

2012
No.145

ISSN 0385-1516



news

ドージンニュース

CONTENTS

•Review

新しい細胞死ネクロトーシス
～プログラムされたネクローシス～
同志社大学大学院 野口範子・山中一哲

「蛍光生物学」の最前線8-1
ゼブラフィッシュの蛍光イメージングによる
血管形成メカニズムの解析
国立循環器病研究センター
福原 茂朋・若山勇紀

「蛍光生物学」の最前線8-2
生活習慣病と生体イメージング
東京大学
西村 智

•Topics on Chemistry

光を音に変換する光音響効果を利用
した Photoacoustic Imaging
株式会社同仁化学研究所 下村 隆



CONTENTS

Review

**新しい細胞死ネクロトーシス
～プログラムされたネクロトーシス～** ●—— [1]
同志社大学大学院
野口範子・山中一哲

**「蛍光生物学」の最前線 8-1
ゼブラフィッシュの蛍光イメージングによる
血管形成メカニズムの解析** ●—— [8]
国立循環器病研究センター
福原茂朋・若山勇紀

**「蛍光生物学」の最前線 8-2
生活習慣病と生体イメージング** ●—— [12]
東京大学
西村 智

Topics on Chemistry

光を音に変換する光音響効果を利用した
Photoacoustic Imaging ●—— [17]
株式会社同仁化学研究所 下村 隆

Commercial

新製品

- 細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬 ●—— [7]
 - 二価性試薬・ビオチンラベル化剤 ●—— [16]
 - 自己組織化単分子膜作製用試薬 ●—— [20]
- 開発中
- プロテオーム解析用試薬 ●—— [19]
NTA-SAM Formation Reagent

お知らせ

フォーラム・イン・ドージン開催報告 ●—— [22]

新製品案内

*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬
Liperfluo

二価性試薬・ビオチンラベル化剤

Biotin-SS-Sulfo OSu

Biotin-HPDP

BS3

DSP

DTSSP

Sulfo-SMCC

Sulfo-AC₅-SPDP

自己組織化単分子膜作製用試薬

-アルキルホスホン酸誘導体

10-CDPA

FHPA

FOPA

FDPA

11-HUPA

11-NUPA

M-EG₃-UPA

ODPA

11-PIUPA

新しい細胞死ネクロトーシス～プログラムされたネクローシス～



野口 範子

同志社大学大学院生命医科学研究科
教授



山中 一哲

同志社大学大学院生命医科学研究科
博士課程

要旨

Apoptosis has been considered the form of programmed cell death, whereas necrosis is regarded as unregulated and non-programmed cell death. The accumulating evidence revealed that necrosis can occur in a regulated manner, which was termed as "necroptosis". We found that 24(S)-hydroxycholesterol(24S-OHC) which was one of oxysterols converted from cholesterol enzymatically in the brain induced neuronal cell death by necroptosis. Neuronal cells treated with 24S-OHC did not exhibit any of features of apoptosis, whereas they showed morphological changes like necrosis. The neuronal cell death induced by 24S-OHC was dependent on receptor-interacting serine/threonine kinase 1(RIPK1) required for necroptosis. There have been many reports showing that reactive oxygen species(ROS) are involved in necroptosis. We confirmed that ROS were not involved in 24S-OHC-induced necroptosis by showing that neither ROS generation nor lipid peroxidation was induced in 24S-OHC-treated neuronal cells.

はじめに

20世紀の後半まで細胞死に関するわれわれの認識はかなり画一的であった。たとえば毒蛇や毒蜘蛛などの毒素の作用により細胞が死んでいく様を表わし、これを“壊死”と呼んでいた。そして、病理組織標本で観察される死んだ細胞の痕跡をまた“壊死”といい、病理学においてはこれとほぼ同義語として“ネクローシス”という言葉が用いられてきた。20世紀の後半に入って、多細胞生物が正常な発生や恒常性の維持のために、必要に応じて特定の細胞を細胞死に導く機構を備えていることがわかり（プログラムされた細胞死）、われわれの細胞死に対する考え方や捉え方は大きく変化した。“アポトーシス”という言葉が使われるようになり、プログラムされた細胞死に関する研究は大変な勢いで進んだ。しかしその一方で、細胞死について混乱や誤解が生じている場合も少なくない。そして21世紀に入つてもなお、新しい細胞死の存在が報告されている。本稿では、まだ議論のあるところや、充分解明されていない部分も含めて、細胞死についてその概念とわれわれの認識の変遷をまとめた上で、近年提唱された細胞死“ネクロトーシス”について概説する。

アポトーシスとネクローシス

細胞死の種類について分類し、それぞれの生理学的、病理学的意味がさかんに議論されるようになったのは、1972年にKerrらによって“アポトーシス：プログラムされた細胞死”が報告されてからである¹⁾。実は、その数年前に、プログラムされた細胞死の存在はすでに確認されていたが²⁾、やはり注目されたようになったのは、アポトーシスという言葉とともにその概念や特徴についての報告がされて以降になる。細胞死の形態学的分類がSchweichelらによって初めておこなわれたのは、翌年1973年のことで、このときは、細胞死はType I “heterophagy”、Type II “autophagy”、そしてType III “without digestion”の3種類に分けられた³⁾。これらは後に、アポトーシス、オートファジー(autophagic cell death)、そして、ネクローシスに相当するもの

として改めて認識されることになる⁴⁾。アポトーシスとネクローシスの最も重要な違いは、前者がプログラムされた細胞死で、後者がプログラムされていない細胞死という点であろう。言い換えれば、アポトーシスは制御可能であるが、ネクローシスは制御困難ということになる。これは医学的大変魅力のある概念で、遺伝子レベルでプログラムされている細胞死のメカニズムがあるならば、そのメカニズムを知ることによって細胞死を制御して疾患の発症や進行を抑制することができる意味している。このため、アポトーシスを誘導する化合物（刺激）、それを受け取る細胞の受容体、遺伝子発現やタンパク質合成に関係するシグナル伝達等々、アポトーシスに至るメカニズムについてさかんに研究されて多くのことが明らかになってきた。アポトーシスの形態学的な特徴はネクローシスとの対比において明確に示されている（表1）。それぞれの特徴を模式的に図1に表わした。アポトーシス細胞は、細胞膜表面の突出（blebbing）、細胞質の凝縮、核の断片化、そして核のクロマチンの辺縁化などがみられる。ネクローシス細胞では、細胞小器官の膨潤、細胞質の透明化、核の凝縮、そして細胞膜の破綻などが観察される。これら形態学的な特徴に

表1 細胞死の特徴

特徴	アポトーシス	ネクローシス	ネクロトーシス
細胞形質膜の blebbing	○	×	×
細胞質の凝集	○	×	×
核の断片化	○	×	×
クロマチンの辺縁化	○	×	×
細胞小器官の膨潤	×	○	○
細胞質の透明化	×	○	○
細胞形質膜構造の破綻	×	○	○
DNA の分断	○	×	×
細胞表面への PS の表出	○	×	×
カスバーゼの活性化	○	×	×
ATP の減少、枯渇	×	○	○
RIPK1/RIPK3 の活性化	×	×	○

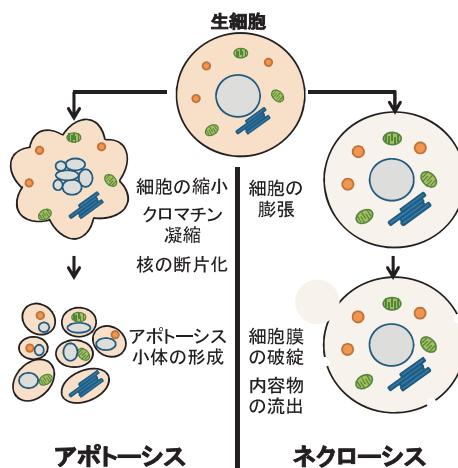


図1 アポトーシスとネクローシスの形態的特徴
ネクロトーシスは形態的にはネクローシス様を示す。

加えて、生化学的、細胞生物学的アプローチにより、アポトーシスとネクローシスの特徴が明らかにされている（表1）。アポトーシス細胞では、DNAの分断、細胞膜表面へのホスファチジルセリン（PS）の表出、そして種々のカスパーゼの活性化がおこる。アポトーシスを誘導する多くの種類の化合物が知られており、活性化されるカスパーゼの種類も異なる⁵⁾。アポトーシスについては他の総説に詳しいので参照いただきたい⁶⁾。ネクローシスの細胞ではこれらの特徴は見られず、その一方で、ネクローシス細胞では細胞内のATPが減少するが、アポトーシスでは減少はみられないとされている⁷⁾。アポトーシスとネクローシスは形態（構造）的、機能的両面において対比して論じられ、それぞれ、プログラムされた細胞死とプログラムされない細胞死の代名詞のように捉えられてきたといってよいだろう。

しかし、Schweichelらも気づいていたように、細胞が死ぬ過程において形態学的な観察が詳細におこなわれる中で、細胞の中に特殊な膜構造体が形成される場合があることが判明した。これをオートファゴソームと名づけて、オートファゴソームが形成される細胞死をオートファジー（autophagic cell death）と呼ぶようになった³⁾。オートファゴソーム形成に関わるタンパク質、そし

てこれらをコードする遺伝子についても次々と明らかにされ、オートファジーもまたプログラムされた細胞死として、その細胞学的意味について研究がさかんに進められている⁸⁾。北中は「プログラム細胞死研究＝アポトーシス研究」と捉えられがちであることについて異議を唱え、その原因を解説している⁹⁾。

ネクロトーシス

オートファジーに関する研究とは別に、「プログラムされた細胞死＝アポトーシス」「プログラムされない細胞死＝ネクローシス」という分類に疑問を呈する実験結果が報告された。TNF α はこれに対する受容体もわかっており、アポトーシス研究によく用いられていた。Lasterらは細胞をTNF α で処理して細胞死を誘導した場合、細胞の種類によってアポトーシスの形態を示すものとネクローシスの形態を示すものがあることに気づいた¹⁰⁾。この発見はネクローシスがただ単に偶発的に起こるものであるという概念を揺るがすものであった。これに続くいくつかの報告は“プログラムされたネクローシス”という概念を生み出すことになり¹¹⁾、そして、2005年にDegterevらによって、この細胞死に“ネクロトーシス”という名前が付けられた¹²⁾。2005年以降、ネクロトーシスに関する論文の数は急速に増加し続けている（図2）。

ネクロトーシスは形態学的にはネクローシスとほぼ同様の特徴を示す。表1に示すように、細胞膜構造は破綻し、核の凝縮がみられる。一方、アポトーシスにみられる細胞膜表面のblebbing、細胞質の凝縮、核の断片化などはみられない。そして、DNAの分断、細胞膜表面へのホスファチジルセリンの表出、そして種々のカスパーゼの活性化もおこらない。ヒトのT細胞由来のJurkat細胞をTNF α で刺激すると、細胞はアポトーシスをおこして細胞死に至ることはよく知られており、そのメカニズムも詳細に調べられている⁷⁾。図3に示すように、TNF α が細胞のTNF α 受容体に結合すると、RFK（riboflavin kinase）を介してTRADD（TNF-receptor-associated death domain）、TRAF2（TNF-receptor-associated factor 2）、TRAF5、そしてRIPK1（receptor interacting protein kinase 1; RIP1と表わされることもある）などからなるcomplex Iが形成される。これらのタンパク質はポリユビキチン化されているが、A20（TNFIP3）、cezanne（OTUD7B）そしてUSP21（ubiquitin specific peptidase）などの働きによって脱ユビ

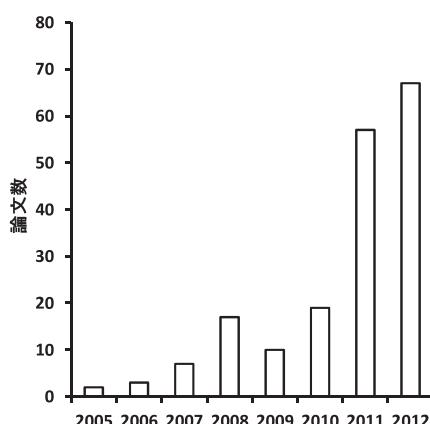


図2 ネクロトーシスに関する論文数

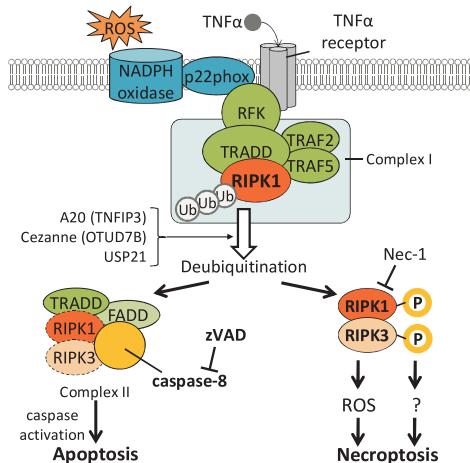


図3 アポトーシスとネクロトーシスの分子機構

キチン化されると、RIPK1はcomplex IIの形成に移行する。Complex IIはRIPK1, RIPK3, Fas-associated protein with a death domain (FADD), TRADDそしてcaspase 8で構成される。Complex IIのcaspase 8が活性化している状態にあるとRIPK1とRIPK3は活性を失い、カスパーゼ依存性の細胞死“アポトーシス”がおこるしくみになっている。このとき、カスパーゼ全般を抑制する試薬であるzVAD (benzyloxycarbonylvalyl-alanyl-aspartyl fluoromethyl ketone)で細胞を処理しておくと、細胞はネクローシス様の細胞死“ネクロトーシス”をおこす¹²⁾。この過程にはRIPK1の活性化が重要であることが示されている¹²⁾。RIPK1が活性化して自己リン酸化するとRIPK3をリン酸化して活性化することはそれ以前にも報告されていた^{13,14)}。カスパーゼを阻害すると細胞はネクローシス様の形態をとつて細胞死を起こすことは別のリンパ球系の細胞L929でも確認されている¹⁵⁾。しかし、RIPK1/RIPK3の活性化からネクロトーシスがおこるまでのメカニズムについては様々な報告があり、まだよくわからない部分も多い。

神経細胞のネクロトーシス

われわれの研究室では、神経変性疾患の発症メカニズムにおける酸化ストレスの関与に注目して研究をおこなってきた。神経変性疾患は神経細胞死が主な原因となって発症する。また、神経変性疾患と脂質代謝については注目されているものの、まだその詳細は明らかにされていない。われわれはここに着目し、コレステロールの酸化と細胞死の関係について研究を始めた。脳のコレステロール代謝は他の臓器とは異なる特殊な環境に適応したメカニズムによって制御されている。脳以外の組織では、コレステロールは細胞内の合成と食餌由来のコレステロールの両方から供給される。食餌性コレステロールはリポタンパク質に組込まれて各臓器・組織に運ばれ、逆に細胞内の過剰なコレステロールはリポタンパク質に引き抜かれて血液循環系に戻る。しかし、リポタンパク質は血液脳閂門を通ることができないため、脳はリポタンパク質からコレステロールの供給を受けることはできない¹⁶⁾。そこで、脳の細胞はもっぱらコレステロール合成を行うことによりコレステロールレベルを維持しているが、濃度が過剰になつた場合に、コレステロール自身もまた血液脳閂門を通過できない

ため、血液循環系に戻すことができない¹⁷⁾。そこで生体は、脳の細胞だけにコレステロール 24S ヒドロキシラーゼ(CYP46A1)という酸化酵素を発現して、血液脳閂門を通過できる 24(S)-ヒドロキコレステロール(24S-OHC)を産生するしくみを備えて適応している(図4)。脳で過剰になったコレステロールは 24S-OHC に変換されて血液循環系に排出される¹⁸⁾。24S-OHC はまた、核内受容体の LXR(Liver X Receptor)のリガンドや SREBP2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2)の活性化抑制因子として働くことにより、細胞の脂質代謝制御に関わっていることが知られている^{19,20)}。

その一方で、アルツハイマー病(AD)の発症に 24S-OHC が関わることが示唆されている。たとえば、患者の血漿や脳脊髄液で、24S-OHC の上昇がみられる^{21,22)}。AD 患者の脳に観察される老人斑の周囲に CYP46A1 が高発現している²³⁾、そして AD 患者に CYP46A1 の活性亢進変異が見られる²⁴⁾などである。24S-OHC が神経細胞毒性を示すことも知られていたが、そのメカニズムの詳細は不明であった²⁵⁾。

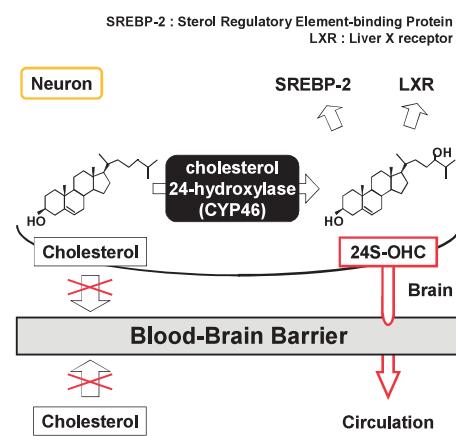


図4 脳のコレステロール代謝制御と 24S-OHC
脳で過剰になったコレステロールは血液脳閂門を透過できる 24S-OHC に変換されて、血液循環系に排出される。24S-OHC は LXR のリガンドや、SREBP2 を不活性化するなどの機能ももつ。

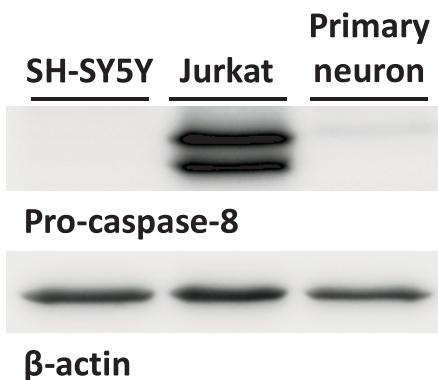


図 5 神経細胞と免疫細胞の pro-caspase 8 の発現レベル

そこでわれわれは、24S-OHC が過剰に產生されたり、循環系への排出が低下するなどにより、神経細胞に高濃度の 24S-OHC が作用して細胞死を誘導し、これが AD 発症の一因となっているのではないかという仮説のもとに、24S-OHC による神経細胞の細胞死メカニズムに関する研究をおこなった²⁶⁾。ヒトの神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞を 24S-OHC (5 ~ 50 μM) で処理すると、10 μM 以上で濃度依存的に細胞死が誘導された。細胞死の形態を観察したところ、細胞膜の構造の破綻が見られ、核の断片化はみられなかった。アポトーシスを誘導することが知られている化合物スタウロスボリン(STS)で同様に SH-SY5Y 細胞を処理すると、核の断片化が見られた。さらに、細胞膜表面へのホスファチジルセリンの表出やカスパーイゼ 3、カスパーイゼ 9 の活性化を調べたところ、STS 処理細胞ではいずれも確認できるのに対して、24S-OHC 処理細胞ではみられなかつた。オートファジーの可能性も考えられたので、オートファゴソーム形成の阻害剤 3 種類を用いて、細胞死の抑制効果について検討を行つたが、いずれの阻害剤も細胞死を抑制することはなかつた。従つて、24S-OHC が誘導する細胞死はアポトーシスやオートファジーではなくネクロシス様であることがわかつた。最初に述べたように、ネクロシスは制御できない細胞死である。これは医学的観点からみてあまり歓迎されない。そこで、もうひとつプロトコラムされたネクロシスの可能性にかけて、24S-OHC で SH-SY5Y の細胞死を誘導する際に、RIPK1 の特異的阻害剤である Necrostatin-1 (Nec-1)¹²⁾ で細胞を処理したところ、有意な細胞死抑制効果が確認できた。阻害剤だけではなく、siRNA 法を用いて SH-SY5Y 細胞の RIPK1 をノックダウンをすると、24S-OHC による細胞死はやはり有意に抑制された。従つて、24S-OHC は神経細胞をネクロシスによる細胞死に導くと結論づけた。次の疑問は、24S-OHC は神経細胞だけに特異的にネクロシスを誘導するのかどうかである。免疫系細胞である Jurkat 細胞を 24S-OHC で処理して細胞死を誘導した。細胞死は SH-SY5Y 細胞の場合とほぼ同様に濃度依存的に起つたが、細胞死の種類はカスパーイゼの活性化がみられるアポトーシスであった。なぜ同じ 24S-OHC が神経細胞にはネクロシスを、免疫細胞にはアポトーシスを起こすのか、これを決定する分子メカニズムは非常に興味深いところである。図 3 にも示したように、この 2 種類の細胞死を分ける鍵を握るカスパーイゼ 8¹⁴⁾にわれわれは着目した。SH-SY5Y 細胞、ラット胎児脳初代培養神経細胞、そして Jurkat 細胞のカスパーイゼ 8 を Western

blotting 法を用いて検出を試みた。驚いたことに、Jurkat 細胞で検出されるカスパーイゼ 8 が 2 種類の神経細胞のどちらにも全く検出できなかつた（図 5）。つまり、同じ刺激であつても、細胞の種類によって異なる細胞死がおこることがわれわれの実験系においても明確に示された。24S-OHC は免疫細胞にはアポトーシスを、神経細胞にはネクロシスを誘導するが、それを決定するのはそれぞれの細胞にカスパーイゼ 8 が発現しているか否かであることが実証された²⁶⁾。

24S-OHC による細胞死は細胞によってアポトーシスであつたりネクロシスであつたりするが、いずれにしてもプロトコラムされた細胞死である。24S-OHC が細胞に最初にどのように作用するのか、受容体を介するのか、細胞膜の構造に変化を与えるのか、あるいは細胞膜を通過して細胞内に入るのか、そして RIPK1 をどのようにして活性化させるのかなど、今後の研究課題である。

ネクロシスシグナルへの ROS の関与

RIPK1/RIPK3 活性化以降のシグナル伝達に、活性酸素 (ROS; reactive oxygen species) が重要な役割を担っていることが報告されている⁷⁾。TNF α 刺激によるネクロシス様の細胞死において、ミトコンドリアの呼吸鎖 complex I からの ROS 产生が重要であることを最初に示したのは Fiers らのグループである²⁷⁾。その後ネクロシスにおける ROS 产生のメカニズムについて多くの報告がなされてきた。活性化した RIPK3 は PYGL (glycogen phosphorylase), GLUL (glutamate-ammonia ligase), GLUD1 (glutamate dehydrogenase 1) などの代謝酵素と物理的に相互作用をしてアロステリックにこれらの酵素を活性化させる。zVAD 存在下で細胞を TNFα で刺激するときに、これらの酵素の遺伝子を siRNA でノックダウンすると、ROS の产生もネクロシス細胞死も抑制されることが示されている²⁸⁾。また、RIPK1/RIPK3 活性化は細胞質内のカルシウム濃度を上昇させ、phospholipase A2 を活性化させ、リン脂質から遊離の脂肪酸の切り出しを促進する結果、lipid peroxidation が起るとされている²⁹⁾。TNF 受容体に TNF α が結合すると、RFK が細胞死シグナルの complex I 形成に重要な働きをすることは図 3 の説明で述べた。このとき、RFK は TRADD と NADPH oxidase のサブユニットである p22phox との間を架橋し NADPH oxidase を活性化してスーパーオキサイドの产生を促す³⁰⁾。ミトコンドリアや NADPH oxidase により產生されるスーパーオキサイド (O_2^-) は SOD (superoxide dismutase) により過酸化水素 (H_2O_2) に還元されるが、鉄や銅などの遷移金属が存在すると、Fenton 反応によって最も攻撃性の高いヒドロキシラジカル (HO^-) やヒドロペルオキシラジカル (HO_2^-) が生じる。これらフリーラジカルによって脂質やタンパク質の酸化が開始されると、ラジカル連鎖反応がおこり多くのヒドロペルオキシドが產生される。これらがネクロシスの誘発に重要との見方がある。

しかしながら、すべてのネクロシスの過程で ROS が產生されるわけではないことも知られている。そこで、24S-OHC によって神経細胞に誘導されるネクロシスに ROS が関与しているかどうか、ROS を検出する蛍光プローブを用いて調べた。細胞内の ROS の検出に一般的によく用いられる DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) で処理した SH-SY5Y 細胞に、24S-OHC もしくは Cumene ヒドロペルオキシド (Cumene-OOH) を添加し、フローサイトメーターを用いて蛍光を測定した。DCFH-DA は細胞膜を透過して細胞内に入るとエステラーゼの作用を受けて DCFH (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) になり、フ

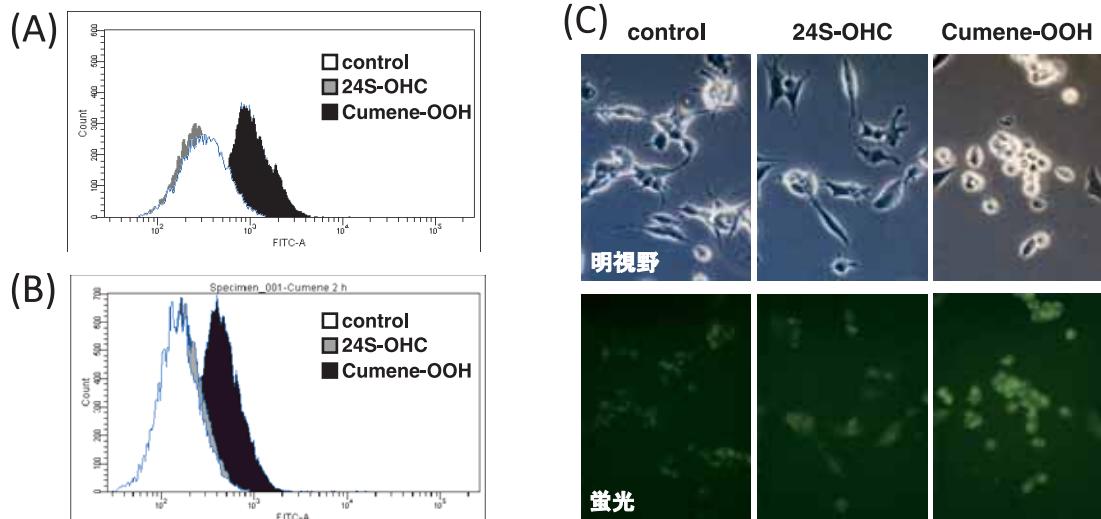


図 6 24S-OHC 刺激による神経細胞の ROS 產生
蛍光プローブを SH-SY5Y に取り込ませた後、24S-OHC (50 μM)、Cumene-OOH (100 μM) を添加した。
(A) DCFH-DA を用いた活性酸素種の検出 (B) Liperfluo を用いた lipid hydroperoxide の検出
(A)、(B) はフローサイトメーターの測定データ、(C) は明視野(上)と蛍光顕微鏡(下)観察写真

リーラジカルと反応して蛍光物質 DCF (2',7'-dichlorofluorescein) になる。Cumene-OOH を添加した細胞では蛍光が増加するのに対して、24S-OHC 添加では蛍光は全く増加しなかった (図 6 A)。上述のように、ネクロトーシスの過程で lipid peroxidation が起ることが報告されているため、当時同仁化学で開発中であった脂質ヒドロペルオキシドを特異的に検出する蛍光プローブ Liperfluo を用いて検出を試みた。Liperfluo を取り込ませた SH-SY5Y 細胞に 24S-OHC もしくは Cumene-OOH を添加したところ、Cumene-OOH を添加した細胞では蛍光の著しい増加が見られたのに対して、24S-OHC ではなく蛍光増加はみられなかった (図 6 B, C)。Liperfluo は Cumene-OOH と直接反応しないので³¹⁾、Cumene-OOH を添加した細胞内ではフリーラジカルが発生し、lipid peroxidation が進行したと考えられる。一方 24S-OHC を添加した細胞では、脂質ヒドロペルオキシドの生成がまったく起らないことが確認でき、ネクロトーシスの過程で ROS の产生はないものと結論づけた。また、24S-OHC によってネクロトーシスを誘導するときに天然ビタミン E のひとつである α -tocotrienol、ビタミン E の誘導体である BO653、別の天然抗酸化物クルクミン、鉄のキレーター deferoxamine などの抗酸化物質を添加したが、いずれの抗酸化物質も抑制効果を示さなかった²⁶⁾。これらの結果は、24S-OHC が誘導するネクロトーシスには ROS は関与しないことを示している。

今後の展望

神経細胞は免疫細胞とは異なり、caspase 8 の発現を抑えてアポトーシスが起こりにくいしくみになっている。それでもあえてネクロトーシスによって細胞死に導く機構を備えていることが明らかになってきたわけであるが、その病態生理学的意味は今後解明されなければならない。脳で特異的に產生される 24S-OHC が誘導する細胞死メカニズムについては、まだ不明な点が残されている。しかしながら、24S-OHC が RIPK1 の活性化を介してネクロトーシスを誘導することは、少なくともこの細胞死を制御でき

る可能性を示唆している。今後、24S-OHC の RIPK1 活性化メカニズムを含めて、24S-OHC によるネクロトーシスのメカニズムの詳細を明らかにすることにより、24S-OHC が関与する神経変性疾患の治療へ一歩近づくことができるのではないかと期待している。

[参考文献]

- J. F. Kerr, et al., "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *Br. J. Cancer*, **1972**, 26, 239-257.
- R. A. Lockshin, et al., "Programmed cell death - II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms", *J. Insect Physiol.*, **1964**, 10, 643-649.
- J. U. Schweichel, et al., "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues", *Teratology*, **1973**, 7, 253-266.
- G. Kroemer, et al., "Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death", *Cell Death Differ.*, **2009**, 16, 3-11.
- M. V. Fiandolo, et al., "Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis", *Exp Oncol.*, **2012**, 34, 165-175.
- S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol.*, **2007**, 35, 495-516.
- P. Vandabeele, et al., "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellule explosion", *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, **2010**, 11, 700-714.
- B. Levine, et al., "Autophagy in cell death: an innocent convict?" *J. Clin. Invest.*, **2005**, 115, 2679-2688.
- 北中千史, "Non-apoptotic 細胞死: アポトーシスとは形態・制御機構を異なるプログラム細胞死の存在と意義について", *山形医学*, **2005**, 23(1), 82-96.
- S. M. Lester, et al., "Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis", *J. Immunol.*, **1988**, 141, 2629-2634.
- F. K. Chen, et al., "A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses", *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 51613-51621.
- A. Degterev, et al., "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury", *Nature Chem. Biol.*, **2005**, 1, 112-119.

- 13) H. Hsu, et al., "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex", *Immunity*, **1996**, 4, 387-396.
- 14) N. Holler, et al., "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule", *Nature Immunol.*, **2000**, 1, 489-495.
- 15) D. Vercammen, et al., "Inhibition of caspase increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor", *J. Exp. Med.*, **1998**, 187, 1477-1485.
- 16) H. Jurevics, et al., "Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain", *J. Neurochem.*, **1995**, 64, 895-901.
- 17) I. Bjorkhem, et al., "Brain cholesterol: long secret life behind a barrier", *Arter. Thromb. Vas. Biol.*, **2004**, 24, 806-815.
- 18) I. Bjorkhem, et al., "Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}\text{O}_2$ techniques *in vivo* and *in vitro*", *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 30178-30184.
- 19) S. B. Joseph, et al., "Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **2002**, 99, 7604-7609.
- 20) A. Radhakrishnan, et al., "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **2007**, 104, 6511-6518.
- 21) D. Lütjohann, et al., "Plasma 24S-hydroxycholesterol(cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients", *J. Lipid Res.*, **2000**, 41, 195-198.
- 22) T. M. Jeitner, et al., "Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders", *Curr. Med. Chem.*, **2011**, 18, 1515-1525.
- 23) M. Shafaati, et al., "Levels of ApoE in cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive disorders", *Neurosci. Lett.*, **2007**, 425, 78-82.
- 24) H. Kölsch, et al., "CYP46A1 variants influence Alzheimer's disease risk and brain cholesterol metabolism", *Eur. Psychiatry*, **2009**, 24, 183-190.
- 25) H. Kölsch, et al., "The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells", *Brain Res.*, **1999**, 818, 171-175.
- 26) K. Yamanaka, et al., "24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis", *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 24666-24673.
- 27) K. Schulze-Osthoff, et al., "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation", *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 5317-5323.
- 28) D. W. Zhang, et al., "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis", *Science*, **2009**, 325, 332-336.
- 29) N. Vanlangenakker, et al., "Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death", *Curr. Mol. Med.*, **2008**, 8, 207-220.
- 30) Y. S. Kim, et al., "TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death", *Mol. Cell*, **2007**, 26, 675-687.
- 31) K. Yamanaka, et al., "A novel fluorescent probe with high sensitivity and selective detection of lipid hydroperoxides in cells", *RSC adv.*, **2012**, 2, 7894-7900.

[著者プロフィール]

氏名：野口 範子

所属：同志社大学大学院生命医科学研究科

職歴：1987年4月 帝京大学医学部助手

1990年2月 National Institute of Standards and Technology
(U.S.A) 客員研究員

1991年2月 東京大学工学部助手

1993年11月 東京大学先端科学技術研究センター助手

2002年4月 東京大学先端科学技術研究センター

科学技術振興特任教員：特任助教授

2005年4月 東京大学先端科学技術研究センター

産学連携研究員：特任教授

2005年4月 同志社大学工学部教授

2008年4月～現在 同志社大学生命医科学部教授

研究キーワード：酸化ストレス、細胞死、神経変性疾患、動脈硬化
趣味：犬に返事を教える

氏名：山中 一哲

所属：同志社大学大学院生命医科学研究科博士課程

職歴：2008年3月 同志社大学工学部卒業

2010年3月 同志社大学大学院生命医科学研究科

博士前期課程修了、理学修士

2010年4月～現在 同志社大学大学院生命医科学研究科

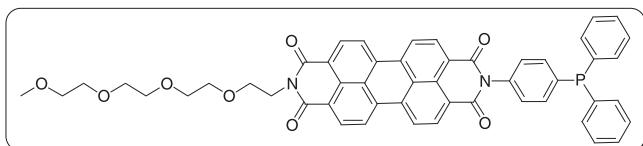
博士後期課程在籍中

2012年4月～現在 日本学術振興会特別研究員(DC2)

趣味：スキー、読書

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬

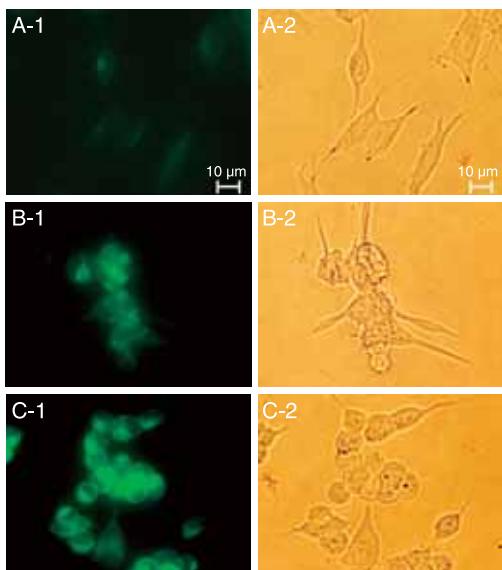
Liperfluo



<特長>

- 細胞の過酸化脂質のイメージングや検出ができる
- 長波長励起のため、細胞への光ダメージや自家蛍光の影響を軽減できる
- 過酸化脂質特異性が高い (Fig. 3)

Liperfluo は、過酸化脂質で特異的に酸化され、強い蛍光を発します (Ex 524 nm, Em 535 nm)。Liperfluo 酸化体は、水中ではほとんど蛍光を発しませんが、細胞膜等の脂溶性の高い部位では蛍光性となることから、容易に蛍光顕微鏡による生細胞の過酸化脂質のイメージングやフローサイトメトリーによる細胞の過酸化脂質量の分析に使用することができます。



(データ提供：同志社大学生命医科学部 野口範子先生)

Fig. 1 SH-SY5Y 細胞における各種薬剤刺激による過酸化脂質イメージング

薬剤による酸化ストレス刺激により明確な蛍光増加が確認できる。
(A) Control (B) AIPH (C) Cumene それぞれの蛍光及び明視野画像。
*Cumene: Cumene hydroperoxide

[参考文献]

- N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, H. Nakajima, K. Nakano and T. Imato, "Swallow-tailed Perylene Derivative: a new Tool for Fluorescent Imaging of Lipid Hydroperoxides", *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 3762.
- K. Yamanaka, Y. Saito, J. Sakiyama, Y. Ohuchi, F. Oseto and N. Noguchi, "A novel fluorescent probe with high sensitivity and selective detection of lipid hydroperoxides in cells", *RSC Advances*, **2012**, 2(20), 7894.

操作手順

- 使用細胞 : SH-SY5Y
6 well plate に播種 (6.0×10^5 cells/well)
↓ 終夜 (37°C, CO₂ インキュベート)
- Liperfluo の DMSO 溶液を添加 (終濃度 : 20 μM)
↓ 15 min (37°C, CO₂ インキュベート)
- Cumene 添加 (終濃度 : 100 μM) or AIPH 添加 (終濃度 : 6 mM)
↓ 2 h (37°C, CO₂ インキュベート)

・蛍光顕微鏡で観察 (Fig. 1)

装置 : Olympus IX-71 epifluorescent microscope

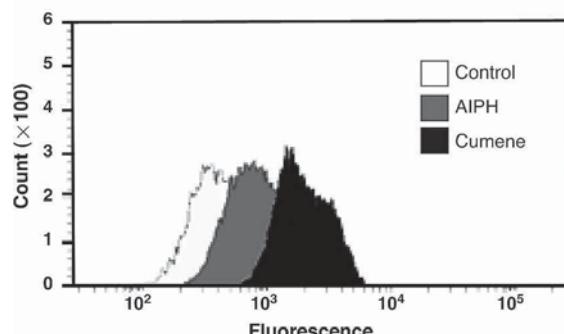
ミラーユニット : U-MNIBA3

露光時間 : 10 sec

ISO 感度 : 800

・FCM で測定 (Fig. 2)

PBS 洗浄 → PBS で回収 → FCM 測定



(データ提供：同志社大学生命医科学部 野口範子先生)

Fig. 2 酸化ストレス刺激による過酸化脂質生成のフローサイトメトリー (FCM) 解析

*Cumene: Cumene hydroperoxide



Fig. 3 Liperfluo の活性酸素種に対する反応選択性

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Liperfluo	1 set (50 μg × 5)	20,000	L248

「蛍光生物学」の最前線

8-1

ゼブラフィッシュの蛍光イメージングによる血管形成メカニズムの解析

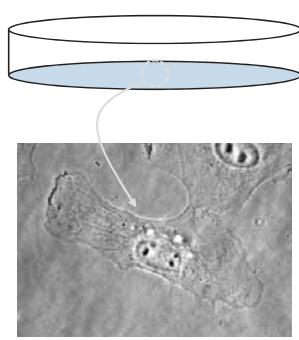
福原茂朋、若山勇紀

国立循環器病研究センター細胞生物学部

はじめに

全身に張り巡らされた血管は、組織や細胞に酸素や栄養を供給し、二酸化炭素や老廃物を回収することで、生命維持に重要な役割を果たしている。血管ネットワークは胎生期に、血球・血管前駆細胞から原始血管叢がつくられる脈管形成、次いで、既存の血管から血管枝が芽生え・伸長し、新たな血管網を構築する血管新生のプロセスを経て形成される。成体では通常、血管新生は、子宮内膜や創傷治癒など限られた部位でしか見られないが、癌や糖尿病網膜症などの疾患では、病的な血管新生の誘導により、未熟で異常な血管が形成され、病態が悪化する。血管新生において、内皮細胞は血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) などの血管新生因子に反応して、血管から出芽、遊走、増殖することで新たな血管を形成する。血管新生におけるこのような複雑な内皮細胞の振る舞いは、これまで主に、2次元環境下の培養内皮細胞を用いて、解析されてきた。それにより、血管新生に関わるシグナル分子が同定され、また、それら分子の生化学的な性質等が明らかにされてきた。しかし、血管新生は生体という3次元環境下で起こる現象であり、図1に示すように、培養皿

培養皿上の内皮細胞



生体内の内皮細胞

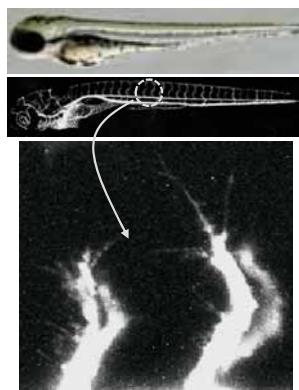


図1 (左) 培養皿上のヒト臍帯静脈血管内皮細胞。

(右) 生体における血管新生過程の内皮細胞。

血管内皮細胞に GFP を発現するゼブラフィッシュの節間血管形成過程を観察。

上の内皮細胞と生体の血管新生過程の内皮細胞は、全く異なった形態、挙動を示す。従って、血管新生における内皮細胞の振る舞いを制御する分子機序を理解するには、生きた個体の血管新生過程の内皮細胞を研究する必要がある。

近年、蛍光イメージング技術の飛躍的な進歩により、これまで生化学的にしか知ることのできなかった分子や細胞の機能情報が、生きた細胞で可視化できるようになってきた。また、二光子励起顕微鏡など顕微鏡技術の進化により、生体で個々の細胞や生体分子の機能動態を解析する蛍光生体イメージング解析が可能になりつつある。筆者らは最近、血管新生における内皮細胞の振る舞いを制御するシグナル伝達系を明らかにするため、ゼブラフィッシュを用いた蛍光生体イメージング解析を行っている。ゼブラフィッシュは、体外で受精、発生を行い、また胚が透明であるため、生きたまま生体内的組織・細胞を観察することができる。また、ゲノム情報も整備されており、遺伝子操作も簡便であるため、蛍光イメージング解析に必要な遺伝子改変ゼブラフィッシュも容易に樹立することができる。例えば、血管内皮細胞特異的な *fli1* プロモーター制御下で緑色蛍光蛋白質 (Green fluorescence protein: GFP) を発現するゼebraフィッシュでは、生きた個体のまま、血管構造を可視化することができる (図1)。筆者らは、血管新生における内皮細胞の“形態・運動”と“増殖”を制御する分子メカニズムを明らかにするため、血管内皮細胞で特異的に各種蛍光バイオセンサーを発現するゼebraフィッシュを樹立し、蛍光生体イメージング解析を行っている。本稿では、筆者らのデータを中心に、蛍光生体イメージング技術を駆使した血管新生研究について紹介する。

1. 蛍光イメージングをするための遺伝子改変ゼebraフィッシュの樹立

ゼebraフィッシュ個体で分子や細胞の機能情報を解析するため、これら情報を可視化するための蛍光バイオセンサーを発現するトランジェニックゼebraフィッシュを樹立する必要がある。そのために、筆者らは、遺伝研の川上浩一博士らが開発した *Tol2* トランスポゾン転移システムを用いている。川上博士らは、メダカゲノム中から発見されたトランスポゾン *Tol2* が、ゼebraフィッシュの生殖細胞でも転移酵素として機能することを明らかにし、ゼebraフィッシュにおいて簡便で非常に効率のよいトランスポゾン転移システムを開発した^{1,2)}。*Tol2* がコードしている転移酵素遺伝子の mRNA と発現させたい遺伝子をコードした *Tol2* ドナープラスミド DNA をゼebraフィッシュ受精卵に微量注入することで、目的遺伝子を染色体ゲノムに効率的に組み込ませることができる。また、BAC のような 100 kb 以上の大きな *Tol2* ドナープラスミド DNA も転移反応により、ゲノムに挿入することができる。

内皮細胞で特異的に蛍光バイオセンサーを発現させるためのプロモーターとして、Ets ファミリーに属する核転写因子 *fli1a* 遺伝子や VEGF 受容体 *flik1* 遺伝子のプロモーターを使用している³⁻⁵⁾。しかし、これら内皮特異的プロモーターでは、イメージング解析に十分な蛍光強度が得られない場合があり、そのようなときには、Gal4/VP16-UAS システムを用いて蛍光バイオセンサーを強発現させている⁶⁾。酵母由来核転写因子である Gal4 の DNA 結合領域とヘルペスウイルス由来 VP16 (*Herpes simplex virus protein 16*) の転写活性化ドメインを融合した Gal4/VP16 は、Gal4 結合配列 (upstream activation sequence: UAS) に結合し、その下流遺伝子の発現を強力に誘導する。これは、VP16 が非常に高い転写活性

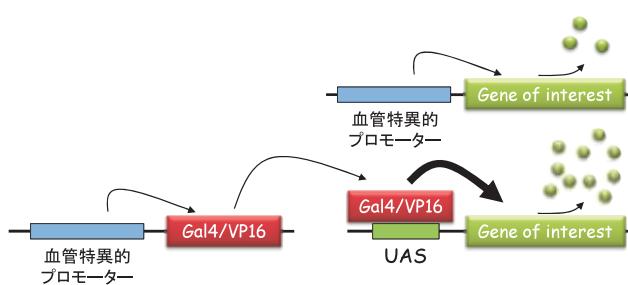


図2 (上) 内皮細胞特異的プロモーターによる目的遺伝子の発現。
(下) Gal4/VP16-UASシステムを用いた目的遺伝子の発現。

内皮細胞特異的プロモーター制御下で強い転写活性化能を有するGal4/VP16を発現するゼブラフィッシュと、UAS (upstream activation sequence) の下流で目的遺伝子を発現するゼブラフィッシュを交配することで、目的遺伝子を血管内皮細胞で強発現できる。

化能を持つためである。著者らは、内皮細胞で蛍光バイオセンサーを強発現させるため、まずflk1プロモーター制御下でGal4/VP16を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ(*Tg(flk1:Gal4/VP16)*)を樹立した(図2)。さらに、UASの下流で蛍光バイオセンサーを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを樹立し、*Tg(flk1:Gal4/VP16)*ゼブラフィッシュと交配することで、蛍光バイオセンサーを内皮細胞で高発現させた。

2. 内皮細胞の“形態・運動”を制御する細胞内シグナル伝達系の解析

血管新生において、伸長する血管の先端に位置する内皮細胞をTip細胞といふ。Tip細胞は、先導端にフィロポディア(糸状仮足)を伸ばしながら、血管新生因子を感じ、血管が伸長する方向を決定する⁷⁾。著者らは、血管新生過程のTip細胞の形態・運動能を制御する分子メカニズムの解析を行った。細胞の形態・運動能の制御には、アクチン細胞骨格系の再編成が重要である。そこでまず、血管新生過程の内皮細胞におけるアクチン細胞骨格系を可視化するため、アクチンバイオセンサーLifeact-mCherryを内皮細胞で発現するゼブラフィッシュを樹立した。Lifeactは、酵母のAbp140に由来する17アミノ酸からなるアクチン結合ペプチドで

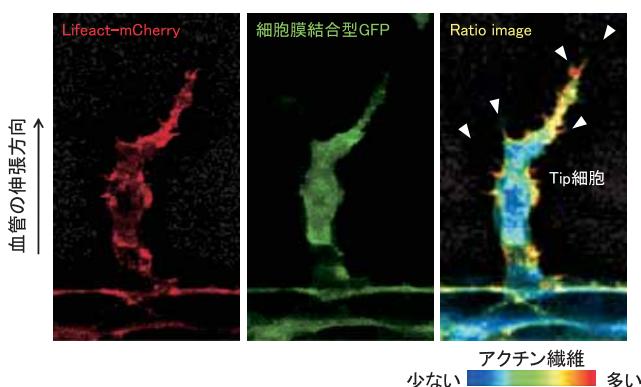


図3 血管新生過程のTip細胞におけるアクチン細胞骨格の可視化。内皮細胞にアクチンバイオセンサー(Lifeact-mCherry)および細胞膜結合型GFPを発現するゼブラフィッシュ胚の節間血管を共焦点蛍光顕微鏡で観察。アクチン繊維の局在を、mCherryとGFPの蛍光強度の比(mCherry/GFP)で示した(ratio image)。矢頭は、フィロポディアを示す。

あり、蛍光タンパク質に付加して細胞に発現させることで、生細胞におけるアクチン動態のライブイメージングが可能になる⁸⁾。図3に示すように、血管新生過程のTip細胞は、先導端で活発にアクチン重合を促進することで、フィロポディアを形成することが分かった。

Rhoファミリー低分子量Gタンパク質は、アクチン細胞骨格系の制御で中心的な役割を持つ細胞内シグナル分子である。哺乳動物には、20種類以上のRhoファミリーメンバーが存在するが、なかでもCdc42はフィロポディア形成能を有することが知られている⁹⁾。そこで、Tip細胞におけるフィロポディア形成がCdc42によって制御されているか検討を行った。そのため、京都大学松田道行教授が、蛍光(またはフェルスター)共鳴エネルギー移動(fluorescence/förster resonance energy transfer: FRET)の原理を基に開発したCdc42 FRETバイオセンサーを血管内皮細胞で発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを、Gal4/VP16-UASシステムを用いて樹立した。FRETとは、励起されたドナー分子から、近傍のアクセプター分子にエネルギーが遷移する現象である。Cdc42 FRETセンサーでは、ドナーにCFPを、アクセプターにYFPを用い、Cdc42とそのエフェクターであるp21-activated kinaseのCdc42結合ドメイン(PakCRIB)をYFPとCFPで挟んだ構造をしている^{10,11)}。Cdc42は不活性化状態ではPakCRIBに結合せず、YFP-CFP間の距離が離れているためFRETが検出されないが、Cdc42が活性化するとPakCRIBと相互作用し、それに伴ってYFP-CFP間の距離が近まりFRETが起こる。このFRETを測定することでCdc42活性を可視化することができる。松田教授は、Cdc42以外にもシグナル分子活性を可視化するFRETバイオセンサーを多数開発しており¹²⁾、その詳細は、松田研究室のホームページに記載されているので、是非一読を勧める。このCdc42 FRETバイオセンサーを内皮細胞で発現するゼブラフィッシュを用いて、血管新生過程の内皮細胞におけるCdc42活性をライブイメージングにより観察したところ、Tip細胞の先導端で形成されるフィロポディアでCdc42活性が高いことが示された(図4)。さらに、Cdc42阻害蛋白質ACK42を血管内皮細胞に発現させると、Tip細胞のフィロポディア形成および血管新生が顕著に抑制された¹³⁾。これらの結果から、血管新生因子がTip細胞に作用することでCdc42依存的にフィロポディアを形成し、

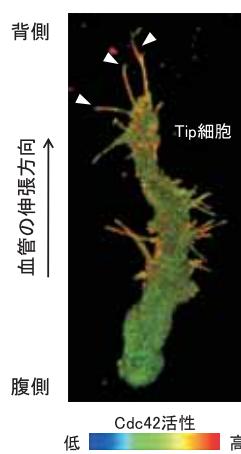


図4 血管新生過程のTip細胞におけるCdc42活性の可視化。矢頭は、先導端に形成されたフィロポディアを示しており、フィロポディアでCdc42活性が高いことが示された。

血管新生を誘導することが示された。現在、Cdc42 の下流因子についても解析を行い、フォルミンファミリーに属するアクチン制御蛋白質の関与を示唆する知見を得ている。

著者らはさらに、血管新生過程の内皮細胞の形態・運動能制御におけるホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol: PI)3キナーゼの役割を検討した。PI3 キナーゼは、PI 4,5-二リン酸(PIP2)をリン酸化し、PI-3,4,5-三リン酸(PIP3)を産生することで、形態、運動、生存、分化など様々な細胞機能を制御する細胞内シグナル伝達分子である¹⁴⁾。血管新生過程の内皮細胞における PI3 キナーゼの活性化部位を知るため、PI3 キナーゼの産物である PIP3 の局在を可視化するバイオセンサー Akt-PH-mVenus を内皮細胞で発現するゼブラフィッシュを樹立し、解析した。その結果、先導端に形成されるフィロポディアで PIP3 の産生が観察され、その領域での PI3 キナーゼの活性化が示唆された。そこで、血管新生における PI3 キナーゼの役割を知るため、血管新生が活発な受精後 24 ~ 30 時間のゼブラフィッシュ胚を PI3 キナーゼ阻害剤で処理したところ、背側大動脈から背側に向かって伸びる節間血管の形成が顕著に抑制された(図 5)。また、アクチンバイオセンサーを発現するゼブラフィッシュを用いて Tip 細胞の形態を詳細に解析したところ、コントロールの胚では、Tip 細胞は遊走方向に多数のフィロポディアを形成したのに対し、PI3 キナーゼ阻害剤で処理した胚では、Tip 細胞は、血管が伸長する方向だけでなく、側方にも多数のフィロポディアを形成し、背側への一方向性の細胞運動が抑制されていた(図 5)。以上の結果から、PI3 キナーゼは Tip 細胞の極性形成に関与することで、Tip 細胞の一方向性の細胞運動を制御している可能性が示唆された。

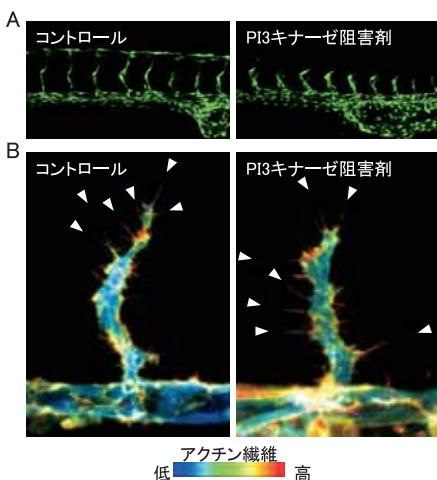


図 5 血管新生における PI3 キナーゼの役割
血管内皮細胞で GFP (A) およびアクチンバイオセンサー (B) を発現する受精後 24 時間のゼブラフィッシュ胚を PI3 キナーゼ阻害剤で処理した。A. は受精後 36 時間胚の血管構造を、B. は受精後 30 時間胚の Tip 細胞のアクチン細胞骨格を示す。矢頭は、フィロポディアを示す。コントロール胚の Tip 細胞は、先導端で遊走方向にフィロポディアを伸ばすが、PI3 キナーゼ阻害剤で処理した胚の Tip 細胞は、側方にもフィロポディアを伸ばした。

3. 血管形成における内皮細胞の細胞周期の可視化

血管形成における内皮細胞増殖の意義を明らかにするため、血管形成における内皮細胞の細胞周期を観察した。そのため著者は、理化学研究所の宮脇敦史博士らが開発した、細胞周期バイオ

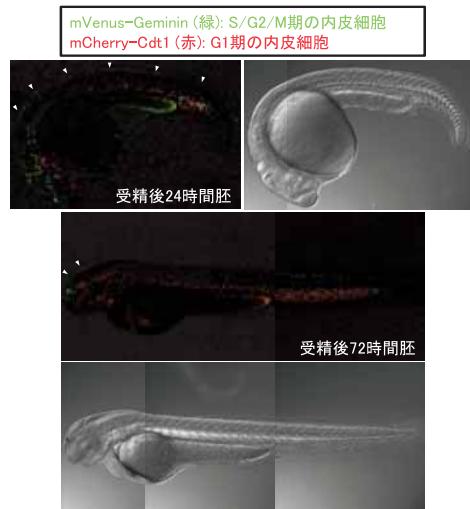


図 6 生体の血管形成過程における、内皮細胞の細胞周期の可視化。内皮細胞で Fucci バイオセンサー (mVenus-Geminin, mCherry-Cdt1) を発現する受精後 24 時間および 72 時間のゼブラフィッシュ胚。緑は、S/G2/M 期の内皮細胞を、赤は、G1 期の内皮細胞を示す。矢頭は、非特異的シグナル。

センサー Fucci (Fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator) を血管内皮細胞で発現するゼブラフィッシュを樹立した^{15,16)}。Fucci は、細胞周期制御に関わる Geminin と Cdt1 の二つのタンパク質とともに開発された細胞周期バイオセンサーである。Geminin は、DNA 複製から細胞分裂に至る S/G2/M 期に蓄積し、G1 期にはユビキチン-プロテアソーム系により分解される。一方、Cdt1 は、分裂をおえた細胞が DNA 複製の準備をする G1 期に蓄積し、S/G2/M 期では、ユビキチン-プロテアソーム系により分解される。Fucci バイオセンサーは、Geminin と Cdt1 の分解に関わる領域に、異なる蛍光タンパク質を融合した 2 種類のタンパク質で構成される。そこで、flk1 プロモーター制御下で mVenus-Geminin および mCherry-Cdt1 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを樹立し (*Tg(flk1:mVenus-Geminin; Tg(flk1:mCherry-Cdt1))*)、血管発生初期の受精後 24 時間胚の血管では、多くの内皮細胞が S/G2/M 期であったのに対し、血管形成が進行した受精後 72 時間胚の血管では、ほとんどの内皮細胞の細胞周期は G1 期で停止していた。以上の結果から、血管新生過程の内皮細胞は、活発に増殖することで新たな血管を形成するが、血管構造が構築されると、内皮細胞は細胞周期を停止し、増殖を止めることで、新生血管の安定化に寄与すると考えられる。現在、血管形成過程および血管構築後の内皮細胞の細胞周期が、どのような分子メカニズムで制御されているか検討を行っている。

4. 今後の展開

今回、ゼブラフィッシュの蛍光イメージングによる血管形成メカニズムの解析について紹介した。これまでの分子生物学研究の進歩により、血管で機能する遺伝子やそれら遺伝子がコードするタンパク質に関する分子レベルの知見が飛躍的に増大した。今後、ゼブラフィッシュの蛍光イメージング解析により、これら分子の生体における機能の解明が進むことが期待される。

ゼブラフィッシュは、血管研究だけでなく様々な分野の生物・

医学研究に応用可能である。ゼブラフィッシュは、脊椎動物であり、主要な臓器の発生や構造がヒトと類似している。このため、これまで心不全、糖尿病、生活習慣病など多くのヒト疾患モデルとなり得るゼブラフィッシュが樹立され、解析されてきた¹⁷⁾。今後、蛍光イメージング技術を、これらゼブラフィッシュを用いた生物・医学研究に応用していくれば、生命現象を、分子レベルから個体レベルまで統合的に理解できるようになるかもしれない。

[参考文献]

- 1) K. Kawakami, A. Shima and N. Kawakami, "Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 11403-11408.
- 2) K. Kawakami, A. Koga, H. Hori and A. Shima, "Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish", *Danio rerio. Gene* **1998**, 225, 17-22.
- 3) S. Isogai, N. D. Lawson, S. Torrealday, M. Horiguchi and B. M. Weinstein, "Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk", *Development* **2003**, 130, 5281-5290.
- 4) N. D. Lawson and B. M. Weinstein, "In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish", *Dev. Biol.*, **2002**, 248, 307-318.
- 5) S. W. Jin, D. Beis, T. Mitchell, J. N. Chen and D. Y. Stainier, "Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish", *Development* **2005**, 132, 5199-5209.
- 6) R. W. Koster and S. E. Fraser, "Tracing transgene expression in living zebrafish embryos", *Dev. Biol.*, **2001**, 233, 329-346.
- 7) S. F. De, I. Segura, B. K. De, P. J. Hohensinner and P. Carmeliet, "Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **2009**, 29, 639-649.
- 8) J. Riedl, A. H. Crevenna, K. Kessenbrock et al., "Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin", *Nat. Methods*, **2008**, 5, 605-607.
- 9) C. D. Nobes and A. Hall, "Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia", *Cell*, **1995**, 81, 53-62.
- 10) N. Mochizuki, S. Yamashita, K. Kurokawa et al., "Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1", *Nature*, **2001**, 411, 1065-1068.
- 11) R. E. Itoh, K. Kurokawa, Y. Ohba et al., "Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells", *Mol. Cell Biol.*, **2002**, 22, 6582-6591.
- 12) K. Aoki and M. Matsuda, "Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors", *Nat. Protoc.*, **2009**, 4, 1623-1631.
- 13) M. S. Nur-E-Kamal, J. M. Kamal, M. M. Qureshi and H. Maruta, "The CDC42-specific inhibitor derived from ACK-1 blocks v-Ha-Ras-induced transformation", *Oncogene*, **1999**, 18, 7787-7793.
- 14) B. Vanhaesebroeck, S. J. Leevers, G. Panayotou and M. D. Waterfield, "Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers", *Trends Biochem. Sci.*, **1997**, 22, 267-272.
- 15) M. Sugiyama, A. Sakaue-Sawano, T. limura et al., "Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 20812-20817.
- 16) A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura et al., "Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression", *Cell*, **2008**, 132, 487-498.
- 17) G. J. Lieschke and P. D. Currie, "Animal models of human disease: zebrafish swim into view", *Nat. Rev. Genet.*, **2007**, 8, 353-367.

[著者プロフィール]



氏名：福原 茂朋

所属：国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部

所在地：〒 565-8565

大阪府吹田市藤白台 5-7-1

TEL: 06-6833-5012 内線 2508

FAX: 06-6835-5461

E-mail: fuku@ri.ncvc.go.jp

略歴：1996年 日本国学振興会・特別研究員

1997年 筑波大学大学院博士課程農学研究科修了

1997年 米国国立衛生研究所・ポスドク

2000年 熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野・助手

2003年 国立循環器病センター研究所循環器形態部・室員

2005年 国立循環器病センター研究所循環器形態部・室長

2010年 筑波大学大学院生命環境科学研究科・非常勤講師 (兼任)

2010年 国立循環器病研究センター細胞生物学部・室長
現在の研究テーマ：

ゼブラフィッシュの蛍光イメージングにより、血管が形作られる仕組みを解析している



氏名：若山 勇紀

所属：国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部

所在地：〒 565-8565

大阪府吹田市藤白台 5-7-1

TEL: 06-6833-5012 内線 2604

FAX: 06-6835-5461

E-mail: waka@ri.ncvc.go.jp

略歴：2009年 関西大学工学部生物工学科卒業

2011年 大阪大学大学院医学系研究科修士課程修了

2011年 大阪大学大学院医学系研究科博士課程入学

現在の研究テーマ：

ゼブラフィッシュの蛍光イメージングにより、血管新生過程における内皮細胞の形態・運動能が制御されるメカニズムを解析している。

「蛍光生物学」の最前線

8-2 生活習慣病と生体イメージング

西村 智

東京大学医学系研究科循環器内科
東京大学システム疾患生命科学による先端医療技術
開発拠点 特任准教授

要旨

最近の研究により各種生活習慣病の背景には、慢性炎症を基盤とした異常な細胞間作用が生体内で生じていることが明らかになっている。我々は、一光子・二光子レーザー顕微鏡を用いた「生体分子イメージング手法」を独自に開発し、生活習慣病にアプローチしてきた。著者らは、本手法を肥満脂肪組織に適応し、肥満脂肪組織で、脂肪細胞分化・血管新生が空間的に共存して生じ、また、脂肪組織微小循環では炎症性の細胞動態を生じていることを明らかにした。また、肥満脂肪組織にはCD8陽性T細胞が存在し肥満・糖尿病病態に寄与していた。さらに、本手法を用いて生体内の血栓形成過程の詳細も明らかになり、iPS由来の人工血小板の機能解析も可能となっている。

1. 緒言 生体イメージングとは

最近の研究により、心筋梗塞や脳卒中などの原因となるメタボリックシンドロームと慢性炎症病態に密接な関連があることが示唆されている。メタボリックシンドロームでは、遺伝子素因と、内臓肥満・加齢・喫煙などの外的誘因の両者が病態形成に関わっていることは、多くの臨床データから明らかである。しかし、慢性炎症そのものの動態が不明であることから、基礎病態に対する特効薬的な治療が存在せず、それに伴う生活習慣病病態については、多くの有疾患患者と高い死亡率を生んでいるのが現状である。そして、病態理解のためには、慢性炎症に伴う生体内での細胞動態の異常、特に免疫細胞の局所での生体内応答について、直接画像化して知見を得ることは必須であると言える。

我々は、独自に開発した「生体分子イメージング手法」を、肥満した脂肪組織に適応し、メタボリックシンドロームの病態にアプローチを行ってきた。我々の開発したイメージングは、従来の手法ではアプローチできなかった細胞間相互作用を生体内で直接可視化するものであり、多くの研究領域において今後重要な役割を果たすと考えられる。本稿では、我々の生体イメージングより明らかになった、肥満脂肪組織の再構築（リモデリング）と炎症性細胞の関与、さらに血栓形成過程についての知見を紹介したい。

2. 肥満と慢性炎症 生体イメージングで見る肥満脂肪組織

2-1. 肥満脂肪組織における生体分子イメージングの意義

近年、動脈硬化・心血管疾患の原因として、末梢組織（骨格筋・脂肪組織）の機能異常が重要であると考えられるようになっている。特に、脂肪組織は、長年、脂肪を蓄積するのみの「何もしない臓器」と考えられてきたが、近年のライフスタイルの変化（食生活の欧米化）に伴う肥満・メタボリックシンドロームの蔓延により、脂肪組織は様々な病気を引き起こす「活発な代謝臓器」として一躍注目を浴びるようになった。内臓脂肪はアディポサイトカインや炎症性サイトカイン等の液性因子を分泌することからも、肥満に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化の発症に必須の役割を担っていると考えられる。しかし、脂肪組織の肥満における役割は必ずしも明らかではなく、脂肪組織が臓器としてどのように機能異常を起こすのか、いかに全身のインスリン抵抗性に寄与するか、その分子機構は十分に解明されているとは言えなかつた。近年の Weisberg らによる肥満脂肪組織に炎症性マクロファージが浸潤しているという報告¹⁾を初めとして、肥満脂肪組織における慢性炎症の関わりについては複数のグループが報告しており、現在では肥満脂肪組織のリモデリングの背景に慢性炎症が存在することは明らかであると考えられている²⁾。実際に、脂肪組織の間質を解析すると、その大半が免疫細胞である。痩せ型マウスでも、間質（stromal vascular fraction, SV fraction と略称される）の 30%が血管内皮細胞、30%が線維芽細胞で残りはすべて免疫系の細胞であり、末梢臓器としては免疫細胞を多く含んだ特異な組織であると言える。さらに、この免疫細胞の比率は肥満において増大する。非免疫組織としては異例に多い比率であり、脂肪組織における活発な免疫・炎症性細胞のクロストークが存在することが示唆される。現在、我々は脂肪組織を一種の免疫組織として捉えている。

2-2. 「生組織イメージング」でみる肥満脂肪組織リモデリング

我々はまず、「脂肪組織をよりよくみるために」、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きたままの組織をそのまま染色する、「生組

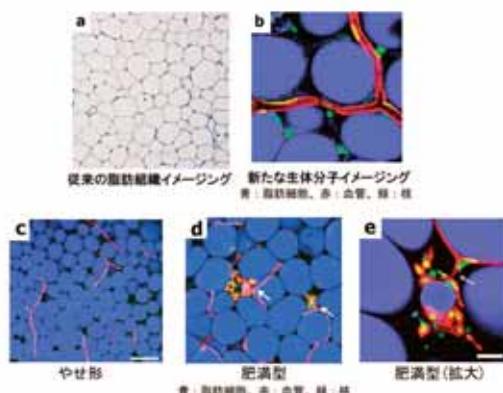


図 1 生体分子イメージングでみる肥満に伴う脂肪組織のリモデリング
やせ形 (a-c) と肥満型 (d, e) のマウスの内臓脂肪組織の比較。a, c, d が弱拡大、b, e が強拡大像。従来の脂肪組織イメージング (a) では分からなかった組織の詳細な構築が新規生体分子イメージング (b) では明らかになっている。実験手法詳細については本文中参照。

スケールバー c: 100 μm, e: 20 μm、白矢印：血管新生像

織イメージング手法」を開発した。通常の固定した組織切片標本では、脂肪組織は白く抜けた脂質と、細胞質・核の集合体として漠然とした組織構築が捉えられなかつたが、我々の手法では組織構築の詳細が可視化された³⁾。青色の脂肪酸で脂肪細胞が、赤色のレクチンで血管内皮が、緑色の核染色色素で核構造が可視化されている。この生組織イメージングは多くのラボで追試が行われており、脂肪組織のイメージング手法としての地位を確立しつつある。非常に簡便に多くの情報を得ることができる方法であり、詳細な手法については引用文献を参照して頂きたい。

この手法を用いて検討した肥満動物モデルの脂肪組織では、多くの脂肪細胞は肥大していたが、加えて分化・増殖した小型脂肪細胞が新たに出現していた（図1）³⁾。さらに、小型脂肪細胞分化と共に存して血管新生像（血管網より枝分かれした新生血管の断端）が観察され、その周囲には活性化マクロファージ浸潤が認められた。我々は、この細胞集団を「adipo/angiogenic cell clusters」と名付けた。さらに、これらに対する介入実験として、血管新生の阻害薬（VEGF中和抗体）を肥満動物に投与したところ、脂肪組織のなかの血管新生部位のみならず、脂肪細胞分化そのものが抑制された。さらに、血管新生の阻害に伴い、全身の内臓肥満やインスリン抵抗性が改善したことにより、肥満脂肪組織の病態形成に血管新生が必須であることが示唆された。

以上より、血管新生と脂肪細胞分化が密接な関連をもって、肥満脂肪組織のリモデリングを形成し、新規抗肥満・糖尿病治療の標的となり得ることが明らかになった。

2-3. 生体内の脂肪組織の可視化 生体分子イメージングの開発

従来、様々な臨床研究等によって、肥満に伴つて脂肪組織内で慢性炎症が起きていることが示唆されていたが、その詳細な機序は不明であった。そこで、我々は本イメージング手法を生体に応

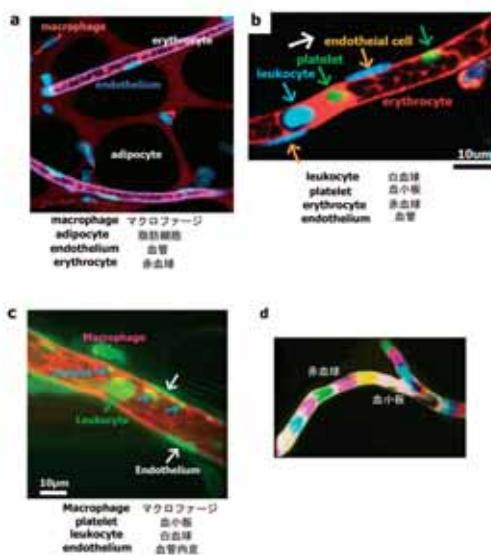


図2 「生体イメージング」でみる体内の細胞動態
「生体イメージング」では手に取るように脂肪組織微小循環における生体内的各種細胞の動きが分かる。実験手法詳細については本文中参照。
白血球、赤血球、血小板、血管内皮、マクロファージを特異的に染色し、マルチカラーでそれぞれの細胞を特異的に可視化することが可能である。
(d) のみ連続画像。

用し「生きた動物の体内的脂肪組織を手に取るように可視化すること」に成功した。そして、本手法により、肥満組織において炎症性の細胞動態が臓器特異的に生じていることを明確に示している（図2）⁴⁾。

2-4. 肥満脂肪組織と慢性炎症

我々は生体内分子イメージング手法を肥満内臓脂肪組織に応用することにより、脂肪組織内の微小血管で炎症性変化が起きていることを明らかにした。すなわち、肥満動物の白色脂肪組織内微小循環の観察で、炎症の最前線である細静脈レベルにおいて、血管壁への白血球の接着・回転・血管外漏出運動が有意に増加していることをイメージングにより示した⁴⁾。すなわち、動脈硬化病変で知られているような炎症性の細胞動態が、肥満した脂肪組織の微小循環でも認められており、「肥満脂肪組織そのものが炎症の場である」ことが可視化手法により明確に示された（図3）。

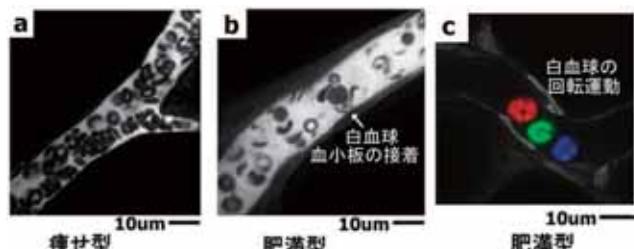


図3 「生体内的分子イメージング」でみる肥満脂肪組織における慢性炎症
肥満脂肪組織の微小循環では、やせ型(a)に比べて、肥満型(b, c)では白血球・血小板の回転運動や接着といった、「炎症の初期像」が観察された。

2-5. CD8陽性T細胞の重要性 肥満病態の最も初期のトリガーは何か？

我々は、分子イメージング及びFACSを用いた解析から、脂肪組織の間質に多くのリンパ球が存在することも明らかにした。前述の通り脂肪組織は多数の免疫細胞を含んでいる。やせ型マウスでも間質細胞の約10%はT細胞であり、肥満に伴つてその数は増加する。T細胞サブセットの解析では、肥満に伴い、CD8陽性T細胞の増加、CD4陽性T細胞・制御性T細胞の減少が認められた⁵⁾。我々以外のグループでは、WinerらはT細胞を標的とした免疫療法によりマウスの肥満が改善することを示している⁶⁾。また、脂肪組織にはマスト細胞・制御性T細胞といった特有のT細胞が存在し、局所免疫や脂肪組織炎症をコントロールし、肥満に伴うインスリン抵抗性に寄与していることも明らかになっている^{7,8)}。その後、多くのグループが脂肪組織のT細胞の役割についてマウス及びヒトレベルで解析を行っているのが現状である。このように、脂肪組織局所においてはマクロファージやT細胞をはじめとする多様な細胞が相互作用し、メタボリックシンドロームの病態を形成していると考えられた。我々の検討では、肥満脂肪組織ではCD8陽性T細胞がポリクローナルに活性化・増殖しており、このCD8陽性T細胞は骨髄由来の单球からマクロファージへの分化、及び、マクロファージの肥満脂肪組織への遊走・活性化を促進していた。さらに、このCD8陽性T細胞の大部分は骨髄由来であることが骨髄移植実験により確かめられている（図4）。つまり、肥満脂肪組織における炎症性マクロファージ浸潤の初期のトリガーがCD8陽性T細胞の浸潤であることが示唆された。異常な肥満脂肪組織における局所免疫異常が、全身及び肥満脂肪組織

の炎症、さらに糖尿病の病態を引き起こしていることが示された。ヒトサンプルにおいても、肥満者の皮下脂肪組織において CD8 遺伝子が高発現となることから、CD8 陽性 T 細胞はマウスのみならず、ヒトにおいても重要な役割を持つことが示されている。

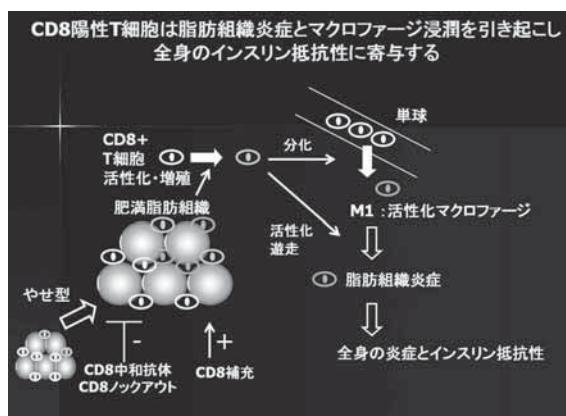


図 4 肥満脂肪組織に浸潤する CD8 陽性 T 細胞
肥満脂肪組織では活性化した CD8 陽性 T 細胞が多数浸潤しており、マクロファージの浸潤、ひいては、脂肪組織炎症と全身のインスリン抵抗性を引き起こしている。

2-6. 脂肪組織イメージング手法 方法論を中心として

我々の開発した「生組織イメージング」手法について概説する。我々はまず、「脂肪組織をよりよくみるために」、スピニングディスク方式の一光子レーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きたままの組織をそのまま染色する、(生体外での)「生組織イメージング」手法を開発してきた。手法としては、脂肪組織をマウスより取り出し、未固定のまま細かく切り出し、蛍光色素の入った培養液中でインキュベートし、生きたまま蛍光標識を行う。従来の手法、すなわち、固定した組織切片標本では、脂肪組織は白く抜けた脂質と、細胞質・核の集合体として漠然としか組織構築が捉えられなかつたが、我々の手法では組織構築の詳細が可視化されている(図 1 参照)。

さらに、新たに開発した「生体分子イメージング」手法を概説する。現在、光学機器の進歩に伴い、高速レーザー共焦点顕微鏡を用いて、血流の方向と平行にごく狭い断面に焦点を合わせて画像取得し、高速に血管内を変形しながら流れる赤血球・白血球・血小板に各々フォーカスを合わせて観察が可能となった(図 2、3 参照)。血管内の細胞動態を明らかにするために、我々は主に多数のピンホールを有する円盤を高速回転させて画像を取得する二ボウ式の共焦点ユニット(横河電機、CSU X1)、及び、シングルビームで組織をスキャンするレゾナンス型高速共焦点システム(Nikon A1R)を組み合わせて用いることにより、高速イメージングを行っている。

3. 血小板機能の生体イメージングを用いた可視化

本邦の死因の上位を占める脳・心血管イベントの多くは血管の動脈硬化性変化を基盤としている。例えば、血栓性疾患(アテローム血栓症)では慢性炎症病態を基盤とした動脈硬化巣の形成と、それに引き続いて起こる、粥腫(アテローム)の破綻が病態形成に重要である。破綻部位においては、血小板は活性化され、

血小板血栓が形成される他、凝固系も病態に関与する。しかし、動脈硬化巣の破綻は偶発的かつ高速に進行する病態であり、実験的にこれらを *ex vivo*、*in vitro* で再現することは不可能であった。実際に、これら一連の過程には血小板のみならず、各種炎症性細胞、血管内皮細胞とその障害、局所の血流動態変化(血流とずり応力)が関わっている。このような多細胞からなる複雑病変とのダイナミクスが血栓性病態の本質であり、これらを生体内で検討する手法が、病態理解の上で求められている。その検討を可能にしたのが我々の開発した「生体分子イメージング」手法である。

血小板を FITC- デキストラン及び抗 CD41 抗体により可視化したところ、定常状態においては、細動脈・静脈では主に血管壁近傍に沿って血小板は運動していた。一方、流速の遅い毛細血管のレベルでは、血小板は血管内皮と相互作用して「stop and go」を繰り返しており、血流に乗って回転運動している様が可視化された。さらに、レーザー照射・傷害と組み合わせることで血栓形成を誘発し、生体内での單一血小板を捉えながら、血栓形成のメカニズムの詳細が可視化された(図 3)。

我々は、レーザー傷害による ROS 産生を伴う血栓形成モデルと生体分子イメージングを組み合わせ、血小板機能に異常を有する各種遺伝子改変動物における血栓形成過程を観察し、生体内での血小板機能との関係を明らかにした。我々のモデルでは橢円形を伴った血小板のみが血栓形成しており、一方、血管内皮の構築は保たれていた。炎症性サイトカインのノックアウトマウス、キメラマウスの解析の結果、TNF- α をはじめとする炎症性サイトカインが、ROS 刺激下での vWF 因子の血管内皮表面への表出に関わっていることが明らかになった。さらに、IL-1、IL-6 等の因子も血栓性を促進しており、これらの炎症性サイトカインは血管内皮に作用し、インテグリンシグナルと協同して、血栓の安定化に寄与していた。従来、炎症と血栓については多様な報告によりその関連が示唆されていたが、本解析により血栓形成過程のうち、血管内皮における炎症性サイトカインのシグナリングが血栓形成に関わっていることが示された⁹。

我々の血栓形成モデルでは、まずレーザー照射により活性酸素の産生が誘発されて血管内皮に血小板が付着する。活性酸素は血管内皮細胞に直接働き、パイエル小体中の von Willebrand 因子を、細胞膜表面上に移動させる。一方、活性酸素は血小板にも直接作用し、P-selectin、GP IIb IIIa といった機能蛋白が血小板表面に誘

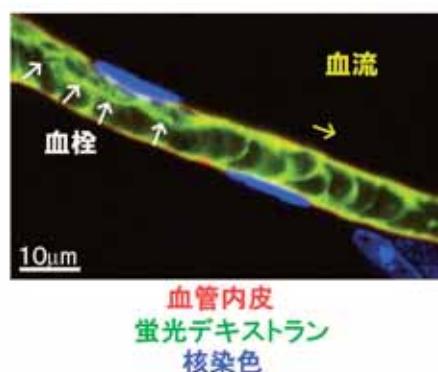


図 5 生体内における血栓形成過程
レーザー照射により誘発された微小血栓の形成過程。生体イメージングとレーザー傷害を組み合わせることにより、腸間膜の毛細血管において、血栓を誘発し、血栓形成に寄与する単一血小板を可視化することが可能になった。15 秒のレーザー照射により血小板血栓が発達し血管径が狭小化している。

導される。その結果、血管内皮の von Willebrand 因子と血小板表面の GP I b が結合し、血栓が誘発される。その後、血小板はその数を増やし積み上り、血管内腔を狭小化し、血液の流速は遅くなる。最終的には、赤血球、もしくは、白血球により血管は閉塞する。我々のモデルが特徴的なのは、血栓形成の全過程が数十秒で終わり、時間的に経過が極めて早いことと、画像が高解像度であることである。本モデルではレーザー照射後に血栓形成に寄与した血小板数を数えることによって血栓形成能を明確に定量可能である。従来の頸動脈に対する塩化鉄傷害モデルにおける血栓による閉塞時間とも強い相関を示しており、生体内の血小板機能を極めて鋭敏に反映していると考えられる。それだけでなく、従来の止血時間の計測では分からなかった、血栓形成の素過程が可視化されており、遺伝子変異の効果がどの過程に影響を及ぼしているかを明らかにできる。

我々は本手法を用い、Lnk というアダプター蛋白に注目して実験を進めた。Lnk は血球系幹細胞の維持に重要な蛋白であるが、巨核球・血小板にも発現しているが、その機能は不明であった。興味深いことに、Lnk の欠損した遺伝子変異動物では、流血中の末梢血小板数が野生型の 5 倍になるにも関わらず血栓性を示さず、むしろ止血時間が延長しており、Lnk の欠損が血小板機能に影響をもたらしていると考えた。骨髄移植を行い作成した Lnk キメラマウスを用い、生体イメージングにより血栓形成過程を観察したところ、血球系でのみ Lnk が欠損した Lnk キメラマウスではレーザー傷害により血小板は一過性に血管内皮に付着するものの、血栓は安定化せず血流に崩され、血小板血栓の発達が阻害されているさまが可視化された。すなわち、Lnk が血小板血栓の安定化に寄与していることが示された。分子生物学的機序としてはリン酸化した Lnk が、c-Src、Fyn と協同してインテグリンのシグナリングに関与していた¹⁰⁾。以上より、Lnk が生体内血栓の形成・安定化に寄与していることが明確に示された。

さらに Lnk の遺伝子変異がヒトにおいては、多血症・血小板無力症や骨髄増殖性疾患を引き起こすことも報告されている^{11,12)}。多血症では血小板数は増加するものの、血小板機能は低下していることが多い、今回、Lnk ノックアウトマウスでみられた表現型にきわめて近いと言え、Lnk の血小板機能における重要性がマウスだけでなく、ヒトにおいても示されている。

今後は、さらに様々な血小板機能に異常を来す遺伝子変異動物における血栓形成過程・血小板動態を観察することにより、「生体内の血栓形成の各過程における遺伝子・物質の関与」が明らかになると思われる。

4. iPS 由来人工血小板の体内イメージング

近年の、多能性幹細胞 (ES, iPS) の研究の進歩により、細胞療法を含む再生医学での広い範囲での臨床応用が期待されている。しかし、これらの幹細胞を用いた基礎研究を臨床現場に繋げるためには、*in vitro* での知見をヒトを対象とした研究に応用する前に、実際に試験管内で作成した細胞が、実際の個体（マウス及び大動物）の中でどのように機能しているか、どのように病変に働くかを明らかにすることは必須である。しかし、今までこれら iPS 由来の分化誘導細胞の体内での細胞動態を検討する手法は存在しなかった。我々は、京都大学 iPS 研究所江藤教授チームとの共同研究の結果、iPS 細胞を誘導するのに必要な山中四因子の中の c-Myc の発現をコントロールすることにより、飛躍的かつ効率的に、ヒト iPS 由来の人工血小板を作成する手法を確立した。我々は生体イメージングを用いて、こうして得られたヒト iPS 由来血小板

の体内動態の可視化を行った。観察に用いた免疫不全マウス (NOG マウス) の体内では、iPS 由来人工血小板の細胞動態が捉えられた。iPS 由来血小板がマウス体内を循環しているだけでなく、レーザー傷害により誘発された血栓形成部位においてはホスト血小板と iPS 由来血小板が相互作用しながら血栓を形成するさまが観察された。つまり、「人工血小板は体内を循環し、血栓も作る」ことが証明されたわけである。このように、本イメージ手法は iPS 分化誘導細胞を用いた細胞療法の臨床応用に向けて、安全性・有用性を評価する上できわめて有用性が高い手法と言える¹³⁾。さらに、最近では、人工血小板の作成を飛躍的に改善する分子メカニズムがより明らかになりつつあり、臨床応用も近いと考えられる。

5. 次世代のイメージング 深部を照らす機能イメージング

我々は今まで主に二ポウ式レーザー共焦点、一光子励起の組み合わせで画像取得を行ってきた。しかし、深部臓器・臓器内部の構造に関しては可視化できず、遺伝子機能も不明であった。生体の各種病態下での細胞連関・情報伝達異常をより明らかにするためには、形態と機能とを組み合わせた深部の光イメージングが今後必要になるとを考えられる。例えば、遺伝子変異動物を用いた遺伝子機能の光による解析を、二光子フェムト秒レーザーと高速スキャニング共焦点システムで行うというものであり、既に多くの生体内深部の知見が得られている。二光子励起による生体イメージングについては、脳組織を用いたイメージングが先行し、それ以外の臓器での知見についてはあまり研究されてこなかったのも実情である。しかし、今後は光学機器の改良に伴う画像の改善・操作性の改善・扱いやすさ使いやすさの向上、顕微鏡システムの価格の一般化、光学プローブの開発改良、が総合的に進むと考えられ、初心者の研究者でも、これらの手法が今後可能になるとを考えている。

[参考文献]

- 1) S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue", *J. Clin. Invest.*, **2003**, 112(12), 1796-1808.
- 2) G. S. Hotamisligil, "Inflammation and metabolic disorders", *Nature*, **2006**, 444(7121), 860-867.
- 3) S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki, Y. Hosoya, H. Yamashita, H. Fujita, M. Ohsugi, K. Tobe, T. Kadokawa, R. Nagai and S. Sugiura, "Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels", *Diabetes*, **2007**, 56, 1517-1526.
- 4) S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki, K. Seo, H. Yamashita, Y. Hosoya, M. Ohsugi, K. Tobe, T. Kadokawa, R. Nagai and S. Sugiura, "In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue", *J. Clin. Invest.*, **2008**, 118(2), 710-721.
- 5) S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadokawa and R. Nagai, "CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity", *Nature Medicine*, **2009**, 15:8, 914-920.
- 6) S. Winer, Y. Chan, G. Paltser, D. Truong, H. Tsui, J. Bahrami, R. Dorfman, Y. Wang, J. Zielenski, F. Mastronardi, Y. Maezawa, D. J. Drucker, E. Engleman, D. Winer and H. M. Dosch, "Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy", *Nature Medicine*, **2009**, 15:8, 921-929.
- 7) J. Liu, A. Divoux, J. Sun, J. Zhang, K. Clement, J. N. Glickman, G. K. Sukhova, P. J. Wolters, J. Du, C. Z. Gorgun, A. Doria, P. Libby, R. S. Blumberg, B. B. Kahn, G. S. Hotamisligil and G. P. Shi, "Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice", *Nature Medicine*, **2009**, 15:8, 940-945.

二価性試薬・ビオチンラベル化剤

- 8) M. Feuerer, L. Herrero, D. Cipolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A. B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson and D. Mathis, "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters", *Nature Medicine*, **2009**, 15:8, 930-939.
- 9) S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki, S. Kakuta, Y. Iwakura, N. Takayama, J. Ooebara, M. Otsu, A. Kamiya, B. Petrich, T. Urano, T. Kadono, S. Sato, A. Aiba, H. Yamashita, S. Sugiura, T. Kadowaki, H. Nakuchi, K. Eto and R. Nagai, "In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling", *Blood*, **2012**, 119, e15-e56.
- 10) S. Nishimura, H. Takizawa, N. Takayama, A. Oda, H. Nishikii, Y. Morita, S. Kakinuma, S. Yamazaki, S. Okamura, N. Tamura, S. Goto, A. Sawaguchi, I. Manabe, K. Takatsu, H. Nakuchi, S. Takaki and K. Eto, "Lnk/Shb2b3 regulates integrin alpha-IIb-beta3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus *in vivo*", *J. Clin. Invest.*, **2010**, 120 (1): 179-190.
- 11) S. T. Oh, E. F. Simonds, C. Jones, M. B. Hale, Y. Goltsev, K. D. Gibbs Jr., J. D. Merker, J. L. Zehnder, G. P. Nolan and J. Gotlib, "Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms", *Blood*, **2010**, 116(6), 988-992.
- 12) T. L. Lasho, A. Pardanani and A. Tefferi, "LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis", *N. Engl. J. Med.*, **2010**, 363(12), 1189-1190.
- 13) N. Takayama, S. Nishimura, S. Nakamura, T. Shimizu, R. Ohnishi, H. Endo, T. Yamaguchi, M. Otsu, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Sawaguchi, R. Nagai, K. Takahashi, S. Yamanaka, H. Nakuchi and K. Eto, "Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells", *J. Exp. Med.*, **2010**, 207(13), 2817-2830

[著者プロフィール]



氏名：西村 智

所属：東京大学医学系研究科循環器内科

東京大学システム疾患生命科学による先端医療技術開発拠点 特任准教授

所在地：東京都文京区本郷 7-3-1

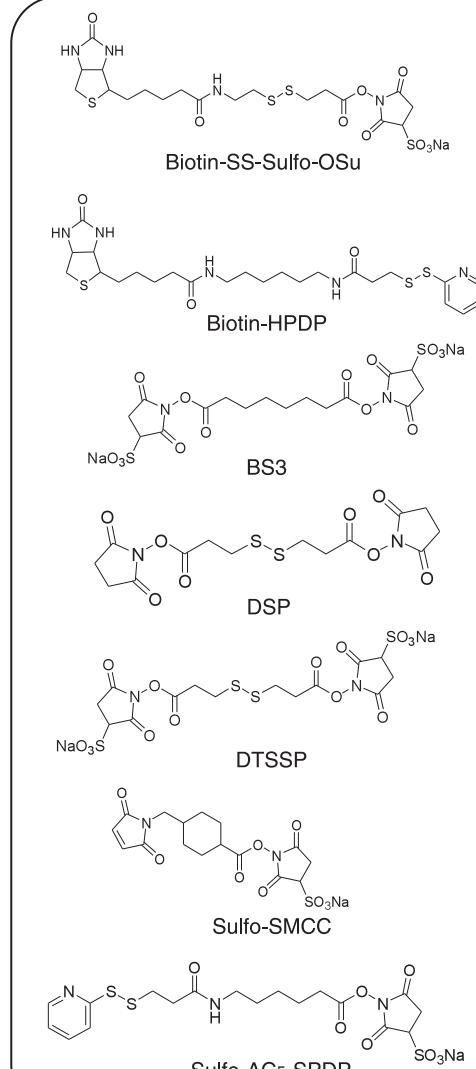
TEL: 03-3815-5411 FAX: 03-3814-0021

E-mail: snishi-tky@umin.ac.jp

出身学校：東京大学医学部医学科

学位：医学博士（東京大学）

研究テーマ：内科学、生活習慣病と慢性炎症の関わり、免疫細胞、イメージング



二価性試薬は、タンパク質、抗体、酵素などが持つアミノ基やSH基を利用し、二種類のタンパク質分子を架橋させるのに使用されます。ビオチンラベル化剤は、ビオチンをアミノ基、SH基を利用し、分子内に導入する試薬です。それぞれ分子の長さと水溶性の有無により分類されます。

今回更にプロテオミクス研究に活用していただける様に、二価性試薬、ビオチンラベル化剤にご要望の多かった化合物を新規ラインアップとして追加致しました。各種研究にご活用下さい。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biotin-SS-Sulfo-OSu	100 mg	38,000	B572
Biotin-HPDP	50 mg	40,400	B573
BS3	50 mg	17,000	B574
DSP	1 g	30,400	D629
DTSSP	50 mg	18,000	D630
Sulfo-SMCC	50 mg	27,600	S330
Sulfo-AC ₅ -SPDP	50 mg	66,000	S359

Topics on Chemistry

光を音に変換する光音響効果を利用した Photoacoustic Imaging

株式会社同仁化学研究所 下村 隆

生体イメージングの利点は、生体を解剖することなく生体内の状況を把握できることである。そのためにも、見たいものを見るようにする仕組みが必要となる。近年、生体内部をイメージング(可視化、画像化)する方法として、ポジトロン断層法(Positron Emission Tomography: PET)や核磁気共鳴イメージング(Magnetic Resonance Imaging: MRI)、超音波イメージング(Ultrasonography: US)、蛍光イメージング(Fluorescence Imaging: FI)、光音響イメージング(Photoacoustic Imaging: PAI)などの手法が開発され、改良が重ねられている。表1にそれらの様々な特徴・特性を示す。例えば、USでは、体内に照射された超音波は、骨など硬い組織では強く反射され、柔らかい組織では反射が弱いため、反射の違いを利用して画像化できる。FIでは、目的部位に蛍光分子を集積させ体外から励起光を当て、発生する蛍光を検出し画像化できる。

本稿では、小動物を対象とした光音響イメージング(PAI)について紹介する。PAIは近赤外光を使い、音で測定することで画像化するため、USとFIの手法を兼ね備えている。FIの深度は5 mm未満であり、皮膚近傍や取り出した部位に測定対象が限られる。一方PAIでの深度は5 cmであり、ほぼ全体を観察可能となる。さらに蛍光分子をコントラスト剤として用いることで、より詳細に目的部位を観察することが可能になっている。

Table 1 各イメージング法の特徴

	PET	MRI	US	FI	PAI
エネルギー源	陽電子	ラジオ波	超音波	紫外・可視・近赤外光	近赤外光
測定するエネルギー	高エネルギー ガンマ線	ラジオ波	超音波	紫外・可視・近赤外光	超音波
解像度	1-2 mm	20-100 μm	50-500 μm	2-10 mm	50-500 μm
深度	制限なし	制限なし	< 5 cm	< 5 mm	< 5 cm
リアルタイム測定	不可	可	可	可	可

光音響効果とは、光エネルギーを吸収した分子が熱を放出し、その熱による体積膨張で音響波が発生する現象である。実際には生体透過性の高い近赤外光を利用し、発生する超音波を音響センサで検出する(Fig. 1右)。

光を使った生体の画像化には、波長が700～900 nmの近赤外光がしばしば使用される。その理由として、近赤外光よりも波長の短い可視光(400～700 nm)はヘモグロビンなどによって強

く吸収され、近赤外光よりも長い波長の赤外光(0.9～400 μm)は水によって強く吸収されるために、これらの領域の光の生体内における透過性は低い。これに対し、近赤外領域の光には、上述のような吸収が少なく、生体を透過しやすいからである。近赤外波長域は「生体の窓」とも呼ばれるのはそのためである。生体成分による光の吸収はFig. 1の左図のように表すことができる¹⁾。今まででは近赤外波長域を用い酸素結合状態と酸素非結合状態のヘモグロビンの吸収スペクトルが互いに異なることを利用して、血管及び、低酸素状態の固形がんのイメージングが行われてきた²⁾。しかし、より詳細な検出や測定を目的として、目的の臓器や腫瘍をPAIでイメージングするには金ナノ粒子、SWNT(single-walled carbon nanotube、単層カーボンナノチューブ)、ICG(indocyanine green、インドシアニングリーン)、MB(methylene blue、メチレンブルー)などのコントラスト剤を体内に投与する必要がある。PAI用のコントラスト剤は近赤外光を吸収し、熱に変換する作用(光音響効果)が強く、抗体などをを利用して目的の部位に集積させることでPAIシグナルが増強され、周りとの区別が容易になる。ICG(肝機能検査用)やMB(メトヘモグロビン血症治療薬)はFDA(Food and Drug Administration、アメリカ食品医薬品局)に認証されていること、また近赤外光によって励起可能であることから、近年、PAIに使用されている³⁾。

以下に、実際に近赤外蛍光色素ICGを用いてPAIを行なった2つの研究を紹介する。Zerdaらは、がん組織の特徴を利用したがん指向性と光音響効果を有するSWNT及びICGを利用した光音響プローブを作成し、イメージングしたことを報告している³⁾。新生血管やがん細胞にはインテグリンが高発現している⁴⁾。そのため、インテグリン認識配列であるRGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列を有する分子はインテグリン高発現部位特異的に送達される。一方で、RAD(グリシンをアラニンに置換した)配列はインテグリンに認識されない。さらに、SWNTは近赤外光を吸収して発熱する性質を有し、同様に近赤外光を吸収するICGをSWNTに修飾すると約20倍光音響効果を増強することができる。以上のような特性を付与したSWNT-ICG-RGDをマウスに投与すると腫瘍特異的に光音響シグナルが得られた(Fig. 2)。

次に、乳がん患者において、がん転移の有無を診断するために、腫瘍からのリンパ液が最初に到達するセンチネルリンパ節生検は必要な検査である。

しかし、生検は侵襲的で患者への負担が大きい。そこで、リンパ節の位置や転移を非侵襲的に検査できる手法が求められる。Kimらは、センチネルリンパ節をPAIで画像化したことを報告し

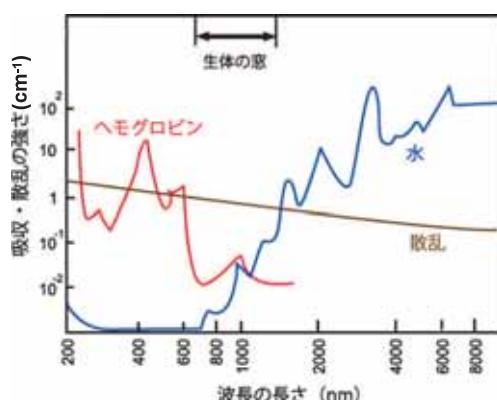
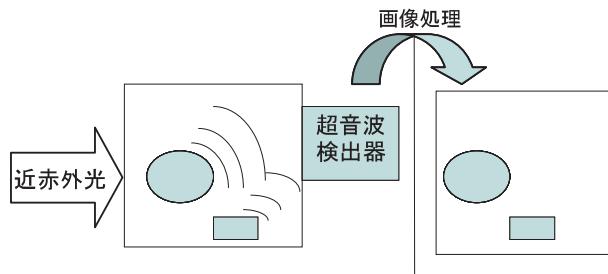


Fig. 1 生体の窓(本文参照)(左)とPAIイメージング画像(右)



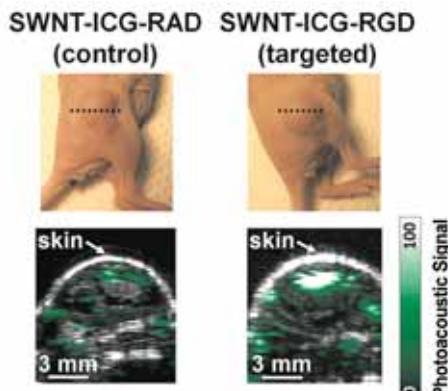


Fig. 2 SWNT-ICG-RAD/RGD を用いた腫瘍の PAI
Reprinted with permission from ACS Nano., 2012, 6, 4694. Copyright 2012 American Chemical Society.

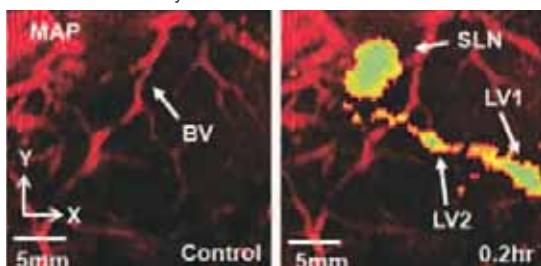


Fig. 3 ICG 皮下投与によるリンパ管とリンパ節の PAI
C. Kim, et al., Radiology, 2010, 255, 442. copyright RSNA®.

ている⁵⁾。ラットの左前足から 1 mmol/L ICG 水溶液を皮下投与し、左脇のリンパ節（センチネルリンパ節）の画像を得た（Fig. 3）。

投与する前（Fig. 3 左）は血管（BV）しか観察されないが、ICG を投与することによってセンチネルリンパ節（SLN）とリンパ節（LV）が明確に識別された（Fig. 3 右）。次に、ICG 投与後のリンパ節を皮下 2、6、8 mm の位置に置いたときのシグナルを検出した（Fig. 4）。PAI ではどの深さでもリンパ節の大きさは 2 mm 程度であるが、蛍光画像では深度に対応して大きくなっている。この結果から、リンパ節の位置はどちらのイメージング法でも確認できるが、正確なリンパ節の大きさと位置を推定するのは PAI の方が容易であると考えられる。

以上のように、生きた動物の皮下の深いところにある臓器を数百 nm 以下の空間分解能で観察できる PAI は、*in vivo* の研究への利用が期待される。さらに、ICG や MB などの近赤外蛍光色素を利用することによって光音響シグナルを増強することが可能であり、人のがん診断への適用なども期待される。

一方で生体の PAI には、生体内のヘモグロビンやメラニンによる近赤外光の吸収のため、目的部位が観察しづらい場合があること、光の到達深度（最大 5 cm 程度）よりも深い目的部位は観察できないこと、目的部位を観察するためのコントラスト剤の種類の少なさなどの問題がある。さらなる研究の発展が期待される。

[参考文献]

- 1) M. S. Patterson, B. C. Wilson and D. R. Wyman, "The propagation of optical radiation in tissue. 2: Optical properties of tissues and resulting fluence distributions", *Lasers in Medical Science*, 1991, 6, 379.
- 2) X. Wang, X. Xie, Ku. G. L. V. Wang and G. Stoica, "Noninvasive imaging

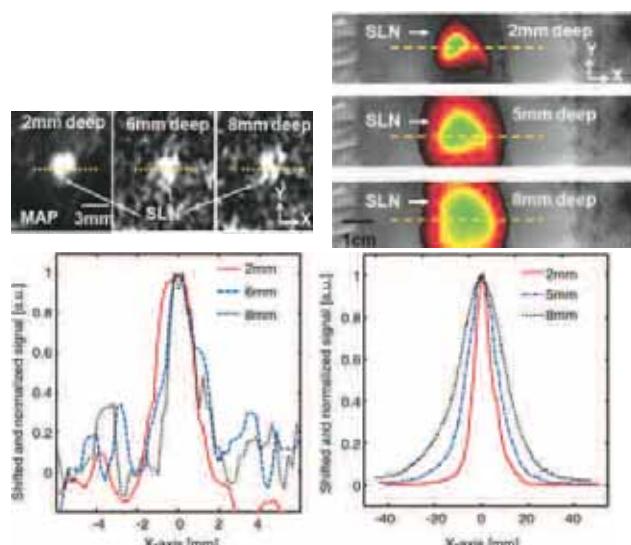


Fig. 4 光音響画像 (PAI、photoacoustic image) (左上) と蛍光画像 (fluorescence image、FI) (右上)、及び腫瘍からのシグナルの断面図 (PAI : 左下と FI : 右下)
C. Kim, et al., Radiology, 2010, 255, 442. copyright RSNA®.

of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography", *J. Biomed. Opt.*, 2006, 11, 024015.

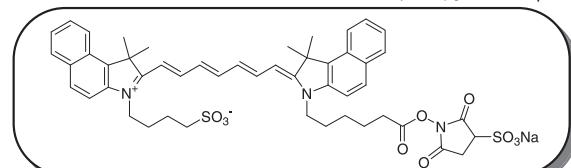
- 3) A. Zerda, S. Bodapati, R. Teed, S. Y. May, S. M. Tabakman, Z. Liu, B. T. Khuri-Yakub, X. Chen, H. Dai and S. S. Gambhir, "Family of enhanced photoacoustic imaging agents for high-sensitivity and multiplexing studies in living mice", *ACS Nano*, 2012, 6, 4694.
- 4) G. J. Mizejewski, "Role of integrins in cancer: survey of expression patterns", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 2007, 222, 124.
- 5) C. Kim, K. H. Song, F. Gao and L. V. Wang, "Sentinel lymph nodes and lymphatic vessels: noninvasive dual-modality *in vivo* mapping by using indocyanine green in rats – volumetric spectroscopic photoacoustic imaging and planar fluorescence imaging", *Radiology*, 2010, 255(2), 442.

試作品

近赤外蛍光標識試薬

ICG-Sulfo-OSu

メーカーコード : I254



<特長>

- ・緩衝液中に混合するだけでアミン選択的に標識できる活性エヌテルである。
- ・近赤外蛍光を用いた低バックグラウンド検出が可能である。
($\lambda_{\text{ex}} = 768 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 807 \text{ nm}$)

開発中

プロテオーム解析用試薬

NTA-SAM Formation Reagent

QCM (Quartz Crystal Microbalance: 水晶振動子マイクロバランス) や SPR (Surface Plasmon Resonance: 表面プラズモン共鳴) 等のバイオセンサーに SAMs (Self-Assembled Monolayers: 自己組織化単分子膜) を介してタンパク質を固定化する方法のひとつに Ni-NTA (Nitritotriacetic acid: ニトリロ三酢酸) を介した His-Tag タンパク質固定化法¹⁾ があります。

〈NTA-SAM 基板の特長〉

1. タンパク質を His-Tag を介して固定化するため固定化による変性の影響が少ない。
2. イミダゾールや EDTA などで His-Tag と Ni-NTA 間の相互作用を解消することで His-Tag タンパク質を脱着することができる。
3. タンパク質の吸・脱着が可能なため基板の再利用が可能である。

また、NTA-SAM 基板の QCM や SPR 以外の利用法として質量分析法である LDI (Laser Desorption/Ionization)-TOF (Time of Flight)-MS (Mass Spectroscopy) と NTA-SAM を組み合わせ、表面のタンパク質の検出や相互作用の検討が可能である SELDI (Surface Enhanced-LDI)-TOF-MS²⁾ があります。さらに、NTA 部位を有する金ナノ粒子を利用して、His-Tag タンパク質を粒子にコートし、目的タンパク質との相互作用を TEM で高感度に観察する報告³⁾ があるなど、NTA 表面を利用した様々なアプリケーションに用いられております。

小社には、表面カルボン酸とタンパク質などのアミノ基の結合反応を利用した方法 (Carboxylic acid-SAM Formation Reagent: メーカーコード C488) や Biotin-Avidin の特異的で強力な結合を利用した方法 (Biotin-SAM Formation Reagent: メーカーコード B564) でタンパク質を固定化できる製品をすでに販売しております。これらの製品は、タンパク質を効率的に固定化し、かつ非特異的吸着の少ない SAM を作製できるという特長があることから多くの方にご利用いただいております。更に、His-Tag タンパク質を効率的に固定化し、非特異的吸着の少ないセンサーを作製するための NTA-SAM Formation Reagent を開発しております。本製品には、表面に NTA 部位が存在する SAM 形成試薬が含まれており、エタノールに溶解して金基板上にアプライするだけで NTA-SAM を金基板上に形成することができます (Fig. 1)。

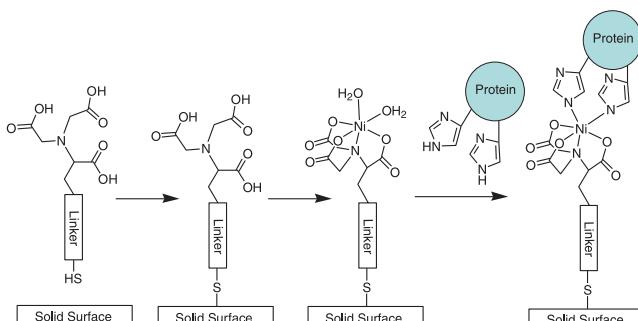


Fig. 1 NTA 末端 SAMs への His-Tag タンパク質の固定化

[参考文献]

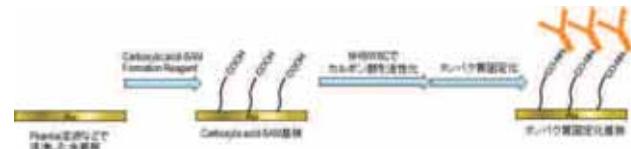
- 1) G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger and G. M. Whitesides, "A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance", *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 490.
- 2) T. W. Hutchens and T. T. Yip, "New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 576.
- 3) T. Kitai, Y. Watanabe, Y. Y. Toyoshima, T. Kobayashi, T. Murayama, H. Sakae, H. Suzuki and T. Takahagi, "Simple method of synthesizing nickel-nitritotriacetic acid gold nanoparticles with a narrow size distribution for protein labeling", *Japanese Journal of Applied Physics*, **2011**, 50, 095002-1.

関連製品

Carboxylic acid-SAM Formation Reagent

金電極、SPR および QCM などの金表面に、末端官能基としてカルボキシル基を有する SAMs (Self-Assembled Monolayers) を形成するための試薬です。

NHS/WSC を用いたアミンカップリング法によって簡便にタンパク質やペプチド、その他の分子認識サイトを導入することができます。



Biotin-SAM Formation Reagent

Streptavidin や NeutrAvidin などのアビジン類を効率的に固定化し、非特異吸着の少ないセンサーを作製するための、ビオチン SAM 作製用試薬です。本試薬を用いて作製したビオチン SAM では、従来品に比べ、Streptavidin 結合後の表面への非特異的なタンパク質吸着が少ないと、より多くのビオチン化タンパク質を固定化することができます。

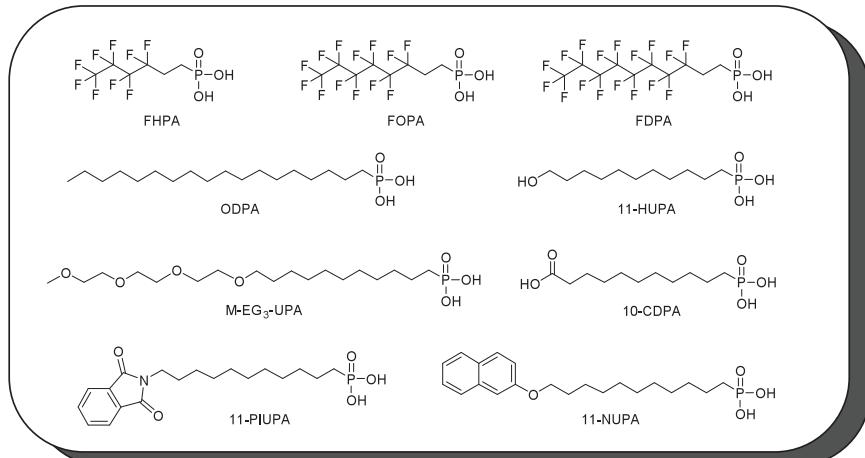


品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Carboxylic acid-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	C488
Biotin-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	B564

新製品

自己組織化单分子膜作製用試薬

アルキルホスホン酸誘導体



ホスホン酸誘導体は、Al₂O₃¹⁾、TiO₂²⁾、ZrO₂³⁾、SiO₂⁴⁾、マイカ⁵⁾、ステンレス(SS316L)⁶⁾、ニチノール⁷⁾、ヒドロキシアパタイト⁸⁾、ZnO⁹⁾、ITO^{10,11)}等の種々金属酸化物の表面処理・改質剤として、近年、注目されています。小社ではこのような表面処理用のホスホン酸誘導体9種類を発売しております。

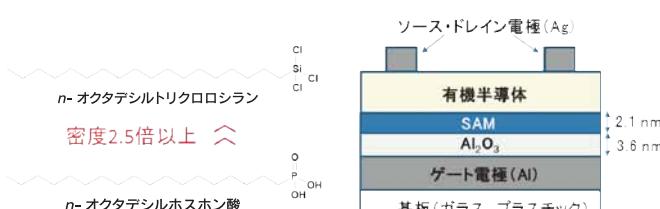
<ホスホン酸誘導体の特長>

金属酸化物の表面処理には古くから有機シランの自己組織化单分子膜(SAMs)が用いられていますが、安定性が低く、試薬同士の重合が起こるなど必ずしも使い易いものではありません。ホスホン酸誘導体はそれ自身は非常に安定な化合物であるにもかかわらず、有機シラン同様に金属酸化物表面にSAMsを形成します。また、ホスホン酸誘導体は有機シランに比べ、密度が高く安定なSAMを形成します。

Schwartzらは、Ti酸化膜上に11-HUPAのSAMを形成して蛍光分子を修飾し、ホスホン酸SAMが有機シランよりも4倍高密度で、アルカリ溶液中で安定性が高いことを示しています¹²⁾。有機シランがTi酸化膜上に存在するOH基としか反応できないのに対し、ホスホン酸誘導体は基板にプロトンを供給することでOHを产生し、高密度に結合すると考えられています¹³⁾。

<有機デバイスへの応用例>

KlaukらやSekitaniらは、Al₂O₃上のアルキルホスホン酸(ODPA)SAMを有機トランジスタの絶縁膜として使用し、トリクロロシラン誘導体よりも密度が高く、有用であることを示しています¹⁴⁾。



ます(Fig. 1)¹⁴⁾。また、Kraftらはフッ化アルキルホスホン酸(FDDPA:試作品)のSAMをゲート絶縁膜として利用して、低電圧有機薄膜トランジスタのしきい値電圧の制御に成功しています。FDDPAはフッ化アルキル鎖の強い電気吸引性のため、アルキルホスホン酸に比べ、しきい値電圧を約1V変化させると報告されています¹⁵⁾。

更にフッ化アルキル鎖を有するホスホン酸誘導体はITOの修飾により仕事関数を増加することから、注目を集めています。SharmaらはITO基板をFOPAで修飾することにより、酸素プラズマ処理と同様に、ITO基板の仕事関数が増大することを報告しています¹⁰⁾。酸素プラズマ処理によって増加した仕事関数はすぐに低下しますが、FOPA修飾により増加した仕事関数は安定性が高く、246時間後も低下しないことが示されています(Fig. 2)。また、FOPA修飾ITOを用いて作製した有機ELデバイスは発光量、駆動電圧ともにより安定で、長寿命化されています。

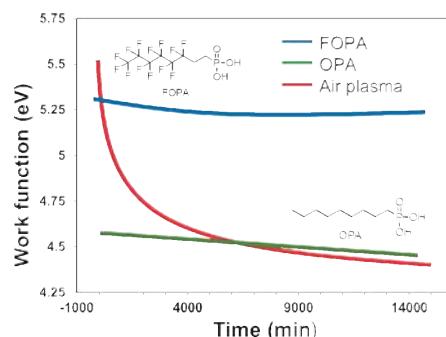


Fig. 2 FOPAにより増加したITOの仕事関数の安定性¹⁰⁾。

<その他の応用例>

有機デバイス以外にも最近様々な応用例が報告されています。例えば、PulsipherらはITO基板に水酸基末端のアルキルホスホン酸(11-HUPA)のSAMを形成し、酸化条件をコントロールすることで、アルデヒドとカルボン酸二種類の表面パターンを作製して

います¹¹⁾。Traina らはオリゴエチレングリコール部位を有するアルキルホスホン酸で Y_2O_3 微粒子を修飾し、水に均一に分散することに成功しています¹⁶⁾。

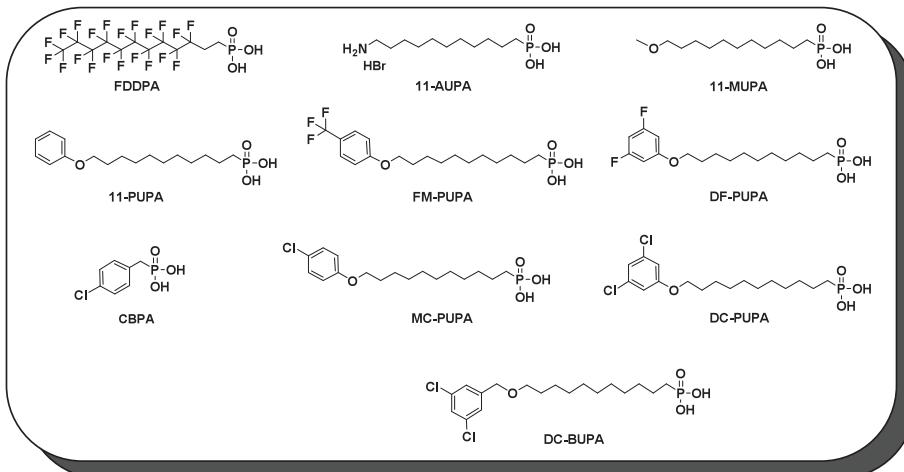
Zhang らは、ZnO 上にカルボン酸末端のアルキルホスホン酸(10-CDPA) SAM を形成し、縮合剤を用いて抗体を固定化し、バイオセンサーへの有用性を示しています⁹⁾。

高原らはゾルゲル法で作製したアルミナゲルを FDPA で修飾し、

超疎水性表面の作製に成功しています¹⁷⁾。

＜試作品のご案内＞

同仁化学研究所では、このような種々の金属酸化物表面の機能化に有用なホスホン酸誘導体の開発を進めております。試作品として下記のような誘導体もございますので、ご興味、ご要望などありましたら、お気軽に小社までお問合せ下さい。



[参考文献]

- (a) T. A. Lewington, M. R. Alexander, G. E. Thompson and E. McAlpine, *Surf. Eng.*, **2002**, 18(3), 228. (b) T. Hauffman, O. Blajiev, J. Snauwaert, C. van Haesendonck, A. Hubin and H. Terryn, *Langmuir*, **2008**, 24(23), 13450.
- (a) B. M. Silverman, K. A. Wieghaus and J. Schwartz, *Langmuir*, **2005**, 21(1), 225. (b) G. Zorn, I. Gotman, E. Y. Gutmanas, R. Adadi, G. Salitra and C. N. Sukenik, *Chem. Mater.*, **2005**, 17(16), 4218. (c) E. S. Gawalt, G. Lu, S. L. Bernasek and J. Schwartz, *Langmuir*, **1999**, 15(26), 8929.
- W. Gao and L. Reven, *Langmuir*, **1995**, 11(6), 1860.
- (a) E. L. Hanson, J. Schwartz, B. Nickel, N. Koch and M. F. Danisman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(51), 16074. (b) M. Dubey, I. Gouzman, S. L. Bernasek and J. Schwartz, *Langmuir*, **2006**, 22(10), 4649. (c) I. Gouzman, M. Dubey, M. D. Carolus, J. Schwartz and S. L. Bernasek, *Surf. Sci.*, **2006**, 600(4), 773.
- J. T. Woodward, A. Ulman and D. K. Schwartz, *Langmuir*, **1996**, 12(15), 3626.
- A. Raman, M. Dubey, I. Gouzman and E. S. Gawalt, *Langmuir*, **2006**, 22, 6469.
- R. Quinones and E. S. Gawalt, *Langmuir*, **2008**, 24, 10858.
- S. C. D'Andrea and Al. Y. Fadeev, *Langmuir*, **2003**, 19, 7904.
- B. Zhang, T. Kong, W. Xu, R. Su, Y. Gao and G. Cheng, *Langmuir*, **2010**, 26(6), 4514.
- A. Sharma, B. Kippelen, P. J. Hotchkiss and S. R. Marder, *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, 93, 163308.
- A. Pulsipher, N. P. Westcott, W. Luo and M. N. Yousaf, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(22), 7626.
- B. M. Silverman, K. A. Wieghaus and J. Schwartz, *Langmuir*, **2005**, 21, 225.
- J. Schwartz, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, J. E. Schwarzbauer, K. S. Midwood and E. S. Gawalt, *Mat. Sci. Eng. C*, **2003**, 23, 395.
- (a) H. Klauk, U. Zschieschang, J. Pflaum and M. Halik, *Nature*, **2007**, 445, 745. (b) T. Sekitani, Y. Noguchi, U. Zschieschang, H. Klauk and T. Someya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 4976.
- U. Kraft, U. Zschieschang, F. Ante, D. Kalblein, C. Kamella, K. Amsharov, M. Jansen, K. Kern, E. Weverb and H. Klauk, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 6416.
- C. A. Traina, A. Christopher and J. Schwartz, *Langmuir*, **2007**, 23(18), 9158.
- W. Ma, H. Wu, Y. Higaki, H. Otsuka and A. Takahara, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 6824.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メークコード
10-CDPA	10 mg	11,000	C490
	100 mg	30,000	
FHPA	10 mg	9,800	F340
	100 mg	28,000	
FOPA	10 mg	9,800	F329
	100 mg	28,000	
FDPA	10 mg	13,000	F330
	100 mg	36,000	
M-EG ₃ -UPA	10 mg	13,800	M457
	100 mg	38,200	
11-NUPA	10 mg	11,000	N468
	100 mg	30,000	
11-HUPA	10 mg	11,000	H399
	100 mg	30,000	
ODPA	10 mg	11,000	O407
	100 mg	30,000	
11-PIUPA	10 mg	11,000	P463
	100 mg	30,000	

23rd フォーラム・イン・ドージン開催後記 ホスホリパーゼ A₂ が織りなす多元的世界

第23回のフォーラム・イン・ドージンが、秋も深まる11月16日、熊本市のホテルキャッスルで開催された。今年のテーマは「ホスホリパーゼA₂が織りなす多元的世界」である。ホスホリパーゼA₂(PLA₂)は細胞膜の主要な構成成分であるグリセロリン脂質のsn-2位に結合した不飽和脂肪酸を切りだしていく酵素であるが、その役割や多様性についての研究が最近大きく進んでいるとのことだったので、今年のテーマに選ばれた。内心、ちょっと対象が狭すぎるのではないかという危惧もあったが、結果的には盛会に終えることができ、くまモン人気にあやかる必要もなくなった。会を重ねるごとに、顔なじみの参加者も増えてくる。テーマに惹かれて路熊本まで足を運んでくれる参加者や、テーマにかかわらず毎年参加される先生方もおられ、23回の重みを感じることができる。大都市と比べると、熊本は研究機関の数も限られ、この種の学術的な催しを行うのには不利ではあるが、あえて熊本での開催にこだわり、その内容を魅力あるものにし、少しでも地域が誇れるものになれば、主催者にとっても本望である。



タイトルにある多元的世界を作りだしているのは30種類以上も存在するPLA₂である。2位のエステル結合を切断するだけの酵素が何故これほど数多く用意され、それぞれどのような役割を担うのか、基礎的なところから分かりやすく清水先生（東大医）と村上先生（東京都医学総合研究所）が導入された。それぞれ、細胞質型と分泌型に研究の力点を置かれ、多くの機能を明らかにされている。午後からのセッションでは疾病との関わりについて、心血管疾患について久木山先生（山梨大医）、神経変性疾患については隅先生（阪大医）が紹介されたが、フロアーからの質

問も多く、臨床の話にはいつも興味を引きつけるものがある。最後は少し趣をかえて、アポトーシス細胞の貪食処理におけるPLA₂の役割について西浦先生（熊大医）が、さらに、ハブ毒のPLA₂について、分子進化の視点も交えて上田先生（崇城大薬）が話された。ハブ毒も地域によって異なり、食性が反映されている可能性など、一つの分子の生い立ちから色々なことがわかるようだ。



今回のフォーラムから、新たな試みとしてマスターズ・レクチャーが企画された。生化学会等で行われているものと同じ狙いだが、第一回目として九大大名誉教授の西野先生に引き受けいただいた。ご自身のペプチド人生を振りかえり、若い研究者にも多くの示唆を与えられた内容だった。講演の最後に「不易流行」という言葉を残された。そういえばこのフォーラム 자체、「流行」ばかりを追いかけてきたが、そうしたなかで、「不易」の大切さにも改めて気づかされた。



ホームページアドレス
URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548