

研究終了報告書

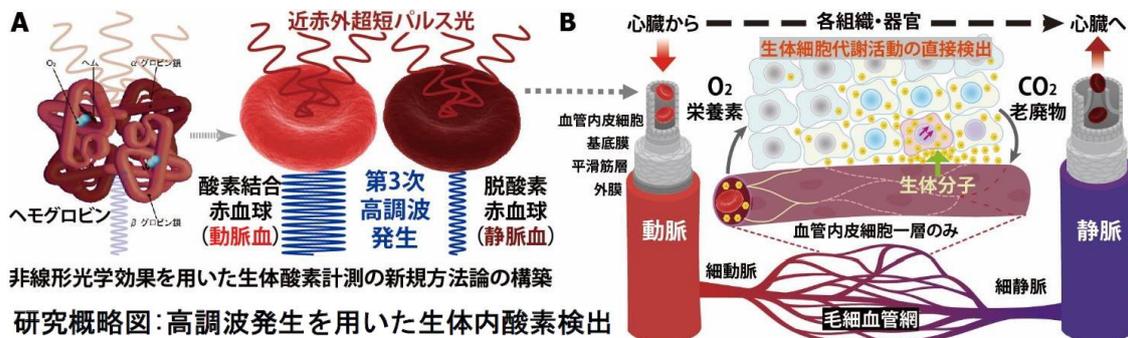
「研究課題名:非線形光学効果が照らす生体物質交換の仕組み」

研究期間: 2019年10月~2023年3月

研究者: 本藏 直樹

1. 研究のねらい

生物は食物を摂取することで栄養素を補給し、また呼吸をすることで酸素を身体に取り込み生命を維持している。その吸収した栄養素や酸素を、全身に存在する細胞へ隈無く、また適切に運搬することが必須であり、これこそが生体内に存在する37兆個の細胞の生命を維持する機構の本質である。この高度なシステムを維持するために各々の臓器間の協調作業が重要であるが、これに大きく寄与するのが生体で唯一の物質輸送路、血管のネットワークである(概略図)。すなわち血管を介した物質のやり取りが生命維持機構の根幹となり、それが崩壊すると個体の死を招く。そこで本研究では生体内の血管および組織を可視化し、血管からどのように酸素および栄養素が組織内の細胞に輸送され、その輸送の結果、変動する代謝活動を単一細胞ごとにリアルタイム計測することを試みている(概略図)。これによりいつ・どこで・どのようにエネルギーが消費され、細胞機能がどのように変動するのかを解明することで、特に生命維持に最も大切な酸素供給機構と局所環境の関係を記述することが第一の目標である。将来の展望として、局所の動的生体恒常性や全身性に広がる生体恒常性の機構を理解するための第一歩であると考えている。



2. 研究成果

(1) 概要

生体イメージングで組織を非侵襲に可視化するため、生体の窓領域である近赤外超短パルス光源を用いた。それを高調波発生の種光源とすることで、蛍光画像取得と同時に、生体物質由来の第2・3次高調波発生画像の取得が可能となり、色収差を伴わない高調波発生・多光子励起同時観察法が確立した。その観察法を脳・皮下など様々な組織において適用した結果、第3次高調波発生画像は無染色の赤血球を可視化できることが自身のシステムで確認した。さらに第3次高調波発生の波長がデオキシヘモグロビンの光吸収域と強く重なる領域であれば、高調波強度を計測するだけで酸素結合度を直接計算できると考えた。これを本研究にて遂行し、赤血球の酸素結合状態が第3次高調波発生の強度として計測できることが分かっ

てきた。しかし本研究課題における波長検出領域では、赤血球や生体から放出される自家蛍光と第3次高調波発生の波長域が被ってしまい、高調波と蛍光放射を厳密に分離できない可能性が生じる。また第3次高調波発生は、可視光域において最もヘモグロビン分子の吸収が高い 400-440nm の波長範囲で放射されるため、検出された光子が高調波発生由来、もしくは蛍光由来なのかを明確に定量評価する必要がある。これを評価するために、高調波の特性である入射光と放出光(フェムト秒)の時間特性を利用することで自家蛍光(ナノ秒)と切り分けられることを考察した。すなわち蛍光時間計測 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy: FLIM) を用いて、高速時間計測 (rapid FLIM) することで、また波長依存性を考慮して、検出される波長域ごとに検出チャンネルを分けることで、光子の性質と由来を明確にする多チャンネル検出系を組み上げた。その結果生体由来の自家蛍光と明確に切り分けて、酸素化および脱酸素化ヘモグロビンのトランジットを高速検出し、生体内での酸素放出場所を直接同定した。また様々な蛍光プローブを組み合わせることで、局所の酸素濃度や様々な生体情報 (pH, 温度, 細胞活動, 膜電位など) を色収差なく、多次元ナノスケール (時間・位置・濃度) で直接検出できる世界初の方法論が確立した。このことは、生命活動の基盤である局所の生体恒常性を解明する技術基盤が完成したことを意味しており、今後これを用いて生命活動の基盤を明らかにしていく予定である。

(2) 詳細

研究テーマ1「非線形光学顕微鏡の開発」

酸素の放出機構およびその場を正確に明示するために、研究成果概要に示した顕微鏡を作製した。最新の超短パルス波長可変レーザーを本さがかけ予算にて第一半期中に政府調達によって購入し、稼働することを確認した。そのレーザーを自身で設計した光路によって導入することによって、非常に高強度光を維持したまま、パルスの到達時間およびその調光を高い時間解像で制御することが可能となった(図1)。また用いた超短パルス波長可変レーザーは 2 つの異なる波長が同期して出射されるため、これを独立した光路を用いて制御することで、誘導放出を用いた多光子 STED 顕微鏡なども作製可能である。これらを想定して応用可能な 3 つの独立した光路を設計し、またそこにパルス同期に必要なディレイラインも加えた。これによりパルス間隔を任意に調節し、パルスごとに異なる波長を組み合わせることも可能となった。またこの光路内に様々な蛍光時間計測に幅広く対応するため、1パルスごとにトリガー出力可能な機構も準備中である。さらに観察対象が組織内を縦横無尽に走行する血管網を対象としているため、それを短時間に撮像するために被写界深度を従来の多光子励起による観察法では満たせない可能性を考察していたため、屈折型アキシコンを用いて疑似的ベッセルビーム生成することで対応した。これにより将来多光子 STED 顕微鏡において使用可能な円環ビームを生成も同時に満たした光路が完成した。すなわち本研究で作出した非線形光学顕微鏡は、多種多様な非線形光学効果を同時計測可能な装置となっている。

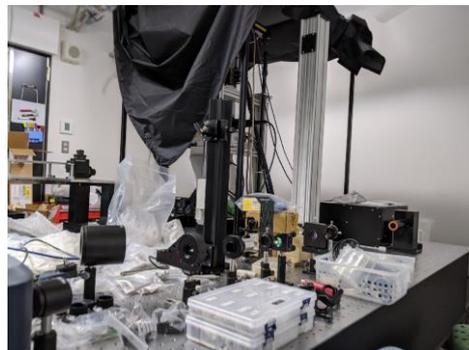


図1. 非線形光学効果を有効利用するための顕微鏡開発

光検出は時間計測可能な4chのハイブリッドディテクターを対物レンズ直上に直接設置することで、高効率に蛍光および高調波を取得可能となっている。またそれを2chごとに分離し、実験ごとに Epi 側だけでなく Trans 側のシグナルも検出可能な配置に再配置可能となっている。これにより高調波発生を効率的に捉える検出系も完成した。

これらの装置の開発により、生体内の微小環境変化を直接検出可能な非線形光学顕微鏡の完成とこれを用いた血管生理学研究へと移行可能となった。

研究テーマ2「実験動物の準備および作出」

血管内皮細胞の生理的な機能変動をとらえるための機能プローブとして、ジャネリア研究所で開発されたタンパク質ベースのカルシウムセンサー、jGCaMP7s を用いることで生理的な変動をとらえる(Nat Methods. 2019 Jul;16(7):649-657.)。この分子は非常に明るくさらに大きなダイナミックレンジを持つプローブであるため、単一細胞レベルの応答を正確に捉えることができると考えられる。これを生体イメージングに適用するため、このプローブを *LoxP* および *lox2272* で挟み込むことで *Cre* タンパク質が作用した時に挟まれた遺伝子配列が反転しプローブが発現する手法を用いることを想定して、その配列を人工遺伝子合成法にて作出した。これにより *Cre* 発現細胞のみで漏れもなく、このセンサーを利用できる設計となった。その後この作出した遺伝子配列を、安定発現させるために *ROSA26* ゲノム領域に組み込むためのターゲットベクターを共同研究先から入手し、目的の遺伝子を組み込みそれをマウスのゲノムに組み込んだ。このマウスに *Tie2-Cre* 発現マウスなどをかけあわせて、血管内皮細胞特異的発現マウスを確立した。これと先記載した顕微鏡と組み合わせることで、酸素動態の検出および生体内局所血管応答を同時に捕らえることができるため、局所の細胞機能変動と物質交換を同時に生体の局所で検出することが可能となる。

研究テーマ3「作出した顕微鏡および実験動物を用いた生理学研究」

研究テーマ1に示した顕微鏡を作製し、高調波発生・多光子励起同時観察法をさらに改良したことで、赤血球の酸素化状態を可視化するための装置が完成した。それを用いて第3次高調波発生の光強度が酸素濃度依存性の有無を明確にするため、外部の酸素・二酸化炭素濃度を自在に調節できる *in vitro* の系を用いて、実際に外部酸素濃度との因果(もしくは相関)関係を明確に示すことを試みた。その結果 *in vitro* の系であっても予想通りに、赤血球から放出される第3次高調波発生を検出し、そのシグナル強度が外部の酸素および二酸化炭素濃度に依存することが、*in vitro* の実験によって証明できた。

また並行して生体研究をおこなうために、マウスに麻酔をおこない顕微鏡下で安定して画像取得可能な実験セットを継続して改良し続けることで、広範囲の視野を高速に取得するための光学系の変更をおこなってきた。高速マルチチャネル FLIM を計測するための、4chの検出器(特注の高 QE ハイブリッドディテクター)を対物レンズ直上に設置したことで、より高感度に高速 FLIM を多チャンネルで検出できるようになった。これにより生体内の局所 pH や温度変化、さらにはヘモグロビンの自家蛍光によらない THG の強度変化が生体内で取得することが可能となってきた。さらに生体分子や薬物の局所微小注入をおこなうための、マイクロインジェクターの設置、および広視野を計測するためのイメージスキャンと同期して可動することを可能にした電動ステージを導入した。これにより広視野を高速に FLIM 計測できる生体計測のための非

線形光学顕微鏡が完成した。さらに生体内で赤血球の酸素結合を直接計測するためには、血管の中を動き回る赤血球をリアルタイムに高速画像取得する必要がある。そのため組織内を縦横無尽に走行する血管を単一画像で取得するために、被写界深度を大きくする必要が生じる。これを実現するために超短パルス光源から出射される水平偏光ガウシアンビームを、アキシコンレンズペアを用いてベッセルビームへと変化することで、横方向の空間解像を維持したまま、光軸方向の被写界深度を増大させた。その結果、ビームの調整をおこなうことで、深度をおおよそ 10 倍程度の 20–30 μm 程度の被写界深度が得られ、すなわち以前と比較して 10 倍程度の高速画像取得が可能となった。

これらの装置を用いて生体内の血管を可視化し、毛細血管から放出されると推定される酸素分子の時空間動態の解析を試みた。この際血管が蛍光ラベルされた様々な遺伝子改変マウスを用いること、および以前自身で開発した RVDМ 法を駆使することで、この生きたマウスの生体内の動脈系および静脈系を非侵襲に明確に分別し、その中を移動する赤血球の酸素結合度を第3次高調波発生により検出した。またその際、赤血球から放出される自家蛍光と明確に区分するために、蛍光寿命計測も組み合わせ計測したことで、THG の強度の変化が明確に生じることを確認した。現在、毛細血管網のどこでこの酸素放出がおこなわれているのか、直接計測しており、また酸素放出が促進されると考えられる生体分子や薬物などを局所微小注入と組み合わせることで、より厳密な酸素放出場所と機構を明らかにするための基盤が完成している。

3. 今後の展開

これらにより今まで誰も証明できなかった生体内での真の酸素交換の計測およびボーア効果の検証などが実測値を伴って考察できる。特に pH および温度の変化を、生体内在分子 NADH の自家蛍光を高速蛍光寿命計測することで、pH の絶対値が導出できることより (Chem. Soc., 2011)、生体のどこでも非侵襲に計測可能となる。これらの結果が取得できれば、動的に変動する運動時の酸素交換や脳機能活性化に伴い局所に上昇する酸素放出の機構を明確に捉える方法となり得る。そのため上記の実験に筋肉の局所電気刺激もしくは体性感覚刺激を組み合わせることで、筋肉の活動量と酸素供給の変動もしくは脳活動と局所の酸素交換の数値化をすることが可能となり、動的に変動する局所の環境と酸素交換の一般化および定式化を目指すことが可能となる。また低酸素状況であると考えられている癌組織特異的な代謝活動制御や、代謝亢進の検出により1細胞レベルでがん細胞の同定や境界領域の検出など臨床治験として利用できる可能性がある。これらは将来の展望として、局所の動的な生体恒常性や全身性に拮がる生体恒常性の機構を理解するための第一歩となるとも考えている。それによって、

- 酸素生命学の開拓
- 栄養供給と単一細胞代謝活動の関係を理解 (局所生体恒常性維持機構)
- 血管を介したホルモン放出などの生体組織・多臓器間シグナル伝達の解明などに将来繋がると考えている。

4. 自己評価

これまで生体内の酸素動態を捉えることは非常に困難であり、時間平均とマクロスコピックな方法でしか議論できなかった。本研究よりこれまでの方法論と比較しても時空間解像が数桁向上

し、単一細胞レベルの活動と酸素濃度の変動を捉えられる世界で初めての方法論を確立した。これにより上述した、酸素生命学、局所生体恒常性維持機構の解明といった生命の根源に迫る研究に対して、直接アプローチする手段を入手した。また医療応用として1細胞レベルでがん細胞の同定や境界領域の検出など、高齢化社会における実用的な医療応用として利用できる可能性も包埋されている成果を得られたと考察する。

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:6件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

主な学会発表(17 件)

- i. Naoki Honkura Intravital imaging analysis for the substance discharge in microcirculation using noninvasive and nonlinear optical microscopy
Gordon Research Conference (GRC) 2/21/2020
- ii. Naoki Honkura, Lena Claesson-Welsh, Tetsumei Urano 非侵襲・非線形光学顕微鏡を用いた微小循環における物質放出の解明
第97回日本生理学会大会大分 2020年3月18日
- iii. 本藏直樹 血管物質交換によって駆動される生体内細胞活動の定量イメージング解析
第44回日本分子生物学会年 2021年12月1日
- iv. 本藏直樹 生体内タンパク質の超高速立体構造変動検出のための新論
第95回日本生化学会大会 2022年11月11日

受賞

第6回血管生物医学若手研究会 血管生物医学若手優秀賞 2020/11/21