

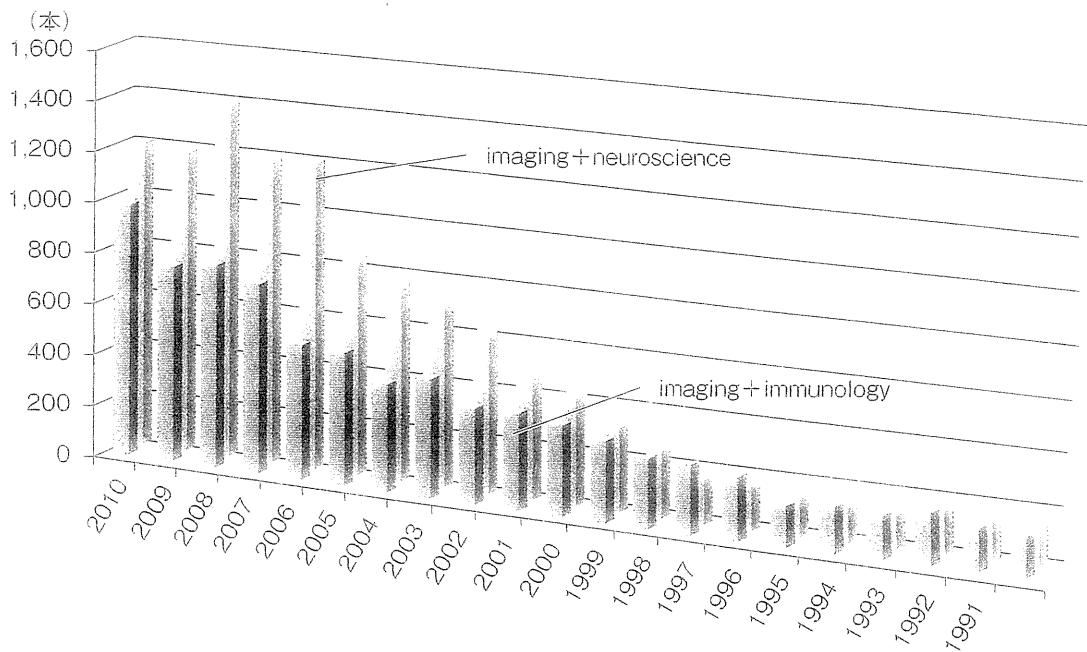
バックミラー)やフィルターを使って光路を分取している。

ところで、蛍光観察ではピントのずれた光をレンズが集光することで、見たい像が「ピンボケ」することがあるが、撮像レンズの前にピンホールをおいて不要な光を除いてピンボケを防いだ改良版を「共焦点(コンフォーカル)顕微鏡」とよぶ。これをさらに発展させ、観察したいところのみを励起する改良版顕微鏡が「多光子励起顕微鏡」である。多(2)光子励起顕微鏡の基本原理や操作の詳細については加藤らの稿を参照いただきたいが、簡潔に述べると、多光子(通常は“2”光子)励起観察では、通常の励起に必要なエネルギーの半分の光(光子)を高密度で照射して2個の光子で1個の蛍光分子を励起して観察する。量子現象は1:1反応が基本であるため、2光子:1電子励起の反応はきわめて稀な現象であり、「光子密度が異常に高い場所=焦点」のみでしか起こらない。つまり2光子励起では焦点のみしか励起されない(①)(ピンホールがなくても)高い空間解像度が得られる。②励起する部位が限られるので、生体に対する光毒性が抑えられる。といった利点があり、さらには、励起に通常の半分のエネルギーの光(2倍の波長の光)を用いるために、組織の奥深くまで励起光が到達するので③深部組織の観察に適している。これら①~③のいずれも、「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。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深い部分でも観察できるが、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かなり深いことがある。このような場合、多(2)光子励起イメージングを用いると、組織の奥深くまで、高い三次元解像度で、しかも低侵襲で、観察することができる。

光イメージングの進歩—神経科学：構造と機能

神経科学は光イメージングの進歩が最も早くに応用された生物学の分野である。解剖学的構造が明確で、位置に固有の機能が存在する脳神経系では、組織をすり潰して機能分子や遺伝子を同定しようとする要素還元主義よりは、組織構築を残したまま、その生きた生理機能を捉えようとする試みが古くから行われていた。特に神経活動の根幹を担う電気現象は、膜電流測定・パッチクランプなどできわめて高い時間分解能で捉えることができ、活動電位の伝導やシナプス伝達の作動様式の発見、単一イオンチャネルの動態計測など、ノーベル医学・生理学賞を賑わす業績を数多く産み出してきた長く輝かしい歴史をもつ。光イメージング技術に関して、 Ca^{2+} 濃度測定をはじめとして、いち早く取りいれられていったが、これらは生理機能を測定する新しいツールの1つとして捉えられてきた(概念図2)。多光子励起観察については、その最初の生物応用はDenkらによって報告され(1995)¹⁾、内耳有毛細胞の微小 Ca^{2+} 動態を捉えた像は、研究者に大きな衝撃を与えた。これ以降、世界中で多光子励起観察が神経科学分野で展開されることになるが、均質で比較的励起光を透過させやすい脳神経組織では、現在、かなりの深部まで高い時空間分解能の観察が可能となっている(加藤らの稿)²⁾。

近年では、光学技術を「単に見る」ツールとして用いるだけでなく、それを用いて生命現象を人為操作して、その応答をみようとするアプローチがなされている(松崎の稿)³⁾。代表例が光照射により特定の物質を放出するケージド化合物や、光刺激に応答して開閉し Na^+ を透過させ膜興奮を誘導するチャンネルロドプシン(ChR2)等の利用であるが、これらにより



概念図2 神経科学と免疫学でのイメージング研究の進展

PubMedによる“imaging + neuroscience” (赤)と“imaging + immunology” (青)の検索結果 (論文本数)。神経科学ではイメージングを用いた報告が2000年頃から増加し、2006年以降ほぼ同じ水準を維持している。免疫学分野では2005年頃から増加し、2010年現在、なお漸増傾向を保っている

光刺激により任意の局所の膜興奮現象を操作することが可能となっている。これは、単に「見る」イメージングから「操る」イメージングへの大転換であり、こういった潮流も神経科学の分野でいち早く取り入れられている。

光イメージングの応用—免疫・癌研究：細胞の動態

今世紀に入り、多光子励起顕微鏡の性能と操作性が格段に進歩し、生体光イメージングが神経科学以外の研究分野でも応用されるようになった (概念図2)。血液・免疫系システムでは、多種多様な細胞の動きが制御されている。

細胞間のジャンクションがなく、基本的に1細胞毎に動いている免疫・血液系では、細胞の単離が容易であり、これまでモノクローナル抗体の登場やフローサイトメトリーの開発により、細胞集団を機能の異なるサブタイプに分類していくことが、免疫学研究の大きな流れであった。形態学的には「リンパ球」としか分類できないものを、その表面マーカーによって細かく分類し、それぞれの特殊機能を同定していく、ここ数十年の免疫学の進歩とは、ま

さに「分類学」にあったといえる。CD番号も300を超えた今や、免疫細胞の細分類化もかなり進み、プレーヤーはほぼ出揃った。これからは、このプレーヤー達がどのように働いているかを明らかにする段階となっている。最近、免疫学の分野で生体イメージングが積極的に取り入れられているのにはこのような背景があると考える。種々の組織・臓器での細胞動態イメージングや、特殊な蛍光リポーターマウスを用いた免疫細胞の追跡については、菊田らの稿、戸村の稿を参照されたい^{4) 5)}。

一方で、癌細胞も増殖・組織浸潤・遠隔転移と、免疫・血液細胞よりは若干スローではあるが細胞の動態が重要なシステムである。近年、癌研究の分野でもイメージング技術はきわめて重要性の高いツールとなってきている（今村らの稿）⁶⁾。癌細胞は*in vitro*での培養・蛍光リポーター遺伝子の導入が比較的容易であるので、イメージング研究を行ううえでは有利である。さらには骨、脂肪から肝臓にいたる各種臓器まで、光イメージングの応用領域は拡大を続けている（菊田らの稿）。

4 蛍光プローブの開発

2007年、下村博士らによるGFP発見がノーベル化学賞の受賞対象となり世間が沸いた。オワンクラゲに含まれる緑色蛍光タンパク質=GFPの発見は、その後予想を超えた発展を示し、生きた個体・組織において特定の細胞・分子を蛍光標識して追跡することを可能とした。これは、顕微鏡技術の開発と同じく、「生体イメージング」のための重要な基盤技術となった。その後、緑色以外のカラーリングや、光刺激によって色調が変化する蛍光タンパク質、FRETによる機能測定蛍光プローブの開発など、多くの発展系が登場している。これらの詳細とイメージング研究への応用については戸村の稿を参照されたい⁵⁾。

一方で、化学合成で作成される蛍光分子もイメージングの重要なツールである。占くはCa²⁺濃度で蛍光強度・波長が制御されるFluo-3やFura-2にはじまり、種々のイオン、pH、NO、活性酸素種など、多種多様な蛍光プローブが現在開発されている（浦野の稿）⁷⁾。化学蛍光プローブは、諸条件により蛍光のon/offのスイッチングが可能であり、細胞・分子の機能の可視化に有用である。また、一般に小分子であり生体への導入が容易であるので、ヒトの系のイメージングツールとしても有望である。

5 核医学イメージングーヒトへの応用

イメージング研究のヒトへの応用を考えるうえで、PETをはじめとする核医学イメージングは非常に重要なツールである（今泉の稿）⁸⁾。蛍光イメージングは、単一細胞・分子レベルを非常に高い時空間分解能で追うことのできる強力なツールであるが、光の到達深度には限界があり、生体の奥深い部分の観察には困難がある（2光子励起を用いても数百μm～1mmが限界）。実験動物であれば、1mmもあればかなり深いところまで見えるが、ヒトでは表面にごく近い部分しか見えない。ヒト体内での分子・細胞の動態を追跡する場合には、これまでから臨床検査としても使用され、確立した方法論を備えた核医学イメージングが有効である。核医学イメージングといえば、代謝回転を検出して、血流や癌・炎症などを検出するFDG (¹⁸F-fluorodeoxy glucose)-PETが有名であるが、最近では、特定のリガンドや抗体を

RI 標識することにより、免疫・血液系細胞の体内動態を追跡することが可能となってきている。核医学イメージングでは、RI 合成・使用の煩雑性、時空間解像度が不十分であるなどの問題点は残されているものの、実験動物を用いて得られた概念をヒト医学へとトランスレートしていく観点から欠かすことのできない可視化技術である。

5 イメージング研究の今後の展望

今後のイメージング研究はどのように発展するのであろうか。注目する細胞を蛍光標識し、個体そのものを生かしたままの状態での動態（細胞の動き・相互作用）を可視化することは、多光子励起などを利用してすでに可能となっている。さらに最近の超解像顕微鏡技術を組み合わせると、生きた個体・組織内での生きた細胞内での 1 分子の動態を追いかけることも現実味を帯びてくるかもしれない。また蛍光イメージングと核医学イメージングといった異なるモダリティがシームレスに有機統合し、実験モデルで示された細胞動態の概念を、ヒト医学でただちに検証できるようになることは、そう遠くない将来に実現可能となるであろう。

医師である筆者としては特に、蛍光生体イメージングの臨床応用による、新しい検査・診断技術の開発に注目したい。最近、微小癌を特異的に蛍光標識し、内視鏡や腹腔鏡での切除術のガイドとして利用する斬新な試みが報告されているが⁷⁾、今後このような試みは、癌以外の疾患、例えば循環器や免疫・血液疾患でも応用されていくことが強く期待される。蛍光の研究分野に関しては、これまで 2007 年にノーベル化学賞 (GFP)、2009 年にノーベル物理学賞 (CCD カメラ・光ファイバー) が授与されている。蛍光イメージング技術が、近い将来医学を変えることができれば、蛍光技術をテーマとしたノーベル医学・生理学賞の受賞も今後あるかもしれない。

いずれにしても、これから 5 ~ 10 年くらいでイメージング研究は爆発的に発展すると筆者は予想する。分子生物学・ジーンターゲット技術の登場と同様、今後 4D イメージング技術の進歩にキャッチアップできるかどうか、研究者としての帰趨を決すると同時に、それほどまでにイメージング技術が進歩した現在と未来、その豊富なツールを用いて何を見るのか、医学・生物学者としての炯眼が問われてくる。

6 おわりに—イメージング研究へのいざない

イメージング研究は、理屈抜きで楽しい。注目する生命現象を「目で見る」ことは、それを長年追いかけてきた研究者の心を震わせる。また、学問的価値を超えて、イメージング画像が描き出す、生物の内にある自然の美しさは、純粹に人に感動を与える力をもつ。さあ、百聞は一見に如かず、である。各論に進み、実際の 4D イメージング研究の世界をご覧いただきたい。本特集号では各稿に関連するイメージング動画を実験医学 online (<http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/>) 特設ページ上に数多く掲載している。これらにより、少しでも多くの読者がイメージング研究のすばらしさに触れて、興味のある生命システムのイメージングに挑戦していただければ、本特集の企画者として望外の幸せである。

文献

- 1) Denk, W. et al. : Neuron. 6 : 1311-1321. 1995
- 2) Takatsuru, Y. et al. : J. Neurosci. 29 : 10081-10086. 2009
- 3) Matsuzaki, M. et al. : Nature. 429 : 761-766. 2004
- 4) Ishii, M. et al. : Nature. 458 : 524-528. 2009
- 5) Tomura, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105 : 10871-10876. 2008
- 6) Hanyu, A. et al. : Cancer Sci. 100 : 2085-2092. 2009
- 7) Urano, Y. et al. : Nat. Med. 15 : 104-109. 2009
- 8) Imaizumi, M. et al. : Neuroimage. 39 : 1289-1298. 2008

石井 優

石井 優：1998年、大阪大学医学部医学科卒業。大阪大学医学系研究科助手、米国国立衛生研究所（NIH）客員研究員などを経て、2009年に大阪大学免疫学フロンティア研究センター准教授、11年より同教授。生きた骨の中を見てみたいという無謀な挑戦から、今の研究がはじまりました。現在では、骨に限らず、免疫・炎症組織や癌のイメージングにも取り組んでいますが、これからも「見ることによってはじめてわかる」新概念を明らかにして、永く人の記憶に残ってもらえるような仕事をしていきたいと考えています。



本特集の特設サイトを実験医学onlineにて公開中！

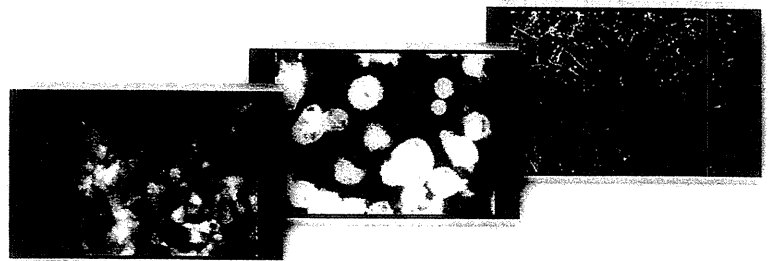
● 特集企画者インタビュー

本特集をご企画いただいた石井 優先生のインタビュー動画を配信



● 4Dイメージング動画を
全15本掲載

特集内のカメラマーク()
が付いた写真の関連動画を
ご覧いただけます



● プレゼント書籍のあたるアンケートを実施！

特設サイトのアンケートに答えていただいた方へ、抽選でイメージング関連書籍をプレゼント！

今すぐアクセス! www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/

▶▶ 詳しくは2702ページへ

免疫・血液系の2光子励起イメージング

“soft-wired network”の実体的解明

菊田順一, 久保厚子, 島津 裕, 石井 優

免疫・血液系はダイナミック（動的）なシステムである。多種多様な細胞が全身をくまなく遊走するが、適切な場所に適切なタイミングで会合しなければ機能を発揮できない。これら血液・免疫系システムにおける高度に統率された細胞遊走ネットワークは、神経系での固定した軸索ネットワーク（“hard-wired”）と比較して、“soft-wired”と形容される。このような動的システムの解明のためには、従来の組織学的（＝静的）な解析では不十分であり、低侵襲で深部まで高い時空間解像度で生きた組織の観察が可能な「2光子励起イメージング」が近年活用されている。本稿では特に当研究室で行っている研究成果を中心に、新しいイメージング技術によって明らかになった新知見について紹介する。

キーワード：細胞ダイナミクス, soft-wired network, 2光子励起顕微鏡, 免疫細胞, ケモタキシス

はじめに

動物の本質は「動き」にある。生体内においても、多彩な生命活動の維持のためには、さまざまな細胞がそれぞれ適切な場所に適切なタイミングで移動・遊走し、活動拠点を正確に定めることがきわめて重要である。典型的な例は免疫・血液系システムであり、感染局所や全身をくまなく哨戒する好中球やマクロファージと、細胞性免疫を担うリンパ球が、リンパ組織間内の適切な微小環境で会合し、互いに情報交換することにより、正常な免疫機能が維持されている。これら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に適切な時間に存在しなければ、十分な機能を発揮できない。これら免疫・血液系システムにおけるシステム化された細胞遊走ネットワーク

は“soft-wired network”と呼ばれる。

従来の組織・形態学の解析では、注目する組織・臓器を「固定」して観察していた。いわば「生体」を「死体」にして観察していたので、細胞の動きに関する情報を得ることはできなかった。近年、低侵襲で深部組織の観察に適した「2光子励起顕微鏡」の登場により、生体を「生きたまま」観察することで、*in vivo*での細胞動態・soft-wired networkをリアルタイムで解析することが可能となってきた^{1,2)}。2光子励起イメージングの生物学への応用は、当初は蛍光イメージングや電気生理などの機能測定において先行していた神経科学の研究分野で応用されていたが³⁾、近年になり、免疫・血液系でのsoft-wired networkの解析に用いられ、新たな研究成果が続々と報告されつつある。

Intravital imaging of “soft-wired network” in the fields of hematology and immunology

Junichi Kikuta/Atsuko Kubo/Yutaka Shimazu/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)

生体2光子励起イメージングの実際

2光子励起顕微鏡の原理については、(加藤らの稿)を参考されたい。実際に2光子励起を用いた「生体イメージング」としては「tissue explant imaging」と「intravital imaging」に大別できる(両方とも適切な邦訳がない)。「tissue explant imaging」では、実験動物を屠殺して注目する組織・臓器を取り出して、培養液中で生かしたまま観察する方法である。本邦でも2000年頃から、生理学研究所(現 東京大学)の河西らによって、脳や内分泌腺のtissue explant two-photon imagingが積極的に行われてきた^{3) 4)}。

一方、「intravital imaging」では、実験動物を麻酔下で生かしたまま、観察したい組織・臓器を手術的に露出して観察する。方法論的には「tissue explant」より困難であり、臓器・組織によってはアプローチが困難であるが多くの利点がある。特に、動物を生かしているので循環血流が保たれるメリットは非常に大きい。血流があることにより、観察している組織を完全に生理的な環境に保つことができ、また血管と組織間での細胞の流入を捉えることもできる。これは、特に免疫・血液系のように、生体内での血流を介した細胞動態が重要なシステム(soft-wired network)の解析において威力を発揮する。2002年頃から、海外の複数のラボによって「intravital imaging」によるリンパ節内での免疫動態解析がなされるようになった^{1) 2)}。その後、方法論の改良により種々の組織・臓器の「intravital imaging」が試みられてきたが、われわれは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世界に先駆けて開発した⁵⁾。

リンパ節の生体2光子励起イメージング (図1)

リンパ節は、末梢で抗原を捕捉した樹状細胞(抗原提示細胞)が、T細胞などに情報を伝達する免疫現象の中心場である。2002年に、米国の複数の研究室で、2光子励起顕微鏡を用いた樹状細胞—T細胞相互作用の*in vivo*で動的可視化の第一報がなされて以来、免疫

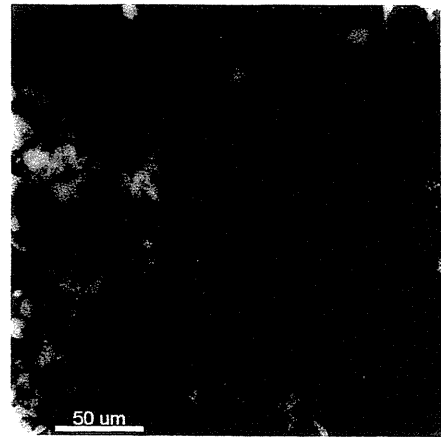


図1 リンパ節での生体2光子励起イメージング
異なる種類のTリンパ球をそれぞれ赤色と青色で、樹状細胞を緑色で標識している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する。スケールバー=50 μ m

システムのイメージング研究は大きく進展してきた。特に、鼠径部(inguinal)や膝窩部(popliteal)のリンパ節のintravitalやexplant imagingの方法論はほぼ確立した。これら動的な観察により、樹状細胞—T細胞のcontact timeやその抗原特異性・抗原量依存性^{1) 2)}、T細胞—B細胞間や樹状細胞—B細胞間作用⁶⁾、リンパ節内での異なるコンパートメント(濾胞や辺縁部など)での細胞動態の差異⁷⁾などについて、さまざまな新事実が明らかにされてきた。われわれも、リンパ節内での調節性T細胞による、T細胞活性化の抑制メカニズムを2光子励起観察により解析している。

骨組織の生体2光子励起イメージング (図2)

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きわめて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨を、カルシウムキレート剤に1週間ほど漬けて脱灰後、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「形態」や「分子発現」(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情

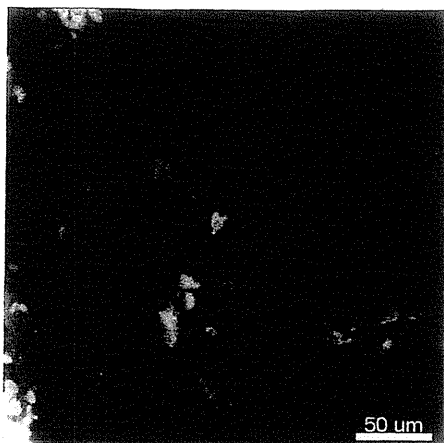


図2 骨組織内での生体2光子励起イメージング
破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP
発現細胞)が緑色に標識されており、毛細血管を
Texas Redデキストラン(70 kD)で赤色に標識
している。青色は自家蛍光のため骨を示している。
スケールバー=50 μm (文献12より転載)



図3 皮膚での生体2光子励起イメージング
観察部位をLPS刺激して30分後に観察。顆粒球
(LysM-EGFP発現細胞)が緑色に標識されており、毛
細血管をTexas Redデキストラン(70 kD)で赤色に
標識している。LPS刺激後、多くの白血球が血管内に
動員されている様子がわかる。スケールバー=50 μm

報が欠落していた。それは細胞の「動き」であった。細胞の動きを見るためには、どうしても生きた細胞を生きた組織の中で観察する必要がある。さらに、骨髓腔のように、豊富な血管床による血流を保ったままそこで流入・流出する細胞の動きを捉えることが重要な場所では、「摘出して生かした(explant)」骨組織ではなく、「生きたままの個体内(intravital)」の骨組織を観察する必要があった。

われわれは骨組織内で古い骨を破壊・吸収する、破骨細胞という特殊な細胞の動態に注目して研究を行っていたが、*in vitro*培養系や固定した骨組織解析ではなく、生きた骨の中で生きた破骨細胞の動態を解析したいという動機に駆られて、骨組織の2光子励起イメージングに挑戦した。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、2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かった。われわれは観察システムを改良し、骨基質が比較的薄い(骨表面から髄腔内まで約80~120 μm)マウス頭頂骨を用いて、生きた骨髓内を外部から非侵襲的に高解像度で観察できる実験系を確立した⁵⁾⁸⁾。これを用いて、破骨細胞の元となる前駆細胞が、血中から骨表面へ移動したり、逆に再還流

する様子をリアルタイムで可視化し、この動態を制御するケモカイン・脂質メディエーターを同定した⁵⁾⁹⁾。

骨髓は謎めいたブラックボックスである。雑多な血液系・間葉系細胞が「所狭しと詰め込まれている」。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。しかもそれはよほど重要なもののように、硬くて頑丈な入れ物(骨皮質)で囲まれている。血液幹細胞の自己複製や血球分化など、骨髓機能の生理・病理には、未だ不明な点が数多く残されているが、2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。

その他の組織・臓器の生体イメージング

① 皮膚(図3)

皮膚は生体内で外界と接する部分であり、感染防御の砦となっている。表皮や真皮層には、それぞれランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞などのさまざまな抗原提示細胞があり、また感染時には好中球やT細胞が多数集積する¹⁰⁾¹¹⁾。また、顕微鏡観察の面からも比較的アプローチがしやすく、2光子励起イメージングの対

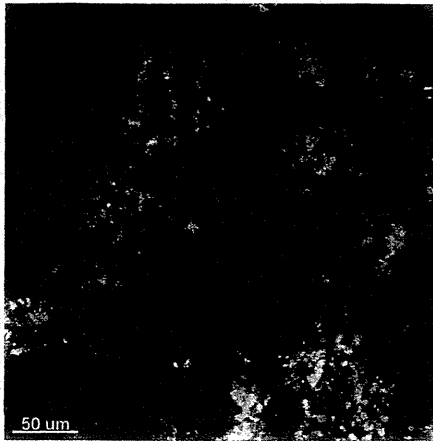


図4 腸管での生体2光子励起イメージング
顆粒球 (LysM-EGFP発現細胞) が緑色に標識されてお
り、毛細血管をTexas Redデキストラン (70 kD) で赤
色に、微柔毛構造をHoechstで青色に標識している。
スケールバー=50 μm

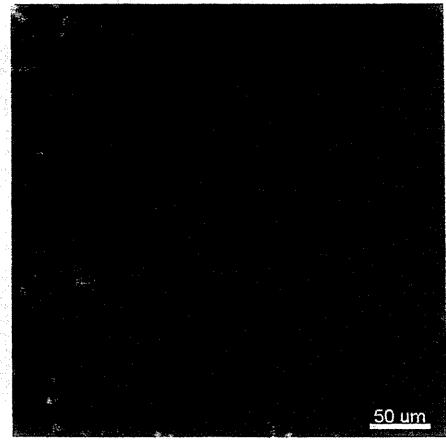


図5 呼吸器での生体2光子励起イメージング
顆粒球 (LysM-EGFP発現細胞) が緑色に標識されて
おり、毛細血管をTexas Redデキストラン (70
kD) で赤色に標識している。スケールバー=50 μm

象としても魅力的である。今後、皮膚のイメージング研究はますます発展していくことが期待される。

② 腸 (図4)

腸管の内部はトポロジーとしては生体の外部であり、やはり感染防御の要衝である。一方で、腸管内には正常な腸内細菌叢が存在し、特有の免疫寛容が成立している。一方で腹腔内で常に蠕動運動をくり返す腸管は、イメージング対象としては適当でなく、2光子励起イメージングを用いた研究はこれまで1報あるのみである¹²⁾。しかしながら、腸管免疫系での細胞動態、腸内細菌との相互作用など、生体イメージングを用いた解析が望まれるテーマに富んでおり、今後の進展が強く期待される分野である。われわれも腸管の2光子励起イメージング系の開発に取り組んでいる。

③ 呼吸器 (図5)

気管・肺も外界と直接接し、感染の多発部位である。感染免疫やアレルギーの研究対象としては興味深いのが、実験動物が生きている (=呼吸する) 限り動き続けるので、生体イメージングには不向きである。それでも最近、explantやintravitalでのイメージングが挑戦されている¹³⁾。

④ 肝臓 (図6)

栄養分の貯蔵・胆汁産生・解毒など、マルチタスク

な臓器である肝臓には、Kupffer細胞などの貪食系免疫細胞が多彩な機能を果たしている。小規模の開腹術で容易に固定されることから、イメージングには比較的適した臓器であり、感染免疫のイメージングなどに汎用されている¹⁴⁾。

⑤ 脂肪組織 (図7)

近年、生活習慣病などの基礎病態として慢性炎症が注目されており、例えば肥満時の脂肪組織では炎症性マクロファージなどさまざまな免疫細胞が侵入し、病態の形成・増悪に関与していることがトピックとなっている。この動的システムの解析のために、脂肪組織の生体イメージングが最近行われており、種々の免疫・炎症細胞の時系列が明らかにされている¹⁵⁾。イメージングとしては、アプローチの容易さから内臓脂肪の一種である精巣上脂肪 (epididymal fat) が汎用されている。

その他、脾臓¹⁶⁾や腎臓¹⁷⁾、脊髄¹⁸⁾などの生体2光子励起イメージングが行われており、われわれは関節炎の生体イメージングにも挑戦している。われわれはよく「○○の組織でのイメージングが可能か?」といった質問を受けるが、可能か不可能か、と言われれば「難しいかもしれないが、不可能ではない」と答えるようにしている。新しいシステムのイメージング系構築は、得られる美しい動画の世界とはうらはらで、泥臭い作

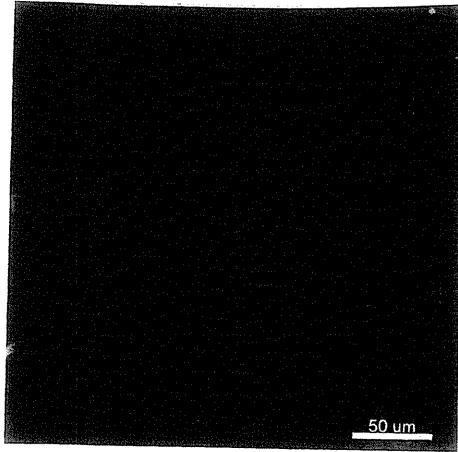


図6 肝臓での生体2光子励起イメージング
顆粒球 (LysM-EGFP発現細胞) が緑色に標識されてお
り、核をHoechstで青色に標識している。スケール
バー= 50 μm

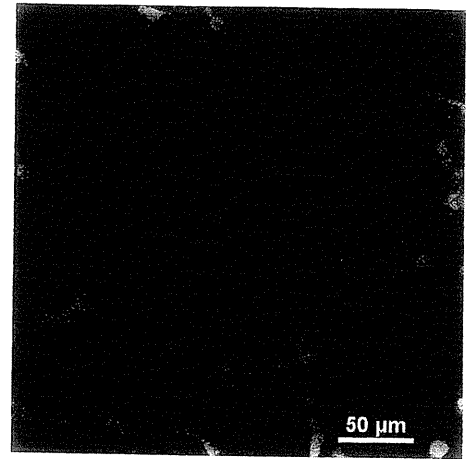


図7 脂肪組織での生体2光子励起イメージング
顆粒球 (LysM-EGFP発現細胞) が緑色に標識されて
おり、脂肪滴をBODIPYで赤色に、核をHoechstで
青色に標識している。スケールバー= 50 μm

業の連続である。しかし、それを乗り越えたときの達成感
は替え難い。

おわりに

生体2光子励起イメージングは、これまでの位置情報
(x/y/z: 3D) のみならず、生命現象の時間軸 (t)
を含めた4D情報が得られる点で画期的な方法論であ
る。神経科学からはじまり、免疫・血液学へと応用さ
れてきた本技術は、さらに多くの生命科学の領域で適
用が広がり、これから5~10年くらいでイメージング
研究はさらに急速に進歩すると予想され、今後の生命
科学研究に革新をもたらすと期待される。

文献

- 1) Stoll, S. et al. : Science, 296 : 1873-1876, 2002
- 2) Miller, M. J. et al. : Science, 296 : 1869-1873, 2002
- 3) Matsuzaki, M. et al. : Nat. Neurosci., 4 : 1086-1092, 2001
- 4) Nemoto, T. et al. : Nat. Cell Biol., 3 : 253-258, 2001

- 5) Ishii, M. et al. : Nature, 458 : 524-528, 2009
- 6) Qi, H. et al. : Science, 312 : 1672-1676, 2006
- 7) Allen, C. D. et al. : Immunity, 27 : 190-202, 2007
- 8) Klauschen, F. et al. : Nat. Protoc., 4 : 1305-1311, 2009
- 9) Ishii, M. et al. : J. Exp. Med., 207 : 2793-2798, 2010
- 10) Ng, L. G. et al. : PLoS Pathog., 4 : e1000222, 2008
- 11) Filippe-Simon, C. et al. : J. Cell Biol., 160 : 101-110, 2002
- 12) Chiappa, M. et al. : J. Exp. Med., 203 : 2841-2852, 2006
- 13) Kreisler, D. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 : 18073-18078, 2010
- 14) Egen, J. G. et al. : Immunity, 28 : 271-284, 2008
- 15) Nishimura, S. et al. : J. Clin. Invest., 118 : 710-721, 2008
- 16) Bajenoff, M. et al. : J. Immunol., 181 : 3947-3954, 2008
- 17) Dunn, K. W. et al. : Curr. Protoc. Cytom., Chapter 12 : Unit12.9, 2007
- 18) Kawakami, N. et al. : J. Exp. Med., 201 : 1805-1814, 2005

菊田順一 : 2006年、大阪大学医学部医学科卒業。国立病院機構大阪南医療センターにて初期研修。リウマチ科後期研修を経て、'09年より大阪大学大学院医学系研究科博士課程在籍(石井優教授)。主な研究テーマは、「生体2光子励起イメージングによる破骨細胞分化・機能の解明」。

生体イメージングとスフィンゴ脂質

石井 優

1. はじめに ～生物学とイメージングの歩み

「イメージング」とは、見えないものを見えるようにする作業である。『Seeing is believing (百聞は一見に如かず)』と言われるように、「見る」ことは人間の五感の中でも特別な位置を占めている。実際、研究の世界でも「見た」ことによって初めて「分かった」と感じ、新しいアイデアの湧出・画期的なコンセプトの発見へとつながった例は枚挙にいとまがない。逆に、いくら証拠を積み重ねても「見ない」限りは、『群盲象を撫でる』が如く、しっくりと理解できないような感じがしてしまう。自然科学・生物学における顕微鏡・イメージング技術の進歩の歴史は、まさに「見えないものを見えるようにしたい」という人間の飽くなき挑戦の歴史である。

17世紀後半、オランダの眼鏡職人であったレーウェンフックが顕微鏡を試作し、イギリスの学者ロバート・フックがこれを改良して生物のミクロの世界を初めて観察した。これは、生物の基本構成単位である「細胞」の発見をもたらし、近代生物学の幕開けへとつながった。それ以降、イメージング技術の進歩は、生物学の進歩と常に歩調を合わせて進んできたと言える。

19世紀後半には、現在の顕微鏡の原型はほぼ確立していたが、20世紀に入りイメージング技術は、さらに大きな発展を遂げていく。その発展は一方のみではなく、(少なくとも) 2つの方向があったと筆者は考える。その一つは「より微細なものを見る」挑戦である。いわゆる「解像度」は異なる2点間の識別能 (d) として計れるが、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、エルンスト・アッペによって理論的に示されていた ($d \propto \lambda / \text{N.A.}$)。つまり、波長の短い光を (開口数の大きな対物レンズで) 観察に使用の方が解像度は大きくなるが、光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 (この詳細については別稿に譲る)。さらに最近になって、光を用いながらも「アッペの限界」を打ち破り、電子顕微鏡に匹敵する解像度を有する驚くべき光学顕微鏡が開発され (STED, SIM, STORMなど)、生きた細胞の中で、単一の分子レベルの観察が可能となってきている。このように「より微細なものを見る」という挑戦は、過去300年以上に渡って、生物イメージング研究の中心テーマであり続けている。

その一方で、また別の方向性でのイメージング技術の進化があった。それは「より深く・より鮮明に・生きた組織で」であり、この究極型が「多光子励起顕微鏡」である。

2. 多光子励起顕微鏡の開発と応用

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、自然にまた基底状態へと戻っていく (図1)。この際、

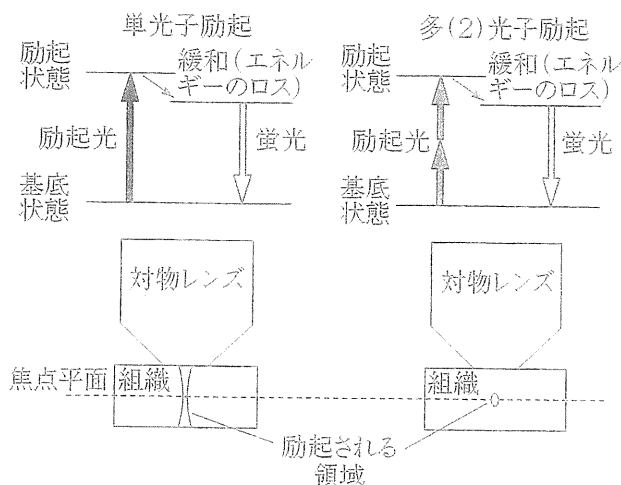


図1 単光子励起と多光子励起

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。

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。ところで、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(ストークスシフトと呼ぶ)。この波長の差を利用して、半透鏡(ダイクロイックミラー)やフィルターを使って光路を分けて観察するのが蛍光顕微鏡である。

多光子励起顕微鏡の最大の特徴は、蛍光観察の際に、光子1個ではなく、複数(通常は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点にある。光子1個 対 蛍光分子1個 による1対1反応に比べて、複数の光子による励起(多光子励起)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、ということ、ドイツの物理学者Goeppert-Mayerが彼女の学位論文の中で初めて理論的に示した(1931年)。しかしながら、この希少な現象を実験物理学的に実証するまでには、さらに30年もの年月が費やされた(Abella, 1962年)。

ところで、この「多光子励起」の現象は、光子密度が異常に高い場所でのみ起こる。顕微鏡観察で言えば、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(=多光子励起顕微鏡)」を作ったのが、Cornell大学のDenkとWebbらであった(1990年)^{1,2)}。

この型破りな顕微鏡は、以下のような様々な長所を備えている。

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780~1000nm)。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極めて小さく抑えることができる。

(これら以外にも多光子励起イメージングには、光学的な様々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、パラフィンやコンパウンドで包埋して薄切すれば

（「物理的スライス」という）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かなり深いことがある。このような場合、多（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、観察することができる。

3. 生きた組織・個体の中での生きた細胞の機能を見る、多光子励起イメージングの実際

多光子励起イメージングの生物応用はDenkとWebbらのグループによって1990年に第1報がもたらされたが¹⁾、引き続いてDenkらが1995年に報告した内耳有毛細胞のciliaでの微小カルシウム動態の論文²⁾は、研究者に大きな衝撃を与えた。これ以降、世界中で多光子励起観察が展開されることになる。

ところで、いわゆる「生体多光子励起イメージング」には大きく2種類ある。それは「tissue explants imaging」と「intravital imaging」である（両方とも適切な邦訳がない）。「tissue explants imaging」では、実験動物を屠殺して注目する組織・臓器を取り出して、酸素化した培養液中で生かしたまま観察する方法である。本邦でも2000年頃から、生理学研究所（現東京大学）の河西らによって、脳や内分泌腺のtissue-explant two-photon imagingが積極的になされてきた^{3, 4)}。

一方、「intravital imaging」では、実験動物を麻酔下で生かしたまま、観察したい組織・臓器を手術的に露出して観察する。方法論的には「tissue-explant」より困難であり、臓器・組織によってはアプローチがきわめて困難なことがあるが多くの利点があり、特に、動物を生かしているので循環血流が保たれる利点は非常に大きい。「tissue-explant」で取り出した組織にも血管はあるが、血流は流れていない。血流があることにより、観察している組織を完全に生理的な環境に保つことができ、また血管と組織間での細胞の流入を捉えることもできる。これは、特に免疫・血液系のように、生体内での血流を介した細胞の動態が重要なシステムの解析において威力を発揮する。2002年頃から、海外の複数のラボによって「intravital imaging」によるリンパ節内での免疫動

態解析がなされるようになった^{5, 6)}。その後、方法論の改良により種々の組織・臓器の「intravital imaging」が試みられてきたが、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世界に先駆けて開発した⁷⁾。

4. 生体骨組織・骨髄内の多光子励起イメージング

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極めて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨を、カルシウムキレート剤に1週間ほど漬けて脱灰し、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「形態」や「分子発現」（免疫染色による）を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の「動き」であった。細胞の動きを見るためには、どうしても生きた細胞を生きた組織の中で観察する必要がある。さらに、骨髄腔のように、豊富な血管床による血流を保ったまま、そこで流入・流出する細胞の動きを捉えることが重要な場所では、「摘出して生かした」骨組織ではなく、「生きたままの個体内」の骨組織を観察する必要があった。

筆者は骨組織内で古い骨を破壊・吸収する、破骨細胞という特殊な細胞の動態に注目して研究を行っていたが、*in vitro*培養系や固定した骨組織解析ではなく、生きた骨の中で生きた破骨細胞の動態を解析したいという動機に駆られて、骨組織の2光子励起イメージングに挑戦した。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、2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かった。筆者は観察システムを改良し、骨基質が比較的薄い（骨表面から髄腔内まで約80～120 μm）マウス頭頂骨を用いて、生きた骨髄内を外部から非侵襲的に高解像度で観察できる実験系を確立した（図2）^{7, 8)}。これを用いて、破骨細胞の元となる前駆細胞が、血中から骨表面へ移動したり、逆に再還流する様子をリアルタイムで可視化し、この動態を制御する脂質メディエーターとしてスフィンゴシン1-リン酸を同定した⁷⁾。

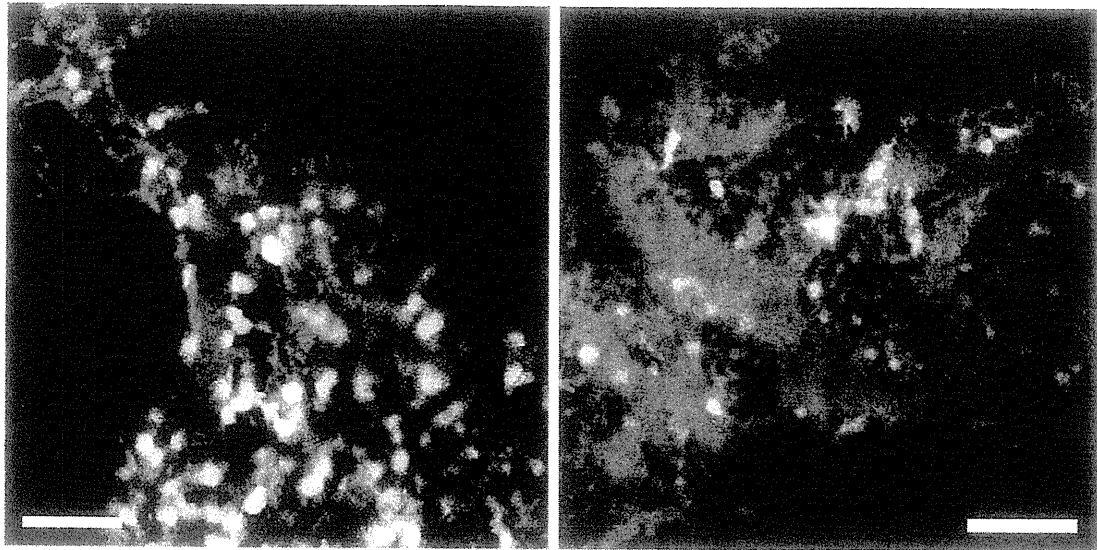


図2 骨組織（骨髄内）の生体多光子励起イメージング

顆粒球（LysM⁺：左側）および単球（CX₃CR1⁺：右側）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 を 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 (Ishii et al.: Nature, 2009 より改編。動画については筆者HPなどを参照)。スケールバー：30 μm。

5. スフィンゴシン1-リン酸による破骨細胞の動態制御

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。

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-κB ligand) が、破骨細胞の分化・成熟に必須であること、RANKL刺激はNF-κBやNF-AT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。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」「一旦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、

破骨細胞およびその前駆細胞の生きた骨組織内での動態については全く明らかにされてこなかった。

我々は、これらの謎に迫るべく、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たが、中でも我々が注目したのは、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スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) であった^{9, 10)}。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リナーゼが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。

我々は、破骨前駆細胞がS1Pに対する受容体 (S1PR1) 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、2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^{7, 8)}。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、定常状態では骨組織および骨表面付近にとどまり、ほ

ほとんど動かなかったが、S1P₁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、多くの細胞が血管へと移行していく様子が観察された（(図3)、動画は著者HP<<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp>>を参照）。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が亢進することが証明された。

さらに我々は、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

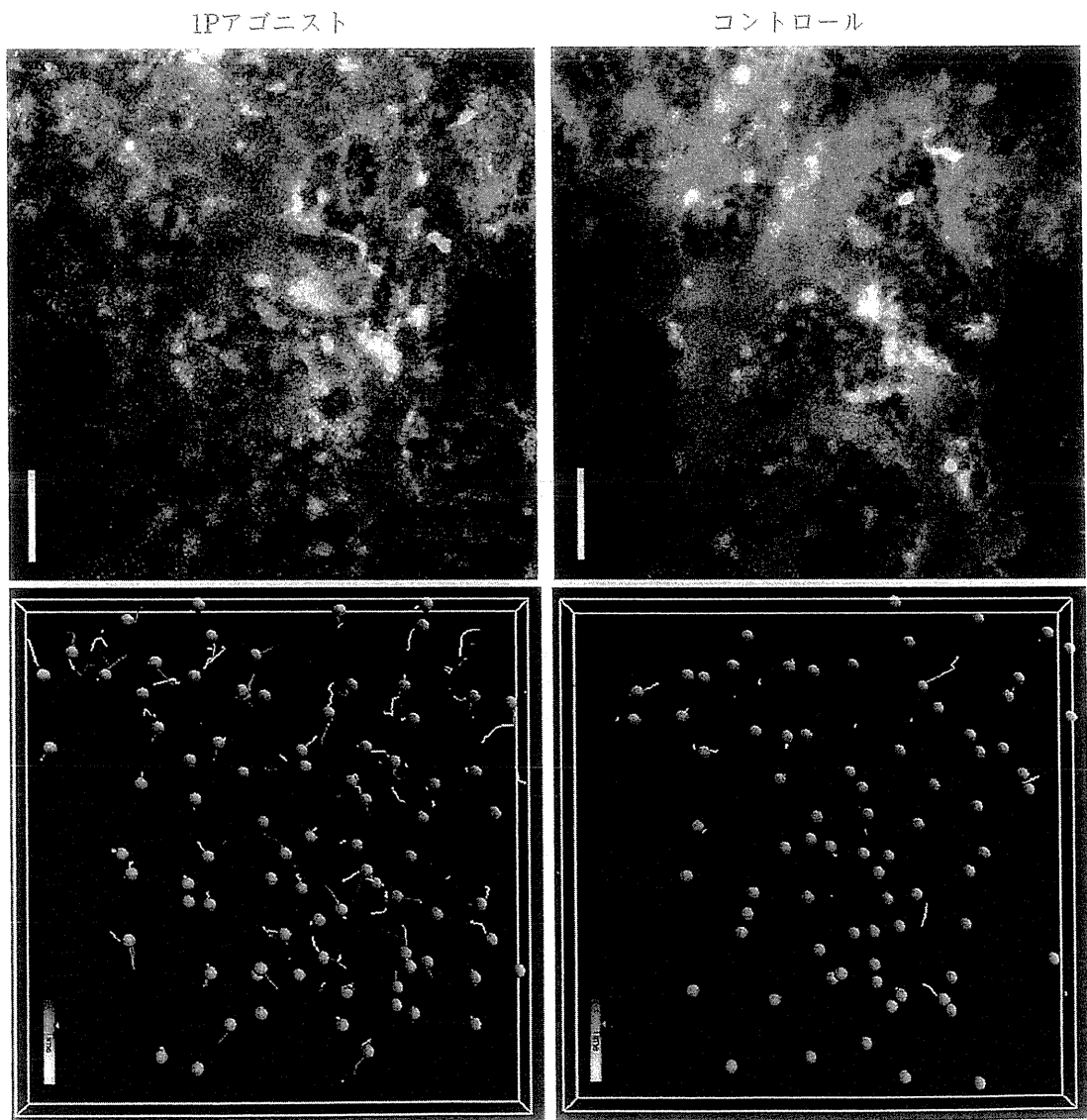


図3 破骨細胞動態の生体イメージング

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（～ 70kDa）を静注して血管構造を赤色でラベルして、それぞれ可視可している（左）。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（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）、S1P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。

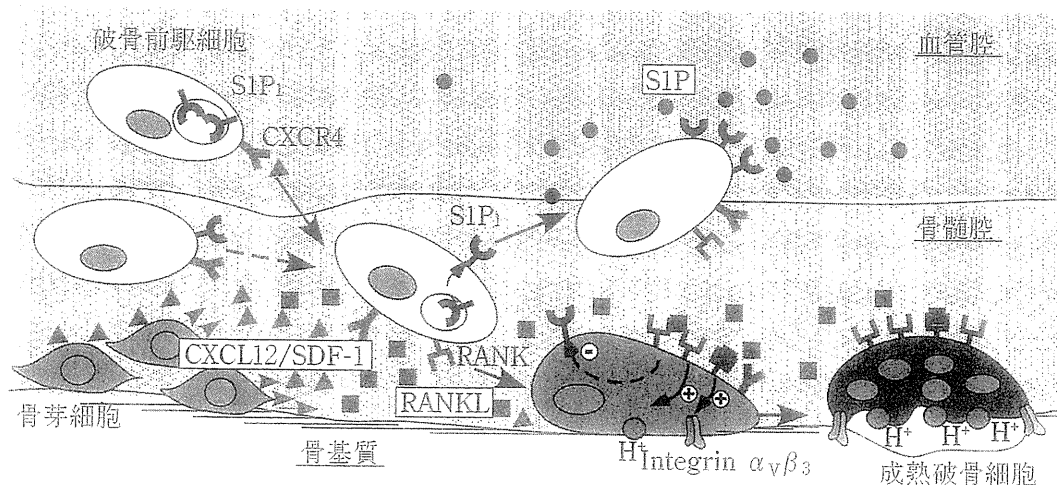


図4 スフィンゴ脂質による破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

単球系破骨前駆細胞は、骨髓内にあるケモカイン SDF-1/CXCL12 によって骨質内へ引き寄せられ、逆に血中の SIP 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。

RANKLの刺激を受け成熟する(図4)。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。

参考文献

- 1) Denk W, Strickler JH, Webb WW.: *Science*. 248: 73-76, (1990).
- 2) Denk W, Holt JR, Shepherd GM.: Corey DP. *Neuron* 6, 1311-1321 (1995).
- 3) Nemoto T, Kimura R, Ito K, Tachikawa A, Miyashita Y, Iino M, Kasai H.: *Nature Cell Biol.* 3: 253-258, (2001).
- 4) Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H.: *Nature Neurosci.* 4: 1086-1092, (2001).
- 5) Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN.: *Science*. 296: 1873-1876, (2002).
- 6) Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD.: *Science*. 296: 1869-1873, (2002).
- 7) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN.: *Nature*. 458: 524-528, (2009).
- 8) Klauschen F, Ishii M, Qi H, Bajénoff M, Egen JG,

Germain RN, Meier-Schellersheim M.: *Nature Protoc.* 4: 1305-1311, (2009).

9) Rosen H, *et al.*: Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5: 560-570, (2005).

10) Cyster JG: Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23:127-159, (2005).

内科疾患の分子イメージング

骨・免疫系の細胞動態イメージング

島津 裕^{*1*2} 菊田 順一^{*1*2} 久保厚子^{*1*2}
石井 優^{**1*2}

要 旨

生体イメージングは、生体内で起こっている現象をリアルタイムでとらえることができる点で、非常に強力な研究ツールと言える。このため、特に細胞の動態および相互関係が重要な免疫・血液系の研究分野で大きく発展してきた。本稿では当研究室で行っている骨髄や免疫組織のイメージング研究の実際について概説し、それらによって得られた新知見について紹介するとともに、生体イメージングの限界と今後の展開についても述べたい。

はじめに

現在でも、免疫学の分野では従来からの分子生物学的な手法が主流である。これらの手法により、個々の遺伝子が *in vitro* から *in vivo* においてどのような役割を果たしているかが明らかにされてきた。ある特定の遺伝子を過剰発現させたり、あるいはその機能を欠失させることにより、ある遺伝子から出発し、途中の経路地点である遺伝子、終着地点である表現型と、一連の流れが解明されてきた。ただこの手法では、実際の生体内でどのような細胞間で相互作用が起こり、その結果どのような事象が引き起こされているのか、時間軸を含めた4次元の情報が全く欠如して

いた。特に免疫系は、細胞の動きおよび相互関係が鍵となるシステムと言える。リンパ球、好中球、単球などの血球系が全身をくまなく循環し、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。この細胞の移動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。このネットワークの解析のためにイメージングの手法が開発され、近年、生体イメージングとしてしばしば取り上げられるようになった。

生体イメージングの中心的方法論である多光子励起観察の歴史は、1930年代 Goppert-Meier らによって理論的に提唱されたことに始まる。しかし、実際に多光子励起が実験的に証明されるには、強力なパルス波の出力可能なレーザーが開発される1961年まで待たなければいけなかった。その後、2光子励起顕微鏡観察をさらに進歩させ、生体内での組

*1 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 同 教授

*2 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業
(CREST)

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

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リナ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）。

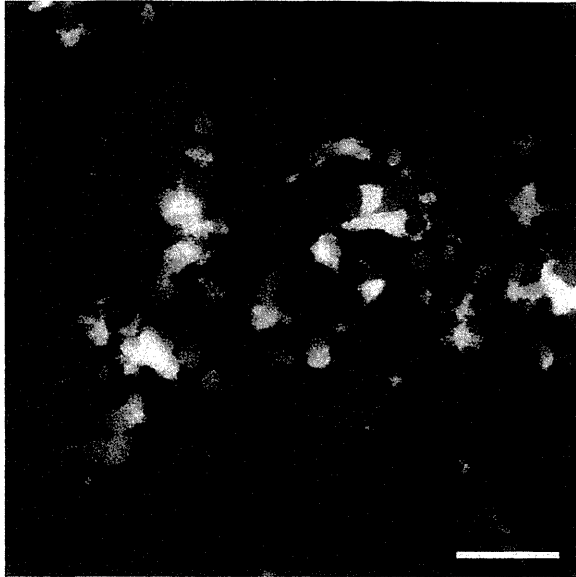
さらに、破骨前駆細胞を含む単球系細胞（CD11b⁺）に特異的にS1PR1を欠損させたマウスを用いて、同様に骨組織内部の生体イメージングを行った。S1PR1を欠損した破骨前駆細胞は骨組織にとどまるため、骨表面の成熟破骨細胞の数が増加し骨吸収が促進されることが分かった。

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。

破骨前駆細胞の遊走・位置決め（図1）

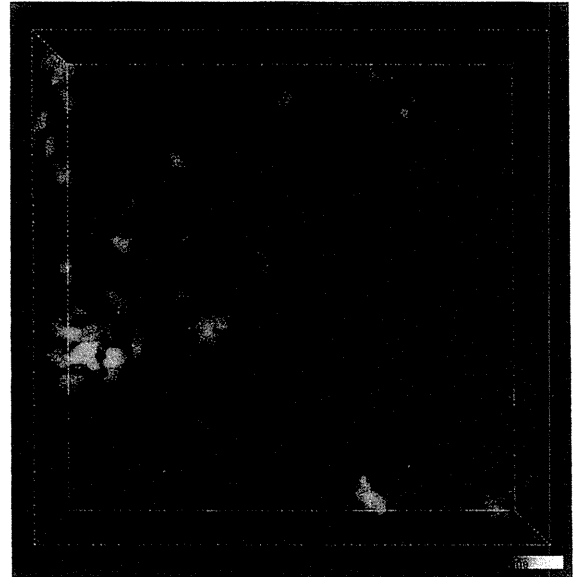
免疫の分野でもリンパ節のイメージングの研究は早く、2002年 Miller や Bousso らによって精力的に明らかにされてきた¹⁾²⁾。彼ら

図1 骨組織（骨髓内）の生体イメージング



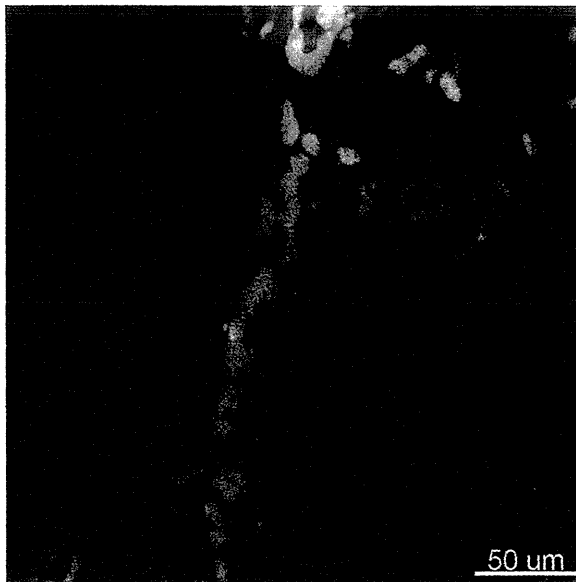
単球系細胞が緑色蛍光（GFP）を発現している遺伝子改変マウスを用いて、骨髓腔を生体2光子励起顕微鏡で観察した像である。赤色蛍光（Texas Red）を結合させた高分子デキストランをマウスの尾静脈より注射し、骨髓腔内の血管網を描出している。青色は骨組織を表す。スケールバー：30 μ m

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⁹⁾。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。

皮膚のイメージング (図 5)

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。

その他の部位のイメージング

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、腸管を生きた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⁾。

生体イメージングの限界と今後の展開

「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.