

今村 健志

国立大学法人愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学分野・教授

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、さまざま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ー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光子励起顕微鏡の構築」に関しては、補償光学専用2光子励起顕微鏡の設計をおこない、新規対物レンズを開発した。補償光学制御とその特性の基礎評価を実施し、蛍光ビーズによる補償光学効果の確認をおこなった。さらに、顕微鏡の構成及び標本周辺の構成検討をおこない、深部観察評価のための標本検討をおこなって、プロトコルを確立した。「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2種類の確立と Fucci を含む蛍光分子プローブ発現がん細胞株4種類を作製した。また、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、光機能性分子でラベルした抗 CEA 抗体を用いた CALI 実験を *in vitro* で成功させ、*in vivo* 実験を開始した。

§2. 研究実施体制

(1)「国立大学法人愛媛大学 大学院医学系研究科」グループ

- ① 研究分担グループ長:今村 健志 (国立大学法人愛媛大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・*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

(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、主幹技師)

② 研究項目

・新規2光子励起顕微鏡の開発

(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

・小動物を用いた *in vivo*2光子励起顕微鏡システムの開発

(4)「北海道大学電子科学研究所」グループ

① 研究分担グループ長:根本 知己 (北海道大学電子科学研究所、教授)

② 研究項目

・生物個体用 *in vivo*2光子励起顕微鏡の高度化

§3. 研究実施内容

(文中の引用番号等は(4-1)に対応する)

(1) 新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の構築

平成22年度の課題であった「長波長2光子励起システムの設計と補償光学系の導入とその最適化」に関し、同顕微鏡システムの設計に関しては完了し、通常の波長帯域(700-1000 nm)における2光子励起顕微鏡の構築及び動作確認は実施されている(前述のマウス脳における1050 nmの深部イメージングに成功)。さらに、補償光学系の導入及びその制御、蛍光ビーズを利用した疑似生体標本中での点像の取得及び最適化も成功している(以下に詳細を記載)。補償光学素子の制御部分に関しては、さらに年度末に向けて制御の簡易化及び最適化をすすめてゆく。

長波長化部分に関しては、光源の長波長化を担うOPOシステム部分の納入が遅れたが(出力強度を重視し、最新機種を選定)、平成23年3月にOPOの設置し、長波長帯域の光学構築を開始した。但し、波長域によってはレーザー発振の不安定性が生じているので、まず、その対応を行う予定である。以上を踏まえ、機能検証に関しては来年度に持ち越す予定である。

【補償光学素子】

補償光学素子としては、本プロジェクトの目的を達成するため、広波長域にて高反射率を有し、多数電極且つ大きな可動量をもつ補償光学素子を選定し、光学系へ導入した。電極制御のためのソフトウェアを構築し、2光子励起顕微鏡へ導入することにより、高屈折率標本において微小蛍光ビーズの点像分布関数に改善をもたらすことに成功した。

来年度は、同光学系において生物標本を観察し、蛍光染色された生物標本における補償光学素子の効果を定量化する予定である。

(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

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、昨年度に作製したFucci-HT1080細胞(ヒト線維肉腫細胞株)に加え、mAG-hGem(1/110)遺伝子とmKO2-hCdt1(30/120)遺伝子を導入したMDA-MB-231-D細胞(高骨転移ヒト乳がん細胞株)を作製した。Fucci-MDA-MB-231-D細胞については、ヌードマウスの左心室に注射する骨転移モデルを用いて、骨転移したがん細胞の細胞周期を病的に観察し、転移の初期ではG1期の細胞が多いことを明らかにした。さらに長波長化に対応させるため、第二世代FucciであるmCherry-hCdt1(30/120)遺伝子を導入した新しいがん細胞株を2種類作製した(ヒト乳がん細胞MCF7とマウス乳がん細胞4T1)。次年度に、*in vivo*で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、光機能性分子でラベルした抗CEA抗体を用いたCALI実験を*in vitro*で成功させ、*in vivo*実験を開始した。当初は腹膜播種モデルで*in vivo*治療実験をおこなったが、殺細胞効果を出すことが難しいとわかったので、胃壁移植による同所

移植モデルを樹立し、その検討を開始した。また、乳がんの悪性化に重要なエストロゲンと TGF- β のシグナルのクロストークとその分子メカニズムを明らかにした 1)。これは当該研究課題で我々が解析する骨髄におけるがんの病態の解明に繋がる重要な成果である。さらに、がん抑制遺伝子 p53 の機能の新たな制御メカニズムを明らかにした 2)。また、近赤外蛍光プローブについては、既に確立した血管のイメージングの系にさらに改良を進めた。

一方、補償光学系を導入した2光子励起顕微鏡の評価のための生体標準試料の探索を、その構築に先立って開始した。評価用標準試料としては、2光子励起顕微鏡の深部観察能を最大限引き出せる光学特性であること、さらに特性が試料によってばらつかない安定性が求められる。

当初、扱いが簡単な固定組織、染色試薬による染色試料の利用を検討したが、少なくとも補償光学を用いない既存の2光子励起顕微鏡においては、固定組織の深部観察は困難であることがわかった。さらに未固定試料においても、深部観察能は組織の状態、蛍光タンパク質の発現量に大きく左右されることがわかった。最終的には、神経細胞において EYFP を強く発現する H-line トランスジェニックマウスの脳を、スライスではなく *in vivo* の状態で観察することが最適であるという結論に至った。

また、麻酔下でマウスを保定し、長時間にわたって観察を可能とする方法論の開発に成功した(図2)。研究代表者が癌研究所から愛媛大学に移動したために、本プロジェクトは基礎生物学研究所で中心的に行われ、北海道大学のグループが基礎生物学研究所に何度も足を運んで共同作業を行ったためにうまくいった。また、電気生理学で用いられる方法論を援用することで、オープンスカル法により大脳新皮質の *in vivo* イメージングを実施するための方法論を開発した。特に、極めて短時間に完了する外科手術のプロトコルを確立し、生体への侵襲性や影響を抑えることに成功した(図3)。



図2: 観察のため頭部を対物レンズに対し保定したマウス



図3: マウス頭蓋上に作られた大脳観察用窓

このように、ニコングループの新規対物レンズによる光学的な性能の改善と自然科学研究機構グループ、北海道大学グループによる生体 *in vivo* イメージングの方法論の確立により、H-line マウスを用いた生体脳の観察において、深部到達能力をさらに更新し、1 mm 以上の生体脳深部で

の蛍光断層イメージングに成功した。また、SHGシグナルを用いて硬膜や骨組織の生体 *in vivo* イメージングが可能であることが判った。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 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 transforming growth factor b signaling by promoting Smad2/3 degradation. J Biol Chem. 285: 14747-55, 2010. DOI 10.1074/jbc.M109.093039
2. Inoue Y, Iemura S, Natsume T, Miyazawa K, Imamura T: Suppression of p53 activity through the cooperative action of Ski and histone deacetylase SIRT1. J Biol Chem. 286: 6311-20, 2010. DOI 10.1074/jbc.M110.177683

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)