

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」

研究課題

「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成27年3月

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  
分子・機能領域 分子病態医学講座、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

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、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 *in vivo* 実験での最適化を行った。具体的には、「新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の構築」として、愛媛大学(代表 G)、ニコン(G1)と北海道大学(G3)を中心に、がん移植モデルで、モデル・実験系の改良、新規対物レンズ(製品化)、新型高感度検出器 GaAsP 検出器(既に製品化)と撮像条件の検討によって 900  $\mu\text{m}$  の深さおよび長管骨髄内で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。多くのがんは発生初期に上皮内に留まっており、表面から約 1 mm の深度のイメージングが実現したことにより、深さ 1 mm 以内に留まっている早期がんの診断および悪性度の評価に蛍光イメージングが貢献できる可能性が高まった。「長波長対応 2 光子顕微鏡構築」に関しては、代表 G、G1 と自然科学機構(G2)を中心に、赤外対応光学系作製、GaAsP 検出器と専用対物レンズの作製(既に製品化)を推進し、1 mm 以上の *in vivo* 深部脳観察を達成した。これにより、これまでのマウス錐体細胞(約 700  $\mu\text{m}$  の深さに細胞体が存在)の観察に加え、それより深部に存在する海馬の細胞も生体観察が可能になり、脳神経科学研究発展に大いに検討することが考えられる。「補償光学系導入の構築」については、代表 G、G1 と G3 を中心に、リレー光学系及び波面センサー導入光学系の作製と画像フィードバック制御アルゴリズムの作製を推進し、ビーズ・培養細胞・個体・骨内部での蛍光強度改善に成功した。また、生物標本において、効率の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。本研究成果については国立天文台のグループも大変興味を持っており、すばる望遠鏡における補償光学素子開発との共同研究を模索している。代表 G と G1 で、それまで個別に効果確認を行っていた補償光学素子と光パラメトリック発振(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 1150 nm 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、従来の励起波長である 950 nm との効果と比較し、1150 nm 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。一方、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、代表 G、G2、産総研(G4)でモデルメダカによる *in vivo* 観察系を確立した。

「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、代表 G を中心に、新しいがん細胞移植モデル系の確立と Fucci を含む蛍光分子プローブ発現がん細胞株を多数作製し、臨床治験を行っている抗がん剤の開発に応用し、論文は発表した。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。さらに、さまざまな蛍光有機小分子でラベルした抗 CEA 抗体を用いたマクロ・マイクロレベルのがんイメージングを行い、2光子励起顕微鏡イメージングを用いたがんイメージングの問題点と有用性を明らかにし、論文発表した。この結果、2光子励起顕微鏡を臨床応用することが出来れば、切除すること無く病理診断を行う Optical biopsy (光生検)に発展する可能性が開けた。また、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* で成功させた。G2 と G4 は蛍光発現モデルメダカを開発・提供し、AO およびデジタルスキャン光シート顕微鏡(DSLM)の開発が飛躍的に進み、一部は論文発表した。

「がんの分子メカニズムの解明と医療への展開」に関しては、代表 G で、がん細胞機能と環境の *in vivo* イメージングを行い、ヒト乳がん細胞の骨転移において、転移初期は細胞増殖が遅いがん細胞が多く、破骨細胞の活性によってがん細胞増殖が促進されること、抗がん剤を投与すると比較的細胞増殖が遅い細胞が治療抵抗性を示すことを明らかにした。この成果は、現在がん研究領域で注目されているがん幹細胞に対して、治療抵抗性に影響を与える細胞周期と骨髄ニッチに注目した新しいアプローチを提案するもので、新たながん診断・治療法の

開発に弾みがつくと考えられる。さらに、G2と代表Gは、2光子顕微鏡とDSLIMの融合を行い、光源として高パルスエネルギー光源を用いることで、この種の顕微鏡の弱点であった視野の狭さを克服し、小動物個体レベルの観察を可能にし、一部は論文発表した。また、G3と代表Gは、超広帯域・高強度の白色レーザーであるスーパーコンティニューム(SC)光源を用いた顕微鏡システムを構築した。小型レーザー開発については、長波長超短パルス小型レーザーの生体組織イメージングにおける有用性を明らかにし、同時にアブレーション可能な新たな動物実験モデルを提唱し、論文発表した。一方、H26から参画した(東北大学横山研)G7で開発した「新規長波長高出力ピコ秒光源」に改良を加え、同じくH26から参画した(東北大学佐藤研)G6の改良したファイバーアンプから構成される新規レーザーシステムをG3の研究室に設置し、がんイメージングへ適用について代表GとG3で検討し、既存のレーザーと比べると、高パワーで、しかも波長が長い分より深部で鮮明な画像を取得できることがわかった。以上の結果は、新しい光源開発の基盤技術形成へと繋がっていく可能性がある。G6とG7の参画により、ベッドサイドでの非線形光学応用医療機器の開発に向けて大きな弾みが出来たと考えられる。

## (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

### 1. 補償光学系の制御に関するシステムの開発と顕微鏡への応用

補償光学系については、リレー光学系及び波面センサー導入光学系の作製と画像フィードバック制御アルゴリズムの作製を推進し、生体標本を対象とした観察(特に深部観察)での各標本に合わせた最適化と蛍光強度改善に成功した。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。補償光学の応用・フィードバック制御に対する対策の特許2件を出願し、さらに1件の特許化を進めている。

### 2. Fucci-がん細胞を用いた抗がん剤開発

被引用件数: 1件

細胞周期を可視化できる各種Fucci-がん細胞を作製し、抗がん剤開発に応用した。特に、Fucci-MCF-7乳がん細胞株については、矢守隆夫博士との共同研究で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。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、Fucci-がん細胞を用いた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。なお、本研究成果は、Eur J Cancer誌に発表した。

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)

### 3. 長波長超短パルス小型レーザーの2光子励起顕微鏡への応用

被引用件数: 0件

MaiTai-OPOの横に小型レーザー検証用光路を組込んだシステムを構築し、MaiTai-OPOを用いたこれまでの実験結果をもとに最適パラメータを探索し、各種パラメータの条件を満たすより小型化された波長固定レーザー光源での生体観察を検討し、長波長超短パルス小型レーザーの生体組織イメージングにおける有用性を明らかにし、同時にアブレーション可能な新たな動物実験モデルを提唱し、論文発表した。

Oshima Y, Horiuchi H, Honkura N, Hikita A, Ogata T, Miura H, Imamura T, “Intravital multiphoton fluorescence imaging and optical manipulation of spinal cord in mice, using a compact fiber laser system”, Lasers Surg Med, 46(7), pp563-572. (DOI: 10.1002/lsm.22266.)

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

従来の2光子顕微鏡技術では、到達が困難であった深部での観察を実現させるため、励起は長の長波長化および波面補正実現のための補償光学系の導入実験を実施した。さらにそれらを組み合わせた場合の効果を確認し、アルゴリズムを開発することで実際の生体標本において現実的に利用可能なシステムのプロトタイプ立ち上げに成功した。長波長パルスレーザーの深部観察の可能性に加え、多光子励起顕微鏡の性能を向上させることによる医療現場での深部観察応用の可能性を示すことに成功したと考えている。

2.

2光子顕微鏡と DSLM(デジタルスキャン光シート顕微鏡)の融合を行い、光源として高パルスエネルギー光源を用いることで、この種の顕微鏡の弱点であった視野の狭さを克服し小動物個体レベルの観察を可能にした。論文発表を行った。

Atsushi Maruyama, Yusuke Oshima, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Shigenori Nonaka, Takeshi Imamura, Kiyoshi Naruse, "Wide field intravital imaging by two-photon excitation digital-scanned light-sheet microscopy (2p-DSLM) with a high-pulse energy laser", Biomedical Optics Express, 5(10), 3311-25 (2014) (DOI: 10.1364/BOE.5.003311)

3.

がん細胞機能と環境の *in vivo* イメージングを行い、ヒト乳がん細胞の骨転移において、転移初期は細胞増殖が遅いがん細胞が多く、破骨細胞の活性によってがん細胞増殖が促進されること、抗がん剤を投与すると比較的細胞増殖が遅い細胞が治療抵抗性を示すことを明らかにした。

## § 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「今村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
今村 健志	愛媛大学大学院医学系研究科	教授	H21.10～
疋田 温彦	同上	准教授	H21.10～ H26.12
飯村 忠浩	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	准教授	H25.4～
大嶋 佑介	愛媛大学大学院医学系研究科	助教	H23.11～
齋藤 卓	愛媛大学医学部附属病院 先端医療創生センター	助教	H25.4～

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 「佐瀬」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
佐瀬 一郎	株式会社ニコン マイクロスコープ・ソリューション事業部 開発部システム開発課	主幹技師	H21.10～
土屋 良二	同上	課長	H23.1～
友杉 亘	株式会社ニコン マイクロスコープ・ソリューション事業部	研究員	H21.10～

	開発部システム開発課		
松為 久美子	株式会社ニコンコアテクノロジー 本部研究開発統括部バイオイメージング開発部第二開発課	主幹技師	H21.10～
浜田 啓作	同上	研究員	H21.10～

研究項目

・新規2光子励起顕微鏡の開発

③ 「成瀬」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
成瀬 清	自然科学研究機構 基礎生物学研究所	准教授	H24.4～
野中 茂紀	同上	准教授	H21.10～
小林 弘子	同上	技術職員	H21.10～
苅田 慎一	同上	研究員	H26.4～
高尾 大輔	同上	NIBB リサーチフェロー	H21.10～
丸山 篤史	同上	研究員	H24.11～H25.3
新谷 敦子	同上	技術支援員	H21.12～H24.9
市川 壮彦	同上	研究員	H21.10～H24.9
高木 千賀子	同上	技術支援員	H26.4～H27.3

研究項目

・小動物を用いた in vivo2光子励起顕微鏡システムの開発

④ 「根本」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
根本 知己	北海道大学	教授	H21.10～
日比 輝正	同上	助教	H21.12～
川上 良介	同上	助教	H22.6～
大友 康平	同上	特任助教	H25.4～
飯島 光一郎	同上	特任助教	H25.4～

研究項目

・生物個体用 in vivo2光子励起顕微鏡の高度化

⑤ 「出口」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
出口 友則	独立行政法人 産業技術総合研究所	主任研究員	H25.4～
静間 和子	同上	技術職員	H26.4～

研究項目

・がんモデルメダカの開発及び該メダカを用いた創薬スクリーニングシステムの開発

⑥ 「佐藤」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
佐藤 俊一	東北大学 多元物質科学研究所	教授	H26.4～
小澤 祐市	同上	助教	H26.4～

研究項目

- ・新規長波長高出力ピコ秒光源システムとベクトルビームのがんイメージングへの応用

⑦ 「横山」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
横山弘之	東北大学未来科学技術 共同研究センター	教授	H26.4～
田主 裕一朗	同上	助教	H26.4～H26.5
草間 裕太	同上	研究員	H26.4～

研究項目

- ・新規長波長高出力ピコ秒光源の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

国内外の研究者との連携や協働:

- ・新学術領域研究「細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング(蛍光生体イメージ)」(領域代表松田道行京都大学教授)との連携でイメージング講習会を開催した。
- ・新学術領域研究「蛍光生体イメージ」の研究者と共同研究を進めている

産業界との連携や協働:

- ・イメージング講習会において、ニコンインステックとパーキンエルマーからの講師と一緒に実技講習をおこなった。
- ・研究代表者が、愛媛大学医学部附属病院先端医療創生センター(TRC)(H24設立)のバイオイメージング部門を主宰し、TRC内でイメージング研究の連携ネットワークを形成した。
- ・研究代表者が、愛媛大学プロテオサイエンスセンター(PROs)(H25設立)のバイオイメージング部門の初代部門長を務め、PROs内でイメージング研究の連携ネットワークを形成した。

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 *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(愛媛大学 今村グループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

##### 研究項目1. 新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の構築

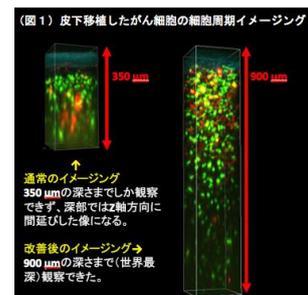
光パラメトリック発振や超小型波長固定超短パルスレーザーなどの新規光源と、多様な生体内での光学的パラメータを最適化する補償光学系とを駆使し、非線形光学過程を用いた革新的“*in vivo*”光イメージングを確立し、特に、がん細胞とその周囲環境の多面的な生体内イベントのリアルタイム画像化を実現させる過程を通じて、革新的光源開発を促し、その結果、我が国の光・半導体産業のポテンシャルを生かした新しいニーズを提案し、ライフサイエンスや医療分野が真に必要とする新規光源の開発を促すことを目指して研究を進めた。

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、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行った。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した。

H21年度から、G1の顕微鏡設計及び構築、代表GとG1による補償光学系導入と最適化、G2とG3による小動物を用いた補償光学システムの立上げを総括し、予定通りH22年度末に終了した。H23年度から予定通り長時間*in vivo*観察の定量化方法確立を開始し、H24年度から、当初H23年度開始予定だった光学システムの小型化検討をG1とともに進めた。具体的な内容については、以下に示す。

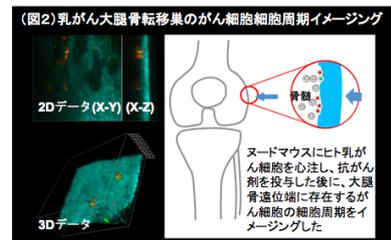
##### 【がん細胞の深部イメージング】

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、900μmの深さでがん細胞をイメージングすることに成功した(図1)。これは、G1との共同の新型高感度検出器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。



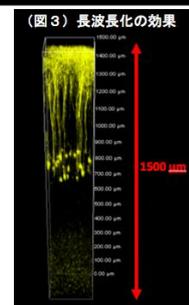
##### 【骨髄内のがん細胞イメージング】

がん細胞イメージングについては、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(図2)。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は抗がん剤耐性能が高いことが示唆された。



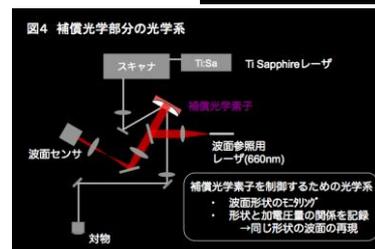
##### 【長波長2光子励起顕微鏡】

長波長化は、OPOシステムを構築するに至り、さらに1300 nmまでの長波長に最適化した専用の対物レンズを新規に作成し、通常の波長領域を超えた>1100 nmにおいて多光子励起観察を行うに至った。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(図3)。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、THGによる*in vivo*標本の多次元情報取得に成功した。



##### 【長波長化に対応した生体試料】

G3とともにH-lineマウスやH2Bマウス等の新規動物モデルを導入し、多様な臓器での深部観



察を試みた。さらに G3 とともに新規蛍光タンパク質の発現系の検討を行った。G2 と G3 とともに、新規蛍光タンパク質 Ca<sup>2+</sup>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 Ca<sup>2+</sup>依存性開口放出の可視化解析を進め、論文投稿中である。

【補償光学素子】

多光子励起観察における補償光学の効果を確認するために、G1 と G3 と共同で、対物レンズと共焦点スキュナに間に補償光学素子を導入した光学系を構築した。再現性の高い評価方法の構築のために蛍光ビーズを利用し効果を示すことに成功した(図4)。手動により補償光学素子制御を行い、その効果を確認した後、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(図5)。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6)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。開発に際し、いくつかの有効な特許案件が得られたため 2 件を出願し、現在 1 件の特許化を進めている。生体標本での効果としては、培養細胞および個体(メダカ)において信号強度の向上(約 1.25 ~ 1.5 倍)を達成した(図7)。骨の下細胞においても同様の信号強度の向上(約 1.15 倍)に成功した(図 8)。

さらに G1 との共同で、マウス大腿骨をスルホローダミンで染色した深さ 50 μm の対象標本において、950 nm 及び 1150 nm での補償光学系による信号強度の改善(1.47, 1.67 倍)に成功した。骨細胞の形状をより明確に示すことが可能となった(G1 の項参照)。

【光学システムの小型化検討】

企業 2 社のレーザーを用いてレーザー小型化の検討を進めている。具体的には IR-OPO の横に小型レーザー検証用光路を組込んだシステムを構築し(図9)、さまざまなサンプルを対象に小型レーザーのパラメータのスペックを、生体組織イメージングの結果をもとに検討し、一部論文発表した。

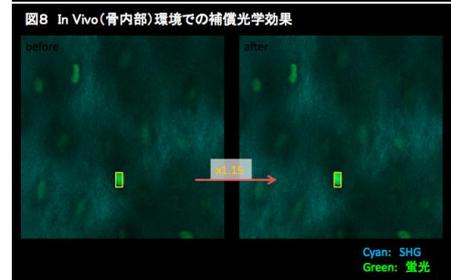
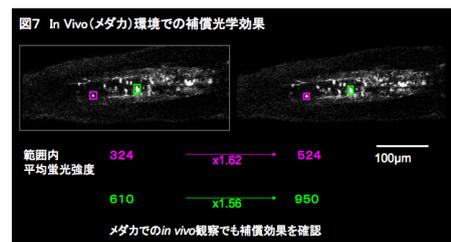
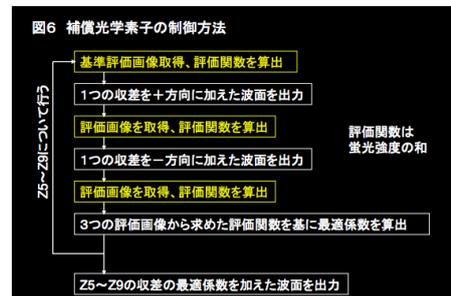
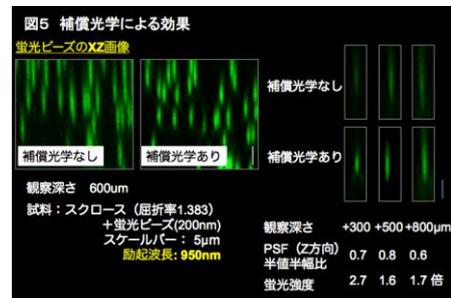
【神経細胞の深部イメージング】

新型高感度検出器 GaAsP 検出器に関しては、生物標本に応用する場合、通常 PMT の 2-3 倍程度の感度を得ることができることが明らかになり、上記のがん以外に、脳神経にも応用した。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行い、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(§6 カタログ参照)。

研究項目 2. 新規補蛍光プローブ・光操作分子、新規がんモデル動物の作製

研究項目 1 で行う新規 2 光子励起顕微鏡システムを開発に必要な蛍光プローブ・光操作分子およびさまざまな新規がんモデル動物を作製した。新規蛍光プローブ・光操作分子の設計と作製および各種新規がんモデル動物を作製し、がんモデル動物での *in vivo* 観察条件検索を行った。

H21 年度から、各種がんモデルの作製、新規蛍光分子プローブの設計と作製と光機能分子の



作製と応用を開始し、予定通り H22 年度末に終了した。H23 年度から予定通りがんモデル動物での *in vivo* 観察条件検索を開始し、順調に進んだ。具体的には、新しいがん細胞移植モデル系の確立については、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(Dan et al., Eur J Cancer, 2012)。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、本研究結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。一方、新規蛍光分子プローブの設計と作製については、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(Hara-Miyauchi et al., BBRC, 2012)。具体的には、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、がん細胞導入を担当した。

H22 年度から、当初計画では想定されていなかった長波長域最適化のためのプローブ開発を G3 と追加項目として開始し、より長波長でより深部が見える新規蛍光タンパク質 iRFP の 2 光子応用など、新たな展開が広がっている。

### 研究項目 3. がんの分子メカニズムの解明と医療への展開

研究項目 1・2 の成果を踏まえ、具体的ながんのメカニズムの解明と医療応用を進めた。具体的には、開発した機器とプローブを駆使し、がん細胞の機能とがん微小環境を *in vivo* でイメージングし、両者の時空間的な相互関係を明らかにした。

H23 年度からがん細胞機能と環境の *in vivo* イメージングを開始し、G1 の臓器毎の最適な観察条件の定量測定と光学システムの小型化検討、G2 の各種モデル動物による *in vivo* 観察条件検索と共同で、最終的には、骨髄内のがん細胞の細胞周期をイメージングする系を用いてさまざまな抗がん剤の作用機序の解析が進み、さらに SHG を用いることで、がん細胞とマトリックスの関係の解析が進んだ。

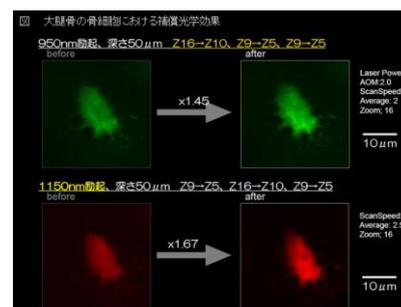
当初計画では想定されていなかった光操作/光治療の基板技術の確立を G3 とともに H23 年度から、DSLM と 2 光子励起顕微鏡の融合を G2 とともに H24 年度から追加項目として開始し、成果を得た。具体的には、2 光子励起顕微鏡とは別の深部観察の方法論である光シート型顕微鏡 DSLM と、波長 1043 nm のファイバーレーザーを組み合わせた 2 光子 DSLM を構築し、画像取得に成功した。DSLM においては、広い視野を確保するためには励起光の照射に使う対物レンズの NA は低い方がよいが、すると 2 光子励起に必要な光子密度を得られなくなるというトレードオフの関係がある。この限界を、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、Xenopus の DSLM イメージングと Zebrafish 2 光子励起イメージングの基礎実験を行い、一部は論文発表した。

## 3. 2 新規 2 光子励起顕微鏡の開発(ニコン・佐瀬グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

#### 【補償光学素子の長波長対応による深部における S/N の向上】

疑似生体標本および培養細胞に対する効果確認にとどまっていた補償光学素子を長波長対応させることにより、生体深部における収差改善に活用することに成功した。実験では、マウス大腿骨をスルホローダミンで染色し、大腿骨内の深さ 50 μm において、1150 nm での補償光学系による細胞の信号強度の改善(1.5~1.7 倍)に成功した。骨細胞の細かい形状を確認することが可能となった(図)。



### 【フィードバックの高速化】

補償光学素子の最適化に伴う高速化においては、アルゴリズムを再検討することで、従来の速度の1/2に収束時間を短縮することに成功した(3次までの場合10分→5分, 5次までの場合35分→15分)。さらに、最適化係数の算出の理論的な検証も実施し、生物実験への応用が可能になった。

## 3.3 小動物を用いた *in vivo* 2光子励起顕微鏡システムの開発(基礎生物学研究所・成瀬グループ)

### (1)研究実施内容及び成果

研究項目:1. 新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の構築

#### 【補償光学素子】

補償光学素子によるAOの効果を生体で評価するために全身でDs-Red2を発現するメダカ系統d-rR-Tg(beta-actin-loxP-DsRed2-loxP-GFP)をNBRP medakaより入手し、代表グループである代表Gに提供をおこなった。メダカ個体を用いて補償光学素子のAO効果を評価したところ信号強度の向上(約1.25~1.5倍)となることが明らかになった。補償光学素子やプログラムの改良では実際のサンプルに近い生体試料を用いることで効率的に進めることができた。

研究項目:2. 新規補蛍光プローブ・光操作分子、新規がんモデル動物の作製

#### 【メダカにおけるゲノム編集技術の確立】

新規癌モデルの作製に必要なゲノム編集技術をメダカで確立するためGSDF遺伝子座をターゲットしたZinc Finger Nuclease(ZFN)を合成し、RNA注入量を変えてメダカ卵に顕微注入することで当該遺伝子での変異導入条件の検討を行った。mRNAを10 ng/μlの濃度で導入したG0個体を用いて孵化時での変異導入効率をPAGEによって検出したところ約30%個体で当該領域に変異が観察された。成魚まで成長させた際の導入個体の割合はおよそ4%であった。次にプラスミドを共注入することによって長い配列をGSDF遺伝子座に挿入する条件の検討を行った。5'及び3'側に約1kbpのhomology segmentを持つRFP cassetteとともにGSDF遺伝子を切断するZFNを共注入したところ、7%の個体で当該領域にRFP cassetteが挿入された個体を得ることができた。これらの一連の実験でメダカでも高い効率でknock-out knock-in 個体を作成できることが明らかとなった。その後ZFNよりも高い確率で当該ゲノム配列を切断することが可能なTALENによるゲノム編集が開発された。そこでG4と共同で、リンパ管がGFPで可視化できる遺伝子導入透明メダカ系統(STII-TG(pFLT4:GFP)) (図1)用いて、移植免疫に中心的役割を果たすSCID及びXSCID遺伝子を切断するTALENを設計し、RNAを顕微注入した。G0世代において2つの遺伝子をともに切断していることをmicrochip電気泳動法で確認した。現在は変異を固定するためのG0世代を成魚まで育成している。G0世代ではSCID-G0個体20尾、XSCID-15尾を現在飼育している。また順次SCID及びXSCID領域を切断するTALENの顕微注入を行っている。獲得免疫において中心的役割をはたすSCID及びXSCID遺伝子に機能欠損をもつ変異体系統を樹立できればヒトがん細胞、メダカがん細胞などを他家移植することで生体内でのがん細胞の振る舞いをリンパ管との関係を含めて可視化できる系統を樹立できると期待している。

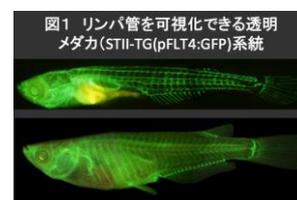
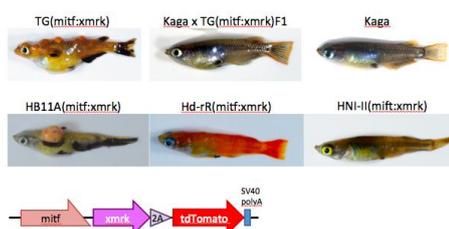


図1 リンパ管を可視化できる透明メダカ(STII-TG(pFLT4:GFP)系統)

#### 【蛍光を発するがん細胞をもつメダカ系統の樹立】

Xmrkはプラチーとソードテールの交配によってメラノーマを発症するモデルシステムからその原因遺伝子として同定された活性型リセプタータイプチロシンキナーゼ遺伝子である。現在はメダカにおいて色素細胞で発現する転写制御遺伝子mitf promoter制御下でxmrkを発現させることでメラノーマとエリスロフォローマを発症するメダカ系統が樹立されている(図2)。そこでmift制御下でxmrkとtdTomato(or mCherry)を共発現する系統の育

図2 遺伝的背景により表現型が変わる発がんモデルメダカ及びxmrk-tdTomatoを共発現するプラスミド



成を目指してプラスミド *mtif-xmrk-2A-tdTomato(or mCherry)* を作成した。これをリンパ管が GFP で可視化できる遺伝子導入透明メダカ系統 (STII-TG(pFLT4:GFP)) に遺伝子導入し、赤色の蛍光タンパク質を発現するメラノーマ・エリスロフォローマ発症系統の育成を行っている。プラスミドを顕微注入して、*tdTomato(or mCherry)* の蛍光を持つ個体を得ることができたので、その個体を育成している。またメダカ膵がんモデルの樹立を目指してすい臓発生で重要な役割を果たす転写因子 *pdx1* プロモーター制御下で GFP を発現する TG(*pdx1-GFP*) 系統を東京大学武田研究室より入手し、GFP 蛍光を指標としてすい臓発生を観察している。系統が成長して授精卵を採卵できる状態になったら *pdx1-xmrk* プラスミドを顕微注入し膵がんの発生を確認する予定である。

### 研究項目:3. がんの分子メカニズムの解明と医療への展開

光源として波長 1043 nm のファイバーレーザーによる高パルスエネルギー光源を用いることで、2光子顕微鏡と DSLM (デジタルキャン光シート型顕微鏡) の融合を行い、2光子顕微鏡の弱点であった視野の狭さを克服し小動物個体レベルの観察を可能にした。これによって研究項目 2 で樹立しているがん細胞の他家移植が可能ならリンパ管可視化透明メダカ系統や蛍光タンパク質を発現する発がんメダカ系統を、今回作製した 2光子 DSLM を用いて観察することで、マウスでは困難であった全身スキャンによるがん細胞の動態観察が可能となると考えている。

## 3. 4 生物個体用 *in vivo* 2光子顕微鏡の高度化(北海道大学・根本グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

【新規蛍光検出器とアタッチメントによる生体脳の深部到達性の向上】

新型 GaAsP 検出器を用いた新型高感度 NDD 型蛍光ダクタは、生物標本に応用する場合、通常の PMT の 2-3 倍程度の感度を得ることができると明らかになった。そこで、カバーガラスの傾きから発生する収差を補正するためのアタッチメントも開発し、組み合わせて *in vivo* イメージングを実施した。その結果、マウス生体脳においては通常のチタン-サファイアレーザーを用いても 1.4 mm 以上観察でき、海馬 CA1 の *in vivo* 観察が可能であった。この成果は、ニコンの多光子顕微鏡のカタログに採用された (図 H1)。

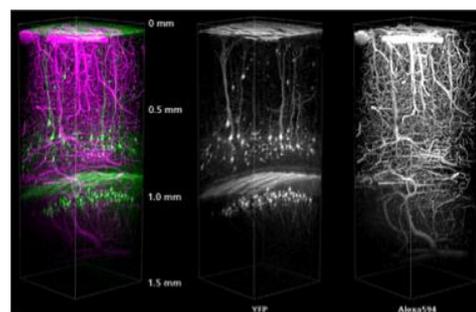


図 H1: GaAsP NDD を使用したマウス脳 *in vivo* 多色イメージング

【新規透徹剤による透明化処理による深部到達性の向上】

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、2,2'-チジオエタノール (TDE) を用いた溶液が有効であることを見出した (図 H2)。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 (図 H2)。そこで、樹状突起スパインの微細の高精細な形態解析に応用した。数 100 個のスパイン頭部の形態 (長軸、短軸) を、1 神経細胞内部の位置と対応付けながら、統計を取ることに成功した。その結果、細胞内からの距離、及び頂上樹状突起か基底か頂上樹状突

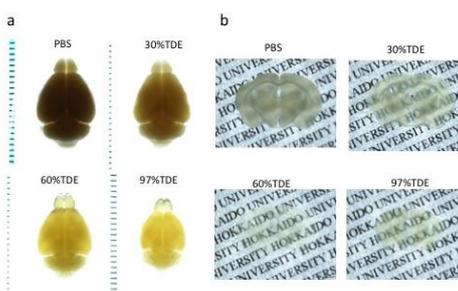


図 H2: 2, 2'-チジオエタノール溶液による固定脳の透徹効果。(a) は全脳、(b) はスライス標本 (厚さ 400 μm)

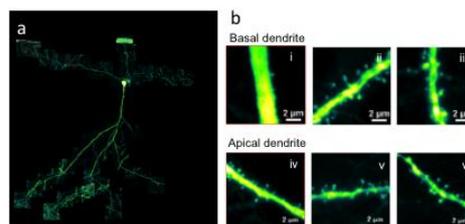


図 H3: 2, 2'-チジオエタノール溶液により透徹化さらた固定スライスでの樹状突起スパインの高精細な観察

起に依存して、スパイン頭部の形態に多様性に統計的有意差が存在することを明らかにした。この成果は北米神経科学会(SfN2013)、第91回日本生理学会で発表し、後者では「優秀ポスター賞」を受賞し、論文発表した(図 H3)。また、腎臓や小腸の固定標本、さらにはG4の作製したメダカ全身の固定標本においても透徹効果が有効であることが新たに明らかになった。(図 H4)

【生体脳内での詳細なレーザー照射条件の検討】

他研究グループとの共同研究の結果、生体深部脳の *in vivo* 観察においても補償光学が有効であることが判明してきた。そこで、より詳細な光学的な特性を明らかにするために、(1)微小蛍光ビーズの生体脳深部へのインジェクション法、(2)安定した孤立蛍光ビーズの3Dプロファイル取得法の2つの構築を試みた。その結果、回折限界以下径の蛍光ビーズでは暗くて困難であったが、マイクロメータサイズのものでは生体深部脳中でも安定して計測が可能となった。さらに、簡便な光学補償システムの開発のための要件検討を実施し、非対称な収差の補正の重要性が判明した。

【2光子励起と3光子励起の同時イメージング】

長波長レーザーの長い発振可能帯域と同時多重染色性を十全に活用すべく、2光子励起と3光子励起を同時に可能とするマルチカラーイメージングのための、最適な蛍光タンパク質の組み合わせを検討した。具体的には研究代表者チームの波長可変レーザーを用いることで定量的に2光子、3光子吸収断面積を網羅的に計測することを進めた。

【多様な臓器、小動物への展開】

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。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”処理をすることにより、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(図 H5)。また、新規蛍光タンパク質Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>依存性開口放出の可視化解析を進め、膵臓外分泌腺おける知見を投稿した。また、本トランスジェニック動物と共振型2光子顕微鏡を活用することで、小脳プルキンエ細胞の神経活動を、大規模イメージングを試みLTDモデルマウスでの神経活動の可視化解析を実施した(図 H6)。

【スーパーコンティニューム光を用いた多色励起高速共焦点顕微鏡法】

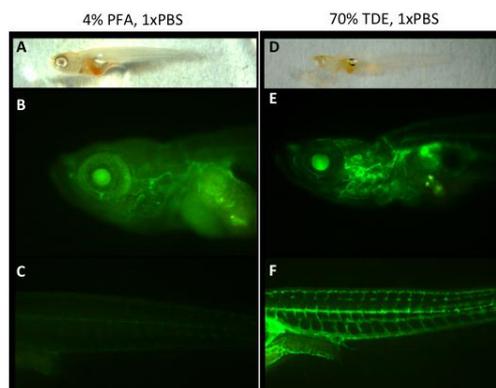


図 H4: 2, 2'-チジオエタノール溶液により透徹化した固定メダカ標本。(A-C) コントロール、(D-F) 70%TDE 浸漬処理後。

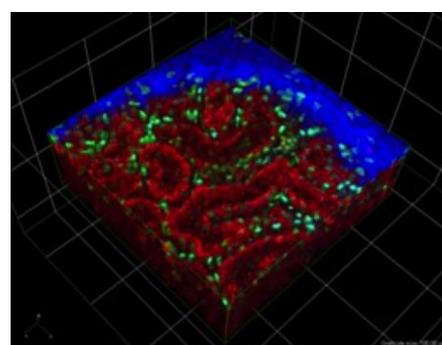


図 H5: 麻酔下のマウス腎臓の生体 *in vivo* マルチカラーイメージング。GFP, SHG、自家蛍光のシグナルをアンミキシング処理によって分離し再構成した。腎臓の特徴的な構造が明確に3次元再構成されている。

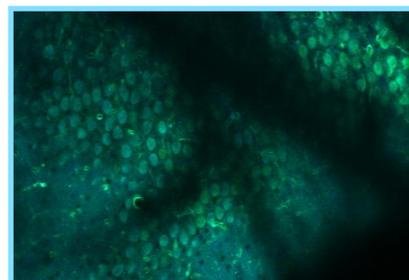
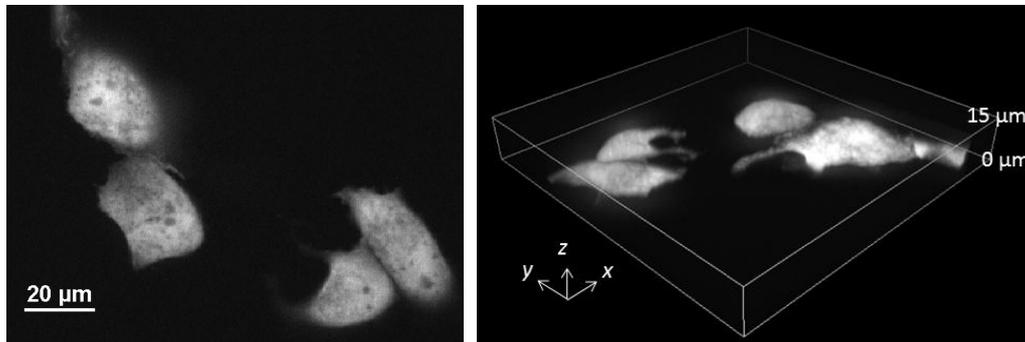


図 H6: カメレオンナノを発現するトランスジェニックマウスのマルチカラー *in vivo* イメージング。個々のプルキンエ細胞が明確に観察されている。脳表より深さ 157 μm。

蛍光バイオイメージングを行うメリットの一つとして、複数の細胞内小器官を波長の異なる蛍光タンパク質、蛍光色素でそれぞれ染色し、独立に可視化、追跡できる点が挙げられる。しかし、その数は励起光源の発振帯域、光学フィルターの特性、発色団の蛍光スペクトルの重なりなどによる制限を受ける。そこで、我々は超広帯域・高強度の白色レーザーであるスーパーコンティニューム (SC) 光源を用いた顕微鏡システムを構築した。具体的には、SC 光から音響光学波長可変フィルターに



図H7: スーパーコンティニューム光を用いた多色励起高速共焦点顕微鏡システムによる mCitrine を細胞質中に発現した COS-7 細胞のライブイメージング。(a) xy 像、(b) 3次元再構築像

より線幅 1 nm 程度の任意の単一波長光を抽出し、スピニングディスク式多点走査型共焦点スキャナを介して倒立顕微鏡へ導入した。これにより、可視波長域のほぼ全域 (400 - 700 nm) において、励起波長を高速で切り替えながらの光学断層像取得が可能となった。一方、多色蛍光イメージングにおいては、蛍光スペクトルの重なりにより蛍光シグナルが他チャンネルへオーバーラップする現象が問題となるため、各蛍光分子成分を線形分離するアンミキシング法が提案されている。今回我々が構築したシステムにおいては励起波長を緻密に設定することが可能であり、吸収スペクトルの重なりによる影響も、励起波長によるアンミキシング処理で除外することができる。これにより、同一試料のイメージデータセットから、より多くの分子の情報を引き出すことが可能となった。本方法論は、近年開発研究が目覚ましい新規蛍光分子の生細胞中における動態解析の高速化、スクリーニングの効率化に資することが期待される(図 H7)。尚、本研究成果は第23回日本バイオイメージング学会学術集会においてポスター発表し、「ベストイメージング賞」を受賞した。

### 3.5 がんモデルメダカの開発及び癌メダカを用いた創薬スクリーニングシステムの開発 (産総研出口グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

研究項目2. 新規補蛍光プローブ・光操作分子、新規がんモデル動物の作製

H26年度から開始した本グループ

の研究目的は、本研究課題の3つの

主要な研究項目のうち、「2. 新規がんモデル動物の開発」を重点的に、特に成瀬グループと強力な連携のもと研究を推進することである。G2 との連携は円滑に行えており、2つの新しいがんモデル開発もほぼ順調に進んでいる(図1)。具体的な内容については、以下に示す。

図1. 工程表

がん遺伝子導入型  
腫瘍がんモデルメダカ  
ヒトがん細胞移植型



#### 【膵がんモデルメダカの開発】

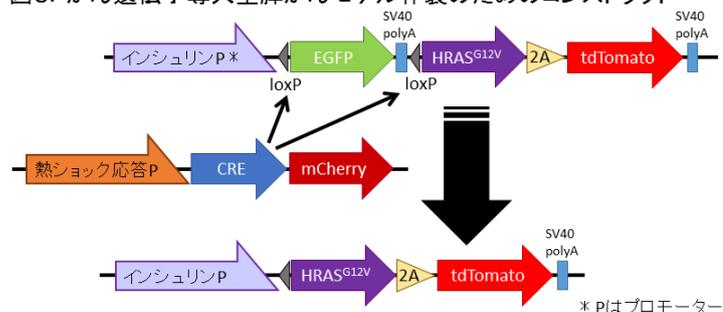
全身の高解像度 *in vivo* イメージングに適したがんモデル動物として、膵臓特異的にヒトのがん遺伝子と蛍光タンパク質を強制発現させることで蛍光標識された膵がんを発症する遺伝子導入メダカシステムを開発する。計画では膵臓特異的に発現する遺伝子である *ptfla* のプロモーターの下流に loxP で挟んだ GFP と終始コドンをつなげ、さらに、下流に 2A ペプチドで RFP の遺伝



子をつなげたヒトの活性型がん遺伝子(H-Ras(G12V))をつなげたコンストラクトを作製し、これをメダカの受精卵にマイクロインジェクションする予定であった。しかし、メダカ *ptf1a* のプロモーター領域として翻訳開始点から上流 5.5kb をクローニングし、その下流に蛍光タンパク質をつなげたコンストラクトを作製し、これをメダカの受精卵にマイクロインジェクションしたが、膵臓特異的な蛍光タンパク質の発現が確認できなかった。そこで、同様に膵臓特異的に発現する遺伝子であるインシュリンのプロモーターに変更し、同様の実験を行ったところ膵臓での GFP の発現が確認できた(図2)。

現在、当初の予定の *ptf1a* プロモーターの代わりにインシュリンプロモーターに変更したコンストラクトの構築を行っている。このコンストラクトを遺伝子導入することで確立した TG 系統と、既存の熱ショック応答プロモーターの制御化で Cre リコンビナーゼを発現する TG 系統と組み合わせることで、熱ショックを与えた後に発がんスイッチが入る系統の確立を目指している(図3)。

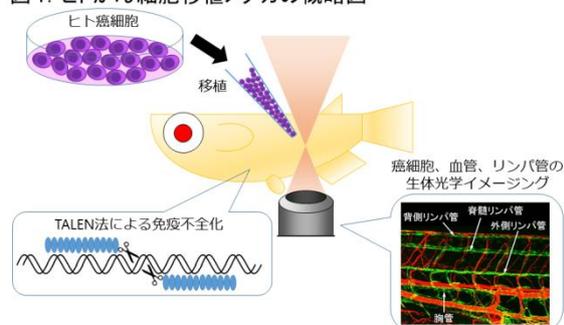
図3. がん遺伝子導入型膵がんモデル作製のためのコンストラクト



【ヒトがん細胞移植メダカの開発】

哺乳類において SCID 及び XSCID 遺伝子は免疫にかかわる重要な働きをしており、これらが破壊されたマウスやラットは免疫不全モデル動物として既に一般に利用されている。しかし、魚類では SCID 及び XSCID 遺伝子が同定されておらず同様の免疫不全モデルは存在していない。そこで、ゲノム編集技術の一つである人工酵素 Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) を用いてメダカの SCID 及び XSCID 遺伝子に突然変異を誘発し世界初の免疫不全メダカを作製する。そして、このメダカに蛍光標識したヒトがん細胞を移植することで、ヒトがん細胞の生体内動態を光学的に詳しく観察することができるモデルメダカを開発する。なお、上記モデルメダカのベースに既に開発しているリンパ管を含む脈管系を *in vivo* で可視化できるトランスジェニック系統を用いることで、がん転移と脈管系の関係を調べることを可能にする(図4)。

図4. ヒトがん細胞移植メダカの概略図



メダカにおける SCID 及び XSCID 遺伝子のオルソログ遺伝子を同定し、それぞれを切断する TALEN を設計し、コンストラクト構築に成功した。これら2の TALEN の mRNA を個別に顕微注入した G0 世代において、それぞれの遺伝子が切断され、修復時に変異が導入されていることを制限酵素処理産物の電気泳動により確認することができた(図5)。その後、F1 世代のゲノム DNA をシーケンシングしたところ、フレームシフトにより機能欠損する変異導入ができていたヘテロ個体を確認できたため、同じ変異を持つ雌雄を交配し F2 世代を得た。この F2 世代においてもゲノム DNA のシーケンシングを行ったところホモ KO となる個体が生まれていることが確認できた(図6)。

図5. G0世代におけるSCID, XSCID遺伝子の変異

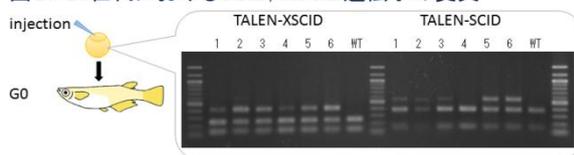


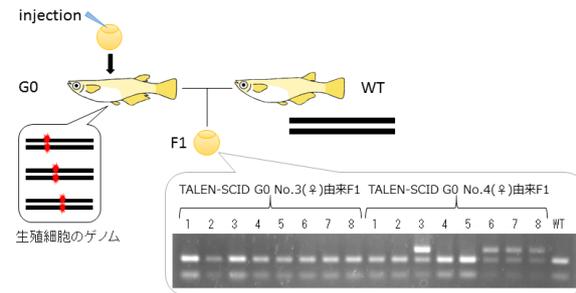
図6. 得られたSCID KO変異体の一つ



### 【蛍光を発するがん細胞をもつメダカ系統の樹立】

当初、G2が単独で遂行する予定であった mift 制御下で xmrk と mCherry を共発現する系統の作製において必要であるコンストラクト mtif-xmrk-2A-mCherry の作製が難航していたため、G4 が行い成功した。これを G2 に渡す一方、当グループでもリンパ管が GFP で可視化できる遺伝子導入透明メダカ系統 (STII-TG(pFLT4:GFP)) に遺伝子導入し、赤色の蛍光タンパク質を発現する悪性黒色腫と赤色腫を発症する系統の育成を行っている。

図6. F1世代におけるSCID, XSCID遺伝子の変異



### 研究項目:3. がんの分子メカニズムの解明と医療への展開

#### 【メダカを用いた創薬スクリーニングシステムの開発】

今後、開発した膵がんモデルメダカやヒトがん細胞移植メダカを用い抗がん剤候補の 1st スクリーニングができるか検討することで創薬応用展開を計る。現在、実際に創薬スクリーニング一般に魚類が使用できるものか調査を行っている。調査の結果、既に米国では、ゼブラフィッシュを用いたスクリーニングで発見された“臍帯血を用いた造血幹細胞移植の成功率を上げる原薬候補物質”が Phase I に進んでいることが分かった。

### 3.6 新規長波長高出力ピコ秒光源システムとベクトルビームのがんイメージングへの応用 (東北大学 佐藤グループ)

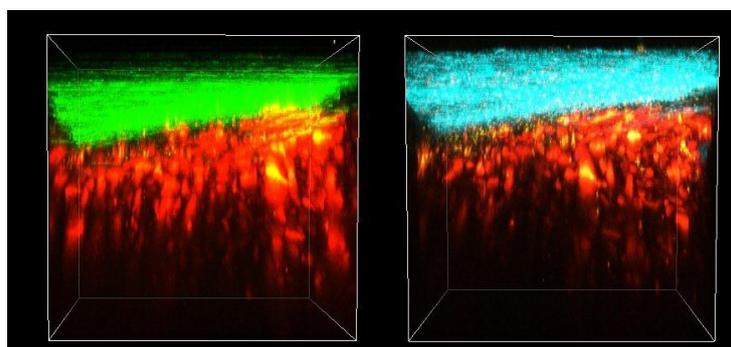
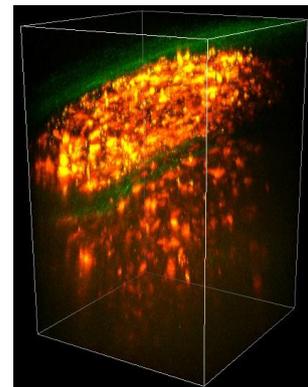
#### (1)研究実施内容及び成果

研究項目3. がんの分子メカニズムの解明と医療への展開

・新規長波長高出力ピコ秒光源の開発・改良とがんイメージングへの応用;ファイバーアンプ・システム構築担当

「光展開」内の旧佐藤俊一チームの G7 で開発した「新規長波長高出力ピコ秒光源」の 5 ps 時間幅の光パルス発生器 (4.7 参照) をベースにして、G6 が改良したファイバーアンプから構成される新規レーザーシステムを、G3 の研究室に設置し、がんイメージングへの適用について検討した。具体的には、代表 G が昨年度までに確立したがんモデル動物を用いて、がん深部イメージングへの応用検討実験を G3 と共に実施した。また収差補正や波面操作の影響も、代表 G、G3

と実施してきた知見を合わせて総合的に検討し、DsRed を発現するヒト線維肉腫 HT1080 細胞をヌードマウス皮下に移植したモデルで、800 μm を越える深さまで、高解像度の 3D イメージを取得することが出来た(上図)。さらに、既存のレーザーと比べると、高パワーで、しかも波長が長い分より深部で鮮明な画像を取得できることがわかった(下図)。以上の結果は、新しい光源開発の基盤技術形成へと繋がっていく可能性がある。



1064 nm 新規半導体レーザー

950 nm 既存のチタンサファイアレーザー

### 3.7 新規長波長高出力ピコ秒光源の開発・改良 (東北大学 横山グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

### 研究項目3. がんの分子メカニズムの解明と医療への展開

・新規長波長高出力ピコ秒光源の開発・改良とがんイメージングへの応用;光源開発担当

「新規長波長高出力ピコ秒光源」に改良を加え、がんイメージングの可能性を検討するために光源開発を行う。すでに、光源の性能として、パルス幅 5ps、繰り返し周波数 10 MHz、ピーク出力 70 kW のレーザーについては、代表 G と G3 でがんイメージングにおける有用性を確認した(上記佐藤グループの項参照)。今後の目標として、ピコ秒光源発振器部分について、光パルス時間幅を 4 ps 以下に短くし、また繰り返し周波数を 10 MHz から 5 MHz へと低繰り返し化を行うことで、ピークパワーを 70 kW から 200 kW 超へ増大させて光源全体の高性能化を図る。

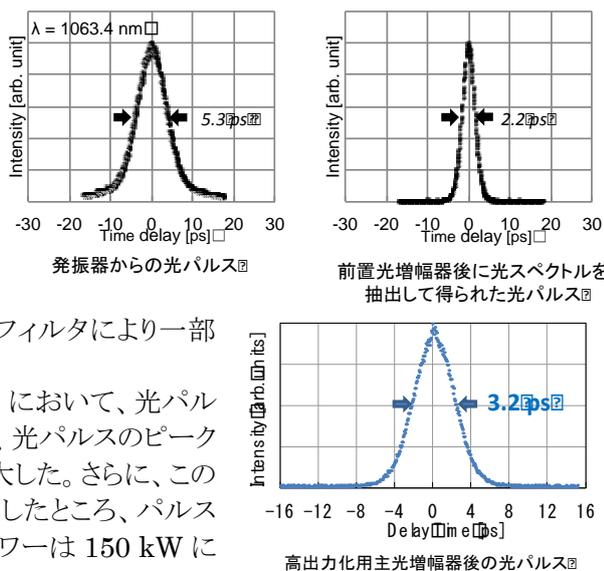
この目標のもと研究を推進した結果、現在までに、時間幅が 2 ps の光パルスが得られるようになった。この技術的要点は、5 ps 時間幅光パルスの増幅において、高出力化前の前置増幅器中の非線形光学効果を完全に抑制することが困難であることがわかったために、むしろ非線形光学効果を短パルス化に利用する方策を取ったことにある。具体的には、非線形光学効

果によるスペクトル歪みを補正するために光フィルタにより一部分の光スペクトルの適正な抽出を行った。

これにより、光パルス繰り返し周波数 10 MHz において、光パルス時間幅は 5 ps から 2 ps へと短くなり(上図)、光パルスのピークパワーも 2.5 W から 350 W へと2桁以上増大した。さらに、この光パルスを高出力化用の主光増幅器で増幅したところ、パルス時間幅は 3ps に広がったが(下図)、ピークパワーは 150 kW に達することがわかった。

以上の結果を踏まえると、今後は、平均光パワーを一定にして繰り返し周波数を 5 MHz にすることで、200 kW 超のピークパワーが実現される見通しである。また、このパルス幅、繰り返し周波数、およびピークパワーの柔軟な制御という特徴を活かすことにより、これまで以上に優れた深部イメージングが可能になるものと期待される。そして、この検討に基づいて、実際に繰り返し周波数を 1 MHz にまで低減して高ピークパワー化を行う実験を試行した。その結果、最終段の光増幅器の出力として、300 kW 超のピークパワーが得られることが確認された。また、ピークパワーの制限要因としては、最終段光増幅器における非線形光学効果に基づくスペクトル広がりに加えて光増幅器内の自然放出光ノイズの影響が大であることもわかった。スペクトル広がりにはファイバ中の群速度波長分散による光パルスの広がりをもたらす、また、自然放出光は正味の光パルス出力成分の低下をもたらす。これらの影響はパルス繰り返し周波数が低いほど大きくなる。自然放出光が光出力全体に占める割合は、上記の 1 MHz の場合においては、1/3 以上にも達していることがわかった。

また、光増幅器を含む光源全体の小型化・無調整化においては、高出力型光増幅器も空間光学系ではなく全光ファイバ接続で構成することが必須であると考えられる。この光源設計思想に基づいて、高出力光増幅器用の大口径コアを有する光ファイバの融着技術確立に向けた取組みも行った。そして、融着点における光伝搬の低損失化の見通しを得るに至った。



## § 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 67 件)

1. Yutaro Tsubakihara, Atsuhiko Hikita, Shin Yamamoto, Sachi Matsushita, Natsuki Matsushita, Yusuke Oshima, Keiji Miyazawa and Takeshi Imamura, “Arkadia enhances BMP signaling through ubiquitylation and degradation of Smad6,” *The Journal of Biochemistry* (2015) in press (DOI: 10.1093/jb/mvv024)
2. Atsuhiko Hikita, Tadahiro Iimura, Yusuke Oshima, Takashi Saitou, Shin Yamamoto and Takeshi Imamura, “Analyses of bone modeling and remodeling using in vitro reconstitution system with two-photon microscopy,” *Bone* (2015) in press (DOI:10.1016/j.bone.2015.02.030)
3. Yusuke Oshima, Tadahiro Iimura, Takashi Saitou, Takeshi Imamura, “Changes in chemical composition of bone matrix in ovariectomized (OVX) rats detected by Raman spectroscopy and multivariate analysis,” *SPIE Proceedings Vol. 9303* (2015) (DOI: 10.1117/12.2078787)
4. Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Takashi Saitou, Tsuyoshi Miyazaki, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, Tadahiro Iimura, “Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application,” *Biomedical Optics Express*, 6(2), 405-420 (2015) (DOI:10.1364/BOE.6.000405)
5. Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Takashi Murata, Hirotaka Watanabe, Ryosuke Kawakami, Hiroshi Nakayama, Mitsuyasu Hasebe, Tomomi Nemoto, “Multi-point scanning two-photon excitation microscopy utilising a high-peak-power 1042-nm laser”, *Anal. Sci.*, 31(4), 307-313 (2015) (DOI: 10.2116/analsci.31.307)
6. Ryosuke Kawakami, Kazuaki Sawada, Yuta Kusama, Yi-Cheng Fang, Shinya Kanazawa, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama and Tomomi Nemoto, “In vivo two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode”, *Biomed. Opt. Express*, 6(3) pp891-901 (2015) (DOI:10.1364/BOE.6.000891)
7. Yuka Aoyagi, Ryosuke Kawakami, Hisayuki Osanai, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, “A Rapid Optical Clearing Protocol using 2,2-Thiodiethanol for Microscopic Observation of Fixed Mouse Brain”, *PLoS ONE*, 10(1), Article#: e0116280., 2015 (DOI:10.1371/journal.pone.0116280 )
8. Tomomi Nemoto, Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Koichiro Iijima, Kohei Otomo, “Two-photon excitation fluorescence microscopy and its application for functional connectomics”, *Microscopy*, 64 (1), pp39-15 (2015) (DOI: 10.1093/jmicro/dfu1105.)
9. Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, ari Ipponjima, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto, *Proc. SPIE* “Transmissive liquid crystal devices correcting the spherical aberrations in laser scanning microscopy”, 9335-1, 2015 (DOI:10.1117/12.2076342)
10. Yasunori Omata, Tetsuro Yasui, Jun Hirose, Naohiro Izawa, Yuuki Imai, Takumi Matsumoto, Hironari Masuda, Naoto Tokuyama, Shinya Nakamura, Shuichi Tsutsumi, Hisataka Yasuda, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi, Atsuhiko Hikita, Takeshi Imamura, Koichi Matsuo, Taku Saito, Yuho Kadono, Hiroyuki Aburatani, Sakae Tanaka, “Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis,” *J Bone Miner Res.* 2014 Nov 27. (DOI: 10.1002/jbmr.2418)
11. Mayu Sugiyama, Takashi Saitou, Hiroshi Kurokawa, Asako Sakaue-Sawano, Takeshi Imamura, Atsushi Miyawaki, Tadahiro Iimura, “Live Imaging-Based Model Selection Reveals Periodic Regulation of the Stochastic G1/S Phase Transition in Vertebrate Axial Development,” *PLOS Computational Biology*, 10(12): e1003957 (2014) (DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003957)
12. Yusuke Oshima, Takeshi Imamura, Atsuko Shintani, Kajiura-Kobayashi Hiroko,

- Terumasa Hibi, Takeharu Nagai, Shigenori Nonaka, Tomomi Nemoto, "Ultrasensitive imaging of Ca<sup>2+</sup> dynamics in pancreatic acinar cells of yellow cameleon-nano transgenic mice", *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 19971-86 (2014) (DOI:10.3390/ijms151119971)
13. Atsushi Maruyama, Yusuke Oshima, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Shigenori Nonaka, Takeshi Imamura, and Kiyoshi Naruse, "Wide field intravital imaging by two-photon excitation digital-scanned light-sheet microscopy (2p-DSLM) with a high-pulse energy laser," *Biomedical Optics Express*, 5(10), 3311-25 (2014) (DOI: 10.1364/BOE.5.003311)
  14. Shigehiro Koga, Yusuke Oshima, Naoki Honkura, Tadahiro Iimura, Kenji Kameda, Koichi Sato, Motohira Yoshida, Yuji Yamamoto, Yuji Watanabe, Atsuhiko Hikita, and Takeshi Imamura, "In vivo subcellular imaging of tumors in mouse models using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody in TPEM," *Cancer Science*, 105(10), 1299-306 (2014) (DOI: 10.1111/cas.12500)
  15. Toshio Takahashi, Hiroe Ohnishi, Yuki Sugiura, Kurara Honda, Makoto Suematsu, Takashi Kawasaki, Tomonori Deguchi, Takeshi Fujii, Kaoru Orihashi, Yoshitaka Hippo, Takehiro Watanabe, Tohru Yamagaki, Shunsuke Yuba, "Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice.", *FEBS J*, 281(20), pp4672-90, 2014(DOI: 10.1111/febs.12974.)
  16. Megumi Nakao, Shintaro Takemoto, Tadao Sugiura, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, Tetsuya Matsuda, "Interactive Visual Exploration of Overlapping Similar Structures for Three-dimensional Microscope Images", *BMC Bioinformatics* (2014), vol. 15, article# 415 (DOI:10.1186/s12859-014-0415-x)
  17. Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, , Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, "Two-Photon Excitation STED Microscopy by Utilizing Transmissive Liquid Crystal Devices", *Optics Express*, 22(23) pp. 28215-28221, 2014 (doi: 10.1364/OE.22.028215)
  18. Tomomi Nemoto, "Development of novel two-photon microscopy for living brain and neuron", *Microscopy* 63, pp. i7-i8 (2014) (DOI: 10.1093/jmicro/dfu087)
  19. Yuriko Nishiyama, Tsutomu Matsumoto, Ji-Won Lee, Takashi Saitou, Takeshi Imamura, Keiji Moriyama, Akira Yamaguchi, Tadahiro Iimura, "Changes in the spatial distribution of sclerostin in the osteocytic lacuno-canalicular system in alveolar bone due to orthodontic forces, as detected on multimodal confocal fluorescence imaging analyses ", *Arch Oral Biol.* (in press) (2014) (DOI:10.1016/j.archoralbio.2014.08.013)
  20. Yusuke Oshima, Hideki Horiuchi, Naoki Honkura, Atsuhiko Hikita, Tadanori Ogata, Hiromasa Miura, Takeshi Imamura, "Intravital multiphoton fluorescence imaging and optical manipulation of spinal cord in mice, using a compact fiber laser system", *Lasers Surg Med*, 46(7), pp563-572, 2014(DOI: 10.1002/lsm.22266.)
  21. Ji-Won Lee, Akira Yamaguchi, Tadahiro Iimura, "Functional heterogeneity of osteocytes in FGF23 production: the possible involvement of DMP1 as a direct negative regulator ", *Bonekey Rep*, 2014 Jun 4;3:543.(DOI: 10.1038/bonekey.2014.38.)
  22. 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)
  23. Megumi Nakao, Kosuke Kurebayashi, Tadao Sugiura, Tetsuo Sato, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, Kotaro Minato, Tetsuya Matsuda, "Visualizing in vivo Brain Neural Structures Using Volume Rendered Feature Spaces", *Computers in Biology and Medicine*, 53, pp. 85-93,2014

- (DOI:10.1016/j.compbio.2014.07.007.)
24. Satoshi Asano, Tomomi Nemoto, Tomoya Kitayama, Kae Harada, Jun Zhang, Kana Harada, Isei Tanida, Masato Hirata, and Takashi, Kanematsu, “Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) controls KIF5B-mediated insulin secretion”, *Biological Open* 3(6), pp. 463-474.,2014 (doi: 10.1242/bio.20147591) (2014)
  25. Guijun Guan, Xi Zhang, Kiyoshi Naruse, Yoshitaka Nagahama, and Yunhan Hong, “Gene Replacement by Zinc Finger Nucleases in Medaka Embryos”, *Mar Biotechnol.* 2014 Aug 6. [Epub ahead of print]
  26. Yusuke Takehana, Masaru Matsuda, Taijun Myosho, Maximiliano L Suster, Koichi Kawakami, Tadasu Shin, Yuji Kohara, Yoko Kuroki, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Satoshi Hamaguchi, Mitsuru Sakaizumi, and Kiyoshi Naruse, “Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*”, *Nature Communication* 5, 4157, 2014 (DOI:10.1038/ncomms5157)
  27. 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”, *Mar Biotechnol* 16(2), 125-134, 2014 (DOI: 10.1007/s10126-013-9556-6)
  28. 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)
  29. Takashi Saitou, Kentaro Kajiwarara, Chitose Oneyama, Takashi Suzuki, 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
  30. 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)
  31. Takashi Saitou, Kentaro Kajiwarara, 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)
  32. 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)
  33. Shimozono S, Iimura T, Kitaguchi T, Higashijima S, Miyawaki A. “Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development”, *Nature.* 2013 Apr 18;496(7445):363-366. Epub 2013 Apr 7.
  34. 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)
  35. 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.* 9(5), 444-454, 2013 (DOI: 10.7150/ijbs.6507)
  36. 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)
  37. 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)
38. Mari Kawaguchi, Hiroshi Takahashi, Yusuke Takehana, Kiyoshi Naruse, Mutsumi Nishida and Shigeki 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)
  39. 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)
  40. 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)
  41. Chikako Hara-Miyauchi, Osahiko Tsuji, Aki Hanyu, Seiji Okada, Akimasa Yasuda, Takashi Fukano, Chihiro Akazawa, Masaya Nakamura, Takeshi Imamura, Yumi Matsuzaki, Hirotaka James Okano, Atsushi Miyawaki, Hideyuki Okano, “Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior”, *Biochem Biophys Res Commun*, Mar 9;419(2):pp188-193, 2012 (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.01.141)
  42. Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, Yamamoto K, Matsushima K, Yamaguchi A, Iimura T. Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. *J Cell Sci.* 2013 Feb 15;126(Pt 4):1032-1045. Epub 2012 Dec 21.
  43. Tojo M, Takebe A, Takahashi S, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K, Chiba T: Smad7-deficient mice show growth retardation with reduced viability. *J Biochem.* 2012 Jun;151(6):pp621-631. (DOI: 10.1093/jb/mvs022. )Epub 2012 Feb 29.
  44. 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):pp936-943, 2012 (DOI 10.1016/j.ejca.2011.10.006)
  45. Tetsuaki Kimura, Yasuhiro Kamei, Yusuke Takehana, Takao Sasado, Kiyoshi Naruse, “Medaka Genomics and the Methods and Resources for Decoding Genomic function”, *Genome Mapping and Genomics in Animals*, Volume 4, 2012, pp 159-182
  46. 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)
  47. 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)
  48. Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, Tamamura Y, Watanabe T, Haraikawa M, Hamagaki M, Hata K, Kanno J, Yoneda T, Saga Y, Goseki-Sone M, Kaneko K, Yamaguchi A, Iimura T. Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the *Mesp2*-null mouse: a model of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis. *Bone.* 2013 Mar;53(1):pp248-258. Epub 2012 Dec 11.

49. 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)
50. 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)
51. 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)
52. 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)
53. 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)
54. 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*, 139, 1417-1426, 2012 (DOI: 10.1242/dev.073239)
55. 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)
56. Sho Ogata, Takashi Miki, Susumu Seino, Seiichi Tamai, Haruo Kasai, Tomomi Nemoto, “ A Novel Function of *Noc2* in Agonist-Induced Intracellular  $Ca^{2+}$  Increase during Zymogen-Granule Exocytosis in Pancreatic Acinar Cells”, *PLoS ONE* 7(5): e37048, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0037048)
57. Koinuma D, Shinozaki M, Nagano Y, Ikushima H, Horiguchi K, Goto K, Chano T, Saitoh M, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. ”*RB1CC1* positively regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling through the modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity”, *J Biol Chem.* 2011 Sep 16;286(37):pp32502-32512. (DOI: 10.1074/jbc.M111.227561.) Epub 2011 Jul 27.
58. Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M, “HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator.”, *Blood.* 2011 Aug 18;118(7):pp1865-1876. (DOI: 10.1182/blood-2010-12-326199.) Epub 2011 Jun 24.
59. Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H, ” Cell-type specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 and hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in HepG2 cells”, *J Biol Chem.* 2011 Aug 26;286(34):pp29848-29860. (DOI: 10.1074/jbc.M110.217745.) Epub 2011 Jun 6
60. Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, Hirose J, Omata Y, Yasuda H, Imamura T, Nakamura K, Tanaka S, “Regulation of

- RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  through molecular interaction between Smad3 and TRAF6”, *J Bone Miner Res.* 2011 ul;26(7):pp1447-1456.(DOI: 10.1002/jbmr.357.)
61. 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)
  62. 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)
  63. 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: pp6311-6320, 2010 (DOI 10.1074/jbc.M110.177683)
  64. Mizutani A, Saitoh M, Imamura T, Miyazawa K, Miyazono K, “Arkadia complexes with clathrin adaptor AP2 and regulates EGF signaling”, *J Biochem.* 2010 Dec;148(6):pp733-741. (DOI: 10.1093/jb/mvq127.) Epub 2010 Oct 21.
  65. Kido S, Kuriwaka-Kido R, Umino-Miyatani Y, Endo I, Inoue D, Taniguchi H, Inoue Y, Imamura T, Matsumoto T, “Mechanical stress activates Smad pathway through PKC $\delta$  to enhance interleukin-11 gene transcription in osteoblasts” *PLoS One*. 2010 Sep 29;5(9). pii: e13090.(DOI: 10.1371/journal.pone.0013090.)
  66. Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung UI, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S, “Runx1 and Runx2 cooperate during sternal Morphogenesis” *Development.* 2010 Apr;137(7):pp1159-1167. (DOI: 10.1242/dev.045005.) Epub 2010 Feb 24.
  67. Kashiwagi Y, Horie K, Kanno C, Inomata M, Imamura T, Kato M, Yamamoto T, Yamashita H, “TGF- $\beta$  type II Receptor mRNA in Retinoblastoma Cell Lines is induced by Trichostatin A”, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Feb;51(2):pp679-685. (DOI: 10.1167/iops.09-4073.) Epub 2009 Sep 8.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 大友康平、日比輝正、根本知己「STED 顕微鏡法—光渦を用いた誘導放出制御による超解像バイオイメージング」、*Oplus E* (2015) *in press*
2. 今村健志、大嶋佑介、岡崎幹生、佐野由文「細胞イメージング技術と呼吸器」、*THE LUNG perspectives*, Vol.22 No.4, 2014
3. 今村健志、大嶋佑介、疋田温彦、古賀繁宏「非線形光学を駆使した生体蛍光癌イメージング」、*医学のあゆみ*, Vol.251 No.11, 2014
4. 今村健志、疋田温彦、大嶋佑介、飯村忠浩「バイオイメージングの現状と展望」株式会社インナービジョン 39-41 ページ, 2014
5. 大嶋佑介、飯村忠浩、疋田温彦、今村健志「ラマン分光法による骨組織の分子計測と骨質評価への応用」*The Bone* 小誌第 125 号「骨バイオイメージング」, 2014
6. 疋田温彦、大嶋佑介、今村健志「骨・がん細胞イメージング」*実験医学*(増刊)、羊土社、Vol.32- No. 7、87-92 ページ, 2014
7. 根本知己、日比輝正、川上良介「生体光イメージングや光学顕微鏡で用いられる原理・装置—最新の光学顕微鏡法を中心に—、(石井編)『生体イメージング研究 update』』南山堂(東京) (2014) pp. 9-19、12月15
8. Tomomi Nemoto, Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Koichiro Iijima, Kohei Otomo, “Deep imaging of living mouse brain utilizing novel laser photonics technologies”, *Plant Morphology*, Vol. 24(1), pp. 31-35, 2014

9. 根本知己、川上良介、日比輝正「2光子・多光子励起顕微鏡 —原理と生体深部イメージング応用—」光アライアンス 2014年3月号、Vol.25, No.3, pp. 10-14, 2014
10. 飯島光一郎、川上良介、根本知己、「生体組織の深部観察に挑む2光子励起蛍光顕微鏡」O Plus E, vol. 36, No.2, pp. 152-156, 2014
11. 今村健志、疋田温彦、大嶋佑介、「In vivo imaging の最前線」整形・災害外科、金原出版株式会社、Vol. 56 No. 6、755-759 ページ、2013
12. 今村健志、疋田温彦、大嶋佑介、古賀繁宏、「血管新生の生体蛍光イメージング解析」日本血栓止血学会誌 24 巻 6 号、2013
13. 今村健志、疋田温彦、大嶋佑介、飯村忠浩、「骨・軟骨組織の生体光イメージング」月刊誌 CLINICAL CALCIUM 医薬ジャーナル社、Vol. 23 No. 12、1767-1773 ページ、2013
14. 疋田温彦、大嶋佑介、今村健志、「癌と骨 Cancer and Bone Chapter 5 骨転移の診断 3骨転移への光イメージングの応用」、株式会社メディカルレビュー社、2013
15. 大嶋佑介、「無染色イメージングの技術開発と医療応用＝細胞のラマン分光から生体の非線形光学イメージングへの技術展開＝」、光アライアンス、日本工業出版、Vol.24、No.4、6-9 ページ、2013
16. 大嶋佑介、「2012年日本光学会の研究動向 17. 医学・生物応用光学」、光学、第 42 巻第 4 号、2013
17. 渡辺高、原田清、山口朗、飯村忠浩、「生後骨発達における Sclerostin 発現分布の時空間的变化 蛍光イメージングによる骨組織のグローバルな観察」、THE BONE、Vol.27 No.1、メディカルレビュー社 pp5-10、2013
18. 飯村忠浩、「骨細胞ネットワークのイメージング」、THE BONE、Vol.27 No.3、メディカルレビュー社 pp31-37、2013
19. 野中茂紀、「光シート顕微鏡を用いた解析」生体の科学 公益財団法人金原一郎医学医療振興財団／医学書院、Vol.64, No.6, pp589-594、2013
20. 野中茂紀「ライブイメージングのための光シート顕微鏡 レーザー学会誌「レーザー研究」第 41 巻2号、pp103-106、2013
21. Nonaka S. “Visualization of mouse nodal cilia and nodal flow” Methods in Enzymology 525:149-57, 2013
22. 飯島光一郎、川上良介、根本知己、「CAG-YC-Nano Transgenic mouse を用いた小脳プルキンエ細胞におけるカルシウム動態の生体イメージング法」、レーザー研究、2013
23. 根本知己、川上良介、飯島光一郎、日比輝正「新規レーザーによる多光子励起過程を用いた生体脳深部イメージング」生体の科学、Vol. 64(6), pp: 571-576、2013
24. 今村健志、疋田温彦、本蔵直樹、大嶋佑介「生物発光・蛍光イメージングを用いたがん細胞とがん微小環境の解析」、ドージンニュース、No.143、pp.10-12(2012)
25. 今村健志、疋田温彦、大嶋佑介、井上博文「腫瘍への生体イメージングによるアプローチ」、血管医学、Vol.13、No.2、pp107-113、2012
26. 疋田温彦「がん細胞とがん微小環境の in vivo イメージング」、病理と臨床、Vol.30、N0.7、pp719-724、2012
27. 本蔵直樹「光イメージングから光操作へ」、病理と臨床、Vol.30、N0.7、pp762-767、2012
28. 大嶋佑介「プローブレスイメージング(ラマン分光法、SHG/THG)の診断応用」、病理と臨床、Vol.30、N0.7、pp755-761、2012
29. 大嶋佑介「無染色イメージングの技術開発と医療応用＝細胞のラマン分光から生体の非線形光学イメージングへの技術展開＝」、光アライアンス Vol.24 No.4 日本工業出版 pp6-9、2012
30. 今村健志、疋田温彦、大嶋佑介、羽生亜紀「疾患モデルの作製と利用—がん— 第 4 節 がんのイメージングモデル」、株式会社 エル・アイ・シー、pp116-125、2012
31. 野中茂紀、大嶋佑介「短時間での広視野ラマンイメージングが可能に」OplusE アドコムメディア株式会社、Vol 396、p996、2012
32. 野中茂紀「光シート顕微鏡：生体観察のための新しい顕微鏡法」、日本顕微鏡学会和文誌「顕微鏡」第 47 巻 3 号、pp163-166、2012

33. Tetsuaki Kimura, Yasuhiro Kamei, Yusuke Takehana, Takao Sasado, and Kiyoshi Naruse. "Medaka genomics and the methods and resources for decoding genomic functions", In *Genome Mapping and Genomics in Laboratory Animals*, P. Denny and C. Kole, eds. (London Springer), pp159-182, 2012
34. Kiyoshi Naruse, Tetsuaki Kimura, Takao Sasado and Yasuhiro Kamei "Development of medaka bioresources and their applications for the analysis of biological function (メダカバイオリソースの活用と生命機能解析への応用)" *水産育種* 42(1), 1-9, 2012
35. 川上良介、日比輝正、根本知己「生体深部を可視化する in vivo 多光子励起顕微鏡法」、*ドージンニュース*, No. 144, pp. 6-9, 2012
36. 澤田雅人, 金子奈穂子, 稲田浩之, 和氣弘明, 加藤康子, 柳川右千夫, 小林和人, 根本知己, 鍋倉淳一, 澤本和延「感覚入力による成体嗅球新生ニューロンの位置決定」*Nagoya Med J*, vol. 52 (2), pp.163-163, 2012
37. 根本知己、川上良介、日比輝正、青柳佑佳、澤田和明「脳の in vivo イメージング」、*病理と臨床*, vol.30、No.7、pp. 725-731、2012
38. 根本知己、日比輝正、川上良介「"in vivo"多光子顕微鏡による生体機能のイメージング」、*未来材料*, vol.12, No.7, pp.2-4, 2012
39. 日比輝正、川上良介、根本知己「生体深部の二光子イメージング」、*血管医学*, vol.13 No.2, pp.123-128, 2012
40. 平沢壮、石原美弥、渡邊智紀、松浦祐司、大嶋佑介、近江雅人、上野登輝夫、石井克典、栗津邦男、「Photonics West BiOS 2011」、*日本レーザー医学会誌*, Vol32, No.1, pp88-91, 2011
41. 今村健志、疋田温彦、本蔵直樹、羽生亜紀「癌細胞の発光・蛍光イメージング」、*実験医学*, Vol.29, No.16, pp2590-2594, 2011
42. 今村健志、疋田温彦、井上靖道、羽生亜紀「細胞周期/転移への Fucci 技術」、Vol.9, No.4, pp227-233, 2011
43. 今村健志、疋田温彦、羽生亜紀「がんのイメージング」、*実験医学(増刊)*, Vol.29, No.10, pp1690-1694, 2011
44. 今村健志、疋田温彦、樋渡 清司、羽生亜紀「癌転移の発光・蛍光イメージング」、*SURGERY FRONTIER*, Vol.18, No.1, pp29-35, 2011
45. 今村健志、疋田温彦、本蔵直樹、佐々木真理「in vivo 光イメージング技術の医学研究応用」、*愛媛医学*, Vol.30, No.3, pp157-161, 2011
46. 今村健志、疋田温彦、羽生亜紀、井上博文「In vivo 蛍光イメージング技術を駆使した癌血管新生の解析」、*血管医学*, Vol.12, No.1, pp85-89, 2011
47. 今村健志「In vivo 光イメージング-光技術を駆使したシグナル伝達研究」、*医学のあゆみ*, Vol.234, No.10, pp928-933, 2011
48. 根本知己、日比輝正、川上良介「多光子励起レーザー顕微鏡を用いた生理機能の非侵襲的生体深部イメージング」、*ファルマシア*, vol. 47, No.8, pp.724-728, 2011
49. 根本知己、第4章 3-4「多光子励起生体イメージング」*京都廣川書店*, pp.411-414「トランポームの世界」(金井他編)、2011
50. 今村健志、疋田温彦、井上博文、羽生亜紀「インビボ光イメージング技術の現状と展望」、*内分泌・糖尿病・代謝内科*, Vol.30, No.5, pp484-491, 2010
51. 今村健志「骨と癌の in vivo 光イメージング」、*臨床雑誌『整形外科』*, Vol.61, No.9, pp1006, 2010

〈国外〉

1. Takeshi Imamura, Yusuke Oshima and Atsuhiko Hikita, "Regulation of TGF- $\beta$  family signalling by ubiquitination and deubiquitination," *JB Review, J. Biochem.* 1-10, 2013
2. Yuji Makino, Kazuo Kaneko, Akira Yamaguchi and Tadahiro Imura, "Developmental biology and etiology of axialskeleton: Lessons from a mouse

model of spondylocostaldysostosis and spondylothoracidysostosis”, Journal of Oral Biosciences, 55:175–9, 2013

3. Takeshi Imamura, Atsuhiko Hikita, Yasumichi Inoue, “The roles of TGF- $\beta$  signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis”, Breast Cancer, Vol 19, Issue 2, pp 118-124, 2012 (DOI:10.1007/s12282-011-0321-2)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 126 件、国際会議 25 件)

(国内)

1. 今村健志、“バイオイメージング技術の開発と医学研究・創薬応用”、日本農芸化学会 2015 年度岡山大会、岡山大学津島キャンパス、2015 年 3 月 29 日
2. 今村健志、“医工学連携による新規蛍光イメージング技術の開発と医学・医療応用”、第 116 回医工学フォーラム、京都大学再生医科学研究所、2015 年 3 月 27 日
3. 今村健志、“革新的蛍光イメージング技術が拓く未来のがん研究とがん医療”、第 9 回愛媛大学学術フォーラム、愛媛大学総合情報メディアセンター、2015 年 3 月 20 日
4. 根本知己「ホールマウスイメージング～2光子顕微鏡による生体脳 in vivo イメージングを中心に」、JST ライフ計測検討会、2015 年 2 月 4 日、科学技術振興機構(東京都)
5. Yusuke Oshima, “Changes in chemical composition of bone matrix in osteoporosis detected by Raman spectroscopy and multivariate analysis,” 1st Raman Bio-sensing Seminar January 20th 2015, Kwansei Gakuin Kaikan
6. 今村健志、“革新的バイオイメージングが拓く未来の医学研究と医療”、第 3 回国際先端生物学・医学・工学会議(ICIBME2015)、名古屋大学豊田講堂シンポジオン、2015 年 1 月 15 日
7. 今村健志、“革新的蛍光イメージング技術の開発とがん研究・医療応用”、第 123 回日本医学放射線学会中国・四国地方会、愛媛大学医学部、2014 年 12 月 20 日
8. 今村健志、“補償光学の 2 光子励起顕微鏡への応用”、すばる望遠鏡から顕微鏡へ：次世代三次元補償光学系を用いた生体イメージング・光操作に向けて、国立天文台(東京)、2014 年 8 月 20 日
9. 今村健志、“光イメージング技術が拓く新たながん研究と創薬応用”、第 25 回霧島神経薬理フォーラム、にぎたつ会館(愛媛)、2014 年 8 月 15 日
10. 齋藤卓、“蛍光イメージングと数理モデルの応用による個体発生現象のパターン解析”、日本応用数理学会2014年度年会、政策大学院大学、2014 年 9 月 4 日
11. 齋藤卓、“蛍光イメージングと数理で観察するゼブラフィッシュの発生のパターン”、数学協働プログラム・数理医学体験ワークショップ～日仏数学者による秋の学校、大阪大学国際棟、2014 年 11 月 1 日
12. 出口友則「メダカの細胞を光らせて体ができる仕組みを知る」、石けん洗剤技術交流会、ホテル大阪ベイトワー(大阪)、2014 年 05 月 17 日(招待講演)
13. 根本知己、多光子励起過程を用いた生体深部のイメージング技術、物性研研究会、東京大学柏の葉キャンパス、2014 年 12 月 4 日、柏市
14. 大友康平、根本知己、「光でひも解く自然科学—光技術のニーズとシーズ—」、第3回 NINS コロキウム、2014 年 12 月 2 日、ホテル・ザプリンス箱根、神奈川県足柄下郡箱根町
15. 大友康平、日比輝正、小澤祐市、一本嶋佐理、横山弘之、佐藤俊一、根本知己, “Improvement of the spatial resolution of two-photon microscopy by utilizing transmissive liquid crystal devices”, 第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 27 日
16. 根本知己、「生きた臓器深部のインビボ観察や操作を実現するレーザー光技術」、未来医療イノベーションセミナー、北海道大学医学部、札幌市、2014 年 11 月 26 日  
大友康平「空間・時間分解能を向上させた多光子顕微鏡法による生体内微細構造の可視化」第 445 回薬学研究科セミナー、東北大学青葉山キャンパス、仙台市、2014 年 11 月 18 日

17. 根本知己, 多光子顕微鏡を用いたマウス生体脳の in vivo 深部観察, 日本顕微鏡学会第 58 回シンポジウム、九州大学医学部百年講堂、2014 年 11 月 17 日
18. 根本知己” Improvement of two-photon laser scanning microscopy for live imaging utilizing laser technology” 日本生物物理学会第 52 回年会、札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 27 日
19. Yi-Cheng Fang, 草間裕太, 横山弘之, 「2ps duration optical pulse source based on a 1060nm-band gain-switched semiconductor laser diode」, 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道大学, 2014 年 9 月.
20. 根本 知己「新規レーザーや光技術を用いた多光子イメージングの高度化」第 6 回光操作研究会 東北大学片平キャンパス (仙台市) 2014 年 8 月 18 日
21. \*Takeshi Imamura, 「Intravital cancer imaging by advanced multi-photon laser excitation microscopy」, THE 37th NAITO CONFERENCE ON Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences. Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan JULY 18, 2014
22. \*Tadahiro Iimura 「Retrieval of regulatory mode of G1S transition in vertebrate axial development by quantitative live imaging and mathematical models.」 THE 37th NAITO CONFERENCE ON Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences. Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan JULY 16, 2014
23. 大嶋佑介, 飯村忠浩, 疋田温彦, 今村健志, 「ラマン分光・イメージング技術の開発と骨代謝研究への応用」第 32 回日本骨代謝学会学術集会 大阪国際会議場 2014 年 7 月 25 日 (24~26)
24. 飯村忠浩 「ケモカイン受容体 CX3CR1 の骨代謝における役割」第 32 回日本骨代謝学会学術集会 若手シンポジウム基礎系「骨代謝のダイナミクスの新たな潮流」大阪国際会議場 大阪 2014 年 7 月 26 日
25. 今村 健志, 革新的 in vivo イメージングが拓く次世代がん研究と創薬応用、OYC バイオシンポジウム 2014「遺伝子発現から薬効薬理評価～最新リアルタイムイメージング～」、日本工業倶楽部会館、2014 年 7 月 4 日
26. 今村 健志, 教育講演: 骨バイオサイエンスにおける蛍光イメージングの新機軸、第 5 回骨バイオサイエンス研究会、岡山大学病院、2014 年 6 月 28 日
27. 飯村忠浩 「脊椎動物の進化における脊索・体節系と中軸骨格の発生」平成 26 年度日本解剖学会関東支部懇話会 脊椎動物における硬組織の発達と進化 東京医科歯科大学歯学部特別講堂 2014 年 6 月 21 日
28. 疋田温彦, 骨・軟骨組織の 2 光子励起顕微鏡・第 2 次高調波発生を用いた観察、第 34 回日本骨形態計測学会、札幌芸文館、2014 年 6 月 13 日
29. 大嶋佑介, 飯村忠浩, 疋田温彦, 今村健志「ラマン分光分析を基盤とした骨質計測技術の開発」第 34 回日本骨形態計測学会シンポジウム 2014 年 6 月 13 日 さっぽろ芸文館
30. 今村 健志, 2 光子励起顕微鏡を駆使した生体蛍光イメージング、第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会、愛媛大学南加記念ホール、2014 年 6 月 6 日
31. 齋藤 卓, 蛍光イメージングと数理モデル~Fucci と数理で見る発生パターン~, 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会、愛媛大学南加記念ホール、2014 年 6 月 6 日
32. 根本知己「新規レーザー・光技術の導入による光学顕微鏡の高度化」附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト(ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス)平成 25 年度成果報告会、大阪大学豊中キャンパス(豊中市)、2014 年 5 月 30 日
33. 大友康平、多光子顕微鏡の時間・空間分解能向上、理研シンポジウム:最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン 2017-, 仙台, 2014 年 5 月 1 日
34. 大友康平, 「新規レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いた生体内微細構造の可視化」日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会, 千葉, 2014 年 5 月 12 日.
35. 大友康平, 「多光子顕微鏡の時間・空間分解能向上」, 理研シンポジウム:最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン 2017-, 仙台, 2014 年 5 月 1 日.
36. 今村 健志, 骨微小環境におけるがん細胞と宿主細胞の相互作用、第 87 回日本内分泌

- 学会学術総会、福岡サンパレス、2014年4月26日
37. 今村 健志、蛍光生体 4D イメージングが拓く新たな形態学、第 103 回日本病理学会総会、広島国際会議場、2014 年 4 月 25 日
  38. 大友康平、小林健太郎、松尾保孝、根本知己、「北大ニコンイメージングセンターの活動報告」、全国大学等バイオイメージング連携体制の今後のあり方を考える会、基礎生物学研究所(岡崎市),2014 年 3 月 5 日
  39. 根本知己, 日比輝正, 川上良介、大友康平「新規レーザーや光技術を用いた多光子顕微鏡の高性能化」8th NIBB バイオイメージングフォーラム, 基礎生物学研究所(岡崎市)、2014 年 3 月 4 日
  40. 根本知己 「多光子顕微鏡の基礎と応用」蛍光生体イメージングワークショップ、東京大学医科学研究所 (東京都)、2014 年 1 月 30 日
  41. 今村 健志、蛍光イメージング技術が拓く先端がん研究と未来医療、平成 25 年度愛媛医学会総会、日本医師会生涯教育講座、愛媛県医師会館、2014 年 1 月 26 日
  42. 今村 健志、生体光イメージング技術が拓く次世代がん・シグナル伝達研究、文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「修飾シグナル病」第 3 回公開シンポジウム シグナル伝達解析技術と数理モデルの最先端、東京大学医科学研究所、2014 年 1 月 25 日
  43. 村田隆、大友康平、日比輝正、川上良介、中山博史、根本知己:「2 光子スピニングディスク顕微鏡を用いた植物紡錘体構築機構の解析」、物質・デバイス領域共同研究拠点、特定課題 B-1「生体ナノシステムの動作原理に基づいた新規バイオナノデバイスの創成と医学研究への展開」公開シンポジウム、北海道大学電子科学研究所(札幌市) (2014 年 01 月 24 日)
  44. 村田隆、大友康平、日比輝正、川上良介、中山博史、根本知己「2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡による紡錘体形成の 3D ライブイメージング」特定課題 B-1「生体ナノシステムの動作原理に基づいた新規バイオナノデバイスの創成と医学研究への展開」公開シンポジウム、北海道大学電子科学研究所(札幌市) (2014 年 01 月 23 日)
  45. 米丸泰央、山中真仁、小澤祐市、日比輝正、川上良介、佐藤俊一、根本知己、藤田克昌、「飽和励起 Higher-order Radially Polarized (HRP)ビーム照明による超解像蛍光イメージング」特定課題 B-1「生体ナノシステムの動作原理に基づいた新規バイオナノデバイスの創成と医学研究への展開」公開シンポジウム、北海道大学電子科学研究所(札幌市) (2014 年 01 月 23 日)
  46. 亀井保博、野中茂紀、永井健治、中野雅裕、北野健、奥山輝大、竹内秀明、横山仁(、林真一、川住愛子、林利憲、服部雅之、玉田洋介、村田隆、早野裕、大屋真、根本知己「生体内の単一細胞温度制御計測システムの開発」特定課題 B-1「生体ナノシステムの動作原理に基づいた新規バイオナノデバイスの創成と医学研究への展開」公開シンポジウム、北海道大学電子科学研究所(札幌市) (2014 年 01 月 23 日)
  47. Ji-Won Lee、「CXCL2 produced by oral squamous cell carcinoma stimulates osteoclastogenesis, involving in cancer-associated bone destruction」、第6回しまなみ骨関節フォーラム(受賞講演)  
大和屋本店(松山市)、2013 年 12 月 12 日
  48. 大嶋佑介、「種々のバイオイメージング技術の構築について」、第 11 回医用分光学研究会「診断画像構築と増感治療開発の基礎技術としての医用分光」、三国観光ホテル(福井県)、2013 年 12 月 7 日
  49. Yusuke Oshima, Takashi Katagiri, Yuji Matsuura, Atsuhiko Hikita and Takeshi Imamura, “Development of nonlinear optical imaging technique for medical applications by the new optical devises,” 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ 異分野連携が拓く新規光学デバイスを駆使したバイオイメージングと 医療応用への展開 演題番号:『3AW2-6』ポートピアホテル(兵庫県、2013 年 12 月 5 日)
  50. 飯村忠浩「蛍光 3 次元計測で見る骨細胞のヘテロジェニティ」第 7 回 骨・軟骨フロンティア(BCF) ベルサール八重洲、東京 2013 年 11 月 30 日
  51. 今村 健志、生体蛍光イメージングの技術革新が拓く次世代がん研究・医療、第 23 回阪大医療組織工学フォーラム、大阪大学吹田キャンパス、2013 年 11 月 26 日

52. 今村 健志、生体蛍光イメージングの医学研究・医療応用、第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、かごしま県民交流センター、2013 年 11 月 9 日
53. 疋田温彦、大嶋佑介、今村健志、「骨髄における冬眠がん細胞イメージング系の確立」第 4 回 Orthopedic research Club、かずさアーク、2013 年 11 月 9 日
54. 今村健志、革新的蛍光イメージングが拓く新たながんモデル研究、第 7 回 In vivo 実験医学シンポジウム がん疾患モデルを用いた発がん解明とがん医療への展開、学士会館、2013 年 11 月 7 日
55. 根本知己「新規レーザー光技術を用いた 2 光子顕微鏡の空間分解能、深部到達性の向上」、日本生物物理学会第 51 回年会、京都国際会館、2013 年 10 月 30 日
56. 野中茂紀「光シート顕微鏡 DSLM の原理と特徴、アメーバ細胞運動への応用」日本原生動物学会若手の会のシンポジウム(第 46 回日本原生動物学会大会サテライトシンポジウム)、広島大学(広島県東広島市)2013 年 10 月 8 日
57. 今村 健志、がん研究における生体蛍光イメージング技術の新機軸、第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2013 年 10 月 5 日
58. Atsuhiko Hikita, Takeshi Imamura, “Multiphoton Fluorescence imaging of the cell cycle progression of cancer cells in the bone marrow”, The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Symposium 2: New development of imaging technique in cancer research, 横浜, 2013 年 10 月 4 日
59. 野中茂紀「Application of light-sheet microscopy on developmental and cell biology」第 3 回岡山医療教育・研究国際シンポジウム、岡山大学創立 50 周年記念館(岡山市)2013 年 9 月 23 日
60. 今村 健志、生体蛍光イメージング技術が拓く次世代骨研究戦略、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山コンベンションセンター、2013 年 9 月 21 日
61. 大嶋佑介、疋田温彦、今村健志「ラマン分光法を用いたがん細胞の無染色イメージング技術の開発」第 86 回日本生化学会大会 シンポジウム「がんと免疫の蛍光イメージング最前線」2S17p-5, パシフィコ横浜(神奈川県)、2013 年 9 月 12 日
62. 出口友則、磯貝純夫、「小型魚類を用いたリンパ管研究の取り組み」、第 3 回リンパ学に関する松本カンファランス(日本リンパ学会)、松本、2013 年 8 月 23 日
63. 大嶋佑介、本蔵直樹、疋田温彦、今村健志「In vivo イメージングのための非線形光学顕微鏡の開発と医療応用」第 39 回レーザー顕微鏡研究会講演会 シンポジウム「新規光源を用いた顕微鏡」、理化学研究所 和光本所(埼玉県)、2013 年 7 月 31 日
64. 野中茂紀「高パルスエネルギーファイバーレーザーを用いた広視野 2 光子光シート顕微鏡の開発」レーザー顕微鏡研究会(SLM-39)、理化学研究所(埼玉県和光市)、2013 年 7 月 31 日
65. 根本知己「多光子イメージングの基礎」、平成 24 年度新学術「第 2 回生体蛍光イメージング講習会」、愛媛大学医学部(東温市)、2013 年 7 月 23 日
66. 疋田温彦、大嶋佑介、今村健志、「骨髄内がん細胞の蛍光イメージング」第 33 回日本骨形態計測学会 シンポジウム 2「先進光イメージングと骨形態研究の最前線」アクトシティ浜松コンgresセンター、2013 年 7 月 5 日
67. 大嶋佑介、疋田温彦、今村健志「ラマン分光法・非線形光学イメージングによる骨基質の分子計測」第 33 回日本骨形態計測学会、アクトシティ浜松(静岡県)、2013 年 7 月 5 日
68. 成瀬 清、モデル生物としてのメダカの特徴とメダカナショナルバイオリソースプロジェクト、イメージング解析と医療への挑戦 日本サイトメトリー学会 2013 年 6 月 22-23 日
69. 今村 健志、革新的蛍光イメージングが拓く新たながん研究とがん医療 CREST「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」領域・さきがけ「光の利用と物質材料・生命機能」領域 合同シンポジウム「進化する光イメージング技術～百聞は一見に如かず～」、東京大学 弥生講堂・一条ホール、2013 年 6 月 20 日
70. 根本知己、「新規光技術を用いた "in vivo" 2 光子顕微鏡法の深部化と超解像化」第 15 回神経科学コアセンターセミナー、東北大学医学部(仙台市)、2013 年 5 月 31 日
71. 野中茂紀「What is the best microscope for developmental biologists?」第 46 回日本

- 発生生物学会大会 WS、くにびきメッセ(島根県松江市)2013年5月28日
72. 今村健志、生体蛍光イメージング技術が拓く次世代がん研究・がん医療、第7回臨床研究セミナー、がん研有明病院、2013年5月27日
  73. 根本知己、「新しい光学技術を用いた2光子顕微鏡法によるin vivoイメージングの深部化と超解像化」、ITbMセミナー、名古屋大学理学部(名古屋市)、2013年5月23日
  74. 今村健志、生体蛍光イメージング技術革新が拓く次世代のがん研究・がん医療、第27回北斗最新医療セミナー、社会医療法人北斗北斗病院、2013年4月9日
  75. 根本知己、「多光子顕微鏡の基礎と応用」、蛍光生体イメージングワークショップ、東京大学医科学研究所、2012年12月14日
  76. 今村健志、「生体光イメージング技術が拓く次世代研究戦略」、長崎心血管代謝セミナー、長崎大学病院、2012年12月14日
  77. Shigenori Nonaka、「Light-sheet microscopy for visualizing whole living organisms」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡市)、2012年12月11日
  78. 川上良介、日比輝正、根本知己、「Recent development and problems of in vivo two-photon microscopy for deep imaging of mouse brain」、BME2012、2012年12月5日-8日
  79. 成瀬 清、第3期NBRP開始記念 ナショナルバイオリソースプロジェクトシンポジウム-第3期の挑戦-「メダカ完全長 cDNA クローンの大規模塩基配列決定とゲノム機能解析」、2012年11月21日
  80. 根本知己、多光子励起過程を用いた顕微鏡の原理と応用、第2回TRCセミナー:バイオイメージングの最前線、愛媛大学医学部、2012年9月13日
  81. 根本知己「多光子励起過程を用いた顕微鏡の原理と応用」、第2回TRCセミナー「バイオイメージングの最前線」、愛媛大学医学部、2012年9月13日
  82. 今村健志、教育演題「がんと骨代謝研究における生体イメージングの進歩」、第12回日本内分泌学会四国支部学術集会、愛媛県医師会館、2012年9月9日
  83. 今村健志、生体蛍光イメージングのがん研究への応用、第23回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、東京医科歯科大学、2012年8月31日
  84. 今村健志、光技術を駆使した血管研究、第9回日本病理学会カンファレンス、ホテル ニュータナカ、2012年8月3日
  85. 今村健志、最新の光イメージング技術のがん研究への応用、第37回組織細胞化学講習会、高槻現代劇場中ホール、2012年8月2日
  86. 根本知己、多光子イメージングの基礎と応用、第2回生体蛍光イメージング講習会、愛媛大学医学部、2012年7月24日
  87. 根本知己、「多光子イメージングの基礎と応用」、平成24年度新学術「第2回生体蛍光イメージング講習会」、愛媛大学医学部、2012年7月24日-27日
  88. 今村健志、MTE3 イメージング、第30回日本骨代謝学会学術集会、京王プラザホテル、2012年7月19日
  89. 根本知己、多光子レーザー顕微鏡を用いた生体イメージングの基礎と応用、感染研・学友会共催セミナー、国立感染症研究所、2012年7月13日
  90. 根本知己、特別講義「2光子顕微鏡による細胞の微細形態と生理機能の可視化解析」、北海道大学医学研究科大学院講義:医学研究法 I:解剖学研究技法、北海道大学医学部、2012年6月18日
  91. 根本知己、「2光子顕微鏡による細胞の微細形態と生理機能の可視化解析」、北海道大学医学部、2012年6月18日
  92. Shigenori Nonaka、Live imaging of the whole mouse embryo during gastrulation、第44回発生生物学会、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2012年5月19日
  93. 今村健志、新規 intravital 蛍光イメージングシステムの開発と硬組織研究への応用、公益財団法人 日本顕微鏡学会第68回学術講演会、つくば国際会議場、2012年5月14日

日-16日

94. 大嶋佑介、in vivo イメージングのための顕微鏡製作と応用、第4回イメージングワークショップ、東京理科大学理学部、2012年4月4日
95. 野中茂紀、光シート型顕微鏡によるマウス原腸陥入胚のライブイメージング、第1回伊香保BSの会、群馬大学医学部(群馬県前橋市)、2012年3月15日
96. 根本知己、日比輝正、川上良介、一本嶋佐理、青柳佑佳、澤田和明、2光子顕微鏡によるイメージング技術の高度化、第1回伊香保BSの会、群馬大学医学部、群馬県前橋市、2012年3月15日
97. 根本知己、二光子顕微鏡を用いた生体イメージングの基礎と応用、第11回再生医学分野公開セミナー(第17回分子研セミナー)、名古屋市立大学医学部、2012年3月8日
98. 大嶋佑介、野中茂紀、根本知己、佐瀬一郎、今村健志、生体深部 in vivo イメージングのための多光子顕微鏡の新規開発と無染色イメージング技術の新展開、画像科学シンポジウム(第2回)・バイオイメージングフォーラム(第6回)、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター、2012年3月4日-9日
99. 根本知己、多光子励起過程を用いた生体機能のイメージング、平成23年度物質・デバイス領域共同研究拠点特定研究[A-1] 公開ワークショップ「量子もつれ光を用いた、新しい物質・材料・生命研究の創成」、大阪大学産業科学研究所、2012年2月24日
100. 野中茂紀、マウス原始外胚葉における核エレベータ運動(INM)の解析、自然科学研究機構国際拠点形成プロジェクト脳神経情報の階層的的研究」シンポジウム、岡崎統合バイオサイエンスセンター(愛知県岡崎市)、2012年2月15日
101. 日比輝正、根本知己、新規超解像顕微鏡の開発と医学研究への応用、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月14日
102. 本蔵直樹、今村健志「長帯域多光子励起顕微鏡を用いた深部生体イメージング」、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月14日
103. 野中茂紀、光シート型顕微鏡によるマウス全胚のライブイメージング、生理学研究所研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」、岡崎統合バイオサイエンスセンター(愛知県岡崎市)、2011年11月30日
104. 野中茂紀、光シート型顕微鏡による原腸陥入期マウス全胚のライブイメージング、「理論と実験」研究会2011、広島大学理学部(広島県東広島市)、2011年10月8日
105. 今村健志、In vivo optical imaging of bone metastasis、第70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、2011年10月4日
106. 今村健志、がんの生体光イメージング、平成23年度生理学研究所研究会神経活動の光操作(行動制御への応用)、自然科学研究機構岡崎カンファレンスセンター、2011年9月29日
107. 根本知己、2光子励起法による組織内イメージング、早稲田大学理工学術院先進理工学部生命医科学科講演会、早稲田大学先端生命医科学センター、2011年9月8日
108. 野中茂紀、“光シート顕微鏡 DSLM によるマウス全胚イメージングと新しい顕微鏡の試み”、静岡大学工学部プロジェクト第6回 CREST 研究会「生体観察のための高機能光学顕微鏡」、静岡大学工学部(静岡県浜松市)、2011年9月6日
109. 根本知己、2光子顕微鏡の原理と応用、平成23年度新学術「生体蛍光イメージング」講習会、愛媛大学医学部、2011年7月19-21日
110. 今村健志、カレントコンセプト5 骨髄環境と幹細胞研究の最前線光技術を駆使したがん骨髄のイメージング、第29回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場、2011年7月29日
111. 今村健志、がん細胞とがん微小環境の光イメージング、第6回日本分子イメージング学会総会・学術集会、神戸国際展示場、2011年5月27日
112. 野中茂紀、原腸陥入期におけるマウス全胚のライブイメージング、顕微鏡学会第67回学術講演会、福岡国際会議場(福岡市)、2011年5月16日
113. 今村健志、ランチョンセミナー3光技術を駆使した時空間機能形態学、第100回日本病理学会総会、パシフィコ横浜、2011年4月28日

114. 今村健志、シンポジウム I [先端技術、臨床検査への応用] 光イメージング技術が拓くがん検査の新展開、日本臨床検査自動化学会、ANA クラウンプラザホテル 富山、2011 年 4 月 9 日
115. 今村健志、光技術を駆使したがんとその微小環境を繋ぐ機能イメージング、第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会シンポジウム「形態と機能をつなぐイメージング技術」パシフィコ横浜、2011 年 3 月 28-30 日(誌上開催)
116. 野中茂紀、「光シート型顕微鏡によるマウス胚丸ごとイメージング」第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会シンポジウム「形態と機能をつなぐイメージング技術」パシフィコ横浜、2011 年 3 月 28-30 日(誌上開催)
117. 根本知己、光学顕微鏡と光技術の基礎と展開—イントロダクション、第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会シンポジウム「形態と機能をつなぐイメージング技術」、パシフィコ横浜、2011 年 3 月 28-30 日(誌上開催)
118. 根本知己、新しい光技術を用いた 2 光子顕微鏡の原理と展開、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、2010 年 12 月 8 日
119. 今村健志、インビボ光操作と可視化の最前線～光技術を駆使した分子・細胞の機能操作とイメージング～、BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会)、神戸ポートアイランド、2010 年 12 月 8 日
120. 根本知己、in vivo 多光子顕微鏡による細胞生理機能の可視化と今後の展開、駒込病院総合カンファレンス、東京都立駒込病院、2010 年 12 月 3 日
121. 野中茂紀，高尾大輔，市川壮彦「光シート型顕微鏡の今後の課題」定量生物学の会第三回年会、東京、2010 年 11 月 26-28 日
122. 今村健志、発光技術と蛍光技術を駆使した生体イメージング、第 56 回日本病理学会秋期特別総会、西日本総合展示場(北九州)、2010 年 11 月 25 日
123. 根本知己、2 光子顕微鏡法の原理と応用」第 16 回細胞生物学ワークショップ、北海道大学(札幌市)、2010 年 11 月 22 日
124. 根本知己、2 光子顕微鏡を用いた脳機能解析の新たな展開、第 31 回日本レーザー医学会総会、名古屋市、2010 年 11 月 14 日
125. 根本知己、二光子励起顕微鏡(超短光パルスレーザー)を用いた生体深部観察例と超解像イメージングの技術展望、第三回炎症・再生セミナー、アスピオファーマ(株)、2010 年 11 月 5 日
126. 今村健志、生物科学におけるインビボ光イメージング技術の現状と問題点、理研・分子研合同シンポジウム 第 11 回エクストリームフォトニクス研究、独立行政法人理化学研究所、2010 年 10 月 12 日

〈国際〉

1. Takeshi Imamura, "Intravital cancer imaging by multi-photon microscopy, International Symposium on Multi-dimensional fluorescence live imaging of cellular functions and molecular activities", Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, Jan. 26-28, 2015
2. Tomomi Nemoto, Terumasa Hibi, Ryosuke Kawakami, Koichiro Iijima, Kohei Otomo, "Improvement of multi-photon microscopy by utilizing new laser technologies, International Symposium on Multi-dimensional fluorescence live imaging of cellular functions and molecular activities", Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, Jan. 26-28, 2015
3. Otomo, K., Hibi, T. and Nemoto, T., "Improvement of spatial and temporal resolution of two-photon excitation microscopy for biological specimens", Hokkaido University - National Chiao Tung University, Taiwan Joint Symposium on Nano, Photo and Bio Sciences, Sapporo, Japan, September 11, 2014.
4. Tomomi Nemoto, Invited Speaker, "Improvement of penetration depth and resolutions in laser-scanning microscopy", WORKSHOP ON ADVANCED OPTICAL IMAGING, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Jul 25, 2014
5. Kiyoshi Naruse "Aquatic Resource Centers for Human Disease Models" (Session

- chair) The 7<sup>th</sup> Aquatic Models of Human Disease Conference, Austin Texas, USA, 13-18 December, 2014
6. Tomomi Nemoto, "Activity of NIC at Hokkaido university", NIC directors' meeting, Northwestern university, Chicago, USA, May 7, 2014
  7. Kiyoshi Naruse, Takao Sasado, Minoru Tanaka, Yusuke Takehana, Yasuhiro Kamei, Tadashi Sato, Taijun Myosho, Mituru Sakaizumi, Ryo Akashi, and Hitoshi Okamoto. "Current Status of National BioResource Project Medaka", The 2nd Strategical Meeting for Medaka Research, Casa de la Ciencia, Seville Spain, 10-12 April, 2014.
  8. Tomomi Nemoto and Kohei Otomo "Improving in vivo two-photon and confocal microscopy with novel laser technology", Bordeaux University, Bordeaux, France, Mar. 13, 2014
  9. Tomomi Nemoto, "Improvement of multi-photon microscopy for in vivo mouse brain imaging", "Super Resolution Imaging beyond the diffraction limit", IBS, KAST, Korea, 2014年3月27日
  10. Kiyoshi Naruse, Yoshihito Taniguchi, Shinji Kuninaka, Shoji Oda, Minori Shinya, Atsunori Oga, Hiroki Oota, Yoshitaka Kimori, and Yasuhiro Kamei, "Collaborative efforts for the establishment of human disease model using medaka", 1<sup>st</sup> Zebrafish Personalized/Precision Medicine Conference, Tronto, Canada, October 16-18, 2013.
  11. Shinsuke Seki, Seungki Lee, Yoshiko Iwasaki, Tadashi Hiratsuka, Kazunari Kusano, Sumie Endo, Takao Sasado, Goro Yoshizaki and Kiyoshi Naruse, "Cryopreservation of testicular tissues and the re-establishment of the strains from cryopreserved spermatogonial stem cells using surrogate system in medaka", The 4th International Symposium of Oryzias Fish "Biodiversity and Environmental Science of Marine and Fresh Water Fishes" Hasanuddin University, Sulawesi, Indonesia, 9-10 October 2013.
  12. Shinsuke Seki, Seungki Lee, Yoshiko Iwasaki, Tadashi Hiratsuka, Kazunari Kusano, Sumie Endo, Takao Sasado, Goro Yoshizaki, Kiyoshi Naruse "Cryopreservation of testicular tissues and the re-establishment of the strains from cryopreserved spermatogonial stem cells using surrogate system in medaka" 8th European Zebrafish Meeting Barcelona, Spain, 9-13 July 2013.
  13. Tomomi Nemoto, "Development of "in vivo" Multi-Photon Laser Excitation Microscopy for Brain Research", The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, academia sinica (Taipei), Jan. 15, 2013
  14. Takeshi Imamura, "Session :Advanced in vivo fluorescent imaging for cancer research , TGF- $\beta$  Family:Signal Network in Biological Functions", Showa Pharmaceutical University, Oct. 28-30, 2012
  15. Atsuhiko Hikita, "Analysis of the roles of Smurf1/2 during osteoblast differentiation", TGF- $\beta$  meeting 2012 Leiden, Netherland, Aug.29-31, 2012
  16. Mari Sasaki, "Analysis of The Roles of Arkadia during Osteoblast Differentiation", TGF- $\beta$  meeting 2012 Leiden, Netherland, Aug.29-31, 2012
  17. Yutaro Tsubakihara, "In vivo Imaging and manipulation of EMT by optogenetic techniques", TGF- $\beta$  meeting 2012 Leiden, Netherland, Aug. 29-31, 2012
  18. Kiyoshi Naruse, "The NUS/TLL/NIBB joint practical workshop on "Genetics, Genomics and Imaging in Medaka & Zebrafish", National University of Singapore, Singapore, July. 21-Aug. 1 , 2012
  19. Takeshi Imamura, "In vivo optical imaging of cancer and microenvironment" The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling, Tokyo University, Jan. 23, 2012
  20. Takeshi Imamura, "SessionIV:In vivo imaging Advanced in vivo optical imaging for angiogenesis, JSPS-NOW Joint Seminar", Showa Phamaceutical University, Nov. 4, 2011

21. Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, "Development of "in vivo" multi-photon and super-resolution microscopy for elucidation of neural activity", Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria, Oct. 14, 2011
22. Takeshi Imamura, "Session3 Nano-and bio-imaging In vivo optical imaging in cancer research", 12th Chitose International Forum on Photonics Science and Technology, Chitose Institute of Science and Technology, Oct. 14, 2011
23. Nemoto Tomomi, "in vivo" functional imaging of cell physiology by using multi-photon excitation process", ETH seminar, Die Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland, Apr. 21, 2011
24. Tomomi Nemoto, "Potential of "in vivo" two-photon microscopy for physiological and pathological research", RIES-CIS international symposium, Sapporo, Hokkaido University, Jul. 23, 2010
25. Tomomi Nemoto, "in vivo two-photon microscopy and super-resolution imaging utilized by vector beam", 4th International Symposium of Nanomedicine, Okazaki, Japan, Nov. 30, 2010

② 口頭発表 (国内会議 11 件、国際会議 5 件)

〈国内〉

1. Takashi Saitou, Takeshi Imamura, Tadahiro Iimura, "Periodic regulation of Embryonic Body Axis Elongation revealed by Quantitative Live Imaging and Mathematical Modeling", Time in Development, Riken CDB, Kobe, 2015年3月24日
2. Yusuke Oshima, Tadahiro Iimura, Takashi Saitou, Takeshi Imamura, "Changes in chemical composition of bone matrix in ovariectomized (OVX) rats detected by Raman spectroscopy and multivariate analysis," Photonics West 2015 (BiOS2015), Paper 9303-601, San Francisco USA, 7 February 2015 (oral)
3. Shigehiro Koga, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Koichi Sato, Motohira Yoshida, Yuji Yamamoto, Tadahiro Iimura, Yuji Watanabe, Takeshi Imamura, "In vivo detection of cancer cells with immunoconjugated fluorescent probes by macro zoom microscopy and two-photon microscopy" Photonics West 2015 (BiOS2015), Paper 9339-17, San Francisco USA, 9 February 2015 (oral)
4. 大嶋佑介、飯村忠浩、齋藤卓、今村健志、「ラマン分光法による骨粗鬆症ラット骨基質の分子計測」第35回レーザー学会学術講演会、東海大学高輪校舎、2015年1月12日
5. 齋藤卓、今村健志、飯村忠浩、「ゼブラフィッシュの胚発生における確率的細胞周期進行波の観察と定量解析」、定量生物学の会代7回年会、九州大学筑紫キャンパス・筑紫ホール C-cube、2015年1月11日
6. 飯島光一郎、大島太矩人、北村 瞭次、川上良介、根本知己 口頭発表「生体適合材料を活用した、Open Skull 法の改良」第3回ニューロフォトニクス研究会 (レーザー学会第467回研究会)、北海道大学北キャンパス、2014年11月7日
7. 椿原裕太郎、「骨芽細胞分化における Arkadia の機能解析」、第7回瀬戸内フォーラム、ホテル北野プラザ六甲荘、2013年8月17日
8. 青柳 佑佳、川上 良介、長内 尚之、飯島 光一郎、根本 知己、口頭発表「新規透徹剤を用いたマウス固定脳深部の蛍光イメージング」、2012年度 日本生物物理学会北海道支部例会、北海道大学理学部、2013年3月5日
9. 川上良介、生体マウス脳における皮質全層および海馬錐体細胞の超深部 in vivo イメージング」第2回 vivid workshop、石川県加賀市瑠璃光、2012年3月1-3日
10. 大嶋佑介、堀内秀樹、本蔵直樹、疋田温彦、尾形直則、三浦裕正、今村健志、「マウス脊損モデルにおけるフェムト秒ファイバーレーザーを用いたアブレーションと非線形光学を駆使したインビボイメージング」、第33回日本レーザー医学会総会、大阪大学、2012年11月11日
11. 大嶋佑介、佐藤英俊、野中茂紀、ライトシート型顕微鏡によるメダカの in vivo ラマンイメージング、第72回応用物理学会学術講演会、山形大学小白河キャンパス(山形県山形市)、

2011年9月1日

〈国際〉

1. 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", Photonics West 2014, Biomedical Optics (BIOS 2014), Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomeleules, Cells, and Tissues XII, San Francisco, California USA, Feb 3, 2014
2. Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Sari Ipponjima, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto, "Transmissive liquid crystal devices correcting the spherical aberrations in laser scanning microscopy", BiOS, SPIE, , The Moscone Center, San Francisco, California, United States, Feb. 7, 2015
3. Yutaro Tsubakihara, "Arkadia induces ubiquitylation and degradation of Smad6", The 4th International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling" International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA, Jan. 12-13, 2015
4. Takeshi Imamura, " In vivo cancer imaging by multi-photon microscopy ", The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program, TGF- $\beta$  Family Signal Network and Live Imaging, Ehime, Oct. 28-29, 2013
5. Yusuke Oshima, Hideki Horiuchi, Tadanori Ogata, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, and Takeshi Imamura, "In Vivo Imaging and Tissue Ablation for Spinal Cord Injury Model Mice Using Multiphoton Microscopy System with 1045 nm Femtosecond Fiber Laser," Conference on Laser Surgery and Medicine 2013 (CLSM 2013), Yokohama JAPAN, Apr. 25, 2013

③ ポスター発表 (国内会議 30 件、国際会議 45 件)

〈国内〉

1. 齋藤卓、今村健志、飯村忠浩、“ゼブラフィッシュの胚発生における確率的細胞周期進行波の観察と定量解析”、定量生物学の会代7回年会、2015/1/11、九州大学筑紫キャンパス・筑紫ホール C-cube
2. Takashi Saitou, Mayu Sugiyama, Hiroshi Kurokawa, Asako Sakaue-Sawano, Takeshi Imamura, Atsushi Miyawaki, Tadahiro Iimura, "Assimilation of Live Imaging and Mathematical Modeling toward Understanding the Regulatory Mode of G1/S Transition Wave in Zebrafish Developing Notochord", Multi-dimensional fluorescence live imaging of cellular function and molecular activities, 2015/1/26, Kyoto international conference center
3. Takashi Saitou, Takeshi Imamura, Tadahiro Iimura, "Periodic regulation of Embryonic Body Axis Elongation revealed by Quantitative Live Imaging and Mathematical Modeling", Time in Development, 2015/3/24, Riken CDB, Kobe
4. 大嶋佑介、飯村忠浩、齋藤卓、今村健志、「ラマン分光法および多変量解析による骨粗鬆症ラットの骨基質の解析」第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月25日(ポスター)
5. 大島太矩人、飯島光一朗、川上良介、根本知己, "Advances in open-skull surgery for in vivo imaging by biocompatible materials" 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会, 神戸国際会議場 2015年3月21日
6. 北村 瞭次, 澤田和明、川上良介、根本知己, "Evaluation of in vivo two-photon microscopy by imaging of embedded fluorescent beads in mouse brain" 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会, 神戸国際会議場 2015年3月21日
7. 大友康平、日比輝正、根本知己、「新規レーザー走査型顕微鏡を用いた生体内微細構造の可視化」IIRS 創立十周年記念学術講演会、東京大学伊藤国際学術研究センター、2014年11月7日

8. 大友康平、日比輝正、伊藤里紗、一本嶋佐理、根本知己、ポスター発表「スーパーコンティニュウム光を用いた多波長励起分光イメージング」光展開成果発表会、JST 東京本部別館、東京、2014年10月18日
9. 大友康平、日比輝正、小澤祐市、横山弘之、佐藤俊一、根本知己:「透過型液晶デバイスを用いた二光子 STED 顕微鏡の開発」、第一回アライアンス若手研究交流会、東北大学片平さくらホール(仙台市)(2013年11月26日)
10. 川上良介、澤田和明、草間裕太、房宜激、小澤祐市、佐藤俊一、横山弘之、根本知己「高出力利得スイッチングLDベース高機能光源による生体マウス海馬の in vivo 2光子イメージング」2014年第75回応用物理学会秋季学術講演会、北海道大学札幌キャンパス(札幌市)、2014年9月19日
11. 村田隆、大友康平、日比輝正、川上良介、中山博史、野中茂紀、根本知己、長谷部光泰「2光子スピニングディスク顕微鏡による紡錘体形成過程の3Dタイムラプス解析」日本植物形態学会第26回総会・大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)2014年9月11日
12. 伊藤里紗、日比輝正、大友康平、一本嶋佐理、大嶋佑介、今村健志、根本知己「スーパーコンティニュウム光を用いた多色励起高速共焦点顕微鏡法」日本バイオイメージング学会第23回学術講演会、大阪大学吹田キャンパス、2014年9月5日
13. Atshiko Hikita、「Intravital imaging of bone metastasis of breast cancer」、THE 37th NAITO CONFERENCE ON Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences. Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan JULY 18, 2014
14. Yusuke Oshima、「Probe-less molecular imaging for bone metabolism in vivo and in vitro analysis using Raman spectroscopy」、THE 37th NAITO CONFERENCE ON Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences. Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan JULY 18, 2014
15. 國井政孝、吉村信一郎、高橋倫子、小林雅樹、佐藤隆史、川上良介、根本知己、河西晴郎、北村忠弘、佐藤健、原田彰宏、「膜外分泌・内分泌における膜融合関連分子 SNAP23の機能の解明」第66回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂東大寺総合文化センター(奈良市)2014年6月13日
16. 野中茂紀「光シート顕微鏡の発生学・細胞生物学への応用」自然科学研究機構 若手研究者による分野関連系研究プロジェクトシンポジウム、国立天文台(東京都三鷹市)2014年3月24日
17. 長内尚之、青柳佑佳、川上良介、根本知己、[新規透徹剤を用いた高解像度共焦点顕微鏡法による海馬単一神経細胞に沿った樹状突起スパイン形態の可視化]第91回日本生理学会大会、鹿児島大学郡元キャンパス、2014年3月18日
18. 齋藤卓、「ゼブラフィッシュ発生における確率的細胞周期進行パターンの数理解析」、細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング 第4回 Vivid Workshop 石川県加賀市瑠璃光、2014年2月20-22日
19. 齋藤卓、「椎体・椎間板繰り返し構造形成のセルオートマトンモデル」、定量生物学の会 第6回年会、大阪大学、2013年11月23-24日
20. 出口友則、川崎隆史、弓場俊輔、「メダカの発生過程におけるリンパ管と神経の相互作用の解明」、第21回日本血管生物医学会学術集会、千里阪急ホテル(大阪)、2013年9月27日
21. 齋藤卓、「脂質ラフトを介した空間的 Src シグナル制御機構」、理研シンポジウム「最先端光計測とライフサイエンスの近未来—バイオ・ラマン2017—[3]」、愛媛大学医学部 重信キャンパス、2013年8月8日
22. 小泉絢花、日比輝正、高橋信之、坂本智弥、河田 照雄、根本 知己「2光子顕微鏡を用いた脂肪細胞における蛍光タグ付けた GLUT4の可視化」第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月19日、ウインクあいち(名古屋市)
23. 今村健志、日浅陽一、疋田温彦、大嶋佑介「生体深部観察用2光子励起顕微鏡の開発と生体がんイメージング」日本がん分子標的治療学会 第17回学術集会 2013年6月13日(ポスター発表)国立京都国際会館(京都府)

24. 古賀繁宏, 渡部祐司, 日浅陽一, 疋田温彦, 大嶋佑介, 本蔵直樹, 今村健志「新規近赤外蛍光プローブの開発とがんイメージングへの応用」日本がん分子標的治療学会 第17回学術集会 2013年6月13日(ポスター発表)国立京都国際会館(京都府)
25. 青柳佑佳, 川上良介, 根本知己, "Enhancement of penetration depth for laser scanning microscopy in fixed mouse brain", 第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月19日
26. 川上良介, 澤田和明, 佐藤綾耶, 日比輝正, 小澤祐市, 佐藤俊一, 横山弘之, in vivo two-photon microscopy with a 1030nm (high peak power) Picosecond-pulse laser visualizing hippocampal pyramidal neurons in mouse brain、第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月19日
27. 大嶋佑介, 今村健志、「生体の無染色イメージング技術開発と医学応用」、秋季第73回応用物理学会学術講演会(一般, ポスター)、愛媛大学(愛媛県)、2012年9月13日
28. 青柳佑佳, 川上良介, 根本知己, 「新規透徹剤を用いたマウス固定脳におけるレーザー顕微鏡の深部到達性の向上」、日本化学会、第27回生体機能関連化学部会若手フォーラム、北海道大学(札幌)、2012年9月5日
29. 川上良介, 生体マウス脳における皮質全層および海馬錐体細胞の超深部 in vivo イメージング、第1回伊香保 BS の会、群馬大学医学部、2012年3月14-15日
30. 今村健志, 新規補償光学型長波長 2 光子励起顕微鏡の開発とがん研究への応用、第4回文部科学省最先端の光の創成を目指したネットワーク研究拠点プログラムシンポジウム、名古屋キャッスルプラザホテル、2011年11月14日

〈国際〉

1. Kouichirou Iijima, Takuto Oshima Ryoji Kitamura, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, poster: Improved methods of open-skull surgery for in vivo imaging using biocompatible materials, International Symposium on Multi-dimensional fluorescence live imaging of cellular function and molecular activities, Jan. 26-28, Kyoto International Conference Center. Jan. 26-28, 2015
2. T Deguchi, "Interaction between lymphatic vasculature and peripheral nerve during development of medaka", International Symposium of Neurovascular Wiring 2015, Kansai Seminar House, Kyoto, Japan, Jan. 28, 2015
3. Ji-Won Lee, Takeshi Imamura and Tadahiro Iimura, "Super-resolution analysis of cell cycle phase-dependent phosphorylation of Smads", The 4th International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling" International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA, Jan. 12-13, 2015
4. Shin Yamamoto, Atsuhiko Hikita, Yutaro Tsubakihara, Natsuki Matsushita, Sachi Matsushita, Yusuke Oshima, Bunzo Matsuura, Yoichi Hiasa, and Takeshi Imamura, "Analysis of the role of Smurf 1/2 in osteoblast differentiation", The 4th International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling" International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA, Jan. 12-13, 2015
5. Yutaro Tsubakihara, Atsuhiko Hikita, Shin Yamamoto, Natsuki Matsushita, Sachi Matsushita, Masato Tojo, Tomoki Chiba, Keiji Miyazawa, Kohei Miyazono and Takeshi Imamura, "Arkadia induces ubiquitylation and degradation of Smad6", The 4th International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling" International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA, Jan. 12-13, 2015
6. Ryoji Kitamura, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, "Evaluation of in vivo two-photon microscopy by imaging of fluorescent beads in mouse brain", the 15 th RIES-Hokudai international symposium 2014, Hotel Châteraisé Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo, Dec. 16, 2014
7. Takuto Oshima, Koichiro Iijima, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, "New method for open-skull surgery for in vivo imaging using biocompatible materials",

- the 15 th RIES-Hokudai international symposium 2014, Hotel Châteraisé Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo, Dec. 16, 2014
8. Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, poster: “Improvement of spatial and temporal resolution in two-photon excitation Microscopy”, G3 Meeting Japanese Nano-Macro Materials, Devices and System Research Alliance, Kyushu Univ., Fukuoka, Nov. 21, 2014
  9. Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, poster, “Excitation spectral imaging by utilizing supercontinuum laser light source”, G3 Meeting Japanese Nano-Macro Materials, Devices and System Research Alliance, Kyushu Univ., Fukuoka, Nov. 21, 2014
  10. H. Nakayama, K. Otomo, T. Murata, T. Hibi, R. Kawakami, T. Nemoto, “Multipoint multiphoton microscope”, Focus on Microscopy, 2014, University of Sydney, Sydney, Australia, Apr. 15, 2014
  11. K. Otomo, T. Hibi, Y. Kozawa, H. Yokoyama, S. Sato, T. Nemoto, “Development of the stimulated emission depletion microscope using transmission-type liquid crystal devices”, Focus on Microscopy, 2014, University of Sydney, Sydney, Australia, Apr. 14, 2014
  12. T Deguchi, “Anatomy of lymphatic vasculature and peripheral nerves of medaka from the point of view of neurovascular interaction”, IVBM2014 - The 18th International Vascular Biology Meeting, Miyakomesse, Kyoto, Japan, Apr. 14, 2014
  13. A. Tanabe, M. Yokoyama, K. Matsumoto, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Hibi, S. Ipponjima and T. Nemoto, “Adaptive optics device for laser scanning microscopy using liquid crystals”, 9<sup>th</sup> International Conference on Optics-photonics, Itabashi Culture Center, Tokyo, Japan, Feb. 13, 2014
  14. Hisayuki Osanai, Yuka Aoyagi, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, “Visualizing dendritic spine morphologies along single dendrites of hippocampal pyramidal neuron by a high-resolution confocal fluorescent microscopy with a novel clearing reagent”, RIES international symposium 2013, Hotel Châteraisé Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo, Dec. 11, 2013.
  15. Hirota Watanabe, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, (poster) “3D imaging of living mouse kidney with two-photon microscopy”, RIES international symposium 2013, Hotel Châteraisé Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo, Dec. 11, 2013.
  16. Yuka Aoyagi, Ryosuke Kawakami, Hisayuki Osanai, Kouichirou Iijima, Tomomi Nemoto, Poster: “High resolution fluorescence imaging in deep regions of the fixed mouse brain by a novel optical clearing reagent”, Annual meeting of Society of Neuroscience (SFN2013), San Diego convention center, San Diego, CA, USA, 11, Nov. 2013.
  17. Yusuke Oshima, Atsuhiko. Hikita, Takeshi Imamura, “Probe-less optical imaging technique for medical applications based on Raman spectroscopy and nonlinear optics,” TGF- $\beta$  Family: Signal Network and Live Imaging, Matsuyama, Japan, Oct 28-29, 2013
  18. Takashi Saitou, “Spatial regulation of c-*Src* kinase mediated by lipid-rafts”, The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program, TGF- $\beta$  Family Signal Network and Live Imaging, Ehime, Oct 28-29, 2013
  19. Yutaro Tsubakihara, Atsuhiko Hikita, Mari Sasaki, Shim Yamamoto, Natsuki Matsushita, Sachi Mtsushita, Tomoki Chiba, Msayoshi Tojo, Keiji Miyazawa, Kohei Miyazono, Takeshi Imamura “ Role of Arkadia in the Osteoblastic Differentiation ”, The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program, TGF- $\beta$  Family Signal Network and Live Imaging, Ehime, Oct. 28-29, 2013
  20. Shigehiro Koga, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Yuji Watanabe, Takeshi Imamura, “ In vivo cancer imaging by two-photon microscopy ”, The 3rd

- International Symposium by JSPS Core-to-Core Program, TGF- $\beta$  Family Signal Network and Live Imaging, Ehime, Oct. 28-29, 2013
21. Hiroshi Kiyomatsu, "Evaluation of osteoarthritis based on SHG imaging", The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program, TGF- $\beta$  Family Signal Network and Live Imaging, Ehime, Oct. 28-29, 2013
  22. Shin Yamamoto, Atsuhiko Hikita, Yutaro Tsubakihara, Natsuki Matsushita, Sachi Matsushita, Masahiro Narimatsu, Jeffrey L. Wrana, Yusuke Oshima, Bunzo Matsuura, Yoichi Hiasa, Takeshi Imamura, "Analysis of the Roles of Smurf1/2 during Osteoblast Differentiation" The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program, TGF- $\beta$  Family Signal Network and Live Imaging, Ehime, Oct. 28-29, 2013
  23. Terumasa Hibi, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, poster:"Improvement of Two-Photon Microscopy for Biological Researches", G3 international meeting, Academia Sinica, Taipei, Oct. 21, 2013
  24. Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, and Takeshi Imamura, "Real time monitoring for differentiation of primary osteoblast culture by using Raman microscopy," ASBMR 2013 Annual Meeting, Baltimore Convention Center, Baltimore MD, USA, Oct 6, 2013
  25. Hiroshi.Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Atsuhiko.Hikita, Hiromasa Miura, and Takeshi Imamura, "Evaluation of osteoarthritis based on second harmonic generation microscopy," ASBMR 2013 Annual Meeting, Baltimore Convention Center, Baltimore MD, USA, Oct 7, 2013
  26. Takashi Saitou, "Molecular and mathematical approaches to spatial regulation of c-Src kinase through raft-anchored adaptor Cbp", Tumor Biology Seminar, Biomedical Center, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden, Aug 29, 2013
  27. Atsuhiko Hikita, Yutaro Tsubakihara, Mari Sasaki, Naoki Honkura, Yusuke Oshima, Takeshi Imamura, "Establishment of an intravital imaging system for analysis of epithelial to mesenchymal transition during metastasis of cancer" FASEB TGF- $\beta$  superfamily: signaling in development and disease, Steamboat springs, Colorado, USA, July 29, 2013
  28. Yutaro Tsubakihara, Atsuhiko Hikita, Mari Sasaki, Shin Yamamoto, Natsuki Matsushita, Sachi Matsushita, Msayoshi Yojo, Tomoki Chiba, Keiji Miyazawa, Kohei Miyazono, Takeshi Imamura, "Elucidation of the Role of Arkadia in the Differentiation of Osteoblasts " FASEB TGF- $\beta$  superfamily: signaling in development and disease, Steamboat springs, Colorado, USA, July. 29 2013
  29. Hideki Horiuchi, Tadanori Ogata, Tadao Morino, Gotaro Ymaoka, Hiromasa Miura, Atsuhiko Hikita, Yusuke Oshima, Takeshi Imamura, "Evaluation of Injured Axons Using Two-Photon Excited Fluorescence Microscopy after Spinal Cord Contusion Injury in EYFP H-Line Mice," ORS 2013 Annual Meeting, January 26-29, 2013 San Antonio TX
  30. Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto "Optimization of laser illumination in two-photon microscopy for "in vivo" deep imaging in living mouse brain", RIES international symposium 2012, Sapporo, Dec. 11, 2012
  31. Kentarou Kobayashi, Kohei Otomo, Yasutaka Matsuo, Tomomi Nemoto, "Annual Activity Report at Nikon Imaging Center", RIES international symposium 2012, Sapporo, Dec. 11, 2012
  32. Kouichirou Iijima, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, "In vivo imaging of calcium dynamics in cerebellar Purkinje cells using CAG-YC-Nano transgenic mouse", RIES international symposium 2012, Sapporo, Dec. 11, 2012
  33. Yuka Aoyagi, Hisayuki Osanai, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, "Enhancement of penetration depth for microscopic observation in fixed mouse brain by novel optical clearing reagent", RIES international symposium 2012, Sapporo, Dec. 11, 2012

34. Yutaro Tsubakihara, Atsuhiko Hikita, Mari Sasaki, Shin Yamamoto, Natsuki Matsushita, Sachi Matsushita, Masayosji Tojo, Tomoki Chiba, Keiji Miyazawa, Kohei Miyazono and Takeshi Imamura<sup>1</sup>, “Analysis of the Roles of Arkadia in the Differentiation of Osteoblasts”, The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling” Showa Pharmaceutical University Oct. 29-30, 2012
35. Shin Yamamoto, Atsuhiko Hikita, Yutaro Tsubakihara, Natsuki Matsushita, Sachi Matsushita, Masahiro Narimatsu, Jeffrey L. Wrana, Yusuke Oshima, Bunzo Matsuura, Morikazu Onji and Takeshi Imamura, “Analysis of the roles of Smurf1/2 during osteoblast differentiation”, The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling” Showa Pharmaceutical University Oct. 29-30, 2012
36. Yutaro Tsubakihara, Mari Sasaki, Naoki Honkura, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Takeshi Imamura, "In vivo imaging and manipulation of EMT by optogenetic techniques", The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling” Showa Pharmaceutical University Oct. 29-30, 2012
37. Atsuhiko Hikita, “Analysis of the roles of Smurf1/2 during osteoblast differentiation”, TGF- $\beta$  meeting 2012, Leiden, Netherland, Aug.29-31, 2012
38. Mari Sasaki, “Analysis of The Roles of Arkadia during Osteoblast Differentiation”, TGF- $\beta$  meeting 2012, Leiden, Netherland, Aug.29-31, 2012
39. Yutaro Tsubakihara, “In vivo Imaging and manipulation of EMT by optogenetic techniques”, TGF- $\beta$  meeting 2012 Leiden, Netherland, Aug. 29-31, 2012
40. Yusuke Oshima, Hiroko Kajiura-Kobayashi and Shigenori Nonaka, “Multimodal light-sheet microscopy for fluorescence live imaging”, SPIE Photonics West 2012, Moscone Convention Center, Jun. 21-26, 2012
41. Ryosuke KAWAKAMI, Terumasa HIBI, Tomomi NEMOTO “Development of in vivo multi-photon microscopy for elucidation of neural activity with morphological changes in living mouse brain”, 12th RIES-Hokudai International Symposium, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo, Nov. 21-22, 2011
42. erumasa Hibi, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto “Improvement of multi-photon microscopy for deeper-tissue imaging in living mice" 12th RIES-Hokudai International Symposium, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo, Nov. 21-22, 2011
43. T. Ichikawa, P. J. Keller, K. Nakazato, E. H. Stelzer, H. Kobayashi, A. Mochizuki, S. Nonaka, “Live Imaging of Whole Mouse Embryo during Gastrulation.” The ASCB 50th Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA, Dec. 11-15, 2010
44. T. Ichikawa, P.J. Keller, E.H.K. Stelzer, S. Nonaka, “Live imaging of the whole mouse embryo during gastrulation” 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network, Kyoto, Japan, Jun. 20-23, 2010
45. T. Ichikawa, P.J. Keller, E.H.K. Stelzer, S. Nonaka, “Live imaging of the whole mouse embryo” Focus on Microscopy 2010, Shanghai, China, Mar. 28-31, 2010

(4)知財出願

① 国内出願 (2 件)

- 1 発明名称:補償光学素子の設定方法及び顕微鏡  
発明者:松爲久美子 浜田啓作 富岡貞祐 根本知己 日比輝正  
出願日:2013/8/2  
出願番号:特願 2013-160985
2. 発明名称:補償光学素子の設定方法及び顕微鏡  
発明者:今村健志 大嶋佑介 本蔵直樹 佐瀬一郎 浜田啓作  
出願日:2013/8/2  
出願番号:特願 2013-160988

(5)受賞・報道等

① 受賞

1. 根本知己、北海道大学研究総長賞奨励賞、2015年3月16日
2. 大島太矩人、飯島光一郎、川上良介、根本知己、優秀演題賞「Advances in open-skull surgery for in vivo imaging by biocompatible materials」、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会」2015年3月21日
3. 山口和志、クラーク賞、「近赤外超短レーザー光パルスを用いた生体脳深部における神経線維破断」“In-vivo nerve fiber severance within deeper regions in living mouse brain by near-infrared ultra-short laser light pulse”公益財団法人北海道大学クラーク記念財団、2015年2月9日
4. 伊藤里紗、三上賞「スーパーコンティニューム光を用いた多波長励起高速共焦点顕微鏡法」、北海道大学情報科学研究科生命人間科学情報専攻、2015年2月13日
5. Ryoji Kitamura, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, 優秀ポスター賞“Evaluation of in vivo two-photon microscopy by imaging of fluorescent beads in mouse brain”, the 15th RIES-Hokudai international symposium 2014, Hotel Châteraisé Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo, Dec. 16, 2014
6. \*疋田温彦、内藤記念特定研究助成金(ポスター賞)、第37回内藤コンファレンス バイオイメージングがめざすもの、ヒルトンニセコビレッジ(北海道)、2014年7月15日-18日
7. 齋藤卓、第34回日本骨形態計測学会若手研究者賞、第34回日本骨形態計測学会、さっぽろ芸文館(札幌市)、2014年6月14日
8. 古賀繁宏、優秀ポスター賞受賞、The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program, TGF-β Family Signal Network and Live Imaging, 大和屋(愛媛)、2013年10月28-29日
9. 出口友則、優秀ポスター賞受賞、第21回日本血管生物医学会学術集会、千里阪急ホテル(大阪)、2013年9月27日
10. 長内尚之、青柳佑佳、川上良介、根本知己、日本生理学会優秀ポスター賞、「新規透徹剤を用いた高解像度共焦点顕微鏡法による海馬単一神経細胞に沿った樹状突起スパイン形態の可視化」、第91回日本生理学会大会、2014年3月18日
11. 伊藤里紗、日比輝正、大友康平、一本嶋佐理、大嶋祐介、今村健志、根本知己、ベストイメージング賞「スーパーコンティニューム光を用いた多色励起高速共焦点顕微鏡法」、第23回日本バイオイメージング学会学術集会、阪大吹田キャンパス、2011年9月5日

② マスコミ(新聞・TV等)報道

1. ・愛媛新聞3面、「変形性関節症の早期発見へ愛媛大院がマウス実験」2015年3月16日
2. ・愛媛新聞3面、「細胞集団の成長解明へ」、2015年2月16日
3. ・NHK松山ニュース845・いよ×イチ「がん細胞観察へ新たな顕微鏡」、2013年9月20日

4. 本 CREST で開発したがん組織深部観察システムと監修してニコンから販売を開始した
5. 1300 nm 対応2光子励起顕微鏡についてニュースで紹介された。
6. ・愛媛新聞 6 面、「がん細胞 深さ 1 ミリに光」、2013 年 9 月 30 日
7. ・読売新聞 26 面、「細胞分裂 鮮明な撮影成功」、2013 年 7 月 9 日
8. ・日経産業新聞 10 面、「細胞の仕切り形成『ゆりかご』で成長」、2013 年 7 月 2 日
9. ・科学新聞 2 面、「マウス胚の体づくり 高精度に長時間観察」、2013 年 8 月 2 日
10. ・科学新聞(平成 21 年 12 月 4 日)に、第 32 回日本分子生物学会年会でオーガナイズするシンポジウムについての記事が掲載された。
11. ・日経産業新聞 H24. 8.3 10 面 「生体内の分子 光らせて観察」
12. ・科学新聞 H24.8.24 1 面 「標識せずに分子を可視化光シート型のラマン顕微鏡 開発」
13. ・マイナビニュース「NIBB など、マウス発生の左右非対称に関わるカルシウムシグナルを発見」2012 年 2 月 21 日 (web 上)

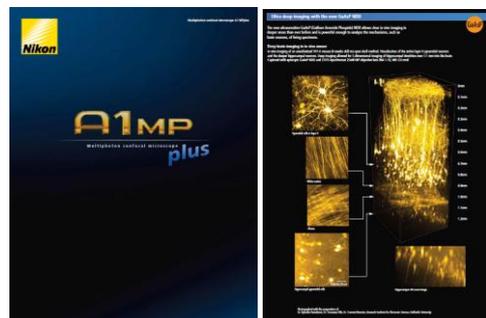
#### (6)成果展開事例

##### ① 実用化に向けての展開

1. ・補償光学の応用・フィードバック制御に対する対策の「補償光学素子の設定方法及び顕微鏡」と「補償光学素子の設定方法及び顕微鏡」の特許 2 件を出願し、さらに「補償光学フィードバック制御」の技術の関する1件の特許化を進めている。
2. ・小型レーザーの開発について、本研究で得られた成果をもとに2光子励起顕微鏡用レーザー開発に必要な情報を企業に提供し、企業にレーザー開発を促した。さらに、すでに企業が開発した小型レーザーを用い、2光子励起イメージングに必要な各種パラメータの条件検討を行って、一部論文発表した。
3. ・将来ヒトに使える新規蛍光有機小分子の開発について、民間企業1社と共同研究を行っている。
4. がん特異抗体に付加可能な新規蛍光有機小分子をスクリーニングし、実際に抗体をラベルし、本研究で得られたシステムを利用し、がん移植モデルでその有用性を明らかにした。

##### ② 社会還元的な展開活動

1. ・本研究の成果であるメダカゲノム編集技術の開発と DSLM によるライブイメージングを中心にした The 8th NIBB International Practical Course (<http://www.nibb.ac.jp/course8/>) を 9 月 22 日-10 月 1 日の日程で開催する。参加はドイツ、バングラデシュ、インド、インドネシア、日本の 5 カ国 16 名の参加が見込まれている。本 CREST はこのコースの後援を行っている。
2. ・研究成果をカタログに掲載得られた成果の一部をニコンの 2 光子レーザー顕微鏡システムのカタログに掲載している(右図カタログを参照)。
3. ・イメージング講習会:これまでに愛媛大学医学部にて4回、東京大学科学研究所にて2回、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「蛍光生体イメージ」領域主催のイメージング講習会を共催し、全国公募から選ばれた若手研究者に2光子励起顕微鏡の実技講習を行った。



## §5 最後に

本研究における機器開発の技術的インパクトおよびそのがん研究応用の科学的インパクトは非常に大きい。具体的には、補償光学に関しては、これまでに、生体標本に対し補償光学素子を利用する場合には対物の焦点位置の変化及び光毒性などを考慮した制御が必要であることを明らかにし、補償光学の応用・フィードバック制御に対する対策の特許化(2件申請済み、1件申請準備中)を進めた。さらに、得られる実画像をフィードバック情報に利用することにより、各標本に合わせた最適化を実現しており、本研究成果の科学的・技術的インパクトは大きい。最近、Focus on Microscopy (FOM)など顕微鏡に関する著名な国際学会において、補償光学の2光子励起顕微鏡応用の演題が増えつつある。ここ数年のFOMでは10題前後の補償光学に関する演題があった。しかし、その内容は*in vitro*実験での検証が多く、本研究課題のように生体でのイメージングを試み、特に、生体標本を対象とした観察(特に深部観察)に焦点を絞っている研究は皆無であり、国内外の類似研究に対して優位性を保っていると考えられる。

一方、長波長化に関しては、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 nmにおいて多光子励起観察を行うに至り、世界で初めて生体マウス移植腫瘍において、0.9 mm、生体マウス脳では1.0 mmの深部イメージングに成功した。また、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ており、本研究成果の科学的・技術的インパクトは大きい。但し、当該分野の競争は激しく、この1-2年で複数の企業が通常の波長領域を超えた超短パルスレーザー搭載2光子励起顕微鏡を提案している。

以上の研究成果が、がんを含めた生命科学研究領域に与える影響は大きい。例えば、日本人の死亡率の1位のがんにおいて最大の課題はがん転移の克服と言っても過言ではないが、生体の中で移動するがん細胞の機能と環境を生きのまま解析することが出来なかった。特に、骨の中の骨髄においては、悪玉であるがん幹細胞が生息していると考えているが、生体でそれを解析する手段が無かった。われわれの研究成果によって、生体深部、特に骨の中のがん細胞を*in vivo*で解析できるようになれば、がん転移のメカニズム研究は規約的に発展し、新たな抗がん剤の開発に弾みがつくと考えられる。実際に、我々は、骨転移初期の骨髄内がん細胞の細胞周期回転は遅く、さらに抗がん剤投与によって増殖期のがん細胞は死滅するが、細胞周期が遅い又は冬眠状態のがん細胞は抗がん剤耐性を持つことを*in vivo*でイメージングすることに成功した。さらに作製した各種Fucci発現がん細胞を応用し、新規抗がん剤開発に役立てることが出来た。これらの成果は、がん研究のみならず、生活習慣病やさまざまな疾患に応用可能で、今後の発展が期待される。

さらに、われわれが新規光源の小型化に成功すれば、非線形光学の医療応用研究に弾みがつく。蛍光イメージングの臨床応用の問題点はプローブのヒトへの応用であるが、われわれは、企業と一緒にヒトに投与可能でがん特異抗体を標識できる新規長波長蛍光有機小分子の開発を行うとともに、SHG、THGた自家蛍光等、プローブを用いないイメージング法についても検討を行い、一部は論文文化を進めている