

3-2 光学顕微鏡による生細胞のナノオーダーの計測

加藤 薫^{1, 2}

¹産業技術総合研究所・脳神経, ²科学技術振興事業団・さきがけ 2 1 「認識と形成」

伸長している神経の先端は、成長円錐という水掻きを持った「蛙の手」のような形の構造をとる。この成長円錐が動き回り、神経伸長の経路探索や、シナプスを作るターゲットの認識を行うが、成長円錐の運動のメカニズムは議論の対象となっている。研究の難しい理由の一つは、生きたままの状態では、成長円錐の内部構造を見るのが難しいことであった。私たちは、新しいタイプの偏光顕微鏡を用いて、神経伸長の仕組みの解明を目指して、生きた神経が伸長するときの、その先端部（成長円錐）の内部構造の振る舞いを高精度で観察し、直径数十 nm のタンパク質の繊維の振る舞いを可視化することに成功してきた。

この講演では、私たちが用いてきた、液晶偏光顕微鏡 (Pol-Scope) を紹介し、この顕微鏡でのタンパク質の繊維束（直径：数十～100nm）等の定量的な観察を例として示す。そして、ビデオ増強

型微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡等、他の顕微鏡法と画像の特徴などを比較する。次に、光学顕微鏡の z 軸方向の精度について考察する。成長円錐や、コロイド粒子などを例にとり、50nm 又は 100nm で z 軸方向に試料を動かし、光学的切片の位置を変えたときの画像を示す。そして、光学顕微鏡の z 軸方向の精度について考察する。

最後に、光学顕微鏡で nm オーダーの何が計測でき、何が計測できないのか、また、今後の可能性について考察する。

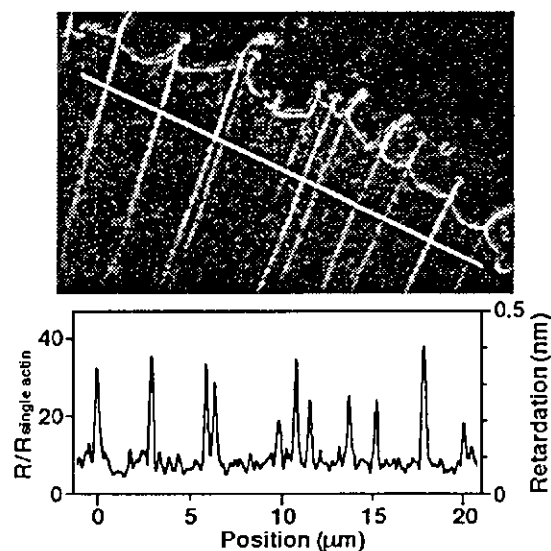


図1 成長円錐のアクチン繊維束の観察例

上：液晶偏光顕微鏡で観察した成長円錐のアクチン束。 下：白線部の plot profile.

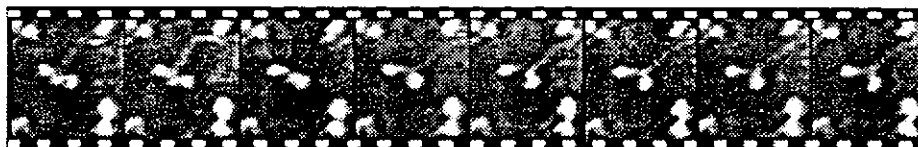
$R/R_{\text{single actin}}$ はアクチン繊維束に含まれるアクチン繊維数の見積もりを示す。

(Reprinted from PNAS 96 p7928-7931 (1999) with permission)

3-3 高速 AFM でタンパク質の動きを見る

安藤敏夫
金沢大学理学部物理学科

タンパク質は人工の創造物では実現不可能な巧みな機能を果たす。タンパク質の機能はその構造に基づいており、機能はその構造の時間発展中に生ずる。生体高分子の動的構造情報をナノメートル解像度で得ることは、X線結晶構造解析、NMR、電子顕微鏡法、光学顕微鏡法といった既存技術では不可能である。それ故、生体分子機械の「構造」と「機能」との関係に関する我々の理解は限られている。生命科学においては、溶液中の個々の生体高分子の動的な振る舞いをナノメートルスケールで見ることが夢であった。原子間力顕微鏡(AFM)は基板上に在る溶液中の個々の生体分子をイメージングできる強力な道具である。それ故、AFM は生体分子過程の「映画」を供給するのではないかと期待されてきた。しかし、AFM は有効な時間軸をもたない。すなわち、市販 AFM が1画像を得るのに1分或はそれ以上かかるのに対し、興味ある生体分子過程はずっと速く起こる。従って、AFM を使って我々が観察できるのは、静止した分子、或は、非常にゆっくり動く分子に限られている。生体分子の動的な振る舞いを研究できるように、我々は AFM の走査速度を飛躍的に上げることを目指した。60kHz まで共振のないスキャナー、高い共振周波数(450-650kHz)と小さいバネ定数(150-280pN/nm)をもつ小さいカンチレバー、対物レンズタイプの光テコ光学系、広帯域特性をもつ種々のエレクトロニクス装置を開発し、これらを組み上げて100x100ピクセルからなる画像を80ms で撮れる AFM、すなわち、水溶液中に在る試料の多くの連続イメージ (80ms 間隔) からなる映像を撮れる AFM を完成させた。水溶液中でマイカ上にあるミオシンVをイメージングしてこの性能を実証した。高速 AFM は上記の生命科学の夢を実現できる唯一の装置である。動作中の生体分子機械の AFM 映像は静止画像よりもずっと情報量が多く、それ故、その映像はバイオナノマシンの働く仕組みに深い洞察を与える。更には、AFM の動画を既に知られている原子レベルの構造情報と結び付けることも可能かもしれない。この結びつけにより、連続する AFM 画像を反映する「動的原子モデル」を構築できるであろう。こうして、高速 AFM は動作中の生体分子の動的振る舞いを可視化するばかりでなく、時間軸に沿って動く原子モデルを解析することにより機能発現の物理的仕組みを理解する道を拓く大きな可能性をもっている。



3・4 光生理学の展開

高島 一郎

産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門

近年、神経生理学の研究分野においては“光による生命現象の解析”が精力的に行われている。これを支える技術の1つは、細胞内現象を光で追跡するためのプローブ（金属イオン蛍光指示薬や蛍光タンパク質など）の開発であり、あるいはまた、極微弱光の高感度検出法を始めとする光学技術の発展である。例えば、神経活動の実体は神経細胞の膜電位の一過性変化であるが、我々はこれをイメージングするために膜電位感受性色素というケミカルプローブを使用する。この色素は細胞膜に入り込み、神経興奮に伴う膜電位変化を蛍光の強度変化に変換する働きを持つ。しかしながらその蛍光変化量は極めて小さく（0.1%以下）、信号を高S/N記録するためには様々な技術的工夫が必要である。本稿ではこの膜電位感受性色素を用いて“神経活動を見る”技術を取り上げ、その現状と将来展開について紹介したい。

— [1] 楽しい(悲しい)ことを記憶に残す神経回路の働きをイメージングする —

大脳辺縁系の一部である海馬は、記憶にとって重要な場所であることが知られている。ラット脳から、海馬、扁桃体、嗅周囲皮質という3つの脳部位を含むスライス標本を作成し、膜電位感受性色素による神経活動のイメージングを行った。扁桃体みの電気刺激（情動入力だけ）、もしくは嗅周囲皮質みの電気刺激（各種感覚入力だけ）では海馬への情報伝達は見られないが、扁桃体と嗅周囲皮質を同時に刺激した場合には海馬まで伝わる神経興奮が観測された。この結果はまさに“感情を伴う出来事がよく記憶に残る”様を捉えている。現在は嗅周囲皮質35野深層に存在する特徴的な神経細胞に着目し、単一神経細胞の膜電位イメージングにより、情動入力と感覚入力の統合処理機構を神経素子レベルで解明することを目指している。

— [2] 脳の病気を治す薬の作用をイメージングにより評価する —

動物の全脳を脳血管系を残したまま摘出し、動脈から人工血液を灌流することで生理活性を保持するという新しい脳標本の作成技術とその応用について紹介する。摘出後5時間経過した本標本の毛細血管の電顕像解析において、脳血管内皮細胞、周皮細胞等に形態異常は認められなかった。また、アセチルコリンのアナログであるカルバコールにより誘導した嗅内皮質神経細胞のガンマ振動活動が、臭化メチルアトロピンの脳灌流によっては阻害されないが硫酸アトロピンによっては阻害される実験から、血液脳関門機能が正常に保存されていることを示す。本標本では膜電位感受性色素を脳灌流した後、神経活動をイメージング解析することも可能である。てんかんモデルを用いた実験で、てんかん焦点から広がる神経興奮伝播が、抗てんかん薬の脳灌流により徐々に縮小していく様子を捉えたイメージング結果を紹介し、ドラッグデリバリー研究への本標本の応用を考えたい。

3-5 細胞機能のX線顕微鏡解析と診断への応用展開

眞島利和^{1, 2}

産業技術総合研究所 光技術研究部門¹・ライフエレクトロニクス研究ラボ²

疾病による細胞レベルあるいは細胞内構造レベルでの機能的・構造的変化を調べる新しい手法の開発が望まれている。軟X線イメージングによる手法にはこれらの変化を可視化できる可能性がある。本報告では、我々が開発してきた軟X線顕微鏡による細胞の機能的イメージングについて述べる。この装置は、電子顕微鏡では観察が困難な、水中で生きている細胞内の壊れ易い構造や含水率の高い構造を観察することができる。また、軟X線顕微鏡の分解能は、可視光より波長の短い軟X線を用いるため原理的に光学顕微鏡よりも高い。

生体を構成している主な元素は、炭素、酸素、窒素、水素であり、一方、水は水素と酸素からなる。軟X線領域にある酸素の吸収端(2.3 nm)と炭素の吸収端(4.3 nm)の間の波長領域では、炭素の軟X線吸収係数が酸素のそれを約一桁上回っている。したがって、この波長領域の軟X線を用いることにより、水中の細胞を炭素密度分布として画像化できる。

綺麗なX線像を得るために必要な軟X線量は、生物に障害を引き起こすとされているX線量のほぼ1000倍にあたりと報告されている。この非常に強いX線照射は、試料の温度を急激に上昇させ、試料の変形を引き起こす。この試料変形によるX線像の乱れを避けるためには、10ナノ秒以内でのX線照射が不可欠である。このフラッシュ照射により、試料の変形や膨張が始まる前に細胞のきれいな軟X線像を撮り終えることが出来る。X線レジスト上に記録されたX線像は、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて読み出される。

我々が研究開発を行ってきた密着型フラッシュ軟X線顕微鏡は、炭素密度分布像として水中の生物を画像化できる。この方法は、試料の化学固定や脱水処理を必要とせず、分解能はAFMのカンチレバーのチップエフェクトを考慮に入れて40nmを超えている。時間分解能は、10ナノ秒である。以上の性能により、生きている細胞やその細胞内構造を画像化することが可能となった。この方法に基づいて、疾病罹患による細胞や細胞内構造の機能的・構造的変化が解析できると期待される。

3-6 NMR（核磁気共鳴）でタンパク質のかたちと動きを見る

田之倉 優

東京大学大学院農学生命科学研究科

PPIase は、プロリンのシス・トランス異性化を触媒し、タンパク質の構造形成を促進するタンパク質である。MtFKBP17 は、好熱性古細菌 *Methanococcus thermolithotrophicus* で唯一知られている PPIase であり、PPIase 活性以外にも、他のタンパク質の誤った立体構造形成や変性を防いで正しい立体構造を維持するシャペロン様活性を示す。我々は、MtFKBP17 の溶液構造を 3 次元 NMR により解析した。MtFKBP17 分子は、典型的な PPIase ドメインと今回新たに見つかった IF (Insert in the Flap) ドメインの、2 つのドメインからなっていた (図 1)。IF ドメインは、シャペロン様活性にのみ必要であることが変異体の機能解析により示された。MtFKBP17 の分子表面は、PPIase ドメインの基質結合部位と、シャペロン様活性の推定機能部位である IF ドメインの疎水性領域とを除いて、酸性であった。明らかになった立体構造から、2 つのドメインが PPIase 活性とシャペロン様活性を別々に担っていて、これらが協同して働くことにより、ポリペプチドの立体構造形成を助けていることが示唆された。



図 1. MtFKBP17 の PPIase ドメインと IF ドメインの NMR 構造

4 ナノプローブを用いたバイオイメージング技術による細胞・組織障害のメカニズム解析 (パネルディスカッション: 生体機能障害と修復機構の解析)

司会 寺川 進(浜松医大)、川戸 佳(東大・院広領域)

現在まだ多くの病気の原因が分からないままである。このような病気に対して、これまで、主として生化学的な方法を使ってその原因の解明努力がなされてきた。つまり、細胞を破碎して分子を大量に集め、その性状を調べることにより、異常の原因を探るというやりかたであった。そこでは、遠心器や濾過器、そして電気泳動装置が主たる道具建てであり、生体分子の分離や精製をし、解析するという手法が主流である。これに対して最近、様々なプローブが作られるようになり、細胞を破碎しなくても細胞の内部の状態をプローブを介してモニターできるようになってきた。プローブとしては、古くから、細い電極を組織に刺入してその領域の酸素濃度を測定するというものがあり、この例では酸素電極がプローブに当たる。このような測定をすると、時間的な変化がよく分かり、組織の状態変化を把握することができる。しかし、一本の酸素電極では、その測定点の情報が与えられるのみで、多くの場所に関する情報を掴むには向いていない。ほとんどの疾患では、複数の細胞や組織の間の互いの影響によって実際の変化が起こっていくので、小さな電極を多数刺入して多くの情報を集めなければならないことになる。プローブをもっと小さなものにして、多くの箇所から情報を得れば、複雑な相互作用のなかで疾患に陥る組織の様子を観察できるはずである。そこで登場するのが、分子としての大きさを持ったプローブと、広い領域のプローブ分子の状態をいっぺんに把握できるイメージングの手法である。この流れは現在急速に発展しており、プローブの種類が増加、応用できる細胞の広がり、得られる情報の拡大と留まるところがない。なかでも、プローブ自身が細胞であったり分子である場合には、特別な機能をもったプローブということになり、より選択的な配置を狙ったり、より選択的な情報の取得が可能になる。分子的な微小環境の状態変化がわかり、生きた細胞や、各種疾患における特徴的な変化を、動的に、かつ全体的に追うことができる。本シンポジウムでは、様々な分子レベルのプローブの応用研究を示し、それによって、どのような病気のどのような異常側面が見えてくるのかを紹介していきたい。さらに、病的状態に陥った細胞や組織はどのようにこれを修復し再生していくのかという問題、かつての生化学的手法では追求しにくかった問題も、イメージングによって同時に見えてくるので、その辺りの紹介もしたい。これらの方法は、疾患の究極の理解を目指すものであり、病気を治すにはどのような方法があり得るのかを探る道でもある。

4-1 心筋細胞・肝細胞等のマルチカラーイメージングと分子機能解析

—カスパーゼ活性の画像化—

○川西 徹¹、河合 洋¹、鈴木琢雄¹、柴山理恵¹、早川堯夫¹、大幡久之¹、百瀬和享¹
¹国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部、¹昭和大学薬学部薬理学

組織障害の解析をイメージングで行うための蛍光プローブ開発をめざした研究の一環として、カスパーゼ活性検出用プローブ開発を行った。カスパーゼは細胞内に多量存在しており、細胞死が起こる際、それらが順次活性化されて細胞内でシグナルを伝達するとされているプロテアーゼである。我々は、カスパーゼ活性をイメージングするための蛍光プローブを開発し、細胞死誘発時のカスパーゼ活性の時間変化を単一細胞で調べ、形態変化、ミトコンドリア膜電位変化との関係を検討した。

〔方法〕 蛍光特性の異なる2つの GFP 変異体の ECFP 及び EYFP の間にカスパーゼ 8/9 あるいはカスパーゼ 3/6/7 の基質となるペプチド配列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。この融合タンパク質は ECFP と EYFP が近接しているため蛍光共鳴エネルギー遷移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) を起こすが、カスパーゼによりペプチド配列部分が切断され CFP と YFP が離れると FRET が起こらなくなる。そこで 458nm 励起によって生じる 467.5-497.5 nm および 515-545nm の蛍光の強度比画像からカスパーゼ活性をイメージングした。

〔結果〕 上記融合タンパク質発現用プラスミドを作製、HeLa 細胞に発現させ、TNF- α (200 ng/ml) もしくは staurosporine (3 μ M) を添加して細胞死を誘発し、6 時間後、細胞より融合タンパク質を抽出した。抗 GFP 抗体を用いてウェスタンブロットを行なったところ、細胞死刺激による融合タンパク質の切断が確認された。また、蛍光スペクトルより FRET 効率の低下が確認され、融合タンパク質が意図した通り機能していると考えられた。このカスパーゼ活性測定プローブを HeLa 細胞に発現させ、さらに 50 nM tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) を添加しミトコンドリア膜電位のイメージングを行ない、細胞死刺激時のカスパーゼ活性とミトコンドリア膜電位の変化の同時測定を試みた。共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Zeiss, LSM510) を用い、2 分間隔で画像化したところ、TNF- α 、staurosporine 添加 1-2 時間後からカスパーゼ活性の上昇及びミトコンドリア膜電位の低下を示す細胞が現れ始めた。変化を示すまでの時間は細胞個々で異なり、6 時間以上経過しても変化を示さないものも存在した。TNF- α 刺激時は、カスパーゼ活性上昇とほぼ同時かそれより遅れてミトコンドリア膜電位の低下が観察され、カスパーゼプローブ間で大きな違いは認められなかった。一方 staurosporine 刺激時では、ミトコンドリア膜電位低下がカスパーゼ 8/9 活性の上昇より遅く観察される細胞が多く、カスパーゼ 3/6/7 活性の上昇より早く観察される細胞が多かった。以上の結果、細胞死を誘発する薬物の種類によってカスパーゼ活性化、ミトコンドリア膜電位低下の動態が異なることが明らかとなった。

4-2 血管炎と細胞傷害過程の解析

鈴木和男

国立感染症研研究所・生物活性物質部

【目的】好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全、自己抗体の産生に関与するなど、血管炎の発症要因との関連を強く示唆している。特に、活性化された好中球は、局所で、そのライソゾームに存在する myeloperoxidase (MPO) を初めとした酵素の触媒により、 O_2^- , H_2O_2 , OCl^- , NO などの傷害分子を産生して、血管内皮などの組織破壊に関与していると考えられている。なかでも、MPO は好中球抗体 MPO-ANCA の抗原分子となっており、(1-4)、血管炎発症に関与していると推定されている。また、活性化好中球や MPO-ANCA のクロナリティーが、血管炎の病態と相関していることから、 γ グロブリン治療の有効性の検討や、動物モデルを用いた発症機構の解析を検討する条件が整ってきた。そこで、*Candida albicans* 由来分子 CADS/CAWS 誘導の血管炎モデルマウスを用い、血管炎発症に関与するサイトカインの産生、血管内皮細胞の apoptosis 誘導におけるシグナルカスケードの解析を行い、血管炎発症機構を検討した。また、本モデルを用いた in vivo イメージング観察系を検討し、血管炎発症機構を解析することにした。

【材料と方法】

1) in vivo イメージング:

C57BL/6 マウスに CAWS 投与後に anti-mouseMPO を投与し、5 日後に FMLP を iv 投与し血管・血流状態をイメージング観察した。

2) CAWS 投与直後の spleen におけるサイトカインの産生を測定し、細胞 population は、FACS 解析によった。

3) 血管内皮細胞の apoptosis にかかわるシグナルの変動をウエスタンブロットにより解析した。

【結果および考察】CADS/CAWS による冠状動脈炎が誘導する条件がほぼ検討できた。また、in vivo イメージング解析のために、CAWS のほかに、anti-mouseMPO および FMLP も加えることによって腎血管傷害を誘導できた。in vivo イメージングの解析では、血流速度の低下、血流停止、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。また、CAWS 投与時の脾臓からのサイトカインの産生は、 $IFN\gamma$ 、 $IL-6$ に加え $IL-10$ が、より血管炎と連動した。さらに、内皮細胞傷害に関与する情報伝達系も解析し、 $IL-1\beta$ および $TNF-\alpha$ 誘導によって apoptosis と関連して p38-MAPK のカスケードの上昇明らかになった。本血管炎誘導モデルにおいて、CADS/CAWS が、MPO および MPO-ANCA 産生による発症誘導に不可欠であることから、真菌由来分子が、血管炎発症と関わる好中球の活性化に重要な役割を担っていると考えられる。一方、モデルマウスを用いて、大量ガンマグロブリン製剤 (IVIg) などの有効性を検討しており (5)、他の治療法を含め、治療機転や発症機構を解析する上で、in vivo イメージングをはじめとするこれらの評価法は有用であると思われる。また、現在ナノプローブを使ったイメージングも検討しており、新たな血管炎病態評価系の提供について討論したい。

【参考資料】

1. Minoshima S, et al. Nephrology 3: 527-534, 1997; 2. Ishida-Okawara A, et al. Inflammation 25: 381-387, 2001.; 3. Aratani Y, et al. Infection and Immunity 67: 1828-1836, 1999.; 4. Okazaki T, et al. Kawasaki Disease 557-558, 1987.; 5. Ihara T & Muso E. et al. Cleveland Clin. J. Med. Suppl. 69: SII-188, 2002.

4-3 糖尿病性血管障害のイメージング診断と治療への応用

関塚永一、大塩 力*、南谷晴之**

国立埼玉病院、大塩医院、慶応義塾大・理工

厚生労働省「患者数調査」平成11年によれば、糖尿病は予備軍を含めると1400万人にも及び、今後食習慣が変わらなければ、10年後には糖尿病患者が、全年代層に増加し、30代で糖尿病が発症することにもなると危惧されている。糖尿病は、慢性の高血糖が原因となり引き起こされる病気で、血液障害および血管障害を引き起こすと考えられている。しかし障害に関する機序の詳細は不明な点が多く、研究の余地は大きい。それ故にこの分野における研究は、今後の臨床治療の一助になるものと思われる。我々の研究グループでは、糖尿病における赤血球、血小板、内皮細胞などの変化をイメージング技術を用いて定量化し、糖尿病性血管障害の機序を明らかにし治療への応用を図ることを目的とした。

まず血栓形成性に関しては、*in vivo*の糖尿病ラットにおいて、光化学反応血栓モデルを用い微小循環系細動脈において糖尿病の易血栓形成性を証明した。生体内には糖尿病状態に至る過程および発症した後に様々な機能障害が誘発される。しかし易血栓形成性が示された過程には、これらのうちのような因子が関与しているかは不明である。そこで更なる研究として、血栓を形成する主要因である血管内皮細胞と血小板に焦点を絞り、*in vitro*での研究を行なった。我々の研究成果では、現在までに糖尿病患者における血小板凝集能が亢進していることが、散乱光を用いた血小板凝集能測定装置によって、糖尿病患者の血小板は小凝集塊の早期出現が示されている。また光化学反応血栓モデルを擬似した条件下において、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いて、血小板と静止接触させ接触面積のイメージングにより相互作用を検討し、糖尿病においては、血小板の影響よりも血管内皮細胞側の因子の影響が著しいことが示唆された。これより血管内皮細胞に注目し、高血糖(高グルコース)培養および高CML-AGE培養によるHUVECへの酸化ストレスに注目し、活性酸素による機能障害を検討した。糖尿病では活性酸素による機能障害が著しく、その関与は高血糖よりも高CML-AGEにおいて著しいことが示された。

微小循環においてその径よりも細い径の毛細血管を変形しながら流れる赤血球において、赤血球変形能の低下は微小循環系における酸素供給に重篤な影響を与える。糖尿病における血液レオロジー異常のひとつとして赤血球変形能の低下はよく知られており、これまでに我々は、超高速度高感度デジタルカメラシステムと半導体エッチング技術によるガラス毛細管モデルを用い、画像相関法による解析により糖尿病状態の悪化に比例した赤血球変形能低下を証明している。また、原子間顕微鏡を用いて、直接個々の赤血球弾性の上昇を証明し、赤血球変形能とその弾性特性に深い関わりがあることを示した。さらに赤血球の *resealed ghost* を作成し赤血球膜のみに依存した弾性特性を計測するための手法を確立し、硬化処理を行った *resealed ghost* においてヤング率が上昇したことより赤血球膜のみに依存したヤング率を計測できることを確認した。また、赤血球と *resealed ghost* を比較し、赤血球の方がヤング率が高かったことより、赤血球内部の状態によって赤血球の弾性特性が変化することがわかった。赤血球ヤング率は赤血球膜・内液の双方の影響を大きく反映していることが示唆された。

4-4 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

南谷 晴之
慶応義塾大学大学院基礎理工学専攻・生体医工学研究室

【はじめに】 ナノテクノロジーは、超微細なレベルで原子、分子を操作したり、微小な粒子や機械を作製する技術であるが、バイオ・医療技術と組み合わせたり、光・イメージング技術との融合により生体の分子・オルガネラ・細胞レベルの構造や機能を詳細に解析することが可能であり、細胞・臓器疾患の診断や治療に役立つ新しい応用分野として“ナノメディシン”が誕生しつつある。本稿では微小循環障害に関わる血球細胞と内皮細胞の働きについて、超極限分子プローブである蛍光・燐光発光分子と光・イメージング技術を用いて解析した成果を報告する。

【ナノプローブとバイオイメージング】 微小循環研究では自明のことであるが、対象を顕微鏡下に展開し、目標となる細胞・オルガネラ等の形態・動態を可視化することが重要である。その際、フルオロフォア分子、ポルフィリン化合物、蛍光蛋白 GFP、量子ドット、磁気微粒子などの超極限分子プローブ（ナノプローブ）を生体中に局所投与して、脳・肝・腎、等の臓器微小循環における血流・酸素代謝機能や腫瘍・糖尿病・血栓症などの病態における微小循環障害を分子・細胞レベルでイメージング解析して、障害・再生・治癒機構を解明することが多い。生体分子やオルガネラと結合したナノプローブを使うことにより超微細な1分子イメージングやイオン種イメージングが可能となるが、超高感度超高速カメラ、高速走査型共焦点レーザー顕微鏡、2光子励起蛍光顕微鏡、近接場励起蛍光顕微鏡、等の新しいイメージングシステムが利用される。

【微小循環障害と組織傷害の分子メカニズム解析】 身近な対象として赤血球変形能と微小循環障害、糖尿病性血管障害・血小板血栓形成、血管炎の分子機構、虚血脳組織におけるレドックス制御の分子機構に対するナノプローブ・ナノイメージング解析とその応用が考えられる。光感受性物質の光化学反応は、活性酸素産生に伴う血流遮断効果（血栓形成）と殺細胞効果（apoptosis 発現）のメカニズムを解明するのに重要な手法となる。筆者らは、まず糖尿病性最小血管症(Microangiopathy)に関わる赤血球変形能と弾性特性についてラット腸間膜毛細血管を対象とする *in vivo* 実験とガラス透過性マイクロチャネルフローシステムを使った *in vitro* 実験によって検討した。糖尿病赤血球は糖化による膜弾性の硬直化と HbA1c の増加などが原因となり細胞膜ヤング率の増加と変形能の著しい低下が認められた。つぎに糖尿病における易血栓性を光化学反応を利用した急性動物実験モデルによって検討した結果、糖尿病発症による血小板粘着能・凝集能の亢進、白血球の粘着能の亢進、血管内皮細胞障害の亢進などにより血栓形成・血流遮断が早期に起こることを確認した。*in vivo* 系蛍光イメージングで血流遮断効果における活性酸素の関与・白血球の粘着・血小板の膠着・接着因子の検討を行い、また *in vitro* 系で関与の著しい活性酸素種の同定、内皮細胞の形態変化・アクチン重合・tight junction の喪失、好中球・血小板の内皮接着性の亢進を検討した結果、重要な知見を得た。さらに、FITC 標識赤血球と Pd ポルフィリンを使い2波長光励起により脳・肝臓等の実質臓器の微小循環血流と酸素分圧を同時計測し、虚血、出血性ショックおよび血液再灌流時の血流動態の解析に成功した。この方法は無侵襲に対象臓器の血流と酸素代謝を計測するのに有効である。

4-5 ナノプローブ GFP による神経細胞再生因子の動的解析

霜田幸雄

東京女子医科大学 総合研究所 研究部

神経系の再生に関して神経幹細胞、胚性幹細胞などの幹細胞あるいは骨髄間質細胞などを用いた再生実験が多くなされている。また、神経軸索の再生についても成長阻害因子などを含めた再生機構の解析がすすめられている。本研究は軸索の再生に関与する物質の解析と再生の機構を解析することを目的に行っている。

神経軸索の再生は魚類網膜の視神経束を用いて実験を行った。魚類網膜の視神経は、ほ乳類の視神経と異なり眼球への動・静脈血管が視神経束の外側に存在する。したがって、顕微鏡下で視神経束だけを切断することができるため、網膜を生かさせて切断後の視神経の動態を観察することが比較的容易にできる。実験にはコイおよびウグイを用いた。MS-222 による麻酔下で視神経を切断し、軸索の再生を経時的に電子顕微鏡にて観察した。興味のあることに視神経の再生は光刺激の影響を受けることが解った。明暗の状態を 12 時間交替で繰り返した場合には、視神経切断後 1 週間で組織上はほぼ 100% まで再生した。一方、全暗黒中に置いたコイでは同時期においても再生した神経は 20% 未満であった。このように組織学的には軸索の再生を見ることができた。現在、TOFMS により軸索再生に関与する物質の解析と GFP による物質の動態を明らかにすることを試みている。また、網膜神経節細胞は眼から中枢への情報伝達の最終経路であるから光により膜電位が変化していることは容易に想像できるが、その膜電位変化と軸索の再生の促進がどのように関連しているのかについては非常に興味を持たれるが未だ不明である。

一方、神経突起の成長を促し神経細胞の生存を維持する作用のある因子として NFG (neuro growth factor) が知られている。軸索の再生に NGF が作用するかどうかを知るために培養神経芽細胞を用いて実験を行った。NFG 存在下および非存在下で培養したマウス神経芽細胞に Calcein-AM を取り込ませた。Calcein-AM は生細胞で 515nm の蛍光を発するため共焦点顕微鏡で細胞の生・死を動的に観察した。培養細胞の外液に 20mM の KCl 液を投与し、培養細胞を脱分極させ、細胞内の Ca^{2+} を増加させた。この結果、NFG を加えていない培養細胞群では、Calcein-AM の蛍光は消失し細胞がアポトーシスを起こしたと考えられた。一方、NFG を加えた培養細胞群ではほとんどの細胞で Calcein-AM の蛍光は消失することは無くまた、KCl 投与前と比べて形態的な変化も見られなかった。したがって、この細胞群ではアポトーシスは起こしていないと考えられた。以上のように NFG は神経突起の成長を促進し細胞の生存を維持することが示された。現在、NFG を切断した神経軸索に投与し軸索の再生に対する効果を検討している。

4-6 ミクログリアをもちいた脳疾患の非侵襲的画像診断と治療法

○澤田 誠、鈴木 弘美
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

ミクログリアはマクローファージ様の中枢神経系細胞で、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか、脳内サイトカインネットワークの中心的な細胞である。これまでミクログリアの起源は周産期に脳内に侵入した単球が特殊化して分化すると考えられてきた。しかし最近の我々の研究からマクローファージ欠損マウス脳に正常とほぼ同数のミクログリアが存在することやミクログリアが骨髄で造血が起こるより早い発生の段階から脳内に存在することが明らかとなり、ミクログリアは骨髄で分化したマクローファージとは異なる細胞起源をもつと考えられる。さらに、我々は脳に対する親和性や脳に浸潤できるか否かについてマクローファージとミクログリアが決定的に異なることを示した。この性質を利用して精製ミクログリアに外来遺伝子を導入し、これを末梢血管投与して脳に目的遺伝子を発現させることができるようになった。また、GFP 恒常的発現ミクログリアを導入した場合、導入後数ヶ月にわたって脳内に GFP 陽性ミクログリアが観察できることから、外来性ミクログリアの一部は脳に侵入後内在性ミクログリアと同様に脳に生着し続けることがわかった。したがって、疾患遺伝子を補償するように遺伝子操作を加えたり、あらかじめ薬物を取り込ませたミクログリアを血管内に注入することによって、脳をターゲットした遺伝子治療やドラッグデリバリーシステムとして利用できると考えている。

一方、脳内でのミクログリアの役割については、神経細胞の変性にともなって活性化ミクログリアの集積や増殖が観察されることや、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患でミクログリアが活性化していることなどから、神経細胞の変性や生存維持に対する作用が注目されている。我々はミクログリアに性質の異なったサブタイプが存在し、また、サブタイプの性質を保持していると考えられる複数の株化細胞の樹立に成功した。これらのサブタイプの培養下での性質は必ずしも neurotoxic ではないことがわかってきた。そこでミクログリアが脳特異的に移入する性質を利用して一過性前脳虚血を起こした砂ネズミ血管にミクログリア導入を行い、遅延性神経細胞死が見られる海馬 CA1 領域の錐体細胞層に標識ミクログリアが集積することを見いだした。この時、内在するミクログリアも海馬の広範囲に渡って集積活性化が観察できた。さらに、ミクログリアを脳内導入した場合や虚血再還流直後にミクログリアを注入した場合においては有意に CA1 錐体細胞の神経細胞死が抑制されることがわかった。したがって、ミクログリアは神経変性に対してこれまでの考えとは反対に保護的に作用している可能性が考えられる。

これらの新規なミクログリアの性質を利用して、MRI の陰性造影効果があるマグネタイト微粒子を取り込ませたミクログリアを末梢血管に投与すると脳に特異的に侵入しさらに神経変性部位に集積するので、高感度で非侵襲的なモニタリングができると考えられる。我々はこれまでにヒト診断用の MRI をもちいてミクログリアの脳内移行を検出することに成功している。

厚生労働科学研究費萌芽的先端医療医療技術推進研究事業

ナノメディシン分野

「超極限分子プローブによる組織傷害の再生・治癒機構の解析
と高精度局所診断技術の開発」

研究報告会

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
—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—」

抄 録 集

日時：12月7日（火）9時～17時30分

会場：国立国際医療センター・国際医療協力研修センター5階大会議室

プログラム

9:00~10:20 「ナノプローブ・バイオイメーシング技術と生体のナノフィールド探索 (I)」

司会 鈴木和男 (国立感染症研究所)

1. 「ナノメディシンとバイオイメーシング」 南谷晴之 (慶應義塾大学理工学部)
2. 「真核生物翻訳終結因子の構造と終止コドン認識機構」
村松知成 (理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)
3. 「神経損傷と神経再生因子の解析」 霜田幸雄 (東京女子医科大学総合研究所)
4. 「ストレス応答・細胞死情報伝達過程のバイオイメーシング」
朽津和幸 (東京理科大学理工学部応用生物科学科)
5. 「活性型マイクログリアの In Vivo イメーシング」
鈴木弘美 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)
6. 「高感度³¹P NMR プローブの開発と生きた細胞への応用」
田之倉 優 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

(休憩 5分)

10:25~11:40 「ナノプローブ・バイオイメーシング技術と生体のナノフィールド探索 (II)」

司会 田之倉 優 (東京大学大学院)

7. 「細胞組織動態の解析に向けた軟X線顕微鏡技術開発」
眞島利和 (産業技術総合研究所光技術研究部門)
8. 「薬物の電界放出に最適ナノポソーム微粒子系の開発」
松村英夫 (産業技術総合研究所光技術研究部門)
9. 「量子ドットの生物・医療応用と安全性への問題点」
山本健二 (国立国際医療センター研究所)
10. 「1分子イメージングでタンパク質の機能を探る」
船津高志 (東京大学大学院薬学系研究科)
11. 「ペルオキシナイトライトにより誘導される神経細胞死に対するネオエキヌリンAの防御作用」
新井孝夫 (東京理科大学理工学部応用生物化学科)

11:40~11:45 (休憩 5分)

11:45~12:20 特別講演 1 「血液脳関門を壊さない脳標的化 DDS」

澤田 誠 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

司会 眞島利和 (産業技術総合研究所)

12:20~13:10 昼休み

13:10~13:55 特別講演2「毛細管機能のフィジオミックな探索」

梶谷文彦(岡山大学大学院医学研究科)

司会 南谷晴之(慶應義塾大学工学部)

13:55~14:40 特別講演3「赤血球による微小循環機能制御機構と病態—メタボローム解析技術による探索—」

末松 誠(慶應義塾大学医学部医化学教室)

司会 関塚永一(国立病院機構埼玉病院)

14:40~14:50 (休憩10分)

14:50~16:50 シンポジウム「ナノバイオイメーシングによる細胞・組織障害の機能解析—血管炎と微小循環障害における分子生理機能を解き明かす—」

司会 川西 徹(国立医薬品食品衛生研究所)、新井孝夫(東京理科大学工学部)

12. 「糖尿病における血球と微小循環系の障害」 関塚永一(国立病院機構埼玉病院)

13. 「ナノイメーシングの新技术で血管炎発症初期の分子機構を解明する」

鈴木和男(国立感染症研究所生物活性物質部)

14. 「Th1/Th2細胞分化と気道炎症制御」

中山俊憲(千葉大学大学院医学研究院)

(休憩5分)

15. 「細胞障害メカニズムのイメージングプローブ：血管組織、内皮細胞、HeLa細胞等への応用」
川西 徹(国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部)

16. 「 α -NOヘモグロビン含有赤血球の出血性ショックに対する微小循環改善効果」

塚田孝祐(慶應義塾大学医学部医化学教室)

17. 「酸化ストレスに基づく微小循環障害のマルチフォトニックイメージング」

南谷晴之(慶應義塾大学工学部)

16:50~17:20 総合討論「ナノメディシンとバイオイメーシング」

司会 鈴木和男(国立感染症研究所) 南谷晴之(慶應義塾大学工学部)

主催：厚生労働科学研究費萌芽的先端医療技術推進研究事業ナノメディシン分野・南谷班
社団法人日本バイオイメーシング学会

後援：財団法人医療機器センター

問合せ先：慶應義塾大学工学部南谷研究室(電話・FAX：045-566-1612)

ナノメディシンとバイオイメージング

南谷 晴之 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻

平成 14 年度から 3 ヶ年に亘り、厚生労働科学研究費萌芽的先端医療技術推進研究事業ナノメディシン分野の研究助成を受け、「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」に取り組んできた。本課題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。リポソーム誘導型蛍光標識モノクローナル抗体、GFP 変異体、磁気ナノ粒子を包含するリポソーム粒子、量子ドット、高効率蛍光・燐光プローブなど超極限分子プローブ（ナノプローブ）の新規開発を行うとともに、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。また、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って誘発される種々の組織・細胞障害のメカニズムを分子・細胞レベルで解析・診断するとともに、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診断治療への応用する、いわゆる Translational Research を展開してきた。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ニ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。今後、更なる継続研究をふまえて人類に貢献する技術と種々の機器開発を行うことを誓いたい。

真核生物翻訳終結因子の構造と終止コドン認識機構

村松 知成

理化学研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ

遺伝情報の翻訳過程において、終止コドンを経験する因子は tRNA ではなく、ポリペプチド鎖終結因子(翻訳終結因子, Release Factor, RF)と呼ばれるタンパク質である。原核生物では 2 種類の RF が分担して終止コドンを経験している (RF1:UAA と UAG, RF2:UAA と UGA)のに対し、真核生物では 1 種類の因子 eRF1 がすべての終止コドンの認識を行っている。通常(普遍暗号では)、終止コドンは UAA, UAG, UGA の 3 種類であり、UGG はトリプトファンのコドンで終止コドンではないので、eRF1 のコドン認識は URR(R=A または G)という単純な様式では説明できず、したがって、その認識機構にも何らかの特殊なしくみが存在するはずである。すなわち、eRF1 は URA コドンを経験するので、このタンパク質上のコドン 2 字目認識部位はプリン塩基(R)特異的結合を行っているはずである。同様に、コドン 3 時目認識部位もプリン塩基特異的結合を行うはずであるが、この 2 つの結合(認識)は独立ではなく、相互作用がある。(そうでないと、UGG を排除できない)。

本研究は、この特殊な認識を可能としているメカニズムを明らかにすることを目的とするものである。まず、変則的終止コドン使用を行っている織毛虫類を含む各種真核生物 eRF1 のアミノ酸配列を比較し、終止コドン認識に関与する部位を推定した。これらは、すでに報告されていたヒト eRF1 の結晶構造上では、ドメイン 1 の先端部分に存在していた。そこで、この領域の立体構造を詳細に検討し、UAA, UAG, UGA の 3 種の終止コドンを経験し、トリプトファンのコドン UGG を排除しうる eRF1 のコドン認識メカニズムモデルを提案した。この仮説では、3 種類の終止コドンに対応するために、この部分が立体構造上いくつかの構造をとりうる柔軟性を持ち合わせていることを予測している。その動的性質(ダイナミクス)を調べるために、ヒト eRF1 ドメイン 1 の発現・精製系を作成した。その ^{15}N -および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -標識体を調製し、三核三次元核磁気共鳴(NMR)等の測定を行い、分離のよいスペクトルを得ることができた。これまでに、主鎖の帰属を終了した。現在、側鎖の帰属を行い、溶液中での立体構造を解析するとともに、各残基の運動性を解析し、上記モデルの検証を行っているところである。

この研究は、東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻田之倉優教授と共同研究で行っている。

神経損傷と神経再生因子の解析

霜田 幸雄 東京女子医科大学 総合研究所 研究部

【序】 神経系の再生に関して神経幹細胞、胚性幹細胞などの幹細胞あるいは骨髄間質細胞などを用いた再生実験が多くなされている。本研究は神経軸索の再生に関与する物質の解析と再生の機構を解析することを目的に行った。すでに報告しているように、魚類の視神経は完全に切断された状態でも形態的には1週間ほどで再生することが認められている。軸索が比較的短時間に再生することから、再生に関して切断部から細胞体に対して「軸索損傷」のシグナルが伝えられていることが推察された。切断端で生じる最初の現象の一つには損傷電流による脱分極があるが、この脱分極が神経の再生に対して影響を及ぼしているとは考えにくい。次に、切断端から何らかの物質が放出あるいは合成され、これが細胞体に運ばれることが考えられた。本研究は、切断後の神経軸索により、このような物質の存在の有無をTOFMASを用いて検証した。この結果、切断した神経軸索から分子量約12,000の物質が検出された。また、この物質は時間と共に細胞体に近い方で検出された。以上のことから、神経軸索の切断端から損傷による物質が細胞体に向かって移動することが示唆された。

【方法】 魚類の眼は視神経の再生を観察するのに有利な形態的特徴を持っている。ほ乳類などでは眼球内を還流する動脈および静脈は視神経束の中を走行しているが魚類では視神経束の外側を視神経に平行して走行している。したがって、血管を残し視神経だけを切断することが容易であり、網膜を含めた眼球を損傷させることがない。実験には体長15cm前後のコイ(*Cyprinus carpio*)を用いた。動物を冷血動物用の麻酔薬FDA100(田辺製薬)にて麻酔させ、眼球をわずかに引き出し、眼球から約4mmの部位で視神経を切断した。その後、水槽に戻し飼育した。切断後の軸索内の物質の同定とその物質の移動を目的としたため術後一定の時間間隔で視神経を摘出して解析を行った。切断直後の眼球と視神経を摘出し、視神経切断端から約1mm毎に切り、それぞれの切片を直ちにマトリックス溶液に浸し、MALDI-TOFMAS(島津製作所)によって解析を行った。また、視神経を切断していない(正常に近い状態)軸索の解析のために断頭後約1時間経ってから摘出した軸索についても同様に解析を行った。

【結果と結論】 視神経切断後、約2時間飼育したコイの眼球を視神経とともに摘出し切断端から1mmの部分で切り取り試料とした。切断端付近の視神経には分子量約12,000のピークが出現した。この大きさの分子は切断された視神経に特徴的に現れた。神経切断後、視神経における、この分子の出現部位を調べてみた。切断後、2時間経過した辞典では、切断端からおよそ1mm離れた部分の視神経束(細胞体に近い側)で記録することができた。すなわち、この分子は切断端から細胞体側に向かう軸索流によって移動していることが示唆された。細胞体が存在する網膜のマスマスペクトルを記録したが、分子量12,000前後の明瞭なピークは見られなかった。これは、神経節細胞だけを分離して計測するのが技術的に困難であり、網膜全体を試料として計測せざるをえなかったため、おそらく、このような大きさの分子が多数存在すると思われる、目的の分子と区別することができなかったためと考えられる。一方、断頭して1時間経過した後に網膜および視神経を摘出して、同様の実験を行い、マスマスペクトルを記録した。200から20000の分子量を観察したが10000以上の分子のスペクトルはほとんど記録されなかった。

【考察】 形態的な観察では視神経の再生の時間経過は魚類の網膜ということも考慮しても早い時期に起きており切断後(損傷後)1週間以内には再生が始まっていることが示されている。この再生が始まる前、すなわち切断後2~3日で神経細胞は変性を起こしている。TOFMASによる分析では、この時期に分子量12,000の物質が出現し、軸索流に沿って細胞体側に運ばれるものと考えられた。また、この分子は細胞が生存中には存在することはなく、切断という損傷によって出現するものと考えられた。ただ、魚類の網膜は有髄神経であり、軸索は全てグリア細胞により覆われている。したがって、この物質が軸索から出てくるものか、あるいはグリア細胞が関与している可能性についても検討する必要があると考えている。また、分子そのものの構造については現在SDS-PAGEなどにより解析中である。

ストレス応答・細胞死情報伝達過程のバイオイメーjing

朽津 和幸 東京理科大学 理工学部 応用生物科学科

生体は病原菌の感染に代表されるストレスを感知して情報を処理・伝達し、活性酸素分子種(ROS)の発生や、プログラムされた自律的な細胞死(PCD)を含む防御応答を誘導する。しかし ROS の生成や PCD の制御等のストレス応答・PCD 情報伝達系が変調をきたすと、逆に組織障害の原因となる。近年の研究により、自然免疫系に代表されるストレス応答のシステムは、動植物を含む広範な真核生物に存在し、共通の機構から進化してきたことが明らかになりつつある。多様な生物のストレス応答制御機構を解明することは、組織障害の分子機構を解明するための重要な基礎となると期待される。

情報伝達の複雑なネットワークを解明するためには、シグナル分子の時間的、空間的動態を生きたまま捉えることが鍵となる。近年のレーザー・画像解析等の技術革新に伴い、バイオイメーjing技術の発展が著しく、顕微鏡はもはや構造を観察する道具ではなく、生きたままの細胞内で働く分子の機能的な情報を得る道具として活用できる。そこで本研究では、ストレス応答過程における細胞内のシグナル分子の動態を生きたまま可視化する技術を開発することを試みた。

ホルモン等の一次性シグナル伝達分子が細胞膜上の受容体で認識された後、細胞内で情報が処理・伝達される機構を解析するためには、特異的な分子プローブを用いて可視化解析を行うことが有効と考えられ、その方法論の開発が重要な課題である。そこで、植物のストレス応答の鍵を握るホルモン(アブシジン酸 ABA)をビオチン化した誘導体(bioABA)を合成し、蛍光ラベルされたアビジンを用いて、細胞表層の受容部位を三次元的に可視化したところ、bioABA 結合部位が細胞膜上にパッチ状に点在することが明らかとなった。フローサイトメトリーを用いた実験系を確立し、蛍光を定量的に解析したところ、bioABA の結合は、無標識の ABA の添加により濃度依存的に阻害され、事前のプロテアーゼ処理により抑制された。生理活性のある ABA の構造類縁体は bioABA の結合を阻害したが、活性のない類縁体は阻害しなかった。一方、ABA 共存下で ABA 活性を阻害した類縁体は、bioABA の結合を阻害した。これらの結果は、ABA を特異的に認識し情報を受容するタンパク質が細胞膜上に点在することを示唆している。

植物は免疫系を持たないが、病原菌の感染を認識し、生体防御応答を誘導する。この際、感染部位の細胞が自律的な細胞死を誘導すると同時に、周辺の組織で迅速な防御遺伝子発現や抗菌性物質の合成などが誘導され、病原体の増殖と拡散を阻止する。この細胞死は、動物のアポトーシスとの類似点や相違点が指摘されているが、その機構は未解明の点が多い。そこで、病原菌由来のタンパク質を感染シグナルとして認識し、高度に同調的に自律的な細胞死が誘導される実験系を構築し解析した。さまざまな特異的な分子プローブを用いた非破壊的バイオイメーjing法を確立し、細胞死に伴うオルガネラの動態を観察した結果、細胞死に先立ち短時間でミトコンドリアの還元酵素活性がほぼ完全に失活し、ミトコンドリアの膜電位の脱分極が誘導されること、典型的なアポトーシスとは異なり、細胞核は明確な構造変化を示さず、むしろ細胞死に先立ち微小管が崩壊し、液胞構造が大きく変化することが細胞死の制御に重要であることが明らかとなった。

細胞死の初期過程では、特徴的なパターンを示す Ca^{2+} の動員が膜電位変化に伴って誘導され、ROS の生成や細胞死の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。全塩基配列が決定された植物ゲノムの中に、典型的な哺乳動物の Ca^{2+} チャネルと相同の遺伝子は見出されなかったが、最近 rat で単離された機能未知の電位依存性 Ca^{2+} チャネル TPC1 と相同な遺伝子を単離し、発現抑制株を作成したところ、感染シグナル誘導性の Ca^{2+} 動員と PCD が共に著しく抑制された。この因子は、感染シグナルに対する感受性を決定し、MAPキナーゼカスケードの活性化や、プログラム細胞死の制御の鍵を握る重要な機能を果たしていると考えられる。緑色蛍光タンパク質との融合遺伝子を細胞内に導入し、一過的に発現させて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて産物の3次元的な細胞内局在性を解析したところ、蛍光は、細胞膜上に点在していた。細胞膜上の特定の部位に受容体や Ca^{2+} チャネルなどのシグナル伝達因子が複合体を形成し組織化されている可能性も考えられる。

【参考文献】 Yamazaki, D. *et al. Plant J.* 35: 129-139 (2003); Kadota, Y. *et al. Plant Cell Physiol.* 45: 160-170 (2004); Karita, E. *et al. Plant Cell Physiol.* 45: 1371-1379 (2004); Kadota, Y. *et al. Plant J.* 40: 131-142 (2004); Kadota, Y. *et al. Plant Cell Physiol.* 印刷中; Kadota, Y. *et al. Biochem. Biophys. Res. Comm.* 317: 823-830 (2004); Kurusu, T. *et al. Plant Cell Physiol.* 45: 693-702 (2004).

活性型ミクログリアの In Vivo イメージング

鈴木 弘美, 澤田 誠

藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療研究部門

【目的】

アルツハイマー病などの神経変性疾患、脳梗塞、脳腫瘍などの種々の脳疾患ではミクログリアが活性化し疾患部分に集積することから、神経細胞の変性や生存維持に対する関連性が注目されている。ミクログリアが、脳内において休止型から活性型に形態変化すると末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) が発現することが知られており、ポジトロン CT (PET) で PBR を画像化すれば、神経変性部分や障害の状態の診断が可能となる。今回我々は、Ethanol Injury モデルを作成して活性化したミクログリアを PBR 製剤と動物用 PET でイメージングを行った。

【方法】

8週齢雄 Wistar ラット (体重 220~260g) にペントバルビツール系薬剤を腹腔内注射で麻酔を施し、脳定位固定装置へ使用して頭部を固定した。歯科用ドリルで Bregma より右 2mm 部分に穴を開け、エタノール 8 μ l を注入し、線条体部分に傷害部分を作製しモデルとした。脳内に傷害を作製した後、3日後麻酔下に 1.5T MRI 装置にリストコイルを使用し、T2 強調像を撮像して線条体の障害の程度を評価した。術後 4 日目で麻酔下に、 ^{11}C -PK11195 12~41MBq を尾静脈注射し、動物用 PET 装置で 60 分間ダイナミックスキャンを実施した。PBR の定量的評価として、小脳を参照部位とし、線条体の normalized distribution volume (V^*)(min) を算出し、比較した。コントロールとしてエタノールを注入していないラットについても同様に動物用 PET で評価した。

【結果】

エタノールによる損傷が MRI で確認できたラットの注入側では非注入側に比べて、動物用 PET で撮像画像から PBR 結合量を定量的に観察すると有意な増加があることがわかった。また、同動物組織を用いた免疫染色ではエタノール注入側の線条体には活性化した形態を示すミクログリアを多く認め、動物用 PET の所見と一致していることから、PBR 結合の増大は活性型のミクログリアが損傷部位に集積している可能性が示唆された。

【考察】

Ethanol Injury 動物モデルにおいて ^{11}C -PK11195 と動物用 PET で PBR を画像化すると、脳内でミクログリアが活性化する状態を評価できることがわかった。ミクログリアはその細胞の性質から脳内で神経変性や細胞障害がある部位に集積して活性化されることが知られている。したがって、PET を用いて PBR 結合脳を撮像すれば脳疾患部位の非侵襲的な診断が可能となる。一方、我々は蛍光標識をしたミクログリアを血管注入した動物に一過性前脳虚血を起こして脳内に侵入したミクログリアの動態を調べたところ、外来性に脳に浸潤したミクログリアは特異的に神経傷害部位に集積することを確認している。一方、ミクログリアは高い貪食能を持つため蛍光マイクロビーズなどの人工物を効率良く取り込み細胞の標識ができる。そこで、脳に導入する前に金属微粒子マグネタイトを取り込ませたミクログリアをラットの頸動脈に注入すると、MRI により撮像することによって脳の病変部の非侵襲モニタリングにも応用できることも判った。さらに、投与前に細胞に特殊な処理を施すことで神経損傷や脱落を抑制し、神経修復を増強することも明らかになった。この性質を利用すると脳への特異的ドラッグデリバリスシステムが構築できるだけでなく、細胞導入によって神経再生、修復が可能となることが考えられる。また、今回のシステムと MRI による非侵襲モニタリングを組み合わせることによってミクログリアを用いた脳・神経系を標的化した脳疾患の診断や治療の精度や有効性を改善できる可能性があると考えられる。

謝辞

本研究は藤田保健衛生大学外山宏助教授、工藤元医師、国立長寿医療センター脳科学研究部伊藤健吾部長、旗野健太郎室長、桃崎壮太郎技師、加藤隆司室長にご協力頂きました。