

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

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)「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:成瀬 清 (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. 研究実施の概要

(1) 新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の構築

本年度は、本プロジェクトの重要なターゲットである生物標本における長波長2光子励起での補償光学効果の確認実験に成功し、さらに生物標本における補償光学素子の制御方法を改良し、2件の特許出願を達成した。具体的には、まず、長波長域最適化のための光学系の改良と生物応用について、昨年まで個別に効果確認を行っていた補償光学素子とOPO光源をひとつの顕微鏡に組み込んだ長波長対応の2光子励起補償光学系を構築し、生物標本における長波長励起での補償光学効果の確認に成功した。同一標本において、従来の励起波長との効果を比較し、長波長においても従来と同様の蛍光強度の向上の効果が得られることを確認した。

補償光学系の最適化と生物応用については、補償光学系の最適化の制御方法に関し、生物標本において、効率的および生物標本への光毒性を低減した状態で最適値を導き出すことができるか否かを検討し、2件の特許を出願した。さらに、補償光学系のフィードバックの高速化に成功した。

in vivo 観察対応では、昨年に引き続き、特に骨髄内がんモデル等を中心に、新型蛍光検出器 GaAsP を用いた画像の改善の可能性の検討をさらに進め、生体深部観察に関するノウハウを蓄えとともに、さまざまパラメーターの至適条件の取得を行った。

新規2光子励起顕微鏡の高度化のための遺伝子導入小動物系の確立について、メダカによる *in vivo* 観察条件の検索とがんモデルの作成を進めるとともに、メダカを用いたすい臓癌モデルの樹立、ヒトがん細胞をメダカに移植するための免疫不全メダカの樹立のための実験に着手した。

(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

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について、*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検討結果をもとに、移植したがん細胞の生体深部での観察を行った。特に iRFP を導入したがん細胞について生体深部観察における有用性を明らかにした。

(3) がんの分子メカニズムの解明と医療への展開

細胞周期プローブ Fucci やプロモータープローブなど細胞機能蛍光プローブや酵素活性プローブなどの環境蛍光プローブを駆使して、特に骨髄内のがん細胞機能と環境の *in vivo* イメージングにおける蛍光観察条件の検索を進めた。

また、生体組織の深部観察の場合、臓器によっては慢性的に透明な窓を臓器に装着する必要がある。しかし、カバーガラスに骨組織や、血管が新生してしまい、深部観察を実施することが次第に困難になる傾向があった。そこで、新たに生体適合材料を検索し、長期観察を可能とすることに成功した。

一方、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。特に、腎臓においては、マルチチャンネルで取得した画像を“アンミキシング”することにより、臓器内部の構造を明瞭な3次元画像として捉える事に成功した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

1. Fujio Toki, Naoki Honkura, Yuji Shirakata, Takeshi Imamura, Shigeki Higashiyama and Daisuke Nanba, “ Second Harmonic Generation Reveals Collagen Fibril Remodeling in Fibroblast-populated Collagen Gels ”, Cell Structure and Function, Vol. 38 (2013) No. 2 pp229-238, 2013 (DOI:10.1247/csf.13017)
2. Walther Akemann, Mari Sasaki, Hiroki Mutoh, Takeshi Imamura, Naoki Honkura and , Thomas Knöpfel, " Two-photon voltage imaging using a genetically encoded voltage indicator", Sci Rep, 19(3), pp2231, 2013 (DOI:10.1038/srep02231)
3. Yusuke Oshima, Hideki Horiuchi, Tadanori Ogata, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura and Takeshi Imamura, " In vivo imaging of spinal cord in contusion injury model mice by multi-photon microscopy", Proc. SPIE, pp8947-8947, 2014 (DOI:10.1117/12.2041042)
4. Takashi Saitou, Kentaro Kajiwara, Chitose Oneyama, Takashi Suzuki and Masato Okada, “Roles of Raft-anchored Adaptor Cbp/PAG1 in Spatial Regulation of c-Src kinase”, PLoS ONE 9(3): e93470 2014 (DOI:10.1371/journal.pone.0093470)
5. Daisuke Takao, Tomomi Nemoto, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Hidetaka Shiratori and Shigenori Nonaka, “Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation” Dev Biol. 376, pp23-30, 2013 (DOI: 10.1242/dev.073239)
6. Takashi Murata, Toshio Sano, Michiko Sasabe, Shigenori Nonaka, Tetsuya Higashiyama, Seiichiro Hasezawa, Yasunori Machida and Mitsuyasu Hasebe, “Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast”, Nature Communucations 4, 1967, 2013 (DOI: 10.1038/ncomms2967)
7. Takehiko Ichikawa, Kenichi Nakazato, Philipp J. Keller, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Ernst H. K. Stelzer, Atsushi Mochizuki and Shigenori Nonaka, “ Live Imaging of Whole Mouse Embryos during Gastrulation: Migration Analyses of Epiblast and Mesodermal Cells”, PLoS One 8, e64506, 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0064506)
8. Takehiko Ichikawa, Kenichi Nakazato, Philipp J. Keller, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Ernst H. K. Stelzer, Atsushi Mochizuki and Shigenori Nonaka, “Live imaging and

quantitative analysis of gastrulation in mouse embryos using light-sheet microscopy and 3D tracking tools”, *Nature Protocols*. 9(3), pp575-585, 2014 (DOI: 10.1038/nprot.2014.035)

9. Guijun Guan, Yan Yan, Tiansheng Chen, Meisheng Yi, Hong Ni, Kiyoshi Naruse, Yoshitaka Nagahama and Yunhan Hong, “Nanos3 gene targeting in medaka ES cells”, *Int J Biol Sci* 2013; 9(5), pp444-454, 2013 (DOI:10.7150/ijbs.6507)

10. Mari Kawaguchi, Hiroshi Takahashi, Yusuke Takehana, Kiyoshi Naruse, Mutsumi Nishida and Shigeaki Yasumasu, “Sub-functionalization of duplicated genes in the evolution of nine-spined stickleback hatching enzyme”, *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 320, pp140-150, 2013 (DOI: 10.1002/jez.b.22490)

11. Ayaka Ohshima, Noriko Morimura, Chizuru Matsumoto, Ami Hiraga, Ritsuko Komine, Tetsuaki Kimura, Kiyoshi Naruse and Shoji Fukamachi, “Effects of body-color mutations on vitality: an attempt to establish easy-to-breed see-through medaka strains by outcrossing”, *G3* 3, pp1577-1585, 2013 (DOI:10.1534/g3.113.007575)

12. Teruhiro Okuyama, Yasuko Isoe, Masahito Hoki, Yuji Suehiro, Genki Yamagishi, Kiyoshi Naruse, Masato Kinoshita, Yasuhiro Kamei, Atushi Shimizu, Takeo Kubo and Hideaki Takeuchi, “Controlled Cre/loxP site-specific recombination in the developing brain in medaka fish, *Oryzias latipes*”, *PloS One* 8, e66597, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0066597)

13. Xi Zhang, Guijun Guan, Jianbin Chen, Kiyoshi Naruse and Yunhan Hong, “Parameters and efficiency of direct gene disruption by zinc finger nucleases in medaka embryos”, *Marine Biotechnology*, 16(2):pp125-134, 2014 (DOI: 10.1007/s10126-013-9556-6)

14. Mikhail Spivakov, Thomas O. Auer, Ravindra Peravali, Ian Dunham, Dirk Dolle, Asao Fujiyama, Atsushi Toyoda, Tomoyuki Aizu, Yohei Minakuchi, Felix Loosli, Kiyoshi Naruse, Ewan Birney and Joachim Wittbrodt, “Genomic and phenotypic characterization of a wild medaka population: Towards the establishment of an isogenic population genetic resource in fish”, *G3*, Early Online January 9, 2014 (DOI:10.1534/g3.113.008722)

(3-2) 知財出願

① 平成 25 年度特許出願件数 (国内 2 件)

② CREST 研究期間累積件数 (国内 2 件)