The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Intravital Imaging of Osteoclast Dynamics using Rationally Designed Small Molecule Probes
Author(s)	前田, 拓樹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55943
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　前田　拓樹　）	
論文題名	Intravital Imaging of Osteoclast Dynamics using Rationally Designed Small Molecule Probes (機能性小分子プローブを用いた破骨細胞動態の生体内イメージング)

論文内容の要旨

Intravital imagingとは、生体内における細胞動態を直接顕微鏡で検出するイメージング手法である。細胞培養や組織切片を利用したイメージング手法とは異なり、細胞移動、細胞間相互作用等を、生きたままの組織中で解析することが可能である。Intravital imagingで使用される二光子励起顕微鏡は、蛍光団を通常の2倍の波長で励起可能であり、高い生体透過性、三次元画像の取得、自家蛍光の抑制など、in vivoイメージングに最適な特徴を有し、蛍光タンパク質や小分子プローブを蛍光団として、生体内の一細胞動態を詳細に解析可能である。蛍光タンパク質は、遺伝子工学による特定の細胞・細胞小器官への導入が可能であるため、組織中の特定細胞を標的としたイメージング実験系が多数報告されている。一方、小分子プローブは、多彩な化学的な修飾が可能で、遺伝子工学的手法を用いずに、細胞活性を評価可能であるという大きな利点を有する。しかしながら、蛍光タンパク質とは異なり、細胞選択性が低く、in vivoにおいて特定の細胞を標的としたイメージングが不可能という問題があった。そのため、小分子プローブのintravital imagingへの応用例は、ごく少数例に限られているのが現状である。

本研究では、小分子プローブを使って、生体中の特定の細胞活性を検出するためのイメージング手法を確立した。小分子プローブに標的細胞が存在する特定の組織への選択的輸送能を付与し、最適な蛍光スイッチ機能を設計することで、標的細胞の活性を選択的に可視化可能であることを示した。また、蛍光タンパク質により標的細胞をラベル化し、小分子プローブと蛍光タンパク質の蛍光シグナルを同時に検出することで、細胞の局在変化と活性変化のリアルタイム解析に成功した。この手法を用いて、本研究では、骨吸収細胞である破骨細胞の活性を生体内で検出可能な小分子プローブの開発を行った。

本博士論文は、以下の二章から構成されている。第一章では、生体内破骨細胞の活性化を可視化するプローブの開発について述べる。破骨細胞は活性化時に酸性領域を形成し、骨を溶かす。そのため、酸性条件下で蛍光ONとなるスイッチ機能を持った小分子プローブを、骨表面上に送達することによって、生体内破骨細胞活性を検出可能であると考えた。そこで、骨組織に対して高いアフィニティーを有するビスホスホネート基に着目し、ビスホスホネート基による能動輸送能を有する光安定性の高いpH感受性プローブ”**pHocas**”（**pH**-activatable fluorescence probe for **o**steo**c**last **a**ctivity **s**ensing）をデザイン・合成した。破骨細胞自身を蛍光タンパク質によってラベル化し、**pHocas**で破骨細胞の活性化を検出することで、intravital imagingによる細胞動態のリアルタイム解析が可能となった。また、光安定性の高い色素母骨格を用いることによって、二光子励起顕微鏡観察下において、長時間に渡り破骨細胞活性を可視化可能であることを示した。長時間の破骨細胞動態を解析することによって、骨吸収中の破骨細胞には、①酸性領域が動かず、motilityの低い細胞と、②酸性領域が動く、motilityの高い細胞の2種類が存在することを明らかにし、破骨細胞の骨吸収メカニズムについて、新たな知見を得た。

第二章では、破骨細胞イメージングへの応用が可能な赤色蛍光pH感受性蛍光プローブを開発した。長波長蛍光波長を有するプローブを開発することによって、生物学実験で汎用される緑色蛍光タンパク質（GFP）を破骨細胞に導入した遺伝子改変モデルが使用可能となる。既に開発された多数のGFP導入型マウスが使用可能となることから、既存の実験系に、プローブを組み込むだけで、新たな実験系を比較的短時間で構築可能になると考えた。そこで、第一章で開発したプローブを基に、π共役系を伸ばしたプローブ”**Red-pHocas**”を合成した。アニリン誘導体の構造を理論計算により最適化することで、破骨細胞のイメージングに最適なpH感受性を付与可能であることを明らかにした。また、アニリン構造の種類によって、骨表面上における蛍光強度が変化することを示し、破骨細胞イメージングに最適な光学特性を有するプローブを開発した。

結論において、以上の成果を総括し、今後の展望について記した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　前田　拓樹　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	菊地　和也
	副 査	教授	伊東　忍
	副 査	教授	大政　健史
	副 査	教授	高井　義造
	副 査	教授	渡部　平司
	副 査	教授	兼松　泰男

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、生体内pH変化に応答して蛍光強度が変化する小分子蛍光プローブの開発について述べている。従来の小分子プローブを用いたバイオイメージング技術は、培養皿上の細胞機能を解明するために使用されているものの、動物体内における細胞動態の検出に応用することは困難であった。この問題点を解決するため、本博士論文では能動的標的指向性（アクティブターゲッティング能）に着目し、動物体内へのプローブ投与後に、観察したい生体組織へと特異的に送達されるような分子構造をデザインした。この蛍光プローブと二光子励起顕微鏡を用いたintravital imaging技術を組み合わせることによって、骨吸収細胞である破骨細胞機能を、生体内で詳細に解明することに初めて成功している。本論文は、第一章、第二章、結論および展望から構成されており、以下に本論文の成果を要約する。

第一章では、生体内破骨細胞の活性化を可視化するプローブの開発について述べている。破骨細胞は活性化時に酸性領域を形成し、骨を溶かす。そのため、酸性条件下で蛍光ONとなるスイッチ機能を持った小分子プローブにより、破骨細胞活性を検出可能である。プローブを骨組織へと選択的に送達するため、骨組織に対して高いアフィニティーを有するビスホスホネート基に着目し、アクティブターゲッティング能を有する光安定性の高いpH感受性プローブ”pHocas”（pH-activatable fluorescence probe for osteoclast activity sensing）をデザイン・合成した。破骨細胞自身を蛍光タンパク質によってラベル化し、pHocasで破骨細胞の活性化を検出することで、intravital imagingによる細胞動態のリアルタイム解析が可能となった。また、光安定性の高い色素母骨格を用いることによって、二光子励起顕微鏡観察下において、長時間に渡り破骨細胞活性を可視化可能であることを示した。リアルタイム破骨細胞動態イメージングから、骨吸収中の破骨細胞には、①その場に留まって酸性領域を形成する細胞と、②細胞の形を変えながら酸性領域の場所を刻々と変化させる細胞がいることを明らかにした。

第二章では、破骨細胞イメージングへの応用が可能な赤色蛍光pH感受性蛍光プローブを開発した。長波長蛍光波長を有するプローブを開発することによって、破骨細胞の異なる部位に、異なる色の蛍光タンパク質（緑色蛍光タンパク質など）を導入した遺伝子改変モデルが使用可能となる。これにより、様々なモデルマウスに対して、細胞活性の評価が可能な実験系を比較的短時間で構築可能となる。そこで、第一章で開発したプローブを基に、π共役系を伸ばしたプローブ”Red-pHocas”を合成した。プローブ構造を理論計算により最適化することで、破骨細胞のイメージングに最適なpH感受性を付与した。人工的な骨組織モデル上において、pH感受性を評価したところ、アニリン構造の種類によって、骨表面上における蛍光強度が異なることを明らかにし、Red-pHocasが破骨細胞イメージングに最適な光学特性を有することを明らかにした。

以上のように、本論文は従来では不可能であった生体内破骨細胞動態を、小分子プローブを使って詳細に解明することに成功している。破骨細胞機能は、骨粗しょう症などの骨疾患の関連が指摘されていることから、治療薬の開発に大いに貢献できると期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。

様式 8

最終試験の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　前田　拓樹　）		
最終試験担当者	職　名	氏　名
	主 査　教授	菊地　和也
	副 査　教授	伊東　忍
	副 査　教授	大政　健史
	副 査　教授	高井　義造
	副 査　教授	渡部　平司
	副 査　教授	兼松　泰男
	副 査	

最終試験の結果の要旨

本学学位規程第１０条の規定により、学位申請者に対して学位論文を中心とし、論文内容及びこれに関連のある科目について試問を行い、審査委員全員の協議の結果、平成28年　2月12日合格と判定した。