

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22959

研究課題名(和文) 生体組織間シグナルカスケード理解のための、多視点・多臓器同時イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of intravital multi-field of view imaging for understanding biological communication among organs

研究代表者

本藏 直樹 (Honkura, Naoki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40518081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：人をはじめとする多臓器が関与する生命現象をあきらかにするために、同一個体の様々な組織を一切の時間遅れなく連続に生理機能を捕捉する方法論が求められている。これに対応するため開口液浸対物レンズおよび光検出器を内包した、3次元可動軸を持つ複数のアームを接続した非線形光学顕微鏡の作成、およびそれを用いた時間遅れのない多臓器高速イメージング法の開発をおこなった。まず光の偏光を瞬時に切り換え光を分配するための高速ピエゾ素子の導入および検出器を低ノイズおよび高量子効率なハイブリッド光検出器を対物レンズ直上に設置することにより非常に高感度なシグナル取得が可能となり、個体の別臓器を高速に2視野観察可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人をはじめとする多細胞生物において、生命機能の維持・調節をおこなうために、様々な組織・器官がそれぞれ特異的な機能を担うこと、またその情報を生体シグナルとして血管を介して送受信することは、特に高度に発達した高等生物の生命の動的恒常性を維持するために必須である。すなわちこれらの多臓器情報伝達の機構を正確に理解することは、高等生物の生命の本質を理解するために絶対不可欠な研究であり、それを推進することは非常に重要である。そのため本研究計画である多視点・多臓器同時イメージング法の開発および生体への適用は、高等生物の多臓器情報伝達による生命維持機構を知るための間違いなく重要な第一歩と見込まれる。

研究成果の概要(英文)：In order to study physiological signaling mechanisms involving multiple organs, such as the human body, there is a need for a methodology to continuously measure the physiological functions of various tissues without any time delay. We have developed a nonlinear optical microscope with multiple arms connected with three-dimensional movable axes, which contains a water immersion objective lens and a photodetector in a single arm. Microscopy has developed a time-delay-free, high-speed imaging method for multiple organs. First, we tried to build a high-speed piezoelectric element for instantaneously switching the polarization of light and distributing the light. By placing a low-noise, high-quantum-efficiency HPD detector directly above the objective lens, weak biological signals can be obtained, enabling high-speed, dual-field of view observation with multi organs.

研究分野：生理学、非線形光学顕微鏡、血管生理学、神経科学

キーワード：多視点同時計測 非線形光学顕微鏡 生体臓器間シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

人をはじめとする多細胞生物では、生命機能の維持・調節をおこなうために、様々な組織・器官がそれぞれ特異的な機能を担うこと、またそれと同時に血管網や神経系を介して他の臓器に情報を伝達することで、生体の恒常性が維持されている。特に血管の生理機能は非常に動的であり、また生体唯一の物質供給路であるため、常に複数の組織の情報のやりとりに使われている。その中でも血管の機能発現の中枢を担うのが物質交換の場である微小循環である。物質交換を通じて局所（臓器など）の恒常性が保たれると同時に、局所の情報の多くが全身に拡散する。これにより臓器・臓器間の情報伝達が可能になり生体としての応答、恒常性維持が可能になる。例えば、臓器間を結ぶホルモンの適切な放出・供給の仕組み（インスリンシグナル等）において、ホルモン放出が組織の細胞（ベータ細胞など）から適切に行われても、それが血管に取り込まれず、また血管から適切な場所に放出できなければ、組織および生体の適応・応答、恒常性維持は、駆動されない。そこで多細胞生物特有の高度化された機能分担システムである、多臓器が関与する生命現象をあきらかにするために、同一個体の様々な組織を一切の時間遅れなく連続に生理機能を捕捉する方法論が求められている。

2. 研究の目的

生命現象を分子・細胞レベルの空間解像を有して連続に捕捉することができる超高速顕微鏡画像取得は、生体で起こる早い生命反応を細かな時空間スケールで、また多次元情報を内包した画像として記録できるため、これまでも生命現象を記録する分野において活躍してきた。しかしながら現状、最新の非線形光学顕微鏡を用いて生体光イメージングをおこなっても、その観察領域はとても限られた視野内（最大1mm²程度）での反応を記録するのみである。すなわち多臓器がほぼ同時に機能発動するような現象において、個々の組織活動を同時記録することは、ほとんど不可能である。たとえば糖代謝（生体エネルギー反応）において、糖摂取後直ちに生じる血管内血糖値上昇により膵臓のベータ細胞からインスリン放出が起こり、それが再び血管や神経を介して他の器官に情報伝達するような、言い換えると生体シグナルが連続的に様々な器官に送受信される現象を正確に記録するためには、独立多視点・多臓器高速イメージング法が必須である。

3. 研究の方法

そこで独立多視点・多臓器間高速画像取得を開発するために、申請者は高開口液浸対物レンズおよび光検出器を内包した3次元可動軸を持つ複数のアームを接続した非線形光学顕微鏡の作成、およびそれを用いた時間遅れのない多臓器高速イメージング法の開発を試みる。

I. 始めに走査型顕微鏡の中核となるスキャニングシステムを考える。通常走査型顕微鏡には1セットのスキャナーを備えているが、それを複数にすることで多視点イメージングを遂行する方法が考えられる。しかしスキャニングの同期、それに関わる画像取得システムの作成また装置の大型化の問題が生じるため、主

に本研究で使用する生きたマウスの多器官同時イメージングには適さない。よって通常のレーザー走査型顕微鏡のシステムをそのまま使用し、観察のための対物レンズの配置の自由度を優先する。

- II. スキャンシステムを1セットにするため励起光を各対物レンズにスキャンシステムの後振り分ける必要が生じる。その励起光を各対物レンズへの振り分けに①ビームスプリット型、②高速偏光切り替え型、③ ①および②混合型を採用する。
- III. 光検出器に関しては、対物レンズ直前に DM を配置することで、蛍光物質から対物レンズに戻ってくる蛍光(Epi-Fluorescence)を効率よく取得でき、結果としてより明るくシグナルノイズレシオ(S/N)の高い画像が取得できる。

これらを組み合わせることで、多視点・多臓器同時イメージングの装置が完成すると計画した。

4. 研究成果

生体光イメージング技術を基盤とした多視点同時記録は、生体の真のシグナル伝達を理解する上で最も重要なシステムとなり得る。しかしながら独立した視野を同時記録するためには、複雑なアーム機構を持ったシステムを組む必要があるため、小型動物でそのような装置を組むことは非常に難しい問題であった。そこで本研究において、これらの問題を解決するために光の分配もしくは偏光方向を巧みに利用することで解決を図った。

これらを実現するための非線形光学顕微鏡のセットアップをおこない、これまでに使用していた光路に、 $\lambda/2$ 波長板を導入して自在に入射光の偏光方向を変更するための装置を組み込んだ。それを調整するために、

結果1. 電動の回転素子を導入することで、2つの観察用対物レンズに光の入射量を調整する電動回転機構を加えることで、同時に2視点観察するための光分配を構成した(図1)。

結果2. 光の偏光方向を高速に変更するためにピエゾ素子を用いて高速回転することで、一枚の画像取得ごとに分配方向を切り換えた(図1)。

これらの結果により、同時2視野画像取得のための入射光調整が自在におこなえることが判明した。これに加えて実際に2つ以上の対物レンズを光路に加えてそれぞれの視野において画像取得をおこなう必要がある。



これを実現するために、

結果3. 2つの独立したアームを構成してその中間に $\lambda/2$ 波長板を導入し、独立した

2つの光路への光量の分配を自在に調整する機構を組み入れた。

結果 4. これに加えて対物レンズの可動域は、10センチメートル以上の可動範囲を持たせたことで、小動物であれば、観察部位を任意に指定できるようになった。

結果 5. さらには、検出器を低ノイズおよび高量子効率なハイブリッド光検出器を対物レンズ直上に設置することにより、非常に高感度なシグナル取得が可能になった。

これらの成果の結果として、独立2視野観察を実現するための偏光連続切り替えを用いて光路を以前に比べて高速に切り換えることが可能となった。また対物レンズの可動範囲を拡張し、さらに角度を任意に変更するアダプターを組み合わせたことで小動物であれば、観察部位を任意に設定できることが可能となった。これらを用いて、生体光イメージングを遂行することで、生きている動物を用いた生体組織間シグナルを計測することが可能となり、当初の目的を達成することが出来ている。さらに今後この技術をさらに発展させることで、より高速で複雑な生体組織間シグナル伝達を捉えることが可能となることを強く予想させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mathews Nitty Skariah, Suzuki Yuko, Honkura Naoki, Sano Hideto, Iwashita Toshihide, Urano Tetsumei	4. 巻 210
2. 論文標題 Pre-administration of a carboxypeptidase inhibitor enhances tPA-induced thrombolysis in mouse microthrombi: Evidence from intravital imaging analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 78 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2021.12.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Tae, Suzuki Yuko, Sano Hideto, Honkura Naoki, Castellino Francis J., Urano Tetsumei	4. 巻 122
2. 論文標題 Demonstration of Three Distinct High-Molecular-Weight Complexes between Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 and Tissue-Type Plasminogen Activator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 336 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1508-7919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Yuko, Tanaka Hiroki, Horinouchi Takahiro, Sano Hideto, Honkura Naoki, Unno Naoki, Miwa Soichi, Urano Tetsumei	4. 巻 10
2. 論文標題 Fibrinolysis-resistant carbonylated fibrin detected in thrombi attached to the vascular wall of abdominal aortic aneurysms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77582-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yuko, Sano Hideto, Mochizuki Liina, Honkura Naoki, Urano Tetsumei	4. 巻 4
2. 論文標題 Activated platelet-based inhibition of fibrinolysis via thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activation system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5501 ~ 5511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Urano Tetsumei, Suzuki Yuko, Iwaki Takayuki, Sano Hideto, Honkura Naoki, Castellino Francis J.	4. 巻 20
2. 論文標題 Recognition of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 as the Primary Regulator of Fibrinolysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Drug Targets	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389450120666190715102510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 HONKURA Naoki	4. 巻 30
2. 論文標題 Noninvasive intravital imaging techniques: In order to capture genuine physiological responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 529 ~ 533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.30.529	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 量子光学を巧みに用いた生体研究
3. 学会等名 第7回 血管生物医学会 若手研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 血管物質交換によって駆動される生体内細胞活動の定量イメージング解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 非線形光学顕微鏡を用いた生体血流イメージング
3. 学会等名 第46回レーザー顕微鏡研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 生命を司る血液循環の定量生体イメージング解析
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 生体細胞代謝に関する血管物質交換の定量生体イメージング解析
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 コロナ病態の理解に繋が生体血管内皮傷害後の血管障害・修復機構とは？ ~ 真実は生体の中でしか分からない ~
3. 学会等名 第6回血管生物若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 定量画像解析により可能となった機能性血管種区分により同定された微小循環物質放出の仕組み
3. 学会等名 第93回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 Intravital imaging analysis for the substance discharge in microcirculation with noninvasive optical microscopy
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 非侵襲・非線形光学顕微鏡を用いた微小循環における物質放出の解明
3. 学会等名 第97回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 Intravital imaging analysis for the substance discharge in microcirculation using noninvasive and nonlinear optical microscopy
3. 学会等名 Gordon Research Conference(GRC): Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本藏 直樹
2. 発表標題 非侵襲・非線形光学顕微鏡を用いた微小循環における物質放出の解明
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会(誌上開催) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Honkura
2. 発表標題 Intravital imaging analysis for the substance discharge in microcirculation using noninvasive and nonlinear optical microscopy
3. 学会等名 Gordon Research Conference(GRC): Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Honkura
2. 発表標題 Application of nonlinear optical effects in intravital imaging to reveal functional blood circuit.
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本藏 直樹
2. 発表標題 非線形光学顕微鏡を用いた生体物質交換の解析
3. 学会等名 第170回 n-bio セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Honkura
2. 発表標題 Intravital imaging with nonlinear optical effects has shown up functional blood circuit
3. 学会等名 第21回高柳健次郎記念シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本藏 直樹
2. 発表標題 非線形光学顕微鏡を用いた生体血管分別法およびその構造機能解析
3. 学会等名 第66回中部生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本藏 直樹
2. 発表標題 最先端生体光学イメージング技術を用いた新規血管分類法と動的な血管機能の評価
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Honkura
2. 発表標題 Advanced intravital imaging techniques for vessel discrimination and assessment of physiological vascular dynamics in in vivo
3. 学会等名 The 19th Hamamatsu-Kyungpook Joint Medical Symposium(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------