった理由は、課題に対する戦略の甘さ、新型コロナウイルスによる入構制限の影響、頻繁なる寄り道など様々に挙げられ、大いに反省すべき点も多い。

一方、寄り道した結果であるが、本研究の過程で得られた SQ-EV2 は、(必ずしもエクソソームを標的とせずとも)価値ある材料となった。特に、2PMによる生体皮膚組織イメージングに関する成果は、これまで“死んだ”組織の観察によって多くの学理を構築してきた皮膚科学において極めて有用な材料になると期待され、例えば、バリア、再生、発汗など、未だ謎多き様々な皮膚機能の解明に役立つと予想される。この場合、SQ-EV2 は学术界だけでなく、例えば化粧品などのような産業界にも大きな影響を与えるかもしれない。実際、これらの蛍光プローブは現在、複数の試薬メーカーから市販化を打診されている。また、SQ および PYSQ-N1 発色団を併用したマルチカラーイメージングでは、血管中を走る免疫細胞の血管外遊走をリアルタイム観察できたことから、がん細胞の血行性転移に関する動態(血管浸潤など)の理解に利用できるかもしれない。

以上、本筆者は、本研究で得られた成果は科学技術ならびに産業界への大きな波及効果が期待できるものだと考えている。

最後に、ACT-X に参画したことで、複数の研究者との交流がはじまった。例えば、金沢大の黒田先生が開発されたイオン液体を利用し、水溶性の低い蛍光プローブでも生体 2PM に使用できるような技術開発にも取り組んでいる。また、広島大の渡邊先生とは、脂質膜の解析に関する情報交換を頻繁にやり取りしている。さらに、2023年1月に行われた第五回勉強会にて講演させていただいたが、そこで知り合った先生方とは研究のみならず、研究室運営に関する相談

などもさせていただいており、いい繋がりができたと感じており、これらの機会を提供してくれた本事業に深く感謝している次第である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Nishihara, H.; Watanabe, M.; Kawakami, R.; Murakami, M.; Seki, H.; Osaki, K.; Tsuda, T.; Imamura, T.; Hadano, S. Watanabe, S.; **Niko, Y.*** Pyrene-Fused Dioxaborine-Based Merocyanines with High Brightness, Photostability, and Fluorogenic Function for Deep-Skin Tissue Imaging of a Living Mouse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2024**, 97, 1-7. (2023, 25 November accepted)

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(招待講演)

1. **仁子陽輔**, 高輝度色素集積型ナノエマルジョンの開発とその *in vivo* イメージングへの応用, 2022 年日本化学会中国四国支部大会広島大会, 広島大学東広島キャンパス, 2022/11/13.
2. **仁子陽輔**, ピレン誘導体を活用した *in vivo* イメージング, 第 18 回バイオオプティクス研究会, 高知大学朝倉キャンパス, 2022/12/16.
3. **仁子陽輔**, 高輝度ピレン誘導体の開発と *in vivo* 多光子蛍光イメージングへの応用, 日本化学会第 103 春季年会 特別別企画「ルミネッセンス化学アンサンブル」, 東京理科大学野田キャンパス, 2023/3/25.
4. **仁子陽輔**, 超高輝度蛍光ナノプローブの創成と生体深部イメージングへの応用生命科学 4プラットフォーム成果シンポジウム, 東京大学弥生講堂, 2023/4/27.
5. **仁子陽輔**, 環境応答性色素を活用した *in vitro*, *ex vivo* および *in vivo* 蛍光イメージング, 第 44 回光化学若手会, 淡路島津名ハイツ, 2023/6/10.
6. **仁子陽輔**, 生体深部組織観察への応用を志向した高効率二光子励起発光性プローブの開発, 日本薬学会東海支部主催 特別講演, 2023/11/28.

(指導学生(分担者)による学会発表)

1. 渡邊舞, 波多野慎悟, 渡辺茂, **仁子陽輔**, 新規ピレンジオキサボリン誘導体群の合成とその光物性評価, 第 18 回バイオオプティクス研究会, 高知工科大学永国寺キャンパス, (2022/12/17), ポスター発表
2. 上村拓巳, 川上良介, 今村健志, 波多野慎悟, 渡辺茂, **仁子陽輔**, 細胞外小胞の染色を志向した新規高輝度・高効率二光子励起発光性色素の開発, 第 18 回バイオオプティクス研究会, 高知工科大学永国寺キャンパス, (2022/12/17), ポスター発表
3. 上村拓巳, 波多野慎悟, 渡辺茂, **仁子陽輔**, 高輝度・高効率二光子励起発光性スク

アライン色素を用いた新規エクソソーム染色用色素の開発, 高知化学シンポジウム 2022, 高知工科大学香美キャンパス, (2022/10/29), ポスター発表, **優秀ポスター発表賞**

4. 上村拓巳, 川上良介, 今村健志, 波多野慎悟, 渡辺茂, **仁子陽輔**, 脂質二重膜の効率的な染色を可能とする新規高輝度二光子励起発光性色素の開発, 2023 年光化学討論会, 広島国際会議場, (2023/9/5-7), ポスター発表