

織を観察する生体2光子励起顕微鏡観察の手法が、2002年 Miller や Bousso らによって免疫の分野に導入され、主にリンパ節内でのT細胞、B細胞、抗原提示細胞などの相互関係が明らかにされてきた¹⁾²⁾。

このように、生体イメージングは免疫の分野を中心に急速に発展してきたが、硬い石灰質に囲まれた骨組織内部の観察に応用することは困難であった。そこで我々は2009年、2光子励起顕微鏡を駆使して、マウスを生かしたままで骨組織内を観察するイメージング方法を確立させ、骨免疫学の分野にイメージングの手法を導入することに成功した。この手法により、骨組織のリモデリングにかかわる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きを、リアルタイムで観察することが可能となった。我々は特に、骨を破壊・吸収する働きを持つ破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、この前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、種々のケモカインや脂質メディエーター（スフィンゴシン1リン酸）によって動的に調節されていることを明らかにした。本稿では骨イメージングの実際について概説するとともに、その他の組織（リンパ節、皮膚、腸管、その他）での免疫現象を分子イメージングで明らかにする研究手法についても述べたい。

骨組織（骨髄質）に生きた破骨細胞の遊走・位置決めを解析する

破骨前駆細胞に主眼を置いて骨イメージングを行うに当たり、我々はリンパ球の遊走に重要な役割を担っているスフィンゴシン1リン酸（S1P）に着目し、破骨前駆細胞への作用を解析した³⁾⁴⁾。S1Pは主に赤血球や血小板によって作られ循環血液中に豊富に存在する一方で、組織中においてはS1Pを分解するS1Pリアーゼが広く発現することにより

S1P濃度は低く保たれている。このように血液-組織間にはS1Pの濃度勾配が存在する。

我々は、破骨前駆細胞にS1Pに対する受容体（S1PR1）が発現し、*in vitro*でS1Pに対して強い走化性が引き起こされることを見いだした。また、2光子励起顕微鏡を用いて個体内で生きたままの骨組織内部の観察を行ったところ⁵⁾⁶⁾、骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞（CSF1R⁺EGFP⁺またはCX₃CR1⁺EGFP⁺）は定常状態ではほとんど動かなかったが、S1PR1に対する強力なアゴニストであるSEW2871を経静脈的に投与することで活発な動きが認められ、組織から血中へ流れていく様子が観察された（文献⁶⁾の supplementary videos 参照）。

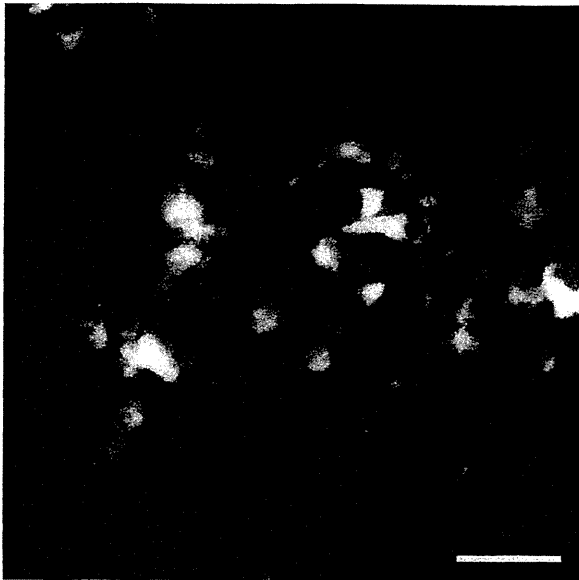
さらに、破骨前駆細胞を含む単球系細胞（CD11b⁺）に特異的にS1PR1を欠損させたマウスを用いて、同様に骨組織内部の生体イメージングを行った。S1PR1を欠損した破骨前駆細胞は骨組織にとどまるため、骨表面の成熟破骨細胞の数が増加し骨吸収が促進されることが分かった。

このように骨組織内の生体イメージングを用いることにより、実際に生体内で単球系の破骨前駆細胞が血液中から流れて骨表面にたどり着き、一部は破骨細胞に分化し、あるものはS1Pの濃度勾配を利用して血液中に再循環するという一連の流れを可視化することが可能となった。また本研究は、破骨前駆細胞が最終分化を遂げる骨へと遊走・位置決めを行うシステムが、破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新概念を提唱するものである。

骨組織（骨髄質）に生きた破骨細胞の遊走・位置決めを解析する

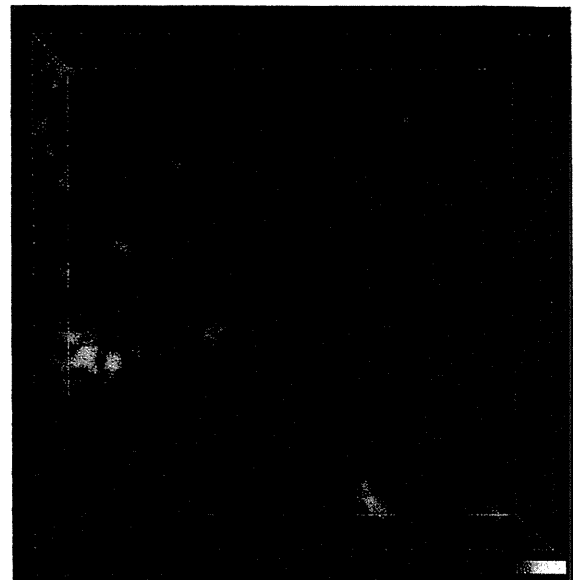
免疫の分野でもリンパ節のイメージングの研究は早く、2002年 Miller や Bousso らによって精力的に明らかにされてきた¹⁾²⁾。彼ら

図1 骨組織（骨髄内）の生体イメージング



単球系細胞が緑色蛍光（GFP）を発現している遺伝子改変マウスを用いて、骨髄腔を生体2光子励起顕微鏡で観察した像である。赤色蛍光（Texas Red）を結合させた高分子デキストランをマウスの尾静脈より注射し、骨髄腔内の血管網を描出している。青色は骨組織を表す。スケールバー：30 μ m

図2 リンパ節の生体イメージング



マウスのリンパ節の生体2光子励起顕微鏡による観察像。体外にてそれぞれ異なるT細胞を赤色および青色、また樹状細胞を緑色にそれぞれラベルしてマウスの体内に戻し、リンパ節内での動きを観察している。各細胞は激しく動き回りながらも、お互いにコンタクトし合っている様子が観察される。

図3 皮膚の生体イメージング



好中球が緑色蛍光（GFP）を発現している遺伝子改変マウスを用いて、耳の皮膚を生体2光子励起顕微鏡で観察した像である。血管は図1と同様、Texas Red を結合させた高分子デキストランで可視化している。観察部位にリポ多糖（LPS）刺激を加え、30分経過したところ、図のように多くの好中球が血管内に動員され、一部が漏出して皮膚組織内へ侵入していることが分かる。

はリンパ節を生体内で、あるいは外に取り出した還流装置の中で観察することにより、リンパ節内でのT細胞、B細胞、抗原提示細胞の関係を明らかにしてきた。2005年 Dustinらは、リンパ節内での抗原特異的な CD4⁺

T細胞と樹状細胞との相互関係が、そこに制御性T細胞を加えることで変わることを、イメージングの手法を用いて評価している⁷⁾。2006年 Bluestoneらは、糖尿病発症モデルマウスの腭頭部リンパ節を用いて、制御性T

細胞が抗原特異的な CD4⁺ ヘルパー T 細胞を抑制していることを、イメージングの手法を用いて示した⁸⁾。また 2007 年 Amigorena のグループは、マウス腫瘍モデルを用いて細胞障害性 T 細胞が腫瘍を殺傷することをイメージングの手法で示している⁹⁾。リンパ節は 1 つの閉鎖空間を形成しており、還流装置の中で観察できるという利点があり、炎症が生じている患部の所属リンパ節を取り出して観察することにより、実際の病変部での免疫現象を可視化することが可能である。

皮膚の免疫イメージング (図 3)

皮膚は低侵襲でアプローチがしやすく、比較的浅い部位に観察したい対象物が存在すること、時間経過を追って何度も観察が可能であるという利点から、しばしばイメージングの対象とされている。1994 年に Mayrovits らは、耳の皮膚を用いて白血球のローリング現象を観察した¹⁰⁾。また、皮膚に刺激物質を塗布することによって炎症を惹起し、免疫現象を観察する手法も頻用されている。

腸管の免疫イメージング (図 4)

腸管はアプローチが難しく、また蠕動運動を伴っていることから、経時的な観測が難しい。当科では炎症性腸疾患モデルを用いて、腸管を生きのまま観察する手法で炎症時の好中球の動きを観測している。その他、脳、眼、関節、腎臓、肝臓、肺、脾臓と多岐に及ぶ臓器の生体イメージングが可能となっており、現在、種々の疾患モデルを用いて解析が行われている¹¹⁻¹⁸⁾。

皮膚・腸管の免疫イメージングの課題

「百聞は一見に如かず」と言われるとおり、イメージングで得られる情報量は非常に多い。しかしその情報を上手に抽出するための解析ソフトの開発は遅れており、自ら解析手法を

生み出さなければいけない。また、イメージングは強力な研究ツールの 1 つであるが、イメージングから得られる画像は解説のない映画であり、監督の独りよがりな解釈で完結させてはならない。その場で何が起きているのか、それは従来からの分子生物学的な手法の手助けを借りて明らかにする必要がある。イメージングが起点となって発展していく研究が今後も増えていくと考えている。

現在の 2 光子励起顕微鏡では表面から 100~200 μm 程度の深度しか観測できず、そのため組織によっては露出するという操作が必要となる。また蛍光標識した分子しか観察できないため、実験動物にしか用いることができない。低侵襲でより深く、また蛍光標識以外の分子が観察可能となるような技術革新が進めば、将来的には人の患部を直接観察することも可能になる時代が来るかもしれない。

文 献

- 1) Miller MJ, et al: Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296: 1869-1873, 2002.
- 2) Bousso P, et al: Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296: 1876-1880, 2002.
- 3) Rosen H, et al: Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5: 560-570, 2005.
- 4) Cyster JG: Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23: 127-159, 2005.
- 5) Germain RN, et al: Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev* 221: 163-181, 2008.
- 6) Ishii M, et al: Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458: 524-528, 2009.

- 7) Shakhar G. et al: Stable T cell–dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity *in vivo*. *Nat Immunol* 6: 707–714. 2005.
- 8) Tang Q. et al: Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7: 83–92. 2006.
- 9) Boissonnas A. et al: *In vivo* imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med* 204: 345–356. 2007.
- 10) Mayrovitz HN: Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol* 262: H157–161. 1992.
- 11) Lehr H A. et al: Stimulation of leukocyte/endothelium interaction by oxidized low–density lipoprotein in hairless mice. Involvement of CD11b/CD18 adhesion receptor complex. *Lab Invest* 68: 388–395. 1993.
- 12) Piccio L. et al: Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P–selectin glycoprotein ligand–1 and heterotrimeric G(i)–linked receptors. *J Immunol* 168: 1940–1949. 2002.
- 13) Becker MD. et al: Digital video–imaging of leukocyte migration in the iris: intravital microscopy in a physiological model during the onset of endotoxin–induced uveitis. *J Immunol Methods* 240: 23–37. 2000.
- 14) Veihelmann A. et al: A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint *in vivo*. *Res Exp Med* 198: 43–54. 1998.
- 15) Buhle C P. et al: The hydronephrotic kidney of the mouse as a tool for intravital microscopy and *in vitro* electrophysiological studies of renin–containing cells. *Lab Invest* 54: 462–472. 1986.
- 16) McCuskey R S. et al: *In vivo* microscopy of the hepatic microvascular system. *Bibl Anat* (18): 73–76. 1979.
- 17) Sikora L. et al: A murine model to study leukocyte rolling and intravascular trafficking in lung microvessels. *Am J Pathol* 162: 2019–2028. 2003.
- 18) Grayson M H. et al: Intravital microscopy comparing T lymphocyte trafficking to the spleen and the mesenteric lymph node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2213–H2226. 2003.

Cellular Dynamics of Bone and Immune Systems Visualized by Intravital Imaging Techniques

Yutaka Shimazu^{1,2}, Junichi Kikuta^{1,2}, Atsuko Kubo^{1,2},
Masaru Ishii^{1,2}

¹ Laboratory of Cellular Dynamics, WPI–Immunology Frontier Research Center,
Osaka University

² Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST),
Japan Science and Technology Agency (JST)

II. 骨代謝研究 UPDATE

蛍光イメージング技術で観察する
破骨前駆細胞のトラフィックキング小谷 真奈斗*¹⁾ 菊田 順一*²⁾ 石井 優*³⁾

単球系の破骨前駆細胞が血中と骨組織との間を出入りしながら、いかにして骨表面に到達するか、また、その遊走がどのように制御されているのかは、長い間不明であった。我々は、二光子励起顕微鏡を駆使して生きたままのマウス骨組織内を可視化することに成功し、破骨前駆細胞の遊走・位置決めがスフィンゴシン1リン酸(S1P)によって動的に制御されていることを解明した。さらに、新規光変換蛍光タンパク質発現マウスを用いることで、生体内で破骨前駆細胞のトラフィックキングを追跡することも可能となった。

本稿では、これらの研究成果に加え、我々が開発した骨のライブイメージングの方法論やその応用について概説する。

Bone and Calcium Update ; Bone Research Update.

Trafficking of osteoclast precursors visualized by intravital imaging technology.

Laboratory of Cellular Dynamics, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, JST, CREST, Japan.

Manato Kotani, Junichi Kikuta, Masaru Ishii

Osteoclasts are 'bone-resorbing' giant polykaryons that differentiate from mononuclear macrophage/monocyte-lineage hematopoietic precursors. However, it has remained unclear how osteoclast precursors migrate into the bone surface and what controls their migratory behaviors *in vivo*. To investigate these questions, we utilized an advanced imaging system for visualizing live bone tissues with intravital multiphoton microscopy that we have recently established. By means of the system we have recently succeeded in visualization of osteoclast precursors in live bones and revealed that sphingosine-1-phosphate (S1P), a lipid mediator, dynamically regulates migration and localization of osteoclasts and their precursors *in vivo*. Here we show the latest data and the detailed methodology of intravital imaging of bone tissues, and also discuss its further application.

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・細胞動態学、科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業

¹⁾(こたに・まなと) ²⁾(きくた・じゅんいち) ³⁾教授(いしい・まさる)

はじめに

破骨細胞は単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞である。破骨前駆細胞は血中と骨組織との間を出入りしながら、必要な時に必要な場所で成熟破骨細胞へと分化し、骨吸収を行っている。これまでの研究成果により、破骨前駆細胞から成熟破骨細胞への分化の過程に関与する分子やシグナルは多数解明されてきた。さらに、破骨細胞およびその前駆細胞のトラフィッキングに関しては、*in vitro*系で、ケモカインやその受容体の遺伝子発現解析、トランスウェル移動アッセイやボイデンチャンパー法を用いた研究が盛んに行われてきた¹⁾²⁾。しかし、これらの方法論は、定量性や高い再現性のあるデータが得られる一方で、生きた骨組織内でも同様の結果が得られるのかについては、これまで明らかにされてこなかった。

硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来、生きたままでの観察が困難であったが、我々は、組織深部の観察が可能な「二光子励起顕微鏡」を駆使して、マウスを生かしたまま骨組織内の細胞動態を観察するイメージング方法を確立した³⁾。この方法を用いると、骨組織のリモデリングに関わる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きをリアルタイムで観察することができる。我々は特に、破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、破骨前駆細胞の骨へのトラフィッキングが脂質メディエーターの一種であるスフィンゴシン1リン酸(S1P)によって動的に制御されていることを解明した。本稿では、これらの研究成果の解説に加えて、新規光変換蛍光タンパク質を用いた破骨前駆細胞の生体内でのトラフィッキング解析、骨組織内の生体二光子励起イメージングの方法論や、二光子励起顕微鏡を用いた今後の応用と将来性について、実際の画像を紹介しながら概説する。

骨組織の生体二光子励起顕微鏡観察

1. 二光子励起顕微鏡はなぜ生きた組織の観察に適しているか？

「蛍光」とは、蛍光分子の基底状態に適当な波長の光を外部から当てて、励起状態を誘発し、これが基底状態に戻る際に放出されるエネルギーの一部が光となる現象である。二光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察（共焦点レーザー顕微鏡も含む）で用いる励起光の半分のエネルギー（2倍の波長）をもったレーザー光を、細かいパルス状に放出したものを励起光源に用いる。二光子励起は、レンズで集約された光子が集まる1点の焦点面にしか起こらないため、非常にクリアな画像が得られ（高い空間解像度）、観察対象となる組織・臓器への光毒性や蛍光の退色もきわめて小さく抑えることができる（低い組織侵襲性）。また、励起光として通常の半分のエネルギー（2倍の波長）の近赤外光（波長が780～1,000 nm）を用いるため、組織の深部まで励起光を到達させることができる（高い組織透過性）。以上の特長から、二光子励起顕微鏡は、「組織・臓器を生かしたまま観察」するためにきわめて有用である⁴⁾⁵⁾。

2. 骨組織内の“生体 (= intravital)” イメージングの実際

骨基質に含まれるリン酸カルシウム結晶は励起光を容易に散乱させるため、二光子励起顕微鏡に用いる近赤外線レーザーを用いても深部まで到達させることは難しい。現在の近赤外線レーザーでは、軟部組織であれば表面から800～1,000 μmまで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150～200 μmが限界である。このため、我々は、骨基質が薄くて骨表面から骨髓腔まで80～120

S1P: sphingosine-1-phosphate (スフィンゴシン1リン酸)

μmで到達できるマウスの頭頂骨を用いて、骨組織内の生体イメージングに取り組んでいる^{31,32}。実際には、麻酔したマウスの頭頂骨の皮膚を切開し、露出させた後、顕微鏡用のステージにマウスを固定して観察する。この方法では、骨髓腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨組織に定着している細胞の動きのみならず、血管から骨髓腔内へ細胞が流入したり、逆に血中へ還流していく様子を観察することができる。さらには、薬剤を尾静脈などから全身投与すると血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。

生体二光子励起イメージングによる破骨前駆細胞の動態解析

1. SIPによる破骨前駆細胞のトラフィック制御

スフィンゴシン 1 リン酸 (SIP) は脂質メディエーターの一種で、免疫系ではT細胞など多様な細胞を遊走させるケモカインとして機能することが知られている^{91,92}。定常状態でのSIPは主に血中の赤血球や血小板によって作られるため、血中に豊富に存在する。その一方、組織中にはSIPを分解する酵素(SIPリアーゼ、SIPホスファターゼなど)が広く発現しており、組織に入ったSIPはすぐに分解されるため、組織中でのSIP濃度は低い。このため、SIPに対する走化性は、基本的には細胞が組織から血中へ移出する際に作用すると考えられており、実際、骨髓腔のSIPの濃度も血管のそれより低くなっている¹¹。この血液と組織とのSIP濃度勾配を考慮すると、何らかの細胞がSIPに対してchemotaxis(走化性)を示すということは、その細胞が組織から血中へと移行する際に必要なシステムであるとも考えられる。

SIP受容体にはSIPR1～SIPR5の5種類が知られており、いずれも三量体G蛋白質共役型受容体である。興味深いことに、SIPは結合する受容体によって、全く異なる作用を発現することが

知られている。例えば、SIPR1にSIPが結合すると、chemotaxisが誘導される。一方、SIPR2にSIPが結合すると、ケモタキシスとは逆の「chemo-repulsion」をもたらす。

次に我々は、破骨前駆細胞がSIPR1とSIPR2を発現していること、*in vitro*でSIPに対して強いchemotaxisが惹起されることを見出した。このSIPに対する細胞遊走が*in vivo*でも見られるかどうかを確認するために、二光子励起顕微鏡を用いて、骨組織内部の生体二光子励起イメージングを行った^{31,32}。

CX₃CR1-EGFP⁺マウスの骨髓腔を生体二光子励起顕微鏡で観察すると、骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺細胞)は、定常状態では骨組織および骨表面付近にとどまり、ほとんど動かなかつたが、SIPR1の機能を促進するSEW2871を経静脈的に投与すると、急速に動きが大きくなり、多くの細胞が骨髓腔から血管へと移行していく様子が観察された(図1;文献3のsupplementary videosを参照)。これにより、*in vivo*の骨組織内でも、破骨前駆細胞は確かにSIPR1アゴニストの投与により、遊走能が亢進することが証明された。また、SIPR2の機能を阻害するJTE013を経静脈的に投与すると、投与前に比較して単球系細胞の動きが大きくなり、血中に戻る細胞が増加する様子が観察された(図2;文献8のsupplementary videosを参照)。つまり、SIPR2によるブレーキが解除されて、破骨前駆細胞が血中のSIPに反応して血管へと移行することを示している。これらの結果から、破骨前駆細胞は相反する機能を示すSIPR1とSIPR2を有し、それらを介してその遊走が制御されていると考えられた。

このように、我々は、生体二光子励起イメージングを用いることにより、生きた破骨前駆細胞のトラフィックを生体内でリアルタイムで解析できるようになった。

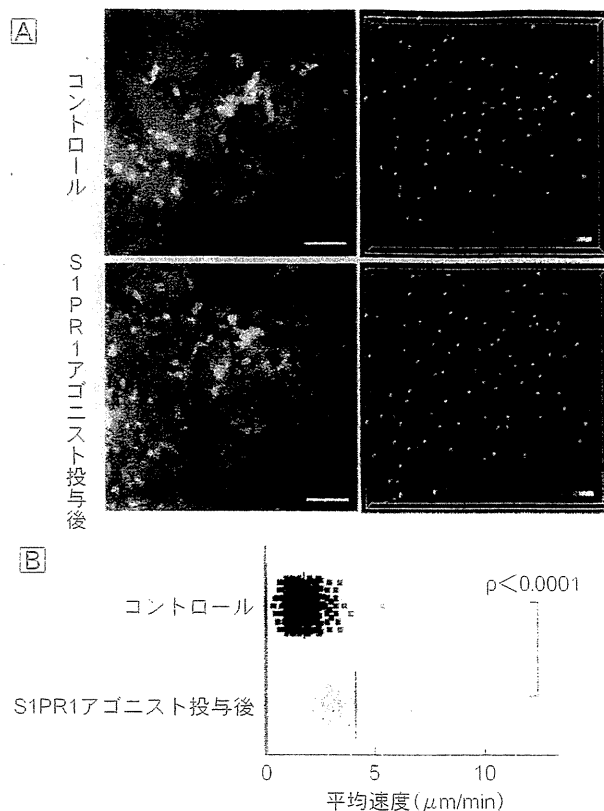


図1 生体二光子励起イメージングによる破骨前駆細胞のトラフィッキング解析

(A) 破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₂CR1⁺) を緑色にラベルしたマウスの骨髄腔の生体二光子励起イメージング。骨髄腔内の血管構造は、赤色蛍光 (Texas Red) を結合させた高分子デキストランを静脈注射して可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する (左)。また、動画解析ソフトを用いて、各細胞を球体に置き換え、軌道を描いて速度を計算している (右)。定常状態では、単球系細胞はほとんど静止しているのに対し (上部2パネル)、S1PR1 アゴニストを投与すると、急速に細胞の運動能が亢進し、血中へ還流していく様子が観察される (下部2パネル)。(スケールバー：50 μm)

(B) 動画解析ソフトによる計測結果。

(文献3より一部改変)

2. 新規光変換蛍光タンパク質 KikGR 発現マウスを用いた破骨前駆細胞の生体内でのトラフィッキング解析

破骨前駆細胞を含む単球系細胞は、リンパ球などとともに免疫システムを構成し、全身を移動し監視を行っている。そして、個々の破骨前駆細胞が、必要な時に骨髄内の的確な場所に移動し、分化・成熟を行うことにより、破骨細胞としての機能を発揮する。したがって、「破骨前駆細胞がいつ

どこにいるのか」という、破骨前駆細胞の時空間的な挙動を明らかにすることがとても重要である。現在、細胞を追跡するには、試験管内で蛍光物質を標識した細胞、もしくは蛍光タンパク質発現マウスから分取してきた細胞を宿主に移入し、一定時間経過後に組織中に含まれる蛍光標識された細胞を、フローサイトメトリーや組織免疫染色を用いて解析するという方法がある。しかし、これらの方法では、*in vitro* の操作が加わるため、移

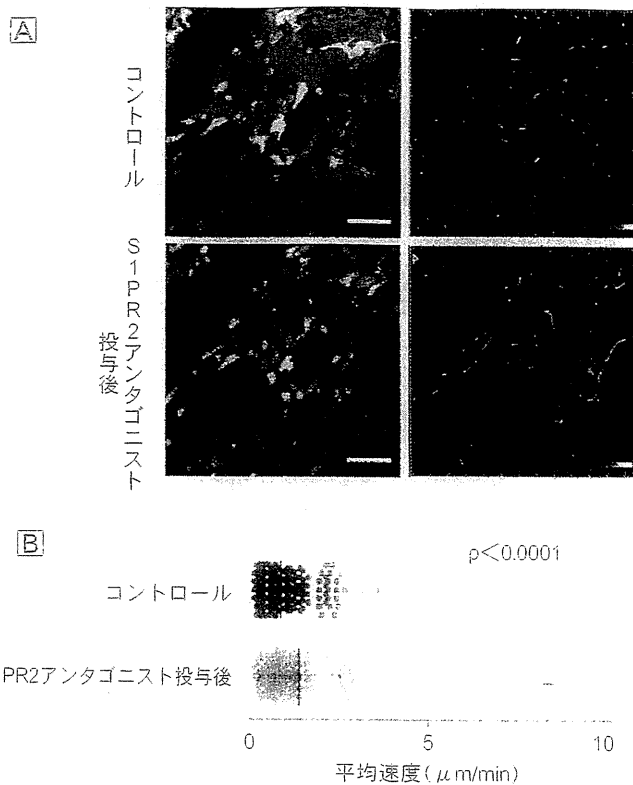


図2 S1PR2による破骨前駆細胞のchemo-repulsion

(A) 破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1⁺)を緑色にラベルしたマウスの骨髄腔の生体二光子励起イメージング。骨髄腔内の血管構造は、赤色蛍光(Texas Red)を結合させた高分子デキストランを静脈注射して可視化している(左)。また、動画解析ソフトを用いて、各細胞を球体に置き換え、軌道を描いて速度を計算している(右)。定常状態では、単球系細胞はほとんど静止しているのに対し(上部2パネル)、S1PR2アンタゴニストを投与すると、急速に細胞の運動能が亢進し、血中へ還流していく様子が観察される(下部2パネル)。(スケールバー: 50 μm)

(B) 動画解析ソフトによる計測結果。

(文献8より一部改変)

入した細胞の性質が変わる可能性があった。さらに、細胞の血中から組織へのホーミングをある程度解析することは可能であるが、細胞が生体内のどこからどこへ移動したのか全体像を把握することは困難であるという問題点があった。

近年の研究により、紫色の光を照射することにより、緑色の蛍光から赤色の蛍光へ光変換を起こす蛍光タンパク質「Kaede」を全身に発現したマウスを用いて、全身レベルでの細胞移動を可視化する

評価系が確立された¹²⁾。我々は、破骨前駆細胞の時空間的な挙動を明らかにするために、Kaedeよりも容易に光変換が可能な蛍光タンパク質「KikGR」¹³⁾を破骨前駆細胞のみに発現させたマウスを作製した。このマウスの脾臓に光照射を行い、血液中を循環している破骨前駆細胞(赤色)と骨髄中に留まっている破骨前駆細胞(緑色)を蛍光色で区別できるようにした。照射2日後に、骨組織切片を作製し、骨髄内に赤色の破骨細胞が存在

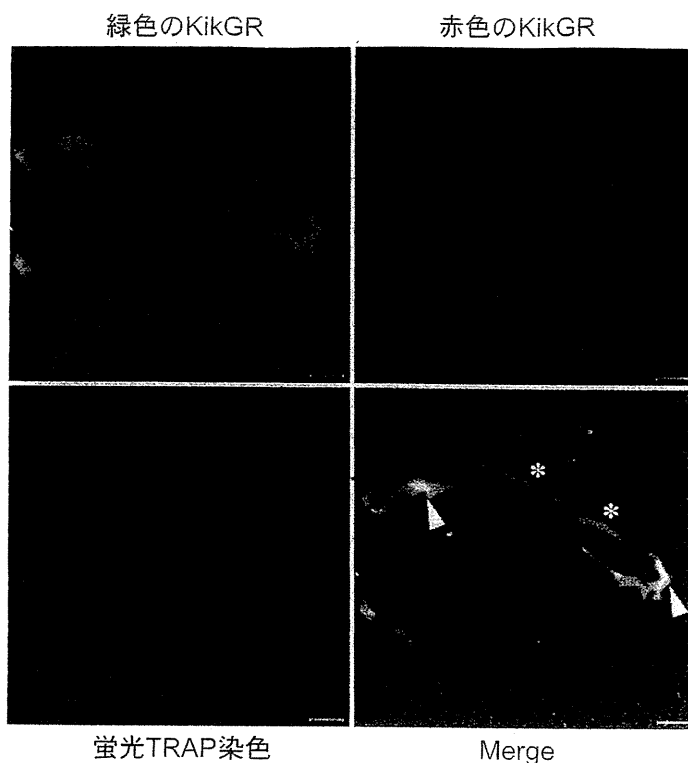


図3 新規光変換蛍光タンパク質発現マウスを用いた生体内での破骨前駆細胞のトラフィッキング解析

KikGRは、紫色の光を照射することにより、蛍光色が緑色から赤色に変わる蛍光タンパク質である。破骨前駆細胞のみ KikGR を発現しているマウスを作製し、そのマウスの脾臓に光照射を行うことで、脾臓中に存在している緑色の破骨前駆細胞を赤色に変換させた。照射2日後に骨組織切片を作製した結果、骨髄由来の破骨細胞 (Merge; アスタリクス) と脾臓から骨髄内に遊走してきた破骨前駆細胞から分化した破骨細胞 (Merge; 矢印) を観察することができた。蛍光 TRAP 染色は、破骨細胞のマーカーである TRAP を示している。(スケールバー: 30 μ m)

(筆者作成)

することを確認した。この結果から、血液中を循環している破骨前駆細胞が、骨髄組織内へホーミングした後に、破骨細胞へ分化し得ることが生体内で証明することができた (図3)。

このように、我々は、蛍光イメージング技術を用いることにより、破骨前駆細胞のトラフィッキングを追跡することが可能となった。今後、このイメージング系を発展させ、生体内における破骨前駆細胞の破骨細胞への分化過程についてさらなる解明に役立てたいと考えている。

今後の展開

～定量的免疫学からシステム免疫学への試み

我々は、生体イメージングから得られた膨大な数値情報を基に、何らかのシステムを再構築していく、いわゆるシステムバイオロジーにも取り組んでいる。例えば、S1Pのケモタキシスについては、S1PR1とS1PR2を介する細胞の動態を追跡して、S1P濃度に応じた細胞の動きのデータをモデル化した。まだ実用には遠い段階であるが、これらのデータを基にシミュレーターを作成し

で、さまざまなケモカイン濃度勾配下での細胞の動きを解明するようなアプローチを試みている。実用化できれば、*in vivo*での細胞のトラフィックキングを追跡して、局所のS1P濃度を推測することも可能になるかもしれない。

おわりに

最近、骨細胞が外界からのメカニカルストレスを感受、応答することで破骨細胞を育て、骨を作り替える司令細胞であることが明らかとなった^{14),15)}。これまで、骨代謝の研究は、破骨細胞と骨芽細胞を中心に行われてきた。ここに、骨細胞が新たなキープレーヤーとして加わった。しかしながら、それぞれの細胞がどのように関わり合って骨のリモデリングを維持しているのか不明な点も多い。そこで、我々が開発した骨組織の生体イメージングの方法論を用いて、生きた骨組織内のさまざまな細胞の「トラフィックキング」のみならず、「機能・分化」、「シグナリング」を観察することにより、骨代謝研究に新たな知見を生み出していきたいと考えている。

文 献

- 1) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, et al : Stromal cell derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* 18 (8) : 1404-1418, 2003.
- 2) Lean JM, Murphy C, Fuller K, et al : CCL9/MIP-1 gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J Cell Biochem* 87 (4) : 383-393, 2002.
- 3) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458 (7237) : 524-528, 2009.
- 4) Denk W, Strickler JH, Webb WW : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248 (4951) : 73-76, 1990.
- 5) Denk W, Svoboda K : Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18 (3) : 351-357, 1997.
- 6) 島津 裕, 石井 優 : 生体2光子励起顕微鏡による骨組織ライブイメージング. *実験医学* 28 (13) : 2147-2153, 2010.
- 7) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al : Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Protocol* 4 (9) : 1305-1312, 2009.
- 8) Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, et al : Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*. *J Exp Med* 207 (13) : 2793-2798, 2010.
- 9) Rosen H, Goetzl EJ : Sphingosine 1-phosphate and its receptors : an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5 (7) : 560-570, 2005.
- 10) Cyster JG : Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23 : 127-159, 2005.
- 11) Maeda Y, Seki N, Sato N, et al : Sphingosine 1-phosphate receptor type 1 regulates egress of mature T cells from mouse bone marrow. *Int Immunol* 22 (6) : 515-525, 2010.
- 12) Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, et al : Monitoring cellular movement *in vivo* with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (31) : 10871-10876, 2008.
- 13) Tsutsui H, Karasawa S, Shimizu H, et al : Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO Rep* 6 (3) : 233-238, 2005.
- 14) Xiong J, Onal M, Jilka R, et al : Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 17 (10) : 1235-1241, 2011.
- 15) Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al : Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17 (10) : 1231-1234, 2011.

4. がん幹細胞と細胞周期の生体イメージング

賀川義規, 森 正樹, 石井 優

がん幹細胞は、主に細胞周期を静止期 (G0/G1) に維持している。このために、現在の化学療法や放射線療法に治療抵抗性を示し再発や転移にかかわっている。このがん幹細胞の細胞周期の制御には間葉系細胞や血管などの微小環境が密接にかかわっており、がん幹細胞と細胞周期の関係を明らかにすることは、がん幹細胞をターゲットとした新規治療を開発するうえで急務である。それゆえ生体内でのがんとその周囲組織を多角的に、かつ時空間的にとらえる生体イメージング技術の重要性が近年増してきている。われわれは、細胞周期をリアルタイムに表すことができるFucciを用いた生体イメージングにより、がん幹細胞と細胞周期を可視化することに挑戦している。

はじめに

がん幹細胞の研究が進み、がんは均一ではなく不均一な細胞集団であることが証明されてきた¹⁾。がん幹細胞を中心とした階層モデルからなるがん組織は、がん細胞だけではなく、その周囲に存在する微小環境の存在の重要性もわかってきた。このため、がん研究ではさまざまな細胞や組織を多角的に解析することが注

目されている²⁾。また、がん幹細胞は細胞周期を静止期に維持することより、増殖能を保持しながらがん組織を維持していると考えられている。このがん幹細胞の機能維持には微小環境 (ニッチ) の相互作用が重視されており、がん研究における *in vivo* イメージングは、生体内でのがんの動態を把握するのに重要な解析ツールとなることが期待されている。なかでも近年、蛍光イメージングは新しい蛍光タンパク質やプローブの開発、顕微鏡技術の向上によりがん研究への応用が進んでいる。特に二光子励起レーザー顕微鏡^{*}を用いた技術の発展は目覚ましく、これを駆使した生きた細

[キーワード&略語]

生体イメージング, 細胞周期の可視化, がん幹細胞, 二光子励起レーザー顕微鏡

EMT: epithelial-mesenchymal transition
(上皮間葉移行)

Fucci: fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator

mAG: monomeric Azami-Green

mKO2: monomeric Kusabira-Orange 2

SP: side population

※ 二光子励起レーザー顕微鏡

エネルギーの低い・長波長のレーザーを使い光子が2個当たるところだけを励起する顕微鏡。そのため焦点が合っていない部分は、組織のダメージが少ない。また、波長の長い近赤外線を励起光として使用するために、サンプル表面から数百 μm の深さまで観察することができる。

Intravital imaging of cell cycle and cancer stem cells

Yoshinori Kagawa¹⁾²⁾/Masaki Mori²⁾/Masaru Ishii¹⁾: Laboratory of Cellular Dynamics, Immunology Frontier Research Center¹⁾/Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University²⁾ (大阪大学免疫学フロンティア研究センター細胞動態学¹⁾/大阪大学大学院医学系研究科外科学講座消化器外科学²⁾)

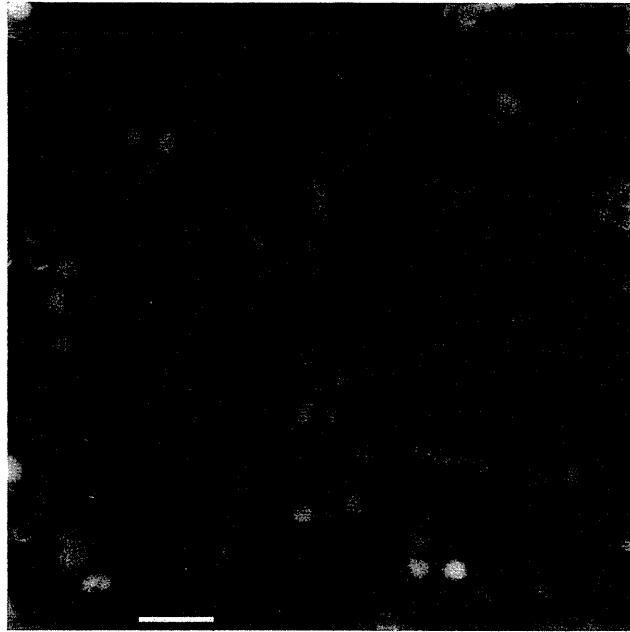


図1 Fucciを遺伝子導入した大腸がん細胞株 (HCT116/Fucci) (巻頭カラー図4参照)
共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察。リアルタイムでそれぞれの細胞周期が観察できる。G1/G0期 (赤), 早期S期 (黄), S/G2/M (緑)。スケールバー=50 μ m (NIKON社 AIRで撮影)

胞の挙動を生体で観察する技術が現在注目を集めている。

本稿ではがん研究のイメージングの種類と特徴について述べるとともに、われわれが取り組んでいるがん細胞の細胞周期とがん幹細胞イメージングの現状と、将来の展望について紹介する。

1 幹細胞と細胞周期

正常幹細胞は、細胞周期を休止期に維持しており、必要に応じて微小環境を変え静止期から活動期に変化することで、分化する細胞を生産し組織の維持に働いている³⁾。正常造血幹細胞の微小環境では骨芽細胞がangiopoietin-1を発現し、幹細胞との細胞間接着を強化し、細胞周期静止期を維持している⁴⁾。造血幹細胞は必要に応じて活性化され、前駆細胞をつくりだす造血のダイナミクスが明らかにされつつある。最近では、標識された造血幹細胞の骨髓内の動きを二光子顕微鏡で時間を追って見るができるようになり、生体内における幹細胞の動態が理解されつつある⁵⁾。

2 がん幹細胞と細胞周期

がん幹細胞は正常幹細胞同様に、がん組織において休止期を維持し、筋線維芽細胞などの微小環境とクロストークを形成することで血管新生を促進し、転移、再発に関与している⁶⁾。この休止期のがん幹細胞も、主に細胞周期をG0/G1に維持しているが、微小環境とのバランスが崩れ増殖が速くなるという仮説が立てられている⁷⁾。

また、肝臓がんにおいては、肝臓がん幹細胞を分離する新規の機能性マーカーであるCD13が同定され、同マーカー陽性細胞が高い腫瘍形成能と自己複製能を有することが報告されている。CD13陽性細胞は細胞周期が静止した状態(G0期)に主に存在しており、多剤耐性を示す分画であるSP (side population) 分画と密接に関連し、高い抗がん剤耐性、放射線耐性を有していた⁸⁾。さらに臨床では、がん幹細胞を分化させると言われているレチノイン酸が使用されている。急性骨髄性白血病において、レチノイン酸による分化誘導を行った後に化学療法を施行することで、約90%の患者を完全寛解することが成功されている⁹⁾。

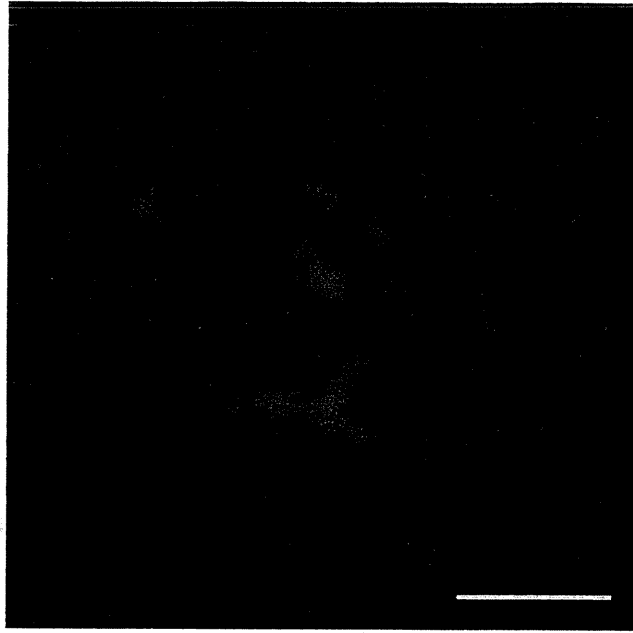


図2 スフェロイド培養したHCT116/Fucci (巻頭カラー図5参照)
非接着性プレートを使用してスフェロイド培養したHCT116を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。G1/G0期 (赤), S/G2/M (緑), スケールバー=50 μ m (NIKON社 AIRで撮影)

このように、がん幹細胞にG0/G1に維持する制御機構があると考えられ、細胞周期をターゲットにした新規治療の研究が進められている¹⁰⁾。

③ 細胞周期の可視化

1) Fucci (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator)

2008年にSakaue-Sawanoらにより細胞周期を可視化できる蛍光タンパク質プローブのFucciが報告された¹⁰⁾。これは、細胞周期の特定の時期に蓄積するタンパク質を蛍光ラベルし、ユビキチン-プロテアソーム系にて分解反応させることでリアルタイムに細胞周期を可視化する画期的な技術である。具体的には、G1期にしか蓄積せずS/G2/Mには存在しないCdt1に赤色の蛍光を発するKusabira-Orange (mKO2) を結合させ、S/G2/Mにしか存在しないGemininにはAzami-Green (mAG) を結合させそれぞれの細胞周期で蛍光を発するように設計された。さらにユビキチンによりそれぞれの蛍光タンパク質を交互に分解させることで細胞周期の可視化に成功したものである(図1)。従来であればBrdUを細胞に取り込ませ固定し、抗体で染色することでしか細胞周期を解析することはできなかつ

た。この技術の開発により生きた細胞の細胞周期をリアルタイムで時空間的に観察できるようになった。細胞周期が可視化できることで、細胞周期を制御するダイナミックなメカニズムの新知見が得られるだけでなく、iPS細胞やがん幹細胞研究への応用が期待されている(図2)。

2) Fucci安定発現株の作製

恒常的にFucciの2つの蛍光タンパク質(mKO2, mAG)が発現する細胞株を樹立するために、われわれはレンチウイルスを用いて遺伝子導入している。遺伝子導入後に、より発現が安定しているものを選択するために、FACSソーティングを用いて、mKO2, mAGが一定以上発しているものを選択してくる。ソーティング後に継代し、同様のことを数回くり返し選択することでFucci安定発現株を樹立している。最終的に、HoechstなどでDNAを染色しFACSを用いた細胞周期解析を行い、mKO2とmAGの発現が細胞周期と一致することを確認する。

④ がん細胞のイメージング

1) タイムラプスイメージング (*in vitro*)

*in vitro*で生細胞を時間経過を追って観察するタイ

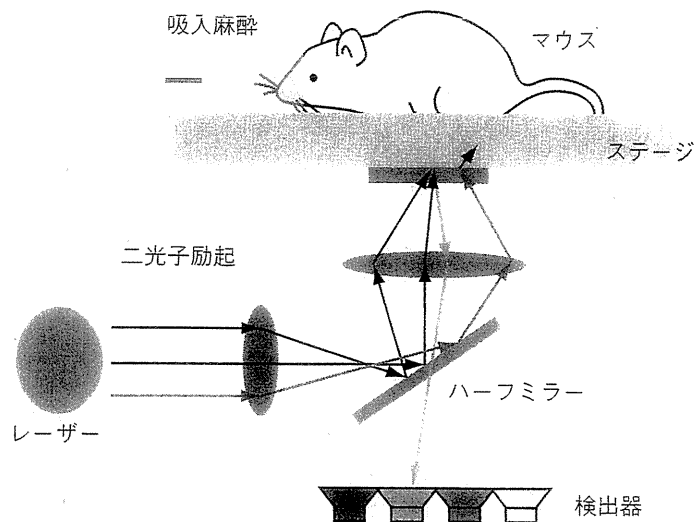


図3 二光子励起レーザー顕微鏡による生体イメージング (巻頭カラー図6参照)
 マウスに麻酔をかけ、循環動態を維持したまま目的臓器を観察する。フェムト秒パルス近赤外線レーザーで励起し、780～950 nmの波長を使用することが多い(文献13より引用)

ムラプスイメージングが盛んに行われている。顕微鏡用インキュベーターを用いて培養下に観察するものである。われわれの施設では、共焦点顕微鏡 (conforcal microscopy) に顕微鏡用インキュベーターをステージに設置し、最大で72時間の観察が可能である。電動ステージを併用することで、1回の実験で多点撮影を行うことができる。細胞の変化をとらえて解析することで個々の細胞の挙動をとらえる。

この方法を用いて、がん細胞の浸潤能を観察するために、wound healing assayやmigration assayなどが行われている。また、細胞周期が観察できるFucciを用いて抗腫瘍薬ががん細胞の細胞周期に及ぼす影響を評価することに応用されている。個々の細胞の細胞周期とその形態変化が直接観察できることから、そのようなアプローチの結果、抗腫瘍薬を付加してがん細胞を培養するとDNAが増えても分裂しない内部複製 (endoreplication) を起こすことが報告された¹¹⁾。また、Fucciは創薬の細胞周期スクリーニングとしての活用も考えられている。さらに化学療法、放射線治療の治療抵抗性とがん幹細胞に関連する研究への応用も期待されている。

2) 生体イメージング (in vivo)

二光子励起レーザー顕微鏡を駆使して行う「生体イメージング (intravital imaging)」は、蛍光タンパク

質で目的の細胞をラベルすることで、生体内に存在する多様な細胞の挙動 (遊走・位置決め・機能) をリアルタイムで観察し動画としてとらえることができる新しい技術である。これは、生体内での細胞の作動原理を明らかにすることを目的としており、破骨細胞の骨吸収メカニズムの解明にも使用されている¹²⁾。特に本法では、組織を摘出して観察する方法とは異なり、マウスの循環血流を保ったまま観察し時空間的に生体の現象をとらえられることが最大のメリットである。

i) 観察方法と解析

まず、マウスに吸入麻酔をかけ、観察する部位を外科的に展開する。次に顕微鏡用のステージにマウスを乗せ、体温を保つためにヒーターなどを用いて加温しながら、観察部位をセットする (図3)。そして対物レンズを観察面に設置する。対物レンズは、組織深部の観察が可能な開口数 (NA) が大きく、作動距離が長いものを使用する。二光子励起には、フェムト秒パルス近赤外線レーザーを用い、800～950nmの波長を使用することが多い。水銀灯を用いて蛍光タンパク質を観察しあらかじめ焦点を合わせておき、次に二光子励起レーザーを用いて観察する。目的とする部位のz軸の範囲、撮影間隔、撮影時間を設定して撮影し動画にする。細胞の移動速度、形態の変化、局在部位の変化を客観的に示すために、動画解析ソフトを用いて解析す

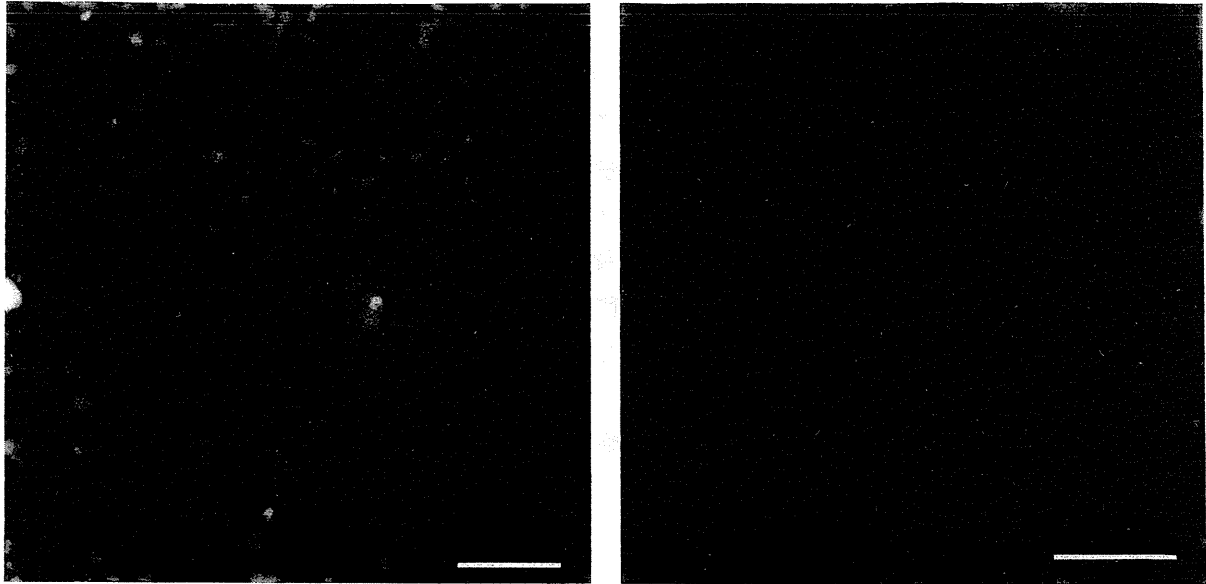


図4 皮下に移植にした大腸がん細胞 (HCT116) (巻頭カラー図7参照)
Fucciを発現する大腸がん細胞を皮下に移植し4週間後に二光子顕微鏡を用いて観察した。二次高調波発生を用いてコラーゲン線維(青)を描出(左)。Qtracker® 655 non-targeted quantum dots (Invitrogen) を使用して腫瘍内の毛細血管(紫)を描出(右)。スケールバー=100 μ m (NIKON社 AIR MPで撮影)

る¹⁴⁾。

ii) がん細胞研究への応用

こうして、がんの増殖と血管新生、浸潤とEMT(上皮間葉移行)など組織を生きのまま観察することにより、がんの生物学的特性を可視化する¹⁵⁾。さらに経時的な変化を解析するためには、循環動態を維持した状態で観察することが必要になっている。生体イメージングの技術を用いれば、生体のがん細胞の挙動と周囲組織を多元的かつ時空間的にとらえることが可能になる。

われわれの研究室では、個体を生きのまま観察することにこだわり、がん細胞に蛍光タンパク質を遺伝子導入し、がん細胞の挙動を「生きのまま」可視化する試みを行っている。具体的には、Fucciを発現する大腸がん細胞をNOD/SCIDマウスの皮下に移植し、その4週間後に生体イメージングで可視化する。二次高調波発生(second harmonic generation)を用いることで、がん組織のコラーゲン線維を青色で観察できる。そして、赤と緑でがん細胞の細胞周期をラベルし、微小血管は蛍光粒子を静注し時空間的に観察する(図4)。組織の表面から約200 μ m深部まで観察可能である。これにより、がん細胞と微小血管の関係が明らかになり、さらにその細胞周期の分布を三次元

で可視化することが可能である(図5)。

3) がん幹細胞の細胞周期の可視化

現在のところがん幹細胞の細胞周期を生体内で可視

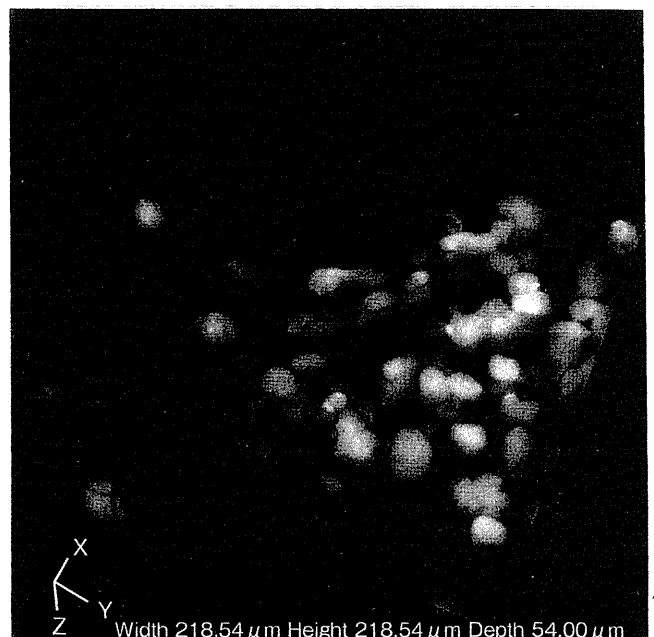


図5 撮影画像の3D化 (巻頭カラー図8参照)
Fucciを発現する大腸がん細胞を皮下に移植し6週間後に二光子顕微鏡を用いて撮影し、3D化し緑(s/G2/M)と赤(G0/G1)の分布を観察。コラーゲン線維(青)近くに赤い細胞が集簇している(NIKON社 AIR MPで撮影)

化した報告はまだない。そこで、細胞周期をリアルタイムで可視化できるFucciのシステムを活用すると、がん幹細胞は赤 (mKO2) の細胞であることが予想される。しかしながら、G0期のみを可視化する蛍光プローブは現在のところ存在せず、FucciのみではG0期の細胞を同定することは困難である。とはいえ、緑 (S/G2/M) と赤 (G0/G1) を浸潤部位や、遠隔転移巣で観察することで、増殖と細胞周期の関係を解析できると考えている。さらにはがん幹細胞マーカーをラベルする蛍光プローブを開発することで生体内での細胞周期とがん幹細胞の関係が明らかになると期待される。

おわりに

生体内のがん幹細胞の挙動を、新しいテクノロジーを用いて可視化 (visualization) する時代に入ろうとしている。従来の組織標本は、二次元 (平面) で観察していたが、二光子励起レーザー顕微鏡により三次元 (立体) で組織や細胞をとらえ、さらに生きたまま観察することで時間軸が加わり四次元 (時空間) として生体内の現象をとらえることが可能になる。四次元で解析することにより、これまでになかった生体内でのがん幹細胞と微小環境のクロストークが明らかになることが期待される。

文献

- 1) Clarke, M. F. et al. : Cancer Res., 66 : 9339-9344, 2006
- 2) Gupta, P. et al. : Nat. Med., 15 : 1010-1012, 2009
- 3) Li, L. & Clevers, H. : Science, 327 : 542, 2010
- 4) Arai, F. et al. : Cell, 118 : 149-161, 2004
- 5) Xie, Y. et al. : Nature, 457 : 97-101, 2008
- 6) Aguirre-Ghiso, J. A. : Nat. Rev. Cancer, 7 : 834-846, 2007
- 7) Li, L. & Neaves, W. B. : Cancer Res., 66 : 4553-4557, 2006
- 8) Haraguchi, N. et al. : J. Clin. Invest., 120 : 3326-3339, 2010
- 9) Ohno, R. et al. : Leukemia, 17 : 1454-1463, 2003
- 10) Sakaue-Sawano, A. et al. : Cell, 132 : 487-498, 2008
- 11) Sakaue-Sawano, A. et al. : BMC Cell Biol 12 : 2, 2011
- 12) Ishii, M. et al. : Nature, 458 : 524-528, 2009
- 13) 賀川善規ほか : 大腸癌 FRONTIER, 4 : 91-95, 2011
- 14) Klauschen, F. et al. : Nat. Protoc., 4 : 1305-1311, 2009
- 15) Jain, R. & Munn, L. : Nat. Rev. Cancer, 2 : 266-276, 2002

<筆頭著者プロフィール>

賀川義規 : 大阪大学免疫学フロンティア研究センター細胞動態学, および大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学所属。2002年, 富山医科薬科大学医学部医学科卒業。その後, 消化器外科医として臨床で経験を積んだ後, '09年4月, 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学。専門は大腸がんの細胞周期と生体イメージングの研究。

骨組織の生体ライブイメージング

石 井 優

要 旨

「百聞は一見に如かず (Seeing is believing)」というように、「見る」ことは人間の五感の中でも特別な存在感を示しており、視覚に訴える「イメージング」研究の成果には強い説得力がある。近年の顕微鏡・レーザー技術の長足の進歩により、ライフサイエンス分野でのイメージング研究が急速に展開しているが、特に、組織深部の観察が可能で、光毒性が少なく生きた組織の観察に適した「2光子励起イメージング」の登場により、個体・組織を生かしたままで、生きた細胞の動態を観察することが可能となってきた。

本稿では、特に筆者が最近立ち上げた、生きた個体での骨組織・骨髄内の2光子励起イメージングについて、その方法論と今後の応用について解説する。

Key Words : イメージング, 多光子励起顕微鏡, 炎症性骨破壊, 破骨細胞, 細胞ダイナミクス

● なぜ「2光子励起イメージング」なのか

2光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察（共焦点レーザー顕微鏡も含む）で用いる励起光の半分のエネルギー（＝2倍の波長）をもったレーザー光を、短いパルス状に放出したもの（超短パルスレーザー）を励起光源に用いる。パルス状の光子は焦点面で一点に集められ密度が高い状態となり、二光子励起（＝通常（一光子励起）では光子1個で励起する蛍光分子を、光子2個分で励起すること）が起こりうる（図1）。このため、二光子励起顕微鏡の特長として以下の点があげられる。

1. 高い空間（特にz軸）解像度

焦点平面のみでしか励起が起こらない（その他のz軸平面では（励起に必要なエネルギーに満たない）光子が当たっているものの励起には至らない）ため、観察していない部分からの蛍光がない。非観察平面からの蛍光はレンズで結像しない（ピントが合っていない）ので、「ピンボケ」の原因となる。レンズの前に「ピンホール」を置いて、非観察平面からの蛍光シグナルを除去して、ボケのない画像を得るのが「共焦点レーザー顕微鏡（いわゆるコンフォーカル）」である。

2. 高い組織透過性（深部組織の観察に威力を発揮）

複数（通常は2個）の光子を同時に当てて蛍光分子を励起するため、当てる光子1個分のエネ

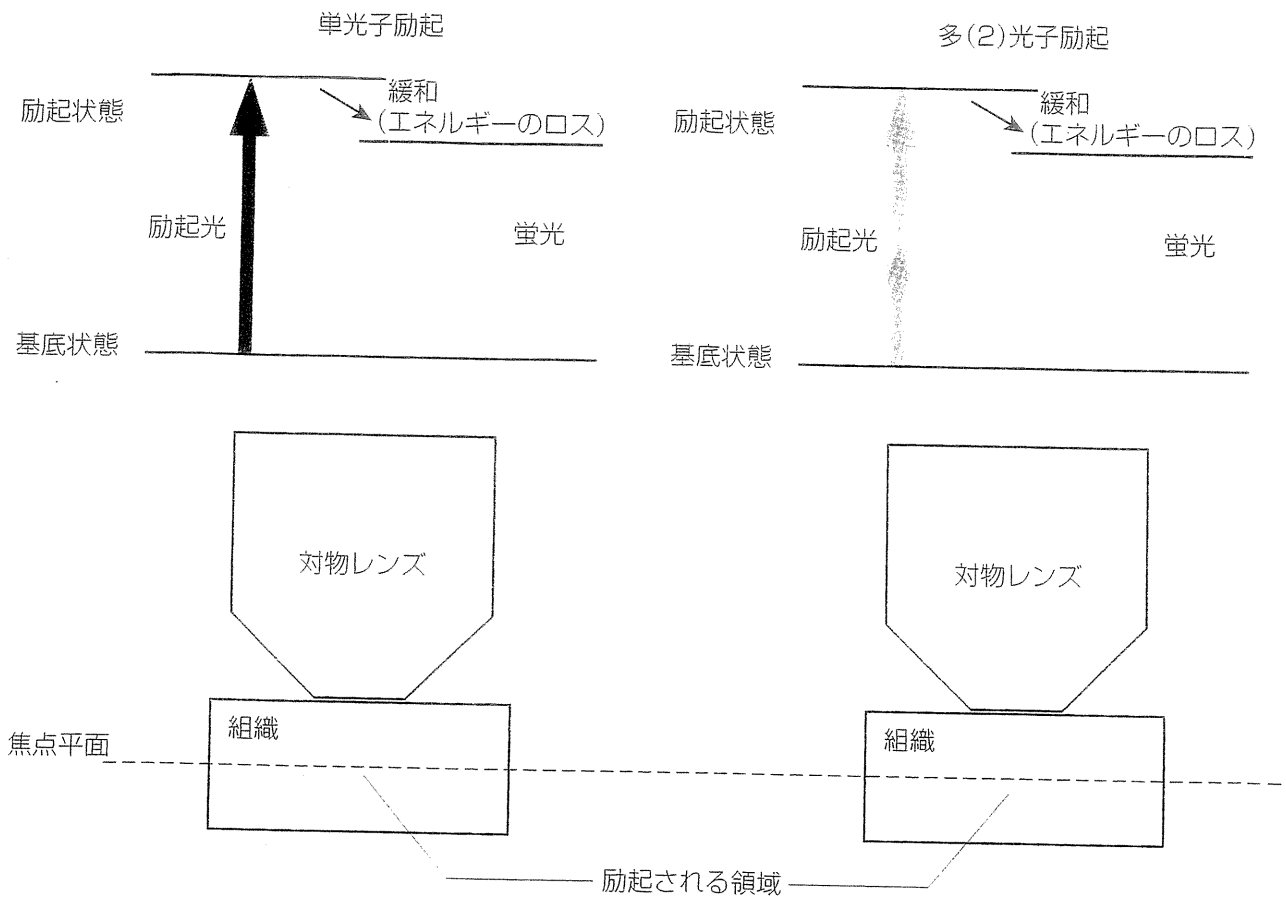


図1 単光子励起と多光子励起

通常の蛍光観察では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起するが(左図)、多(2)光子励起では複数(2個)の光子で励起する(右図)。このような現象は非常に起こりにくく、光子密度が極大となる焦点平面のみで起こる(下図)。このため、観察したい部位のみ蛍光することになるので高い空間解像度が得られ、非観察部位が励起されないため光毒性が低く退色が少ない。

エネルギーは小さくて済む(2光子励起の光子エネルギーは、1光子励起のその約半分)。エネルギーが半分ということは、光子の波長が2倍になることであり、実際2光子励起で用いるレーザーは近赤外域にある(通常の使用域は波長が780~1,000nm)。波長の長い赤外光は、短い可視光や紫外光よりも浸透性が高く、より深い組織まで励起・観察することが可能となる(光は波長が長いほど障害物を越えて行きやすい。テレビの赤外線リモコンは障子やのれんを通過するが、紫外線は日傘で大部分がカットできる)。

3. 低い組織侵襲性(生体組織の観察に有利)

1. と内容が重なるが、2光子励起観察では焦点平面でしか蛍光分子の励起がなされないため、観察対象となる組織・臓器への光毒性や蛍光の退色はきわめて小さく抑えることができる。(これら以外にも2光子励起イメージングには、光学的なさまざまな利点があるが本稿では紙面の都合上割愛する)

上記1. ~ 3. のいずれも、「組織・臓器を生かしたままで観察」するためにきわめて有用である。固定した(もはや生きていない)組織や臓器は、パラフィンやコンパウンドで包埋して薄切すればどんな場所でも観察できる(=物理的スライス)、生きた組織(特に生きた個体内)では、観察したい場所が、対物レンズでアプローチできる場所よりもかなり深いことがある。このような場合、2光子励起顕微鏡を用いると、組織の奥深くまで、高い3次元解像度

で、しかも低侵襲で、断層画像を撮ることができる (= 光学的スライス)。このため、生きた組織の観察手段として、2光子励起顕微鏡が近年、国内外で多用されてきた。たとえば、動物の脳や分泌腺など臓器・組織を摘出して (= 個体は殺して)、培養液中で生かしながら2光子励起観察されてきた (“tissue-explant” two-photon imaging と呼ぶ)。

● 「生体 (=intravital)」 2光子励起観察のメリット

免疫系は、特に細胞の動きが重要なシステムである。好中球やマクロファージなどの抗原提示細胞や細胞性免疫を担うリンパ球が、感染局所や全身をくまなく遊走し、リンパ組織間内の微小環境で会合し、互いに信号を伝達することにより、免疫機能が維持されている。これら細胞遊走は時空間的に精緻にコントロールされており、各細胞が適切な場所に適切な時間に存在しなければ、機能を十分に発揮できない。これら免疫系における統率された細胞遊走システムは、神経系での固定した軸索システム (“hard-wired”) と比較して、“soft-wired” と形容される。このようなシステムの解析のため、2光子励起観察をさらに一步進めて、実験動物を生かしたままで顕微鏡に乗せて、注目する組織を観察する “intravital two-photon microscopy (生体2光子励起顕微鏡観察)” の手法が、2002年頃より海外の複数の研究者によって開発された [1, 2]。この方法論では、注目する組織のみならず、個体自体が生きており、全身の血流や代謝が保たれた状態で観察できるため、きわめて情報量が多い。

筆者は、特に骨組織・骨髄腔内の “intravital” imaging に取り組んだ [3, 4]。この方法では、骨髄腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨組織に定着している細胞の動きのみならず、血管から骨髄内へ細胞が流入したり、逆に血中へ還流していく様子を観察することができる。さらには、薬剤を尾静脈などから全身投与すると血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。このような長所から、著者は骨の tissue explant imaging では intravital imaging を行っているが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出した状態で生かして観察することはかなり難しい。

● 骨組織・骨髄内の生体イメージングの実際

骨基質に含まれるリン酸カルシウム結晶は、励起光を容易に散乱させるため、二光子励起に用いる近赤外線レーザーを用いても深部まで到達させることは難しい。現在の近赤外線レーザーでは軟部組織であれば表面から800~1,000 μm まで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150~200 μm が限界である。このためわれわれは、骨基質が薄くて骨表面から骨髄腔まで80~120 μm で到達できる、マウスの頭頂骨をイメージングに用いた (図2)。

また、骨組織・骨髄内細胞のイメージングに関しては、その蛍光標識の方法にも難点があった。2光子励起イメージングを含めて、あらゆる蛍光イメージングでは、見たい対象物を蛍光標識する必要があるが、リンパ球のイメージングなどの intravital imaging では、あるマウスから細胞を取り出して ex vivo (生体外) で蛍光ラベル (細胞透過性の蛍光色素が各種存在する) して、これを別のマウスに移入すると、リンパ節内に蛍光ラベルしたリンパ球が多数観察される。しかし、同様の手法は骨髄系の細胞に関しては、うまくいかないことが多い (理由と