

病態細胞の研究に貢献

細胞の温度を見るための方法をマニュアル化に成功！

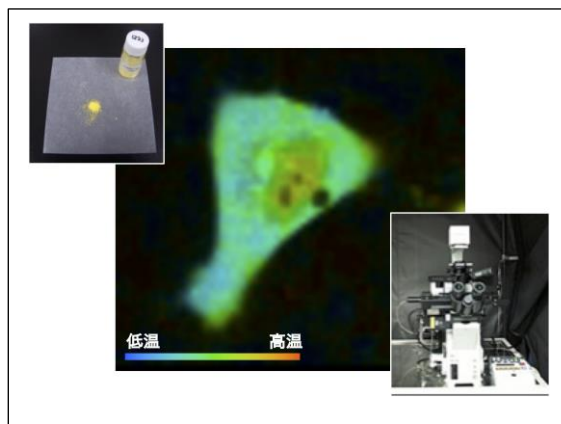
大阪府立大学（学長 辻 洋）の稲田のりこ准教授、新潟大学（学長 高橋 姿）の福田七穂特任講師、甲子園大学（学長 中村 秀雄）の林晃之専任講師（4月1日付で准教授）、東京大学（総長 五神 真）の内山聖一助教のグループは、一つの細胞の中の温度の分布を可視化する、細胞内温度イメージング法について、詳細なプロトコール（実験マニュアル）を確立しました。

体調が悪いときにはまず体温を測ることからもわかるように、温度は生物の状態を知る上で、もっとも重要な物理量です。ガン細胞などの病態細胞は、一般的に代謝が高く、温度が高いと言われています。細胞の温度を測定し、解析する方法の確立は、病態細胞の仕組みの理解、検出、新規治療法の開発に貢献すると考えられます。

今回確立された細胞内温度イメージング法の詳細なプロトコールは、これらの応用研究、また、生命科学の基礎研究に大きく貢献することが期待されます。本研究成果は、「Nature protocols」オンライン版で、日本時間の2019年3月23日午前1時に公開されました。

■本取り組みのポイント■

- 細胞の中の温度をイメージングするための実験手順や注意点を詳細にまとめたプロトコール（実験マニュアル）を確立。
- 温度は生物の状態を理解するためのもっとも重要な指標であり、細胞内温度イメージングは近年注目を集めているが、一般的なプロトコールが存在せず、多くの研究者がその確立を求めている。
- 今回確立されたプロトコールは、代謝が高く温度が高いガン細胞などの仕組みの理解、検出、新規治療法の開発に貢献すると期待される。



ポリマー型蛍光温度プローブ（左上）と蛍光寿命イメージング顕微鏡（右下）を用いた動物培養細胞の温度イメージング（中央）

【研究の背景】

体調が悪いときはまず体温計で体温を測ることからもわかるように、温度は生物の状態を知る上で最も重要な物理量です。しかしながら、生物の基本単位である細胞の中の温度については、細胞のような小さな空間に対応する温度計が存在しなかったため、長い間調べられていませんでした。

蛍光プローブ（解説1）と顕微鏡を用いた観察は、現在の生命科学研究において細胞の状態や仕組みを知るために欠かせない技術です。私たちは、独自に開発したポリマー型の蛍光温度プローブと蛍光寿命（解説2）イメージング顕微鏡（解説3）を用いて、細胞の中の温度分布を可視化する手法の開発に成功し、2012年に論文を発表しました。この論文では、細胞内に1℃以上の温度差があり、細胞核は細胞質よりも温度が高いこと、ミトコンドリアや中心体の周辺温度も細胞質の他の部分と比較して高いことを、世界で初めて明らかにしました。また、その後もさまざまな蛍光温度プローブと、細胞に適用する手法の開発に携わってきました。

ガン細胞などの病態細胞は、健全な細胞よりも代謝が活発であることがわかっており、温度が高いことが予想されています。このことから、細胞内温度イメージングを使うことにより、病態細胞の検出や、細胞が病態化する仕組みの解明、新規薬剤の開発、温熱療法時の患部温度のモニタリングなどへの応用が期待されます。また、さまざまな状態における細胞内の温度を詳細に調べることにより、温度というあたらしい観点から細胞の仕組みを明らかにできると期待されます。

以上のことから、私たちが開発した細胞内温度イメージングの手法は、論文発表後から大きな反響を呼び、国内外の研究者からの問い合わせが相次ぎました。また、ポリマー型蛍光温度プローブは、現在フナコシ株式会社から市販され、国内外において数多くの販売実績を上げています。さらに、細胞内の温度を可視化する新たな手法の開発にも注目が集まり、現在までに、国内外の多数のグループが、温度をさまざまな仕組みで検出する蛍光プローブを発表しています。

一方で、現在までのところ、細胞内温度イメージングは手法の開発についての研究が先行しており、この手法を用いて新しい生物学的発見をしたという報告は数えるほどしかありません。これは、細胞内の温度を正確にイメージングするために必要とされるさまざまな実験手順、注意事項が、通常の顕微鏡観察とは大きく異なっており、スタンダードとなるプロトコール（実験マニュアル）が存在しなかったためだと考えられます。

私たちは、初めて細胞内の温度分布を可視化する手法を開発した研究グループとして、これまでにさまざまな蛍光温度プローブの開発を通して細胞内温度イメージングの普及に取り組んできました。その普及活動の一環として、今回、外部研究者や雑誌編集者の強い要望に応える形で、スタンダードとなるプロトコールの作成を行いました。

【研究の成果】

今回発表した論文は、私たちが2015年に「PLOS ONE」誌に発表した細胞内温度イメージング法に関する論文を下敷きとして、その実験手順や注意点をまとめたものです。

私たちが独自に開発した蛍光温度プローブは、温度感受性のポリマーユニット、イオン性ユニット、蛍光性ユニットの3つのユニットから構成されています（図1a）。温度感受性ポリマーは、低温では伸展し、高温になると自己凝集するという性質を、また、蛍光性ユニットは、周りに水分子があると蛍光が弱まり、水分子が排除されると蛍光が強くなるという性質を持っています。温度感受性ポリマーと、この蛍光性ユニットを組み合わせることで、温度の変化によるポリマーの構造変化を蛍光の強弱で読み取ることができます（図1b）。またイオン性ユニットは、細胞の中でプローブが沈殿して機能を失ってしまうのを防ぐほか、プラスに帯電させることにより、細胞膜の透過性をプローブに持たせてプローブが細胞内

に自然に入っていくのを助けるという役割も持っています。

細胞膜透過性ポリマー型蛍光温度プローブは、プローブを含む溶液で10分間細胞を処理するだけで、自然と細胞の中に取り込まれ、細胞全体に拡散します(図2a、b)。処理時の至適濃度は異なりますが、HeLa、COS7、NIH/3T3など、生命科学で広く使われているさまざまな動物培養細胞に適用可能です。本論文では、蛍光温度プローブを細胞に導入する方法について詳細に解説したほか、細胞内の温度を正確に定量するために必要な検量線の作成法、細胞内温度イメージングを行う際の厳密な温度制御法についての実験手順、注意点をまとめました。

ポリマー型蛍光温度プローブは、温度が高くなると蛍光が強くなります(図1b)。一方で、蛍光の強さは、蛍光プローブの濃度、励起光の強度、検出器の感度などの実験条件に大きな影響を受けます。細胞内の温度変化を正確に測るため、私たちは、実験条件の影響を受けにくいパラメーターである蛍光寿命を使用した細胞内温度イメージングを行いました。ポリマー型蛍光温度プローブは、温度が高くなると蛍光寿命が長くなります。この論文では、蛍光寿命を測定し可視化できる蛍光寿命イメージング顕微鏡の使用法についても詳細に解説し、この顕微鏡を使って、細胞内の温度分布を定量的にイメージングする方法手順を確立しました(図2c)。

私たちが確立したプロトコールは、私たちが開発したポリマー型蛍光温度プローブだけでなく、他のグループによって開発された蛍光温度プローブを用いての細胞内温度イメージング実験を行う上でも重要な指針となるものです。さらに、検量線の作成法や蛍光寿命イメージング顕微鏡の使用法に関する詳しいマニュアルは、細胞内のさまざまな物質(イオン、活性酸素など)の濃度や状態(pHの変化など)を可視化する実験にも適用できます。本論文は、細胞内温度を使用する応用研究・基礎研究だけでなく、「生細胞イメージング」を用いる生命科学全体に貢献するものと考えています。

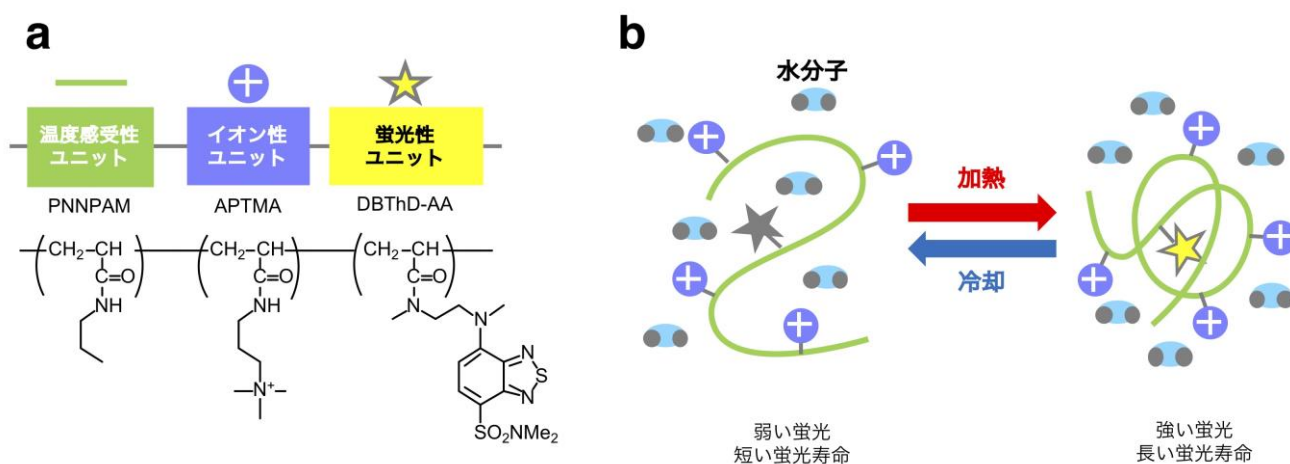


図1. 細胞膜透過性ポリマー型蛍光温度プローブの構造と温度検出の仕組み。(a) 蛍光温度プローブの構造。温度感受性ユニット、イオン性ユニット、蛍光性ユニットの3つのユニットから構成されている。(b) 温度が高くなると、温度感受性ユニット(緑のひも)が凝集し、蛍光ユニット(星型)の周辺の水分子が排除されるため、蛍光強度が強くなり、また蛍光寿命が長くなる。

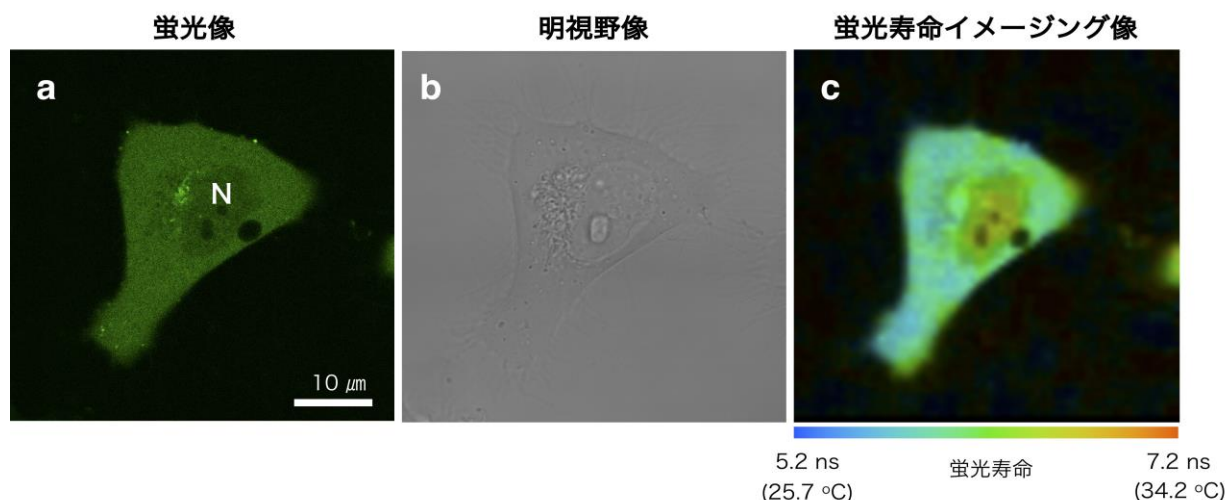


図 2. 細胞膜透過性ポリマー型蛍光温度プローブを導入した HeLa 細胞の蛍光像 (a)、明視野像 (b)、温度を示す蛍光寿命イメージング像 (c)。細胞の中央の丸い構造が細胞核 (N)。蛍光寿命イメージング像では細胞核の中の蛍光寿命が長くなっており、細胞核の温度が細胞質よりも高いことがわかる。

【用語解説】

(解説 1) **蛍光プローブ**: 細胞のような微小空間における分子やイオンなどの化学量、また、温度や粘度などの物理量を、蛍光現象の変化で出力する化合物。

(解説 2) **蛍光寿命**: 蛍光物質が励起光からのエネルギーを受けて励起状態に移行してから、蛍光を発して基底状態に戻るまでの、励起状態にとどまっている時間の長さのことを指す。蛍光物質はそれぞれ数ナノ秒程度の特定の長さの蛍光寿命を有する。蛍光寿命の長さは、蛍光物質が置かれた環境によって異なることから、蛍光物質の蛍光寿命を測定することにより、その蛍光物質がどのような環境にあるのかが推定できる。

(解説 3) **蛍光寿命イメージング顕微鏡**: 蛍光寿命を可視化することができる顕微鏡システム。画像のピクセルごとに蛍光寿命を測定し、蛍光寿命の長さを擬似カラーで示すことにより、視野内の蛍光寿命分布を可視化できる。

【発表論文】

発表雑誌: Nature protocols

論文名: Temperature imaging using a cationic linear fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy.

著者名: 稲田のりこ (大阪府立大学)、福田七穂 (新潟大学)、林晃之 (甲子園大学)、内山聖一 (東京大学)

論文 URL: <https://www.nature.com/articles/s41596-019-0145-7>

DOI: 10.1038/s41596-019-0145-7

【研究助成資金等】

JST 先端計測 分析技術・機器開発プログラム 要素技術開発 (2010年～2014年、代表者：内山聖一)、
三菱財団自然科学研究助成(2013年～2015年、代表者：稲田のりこ)、科学研究費補助金(基盤(C)16K07415、
代表者：稲田のりこ；基盤(B)17H03075、代表者：内山聖一)

【お問い合わせ】

■研究内容に関すること

大阪府立大学 稲田のりこ 准教授

mail : [norikoinada\[at\]plant.osakafu-u.ac.jp](mailto:norikoinada[at]plant.osakafu-u.ac.jp) TEL : 072-254-7494

新潟大学 福田七穂 特任講師

mail : [nanahof\[at\]bri.niigata-u.ac.jp](mailto:nanahof[at]bri.niigata-u.ac.jp) TEL : 025-227-0565

甲子園大学 林晃之 専任講師 (4月1日付で准教授)

mail : [hayashi\[at\]koshien.ac.jp](mailto:hayashi[at]koshien.ac.jp) TEL : 0797-87-8467

■報道提供に関すること

大阪府立大学 理事長室 広報課 林田 雄三 TEL : 072-254-9103

新潟大学 脳研究所 共同利用係 高木 美桜 TEL : 025-227-0565

甲子園大学 広報担当 下田 陽・樋口 信一 TEL : 0797-87-5111

※上記の[at]は@に置き換えてください。