

## 高輝度ピレン誘導体の開発と *in vivo* 多光子蛍光イメージングへの応用

(高知大院総合<sup>1)</sup>) ○仁子 陽輔<sup>1</sup>

Development of pyrene-based bright probes for *in vivo* multi-photon excited fluorescence microscopy imaging (<sup>1</sup>*Graduate School of Integrated Arts and Sciences Kochi University*)

○Yosuke Niko<sup>1</sup>

*In vivo* fluorescence imaging enables visualizing the living cells, tissues, and organs in model animals with high spatio-temporal resolution. However, what can be observed through the technique strongly depends on the performance of the fluorescent probes in use. In this presentation, the author will introduce recently developed bright probes based on pyrene and their application to *in vivo* imaging.

**Keywords :** Pyrene; *In vivo* Fluorescence Imaging; Multi-photon Fluorescence Microscopy

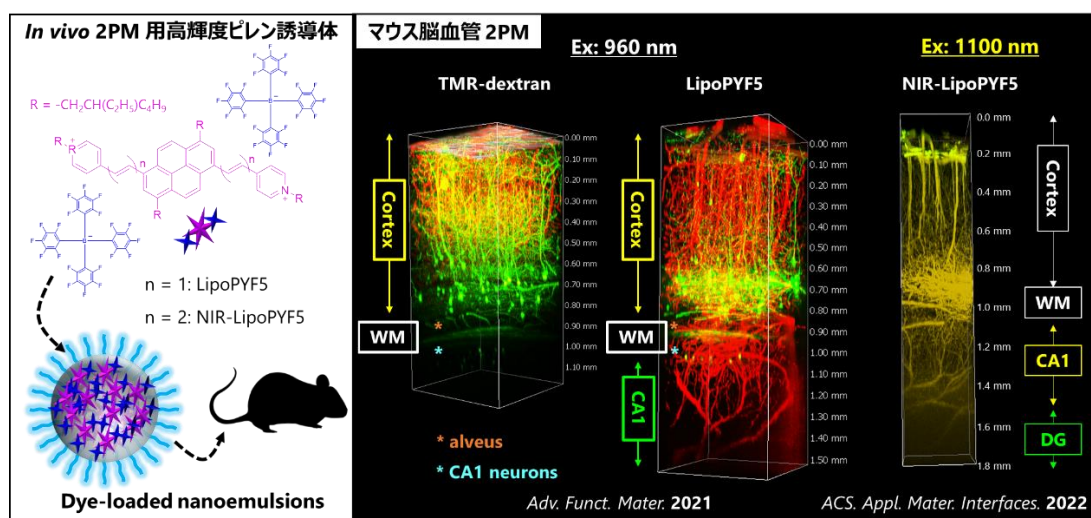
生体 (*in vivo*) 蛍光イメージングとは、動物体内の生きた細胞・組織・器官を低侵襲的に観察する技術の一つであり、その高い時空間分解能や複数の標的を同時に捉える多重染色性に特徴がある。中でも、蛍光プローブ（蛍光色素）の二光子吸収（あるいは多光子吸収）現象を利用した *in vivo* 二光子励起蛍光イメージング (*in vivo* 2PM) は生体深部の観察に優れ、さらに三次元的光学断層像の取得を可能とすることから、生物・医学分野を中心に広く利用されている。

*In vivo* 2PM における重要な標的の一つとして、マウスの脳血管が挙げられる<sup>1)</sup>。脳血管動態（血流速度、血管径など）は近傍の神経活性に応じて変化することが知られており、それらを詳細に観察する技術を開発することは神経-血管相互作用の理解とそれに関連する神経疾患や虚血性脳梗塞、悪性腫瘍等の病態解明、および治療法開発に繋がると期待されている。しかし、従来の *in vivo* 2PM ではマウスの脳新皮質領域（脳表面から 0.8 mm 程度）の血管を観察することができても、記憶・学習を司る海馬領域 (> 1.0 mm) の血管を観察することは非常に難しい。仮に観察できたとしても、1 画像を取得するのに 1 秒以上かかってしまう (< 1 frame/s (fps)) 場合が多く、血管動態の観察に十分な時間分解能を得られない点に問題がある。

上記の問題を解決するためのアプローチの一つとして、『高輝度な蛍光プローブを開発・利用する』ことが挙げられる。高輝度なプローブを用いることで、生体深部に侵達した微弱な励起レーザー光でも十分な蛍光シグナルを得ることができ、観察深度が向上すると予想される。特に、生体組織透過性が高い > 900 nm の領域で高い輝度（＝二光子励起発光効率：二光子吸収断面積×蛍光量子収率）を示し、さらに検出器の高感度帯で蛍光を放射できる色素を集積させた新規蛍光プローブが得られれば、*in vivo* 2PM における観察深度や時間分解能を飛躍的に向上できると期待される。

本講演者はこれまで、ピレンを基盤とした様々な *in vivo* 2PM 用高輝度蛍光プローブを開発してきた（下図参照）。2021 年には、ジカチオン性ピレン誘導体 LipoPYF5 を開発した<sup>2)</sup>。LipoPYF5 は、*in vivo* 2PM に汎用されるテトラメチルローダミン (TMR)

誘導体と比較して 25 倍以上の輝度を有することが明らかになっており、また汎用の蛍光検出器 (GaAsP) の高感度帯にマッチした赤色蛍光を示す。同色素を高密度集積したナノエマルジョンを作成し、マウスに静脈投与することで、マウス脳表面から約 1.5 mm の血管を可視化することに成功した。また、レゾナントスキャナーを用いた高速イメージング (120 fps) を実施したところ、最深で脳表面から 1.1 mm の血管を観察することができ、当時世界で初めて、2PM によるマウス脳海馬 CA1 域の血流を直接観察することに成功した。なお、TMR を用いた場合の観察深度は 0.6~0.8 mm 程度であり、したがって本成果は高輝度蛍光プローブの開発・利用が *in vivo* 2PM の性能 (観察深度・時間分解能) の向上に対する重要なアプローチであることを支持している。2022 年には、生体透過性の高い第二近赤外光 (1100 nm) で効率的な二光子励起発光性を示すピレン誘導体 NIR-LipoPYF5 を開発した。同色素を高密度集積したナノエマルジョンを作成し、マウスへと静脈投与することで、神経新生の場である海馬歯状回領域 (脳表面から約 1.8 mm) の血管の観察に成功した他、海馬 CA1 領域 (1.1~1.5 mm 程度) 全層の毛細血管を明瞭に描出することにも成功している<sup>3)</sup>。



本講演者はこれまでに、上記した脳血管に加え、骨髄や皮膚組織など、様々なものを標的とした *in vivo* 2PM を実施してきた。本講演では、これまでに開発してきたピレンを基盤とした蛍光プローブとそれらを活用した *in vivo* イメージング、そして今後の展望について紹介したい。

- 1) K. Kisler, D. Lazic, M. D. Sweeney, S. Plunkett, M. El Khatib, S. A. Vinogradov, D. A. Boas, S. Sakadži, B. V. Zlokovic, *Nat. Protoc* 2018, 13, 1377.
- 2) M. Takezaki, R. Kawakami, S. Onishi, Y. Suzuki, J. Kawamata, T. Imamura, S. Hadano, S. Watanabe, Y. Niko, *Adv. Funct. Mater.* 2021, 31, 1.
- 3) H. Matsuura, R. Kawakami, M. Ise, M. Hoshihara, Y. Minami, K. Yatsuzuka, T. Tsuda, M. Murakami, Y. Suzuki, J. Kawamata, T. Imamura, S. Hadano, S. Watanabe, Y. Niko, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2022, 14, 404810.