

「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

H24 年度 実績報告

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) 新規補償光学系長波長2光子励起顕微鏡の構築

【補償光学系導入と最適化】

平成 23 年度の成果を受け、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、補償光学素子を調整し、パラメータを変えろ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改良した。当初 60 分程度要していた条件決め時間を 20 分に短縮した。また、蛍光ビーズの評価だけでなく、各種生体組織におけるフィードバックも実施し、培養細胞および個体(メダカ)において信号強度の向上を達成した。骨中及び下の細胞においても同様の信号強度の向上に成功した。

【レーザー照射条件の検討】

昨年度に引き続き、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 マウス脳を観察においては、深さ依存的な最適条件をさらに追求し、海馬 CA1 領域のイメージングに最適な条件を見出すことに成功した。

【長波長域最適化のための光学系の開発】

長波長対応した顕微鏡に、より高感度検出が可能な検出器 (GaAsP) を実装し、In vivo 観察においてその有効性を確認するに至った。さらに、ポンプレーザーと OPO のワンボックス型新規長波長超短パルス小型レーザー (SP 社 Insight) の導入を実現し、代表グループとの連携により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、同連携により長波長を利用した SHG、THG による in vivo 標本の多次元情報取得に成功した。

【がん細胞の深部イメージング】

これまでは数百 μm の深さまでしか観察できなかった皮下移植したがん細胞について、900 μm の深さでがん細胞の細胞周期(G1 期の核が赤、S/G2/M 期の核が緑)をイメージングすることに成功した。これは、新型高感度検出器 GaAsP 検出器の導入とともに、モデルの開発・改良、撮像条件の検討によるものである。

(2) 新規補償光プローブ・光操作分子、新規がんモデル動物の作製

【骨髄内のがん細胞イメージング】

がん細胞イメージングについて、がん転移の好発部位である大腿骨遠位端の骨髄内イメージングの実験系を確立し、骨転移モデルマウスの骨髄中のがん細胞の細胞周期をイメージングすることに成功した。がん細胞を移植後、抗がん剤を投与し、骨髄内を観察すると、G1 期(核が赤)の細胞

が優位に観察され、増殖が遅いまたは冬眠したがん細胞の抗がん剤耐性能が高いことが示唆された。

【各種がんモデルを用いた *in vivo* 観察条件の検索】

これまでに構築した蛍光タンパク質を恒常的に発現させた各種がん細胞移植モデルを用いて、*in vivo* 蛍光観察条件、特に異なる波長の蛍光タンパクの *in vivo* での検出の至適条件を明らかにした。

【新規蛍光分子プローブの設計と作製(長波長域最適化)】

明るく安定な近赤外蛍光タンパク質 iRFP の細胞導入をおこない、*in vivo* 蛍光観察条件をおこなった。

(3) がんの分子メカニズムの解明と医療への展開

【光学システムの小型化検討】

代表グループと連携し、ポンプレーザーと OPO のワンボックス型新規長波長超短パルス小型レーザー(SP 社 Insight)を評価し、2 光子励起顕微鏡観察に利用可能であることを確認するに至った。さらに、同レーザーの改善すべき点に関して同レーザーメーカーとディスカッションをすることで製品の改善を継続的に進めている。

【各種モデル動物による *in vivo* 観察条件検索】

平成 23 年度に作成した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成果を受け、魚類での高感度 Ca²⁺イメージングが可能なシステムを樹立するためメダカ β アクチンプロモーターに Ca²⁺センサー (YC2.6-3GS 及び YC2.6-4GS)を組み込んだトランスジェニックメダカを樹立した。GFP による蛍光観察では現在までの 6 系統の YC2.6-3GS 及び YC2.6-4GS 発現ラインが得られている。またすい臓癌モデルの樹立を目指してすい臓源基で発現する Pdx1 プロモーターにより活性型受容体型チロシンキナーゼと mCherry を共発現するコンストラクト作成した。現在はこのコンストラクトをメダカに導入するためマイクロインジェクションを行っている。またがん細胞の転移と脈管系との関係を解析するためリンパ管と血管を可視化した遺伝子導入システムを樹立している産総研出口博士の協力によって DSLM (Digital Scanning Light-Sheet Microscope) によって脈管系を観察したところリンパ管 (Ds-Red) と血管 (eGFP) を明瞭に区別して観察することができた。平成 25 年度からは出口博士は正式にクレストメンバーとして参加し、がん転移の *in vivo* イメージング系の樹立を共同で行うこととなった。

【ファイバーレーザーを用いた2光子 DSLM の構築】

広い視野と深部観察を両立できる方法論として昨年度から引き続き開発している、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 について、本年度は実際のインビボ観察に使用できるよう、ガルバノミラーを用いて高速で画像取得できる系の構築をおこなった(図3)。従前、1枚の画像取得に5秒かかっていたものが 0.2 秒にまで短縮された。今後は、現在までの結果をファイバーレーザーの特性を生かした顕微鏡方法論として論文投稿すると共に、実際のがんイメージングへの応用を進める。

【新規透徹剤による透明化処理の検討】

昨年度、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、新規透徹剤として、2'-チジオエタノールを用いた溶液が有効であることを見出した。そこで、さらに溶液組成や浸透時間の関東を行い、2 光子顕微鏡、共焦点顕微鏡のどちらの場合でも、H-lineマウス固定脳標本において透明化することが可能となった。さらに高 NA レンズと組み合わせることで空間分解能が向上し、神経細胞樹状突起上のスパインを細胞体の形態を詳細に検討することが可能となった。また、腎臓や小腸の固定標本においても透徹効果が有効であることが明らかになった。

【多様な臓器への展開】

昨年度導入した H2B-GFP マウス等を用いて、腎臓や小腸、大腸などの、大脳以外の臓器においても、観察条件の検討を実施した。また、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。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Yusuke Oshima, Hidetoshi Sato, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Tetsuaki Kimura, Kiyoshi Naruse, and Shigenori Nonaka, "Light sheet-excited spontaneous Raman imaging of a living fish by optical sectioning in a wide field Raman microscope," *Opt. Exp.*, Vol. 20, Issue 15, pp16195-16204, 2012 (DOI: 10.1364/OE.20.016195)
2. Daisuke Takao, Atsushi Taniguchi, Takaaki Takeda, Seiji Sonobe, Shigenori Nonaka, "High-speed imaging of amoeboid movements using light-sheet microscopy" *PLoS ONE*, 7, e50846, 2012 (DOI: 10.1371/journal.pone.0050846)
3. Satoko Yoshida, Hidetaka Shiratori, Ivana Y. Kuo, Aiko Kawasumi, Kyosuke Shinohara, Shigenori Nonaka, Yasuko Asai, Genta Sasaki, Jose Antonio Belo, Hiroshi

Sasaki, Junichi Nakai, Bernd Dworniczak, Barbara E. Ehrlich, Petra Pennekamp, Hiroshi Hamada, “Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2” *Science* 338, pp226-231, 2012 (DOI: 10.1126/science.1222538)

4. Daisuke Takaoa, Tomomi Nemoto, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Hidetaka Shiratori, Shigenori Nonaka, “Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation” *Dev Biol.* 376, 23-30, 2013 (DOI: 10.1242/dev.073239)

5. Tetsuaki Kimura, Minoru Shinya, Kiyosi Naruse, “ Genetic analysis of vertebral regionalization and number in Medaka (*Oryzias latipes*) inbred lines”, *G3* 2, 1317-1323, 2012 (DOI: 10.1534/g3.112.003236)

6. Yuuta Moriyama, Toru Kawanishi, Ryohei Nakamura, Tatsuya Tsukahara, Kenta Sumiyama, Maximiliano L. Suster, Koichi Kawakami, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Yuuri Yasuoka, Yusuke Nagao, Etsuko Sawatari, Atsushi Shimizu, Yuko Wakamatsu, Masahiko Hibi, Masanori Taira, Masataka Okabe, Kiyoshi Naruse, Hisashi Hashimoto, Atsuko Shimada, Hiroyuki Takeda, “ The medaka *zic1/zic4* mutant provides molecular insights into teleost caudal fin evolution”, *Curr. Biol.* 22, 601-607, 2012 (DOI: 10.1534/g3.112.003236)

7. Taijun Myosho, Hiroyuki Otake, Haruo Masuyama, Masaru Matsuda, Yoko Kuroki, Asao Fujiyama, Kiyoshi Naruse, Satoshi Hamaguchi, Mitsuru Sakaizumi, “ Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*”, *Genetics* 191, 163-170, 2012 (DOI:10.1534/g3.112.003236)

8. Yasushi Shibataa, Takashi Iwamatsu, Norio Suzuki, Graham Young, Kiyoshi Naruse, Yoshitaka Nagahama, Michiyasu Yoshikuni, “ An oocyte-specific astacin family protease, alveolin, is released from cortical granules to trigger egg envelope hardening during fertilization in medaka (*Oryzias latipes*).”, *Developmental Biology* 372, 239-248, 2012 (DOI:10.1534/g3.112.003236)

9. Yusuke Takehana, Kiyoshi Naruse, Yusuke Asada, Yoichi Matsuda, Tadasu Shin-I, Yuji Kohara, Asao Fujiyama, Satoshi Hamaguchi, Mitsuru Sakaizumi, “ Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the W chromosomes of medaka fishes”, *Chromosome*

Res. 20, 71-81, 2012 (DOI: 10.1534/g3.112.003236)

10. Daisuke Takao, Tomomi Nemoto, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Hidetaka Shiratori, Shigenori Nonaka, "Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formatio, *Developmental Cell*, 2013 (in press)

11. Sho Ogata, Takashi Miki, Susumu Seino, Seiichi Tamai, Haruo Kasai, Tomomi Nemoto, " A Novel Function of Noc2 in Agonist-Induced Intracellular Ca²⁺ Increase during Zymogen-Granule Exocytosis in Pancreatic Acinar Cells", *PLoS ONE* 7(5): e37048, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0037048)