

蛍光生体イメージングによる in vivo 細胞動態の解析



医療と技術

石井 優*

Intravital multi-photon imaging of immune cell dynamics

Key Words : multiphoton microscopy, immune system, bone marrow migration, osteoclast

はじめに

蛍光生体イメージングとは、生きた組織・臓器（できれば個体そのものを生かして）の内部を観察し、そこで生きた細胞・分子の動態をリアルタイムで解析する新しい研究手法である。近年の光学機器・蛍光イメージングの技術革新により、今や様々な組織・臓器における、多種多様な生命現象に「蛍光生体イメージング」を適用することで、生きた細胞・分子の動き、「生命（いのち）の姿」を描出することが可能となってきた。静態から動態へ、今や生命科学研究は確実に、不連続な新しいフェーズに突入した。

1. To see the unseen...

我々人類が「目には見えないものを見る」努力を始めて、300年超が経過した。17世紀の終わりに、オランダのレンズ職人であったレーウエンフックは、自ら試作した顕微鏡を用いて「目には見えないが存在する小さな生物（＝微生物）」を観察し、これが様々な病気を引き起こしていることを発見した。これが「微生物学」の先駆けであると言われている。また同時代に、イギリスのロバート・フックは、やはり独自に開発した顕微鏡を用いて、「目には見えないが存在する生命体の基本単位」としての「細胞」を

同定した。いずれも、「目には見えないもの」を見ることにより、生命科学上の新しいコンセプトを創出してきた。以降、生命科学の発展は、常に「見る」技術の開発とともに歩んできた。

光学顕微鏡の基本構造は19世紀末にほぼ完成したと言われている。この当時の顕微鏡には対物レンズと接眼レンズが鏡筒で繋がれた構造をしており、基本的に現在の顕微鏡のそれと同じである。この当時、世界で最高レベルの顕微鏡技術を有していたのはドイツであったが、この高い顕微鏡技術が、やはり当時世界最高レベルの病理学（＝病気の組織や細胞を観察してその原因を探る学問）を支えていた（ウィルヒョーやエールリッヒらが活躍していた時代）。

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。その発展は一方向だけではなく、多角的に広がっていった。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）観察に使用する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。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ており（超解像顕微鏡、2014年ノーベル化学賞受賞テーマ）、生きた細胞の中で、単一の分子レベルの



* Masaru ISHII

1973年5月生
大阪大学医学部医学科卒（1998年）
現在、大阪大学大学院生命機能研究科/
医学系研究科 免疫細胞生物学教室
教授 医学博士 免疫学・細胞生物学・
リウマチ学
TEL : 06-6879-3880
FAX : 06-6879-3889
E-mail : mishii@icb.med.osaka-u.ac.jp

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、「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。

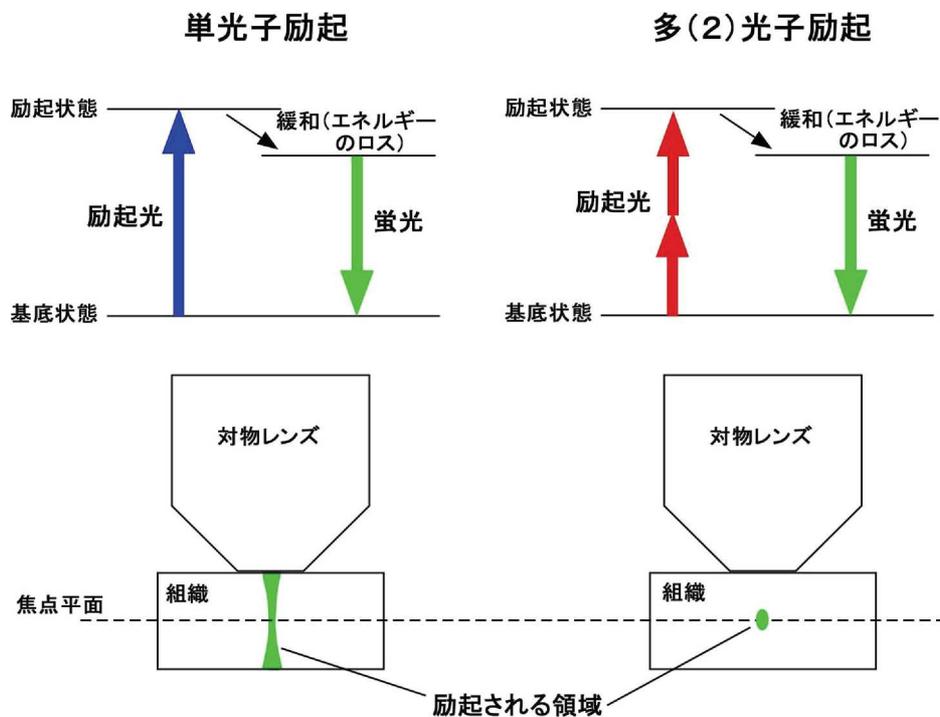
2. 多光子励起顕微鏡の開発と応用

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、自然にまた励起状態へと戻っていく【図1】。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。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）。一般に蛍光顕微鏡では、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している。

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（単光子励起）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、ということをも、ドイツの物理学者 Göppert-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



【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。

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【図1参照】。

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信号を除去して、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780~1,000nm)。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」は「tissue explants imaging」と「intravital imaging」に大別できる(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)}。

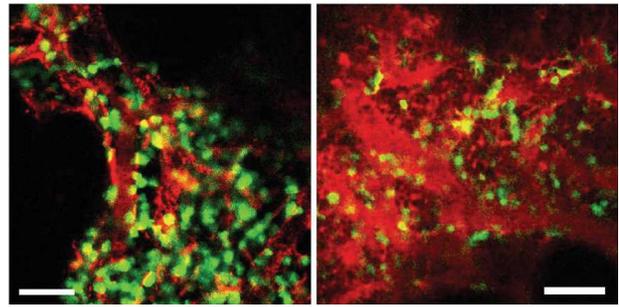
一方、「intravital imaging」では、実験動物を麻酔下で生かしたまま、観察したい組織・臓器を手術的に露出して観察する。方法論的には「tissue-explant」より困難であり、臓器・組織によってはアプローチがきわめて困難なことがあるが多くの利点があり、特に、動物を生かしているので循環血流が保たれるメリットは非常に大きい。「tissue-explant」で取り出した組織にも血管はあるが、血流は流れていない。血流があることにより、観察している組織を完全に生理的な環境に保つことができ、また血管と組織間での細胞の流出入を捉えることもできる。これは、特に免疫・血液系のように、生体内での血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週間ほど漬け込んで脱灰し、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る。

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 μ m) 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であるスフィンゴシン1リン酸(Sphingosine-1-phosphate; S1P)を同定した⁷⁾。筆者らの解析により、S1Pは骨髄腔中の血中に豊富に存在する



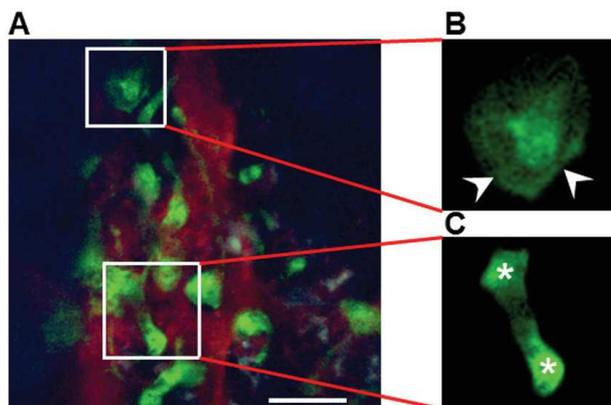
【図2】 骨組織(骨髄内)の生体多光子励起イメージング。顆粒球(LysM+:左側)および単球(CX3CR1+:右側)をそれぞれGFP標識したトランスジェニックマウスの骨髄腔の生体2光子励起イメージング。骨髄内の血管構造をTexas Redをconjugateした高分子デキストランを静脈注射にて可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する(Ishii et al., Nature, 2009より改編。動画については筆者HPなどを参照)。スケールバー:30 μ m。

が、破骨細胞側にはS1Pに引き寄せられる受容体(S1P 1型受容体:S1PR1)と、逆にS1Pから遠ざかるような動きを誘導する受容体(S1P 2型受容体:S1PR2)が発現しており、破骨細胞はこの2種類の受容体を巧妙に使い分けることで、骨組織を出入りしていることが明らかにされた^{8) 9)}。さらには、以前より骨吸収抑制薬として知られていたがその作用機序が長年に渡って不明なままであった活性型ビタミンDが、破骨細胞を骨に引き寄せる受容体S1PR2の発現を抑制することで骨吸収を抑制することが明らかとなり¹⁰⁾、この機構が創薬標的としても有用であることが明らかとなった。

骨組織の生体多光子励起イメージング系はさらに進化を遂げており、破骨細胞の骨髄内への出入りのみならず、成熟破骨細胞の骨破壊の実体解明にも応用されている¹¹⁾。これで見ると、成熟破骨細胞には「骨吸収型(R型)」と「休止型(N型)」が存在し、骨表面でこの2つの機能状態を遷移していることが明らかとなった。生体内では、骨吸収の調節は破骨細胞の遊走や分化などによる「総数の制御」のみならず、個別の細胞の「機能」も制御を受けていることが分かった。

骨髄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。しかもそれは余程重要なものようで、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、骨髄機能の生理・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。



【図3】成熟破骨細胞の生体多光子励起イメージング
成熟破骨細胞が骨吸収に用いるH⁺ポンプ(V-type H⁺ATPase)を緑色(GFP)に標識したマウスの骨髄腔の生体多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デキ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。骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞には、「動きの乏しい細胞(B)」と、「アメーバ状によく動いている細胞(C)」の少なくとも2種類が存在する。動きの乏しい細胞の方では、GFP(H⁺ポンプ)が膜に沿って発現しているように見える(B、矢印)。つまり、今まさに酸を出して骨吸収をしていると考えられる。一方、アメーバ状によく動いている細胞の方では、GFP(H⁺ポンプ)が細胞質に存在し、膜上には発現していないように見える(C、アステリスク)。つまり、現時点で酸を出しておらず骨吸収には関わっていないと考えられる。(スケールバー：40 μm)

5. 多光子励起イメージングの今後

注目する細胞を蛍光標識し、生かしたままの組織(可能であれば個体そのもの)内での動態(細胞の動き・相互作用)をイメージングすることは、多光子励起観察においてすでに可能となっている。さらに最近の光学・レーザー技術の進歩により、生きた組織中で生きた細胞内の分子局在(膜か細胞質か、細胞の前か後か、など)を捉えることが可能となりつつある。今後は前述の超高解像度イメージングと組み合わせることにより、生きた組織の生きた細胞内での1分子の挙動を追いかけることも現実味を帯びてくるかもしれない。筆者の予想では、これから5～10年くらいでバイオイメージング研究はさらに急速に進歩すると考える。1980年代の分子生物学、

1990年代のジーンターゲット技術の発展など、新しい方法論は新しい概念を創出してきた。今後、バイオ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、それらの豊富なツールを用いて何を見るのか、生物学者としての知識と力量が改めて問われてくる。

もう一点、今後の生体イメージング(多光子励起を含む)において筆者が重要と考える方法論は「光による生物現象のマニピュレーション」である。観察のための媒体としての光ではなく、マニピュレーションツールとして使用の先駆けは「ケージド化合物」である¹²⁾。生理活性物質をキレート剤の「かご(ケージ)」に閉じ込めて不活化したものを生組織に投与しておき、観察視野の一部に強い光を当ててケージを壊して活性化(アンケージング)本法では、観察視野における局所(ピクセル単位)での「生物現象のマニピュレーション」が可能である。またさらに最近では、光感受性視細胞にあるロドプシンの性質を利用して、光を照射した部位の膜電位を調節したり(チャンネルロドプシン)、ロドプシンと他のGタンパク質共役受容体(GPCR)とのキメラ分子を用いて、局所での細胞内シグナルを制御できたという報告もなされている¹³⁾。これらの方法の登場により、イメージングではこれまでのように単に起きている自然現象を眺めているだけではなく、積極的に生体システムをマニピュレートしその動的な反応を観察することが可能となってきている。

イメージング研究は楽しい。筆者が生体多光子励起イメージングを行っているのは、それが生物学的に重要であるから、というよりは単に好きだからである。昔から写真撮影が趣味で、今でも海外出張の際には愛用の一眼レフと広角・望遠の各レンズを持参する。いい写真を撮るためであれば、道路にだって平気で寝転ぶ(例えば大聖堂の尖塔を見上げた写真を撮るときなど)。写真撮影では、もちろんカメラの構造(レンズ口径やシャッター速度、絞りや露光時間など)を熟知して制御することが必要であるが、「いい構図を探す苦勞を厭わない」ことも重要である。顕微鏡のイメージングも同じで、最初はなかなか「いい画像」が撮れないが、少し慣れてくると自然と撮れてきて、面白くてたまらなくなる。筆

者の研究室に来てくれる大学院生もそのような経過を経て、今では夜遅くまで顕微鏡に張り付いている。少しでも多くの人に生体多光子励起イメージングの面白さを伝えたい、それを使ってすごく新しい研究をしたい、そんな気持ちで日々仕事をしています。研究室への参加や見学・共同研究など、ご興味のある方が居られればぜひご連絡ください (筆者 E-mail: mishii@icb.med.osaka-u.ac.jp, 筆者研究室 HP: <http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp>)。

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) Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J. Exp. Med.*, 207: 2793-2798, 2010.
- 10) Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M, Ishii M. Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques. *J. Immunol.*, 190:605-12, 2013.
- 11) Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada G-H, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J. Clin. Invest.*, 123: 866-873, 2013.
- 12) Kaplan JH, Ellis-Davies GC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85: 6571-6575, 1988.
- 13) Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. *Nature* 458:1025-1029, 2009.

