

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22113005

研究課題名（和文）生体深部の可視化と操作が同時に可能な個体用 *in vivo* 2光子顕微鏡の開発と応用研究課題名（英文）Development and application of *in vivo* two-photon microscopy for imaging and stimulation

研究代表者

根本 知己（Nemoto, Tomomi）

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：50291084

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 84,500,000円

研究成果の概要（和文）：最先端のレーザー光科学技術、蛍光プローブの導入や生体中での光学特性の定量的評価法を開発し、“*in vivo*”2光子励起顕微鏡による可視化解析の高度化を目指した。その結果、2光子顕微鏡の深部到達性や空間分解能を向上させることができ、特に、マウス生体脳においては、世界最深部の海馬歯状回での「そのまま」観察に成功した。加えて、光操作・刺激の方法論を切り開き、マウス生体脳深部での神経線維のレーザー破断にも成功した。

研究成果の概要（英文）：In order to advance visualization analysis by “*in vivo*” two-photon microscopy, we combined the microscopy with cutting-edge technologies of laser optics and fluorescent probes novel visualization as well as developed a new analysis technique for estimating optical properties in living bodies. We improved the penetration depth and the spatial resolution in two-photon microscopy, and successfully demonstrated “intact” visualization of hippocampal dentate gyrus in living mouse brains. Furthermore, we created a method for optical manipulation and stimulation, and successfully achieved laser ablation of neural fibers within deeper layers in living mouse brains.

研究分野：生物物理学

キーワード：バイオイメージング 2光子顕微鏡 脳神経科学 *in vivo*イメージング 多光子顕微鏡 超短光パルスレーザー

1. 研究開始当初の背景

2光子顕微鏡は、近赤外域のフェムト秒レーザーを励起光源として用いることで生じる非線形光学過程を利用し、他の顕微鏡法では観察不可能な、インタクトな組織深部の分子細胞機構の観察を可能とする。現在、生物個体中で非侵襲的に細胞の形態・機能の解析が可能な方法論として最も期待される。申請者は、この顕微鏡法の黎明期より、生命科学への応用を先導してきた。特に、世界最深部の、脳表面から約1.0mmという深部到達性とサブマイクロメートルの分解能を実現する最も優れた *in vivo* 2光子顕微鏡システムのひとつを構築することに成功していた。しかし、本方法論は脳神経系においては多く成果をもたらしているが、他の生体組織では報告例は少なかった。申請者は、この原因が組織や観察部位の深さによって光学的特性が異なるためであることを、上述の世界トップの顕微鏡システムの開発過程において推定した。そこで本申請では、レーザー科学、光化学、新規蛍光分子等を十全に活用することにより新規的な光イメージング・光操作を確立することを目的とした。最終的には、他計画班との連携により、がん発症・転移の分子基盤・治療への応用を目指した「*in vivo*」光・細胞生物学」を先導することを目標とした。

2. 研究の目的

光学的な観察・測定法は「生きた」対象内部で (*in vivo*) 多種類の分子や細胞の動態を、同時かつ高時空間分解能で、計測することが可能である。2光子顕微鏡は、近赤外域のフェムト秒光パルスにより生じる2光子励起過程を利用し、他の顕微鏡法では観察が困難な生体組織深部の観察が可能である。現在、生物個体中で細胞や生体分子の非侵襲的な可視化解析が可能な方法論

として最も期待されている。本研究計画では、新規レーザーや補償光学系、試料作製法の改善により、光による観察と操作を真の生体組織深部で実現する *in vivo* 2光子顕微鏡の完成を目指した。さらに、新規蛍光タンパク質や光機能性分子の導入より、生体脳の神経伝達、分泌現象をモデルとして、生体内の分子機構を理解する新規イメージング手法を確立することも目標とした。

3. 研究の方法

(1) 生体深部での可視化と光活性化が同時可能な2光子顕微鏡システムの開発

新規ダイクロイックミラーを用いた同時レーザー光導入系を設計するなど、新たに赤外レーザー、補償光学系等を導入することで、生体深部で「光」による観察と操作を実施可能とする *in vivo* 2光子顕微鏡を構築した。マウス生体脳深部の空間分解能と光操作生体深部における観察における光学収差の低減を目的とし、オープンスカル法に微小蛍光ビーズを導入する用いる方法を確立し、マウス脳中での点像分布関数の解析を可能とした。そして、瞳孔充足率や球面収差補正量等の光学パラメータの検索を網羅的に実施した。

また、長時間の観察において重要な、麻酔等の小動物保定システムの改善や、画像取得手順の解析から心拍呼吸等の影響を抑える方法論を確立することに成功し、安定した *in vivo* イメージングを可能とした。加えて、新型高感度蛍光検出器や新規光源の導入を実施し、最適な観察および刺激のための条件の検討を行った。

(2) 開口放出・分泌の生理機能の分子基盤の可視化解析法の開発

新規蛍光タンパク質「シリウス」や「カメレオンナノ」等の導入より、分子機構を可視化解析し、生理機能の分子基盤を解明す

るための方法論の確立を目指した。

4. 研究成果

(1) 生体脳深部イメージングにおける深部到達性の向上

以上のように高度化を実施した2光子顕微鏡システムを用いて、麻酔下のH-lineマウスの2光子*in vivo*イメージングを実施したところ、最深部の生体脳断層イメージングに成功し、前半期では世界で初めて海馬CA1ニューロンの、さらに後半期では海馬歯状回のニューロンの世界で初めての*in vivo*イメージングに成功した。(図1)。また、今村班と*in vivo*2光子顕微鏡に関する研究情報の交換や議論を実施し、がんや破骨細胞の観察を実施した。

(2) マウス生体脳中の光刺激・光操作

また、光刺激・光操作に関しても同様の光学的な解析を実施し、“*in vivo*”光操作の可能性を開拓した。ここではマウス生体脳中の皮質深層でのレーザー光による神経線維破断をターゲットとし、その実現可能性を

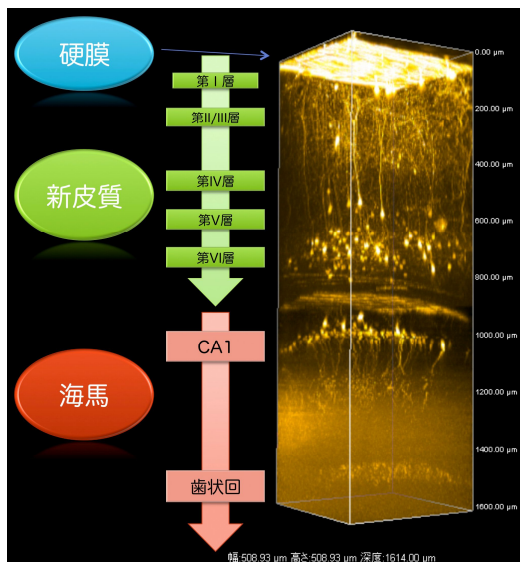


図1：新規半導体レーザー光源により、海馬歯状回・CA1、新皮質全層の同時*in vivo*イメージングに世界で初めて成功 (*Biomed Opt.* 2015)

検討した。具体的には、同一のマウス個体において*in vivo*2光子イメージングをし、かつ生体脳中の神経細胞の局所に近赤外超短光パルスレーザー光を集中させることにより*in vivo*でのレーザー破断を試みた。照射時間や浸液の屈折率等を最適化することにより、知る限り世界で初めて、脳表から500μm以上の深部で神経線維の*in vivo*光操作・光破断に成功した(図2)。

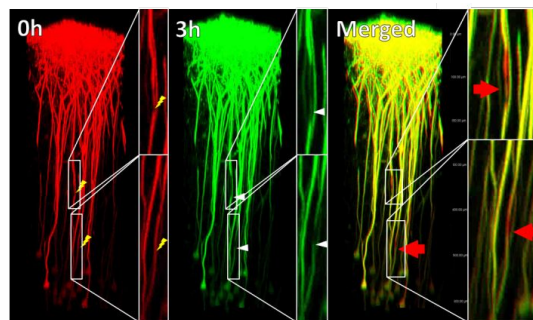


図2：マウス生体脳における頂上樹状突起の光操作と経時時間

(3) 固定組織の新規透徹化の法の開発と深部到達性・空間分解能の向上

PFA固定した組織標本の光学特性について検討を行い、2,2'-チジオエタノール(TDE)を用いた新規透徹法の開発と高度化を実施した。特に、2光子顕微鏡、共焦点顕微鏡のどちらの場合でも深部到達性の向上が確認できた(図3)。

さらに高NAレンズと組み合わせることで空間分解能が向上し、神経細胞樹状突起上のスパインを細胞体の形態を詳細に検討することが可能となった(図4)。その結果、形態学的な神経細胞内の部位に依存した形態学的な多様性を示唆する結果を得た。

(4) 新規蛍光タンパク質、蛍光プローブの生理機能の可視解析への応用

新規蛍光タンパク質を導入し、開口放出に関わるSNARE分子VAMP8やCa²⁺動態、

蛍光タグ化糖輸送体 GLUT4 の小胞輸送の観察を行った。その結果、インシュリン刺激時の脂肪細胞内での小胞輸送の3次元可視化や、膵臓外分泌腺の Ca^{2+} 依存性開口放出過程における Ca^{2+} 動態に関する知見を得た。

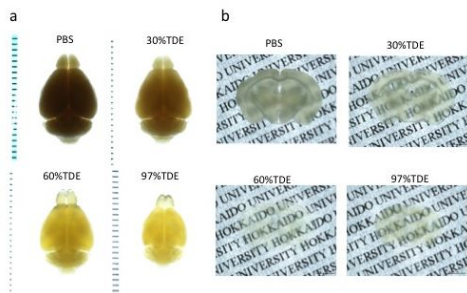


図3：2,2'-チジオエタノール溶液による固定脳の透徹効果。(a)は全脳、(b)はスライス標本(厚さ400 μm) (*PLOS ONE*, 2015)

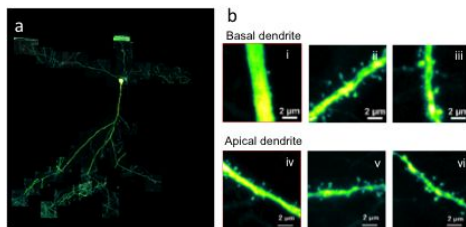


図4：固定スライスでの樹状突起スパインの高精細な観察 (*PLOS ONE*, 2015)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計48件)

1. Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Takashi Murata, Hiroataka Watanabe, Ryosuke Kawakami, Hiroshi Nakayama, Mitsuyasu Hasebe, Tomomi Nemoto (2015) “Multi-point Scanning Two-photon Excitation Microscopy by Utilizing a High-peak-power 1042-nm Laser”, *Anal Sci.*, vol. 31, no.4, pp. 307-313. 査読有

doi :10.2116/analsci.31.307

2. Ryosuke Kawakami, Kazuaki Sawada, Yuta Kusama, Yi-Cheng Fang, Shinya Kanazawa, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto (2015) “In vivo two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode” *Biomed Opt Express*, vol. 6, no.3, pp. 891-901. 査読有

doi :10.1364/BOE.6.000891

3. Yuka Aoyagi, Ryosuke Kawakami, Hisayuki Osanai, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto (2015) “A rapid optical clearing protocol using 2,2'-thiodiethanol for microscopic observation of fixed mouse brain” *PLoS One*, vol. 10, no. 1, e0116280. 査読有

doi :10.1371/journal.pone.0116280

4. Tomomi Nemoto, Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Koichiro Iijima, Kohei Otomo (2015) “Two-photon excitation fluorescence microscopy and its application in functional connectomics” *Microscopy (Oxf)*, vol. 64, no.1, pp. 9-15. 査読有 doi :10.1093/jmicro/dfu110

5. Megumi Nakao, Shintaro Takemoto, Tadao Sugiura, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, Tetsuya Matsuda (2014) “Interactive visual exploration of overlapping similar structures for three-dimensional microscope images” *BMC Bioinformatics*, vol. 15, article#415. 査読有

doi :10.1186/s12859-014-0415-x

6. Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Makoto Kurihara, Nobuyuki

- Hashimoto, Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto (2014) "Two-photon excitation STED microscopy by utilizing transmissive liquid crystal devices" *Opt Express*, vol. 22, no.23, pp. 28215-21. 査読有 doi :10.1364/OE.22.028215
7. Yusuke Oshima, Takeshi Imamura, Atsuko Shintani, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Terumasa Hibi, Takeharu Nagai, Shigenori Nonaka, Tomomi Nemoto (2014) "Ultrasensitive imaging of Ca²⁺ dynamics in pancreatic acinar cells of yellow cameleon-nano transgenic mice" *Int J Mol Sci.*, vol. 15, no.11, pp. 19971-86. 査読有 doi :10.3390/ijms151119971
8. Tomomi Nemoto (2014) "Development of novel two-photon microscopy for living brain and neuron" *Microscopy (Oxf)*, vol. 63 (Suppl 1), pp. i7-i8. 査読有 doi :10.1093/jmicro/dfu087
9. Megumi Nakao, Kosuke Kurebayashi, Tadao Sugiura, Tetsuo Sato, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, Kotaro Minato, Tetsuya Matsuda (2014) "Visualizing in vivo brain neural structures using Volume Rendered Feature Spaces" *Comput Biol Med.*, vol. 53, pp. 85-93, 査読有 doi: :10.1016/j.combiomed.2014.07.007
10. Satoshi Asano, Tomomi Nemoto, Tomoya Kitayama, Kae Harada, Jun Zhang, Kana Harada, Isei Tanida, Masato Hirata, Takashi Kanematsu (2014) "Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) controls KIF5B-mediated insulin secretion", *Biol Open*, vol. 3, no.6, pp. 463-74. 査読有 doi :10.1242/bio.20147591
11. Yuta Kusama, Yuichiro Tanushi, Masami Yokoyama, Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Tomomi Nemoto, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama (2014) "7-ps optical pulse generation from a 1064-nm gain-switched laser diode and its application for two-photon microscopy" *Opt Express*, vol. 22, no.5, pp. 5746-53. 査読有 doi :10.1364/OE.22.005746
12. Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Hibiki Horanai, Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto (2014) "Improvement of lateral resolution and extension of depth of field in two-photon microscopy by a higher-order radially polarized beam" *Microscopy (Oxf)*, vol. 63, no.1, pp. 23-32, 査読有 doi :10.1093/jmicro/dft041
13. Daisuke Takao, Tomomi Nemoto, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Hidetaka Shiratori, Shigenori Nonaka (2013) "Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation" *Dev Biol.*, vol. 376, no.1, pp. 23-30. 査読有 doi :10.1016/j.ydbio.2013.01.018
14. Ryosuke Kawakami, Kazuaki Sawada, Aya Sato, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto (2013) "Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser", *Scientific Rep.*,

vol. 3, Article #1014, 査読有 doi:
10.1038/srep01014 15.

15. Daisuke Takao, Tomomi Nemoto, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Hidetaka Shiratori, Shigenori Nonaka, "Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation", *Developmental Cell*, vol. 376, no.1, pp. 23-30, 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.18. (2013)
他 33 件

〔学会発表〕(計 140 件)

1. T. Nemoto, Invited Speaker:
Improvement of penetration depth and resolutions in laser-scanning microscopy, WORKSHOP ON ADVANCED OPTICAL IMAGING, Academia Sinica (Taipei, Taiwan),
2014 年 7 月 25 日

他 139 件

〔図書〕(計 4 件)

1. 根本知己、日比輝正、川上良介「2 光子蛍光イメージング」, 「発光の事典」(木下、太田、永井、南(共編))第 7 . 3 . 2 節、朝倉書店(印刷中)

他 3 件

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

名称: 液晶光学デバイス

発明者: 日比輝正、根本知己他

権利者: 北海道大学、(株)シチズンホールディングス

種類: 特許

番号: 2013-262481

出願年月日: 2013 年 12 月 19 日

国内外の別: 国内

他 2 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/mcb/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

根本 知己 (NEMOTO TOMOMI)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号: 50291084

(2)研究分担者

日比 輝正 (HIBI TERUMASA)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号: 50554292

川上 良介 (KAWAKAMI RYOSUKE)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号: 40508818

大友 康平 (OTOMO KOHEI)

北海道大学・電子科学研究所・特任助教

研究者番号: 40547204

(3)連携研究者

なし