

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
平成 21 年度採択研究代表者

今村 健志

財団法人癌研究会癌研究所 生化学部・部長

新規超短パルスレーザーを駆使した *in vivo* 光イメージング・

光操作のがん研究・がん医療への応用

§ 1. 研究実施の概要

本研究課題では、新規長波長パルス光源および補償光学を駆使した新規2光子励起顕微鏡システムを開発し、さらに、様々ながんモデル動物を利用して、波長、パルス幅、ビーム径、波面収差など光学的なパラメータの最適化をおこなう。これらの結果を踏まえ、光源の性能を精密に制御する光学系の開発を推進する。一方で、光照射によってラジカルを発生する光機能性分子を利用したがん光治療への方途を拓く。これまでに「新規補償光学系長波長2光子励起顕微鏡の設計」に関しては、平成 22 年度の装置構築に向けて、「補償光学系による収差補正量の計算」、「顕微鏡の構成及び標本周辺の構成検討」や「深部観察評価のための標本検討」等をおこない、装置の基本構成を決めるに至った。「新規光プローブ・光操作分子、新規がんモデル動物の開発」に関しては、新しいがん細胞移植モデル系の確立と蛍光分子プローブ発現がん細胞株の作製を進めた。また、がん幹細胞特異的のマーカールやがん細胞内シグナル伝達などを可視化する機能蛍光遺伝子や蛍光分子プローブに関して抗体のスクリーニングを開始し、光機能性分子でラベルした抗体を用いた CALI 実験を開始した。

研究進捗状況は順調で、研究成果も出つつある。これらの成果をもとに、平成 22 年度には、具体的な装置構築を開始する予定である。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「財団法人癌研究会」グループ

- ① 研究分担グループ長: 今村 健志 (財団法人癌研究会癌研究所、部長)
- ② 研究項目
新規補償光学型長波長 2 光子励起顕微鏡の構築
新規光プローブ・光操作分子、新規がんモデル動物の開発

(2) 「株式会社ニコン」グループ

- ① 研究分担グループ長: 佐瀬 一郎 (株式会社ニコン、一般職)

- ② 研究項目
新規補償光学型長波長 2 光子励起顕微鏡の構築

(3)「自然科学研究機構基礎生物学研究所」グループ

- ① 研究分担グループ長:野中 茂紀(自然科学研究機構基礎生物学研究所、准教授)
- ② 研究項目
新規補償光学型長波長 2 光子励起顕微鏡の構築

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する。)

(1) 新規補償光学系長波長2光子励起顕微鏡の設計

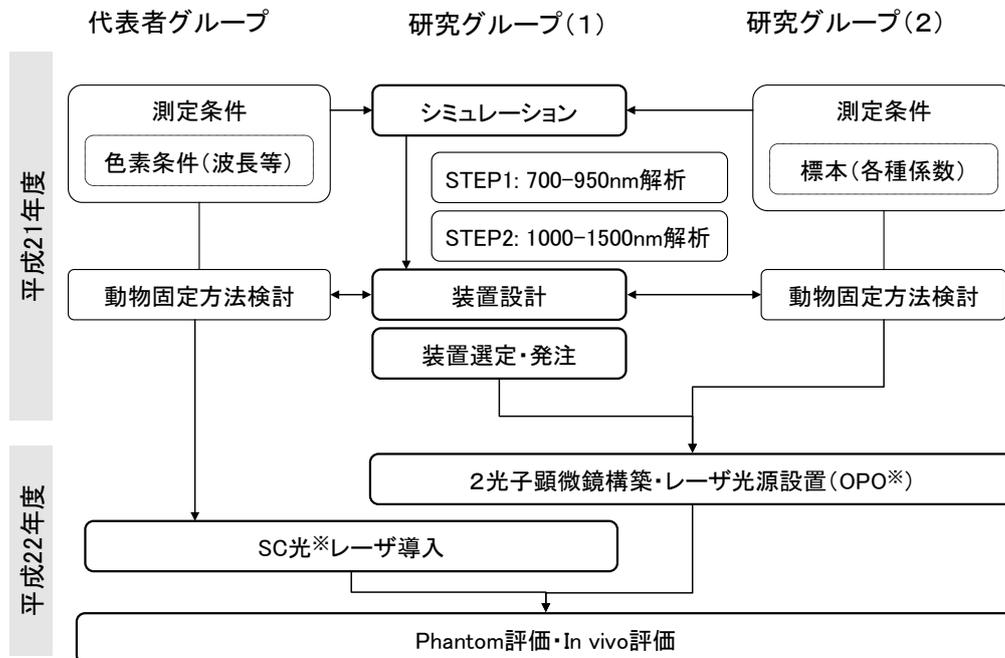
平成 22 年度の装置構築に向け、以下の各項目に対する検討をおこない、装置の基本構成を決めるに至った。

1) 補償光学系による収差補正量の計算

新規補償光学系長波長2光子励起顕微鏡に搭載する補償光学系素子を決定するため、*in vivo* 標本深部における収差の発生量を計算し、さらに原理的に高次の補正に十分な分解能での制御が可能となる素子を選定した。また、補償光学系の単独評価のための光学系も設計し、構築を開始した。補償光学素子は、レーザ光源と波面センサーを用いた光学系により波面をモニターすることによりフィードバック制御することとした。

2) 顕微鏡の構成及び標本周辺の構成検討

実際の標本操作及び光学調整(光学系の切替含)を考慮し、光学系(光源・入射光学系(位置補正含)・スキャナー部・補償光学系・顕微鏡・対物レンズ)の配置を決定した。



※: Optical Parametric Oscillator, Supercontinuum 光

3) 深部観察評価のための標本検討

生体試料の深部観察を想定した疑似生体試料の検討を進め、蛍光ビーズなどを利用した厚さのある標準標本を作製した。本研究における生体標本において重要なパラメータとしては「屈折率」に加え「散乱」が想定され、散乱に関しても疑似生体試料作成の検討を継続的に進めている。また、骨については、厚さの異なる非脱灰切片を作製し、その透過特性を測定する基礎実験に着手した。

(2) 新規光プローブ・光操作分子、新規がんモデル動物の開発

平成 22 年度の装置構築後の実験に向け、以下のモデルや分子プローブの作製を進めた。

がん細胞動態、機能、微小環境を *in vivo* で可視化解析するための新しいがん細胞移植モデル系を確立した。具体的には、蛍光蛋白質を発現するヒト胃がん細胞株 MKN45 細胞の腹膜播種モデルと同所移植モデルを樹立し、病的に移植細胞を確認した。次年度に *in vivo* イメージングをおこなう予定である。

次に、HT1080 細胞（ヒト線維肉腫細胞株）に mAG-hGem(1/110) 遺伝子と mKO2-hCdt1(30/120) 遺伝子を導入した Fucci-HT1080 細胞を樹立し、*in vitro* で細胞周期のイメージングに成功し、さらに Cdk4 inhibitor と Wortmannin (PI3K 阻害剤) による G1 arrest を確認した。次年度に、Fucci-HT1080 細胞を用いたリンパ行性転移モデルを確立する予定である。

がん幹細胞特異的マーカーやがん細胞内シグナル伝達などを可視化する機能蛍光遺伝子や蛍光分子プローブに関しては、まず、上皮細胞及び間葉系細胞に対するさまざまな抗体のスクリーニングを開始した。

光機能性分子でラベルした抗 CEA 抗体を作製し、*in vitro* でヒト胃がん細胞株 MKN45 細胞への CALI 効果を得ることに成功した。さらに、腹膜播種モデルを用いて、*in vivo* で抗 CEA 抗体の CALI 実験をおこない、その効果を病的に検証した。その結果、腹膜播種モデルにおいては、がんの体積が大きく、さらに部位によっては光照射が難しく、CALI の効果を得ることが困難であることがわかった。この基礎実験の結果を踏まえ、CALI 効果を検証しやすい新たな同所移植モデルを樹立した。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

Ito I, Hanyu A, Wayama M, Goto N, Katsuno Y, Kawasaki S, Nakajima Y, Kajiro M, Komatsu Y, Fujimura A, Hirota R, Murayama A, Kimura K, Imamura T, Yanagisawa J
Estrogen inhibits TGF- β signaling by promoting Smad2/3 degradation.
J Biol Chem. (2010) in press