

学 位 論 文 の 要 旨

High-resolution O₂ imaging of living tissues based on
phosphorescence lifetime imaging microscopy using Ir(III) complexes
(Ir(III)錯体を用いたりん光寿命イメージング顕微鏡法に基づく
生体組織の高分解能酸素イメージング)

氏 名 水上 輝市 印

酸素は好気性生物の代謝過程において必要不可欠な分子であり、生体内において細胞の分化や増殖、代謝さらには細胞間情報伝達など様々な生命活動に関与している。生体組織内の酸素濃度変化は様々な病気の発症や増悪、進行に深く関わっており、組織中の酸素化状態を高分解能でライブイメージングする技術は、低酸素が関係する病態の発症・進展機序の解明、低酸素に対する応答機構の解明などに大きく貢献することが期待できる。生体組織における酸素濃度の測定には、酸素濃度に依存して発光特性が変化するりん光に基づいた光学的測定法が有用である。本研究では、室温で強いりん光を発するイリジウム(Ir)錯体を酸素プローブとして開発し、共焦点りん光寿命イメージング顕微鏡 (PLIM) 法を用いて、細胞スフェロイドや生体組織の酸素濃度分布を高分解能で画像化する技術を開発した。本研究で構築した共焦点 PLIM システムは倒立顕微鏡と共焦点レーザースキャニングシステムで構成されており、Ir 錯体を酸素プローブとして用いることで細胞や組織の高分解能酸素イメージングが可能である。

第 1 章では、序論として本研究の背景、これまでに報告されている酸素濃度測定法の概要、本研究の目的について、第 2 章では実験手法について述べられている。

第 3 章では、溶液中における Ir 錯体の光物理特性、細胞内特性を明らかにし、細胞内酸素プローブとしての評価を行った。続いて細胞スフェロイドの酸素分圧分布の可視化を試みた。本研究で用いた Ir 錯体 BTPDM1 と BTP-3OH は発光輝度やりん光寿命の長さ、酸素感受性などの光物理特性において細胞内酸素プローブとして優れた特性を示し、高い細胞内移行性や光安定性、低い細胞毒性を有していることが明らかになった。細胞スフェロイドの培養液にこのプローブを最終濃度 500 nM になるよう添加し 24 時間培養したところ、HT-29 細胞スフェロイド全体にプローブが行き渡り、細胞スフェロイドの酸素イメージングを可能にした。PLIM 測定の結果から、HT-29 細胞スフェロイドは表面から内部に向かってりん光寿命が長くなっていることがわかった。HT-29 細胞を用いたりん光寿命の校正に基づいてりん光寿命から酸素分圧を算出すると、内部になるほど低酸素状態に陥っていることが明らかになった。これは、細胞スフェロイドの表面側の細胞の酸素消費によって、細胞スフェロイドの内部への酸素供給が不十分となるためである。さらに、細胞内のミト

コンドリアのプロトン濃度勾配を解消する脱共役剤である FCCP および呼吸阻害剤 antimycin A を HT-29 細胞スフェロイドに添加し、酸素分圧の経時変化をリアルタイム計測することに成功した。これらの結果は、本法を用いることで酸素消費が関与する生体内の代謝過程を、時空間的に追跡できることを示している。

第 4 章では肝臓の酸素イメージングについて検討した。BTPDM1 あるいは BTP-3OH をマウスに投与した後に肝臓表層の PLIM 測定を行ったところ、肝小葉内の門脈から中心静脈に向かってりん光寿命が長くなった。これは血流に沿って肝細胞が酸素を消費するためである。AML12 細胞を用いてりん光寿命の酸素分圧に対する calibration を行いそれぞれのプローブから得られたりん光寿命から酸素分圧を算出した。BTPDM1 によって求められた酸素分圧は、門脈付近が 39 mmHg、中心静脈付近が 24 mmHg となった。一方、BTP-3OH によって求められた酸素分圧は、門脈付近が 7 mmHg、中心静脈付近が 3 mmHg となり、BTPDM1 と比較して著しく低い値を与えた。これは肝臓における毒物や異物の代謝による酸素消費のためと考えられ、肝臓における解毒の際の酸素消費変化を観察するため、塩化アンモニウムを投与し、肝臓の酸素濃度の経時変化を PLIM 法によって調べた。BTPDM1 を投与したマウスに、さらに塩化アンモニウムを投与し肝臓の PLIM 画像を測定したところ、10 分以内に BTPDM1 のりん光寿命が著しく増加し、酸素分圧が低下していることがわかった。その後、数十分で正常状態の酸素レベルに回復した。塩化アンモニウムの投与によって肝臓が低酸素状態に陥った理由は、アンモニアの解毒経路であるオルニチン回路が働き、酸素を消費する ATP 産生が活性化したためと考えられる。このように、Ir 錯体を酸素プローブとした PLIM 測定によって、生きたマウスにおける肝組織の酸素レベルの変化を高分解能でイメージングできることが明らかになった。

第 5 章では、腎臓の酸素イメージングについて検討した。血管内皮細胞を染色する蛍光プローブ FITC-lectin と酸素プローブとして BTPDM1 をマウスに投与した後、開腹し腎臓を露出させ *in vivo* FLIM/PLIM 測定を行った。蛍光寿命イメージング (FLIM) 測定を行った結果、腎表層の尿細管細胞とその周辺組織の形態や毛細血管を観測することができた。また、PLIM 測定を行った結果、BTPDM1 は血管壁を透過し、腎臓の尿細管細胞に集積して酸素濃度に依存したりん光寿命を与えていることがわかった。腎臓の近位尿細管は主に糸球体に近い S1 セグメントとその下流に位置する S2 セグメントで構成され、それらのセグメント間で異なる酸素レベルを有していることが PLIM 測定によって明らかになった。さらに、窒素/酸素混合ガスを用いて、マウスの吸気酸素分圧を 21% から 15% に低下させたところ、尿細管内の BTPDM1 のりん光寿命が長くなり、21% に戻すと再びりん光寿命が短くなった。HK-2 細胞を用いた calibration 実験に基づいてりん光寿命を酸素分圧に変換したところ、得られた酸素分圧は従来法である酸素電極を用いて測定した報告と一致しており、本研究で開発した共焦点 PLIM システムを用いることによって、腎組織の酸素化状態を高空間分解能でイメージングできることが明らかになった。

最後に、第 6 章で本研究の総括と今後の展望について述べられている。

学 位 論 文 の 要 旨

High-resolution O₂ imaging of living tissues based on
phosphorescence lifetime imaging microscopy using Ir(III) complexes
(Ir(III)錯体を用いたりん光寿命イメージング顕微鏡法に基づく
生体組織の高分解能酸素イメージング)

氏 名 水上 輝市 印

Molecular oxygen (O₂) plays a pivotal role in aerobic metabolism of cells and tissues. Oxygen level changes in living tissues are deeply involved in the onset, exacerbation, and progression of various diseases, and thus the imaging technique for O₂ distribution in living tissues with high-resolution can greatly contribute to the elucidation of the pathogenic mechanism of hypoxia-related diseases. An optical O₂ detection method based on O₂-dependent phosphorescence is very useful for *in vivo* oxygen measurements. In this thesis, a fluorescence and phosphorescence lifetime imaging microscopy (FLIM/PLIM) system using phosphorescent Ir(III) complexes as optical O₂ probe has been constructed for high-resolution O₂ imaging in cells, cell spheroids, and living tissues.

Chapter 1 outlines the background of this study and major O₂ measurement methods reported so far, followed by the purpose of this study. Chapter 2 describes the experimental methods used in Chapters 3-5.

In Chapter 3, a FLIM/PLIM system was constructed using an inverted microscope equipped with a confocal laser scanning system and an emission lifetime measurement system, and its basic performance was assessed using a solution of hydrophilic Ir(III) complex. After confirming the usefulness of the PLIM system, O₂ imaging experiments on HT-29 cell spheroids were performed using Ir(III) complexes, BTPDM1 and BTP-3OH. These complexes showed excellent characteristics as intracellular O₂ probe in photophysical properties such as brightness, lifetime, and O₂ sensitivity, and also in intracellular properties such as cellular uptake efficiency, cytotoxicity, and photostability in cells. In particular, their high cell-permeability facilitated penetration into a cell spheroid, enabling O₂ imaging of the entire cell spheroid. PLIM images of HT-29 cell spheroids stained with BTPDM1 or BTP-3OH showed a lifetime gradient that increases from the peripheral region towards the core. Based on the calibration of phosphorescence lifetime using HT-29 cells, it was shown that the core region of spheroids fell into hypoxia due to cellular respiration consuming oxygen. Furthermore, PLIM measurements allowed tracking changes in cellular oxygen consumption due to metabolic stimulation with FCCP and antimycin A.

In Chapter 4, the PLIM method using BTPDM1 and BTP-3OH was applied to O₂ imaging of the liver in living mice. The O₂ probes were intravenously administered to anesthetized mice, and the PLIM image of the hepatic tissues was measured *in vivo*. Both BTPDM1 and BTP-3OH were internalized in hepatocytes, and the PLIM images visualized clearly the characteristic structure of hepatic lobules. The lifetimes of each pixel in the PLIM images were converted to the oxygen partial pressure (pO_2) based on the intrinsic lifetime (τ_p^0) and quenching rate constant (k_q) which were determined by using AML 12 cells. BTPDM1 gave reasonable O₂ levels (24 mmHg for the central vein and 39 mmHg for the portal vein), whereas BTP-3OH showed extremely low O₂ levels (3 mmHg for the central vein and 7 mmHg for the portal vein), suggesting that the detoxification of probes might affect liver O₂ levels. In fact, intravenous administration of NH₄Cl to mice caused the hepatic tissues to fall into hypoxia because of the O₂ consumption to produce ATP required for detoxification of ammonia. These results reveal that Ir(III) complexes allow imaging of spatiotemporal changes in O₂ levels within the tissue microarchitecture *in vivo*, but some complexes may influence oxygen consumption in the liver when used for oxygen imaging of hepatic tissues.

In Chapter 5, the oxygen level of the renal cortex in mice was examined by FLIM/PLIM measurements using phosphorescent BTPDM1 as an O₂ probe and fluorescent FITC-lectin as a vascular staining reagent. In order to clearly image the structure of renal tissues, red-emitting intracellular probe (BTPDM1) and a green-emitting intravascular probe (FITC-lectin) were simultaneously administered to anesthetized mice. FLIM images of renal tissues separately visualized the proximal tubular cells and the peritubular capillaries by the fluorescence of FITC-lectin and autofluorescence. PLIM images showed that BTPDM1 was localized in the lysosomes located on the apical side of tubular cells, and gave different lifetimes depending on the tubules. Furthermore, PLIM measurements using BTPDM1 showed that the O₂ levels in renal tissue were sensitive to inspiratory conditions. Using the τ_p^0 and k_q of BTPDM1 as determined in HK-2 cells, the average pO_2 in the S1 and S2 segments were obtained to be 49 mmHg and 41 mmHg for 21% O₂ inhalation condition, and 39 mmHg and 33 mmHg for 15% O₂ inhalation condition. It was found from these results that the S1 segment had a slightly higher O₂ level than the S2 segment. The pO_2 of the renal tissue under 21% O₂ inhalation condition obtained from the PLIM measurement was in good agreement with the literature value obtained using the oxygen microelectrode, demonstrating the reliability of the PLIM system using Ir(III) complexes developed in this study.

Finally, the summary of this thesis is described in Chapter 6. This study showed that the PLIM method using Ir(III) complex as an O₂ probe provides a useful technique for high-resolution O₂ imaging of living tissues *in vivo*.