

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：S1P）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、これらの研究成果の解説に加えて、骨組織内の二光子励起ライブイメージングの方法論や、実際の画像を紹介しながら概説し、最後に骨転移と癌幹細胞のイメージングへの挑戦について述べる。

イントロダクション： 骨組織の恒常性維持機構

骨組織は、古い骨を壊して吸収する「破骨細胞」と、骨を新生する「骨芽細胞」のバランスの取れた働きにより新陳代謝が繰り返されているが、加齢や炎症により破骨細胞の機能が亢進するとバランスが骨吸収側に傾き、骨粗鬆症の発症につながる。また関節リウマチでは、関節炎局所に活性化破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与している²⁾³⁾。

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が、これまでの研究成果により、骨髄間質細胞や骨芽細胞などによって産生されるM-CSF (macrophage colony-stimulating factor) や RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が、破骨細胞の分化・成熟に必須であること、RANKL 刺激は NF- κ B や NFAT などの転写因子群を介して破骨細胞の分化を誘導すること、などの知見が確立している⁴⁾⁵⁾。その一方で、長らく解決されていなかった重要な謎

があった。それは「破骨細胞（およびその前駆細胞）はどうやって骨表面に到達するのか」である。——「どのような分子機構が破骨細胞の遊走を調節しているのか」「いったん骨表面に達した破骨前駆細胞はすべて最終分化するのか（再び戻っていくことはあるのか）」など、ほとんど明らかにされてこなかった。

われわれは、破骨前駆細胞がいかんして骨表面へ到達するのか、またその遊走・位置決めがどのように制御されているかについて解明するために、まず、種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を動かす得るかどうかが *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、S1P をはじめとした、いくつかの候補分子を得た。しかしながら、次の研究段階として、「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨前駆細胞を動かすのかどうか」を解決する必要がある。このため、二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察することに挑戦した。

骨組織の生体二光子励起顕微鏡 観察

免疫系は、特に細胞の動きが重要なシステムである。好中球やリンパ球が全身をくまなく遊走し、免疫組織内の微小環境で会合し互いに相互作用を行うことにより、適切な機能が維持されている。この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と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。

このような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⁶⁾。この soft-wired ネットワークの解析のために、二光子励起観察をさらに一歩進めて、実験動物を生かしたまま顕微鏡に乗せて、注目する組織を観察する「intravital two-photon microscopy (生体二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^{7)~10)}。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完全にインタクトに保たれた状態で観察できるため、極めて情報量が多い。

骨組織内での破骨前駆細胞の遊走・位置決めを観察するために、われわれは骨内・骨髄腔の「intravital」imaging に取り組んだ^{11)~13)}。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(図1)。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、われわれは骨の intravital imaging を行ったが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出して観察することはかなり難しい。

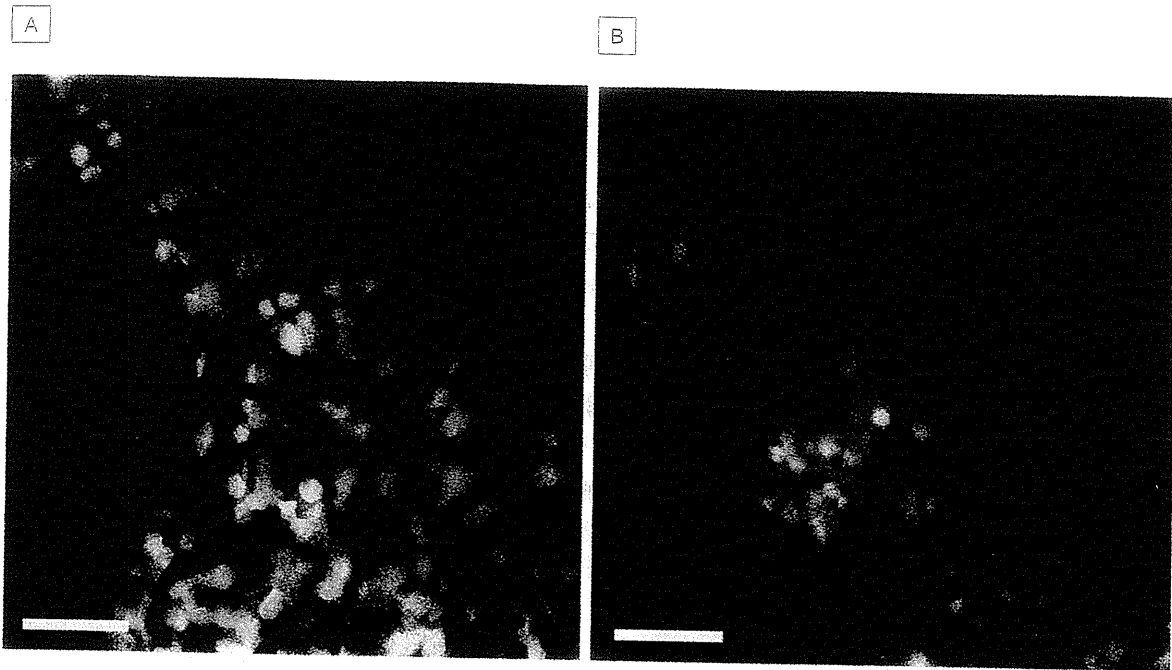


図1 骨髄内(骨髄内)の生体二光子励起イメージング

スケールバー：30 μm 。

A：顆粒球 (LysM^+) および B：単球 ($\text{CX}_3\text{CR1}^+$) をそれぞれ GFP 標識したトランスジェニックマウスの骨髄腔の生体二光子励起イメージング。骨髄内の血管構造を Texas Red で conjugate した高分子デキストランを静脈注射にて可視化している。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(動画については筆者の研究室ホームページ <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp> を参照)。

生体二光子骨組織観察によって 見えた、脂質メディエーター S1P による破骨前駆細胞の 遊走と位置決め制御

種々のケモカイン・脂質メディエーターを *in vitro* でスクリーニングした結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの分子を得ていたが、中でもわれわれが目にしたものは、現在リンパ球の遊走制御について重要な知見が得られている S1P である^{[11][15]}。S1P は主に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。一方、

組織には S1P を分解する S1P リアーゼが ubiquitous に発現しており、一般に S1P は血中で高く、組織で低い濃度に保たれている。このため、S1P に対するケモタキシスは、基本的には細胞が組織から血中へ還流する際に作用すると考えられている。

われわれは、破骨前駆細胞が S1P に対する受容体 (S1P_1) を発現しており、*in vitro* で S1P に対して強いケモタキシスが惹起されることを見出した。この S1P 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

内部の生体観察を行った^{[11][12]}。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 $\text{CX}_3\text{CR1-EGFP}^+$) は、定常状態ではほとんど動かなかったが、 S1P_1 受容体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と、急速に動きが大きくなり、血管へと移行していく様子が観察された(図2；文献12の supplementary videos や、筆者の研究室ホームページ参照)。これにより、*in vivo* の骨組織内でも、破骨細胞は確かに S1P 受容体刺激に反応して遊走能力が亢進することが証明された。

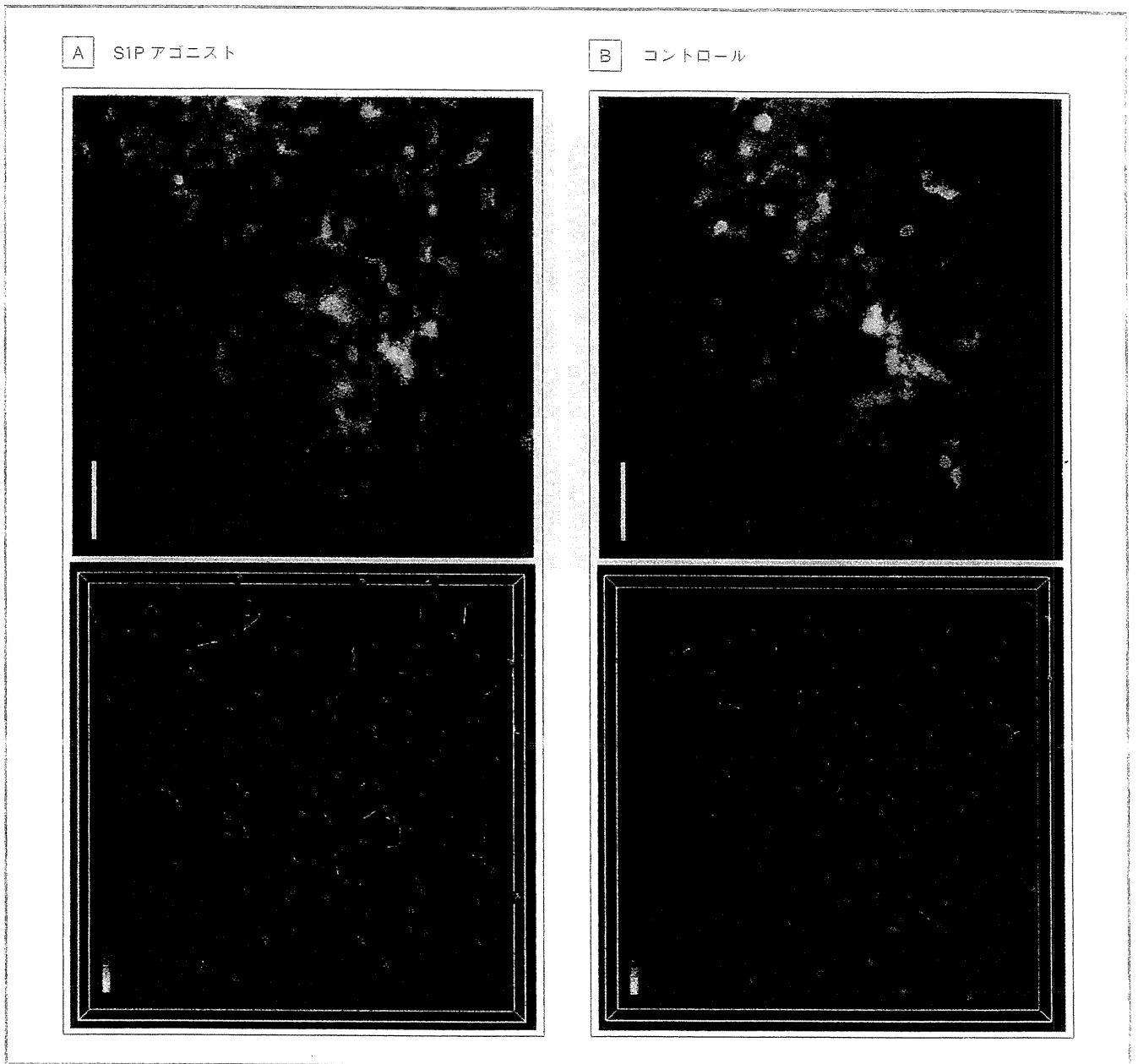


図2 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体二光子励起イメージング

破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺) を緑色にラベルして、TexasRed を conjugate した高分子デキストラン (~70 kDa) を静注して血管構造を赤色でラベルして、それぞれ可視化している (図 2-A, B, 上 2 写真)。また、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 (図 2-A, B, 下 2 写真)。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 (図 2-B, 下)、SIP アゴニストである SEW2871 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。

(文献 12 より一部改変して引用)

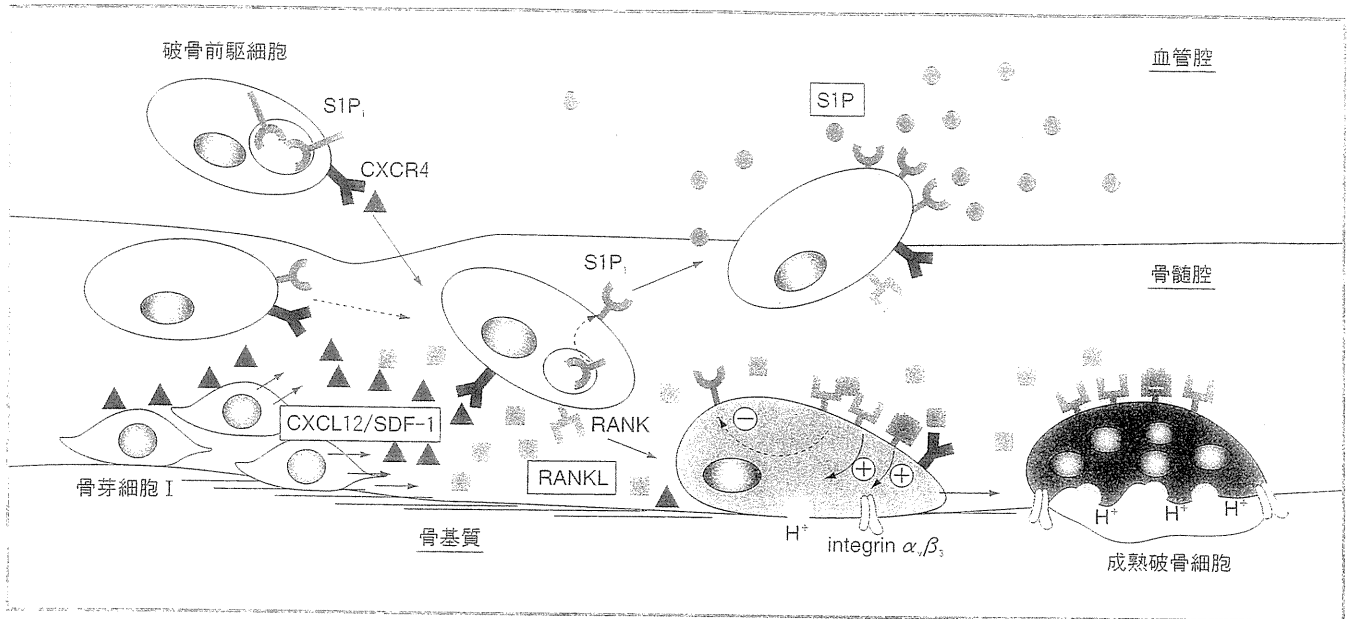


図3 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

単球系破骨前駆細胞は、骨髄内にあるケモカイン CXCL12/SDF-1 によって骨基質内へ引き寄せられ、逆に血中の S1P によって血管内へと再還流する。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数が RANKL の刺激を受けて成熟破骨細胞へと分化する。
(文献 12 より一部改変して引用)

さらにわれわれは、この「S1P に対する破骨前駆細胞の遊走」の生理意義を解明するために、破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CD11b⁺) に特異的に S1P 受容体 (S1P₁) を欠損させたマウスの解析を行った。S1P₁ を欠損した破骨前駆細胞は骨組織に留まりやすくなり、その結果として骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収側へと傾くことが分かった。S1P の濃度が血中で高く、S1P に対する遊走が一般に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中の S1P に対して遊走することにより血中

へ再還流するシステムが存在する。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する前駆細胞数が決められており、一定数が RANKL の刺激を受け成熟する (図 3)。これまで、RANKL などの分化誘導因子やその下流にある転写制御が、破骨細胞研究の主要な課題であったが、この研究はその前の段階、すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所 (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。

骨転移と癌幹細胞のイメージングへの挑戦

乳癌、前立腺癌、肺癌などの癌は骨

に高頻度で転移が見られる。癌患者の生活の質 (QOL) を確保するためには骨転移巣のコントロールが必要となってきた¹⁶⁾。また近年の研究成果により、骨転移において癌幹細胞が重要な働きを担い、転移直後は骨芽細胞のニッチな環境で静止期を維持し、時間が経てば再び増殖・再発するといわれている。癌幹細胞とは、腫瘍中の癌細胞のうち、ごく少数の一部の細胞のみが自己複製能を持ち、多分化能を有し組織を形成する能力を持つ。これらが増殖することで多様性 (heterogeneity) を有する腫瘍が形成される。それらの細胞群が発癌や癌の再発の原因ではないかと考えられている¹⁷⁾。癌に対する化学療法や放射線

治療法などの治療方法は、増殖する癌細胞を標的にしている。しかし、癌幹細胞は、細胞周期の回転が遅いことから治療の標的となりにくい。

新しい治療戦略として、幹細胞の周囲を取り巻くニッチが注目されている。癌幹細胞とニッチの相互作用は、その細胞数や分裂・生死まで制御されていると考えられている。そのため、ニッチを制御することにより、癌の増殖を制限できると考えられている。

癌幹細胞やニッチを理解するためには、*in vitro* の情報だけでなく、実際に生体内での癌細胞や生体分子が時間的・空間的にどのように機能しているのか解析する必要がある。そこで、二光子励起顕微鏡を駆使しての骨髄内の生体イメージングは、これらの疑問を解決する強力なツールとなり得る。生きたままの癌細胞とそのニッチをイメージングによって解明することは、これまでにはなかった新たな癌研究の方法論であり、これらにより臨床応用が可能な新規治療法の開発につなげていきたい。

文 献

- 1) 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 : 2147-2153, 2010
- 2) Teitelbaum SL : Bone resorption by osteoclasts. Science 289 : 1504-1508, 2000
- 3) Teitelbaum SL, Ross FP : Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet 4 : 638-649, 2003
- 4) Takayanagi H : Osteoimmunology : shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nat Rev Immunol 7 : 292-304, 2007
- 5) Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y : Osteoimmunology : interactions of the bone and immune system. Endocr Rev 29 : 403-440, 2008
- 6) Huang AY, Qi H, Germain RN : Illuminating the landscape of *in vivo* immunity : insights from dynamic in situ imaging of secondary lymphoid tissues. Immunity 21 : 331-339, 2004
- 7) Stoll S, Delon J, Brotz TM, et al : Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. Science 296 : 1873-1876, 2002
- 8) Miller MJ, Wei SH, Parker I, et al : Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. Science 296 : 1869-1873, 2002
- 9) Bousso P, Bhakta NR, Lewis RS, et al : Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. Science 296 : 1876-1880, 2002
- 10) von Andrian UH : Immunology. T cell activation in six dimensions. Science 296 : 1815-1817, 2002
- 11) Germain RN, Bajénoff M, Castellino F, 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
- 12) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. Nature 458 : 524-528, 2009
- 13) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al : Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. Nat Methods (in press), 2009
- 14) Rosen H, Goetzl EJ : Sphingosine 1-phosphate and its receptors : an autocrine and paracrine network. Nat Rev Immunol 5 : 560-570, 2005
- 15) Cyster JG : Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. Annu Rev Immunol 23 : 127-159, 2005
- 16) 真鍋 淳 : 骨転移に対する診断と治療 : Cancer Board による集学的チーム医療について. 癌と化学療法 37 : 211-216, 2010
- 17) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al : Stem cells, cancer stem cells. Nature 414 : 105-111, 2001

生体イメージングによる 癌の可視化

Summary

癌幹細胞の研究がすすみ、癌は癌幹細胞とその子孫の細胞が混在する heterogeneous な存在であることが明らかにされた。この癌幹細胞は多分化能を保持しながら長期にわたり癌組織を維持し、増殖、浸潤、転移、さらに治療抵抗性や再発に深く関与していると考えられている。また、癌組織に存在する血管、線維芽細胞、サイトカインなどの微小環境(ニッチ)が癌細胞を支えていることも報告されている。このため、癌細胞と微小環境を多元的に時空間解析することが必要とされるようになり、生体イメージングを駆逐することで、生体内のより深部に存在する多様な細胞の挙動を「生きたまま」可視化することができるようになった。癌細胞の挙動を分子生物学的解析から imagination するのみではなく、時空間的に visualization することに取り組んでいる。その方法と今後の展望について報告する。

Key words

- 大腸癌
- イメージング
- 二光子励起レーザー顕微鏡

大阪大学免疫学フロンティア研究センター
主任イメージング/
大阪大学大学院医学系研究科
消化器外科学
賀川 義規
大阪大学大学院医学系研究科
消化器外科学 教授
森 正樹
大阪大学免疫学フロンティア研究センター
生体イメージング 准教授
石井 優

はじめに

癌研究における *in vivo* イメージングは、生体内での癌の動態を把握するのに重要な解析ツールである。生体内の癌を可視化する方法として、放射線技術を利用するイメージング (CT, MRI, PET)、発光を利用したイメージング (ルシフェラーゼなど)、

蛍光を利用したイメージング (GFP など) が現在利用されている。それぞれの利点と欠点を理解し、うまく使い分けることが必要になってくる。この中でも近年、蛍光イメージングは新しい蛍光タンパク質の開発、蛍光プローブの進歩、顕微鏡技術の向上によりさまざまな分野の研究への応用が進ん

でいるが、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、破骨前駆細胞の挙動を「生きたまま」観察する¹⁾などの生体イメージングの技術が現在注目を集めている²⁾。癌研究の *in vivo* 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癌細胞の生体イ

メージングの実際と将来の展望について紹介する。

癌研究における *in vivo*イメージング

癌の研究分野において、分子生物学の発展に伴いさまざまな遺伝子の解明が進み、癌との関連が明らかにされてきた。動物が生きた状態で、生体内の細胞や分子の挙動や機能をさまざまな方法で可視化されている(表1)。

1. 放射線技術を利用した イメージング

癌研究における放射線を利用したイメージングには、一般的な医療に導入されているCT(コンピューター断層撮影)、MRI(磁気共鳴画像)、PET(陽電子放出断層撮影法)を用いて可視化する方法がある。CTは、動物用の造影剤も購入することが可能であり解剖学的形態観察が容易であるが、細胞レベルや分子レベルのイ

メージングをすることは困難である³⁾。MRIを用いた分子イメージングも近年行われている。MRIでは無侵襲・無被曝下で高分解能画像が得られる。この方法では、標的造影剤を使用し、その分子が結合・蓄積・機能する部位を画像コントラストの変化により検出する⁴⁾。標的造影剤は分子や細胞レベルで作用することで、解剖学的な特徴に加え、分子の集積を確認することができる。PETを用いた生体分子イメージングの特徴は、感度が優れている点である。このため非常に少ない分子数でも局在をみることができ、場所と時間情報に加えて、機能とかかわる定量的な分子情報を得ることができることで現在、注目されている⁵⁾。一方、RI施設でサイクロトロンなどの装置が必要ではあり、現在のところ分子プローブを手に入れる手段が限られていること、また分子プローブの設計が技術的に非常に高度であるという点で課題が残っている。

2. 発光を利用したイメージング

ホタルなどの発光生物はルシフェラーゼという酵素の働きでルシフェリンという基質を酸化して自ら発光する。これは、ルシフェリンが酸化されてできるオキシルシフェリンの高いエネルギー状態(励起状態)から低いエネルギー状態(基底状態)に遷移する過程で放出されるエネルギーの一部が光となるためである。発光イメージングの利点は、蛍光と比較すると生物発光は、バックグラウンドが低く生体内の深部からのシグナルも高感度CCDカメラを使用することにより検出することが可能である(図1a)。個体を全身スキャンし、目的とする細胞の局在を確認できる。基質を加えるのみで観察できるため、個体への侵襲は少なく何回も基質を加えることで長期の経時変化を捉えることができる。一方、生体での発光イメージングでは細胞レベルで観察できるほどの分解能が得られないこと、多種多様な細胞を同時に観察するような多元的な解析ができないこと、1回の観察時間が短いなどの制限がある。癌細胞にルシフェラーゼを恒常発現するように遺伝子導入しておき、癌細胞を移植することで、生体内の癌の局在や転移を経時的にイメージングすることに利用されている。

3. 蛍光を利用したイメージング

1962年に下村脩博士によりオワンクラゲから分子量26kDの蛍光タンパク質が精製された⁶⁾。その後、さまざまな蛍光タンパク質や蛍光色素の開発が進み、細胞周期を可視化することができる蛍光プローブ(Fucci)も開

表1 *in vivo* イメージングの種類

方法	利点	欠点
蛍光イメージング	基質が不要。 シグナルが大きい。 長時間観察可能。 細胞レベル、分子レベルで応用可能。	自家蛍光によるバックグラウンドが問題になる。 深部の観察は困難。
発光イメージング	高感度で体内の深部でも観察可能。 迅速性に優れている。	基質が必要。 発光時間に制限がある。 RI施設が必要。
PET	高感度。 定量性に優れている。	サイクロトロンが必要。 プローブが限られている。
MRI	高解像度。 標的造影剤の使用により、分子のイメージングも可能。	低感度。 大規模な装置が必要。 標的造影剤が限られている。
CT	X線の被曝がない。 解剖学的形態を観察可能。 骨などの形態変化を3Dで捉えることが可能。	細胞レベル、分子レベルのイメージングは困難。

(今村健志, 羽生亜紀: がんの光イメージング, 実験医学26(17):2807-2812, 2008参照)

発されている⁷⁾。蛍光とは、蛍光物質に適切な波長の光を外部からあてることにより、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。蛍光物質の特徴は、多重蛍光ラベルによる多元的解析の可能性、長時間にわたり観察できる安定性、放射性物質を使わない安全性、シグナルレベルが強いため細かい局在まで検出できる精細性があげられる。しかし、生体の深部での蛍光シグナルは周囲のノイズ(自家蛍光など)が大きいため可視化が困難である(図1b)。また、励起波長によりシグナル強度が変わるため分子の定量には不向きである。蛍光タンパクを遺伝子導入したトランスジェニックマウスや蛍光タンパクを遺伝子導入した癌細胞を用いて、細胞レベルの挙動を追跡する研究が行われている。

生体イメージング

生きた個体を麻酔下で観察部位(臓器・組織)を展開し、細胞レベルで観察する。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捉えることができる⁸⁾。この動画を解析し、生体内での作動原理を明らかにすることを目的としている。特に本法では、組織を摘出して観察する方法とは異なり、個体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捉えることが最大のメリットである。つまり、従来の組織

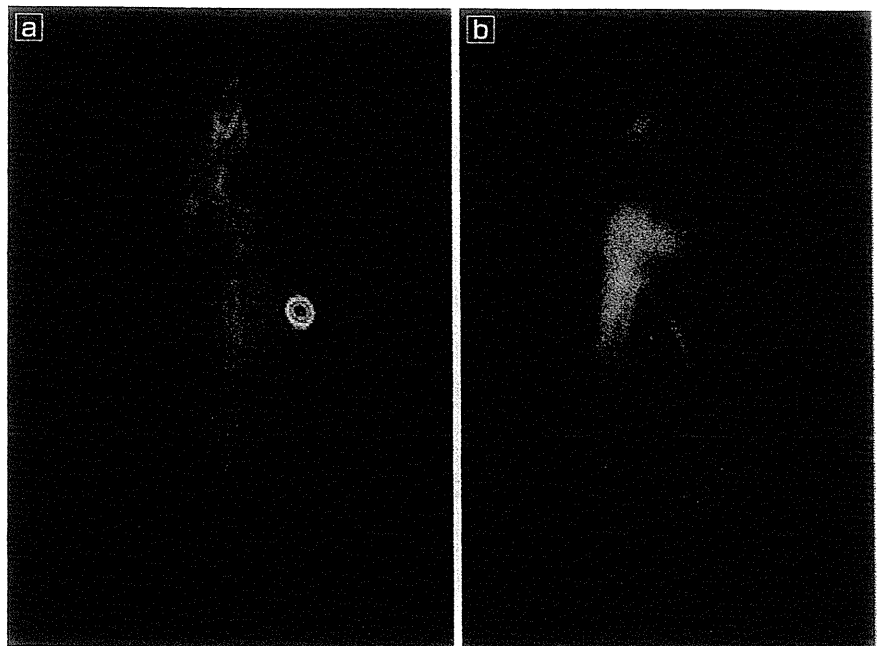


図1 発光イメージングと蛍光イメージング

ルシフェラーゼと蛍光タンパク質を遺伝子導入した大腸癌細胞(HCT116)をNOD/SCIDマウスの皮下に移植して2週間後の発光イメージング(a)と蛍光イメージング(b)。

標本は、2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3次元(立体)で組織や細胞を捉え、さらに生きたまま観察することで時間が加わり4次元(時空間)として生体内の現象を捉える新しい技術である。

1. 二光子励起レーザー顕微鏡

1990年にDenkにより二光子励起レーザー顕微鏡の応用がはじめて発表された⁹⁾。エネルギーの低い・長波長のレーザーを使い光子が2個あたる場所だけを励起する。このためレーザーの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数百 μm の深さまで観察することができ、立体として組織や細胞を観察できる。これらの利点を生体

イメージングに応用されている(表2)。

2. 生体イメージングの実際

マウスに麻酔をかけ、観察する部位を展開する。顕微鏡用のステージにマウスを乗せる(図2)。体温を保つためにヒーターなどを用いて加温する。観察部位をセットする。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、780~900nm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、次に二光子励起で観察する。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

表2 二光子励起レーザー顕微鏡の特徴

低侵襲性

- 組織にあたる光子エネルギーが小さい。
- 励起光が絞り込まれた対物レンズの焦点面でのみ励起される。

同時多重染色イメージング

- 単一光源で多重染色が可能。
- 4色まで可能。

局所励起

- 光反応で活性化させたり解離を誘導する場合、厚みのある試料でも焦点面のみで反応を起こすことが可能。

試料透過性

- 長波長の近赤外線を用いるため、可視光に比べ生物試料による吸収・散乱を受けにくい。
- 深部へ到達しやすい。

Second harmonic generation

- 二光子励起によるものではないが、二光子励起に用いるレーザーで発生する。
- フェムト秒オーダーの超短パルスレーザー光を生体組織に照射すると、光電場とコラーゲン分子の非線形相互作用により入射レーザー波長の半波長の光を発する。

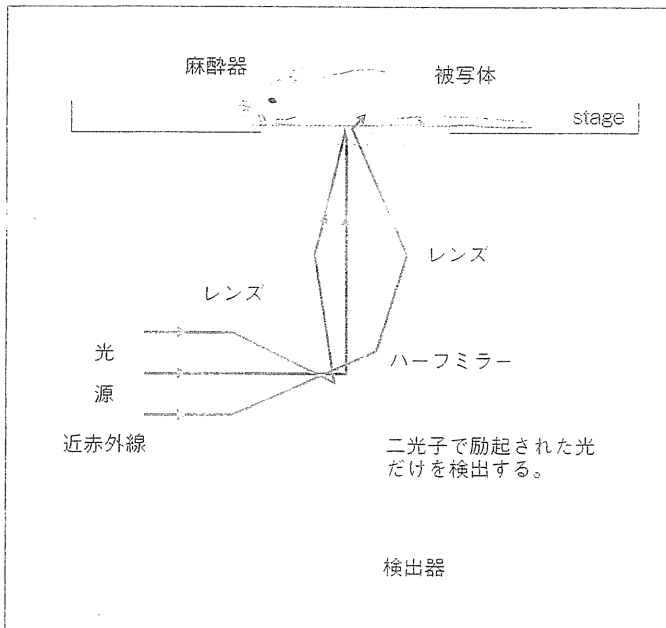


図2 二光子励起レーザー顕微鏡を用いた生体イメージング(倒立型)

マウスに麻酔をかけたままステージに乗せて目的臓器を観察する。

を中心とした階層モデルからなる癌組織は、癌細胞だけではなく、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、癌研究はさまざまな細胞や組織を多元的に解析することが必要とされるようになった¹²⁾。癌の増殖と血管新生、浸潤とEMT(上皮間葉移行)など組織を生きたまま観察することにより、癌の生物学的特性を可視化する¹³⁾。さらに経時的な変化を解析するために、循環動態を維持した状態で観察することが必要になった。生体の癌細胞の挙動と周囲組織を多元的かつ時空間的に捉えることが可能になる。われわれの研究室では、個体を生きたまま観察することにこだわり、癌細胞に蛍光タンパク質を遺伝子導入し癌細胞の挙動を「生きたまま」可視化する試みを行っている(図3)。

4. 生体イメージングの課題

個体を生きたまま観察しているが、同一個体を長時間、複数回観察することは現在の段階では難しい。また、安定した視野で腹腔内臓器を観察するためには、呼吸や心臓の拍動による臓器の揺れが問題となる。これを打開する方法として、さまざまな観察方法が報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。また、同一個体で、安定した視野で何度でも臓器を観察されることによって、癌の進展を観察することが可能になると考えられる。

おわりに

「imaginationからvisualizationへ」。われわれは、分子生物学や細胞生物学により得られた緻密な知見から、生

し、これを編集し動画にする。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る¹⁰⁾。

3. 癌研究への応用

癌幹細胞の研究がすすみ、癌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¹¹⁾。癌幹細胞



図3 生体イメージングで可視化した癌細胞と間質
GFPヌードマウス(Anticancer Japan)の皮下にRFPを遺伝子導入した大腸癌細胞(HCT116)を移植後3週間。二光子励起レーザー顕微鏡(Nikon A1)を用いて観察した。

体内の癌の動態を想像(imagination)してきた。生体内の癌の挙動を、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。「生きたまま」癌細胞と微小環境を可視化し時空間的に解析することは、今までにない新たな研究手法である。今後、研究の軸となることで臨床応用につながる新規治療の開発に携わることが可能になると考えている。

References

- 1) Ishii M, Egen JG, Klauschen F et al: Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458 (7237): 524-528, 2009
- 2) Weigert R, Sramkova M, Parente L et al: Intravital microscopy: a novel tool to study cell biology in living animals. *Histochem Cell Biol* 133 (5): 481-491, 2010
- 3) Schambach SJ, Bag S, Schilling L et al: Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods* 50 (1): 2-13, 2010
- 4) Himmelreich U, Dresselaers T: Cell labeling and tracking for experimental models using magnetic resonance imaging. *Methods* 48 (2): 112-124, 2009
- 5) Riemann B, Schäfers KP, Schober O et al: Small animal PET in preclinical studies: opportunities and challenges. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 52 (3): 215-221, 2008
- 6) Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239, 1962
- 7) Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T et al: Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132 (3): 487-498, 2008
- 8) Sumen C, Mempel TR, Mazo IB et al: Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity* 21 (3): 315-329, 2004
- 9) Denk W, Strickler JH, Webb WW: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248 (4951): 73-76, 1990
- 10) 島津 裕, 石井 優: Close Up実験法 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.
- 11) Clarke MF, Dick JE, Dirks PB et al: Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66 (19): 9339-9344, 2006
- 12) Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA: Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 15 (9): 1010-1012, 2009
- 13) Jain RK, Munn LL, Fukumura D: Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer* 2 (4): 266-276, 2002
- 14) Hak S, Reitan NK, Haraldseth O et al: Intravital microscopy in window chambers: a unique tool to study tumor angiogenesis and delivery of nanoparticles. *Angiogenesis* 13 (2): 113-130, 2010
- 15) Chen DC, Agopian VG, Avansino JR et al: Optical tissue window: a novel model for optimizing engraftment of intestinal stem cell organoids. *J Surg Res* 134 (1): 52-60, 2006
- 16) Liu Y, Chen HC, Yang SM et al: Visualization of hepatobiliary excretory function by intravital multiphoton microscopy. *J Biomed Opt* 12 (1): 014014, 2007

二光子励起顕微鏡による生きた組織の観察

Visualization of live tissues and organs by using intravital two-photon microscopy

石井 優

Key Words: live imaging, two-photon microscopy, immune system, bone homeostasis, chemokine

■ Abstract ■

動物の本質は<動き>にあるが、これは生体のみが備え、死体にはない。近年、蛍光顕微鏡技術の長足の進歩により、生体を「生きたまま」で観察することができるようになった。この技術によって、特にそれまで見えなかった細胞や分子の「動き」を直接見ることができるようになり、生命科学の領域にパラダイムシフトをもたらされつつある。本稿では、二光子励起顕微鏡を用いた「生体イメージング」の方法論と今後の応用について概説する。

■ 二光子励起顕微鏡の原理と応用

蛍光観察では、注目する細胞や分子などを蛍光分子で標識する。蛍光分子は一般に、エネルギー的に低い状態（基底状態）と高い状態（励起状態）があるが、普段は基底状態にある。このエネルギー差に相当する光（光子）を当てると、蛍光分子はこのエネルギーを吸収して励起状態になるが、自然にまた励起状態へと戻っていく（図上）。この際、そのエネルギーに相当する光を放出し、これを観察しているのが蛍光観察である。

二光子励起とは、蛍光観察の際に、光子1個ではなく、2個の光子を蛍光分子に同時に当てることにより励起させることである。光子1個1対1対1反応による1対1反応に比べて、複数の光子による励起（多（二）光子励起）は極めて起こりにくい現象であるが、光子密度を非常に高くすれば非線形的に起こり得る（Göppert-Mayer, 1931）。

Masaru Ishii, M.D., Ph.D.
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・細胞動態学分野
Professor and Chief, Laboratory of Cellular Dynamics,
Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka
University

この「二光子励起」の現象は、光子密度が異常に高い場所でのみ起こる。蛍光顕微鏡でいえば、光が一点に凝集される点、すなわち「焦点」のみで起こり得る現象である。これを利用して「焦点のみで励起が起こるような顕微鏡」として「二光子励起顕微鏡」が作られた¹⁾。

まとめると、この顕微鏡には以下のような長所がある。

① 高い空間（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、非観察面からの蛍光シグナルがない（非観察面からの蛍光シグナルは「ピンボケ」の原因となる）。

② 高い組織透過性（深部組織の観察に威力を発揮）

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個分のエネルギーは小さくて済む（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、実際二光子励起で用いるレーザーは近赤外域にある（波長が780~1000 nm）。波長が長い赤外光は、短い可視光や紫外光よりも浸透性が高く、深い組織まで励起・観察することが可能となる。

これらの特長は、「組織・臓器を生かしたままに観察」するために極めて有用である。固定した（もはや生きていない）組織や臓器は、パラフィンなどで包埋して薄切すれば、どんな場所でも観察できるが、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深いことがある。このような場合、二光子励起顕微鏡が威力を発揮する。

■生きた組織・個体の観察の実際

「生体イメージング」は大きく2つに分類される。「tissue explant imaging」では、実験動物を屠殺して注目する組織・臓器を取り出し、酸素化した培養液中で生かして観察する。一方、「Intravital imaging」では、動物を麻酔下で生かしたままに、観察したい組織・臓器を露出して観察する。Intravitalの方法論はより困難であるが、その利点があり、特に、動物を生かして、その循環血流が滞りやすい点是非常に大きな利点（特に免疫・血管系のように、血流を止めた細胞の動態が重要な要素）の解析に有利である。

■生きた骨組織・骨髄内の二光子励起観察

筆者はintravital two-photon imagingによる生きた骨組織・骨髄内の高解像度イメージング法を最早に光顕鏡で開発した。硬い骨質の透き切った骨組織の内部は、生きたままでの観察が特に困難であると考えられていた。骨基質に含まれる有機質の結晶は、励起光を容易に吸収するため、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が難しかった。筆者はシステムを改良し、骨基質が比較的薄い頭頂骨を用いて、生きた骨髄内を何部分も非侵襲的に高解像度で観察できる実験系を確立した（図下）であり、これを用いて、骨髄内の細胞が血中から遊走したり常に循環する標子をリアルタイムで可視化し、その動態を制御する因子を同定した。

骨髄には造血系血液系、間葉系細胞が、所望した話の心まわっている。多様な血液系細胞はそれぞれ決まった場所（ニッチ）に存在し、また互いに複雑な静的・動的ネットワークを形成しているが、これらについては未だ不明な点が多く残されており、二光子励起顕微鏡による“非破壊検査”を用いた今後の解明が期待される。

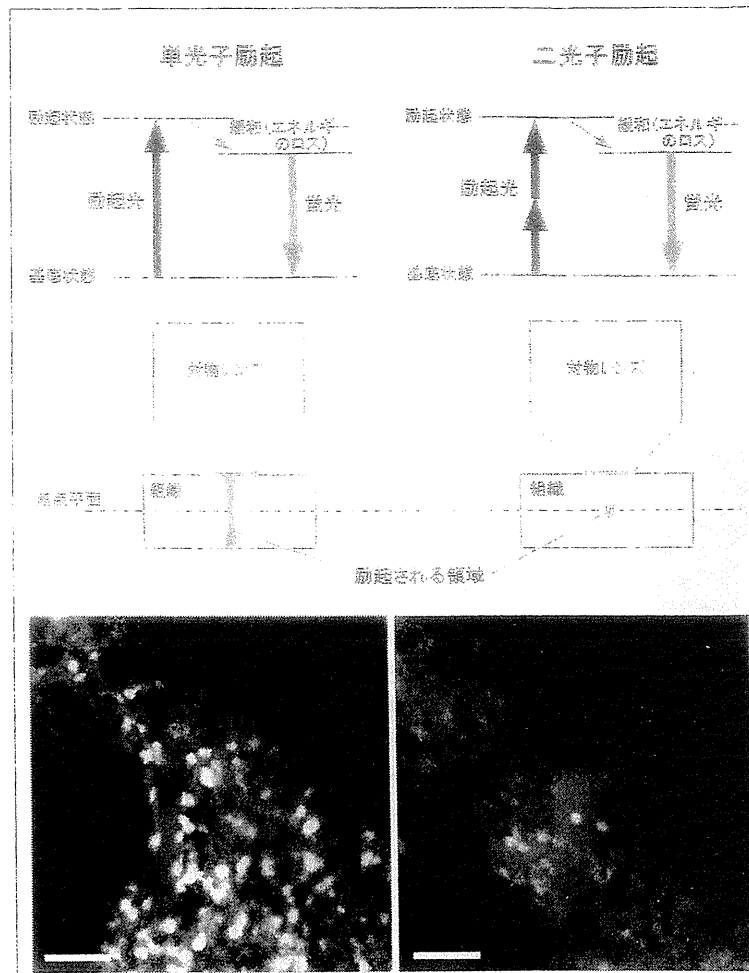


図 二光子励起顕微鏡の原理とその生体観察
 上図：通常の蛍光観察では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起する（左図）。多光子励起では複数（2個）の光子で励起する（右図）。このような現象は非常に起こりにくく、光子密度が極大となる焦点平面のみで起こる（下図）。このため、観察したい部位のみ蛍光することになるので高い空間解像度が得られ、非観察部位が励起されないため光毒性が低く、退色が少ない。
 下図：顆粒球系（LysM）（左側）および単球系（Ly6G）（右側）をそれぞれGFP標識したマウス（マウス）の骨髄腔の生体二光子励起イメージングで、骨髄内の血管管壁をTexas Redを結合した高分子デキストランを静脈注射して可視化している。実際に何秒かを一定時間間隔で撮影し、動画を生成する（左側）より一部変更、動画（右側）は薬物HP<<http://bioimaging.illinois.edu/HP>>を撮影して生成した（右側）。

文 献

- 1) Dear W, Sotgiu JH, Webb WW. Science, 248: 73-76, 1990.
- 2) Spill S, DeJen J, Brose TH, Germain P. Science, 296: 1873-1876, 2002.
- 3) Miller MJ, Wei SH, Farber L, Schalian MD. Science, 296: 1869-1873, 2002.
- 4) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Szeftl T, Macher J, Proia RL, Germain RN. Nature, 458: 524-528, 2009.
- 5) Klauschen F, Ishii M, Qi H, Bajénoff M, Egen JG, Germain RN, Meier-Schellersheim M. Nature Protoc, 4: 1305-1311, 2009.

破骨細胞のイメージングと RANKL シグナル

菊田 順一*¹⁾ 石井 優*²⁾

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り、「骨吸収」という特殊な機能を持つ唯一の細胞である。しかし、生きた骨組織内で成熟破骨細胞がどのように骨吸収を行っているのか、生体内における成熟破骨細胞の動態についてはこれまで明らかにされてこなかった。我々は最近、二光子励起顕微鏡を駆使することでマウスを生かしたまま、骨表面上での生きた成熟破骨細胞の動態を可視化することに成功し、成熟破骨細胞の骨吸収がRANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) によって動的に制御されていることを明らかにした。

本稿ではこの研究成果に加え、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。

RANKL signaling and bone diseases.

In vivo imaging of mature osteoclasts and RANKL signaling.

Laboratory of Cellular Dynamics, Immunology Frontier Research Center, Osaka University

Junichi Kikuta, Masaru Ishii

Osteoclasts are 'bone-resorbing' giant polykaryons that differentiate from mononuclear macrophage/monocyte-lineage hematopoietic precursors. However how the activity of mature osteoclasts is regulated *in vivo* remains unclear. To answer the question, 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 mature osteoclasts in live bones and revealed that RANKL regulates bone-resorptive functions of mature osteoclasts *in vivo*. Here we show the latest data and the detailed methodology of intravital imaging of bone tissues, and also discuss its further application.

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り、「骨吸収」という特殊な機能を

持つ唯一の細胞である。骨髄から採取した単球系細胞をM-CSF (macrophage colony-stimulating factor) とRANKL (receptor activator of

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⁾(きくた・じゅんいち) ²⁾教授 (いしい・まさる)

NF- κ B ligand) の刺激下で *in vivo* で培養すると、破骨細胞様の多核巨細胞が形成され、中には 100 核以上の巨細胞も観察される。しかし「このような多核巨細胞が *in vivo* でも本当に形成されるのか」、「生きた骨組織内で成熟破骨細胞はどのように骨吸収を行うのか」など、生体内での成熟破骨細胞の動態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で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¹⁾。この方法を用いて、我々は最近、骨表面上での生きた成熟破骨細胞の動態を可視化することに成功し、成熟破骨細胞の骨吸収が RANKL によって動的に制御されていることを明らかにした。

本稿では、これらの研究成果の解説に加えて、骨組織内の生体二光子励起イメージングの方法論や、その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。

骨組織内の生体二光子励起イメージング

1. 二光子励起顕微鏡のメリット

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で観察」するためにきわめて有用である^{2,3)}。

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 μ mまで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150~200 μ m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 μ m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^{1,4)}(図1)。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採られているため、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「生体二光子励起イメージング」を用いて、我々はこれまで、破骨前駆細胞の骨吸収面への遊走・接着が、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⁵⁾。しかしながら、

RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (破骨細胞分化因子)

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor (マクロファージコロニー刺激因子)

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

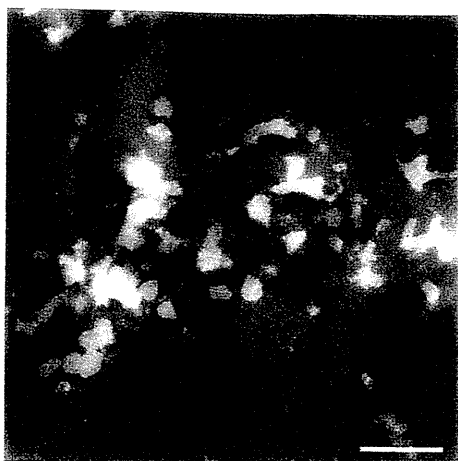


図1 骨組織内での破骨前駆細胞の生体二光子励起イメージング

破骨前駆細胞を含む単球系細胞を緑色にラベルしたマウスの骨髓腔の生体二光子励起イメージング。骨髓腔内の血管構造は、赤色蛍光 (Texas Red) を結合させた高分子テクストランを静脈注射して可視化している。青色は骨組織を示す。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。

(スケールバー: 30 μm)

(カラーグラフィック5頁参照) (筆者作成)

「破骨前駆細胞が骨表面に到達して成熟破骨細胞に分化した後、骨吸収が生体内でどのように調節されているのか」という点については、これまで明らかにされていなかった。そこで、我々は「生体二光子励起イメージング」技術を駆使して、生体骨組織内での成熟破骨細胞の動態を可視化することに取り組んだ。

生体イメージングによる成熟破骨細胞の動態解明

1. 生きた成熟破骨細胞の動態の可視化

我々は、成熟破骨細胞に特異的に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現させたマウスの骨組織内を二光子励起顕微鏡で観察することにより、生きた成熟破骨細胞の動態の可視化に成功した (図 2a)。その結果、骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞

には、「①動きがなく、今まさに骨吸収をしている状態の細胞 (図 2b)」と、「②動いていて、骨吸収をしていない状態の細胞 (図 2c)」の少なくとも2種類が存在することが明らかとなった (論文投稿中)。

次に我々は、これらのマウスに各種薬剤を投与して、成熟破骨細胞の動態の変化を検討した。まず、成熟破骨細胞を蛍光標識したマウスに RANKL を腹腔内投与して破骨細胞の機能を亢進させ、投与2日後にマウスの骨組織内を生体二光子励起顕微鏡で観察した。その結果、成熟破骨細胞数が増加し、そのほとんどが「①動きがなく、今まさに骨吸収をしている状態の細胞」であった。一方、骨粗鬆症の治療薬であるビスホスホネートを投与して破骨細胞の機能を抑制させると、骨表面での成熟破骨細胞数が減少し、また残った細胞のほとんどが、「②動いていて、骨吸収をしていない状態の細胞」であった。このように、二光子励起イメージングを用いることにより、成熟破骨細胞の絶対数のみならず、成熟破骨細胞の機能 (骨吸収をしているのか、あるいは骨吸収をしていないのか) も同時に評価することができるようになった。

2. RANKL による成熟破骨細胞の骨吸収制御機構の解明

次に我々は、上述の成熟破骨細胞を蛍光標識したマウスに RANKL を急速に静脈内投与した。その結果、投与後 30 分という比較的短い時間に、成熟破骨細胞が「②骨吸収をしていない状態」から「①今まさに骨吸収をしている状態」へと変わっていく様子が観察された。従来、RANKL は破骨前駆細胞が成熟破骨細胞へ分化するための必須の因子であることが知られていた。今回我々が行ったイメージングの結果により、RANKL は破

GFP: green fluorescence protein, green fluorescent protein ともいう。(緑色蛍光タンパク質)

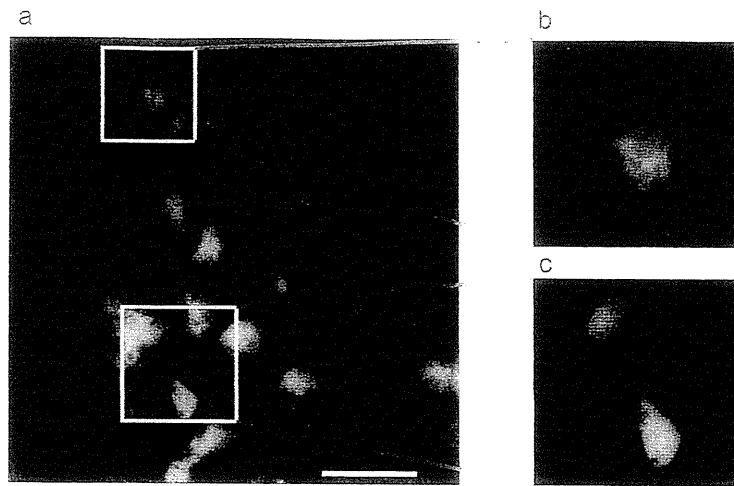


図2 骨組織内での成熟破骨細胞の生体二光子励起イメージング

成熟破骨細胞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 (a)。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テクストランを静脈注射して可視化している。青色は骨組織を示す。骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞には、「動きがなく、今まさに骨吸収をしている状態の細胞 (b)」と、「動いていて、骨吸収をしていない状態の細胞 (c)」の少なくとも2種類が存在する。(スケールバー：40 μm) (カラーグラフィック5頁参照) (筆者作成)

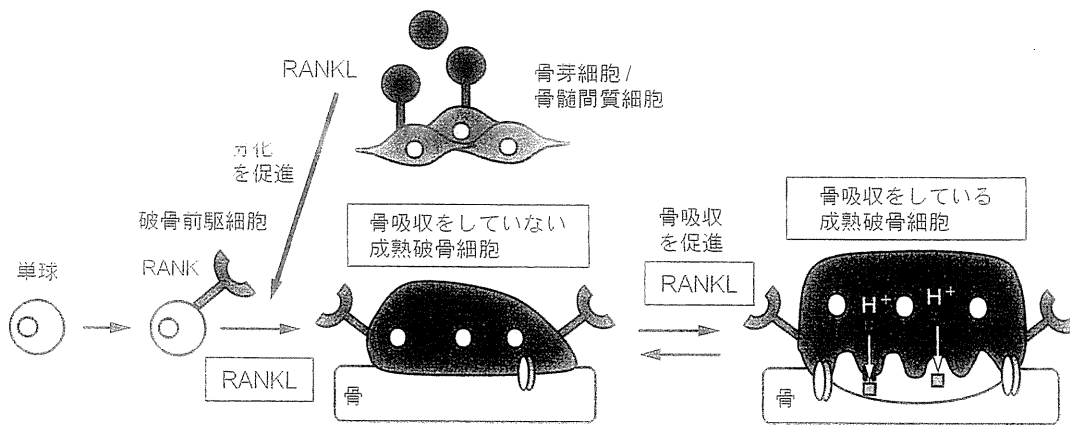


図3 生体内における成熟破骨細胞の骨吸収メカニズム

成熟破骨細胞には、「骨吸収をしていない状態の細胞」と、「今まさに骨吸収している状態の細胞」との2種類が存在する。また、RANKLは破骨細胞分化を促進するだけでなく、成熟した破骨細胞にも作用し、骨吸収を促進する役割も担っている。(筆者作成)

骨細胞の分化を促進するだけでなく、成熟した破骨細胞にも作用し、骨吸収を促進する役割も担っていることが明らかとなった (図3)。

これまでの成熟破骨細胞の骨吸収に関する研究のほとんどは、固定した骨組織を切り出して行われたものであるため、細胞の動的な情報を得るこ

とが困難であった。しかし、今回我々が行ったイメージング系は、マウスを生かしたまま、骨表面での成熟破骨細胞の骨吸収の動態をリアルタイムで観察することができるため、今後、骨吸収性疾患の病態解明や新規薬剤の開発においても強力な手段となり得ると考えられる。

今後の展開

1. 頭頂骨以外の骨組織のイメージング系の開発

現時点では、十分な解像度で可視化できる骨組織は、骨梁が薄くレーザー光を透過させやすい頭頂骨に限られている。基本的には、どこの部分の骨であっても、骨代謝や骨髄細胞の動態などには変化がないと考えられるが、それらを実証するためには、やはり長管骨など一般に広く研究に用いられている骨組織をライブイメージングにより解析する必要がある。現在我々は、長管骨のライブイメージング系の確立に取り組んでいる。

2. 長時間のライブイメージング系の開発

ガス麻酔下でマウスを生かしたまま、骨組織を手術的に露出してイメージングに当たっている現在の方法では、連続した撮影時間は4~5時間程度が限界である。細胞の動きや細胞間の接触時間などをイメージングするのであれば、この観察時間で十分であるが、それより長い時間のかかる現象(例えば、破骨細胞の分化など)をイメージングするためには、別の測定系を構築する必要がある。(マウスを長期間にわたり麻酔管理するか、手術野を閉じて経日的観察を可能にするなど)。現在我々は、長時間のライブイメージング系の確立にも取り組んでいる。

おわりに

近年の蛍光イメージング技術の急速な進歩のおかげで、さまざまな臓器・組織での生きた細胞の

観察が活発に行われている。しかしながら、これまでの生体イメージング研究の多くは、生体内での細胞の動き(動く速さ)や細胞間相互作用(細胞同士の接触時間)を観察するにすぎなかった。これからの生体イメージング研究では、「細胞が動いて接触した後に何が起こるのか」、すなわち生体内での細胞の「機能」や「分化」をイメージングすることが重要になってくると思われる。特に骨組織は、破骨細胞や骨芽細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、リンパ球を始めとして顆粒球・単球など多種多様な血液細胞の発生・機能分化にとって重要な部位である。我々が開発した骨組織の生体二光子励起イメージングの方法論は、骨髄腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御や、血液系幹細胞が多能性を維持する特殊な環境(ニッチ)の解明において強力な手段となることが強く期待される。

文 献

- 1) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458 (7237) : 524-528, 2009.
- 2) Denk W, Strickler JH, Webb WW : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248 (4951) : 73-76, 1990.
- 3) Denk W, Svoboda K : Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18 (3) : 351-357, 1997.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

概論

生体4Dイメージングの最前線

見えないものを見て、新しい概念を切り拓く 研究者の飽くなき挑戦

石井 優

動物とは、その名の通り「動く物」であり、われわれが社会のなかで日々忙しく動き回っているのと同じく、細胞は「個体」という社会のなかで動き続けている。細胞がいつ、どこで、どのように行動するのか、これは個体の生命機能を支える本質的現象であるが、固定・薄切した組織による従来の静的な解析では十分な検討が困難であった。近年の研究技術における飛躍的革新により、動きのある生命現象を、そのまま「生きたまま」で観察することができるようになり、生命科学上の多くの新概念が明らかになってきた。本特集では、多光子励起顕微鏡を用いた最先端の生体イメージング研究と、蛍光プローブ・光操作技術、核医学イメージングの現状について、最新の研究成果を交えて紹介する。

はじめに一方法論の革新と科学の進歩で手に入れた「創造主の目」

17世紀後半、イギリスの科学者ロバート・フック (Robert Hooke, 1635～1703年, 図A) が顕微鏡を使って、生物が小さな構成単位 (=細胞) で形成されていることを見出した。同じ頃、オランダのレーウエンフック (Antoni van Leeuwenhoek, 1632～1723年, 図B) は目に見えない小さな微生物を多数観察し、それらが病気の原因であることを示唆した。これらはいずれも「目には見えないもの」を見て、解析することにより、新しい概念を切り拓く試みであり、「単に目で見えていたもの」のみを収集していた従来の「博物学: natural history」から、より解析的な「生物学: biology = bio<生命> + logia<論理>」という学問が歴史上に誕生した瞬間であった。それ以降、生物学の進歩は常に観察技術の革新と歩調を合わせて進んできたと言って過言ではない。

「視ること」は人間の五感のなかでも特別な存在感を示している。「目隠し」をした状態でさまざまな方向から対象物に触れて、それらの特徴から推測するだけでは、結局のところ、対象物が何物であるかを理解できない。目を開いて「見る」という新しい解析法を導入することではじめて、対象物がどんなものであるか、はっきりと理解することができるようにな

A new era of biomedical sciences pioneered by advanced 4-dimensional imaging technologies

Masaru Ishii: Laboratory of Cellular Dynamics, Immunology Frontier Research Center, Osaka University/ Japan Science and Technology Agency (JST), Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) (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)

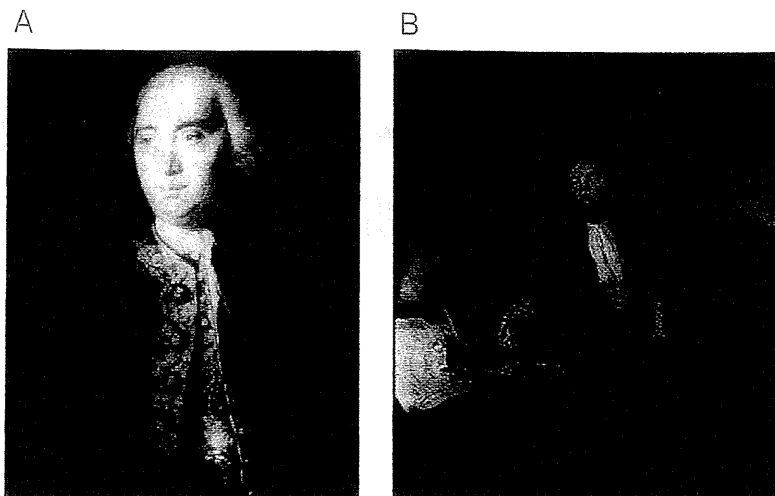


図 □バート・フックとレーウェンフック
 A) Robert Hooke (1635～1703年). B) Antoni van Leeuwenhoek (1632～1723年)

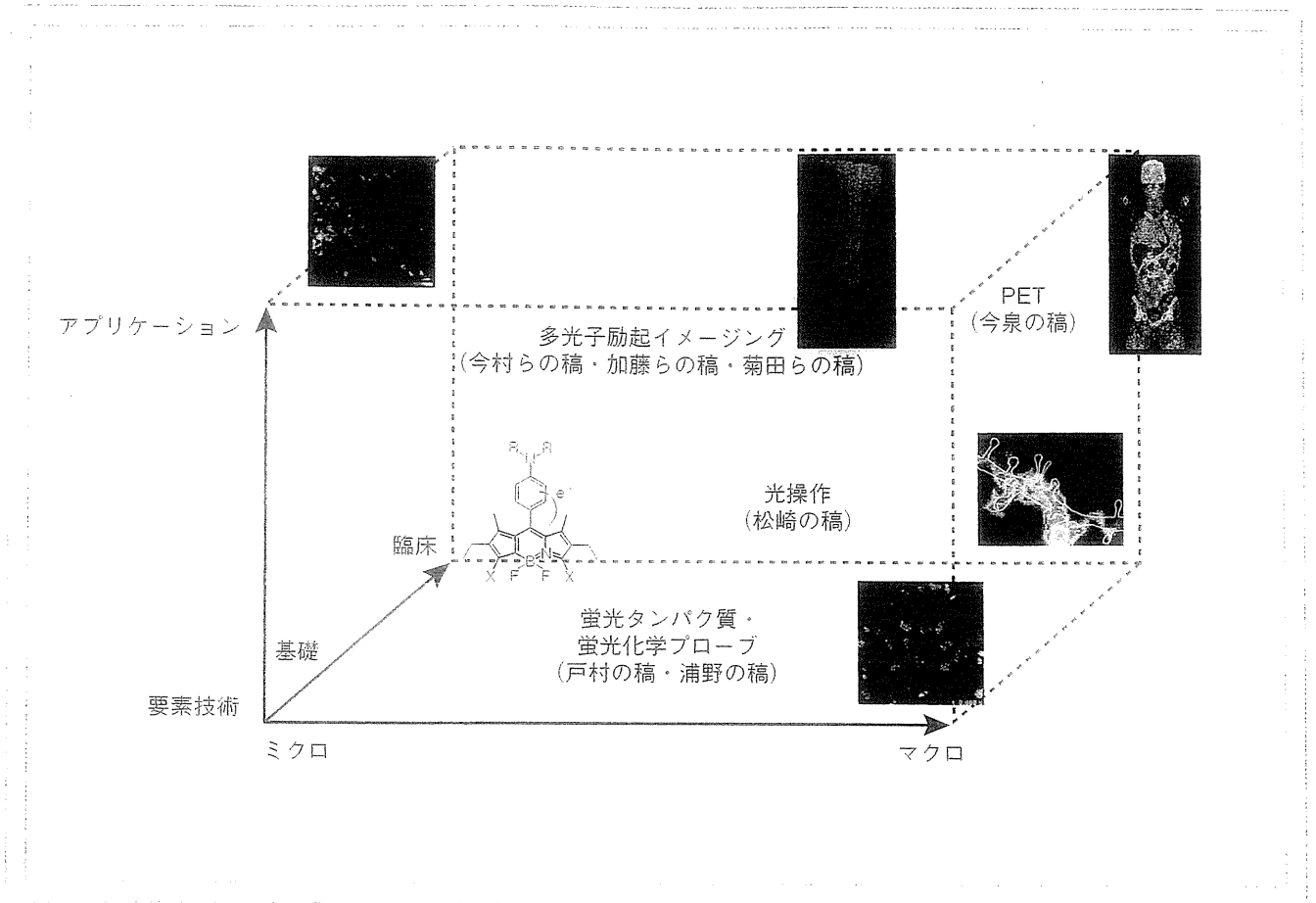
る。このように、1つの新しい方法論の登場は、ときにはそれまでの研究成果をすべて超克して真実に近づくような威力をもつ。

動物は「動き」のあるシステムである。従来の組織・形態学上の「静的」な解析では、生命現象の“スナップショット”を見るのみで、その動く実像を捉えることはできなかった。近年の生体イメージング技術は、生物の内部で起こっている事象を「生きたまま」で、時間軸をもって“ビデオ撮影”することを可能とし、これによって生命現象の本質である分子・細胞の「動き」をはっきりと理解することが可能となった。空間情報 (x/y/z) に加え、時間軸 (t) をもった情報を可視化するイメージング技術の登場は、3D世界から4D世界への転換であり、生命科学上の不連続な、革命的進歩の1つである。

近年の医学・生物学の著しい進歩を支えているのは、10～20年周期で登場する革新的な方法論である。1970～1980年代の分子生物学の登場、1990年代のジーンターゲット技術の進歩により、研究者は生命の本質である遺伝子を発見し操作する、「創造主の手」をもった。これらの方法論が数多くの新しい概念の創出につながり、生命科学が飛躍的に発展したことは論を待たないが、今われわれは、生命現象を生きたまま見る「生体イメージング」という、「創造主の目」を手に入れた。まさに、新しい研究の時代の幕開けに立ち会っているとさえいう。本特集では、そのような生命科学の新たな「目」から見える世界を各論で紹介いただいている (概念図1)。

顕微鏡技術の進歩

16世紀末頃に試作機がつくられた顕微鏡は、光学・物理学の進歩とともに技術革新がなされ19世紀後半にはほぼ原型が確立していたが、20世紀に入り可視化・イメージング技術は、多角的に大きな発展を遂げていく。その1つは「さらに微細なものを見る」挑戦である。いわゆる「解像度」は異なる2点間の識別能 (d) として計測できるが、これは、観察に用いる光の波長 (λ) に比例し、対物レンズの開口数 (N.A.) に反比例することが知られている



概念図1 各論の相関図

イメージング研究の各論を、3つの軸（マイクロ→マクロ、基礎→臨床、要素技術→アプリケーション）で分類し表示している

($d \propto \lambda / NA$, A: アッペの限界), つまり、波長の短い光を（開口数の大きな対物レンズで）観察に使用する方が解像度は大きくなるが、可視光 ($\lambda = 380 \sim 760 \text{ nm}$) を用いた観察では限界がある。そこで光に比べて波長がはるかに短い、高電圧で加速した電子線（電子=粒子の流れは波でもある：粒と波の二重性）を「光」の代わりに用いて、超高解像度イメージングを実現させたのが電子顕微鏡である。最近、光を用いながらも光学系・画像処理の工夫により「アッペの限界」を打ち破り、電子顕微鏡に比肩する解像度を有する驚くべき光学顕微鏡（超解像顕微鏡）が開発されており、今後の生物学への応用が期待されている。

その一方で、20世紀は「蛍光イメージング」の著明な技術革新がみられた。蛍光分子は一般に、エネルギー的に低い状態（基底状態）と高い状態（励起状態）があるが、普段は基底状態にある。このエネルギー差に相当する光（光子）を当てると、蛍光分子はこのエネルギーを吸収して励起状態になるが、自然とまた基底状態へと戻っていく。この励起→基底状態へと遷移する際に、そのエネルギーに相当する光が放出され、これを観察するのが蛍光観察である。なお、当てた光子（励起光）よりも、出てくる光子（蛍光）の方が常にエネルギーが低く（エネルギーは必ずロスされる）、このため、蛍光は励起光よりも波長が長い（Stokes' shiftとよぶ）。一般に、蛍光観察ではこの波長差を利用して、半透鏡（ダイクロ