

200400202B

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

超極限分子プローブによる組織障害の
再生・治癒機構の解析と
高精度局所診断技術の開発

(H14-ナノ-018)

平成14～16年度 総合研究報告書

主任研究者

南 谷 晴 之

平成17（2005）年3月

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

超極限分子プローブによる組織障害の
再生・治癒機構の解析と
高精度局所診断技術の開発

(H14-ナノ-018)

平成14～16年度 総合研究報告書

主任研究者

南 谷 晴 之

平成17（2005）年3月

目 次

I. 総合研究報告	
超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と 高精度局所診断技術の開発 1
	南谷晴之
II. 公開シンポジウム要旨集	
1. 公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」 113
2. ナノメディシン公開シンポジウム「ナノバイオイメージングで切り開く先端的 生体機能解析ー血管炎と微小循環血流障害における分子生理機能を解き明かすー」 155
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 179
IV. 研究成果の刊行物・別刷各年度の報告書に添付

厚生労働科学研究費補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業
総合研究報告

課題名：超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析
と高精度局所診断技術の開発

主任研究者：所属施設：慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻 教授
氏名：南谷晴之

分担研究者：所属施設：国立感染症研究所生物活性物質部 室長
氏名：鈴木和男
所属施設：国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 部長
氏名：川西 徹
所属施設：東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授
氏名：新井孝夫
所属施設：独立行政法人国立病院機構埼玉病院 副院長
氏名：関塚永一
所属施設：産業技術総合研究所光技術研究部門 主任研究員
氏名：真島利和
所属施設：東京大学大学院薬学研究科 教授
氏名：船津高志
所属施設：千葉大学大学院医学研究院免疫発生学教室 教授
氏名：中山俊憲
所属施設：東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
氏名：田之倉優
所属施設：理化学研究所ゲノム科学総合研究センター 上級研究員
氏名：村松知成
所属施設：産業技術総合研究所光技術研究部門 主任研究員
氏名：松村英夫
所属施設：国立国際医療センター研究所 副所長
氏名：山本健二
所属施設：東京女子医科大学総合研究所研究部 助教授
氏名：霜田幸雄

研究協力者：

鈴木弘美（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）、塚田孝祐（慶應義塾大学医学部医化学教室）、朽津和幸（東京理科大学理工学部応用生物科学科）、大幡久之（昭和大学薬学部薬理学教室）、大川原明子、長尾朋和（以上、国立感染症研究所）、高橋啓、大原関利章、直江史郎（以上、東邦大学医学部病理学教室）、長谷川明洋、村田薫（以上、千葉大学大学院医学研究院免疫発生学教室）、三浦典子、大野尚仁（以上、東京薬科大学薬学部）、山岸舞（東京大学大学院薬学研究科）、村山研、黒岩憲二（以上、東京理科大学理工学部応用生物科学科）、湯本史明、胡芳宇、金森陽子（以上、東京大学大学院農学生命科学研究科）、星野昭芳、真鍋義則、藤岡宏樹、塩原あまね、桑原三佳子（以上、国立国際医療センター研究所）

研究要旨

本研究「超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と高精度局所診断技術の開発」では、ナノプローブ技術、ナノバイオイメージング技術、細胞組織の分子生理機能の研究に秀でた研究グループを組織し、生体の恒常性破綻に起因する種々の細胞組織障害と再生治癒機構の解明を目指して研究を推進した。第1に新規に開発した FRET 型 GFP 変異体、Cd-Se を基材とする量子ドット、カチオン性リポソーム付加蛍光標識モノクローナル抗体、磁気ナノ粒子を包含するリポソーム粒子などの超極限分子プローブ（ナノプローブ）と高効率蛍光・燐光プローブを用いて組織・細胞の分子標識を可能にした。第2にこれら複数の異なるナノプローブの発光現象を利用したマルチカラーイメージングや1分子蛍光イメージング、高感度高速度イメージング、軟X線顕微鏡イメージングなど、新たな生体情報を提供するイメージング技術の開発を行った。第3にこれら物理的・生化学的作用に基づく分子認識機構を有する各種ナノプローブを用いて、細胞構築・細胞機能のイメージング解析を行うとともに、生体内で起こる血管炎や微小循環障害によって誘発される種々の組織・細胞障害のメカニズムや細胞死のメカニズムを分子・細胞レベルで解析するとともに、障害からの再生・治癒過程に関する分子機序を局所的に解析し診断治療へ応用する、いわゆる Translational Research を展開した。主な研究項目は、1)超極限分子を骨格とするナノ粒子プローブの開発と応用、2)高感度高速度バイオイメージング技術の開発と応用、3) 複数の異なるナノプローブの発光現象を利用する多波長励起マルチフォトリックイメージングシステムの開発と応用、4)組織細胞内の分子生理機能の時空間的計測・解析技術の開発と応用、5)糖尿病性細小血管障害・脳血栓など特異的な血流ダイナミクスのイメージング解析と薬理効果の評価、6)腎炎・関節炎など炎症反応における特異的蛋白分子作用と易血栓性の解析、7)腫瘍新生血管の光化学反応に基づく血流遮断効果や糖尿病性微小循環における血管閉塞・血栓形成の解析と診断治療への応用、8)血管内皮細胞と白血球・血小板間相互作用における分子生理機能の解析、9)肝細胞・神経細胞のマルチカラーイメージングと分子機能解析、10)腫瘍細胞・神経細胞などにおけるアポトーシス・細胞死に関わるタンパク質・酵素の作用機序の解析、などである。また、病態に対する促進・抑制分子機能や薬理効果の解析評価を行い、Translational Research の一環として臨床診断治療への応用展開をはかることを目的として遂行した。ナノメディシン分野は、今後発展の一途を辿るものと予測され、本研究の成果は、今後、臨床の現場で活用される実用的な診断治療技術および医療機器へ展開されるシーズを作り出したといえる。

A. 研究目的

本研究では、種々の細胞組織障害と再生治癒機構の解明を目指して、*in-vivo*、*in-situ* ならびに *in-vitro* 系で形態変化のみならず分子生理機能変化を時空間的な可視情報としてとらえるためのナノプローブ技術、ナノバイオイメージング技術の開発を行い、各種蛍光・燐光ナノプローブを用いて生体内で起こる血管炎や微小循環障害による細胞組織障害の発現メカニズムを分子・細胞レベルで解析する

とともに、その障害からの再生治癒過程に関する分子機序を局所的に解析し、診断治療へ応用展開する Translational Research を目的とした。本研究では特に、蛍光・燐光発光分子、量子ドットなどの超極限分子プローブを用いて、生体内で起こる血管炎や微小循環障害によって誘発される種々の組織傷害や細胞傷害のメカニズムを分子・細胞レベルで解析・診断する超高感度イメージング技術を開発するとともに、その障害の発現メカニズムと障害

からの再生・治癒過程に関する分子機序を局所的に解析した。また、酸化ストレスが恒常性の破綻に伴う活性酸素亢進や消去系の機能低下で活性酸素種の蓄積、より反応性の高い活性酸素種の生成が起こり、直接・間接的に微小循環障害に深く関わることから、生体の内因性あるいは外因性因子によって活性酸素の処理が不十分な状態になるために生じる酸化ストレスに関して、ラット・マウスの微小循環を対象に光化学反応に基づく酸化ストレス付加モデルと虚血再灌流モデルを構築し、実質臓器内での酸化ストレスと微小循環障害の関係を各種蛍光・燐光ナノプローブのマルチフォトンイメージング技術を駆使して解析した。研究項目は、1)複数の異なるナノプローブの発光現象を利用する多波長励起マルチフォトンイメージングシステムや新規の密着型フラッシュ軟X線顕微鏡の開発と応用、2)組織細胞内の分子生理機能の時空間的計測・解析技術の開発と応用、3)虚血再灌流傷害における血管内皮細胞と血小板・白血球の相互作用の解析、4)糖尿病性細小血管障害・脳血栓など特異的な血流ダイナミクスのイメージング解析と薬理効果の評価、5)腫瘍等新生血管の構築と光化学反応に基づく血栓形成・血管閉塞・血流遮断効果の解析と診断治療への応用、6)腎炎・関節炎など炎症反応における特異的蛋白分子作用と易血栓性の解析、7)培養血管内皮細胞と白血球・血小板間相互作用における分子生理機能の解析、8)肝細胞・神経細胞のマルチカラーイメージングと分子機能解析、9)腫瘍細胞・神経細胞などにおけるアポトーシス・細胞死に関わるタンパク質・酵素の作用機序の解析、などである。また、病態に対する促進・抑制分子機能や薬理効果の解析評価を行い、臨床診断治療への応用展開をはか

ることを目的として研究を遂行した。

B. 研究方法

蛍光ナノプローブの開発と利用：

① 数種の蛍光・燐光プローブを同時に生体組織・細胞中に投与して、種々の細胞・組織内の分子生理機能や微小血管中の血球細胞の動態をナノ・マイクロレベルで可視化解析した。組織微小血管内の血行動態を可視化解析するために、FITC-dextran (励起波長 488nm、蛍光波長 520nm) 20mg/ml を iv 投与し、血漿成分の流動現象を可視化して、全血血流動態の定量化を行った。また、赤血球の流速を測定するために、予め、循環赤血球の約 5% を採血し、これを体外で蛍光プローブ FITC (励起波長 488nm、蛍光波長 520nm) で *ex-vivo* 標識した後、返血し、顕微鏡下で微小血管を流れる個々の蛍光標識赤血球の流動現象を可視化した。白血球の可視化にはアクリジンオレンジ (励起波長 430nm、蛍光波長 530nm) 0.5mg/kg を iv 投与し体内染色するか、ローダミン 6 G (励起波長 514nm、蛍光波長 590nm) 50µg/ml で *ex-vivo* 標識して、微小血管内の白血球のローリングや粘着数を可視化計測した。一方、血小板の可視化には CFSE (励起波長 494nm、蛍光波長 520nm) かローダミン 6 G を iv 投与・体内染色するか、CFDASE で *ex-vivo* 標識して、微小血管内の流動、血小板血栓生成動態を可視化評価した。他に蛍光標識したミクログリアの網膜・脳神経浸潤と傷害細胞死抑制効果のマーカとしての可能性を検討した。

② 量子ドットは Cd・Se ナノ粒子をホットソープ法で合成し、有機酸、シロキ酸、アミンなどで表面加工、その官能基に核酸、蛋白、オリゴペプチドを tagging させ、Vero 細胞やリンパ T 細胞のエンドソームマーカとして活

用するとともに、ライソゾームや細胞質への伝達、アダプター分子とシグナルペプチドの結合により安定に核やミトコンドリアに局在化させ可視化することに使用した。量子ドットの安全性について MTT アッセイとコメットアッセイの二法で検討した。メルカプトウリデカン酸とメルカプトグリセロールの表面加工の違いにより、同じナノ粒子でも生物毒性の有無があり、安全な物質、毒性のある物質ともに製造可能であることが判明した。各種臓器における量子ドットの蓄積性・排泄能についてもイメージング法によって評価した。

③ 異なる 2 種の GFP 変異体の間にペプチド配列基質を挿入した FRET 型 GFP を作製、チロシンリン酸化や Caspase 活性を可視化し細胞死の評価に使用した。細胞死のシグナル伝達メカニズムであるカスパーゼカスケードを FRET 現象のマルチカラーイメージングで解析する 2 種の蛍光タンパクプローブを作製した。シグナル伝達の上流で働くイニシエーターカスパーゼ (IC) と下流で働くエフェクターカスパーゼ (EC) によって切断されるペプチド配列を挟む融合タンパク質を各カスパーゼ活性化検出用プローブとして作製した。EYFP と DsRed を用いた IC 活性化プローブ、ECFP と DsRed を用いた EC 活性化プローブを同一 HeLa 細胞に発現させ、488 nm 励起による EYFP 蛍光の上昇、458 nm 励起による ECFP 蛍光の上昇によってカスパーゼ活性化をモニターして同一細胞内で 2 種のカスパーゼ活性化の同時解析に使用した。また、Cy3 で標識した GFP やプロリン変異体 GFP を基質蛋白質の運動マーカや遺伝子発現マーカとして使用した。

④ カチオン性リポソームを付加した蛍光標識モノクローナル抗体の生細胞導入技術確立し、生存維持活性をもつアゴニスト抗体お

よび神経細胞の活性酸素傷害・細胞死のイメージングに活用した。ヒドロキシラジカルによる細胞死を抑制するモノクローナル抗体 DT-1 は、アストログリアの細胞表面抗原を認識し、アストログリアの細胞死抑制活性因子の分泌を促進する作用があることが示された。一方、微生物代謝物質ネオエキヌリン A がペルオキシナイトライトにより誘導される神経細胞死を抑制する作用を有し、ペルオキシナイトライトの消去能を有するが、NO やヒドロキシラジカルについては消去能を示さないことを明らかにした。

⑤ エレクトロマグネトケモセラピーに活用する目的で多数のリポソーム粒子を磁性粒子周囲に配す金平糖型複合微粒子 (1 μm のヘマタイト粒子表面をシリカ層コーティング処理して血清タンパク質をバインダーとする) を作製し、膜透過性・エレクトロパーミエーションや分子キャリアとしての可能性を検討、また、磁針により集積可能でパルス電場印加で細胞膜を通して薬を細胞内へ輸送する方法について検討した。

バイオイメージングシステムの開発と利用：

① 上記の血球細胞の挙動や血流動態の可視化解析には、高感度高速度 CCD ビデオイメージングシステム (Nippon Roper CR image2000、浜松ホトニクス SIT) を、血球細胞の速度計測には画像相関法を用いて行った。FITC 標識赤血球の流速計測と同時に光励起した Pd ポルフィリンからの燐光寿命より酸素分圧を計測する技術 (蛍光・燐光ナノプローブを用いたフォトニック・イメージング解析法による臓器微小血管内の血流速度・酸素分圧同時計測法) を開発し利用した。予め、対象動物に Pd ポルフィリンを iv 投与し、対象となる微小血管に励起パルス光 (Nd:YAG

laser SH、波長 532nm) を照射する。酸素濃度に依存して発光する燐光を 620nm のロングパスフィルタを介してフォトマルで光電変換し、AD 変換後にパソコンで波形処理して、燐光寿命 τ より次の Stern-Volmer 式に基づいて酸素分圧 pO_2 を求めた。

$$\tau_0/\tau = 1 + K\tau_0 pO_2$$

ここで τ_0 、 τ はそれぞれ酸素分圧が 0 および pO_2 mmHg のときの燐光寿命、 K は Stern-Volmer 定数である。図 1 は多波長励起フォトニックイメージングシステム (ニューオプト、BOPIS-1) を示す図である。これらの実験ではラットやマウスの *in-vivo* 実験系でなされた。図 2 は、病態モデルラット脳表の微小循環障害を長時間生理的に観測するために作成した直径約 4 mm の closed cranial window であり、window 内は人工髄液 (Na^+ 147.8 mEq/L, K^+ 3.0 mEq/L, Mg^{2+} 2.3 mEq/L, Ca^{2+} 2.3 mEq/L, Cl^- 135.2 mEq/L, HCO_3^- 19.6 mEq/L, lactate 1.7 mEq/L, phosphate 1.1 mM, and glucose 3.9 mM) を灌流している。Window は円形カバーガラスでラバーリングを覆い密閉してあり、生理状態が保たれる。ラット・マウスを対象にした血栓形成モデルの構築にはポルフィリン系光感受性物質と特定波長励起光の相互作用に基づく光化学反応を利用し、活性酸素産生、サイトカイン産生、酵素作用を解析した。図 3 は、病態モデルマウスの微小循環障害を慢性的に観測するために作成された dorsal skin fold chamber であり、マウス背部皮内の微小血管系の構造と血流動態が顕微鏡下で可視化できる。一方、血管障害や血栓形成に関わる血管内皮細胞 (HUVEC) と血小板・白血球の相互作用を検討するために、培養細胞を用

いた *in-vitro* 系において各種蛍光プローブを用いて細胞骨格の形態変化・細胞内分子機能変化の可視化解析および活性酸素種の同定と定量化を蛍光生体顕微鏡 (NIKON、TE-1000) やリアルタイム共焦点走査型レーザ顕微鏡 (YOKOGAWA、CSU-21) を用いて行った。活性酸素のイメージング解析には、 O_2^- には DHE、 H_2O_2 には DHF-DA、 $\cdot OH$ および $ONOO^-$ には HPF などの蛍光試薬を用いて培養血管内皮細胞に発現する活性酸素を定量化した。また、Apoptosis を含む細胞機能や分子機能の分析にフローサイトメトリー、ウェスタンブロット法などの分析法も利用した。② ナノプローブの細胞・組織内の局在性・機能性を可視化し、細胞機能・組織障害を解析するためにマルチカラーイメージングシステムおよび高速度高感度イメージングシステムを用い、肝細胞や心筋細胞の Ca 動態、Caspase 活性、ミトコンドリア膜電位変化の同時可視化に成功した。蛍光特性の異なる 2 つの GFP 変異体の間にカスパーゼ 3 の基質となるペプチド配列 (カスパーゼ 3 由来の配列 (LDCGIETDSGVD)) を挿入した融合タンパク質をカスパーゼ活性検出プローブとして作製した。GFP 変異体としては CFP, GFP, YFP, DsRed2 から 2 種の組み合わせを選択することにより、蛍光特性の異なる 6 種のカラーバリエーション、CFP-GFP (CG), CFP-YFP (CY), GFP-YFP (GY), CFP-DsRed2 (CR), GFP-DsRed2 (GR), YFP-DsRed2 (YR) のものを作製したが、さらに N 末端に核局在性シグナル、ミトコンドリア局在性シグナル、および小胞体局在性シグナルを付加した融合タンパク質の発現プラスミドを作製した。以上のタンパク質を HeLa 細胞に発現し、主に LSM510 (Carl Zeiss) を用いて、それぞれ表 1 に示した波長につい

てマルチスキャンモードでイメージングを行った。カスパーゼの活性化は蛍光強度比の変化として検出される。画像処理、データ解析には MetaFluor (Universal Imaging) を用いた。

表 1 LSM510 測定条件

probe color	excitation (nm)	emission (nm)	
		donor	acceptor
CG	458	467.5-497.5	515-545
CY	458	467.5-497.5	515-545
GY	458	475-515	515-545
CR	458	467.5-497.5	560-615
GR	488	505-530	560-615

③ 細胞内 Ca^{2+} 応答, pH_i 変化及び NO 産生のマルチカラーイメージングでは ddY 系雄性マウス (5~8 週齢) から内皮細胞を傷つけないように注意しながら、胸部大動脈を摘出し、周囲に付着している脂肪組織を取り除いた後、血流方向に沿って切り開いた。 Ca^{2+} 蛍光指示薬として fluo-4/AM を負荷した組織片を自作の平行平板型チャンバーに固定し、シリンジポンプから任意の流速で Krebs-Henzeliet-HEPES 溶液を灌流することによりシエラストレスを負荷した状態で、血管組織片の蛍光画像を取得した。顕微鏡には、従来の共焦点顕微鏡と比較して、焦点面のみを効率よく観察できレーザーによる細胞傷害や蛍光指示薬の消光が少ない、多光子励起レーザー走査型顕微鏡システム (Bio-Rad, RTS2000-MP) を用いて、780 nm の多光子励起により生じる蛍光の 450 nm~600 nm をフォトマルチプライヤーで検出し蛍光画像として記録した。本研究では、蛍光画像を用いた血管応答の評価方法として収縮・弛緩反応に伴う内皮細胞

の移動距離を測定した。血管組織片にフェニレフリンを適用すると、適用と同時に組織片の収縮反応に伴う内皮細胞の移動が認められた。この内皮細胞の移動方向は、平滑筋細胞の長軸方向に平行していた。

④ CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction、カンジダ標準株 IFO1385 由来、4mg/0.2mL/mouse)、anti-mouse MPO および fMet-Leu-Phe (FMLP) を投与し、倒立蛍光顕微鏡により腎微小循環の悪化について解析した。また、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流についても観察した。また、近尿細管からの血液成分の漏出は、Rhodamine B isothiocyanate (RITC)-conjugated Dextran (RITC-dextran: mol wt 73,000) を血液に投与してモニタリングした。また、健常者末梢血から比重分離法によって好中球を分離し、スライドガラス上に直径 7 mm 孔ラバープレート張り付けた well に、好中球を 37°C、10min で粘着させた。その後、PMA (100ng/ml)、FMLP (fMet-Leu-Phe, 1μM)、TNF α , PMA (100 ng/ml), FMLP (1 μM), TNF- α (20 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml), or CAWS (100 μg/ml) を各 well に添加し、37°C、10min で加温した。刺激後、直ちに 1% パラホルムアルデヒドで固定し、FITC 標識抗 CD69 抗体で染色してコンフォーカル顕微鏡で CD69 の局在性を観察した。

⑤ 密着型フラッシュ軟 X 線顕微鏡と密着型紫外線顕微鏡の新規開発により血球細胞や神経細胞など生細胞の炭素密度イメージングや癌治療に関わる重粒子線の細胞内粒子飛翔マッピングを高精度で行えることを明らかにした。NMR アナライザーの活用では、X 線結晶構造解析と併せて細胞分化、分裂、DNA 複製・修復に関わる蛋白質の機能解析を行い、多くの蛋白質の立体構造を決定するとともに

細胞内の無機リン酸と pH を生きた状態で短時間に観測する方法を可能にした。

C. 研究結果

(1) 微小循環障害における血流動態と酸素代謝の解析

上記のナノプローブとナノバイオイメージング技術を活用して、生体の恒常性破綻に伴う酸化ストレスと微小循環障害を解析した。ex-vivo-FITC 標識赤血球と Pd ポルフィリン酸素プローブによる血流・酸素動態の計測と細胞ミトコンドリア内 NADH の紫外吸光観測により、脳表層組織の血流・酸素代謝変化の定量化した。また、虚血再灌流障害における血流動態を ex-vivo-標識 Rhodamine 6 G 白血球と CFDASE 標識血小板の rolling・粘着過程可視化解析によって定量化した。生体の恒常性破綻に伴う微小循環障害を血流動態と酸素代謝の関連から評価し、微小循環障害・血栓形成に基づく血流停止・血管閉塞あるいは虚血応答をラットの腸間膜・肝臓・脳表層微小血管を対象に可視化解析した。また、脳、肝臓の虚血再灌流障害において血小板・白血球の接着亢進、血流停滞、血栓増悪を定量的に明らかにした。図 4 は Wistar 系雄性ラットの closed cranial window 内で観測された脳表微小血管内の FITC 標識赤血球の流動状態を可視化したものである。このようなイメージングから血流速度と酸素分圧を計測した結果が図 5 である。急性的な脳虚血を起こさせ、短時間で返血・再灌流した結果では、短時間の措置であるがゆえに脳内血管の血流と酸素分圧は前値に復帰するが、時間経過が長くなると血流の停止により酸素分圧の極端な低下となり、細胞傷害が顕著となる。直径の異なる微小血管（細動脈）内酸素分圧と周辺組織の酸素分圧の観点からすると、径が細く

なるにつれて血中酸素分圧は低下しており、また血管外の組織中の酸素分圧は血管からの距離が隔たるにしたがい指数関数状の勾配をもって低下していく。血管が閉塞して血流が低下してくると虚血状態となり、血中ならびに組織中の酸素分圧は 10mmHg 以下に低下して極めて重篤な状態に陥る。

(2) 虚血再灌流傷害における脳皮質の血流動態、白血球・血小板粘着の解析

一方、脳虚血・4 時間後の再灌流実験では、脳表層微小血管中を流動する白血球が血管内皮上に粘着するとともに血小板が接着し小凝集塊となり、流れによって剥離して flying thrombus となる。これは虚血・再灌後の酸化ストレスが関与して、血管内皮と白血球および血小板間の分子相互作用によりこれら血球細胞の粘着と血栓形成が顕著に亢進すると考えられる。図 6 は虚血・再灌流後の血管内皮への白血球および血小板の粘着数を計測した結果である。血管内皮と白血球および血小板間の分子相互作用によりこれら血球細胞の粘着と血栓形成が顕著に亢進することがよくわかる。とくに図 7 に示すように糖尿病モデルマウスではその粘着亢進が著しくなり、病態として重篤な症状となる。このような血栓形成は、とくに糖尿病において顕著な速さで起こるが、糖尿病における易血栓性の亢進は大きな問題であり、いわゆる細小血管障害の生起頻度の高まりが明らかとなった。関連して脳における蛍光標識ミクログリアの脳神経細胞浸潤過程の可視化解析に成功した結果は、研究協力者鈴木弘美の成果報告書に記述した。

(3) 糖尿病における微小循環障害と血管内皮細胞・白血球・血小板相互作用の解析

糖尿病の微小循環において血小板の変形流

動、血管内皮損傷部位への粘着・凝集、血栓形成のプロセスを蛍光ナノプローブで可視化し、定量的に評価した結果、健常群に比べて糖尿病群で血小板の凝集、粘着、血栓形成が容易に起こることを明らかにした。また、血栓形成に関わる活性酸素種の影響を各種スカベンジャを用いてイメージング解析し、 $^1\text{O}_2$ 、 O_2^- 、 H_2O_2 、 OH による血管内皮傷害とともに血小板膜破壊・脱顆粒・作用物質の放出が促進され、これに続いてカスケード的に血小板粘着能の亢進、凝固系の促進、血栓成長、血管閉塞へ至る活性化メカニズムが働くことを明らかにした。さらに各種抗血栓薬を用いて、酵素作用、血栓促進・抑制因子、粘着・凝固因子の関与を解析し、血栓抑制に関わる薬理効果を検証した。これに関連して、糖尿病赤血球の変形能の低下が赤血球内ソルビトール及びHbA1cの増加と高く相関することを明らかにし、糖尿病では変形能が血流速度・ずり応力の増加とともに著しく減少し、血管壁の損傷を促進する可能性が大である事を示した。原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定に基づく赤血球のヤング率の増加、軟X線顕微鏡を用いた細胞膜の炭素イメージングにより膜組成・構造の違いを検討した。アルドース還元酵素阻害剤の投与により血球内へのソルビトール蓄積が減少し、赤血球変形能が増加・改善されること、また血行改善薬の投与により同様な赤血球変形能の増加・改善を確認している。

これらの成果に基づき糖尿病性の細小血管障害・脳血流障害など特異的な血流動態をイメージング解析したが、図7の結果からわかるように活性酸素産生の亢進、血管内皮傷害、白血球の粘着、血小板膜破壊・作用物質の放出促進、これに続いてカスケード的に血小板粘着能の亢進、凝固系の促進、血栓成長、血

管閉塞へ至る活性化メカニズムの働きを明らかにした。糖尿病では赤血球の変形能の低下や赤血球膜の硬化が認められるので、血管内皮への傷害も増加するものと考えられる。関連して血管内皮細胞と白血球・血小板間相互作用における分子生理機能を解析したが、ポルフィリン誘導体光化学反応(PDT)の活性酸素産生に基づく血栓形成過程において内皮細胞の細胞骨格 F-actin の重合、細胞接着 tight junction の喪失、細胞短縮、内皮下露出が顕著に増加、さらに血小板と白血球の内皮細胞接着性が有意に増加し血栓形成が促進されることを明らかにした。抗体を用いた血栓形成阻害実験では、Pセレクトリン、Eセレクトリンの関与は少なく、 β_2 インテグリン (CD18)、ICAM-1、CD11aの関与が認められ、血小板のVLA-2、内皮細胞のvWFの関与も強く認められた。さらに拍動を有する血圧可変型微小循環モデルによる糖尿病性内皮細胞対血小板凝集反応の解析を行い、糖尿病性最小血管障害の機構解明を行った。糖尿病に対する各種治療薬の効果を評価し、血栓抑制が有意に高まる結果を得た。

(4) メカニカルストレスによる血管内皮細胞傷害のイメージング解析

摘出したマウス胸部大動脈の内皮細胞を対象に *in-situ* 系でメカニカルストレスを負荷し血管内皮細胞のNO産生とCa応答、pH変化を解析したところ、リゾホスファチジン(LPA)刺激で内皮細胞のCa応答を介してトロンボキサンA2/プロスタグランジンH2の産生・遊離を促進し、内皮・血管組織の収縮を誘発することが示唆された。また、高濃度のLPAは強い流れ刺激が負荷された状態では一部の内皮細胞に傷害的に作用し、その傷害メカニズムにはCa応答の持続的な増強が密

接に関与することが示唆された。平行平板型チャンバーを用いて、細胞個々の Ca^{2+} 応答と、血管組織片の局所的な収縮・弛緩反応を同時に評価可能であるかどうかについて検討を行った。血管組織片に 30 nM のフェニレフリンを適用すると、組織片の収縮に伴った内皮細胞の移動が認められた。この状態で 100 nM のアセチルコリンを適用すると内皮細胞はフェニレフリンの適用時とは逆方向に移動した。またこの移動に先行して内皮細胞の Ca^{2+} 応答が認められた。さらに、アセチルコリンを除去すると再び収縮方向に内皮細胞が移動し、最後にフェニレフリンを洗浄すると、内皮細胞は弛緩方向に移動した。

続いて、流れ刺激存在下で LPA を適用した時に誘発される内皮細胞の Ca^{2+} 応答に引き続いて起こる組織応答が収縮反応であるか弛緩反応であるかについて検討を行った。流れ刺激 20 dyne/cm² では 3 μM LPA により、40 dyne/cm² では 1 μM LPA により内皮細胞の反復性のカルシウム応答の後にフェニレフリン適用時と同様の組織片の移動が認められた (図 8)。また、この時には平滑筋細胞層における Ca^{2+} オシレーション頻度の上昇が認められたことから、収縮応答が生じることが明らかとなった。内皮細胞の Ca^{2+} 応答とその後の血管組織の収縮反応は、LPA 濃度及び流れ刺激強度に依存して増大した。流れ刺激存在下、LPA により誘発される血管収縮反応のメカニズムについては、薬理的な検討により、LPA により誘発される血管収縮反応はトロンボキサン A₂/プロスタグランジン H₂ 受容体阻害薬である SQ-29548 の適用 (収縮率: 16.2 ± 3.0% . p<0.01. Student *t* test. n=3) およびトロンボキサン A₂ 合成系の合成酵素阻害薬である OKY-046 (収縮率: 32.9 ± 4.9%. p<0.05. Student *t* test. n=3) 並びにアス

ピリンの前処置 (収縮率: 23.3 ± 7.2%. p<0.05. Student *t* test. n=3) によりほぼ完全に抑制された。これらの阻害薬は、内皮細胞の Ca^{2+} 応答には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、LPA は流れ刺激存在下で内皮細胞の Ca^{2+} 応答を介してトロンボキサン A₂/プロスタグランジン H₂ の産生・遊離を促進し、これらの物質による血管組織の収縮反応を誘発することが示唆された。また、流れ刺激存在下で LPA を適用すると高濃度の LPA (3 μM) が高い流れ刺激 (20 or 40 dyne/cm²) と共に内皮細胞に適用されたときに、内皮細胞の傷害にともなう蛍光指示薬の細胞外漏出が認められた。LPA により傷害を受けていない内皮細胞の Ca^{2+} 応答が上昇下降を繰り返すオシレーションであるのに対して、傷害された内皮細胞では、細胞傷害直前に比較的長時間の持続的な Ca^{2+} 上昇が認められた。以上の結果から、高濃度の LPA は強い流れ刺激が負荷された条件では一部の内皮細胞に対して傷害的に作用し、その傷害メカニズムには Ca^{2+} 応答の持続的な増強が密接に関与することが示唆された。

(5) 血管新生における血管構築と血流動態・酸素代謝の解析

マウス dorsal skinfold chamber 法により新生血管 (腫瘍モデル、VEGF モデル、bFGF モデル) の増殖過程における血管構築と血流動態・酸素代謝を観測し、その特異性を検討するとともに活性酸素産生に伴う腫瘍新生血管の血流遮断メカニズムについて検討した。腫瘍モデルは、マウス背部皮膚に乳癌細胞 MT060562 を埋め込み増殖させた。図 9 に示したように腫瘍新生血管の構築状態は正常血管網とは著しく異なり、血流速度ならびに酸素分圧の様相もかなり異なる。腫瘍微小血管

は管径が細く複雑な形態を示し、血管内皮が脆弱で血流速度は低い。腫瘍血管の血流は細静脈と同等の低流速で流れており、酸素分圧も極めて低い低酸素状態にあるといえる。相対的にみて正常な細静脈の酸素分圧は細動脈系の50%以下であり、また腫瘍血管では周辺組織で酸素消費が高いため正常細静脈系よりさらに低い酸素状態にある。図10はVEGFによる血管新生構築部の酸素分圧マップを示したものであるが、早い速度で血管新生が促進される部位では酸素消費が多く、酸素供給不足となり、低酸素状態となることがよくわかる。

(6) 活性化好中球による急性腎炎血管症における血流障害のイメージング解析

腎炎、SLE、リウマチをはじめとする難治性血管炎は、自己免疫疾患などの免疫異常による好中球活性化や好中球自己抗体(ANCA)と連動して進行するものと予想される。腎炎の発症・進展における好中球の役割を明らかにするために、腎炎モデルマウスの構築および観察を行った結果、*Candida albicans* 由来糖ペプチド、MPO抗体およびfMet-Leu-Pheによって腎血管傷害を誘導したマウスでは、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流、白血球粘着をイメージングで確認した。最も顕著な場合、広範囲にわたる腎表面血流の停止も観察された。また、血管障害に関与するCD69分子を欠損したマウスでは、活性酸素誘導の血小板凝集が遅延、血栓形成・血管閉塞の遅延が観測された。これらの現象には血管内皮への白血球の接着を伴うことが観察されるが、この腎炎誘導モデルにおいてはMPOが関連していることから、特に好中球が炎症における重要な役割を担っているものと考えられる。さらに好中球による血管内皮傷害時の

apoptosis signal 伝達過程におけるp38 MAPK(p38)とCaspase 8の活性化を検討した結果、TNF α 、IL-1 β によりMAPK-p38が最もリン酸化され、Caspase 8の18kDaの活性化型(c-Cas8)が生成されていることを確認した。血管内皮細胞傷害が活性化好中球を介して生起し、血管内皮細胞内では、IL-1 β 等の受容体を介しp38のリン酸化やCaspase8の活性化が起こり、apoptosis誘導されている可能性が示唆された。また、活性化好中球の細胞膜表面に局在するCD69分子の局在移行とCD69の関与が示唆された。その結果より好中球活性化によるCD69分子の表面出現が血管得発症初期過程に関与していると推定された。MPO抗体の濃度依存的に内皮細胞のICAM-1発現が上昇し、Fab抗体でも同様の反応が見られ、これらの結果からMPOの関与と特に好中球が炎症において重要な役割を担っていると考えられた。FMLP刺激活性化好中球では、細胞表面に量子ドット標識MPO抗体が特異的に結合し炎症に関与することが示された。この研究の成果をまとめると、CAWS(*Candida albicans* water soluble fraction、カンジダ標準株IFO1385由来、4mg/0.2mL/mouse)、anti-mouseMPOおよびfMet-Leu-Pheの投与による、腎微小循環が悪化を確認された。血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた(図11)。腎臓表面血管の流速の変化もCAWS+ anti-mouseMPO+ fMet-Leu-Pheの時に、悪化することがわかった(図12)。さらに、血管炎や腎炎でのMPO-ANCAの役割を明らかにするために、血管炎モデルマウスを開発し、MPO-ANCAに関連した発症機構をIn-vivo Imagingにより検討した結果、MPO-ANCAによって血管傷害が引き起こさ

れ、腎炎が誘発された。RITC 蛍光標識した分子をプローブとし、anti-mouse MPO の投与による、RITC-dextran の近尿細管への流出が観察された (図 13)。CD69-KO マウスでの血栓形成についても検討した結果、血管内への活性酸素誘導の血栓形成による血流遮断の有意な遅延が生じた (図 14)。コンフォーカル顕微鏡を用いて、その後、PMA、FMLP、TNF α 、IL-1 β 、CAWS の刺激によって活性化した好中球の細胞表面に局在する CD69 を解析した。その結果、CAWS を除く、PMA、FMLP、TNF α 、IL-1 β のいずれの刺激によっても、CD69 が好中球表面に表出した (図 15)。

(7) 細胞死における Caspase 活性のイメージング解析

細胞の apoptosis 誘導経路について分子シグナル伝達の探索を行い、Ca イオンの細胞内流入、Caspase 系列の活性化、ミトコンドリア膜電位の上昇を確認、DNA 傷害を各種蛍光プローブのイメージングによって明らかにした。細胞死のシグナル伝達に関係するカスパーゼについて細胞内オルガネラ内カスパーゼ活性化を FRET 型 GFP でイメージング解析した結果、ミトコンドリア内及び小胞体内では活性化がないものの核内では細胞質にやや遅れて活性化されることを明らかにした。

PDT による活性酸素誘導アポトーシスでは、ミトコンドリア膜電位の低下、細胞内 Ca 濃度上昇が観測され、Ca 濃度上昇は Caspase-3、-6、-8 の活性化に、活性酸素は Caspase-3、-8 の活性化に不可欠であることが明らかとなり、Ca 濃度上昇がアポトーシス誘導に不可欠と考えられた。また、活性酸素ペルオキシナイトライトによる神経障害で誘導される細胞死を防御するネオエキヌリン A は、細胞内に存在するシグナル伝達系のタン

パク質を標的とする可能性があることが示唆された。

FRET 型 GFP による細胞内小器官におけるカスパーゼ活性化の画像化：核内カスパーゼ活性化イメージングでは、まず、CY の C 末端に simian virus 40 large T-antigen 由来の核局在化シグナル (nuclear localization signal ; NLS) を融合した核局在型プローブ (NLS-CY) を作成し、これを HeLa 細胞に発現させ、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察すると、NLS-CY は核にのみ発現が認められ、細胞質への発現は見られなかった (図 16)。NLS-CY 発現 HeLa 細胞を TNF $\cdot\alpha$ で曝露することによる蛍光強度変化および各蛍光強度の比 (ratio) の変化を計測したところ、核内におけるカスパーゼの活性化による蛍光強度比変化が捉えられた。次に、プローブの N 末端に MAP kinase kinase (MAPKK) 由来の核排出シグナル (nuclear export signal ; NES) を融合した細胞質局在型カスパーゼ活性化検出プローブ (NES-GR) を作成し、HeLa 細胞で発現させ、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、NES-GR は核を除く細胞質部分に一樣に発現がみられた。そこで NLS-CY、NES-GR を同一 HeLa 細胞に共発現させ、LSM 510 META システムを用いて画像化、解析を行った。LSM 510-META は、試料から放出された蛍光をグレーティングによって分光し、スペクトルの順に 32 個の検出器が並んだ META ディテクタによって各蛍光強度を検出するシステムであり、二つの蛍光の完全な分離が可能である。図 17 に、NLS-CY、NES-GR 共発現 HeLa 細胞に TNF $\cdot\alpha$ を曝露することで得られる蛍光強度比変化の典型例を示す。この細胞に発現した NLS-CY から得られる蛍光強度比は TNF $\cdot\alpha$ 曝露開始後 323

分から低下したのに対し、NES-GR から得られる蛍光強度比は TNF- α 曝露開始後 325 分から低下した。したがって、TNF- α 刺激を受けた細胞内ではまず細胞質のカスパーゼが活性化され、その後数分で核内カスパーゼが活性化されることが明らかとなった。

ミトコンドリア内カスパーゼ活性化イメージングでは、CY の N 末端に subunit VIII of human cytochrome *c* oxidase 由来のミトコンドリア局在化シグナルを融合させたミトコンドリア局在型プローブ (Mito-CY) を作成し、HeLa 細胞に発現させ共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察すると、Mito-CY は核の外側に局在が認められた。この局在はミトコンドリア局在プローブである MitoTracker Orange の局在と一致することから、Mito-CY はミトコンドリアに局在することが確認された。MitoTracker Orange は rhodamine 骨格を持つ赤色蛍光物質であるが、ミトコンドリア膜電位が低下してもミトコンドリアからの遊離は少ない。そこで、MitoTracker Orange を細胞へ取り込ませることによりミトコンドリアの位置の把握を行いながら、TNF- α 誘発アポトーシスにおけるミトコンドリア内カスパーゼ活性化の検出を試みた。Mito-CY 発現 HeLa 細胞を TNF- α に曝露することで得られる蛍光強度変化および各蛍光強度の比の変化、MitoTracker Orange が集積した部分を範囲指定して得られた蛍光強度の変化をミトコンドリア内発現プローブの蛍光強度変化とし、核部分を範囲指定して得られた蛍光強度の変化を核内発現プローブの蛍光強度変化として解析した結果、核内発現プローブの各蛍光強度比は 178 分から急激な低下を示し、核内でカスパーゼの活性化が起きたことが確認された。一方ミトコンドリア内発現プローブの各蛍光強度比

(ratio) は、TNF- α 曝露時間が経過するにしたがって低下していく傾向がみられた。核内における ratio のグラフに見られたような急激な低下はみられなかったことから、ミトコンドリア内ではカスパーゼの活性化が生じていないことが示唆された。

D. 考察

脳虚血は脳血管障害のみならず心肺蘇生時や外傷時などにもみられる病態であり、脳神経細胞は虚血侵襲に極めて脆弱である。その病態・薬理作用や再灌流時の細胞・組織の機能解析を行うには、微小循環の血流動態と酸素代謝また細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝過程で使用される NADH 変化による虚血指標を時空間的に捉えることが極めて重要であり、本研究の多波長マルチフォトリックイメージングシステムはその要望に十分に応えるものである。また、in-vivo 実験において虚血・再灌流時の白血球と血小板の血流動態を可視化可能にしたことは、この関連研究に大きな手段を提供したことで意義深い。脳、肝臓をはじめ各種実質臓器の微小循環系を対象とした本研究において、血流速度や血管径、酸素濃度はそれぞれ異なる物理量であるが、従来、これら複数のパラメータを同一個体で計測する場合、それぞれ独立した計測装置を使用することになり、計測系が複雑化した原因である。本研究で開発したマルチフォトリックイメージングシステムは、血流動態計測は光励起した FITC から発する蛍光から、酸素分圧計測では光励起した Pd-TCPP から定量化することができ、その他の分子生理機能に対しても異なるナノプローブと励起光源を使ってマルチカラーイメージングが可能となった。全てのパラメータの計測に光励起による発光現象を利用することに着目し、異なる波長の励起光源を利用した光学系をシステム

アップすることで双方の情報を連続的かつ簡便に取得可能としたことは本研究の大きな成果である。

一方、活性酸素産生による血栓形成については、活性酸素産生、血小板 LDH 放出誘発（血小板そのものの凝集作用は抑制）、内皮細胞 F アクチン重合・細胞骨格変化、tight junction 消失、細胞質の収縮、血管内皮基底膜の露出、基底膜コラーゲンからの血小板コラーゲン受容体を介する血小板活性化、フィブリノーゲンレセプター GP II b/III a の活性化、vWF レセプター GP I b の活性化、vWF を介する接着、また白血球の活性化による二次的な活性酸素の産生、内皮基底膜の露出促進、白血球の接着性亢進、血小板の粘着亢進などが相乗的に起こる。糖尿病では非酵素的糖化反応により GP I b、GP II b/III a の増加が顕著となり、易血栓性を示すと考えられる。微小血管の血栓形成過程における血小板粘着と血栓形成・血管閉塞に対する活性酸素の関与をスカベンジャーを用いて調べたところ、一重項酸素とスーパーオキシドアニオンの関与が大であったが、これ以外の ROS や種々の活性化因子の関与についても検討する必要がある。光化学反応による酸化ストレスで血管内皮細胞 (HUVEC) の球状タンパク質の G アクチンから線維状の細胞骨格 F アクチンへの重合が起こり、細胞の形態変化・短縮化・細胞先端部の増強に作用しているものと考えられた。また、細胞接着を司っている tight junction の構成タンパク質 ZO-1 については、光化学反応前には細胞間に線維状の ZO-1 が確認されたが、光化学反応後には喪失し、内皮細胞の短縮とともに細胞間隙が広がり内皮下露出が顕著となったといえる。以上のように、活性酸素産生による培養血管内皮細胞の形態変化は、短時間のうちに顕著に起こり、内皮

下組織の露出部分に血小板の粘着凝集や白血球の接着が容易に起こり、これら血球細胞の接着性の亢進が顕著となることが明らかとなった。また、in vivo 実験でも白血球のローリングと接着が加速度的に誘起されるを確かめている。これら血管内皮細胞と血小板および白血球の粘着凝集に関して抗体を用いた接着阻害実験を試みた結果、光化学反応による急性血栓生成モデルでは、接着因子の P セレクチンと E セレクチンの関与は少ないものの、内皮細胞のトロンボモジュリン活性の減少、内皮と血小板間での接着性亢進において VLA-2、vWF の活性化が認められた。内皮と白血球間での接着性亢進については、B2 インテグリン、ICAM-1 の活性化が認められ、また CD18、CD69、CD11a の活性化によって血栓生成が亢進したものと考えられる。

マウス dorsal skinfold chamber 法により新生血管の増殖過程と血流動態・酸素代謝を観測し、その特異性を検討したが、bFGF モデルと VEGF モデルの差は血管新生に働く各増殖因子の働く役割の違いを示唆している。新生血管占有面積について bFGF モデルでは 4~5 週にかけて急増するのに対して VEGF モデルでは 2~3 週で進行が早く、VEGF では 4~5 週になると作用中心部では血管数が減少するのに対して辺縁部の血管占有面積が増加して辺縁部の広がりが増大された。中心部では血管新生の進行が著明に増大するために低酸素状態となり血管が壊死状態に陥ることが示唆された。酸素分圧の計測によってその現象は確認され、VEGF の作用の方が低酸素による血管新生の促進効果が高いと考えられた。腫瘍モデルにおいては血管新生の成長が持続するものの腫瘍組織の増殖により数量的には他のモデルに比べて少なく低酸素状態となっていることが特徴的である。

血管炎モデルマウスおよび臨床研究の結果から、MPO および MPO-ANCA 産生が血管炎の発症誘導に不可欠であること、また、炎症性サイトカインが血管炎の発症に連動し、特に、TNF- α および IL-1 β が重要であることが明らかになってきている。また、これらのサイトカインによって活性化された好中球が血管炎の発症に関連していることが推定されており、好中球の活性化状態にかかわる MPO と MPO-ANCA に加え、好中球内分子の役割が重要であると考えられていた。本研究では、1) CAWS、anti-mouse MPO および fMet-Leu-Phe の投与による腎微小循環の悪化、2) コンフォーカル顕微鏡での CD69 の局在観察、3) CD69-KO マウスにおける活性酸素誘導の血栓形成の遅延、および、4) CD69 分子の好中球細胞膜局在変化について解析した。CD69 分子が細胞膜周囲に局在したことが認められたが、この結果は、活性化好中球表面に出る CD69 分子が、炎症性サイトカインレベルの上昇と連動しておこったと推定される。*in vitro* において、ヒト末梢血好中球が、好中球走化性因子 fMet-Leu-Phe、炎症性サイトカイン TNF- α および IL-1 β で刺激した細胞表面に CD69 分子が細胞膜周囲に表出したことが認められことから、好中球の活性化によって表面に存在する CD69 分子が血小板の凝集を誘導すると推定される。

アポトーシス刺激時の細胞内情報伝達で重要な役割を果たしているカスパーゼについて、細胞内オルガネラ内での活性化をイメージで捉え、解析するためのプローブ開発を行ったが、核内でのカスパーゼの活性化については、カスパーゼ 3 は核膜を透過すると考えられることから、核内での活性化の検出は予想されるところであった。核内、細胞質への各局在化プローブを用いて活性化のタイミングを調

べてみると、全ての細胞で核内の活性化が細胞質に数分遅れて生じることが明らかとなった。その原因としては、1) 活性型カスパーゼ 3 そのものの細胞質から核への拡散、2) カスパーゼ 3 活性化の連鎖の核への伝播、3) カスパーゼ 3 を活性化する酵素の核への拡散、等が核膜によって妨げられることによるものと考えられる。細胞質内あるいは核内での活性化の伝播は極めて速いと考えられることから、恐らく核膜を障壁としてカスパーゼの拡散の遅れというより活性化の伝播の遅れが主な要因と考えられる。ミトコンドリア内カスパーゼ活性化については、ミトコンドリア内にはそもそもカスパーゼが存在しないという報告、あるいはカスパーゼは存在するが活性化されると細胞質に放出されるという報告等、意見がわかれている。本研究では、ミトコンドリア内のカスパーゼ活性化を示唆する結果は得られなかった。またミトコンドリア内カスパーゼ活性化プローブの蛍光変化が捉えられていなかった可能性を考え、さらに、ミトコンドリア局在プローブを発現させた細胞をアポトーシス刺激し、ミトコンドリアを単離し、SDS-PAGE によってプローブ断片の解析を行ったが、カスパーゼによって切断された断片は検出されなかったという結果によっても、この結果は確認された。小胞体においても、ミトコンドリア同様にアポトーシス刺激を加えても、カスパーゼの活性化を示唆するシグナル変化は検出されなかった。これらの結果はミトコンドリア及び小胞体におけるカスパーゼの活性化を否定するものである。

[Ca²⁺]_i, pH_i 及び NO のマルチカラーイメージングは、本研究グループの確立した極めてユニークな解析系であるが、この解析系を用いて大動脈標本において血管内皮細胞に流れ刺激を加えながら LPA を添加すると、血管

収縮が生じるとともに血管内皮細胞に細胞傷害が起こることが観察された。その原因としては、LPA 刺激によって血管内皮細胞内 Ca^{2+} が上昇するとともにトロンボキサン A_2 /プロスタグランジン H_2 の産生・遊離が生じることが示されるとともに、さらに内皮細胞内 Ca^{2+} の大きな上昇によって細胞傷害が生じることが示唆された。血液中では LPA は時によって本実験条件と同程度の濃度まで上昇することも想定され、この現象と循環器系疾患との係りが注目される。

本研究ではこの他、神経細胞の細胞障害・神経再生因子のイメージング解析、1 分子イメージング法による mRNA の情報伝達に関わるダイナミクスの解析、NMR によるタンパク構造解析、リポソーム包含磁性粒子の開発などに新しい成果を得たが、詳細については平成 14 年度～16 年度の分担研究報告書に記載した。

E. 結論

本研究では、血管炎や微小循環障害によって誘発される種々の組織傷害や細胞傷害のメカニズムを分子・細胞レベルで解析・診断するために各種蛍光・燐光標識ナノプローブと高感度イメージング技術を開発し、これらを用いて傷害の発現メカニズムと傷害からの再生・治癒過程に関する分子機序を局所的に解析した。脳・肝臓・腎臓を対象に微小血管内の血流動態を可視化解析し、赤血球速度、血小板粘着・血栓形成過程、白血球粘着能などの動的変化を明らかにするとともに、糖尿病微小循環障害や脳虚血などの病態把握と治療効果の評価を行った。また、新生血管構築過程の血流動態と酸素代謝の解析、急性腎血管炎の発症機序の解明などを行い、幾多かの新所見をえることができた。さらに培養細胞系

および摘出組織標本を用いて酸化ストレスならびにメカニカルストレス下の血管内皮細胞の機能変化を解析するとともに細胞死に関わる分子生理機能をイメージング解析して新しい知見を得るとともに、使用したナノプローブやイメージング技術の有効性を検証した。とくに細胞死のシグナル伝達機構として Caspase 系列の細胞誘導過程について重要な結果を得ることができた。これらの成果は今後、診断治療において役立つことことができるものと考えられる。以上、分子・細胞レベルで可視化解析するための各種蛍光・燐光ナノプローブとバイオイメージング技術の新規開発、その有効な利用法の確立、ならびに種々の機能解析に新しい知見を得ることができたことは本研究の大きな成果であった。ヒトを対象とした臨床応用への展開には更なる検討と生体適合性および安全性の確認が必要である。ナノメディシン分野は、今後発展の一途を辿るものと予測され、本研究の成果は、今後、臨床の現場で活用される実用的な診断治療技術および医療機器へ展開されるシーズを作り出したと考える。

F. 健康危険情報

特になし。

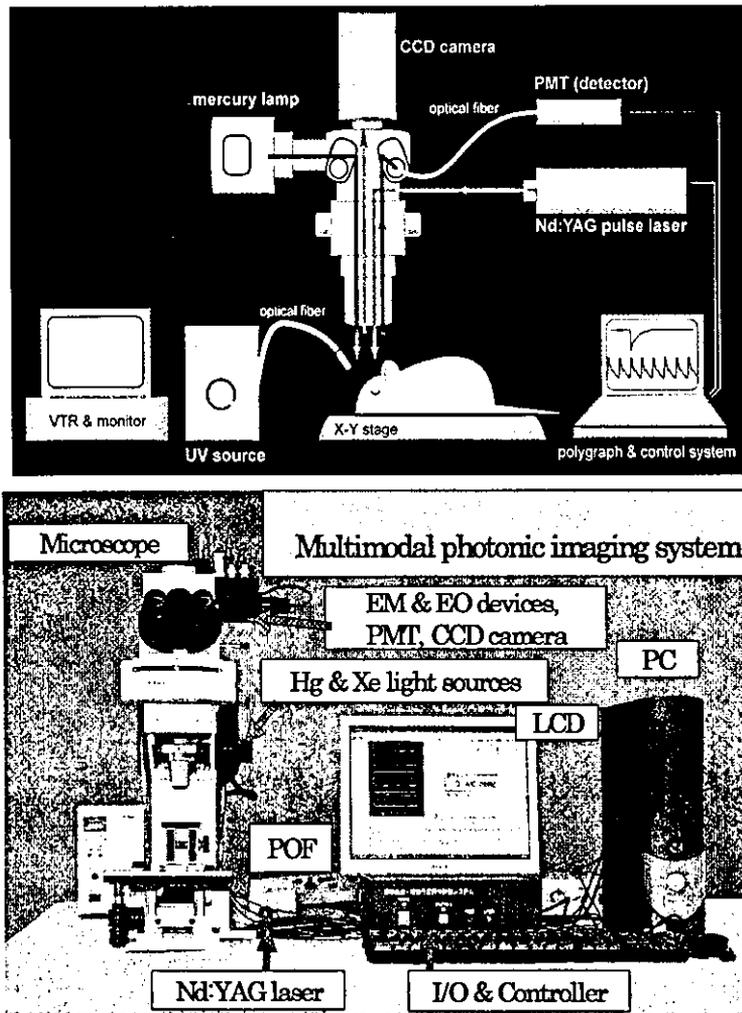


図1 多波長励起フォトニックイメージング システム (上: 概念図、下: 実装システム)

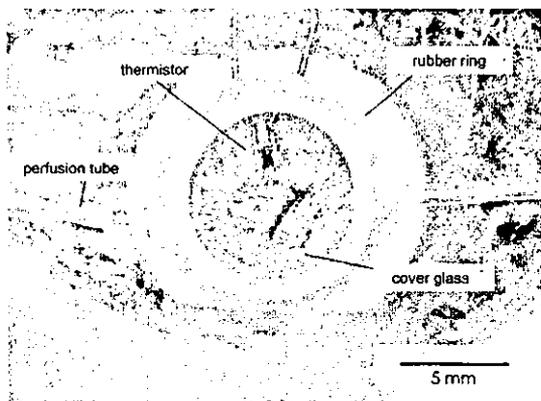


図2 ラット頭頂骨に作成した closed cranial window

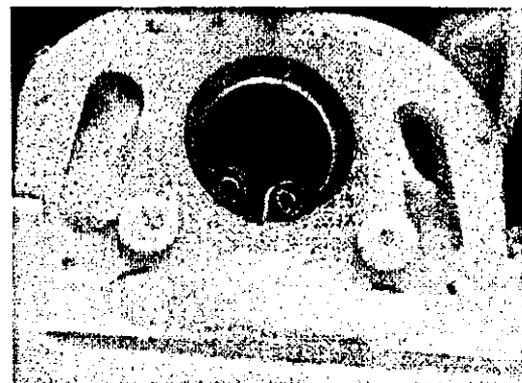


図3 マウス背部の dorsal skin fold chamber

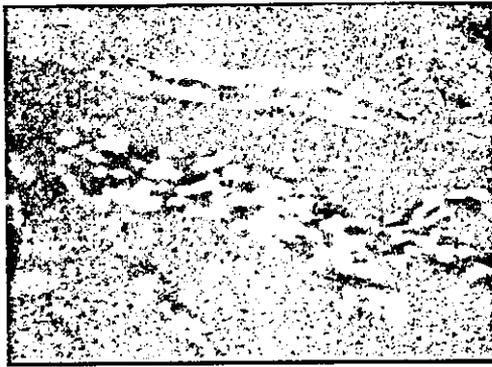


図4 ラット脳表層の微小血管内の FITC 標識赤血球の流動状態

脳皮質細動脈の血流速度と酸素分圧：
組織への酸素拡散

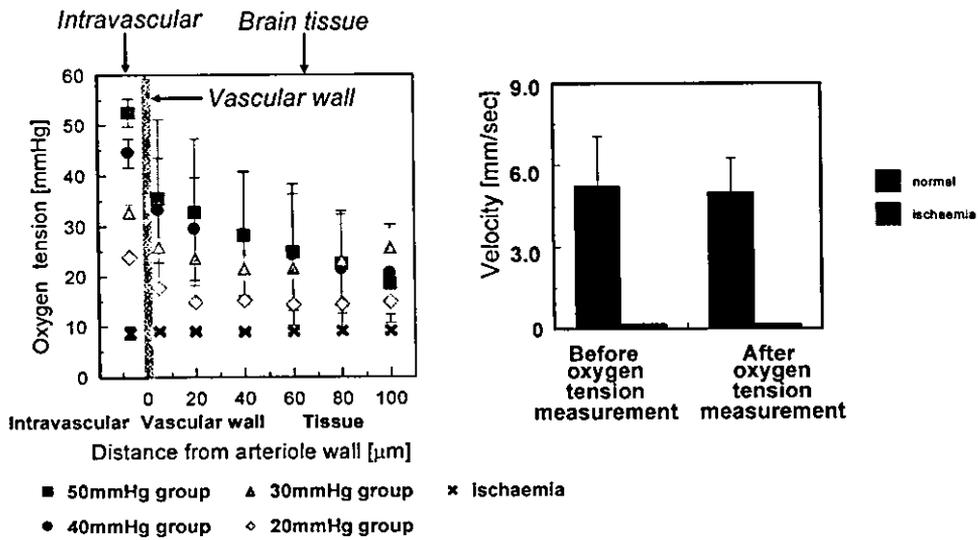


図5 虚血状態における脳皮質細動脈および周辺組織の酸素分圧と血流速度