

破骨細胞の活性化を可視化する pH 感受性プローブの開発

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻
ケミカルバイオロジー領域 菊地研究室

前 田 拓 樹

緒言

我々の骨組織では、破骨細胞と骨芽細胞による骨破壊と骨形成が繰り返し行われている。この骨再構築メカニズムは損傷や老朽化した組織を除去し、新たな組織を形成するための重要な役割を果たしている。しかし、破骨細胞による骨吸収は、骨の恒常性を維持する上で必須であると同時に、様々な骨疾患の原因となることが指摘されている¹⁾。例えば骨粗しょう症は、骨破壊が過剰に働くことにより引き起こされる(図1)。破骨細胞機能の解析は骨疾患の原因解明や新薬の開発に繋がることから、近年、生体内における破骨細胞活性の時空間的解析を可能とする新たな手法が求められている。生体中の細胞活動を可視化するための手法として、蛍光を有する有機小分子を用いた蛍光イメージング法が汎用されている。蛍光性の有機小分子の利点としては、特定の条件において、蛍光のOFF/ONを切り替えるスイッチ機能を付与することにより、生理活性物質の微小な濃度変化や細胞内環境変化を非常に高感度で検出可能であることが挙げられる。我々は本研究において、このような機能性蛍光プローブを用いた破骨細胞活性のイメージング法の確立を目的としている。

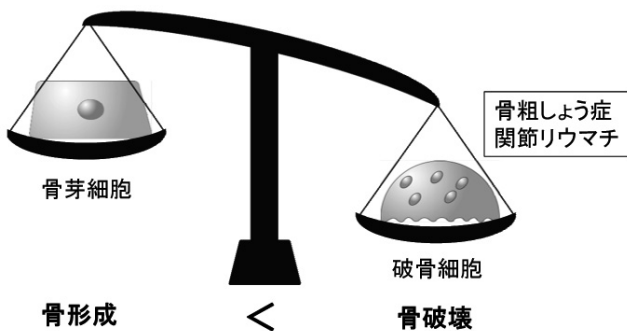


図1. 骨形成と骨破壊のバランス

破骨細胞活性の検出概念

活性化状態での破骨細胞では、骨表面側の細胞膜に多数のプロトンポンプが発現しており、骨表面上にpH4.7-6.8程度の酸性領域が形成される²⁾。低pH環境下では骨組織の主成分であるヒドロキシアパタイトの溶解が引き起こされるため、骨破壊を行うことが可能となる。機能性小分子蛍光プローブの開発にあたり、我々はこの酸性領域に着目した。酸性領域の形成は骨破壊時にのみ生じる。そのため、骨表面上のpHの低下により蛍光を発するスイッチ機能を導入することで、破骨細胞が活性化する瞬間を可視化可能であると考えた(図2)。

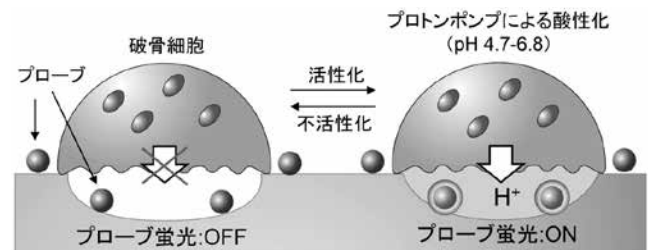


図2. 破骨細胞活性の検出概念

BODIPY色素を母骨格に有するpH感受性蛍光プローブ

生体内の破骨細胞活性を可視化する小分子蛍光プローブを設計する上で、①蛍光団、②pH依存的な蛍光スイッチ機能、③骨組織へのプローブ送達機能の3つが必要となる。我々は蛍光団としてBODIPY色素を採用した。BODIPY色素はシャープなスペクトル形状を有し、分子周辺の環境変化に対して蛍光特性が変化しないことから生体イメージングに適した色素である。現在までに、我々はこのBODIPY色素を母骨格に有するpH感受性蛍光プローブ“BAp-E”を開発している(図3)³⁾。このプローブは、光誘起電子移動(PeT)によるpH応答性を有する。中性条件下では電子供与体であるアニリン誘導体から、電子受容体

である BODIPY 色素への電子移動によって蛍光が消光する。一方、酸性条件では、アニリン誘導体がプロトン化され、電子移動の抑制により蛍光が回復する。このシステムによって、酸性条件下において蛍光強度が増大するスイッチ機能を付与可能である。しかし、細胞内には破骨細胞以外にも酸性領域を形成する細胞が存在することから、破骨細胞近傍の酸性領域のみを選択的に可視化するシステムが必要である。そこで我々は、ヒドロキシアパタイトに対して特異的なキレート効果を示すビスホスホネート基に着目した。アレンドロネートやパミドロネートといった骨粗しょう症の治療薬にも、ビスホスホネート基が含まれており、骨組織に対して特異的な結合を示すことが報告されている。そのため、この官能基を導入することにより、プローブを生体内の骨組織表面に固定化可能となり、破骨細胞の活性化を可視化可能であると考えられた。

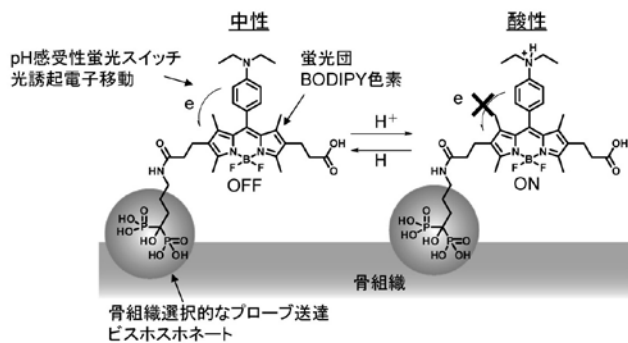


図 3. BAp-E の構造と機能

BODIPY 色素の光安定性

実際に BAp-E を用いて生体イメージングを行うと、励起光照射下において BODIPY 色素が顕著な退色性を有することが明らかとなった。蛍光顕微鏡を用いて長時間に渡り破骨細胞活性を観察する際には、数十分間励起光を連続して照射する必要がある。そのため、プローブの光安定性が低い場合には、時間の経過とともに画像の鮮明さが失われ、満足のいく解析が行えない。この BODIPY の分解の原因として、二つの経路が報告されている。一つは酸性条件下における分解反応であり、BODIPY からホウ素の脱離によって分解が起こることが報告されている (図 4a)⁴⁾。もう一つは、一重項酸素による分解反応である。BODIPY 色素を励起すると、励起一重項状態からの系間交差によって少数の励起三重項状態の色素が生成する。三重項状態の色素は溶存酸素の衝突に伴うエネルギー移動

により、反応性に富んだ一重項酸素を形成する。この一重項酸素が BODIPY 色素と反応することで、退色が引き起こされる (図 4b)⁵⁾。BAp-E についてもこのような分解反応が進行していると考え、①酸性条件下におけるプローブの安定性と②無酸素条件下でのプローブの光退色に関して検討を行った (図 5)。その結果、酸性条件下においてプローブの蛍光強度がほとんど変化しないことが確認された。一方で、無酸素条件下ではプローブの光安定性が向上することが明らかとなった。この結果より、プローブの安定性は一重項酸素と色素の反応に依存すると示唆された。

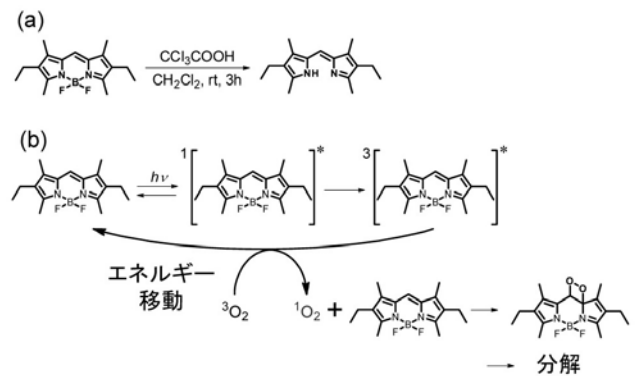


図 4. BODIPY の分解経路. (a) 酸性条件下での分解. (b) 一重項酸素による分解

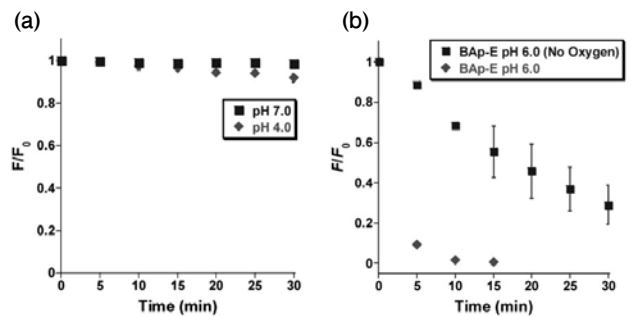


図 5. (a) pH 4 および pH 7 における BAp-E の蛍光強度変化 (b) 光連続照射下 (5 mW/cm²) での BAp-E の蛍光強度変化

光安定性の高いプローブ開発

顕微鏡観察中の安定性を向上させるためには、プローブと一重項酸素の反応を抑制する必要があった。一重項酸素は電子豊富な BODIPY 色素と [2+2] 環状付加反応を引き起こすことが報告されている。そのため、BODIPY 色素の電子密度が低下すれば、一重項酸素と BODIPY の反応が抑制されると考えられる。このような考えに基づき、BODIPY 色素に新たに電子求引基であるアミド基を導入し、アニリン誘導体の構造を最適化した“pHocas-3”を考案した。

電子求引基の導入は BODIPY 色素の電子状態を変化させることから、PeT による適切な pH 感受性を付与するためにはアニリン誘導体の最適化が必須である。pHocas-3 に以前のプローブと同等の pH 感受性を付与するためには、① Rehm-weller 式から求められる電子移動の自由エネルギー変化量が等しいこと、② プローブの pK_a が 6.0 前後であることが要求される。そこで、量子化学計算によってアニリン誘導体と BODIPY 色素のエネルギー準位を算出し、条件を満たすようなアニリン誘導体の検討を行った (図 6)。BAp-E の ΔG を算出したところ、 -0.2 eV となることが明らかとなった。pHocas-3 について様々なアニリン誘導体の検討を行ったところ、N-ethyl-methyl-o-toluidine を誘導体として導入した場合に、 ΔG と pK_a が BAp-E と同じ値となることが判明した。

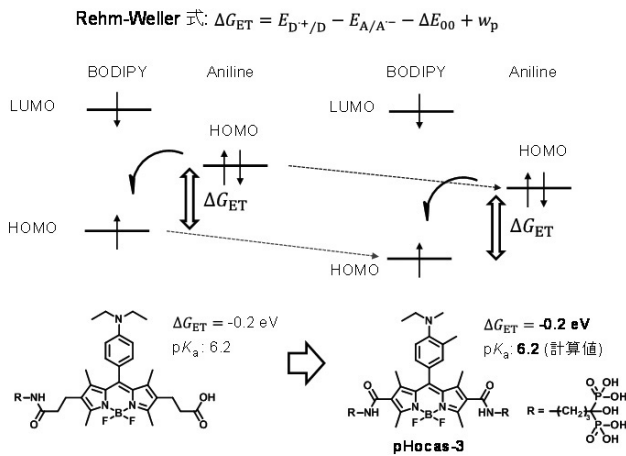


図 6. pHocas-3 の構造と量子化学計算によるアニリン誘導体の最適化 (エネルギー準位: B3LYP/6-31G(d), pK_a : SPARC)

プローブ合成、物性評価

設計したプローブの合成を行い、蛍光スペクトルを測定した。その結果、pH の低下と共に pHocas-3 の蛍光量子収率が増大し、その pK_a が 6.1 であることが明らかとなった (図 7)。この値は、破骨細胞の酸性領域 (pH 4.7-6.8) に対して適切な値であると考えられる。また、pHocas-3 の蛍光量子収率は BAp-E と比較して約 2 倍であるため、酸性領域をより鮮明に可視化可能であると考えられた。つぎに光照射下における pHocas-3 の光安定性について評価した。5 mW/cm^2 の光をプローブ溶液に対して 30 分間連続的に照射したところ、pHocas-3 の蛍光強度は、ほとんど減少しないことが確認された (図 8a)。また、一重項酸

素発生剤を用いて、500 μM の一重項酸素とプローブを反応させ、そのときの蛍光強度変化を測定した (図 8b)。その結果、BAp-E と比較して、pHocas-3 は蛍光強度減少が抑制されることが明らかとなった。この結果より、pHocas-3 の高い光安定性は、電子密度の低下による一重項酸素との反応性の減少に起因すると考えられる。

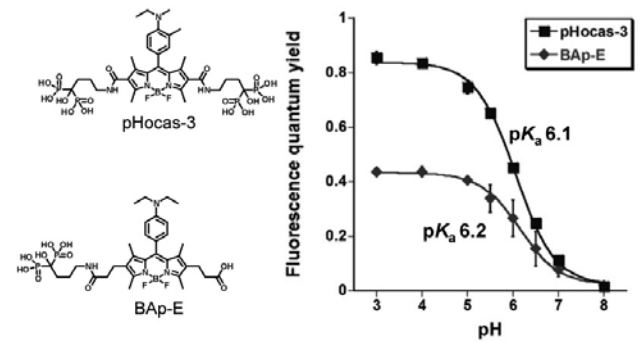


図 7. pHocas-3 の蛍光特性

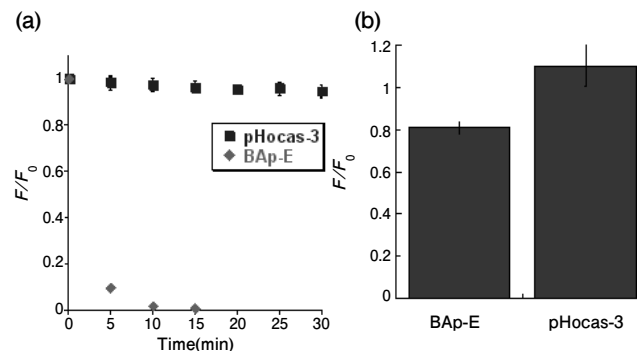


図 8. (a) 光連続照射下 ($5 \text{ mW}/\text{cm}^2$) での pHocas-3 の蛍光強度変化 (b) 500 μM の一重項酸素とプローブの反応後の蛍光強度変化

二光子励起顕微鏡を用いたイメージング

開発したプローブを使って、マウス体内における破骨細胞活性の二光子励起顕微鏡による可視化を行った。投与するプローブはビスホスホネートの効果によって、骨表面状に選択的に結合しているため、破骨細胞が活性化している場所では、骨表面上にプローブ由来の蛍光が確認できると期待される。pHocas-3 をマウスに投与したところ、活性化状態の破骨細胞近傍からプローブ由来の蛍光が確認された (図 9)。また、60 分間に渡って連続的に破骨細胞活性イメージングを行ったところ、顕微鏡観察中に光退色に伴う蛍光強度の減少は確認されず、二光子励起顕微鏡の強いレー

ザー照射下においても、pHocas-3はその蛍光強度を維持できることが明らかとなった。このように、電子求引基を導入した pHocas-3 を用いることで、長時間に渡る生体内の破骨細胞活性の追跡に初めて成功した。

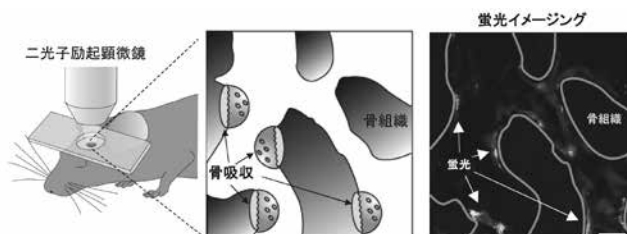


図 9. マウス体内の破骨細胞イメージング
(励起波長：940 nm, 蛍光波長：500-550 nm)

結言

本研究では、生体内における破骨細胞活性イメージングを可能とする pH 感受性蛍光プローブの開発を行った。BODIPY 色素に電子求引基を導入することにより、一重項酸素との反応性が低下し、飛躍的な光安定性の向上に成功した。また、マウスにプローブを投与し、破骨細胞イメージングを行ったところ、pHocas-3 は破骨細胞活性を選択的に可視化可能であることが示された。さらに顕微鏡の励起光照射下において安定であることが判明し、破骨細胞活性の長時間イメージングに初めて成功した。今後、生体内での破骨細胞動態解析に本プローブが応用され、複雑な免疫系における細胞機能の解明につながることを期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻物質生命工学コース ケミカルバイオロジー領域・菊地和也教授に深く感謝致します。また、実験の際に直接ご指導頂きました小和田俊行特任助教、遺伝子改変マウスの準備や二光子励起顕微鏡での測定などで大変お世話になりました大阪大学大学院医学系研究科免疫細胞生物学教室の石井 優教授、菊田順一博士に深く感謝いたします。

<参考文献>

- 1) Kikuta, J.; Ishii, M. *Rheumatology*, 2013, 52, 226
- 2) Teitelbaum, S.L. *Science*, 2000, 289, 1504
- 3) Kowada, T.; Kikuta, J.; Kubo, A.; Ishii, M.; Maeda, H.; Mizukami, S.; Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 17772
- 4) Yang, L.; Simionescu, R.; Lough, A.; Yan, H. *Deys Pigms.* 2011, 91, 264
- 5) Soumyaditya Mula, S.; Ray, A. K.; Banerjee, M.; Chaudhuri, T.; Dasgupta, K. and Chattopadhyay, S. *J. Org. Chem.* 2008, 73, 2146



同研究室において、博士後期課程へ進学
引き続き、骨代謝関連細胞の機能解明を目指したプローブ開発に従事している。

(応化 平成 23 年卒 生命先端 25 年前期)