

「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

H23 年度 実績報告

今村 健志

愛媛大学大学院医学系研究科・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 研究代表者: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 主たる共同研究者: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 主たる共同研究者: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 主たる共同研究者: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」の実験

§2. 研究実施内容

(文中の引用番号等は(3-1)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

【長波長2光子励起顕微鏡】

本年度は、2点の大きな成果を得ることができた。まず、昨年度問題となっていた OPO システムを構築するに至り、通常の波長領域を超えた $>1100\text{ nm}$ において多光子励起観察をおこなうに至った。具体的には、一部の錐体路細胞に EYFP を発現する H-line トランスジェニックマウスの生体脳イメージングにおいて、従来のチタンサファイアレーザーでは約 0.8 mm の深部イメージングが限界であったが、OPO システムを用いた 1100 nm を越える波長励起によって、 1.0 mm を越える深部イメージングに成功した。特記すべきは、OPO システムを用いた場合のレーザーパワーは従来のチタンサファイアレーザーのそれに劣り、 1100 nm を越える波長は EYFP の至適の励起波長ではないことである。さらに、OPO を利用した長波長2光子励起観察においては、いくつかの有効な波長にて蛍光タンパク質を有効に励起できる波長を確認することに成功した。また、長波長を利用した SHG による *in vivo* 標本の多次元情報の取得に成功した。

次に、より深部の観察を可能とするために、新型高感度検出器である GaAsP 検出器を試作し、生物標本に応用した。GaAsP 検出器を用いることで、通常の PMT の 2-3 倍程度の感度を得ることができた(図1参照)。具体的には、H-line マウスにおいては 1 mm を越える深部到達性を実現し、ヤングアダ

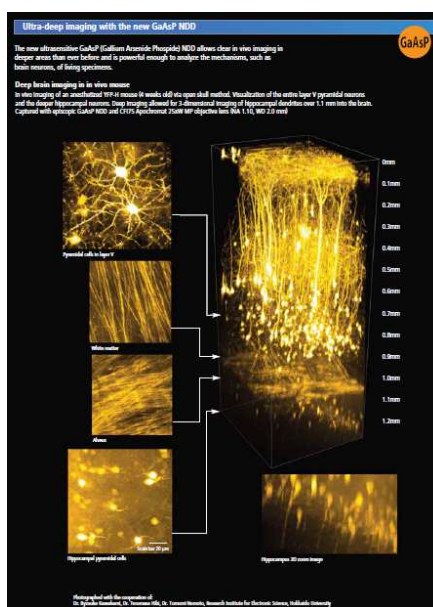


図 1

ルトの個体の場合、大脳新皮質全層 (I-VI)、及び白質、白板の観察が可能となった。さらに若齢マウスの安定観察法についても改善をおこなった結果、4週令の H-line マウスにおいては、世界で初めて、脳表から 1 mm を越える深部にある海馬 CA1 ニューロンの *in vivo* 観察に初めて成功した。この限界は、対物レンズの作動距離が 2 mm 程度しか無いこと

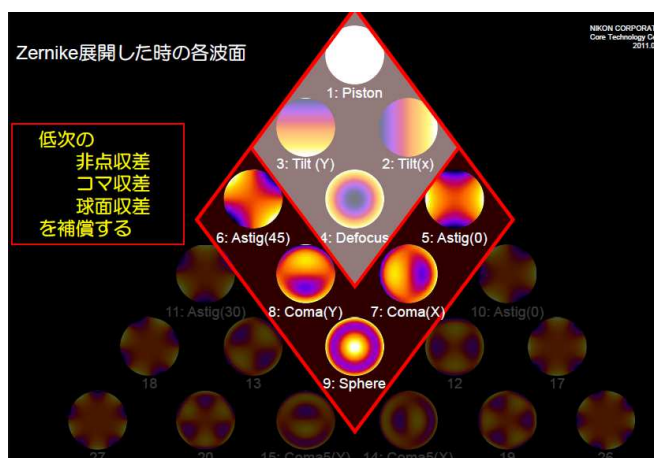


図 2

が原因であるので、より長い作動距離の対物レンズの導入について、特注も含め、検討をおこなう。

【補償光学素子】

昨年度は手動により補償光学素子制御を行っていたが、本年度はフィードバックソフトウェアを開発し、補償光学素子の最適パラメータ検出の自動化に成功した。補償光学素子 (Deformable Mirror) のパラメータ決定においては、Zernike 関数を利用し、特に影響の大きな低次項の成分 (図2参照) を対象に自動制御を施し、得られた画像を定量評価し、再度補償光学素子パラメータを変えるというループを回し、最適画像 (蛍光輝度の向上) を得る一連のハードウェア及びソフトウェアを開発した。

【レーザー照射条件の検討】

AOの簡略化を目的とし、励起レーザー光の瞳充足率と拡散角、補正環位置をパラメータとして、生体 *in vivo* 観察条件の最適化を検討した。その結果、生きた H-line マウス脳の観察においては、深さ依存的な最適条件があることが判明した。今後は骨組織等との比較検討が重要になる。

(2) 新規補蛍光プローブ・光操作分子、新祈願モデル動物の作製

昨年に引き続き、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の確立を進めた。さらに、得られた系を用いて、生物学的意義を確認した。具体的には、昨年度までに作製した各種 Fucci 発現がん細胞で、新たに、骨転移早期観察モデルを樹立し、さらに、乳がん細胞株 Fucci-MCF-7 については、共同研究で PI3K 阻害剤 ZSTK474 によるがん細胞の G1 アレスト誘導を *in vivo* で可視化することに成功した 1)。ZSTK474 は共同研究者が開発した独自性の高い薬剤で、現在 Phase 1 臨床試験中であり、このまま医薬品化まで繋がれば、本研究成果が創薬にも役に立つインパクトの高いものであることを立証できると考えている。また、共同研究で、生体深部観察のために、蛍光タンパク質とルシフェラーゼ酵素の新規融合タンパクを樹立し、そのトランスジェニックマウスを作製することで、*in vivo* での有用性を明らかにした 2)。具体的には、我々が、コンストラクトのスクリーニングと培養細胞を用いた活性評価、がん細胞導入等を担当した。

【補償光学を評価するための生体試料】

補償光学系を開発する上で必要とされる、評価のための生体試料について検討を行った。適切な評価を行うためには、生体深部まで十分な濃度で、適切なコントラストをもって蛍光物質が分布している必要がある。核や神経細胞に蛍光タンパクを発現するトランスジェニックマウス、蛍光ビーズをマウス体内に血流を介して全身に分布させたもの、脳内に注入したもの、さらに量子ドットについて検討した結果、主にトランスジェニックマウスを用いて行うこととした。さらに、マ

ウス生体脳の *in vivo* イメージングにおいて、麻酔下のマウスの保定方法を改良し同一のマウス個体内部の同一部位について、長時間(6時間以上)に渡り、安定的に観察することが可能となった。

【新規透徹剤による透明化処理の検討】

固定生体サンプルの観察における深部到達性の向上のため、新規透徹剤の検討を行った。(薬品名は公開しない)その結果、2光子顕微鏡、共焦点顕微鏡の両方で使用可能なプロトコルが決定でき、H-line マウス固定脳標本において、深部樹状突起スパインの形態を観察することが可能となった。他の臓器への応用可能性を今後は検討する。

【長波長化に対応した生体試料】

標準モデルとして採用している H-line マウスを用いて、多様な臓器での深部観察を試みた。さらに新規蛍光タンパク質の発現系の検討を行った。また、新たに H2B マウス等の新規動物モデルの導入を開始した。特に、新規蛍光タンパク質 Ca²⁺センサーであるカメレオンナノを発現したトランスジェニックマウスのプロファイリングと Ca²⁺依存性開口放出の可視化解析を進めた。次年度、原書論文を投稿する予定である。

【ファイバーレーザーを用いた2光子 DSLM の構築】

2光子励起顕微鏡とは別の深部観察の方法論である光シート型顕微鏡 DSLM と、波長 1043 nm のファイバーレーザーを組み合わせた2光子 DSLM を構築し、画像取得に成功した。同様の試みは他のグループも従来のチタンサファイアレーザーを用いて行っているが、DSLM においては、広い視野を確保するためには励起光の照射に使う対物レンズの NA は低い方がよいが、すると2光子励起に必要な光子密度を得られなくなるというトレードオフの関係がある。この限界を、高いピークパワーをもつファイバーレーザーを用いることで打ち破り、非常に広い視野にて画像を取得することに成功した。現状は光学的な原理の実証段階にあり、今後は、高速なスキャン光学系や試料の保持・保温の方法を工夫することで小動物の *in vivo* 観察に活用していくと共に、さらに補償光学を用いた画質向上の可能性を検討する。すでに、マウス以外のモデル系として、DLSM を用いた *Xenopus* イメージング 3)と2光子励起顕微鏡を用いた *Zebrafish* イメージング 4)の基礎実験をおこない、一部は論文発表した。今後は、メダカ等のイメージングの条件検討も進める予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Shingo Dan, Mutsumi Okamura, Yumiko Mukai, Hisashi Yoshimi, Yasumichi Inoue, Aki Hanyu, Asako Sakaue-Sawano, Takeshi Imamura, Atsushi Miyawaki, Takao Yamori, “ ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo ”, *Eur J Cancer*, Apr;48(6):936-43, 2012 (DOI 10.1016/j.ejca.2011.10.006)

2. Chikako Hara-Miyauchi, Osahiko Tsuji, Aki Hanyu, Seiji Okada, Akimasa Yasuda, Takashi Fukano, Chihiro Akazawa, Masaya Nakamura, Takeshi Imamura, Yumi Matsuzaki, Hiroataka James Okano, Atsushi Miyawaki, Hideyuki Okano, “ Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior ”, *Biochem Biophys Res Commun*, Mar 9;419(2):188-93, 2012 (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.01.141)

3. Hitoshi Morita, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Chiyo Takagi, Takamasa S Yamamoto, Shigenori Nonaka, Naoto Ueno, “Cell movements of the deep layer of non-neural ectoderm underlie complete neural tube closure in *Xenopus*”, *Development*, vol. 139, No. 8, pp. 1417-1426, 2012 (DOI: 10.1242/dev.073239)

4. Norihito Kishimoto, Clara Alfaro-Cervello, Kohei Shimizu, Kazuhide Asakawa, Akihiro Urasaki, Shigenori Nonaka, Koichi Kawakami, Jose Manuel Garcia-Verdugo, Kazunobu Sawamoto, “Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish”, *Journal of Comparative Neurology*, vol. 519, No. 17, 3549-3565, 2011 (DOI: 10.1002/cne.22722)

5. Hiroyuki Inada, Miho Watanabe, Taku Uchida, Hitoshi Ishibashi, Hiroaki Wake, Tomomi Nemoto, Yuchio Yanagawa, Atsuo Fukuda, Junichi Nabekura, “GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice ”, *PLoS ONE*, Vol. 6, No. 12, e27048 (epub),2011 (DOI:10.1371/journal.pone.0027048.g001)

(3-2) 知財出願

① 平成 23 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)