

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300284

研究課題名(和文)二光子レーザー顕微鏡による生命現象の動画を用いた生命科学実感教材の開発

研究課題名(英文)Development of education movies demonstrating real-time biophysical phenomena by two photon laser microscopy

研究代表者

溝口 明(MIZOGUCHI, Akira)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90181916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多光子レーザー顕微鏡を用いた生命現象の体感的理解教材の開発・作成を実施した。その過程で、最近特に社会的な注目を集めているiPS細胞などの幹細胞を用いた幹細胞再生医療に関する教育教材をも作成した。さらに、教材データの開発中に、世界最高感度の癌細胞検出技術の開発に成功し、成果は日本国科学技術振興事業団(JST)の支援を受け、国際特許申請として発表した。これらの教材データは、特許認可が下り次第、インターネットを通して無料公開する計画である。本研究は、当初の研究計画を着実に遂行しただけでなく、癌細胞検出技術の開発にも成功し、大きな成果が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：I have engaged in development of education movies demonstrating real-time biophysical phenomena in vivo and in vitro by two photon laser microscopy. Two photon laser microscopy is a new method based on two photon excitation which generates new photons inside the animal body for visualizing real-time images of cells. These real-time movies demonstrating dynamic phenomena occurring inside our body probably enhance the understanding of students studying biological science. In this study I have obtained the real-time images of normal cells in gastrointestinal tracts, liver, pancreas, kidney, brain, and vessels. I have also observed the real-time images of cancer cells in intestines, which gives me an opportunity to develop a novel method to identify very small cancers at the ultra-early stages. The new method has been submitted as an international patent under the financial support from JST. The education movies obtained in this study will be opened in a free internet service.

研究分野：細胞生物学・神経生物学

科研費の分科・細目：科学教育・教育工学

キーワード：2光子レーザー顕微鏡 生体内細胞観察 GFPマウス iPS細胞 病気の可視化 治療効果の可視化 生命科学実感教材の開発 超早期癌診断・治療

1. 研究開始当初の背景

自然科学教育では、生体の仕組みの驚異を実感することが、初心者から熟練者まですべての学習者の学習動機の根源となる。多光子レーザー顕微鏡は、個体が生きたままの状態で生体内の細胞や組織の形態と機能がリアルタイムで動画として観察でき、生命現象を手取るように理解できる新装置である (図1A、B)。

図1A 2光子レーザー顕微鏡の原理

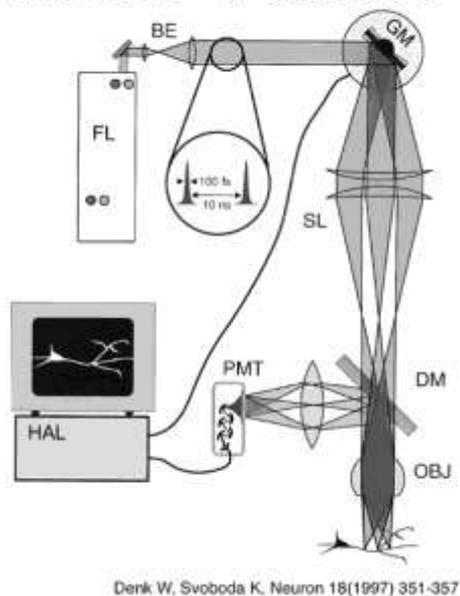
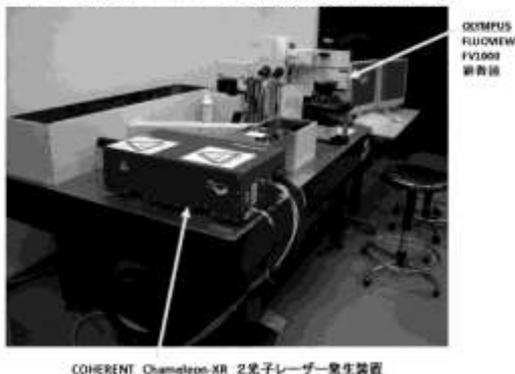


図1B 2光子レーザー顕微鏡の装置側面像



2. 研究の目的

本申請者は、これまで観察が困難であった生体深部内臓の観察法を開発し (図1C)、消化、分泌などの正常な現象や、血栓形成、炎症、癌化などの病的な現象

を動画撮影してきた (図1D)。この新技術で撮影した生命現象画像をもとに、生命現象を実感できるような新教材を開発することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

そこで本研究では、2光子レーザー顕微鏡と申請者らの開発した特許技術を用いて、生命現象をダイナミックな動きのある動画として編集し、生命科学系大学生 (一般教養・理学・農学・薬学・栄養学・医学・歯学) に、実感しやすい形で教えることができる教材を開発することを目的とした。この教材はまた、小学校から高校までの学習補助教材としても利用可能にし、昨今の理科離れを阻止する一助となることをも、あわせて目標とした。これら教材の元になる多くの画像データの撮影に成功した。完成した教材は電子媒体で、教育機関には、電材申請中の国際特許の認可が下り次第、インターネットのホームページにおいて、無料公開してゆく。

具体的な研究達成目標は以下の通りであった。

- (1) 正常な生体における動的な生命現象解析の基礎として、GFP 発現マウスを用いて、細胞の構築・増殖分化の動態を動画撮影し、解説をつけて教材化する。臓器としては、消化管、肝臓、腎臓、血管、神経、内耳、卵巣、精巣、胎盤を観察した。
- (2) 組織や細胞内の情報伝達物質の動的変化を可視化し、教材化する。情報伝達物質としては、細胞内 Ca^{2+} やサイクリックAMPを測定する。膵臓ランゲルハンス島の β 細胞の高ブドウ糖刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇、脳の海馬や大脳の神経細胞の感覚刺激に応答した細胞内 Ca^{2+} 上昇を動画化し、教材化した。

(3) 病的な状態における障害された細胞組織の動態を可視化し、教材化する。現象の例として、血栓の形成と溶解治療、膵臓ランゲルハンス島の糖尿病による破壊などの現象を動画化し、教材化した。

最新の再生医療、癌治療の現象を可視化し、教材化する。現象の例としては、組織の発生分化や iPS 細胞などを用いた再生医療、癌の浸潤・転に対する癌の免疫療法などを動画化し、教材化した。

図1C 特許が認められた「個体内部の組織学的イメージ像を観察・取得する方法」(特開2007-129723)の装置概略

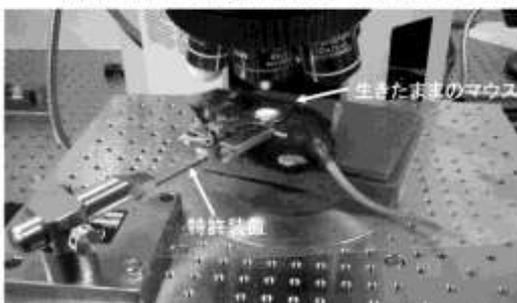
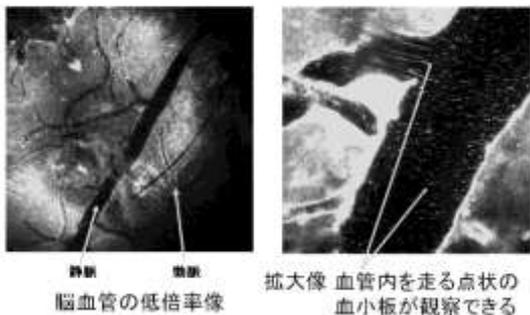


図1D 正常GFP-マウス脳血管のリアルタイムイメージング



4. 研究成果

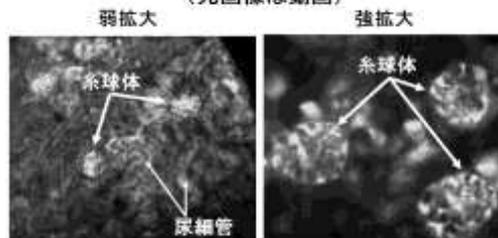
教材化できた画像データ

(1) 正常な生体における動的な生命現象に関する動画の教材化

この部分は、本研究の基礎となる正常な現象の動画化で、様々な臓器や組織のほぼ全ての細胞に GFP(Green Fluorescent Protein)を発現し、可視化したマウスを用いて、胃腸などの消化管、肝臓、腎臓、血管、神経、内耳における細胞構築・動態を動画撮影した。以下に、腎臓(図2A)と内耳(図2B)を示す。

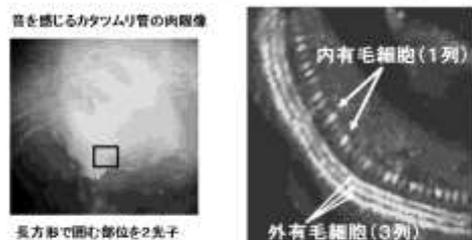
これらの実績を踏まえて、さらに可視化効率の良いマウスを作成し、より多くの生命現象を動画化した。

図2A. 正常マウス腎臓の2光子レーザー顕微鏡像(元画像は動画)



このマウスでは、血液を濾過する装置である糸球体と、再吸収する尿管がGFPで標識されて明瞭に識別できる。

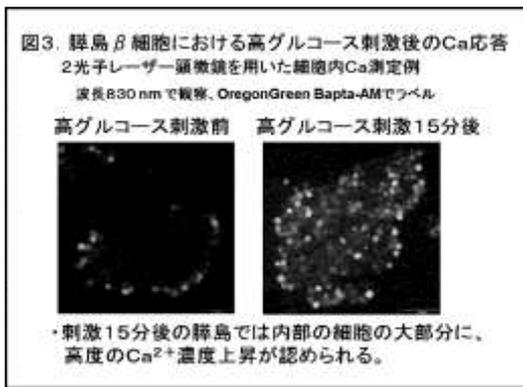
図2B. 正常マウス内耳の2光子レーザー顕微鏡像



長方形で囲む部位を2光子レーザー顕微鏡で観察した。このマウスでは、音を感ずる神経細胞で1列に並ぶ内毛細胞と3列に並ぶ外毛細胞がGFPで標識されて明瞭に識別できる。

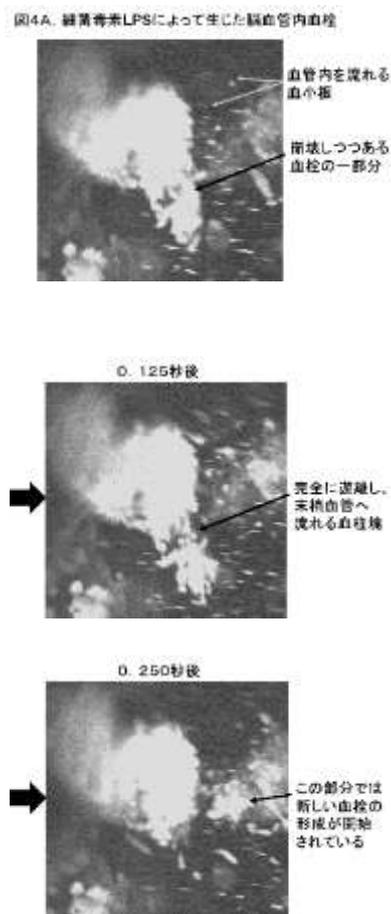
(2) 組織や細胞の中の情報伝達分子濃度の動的変化に関する動画の教材化

この教材例として、膵臓ランゲルハンス島のβ細胞の高ブドウ糖刺激による細胞内Ca²⁺上昇、脳の海馬や大脳の神経細胞の感覚刺激に応答した細胞内Ca²⁺上昇を動画化し、記録した。図3は、膵臓ランゲルハンス島β細胞の高ブドウ糖刺激に対する細胞内Ca²⁺上昇を画像化したもので、この細胞内の情報伝達分子のリアルタイムで可視化できる点は、従来の顕微鏡にはない2光子レーザー顕微鏡の長所である。



(3) 病的な状態における障害された細胞組織像の動画教材化

例として、脳血管における血栓の形成を動画化し、教材化した。細菌毒素LPS(Lipopolysaccharide)投与により脳血管内に生じた大型の血栓が、秒単位で拡大・発達と崩壊・溶解を同時に起こしている像が認められた(図4A)。



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 13 件)

1. Tagawa T, Sakuraba S, Kimura K, Mizoguchi A. Sevoflurane in combination with propofol, not thiopental, induces a more robust neuroapoptosis than sevoflurane alone in the neonatal mouse brain. J Anesth. 査読有 2014. DOI 10.1007/s00540-014-1822-x in press.
2. Shimura T, Tanaka K, Toiyama Y, Okigami M, Ide S, Kitajima T, Kondo S, Saigusa S, Ohi M, Araki T, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. In vivo optical pathology of paclitaxel efficacy on the peritoneal metastatic xenograft model of gastric cancer using two-photon laser scanning microscopy. Gastric Cancer. 査読有 2014 doi 10.1007/s10120-013-0334-y in press.
3. Fukuda T, Kominami K, Wang S, Togashi H, Hirata K, Mizoguchi A, Rikitake Y, Takai Y. Aberrant cochlear hair cell attachments caused by Nectin-3 deficiency result in hair bundle abnormalities. Development. 査読有 2014.141(2):399-409. doi:10.1242/dev.094995.
4. Tanaka K, Toiyama Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. Intravital imaging of gastrointestinal diseases in preclinical models using two-photon laser scanning microscopy. Surg Today. 査読有 2013. 43(2):20123-9. doi :10.1007/s00595-012-0283-9
5. Wang S, Watanabe T, Matsuzawa K, Katsumi K, Kakeno M, Matsui T, Ye F, Sato K, Murase K, Sugiyama I, Kimura K, Mizoguchi A, Matsuda M, Ginsberg

- MH, Collard JG, Kaibuchi K. Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *J Cell Biol.* 査読有 2012. 199(2):331-345. doi: 10.1083/jcb.201202041
6. Iizuka M, Kimura K, Wang S, Kato K, Amano M, Kaibuchi K, Mizoguchi A. Distinct distribution and localization of Rho-kinase in mouse epithelial, muscle and neural tissues. *Cell Structure and Function* 査読有 2012. 37(2):155-175. Doi:hhttp://dx.doi.org/10.1247/csf.12018
7. Tanaka K, Okigami M, Toiyama Y, Morimoto Y, Matsushita K, Kawamura M, Hashimoto K, Saigusa S, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. In vivo real-time imaging of chemotherapy response on the liver metastatic tumor microenvironment using multiphoton microscopy. *Oncol Rep.* 査読有 2012 28(5):1822-1830. doi:10.3892/or.2012.1983.
8. Yoshida M, Shimono Y, Togashi H, Matsuzaki K, Miyoshi J, Mizoguchi A, Komori T, Takai Y. Periderm cells covering palatal shelves have tight junctions and their desquamation reduces the polarity of palatal shelf epithelial cells in palatogenesis. *Genes Cells.* 査読有 2012. 17(6):455-472. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01601.x.
9. Tanaka K, Morimoto Y, Toiyama Y, Matsushita K, Kawamura M, Koike Y, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mizoguchi A, Kusunoki M. In vivo time-course imaging of tumor angiogenesis in colorectal liver metastases in the same living mice using two-photon laser scanning microscopy. *J Oncol.* 査読有 2012:2012: Article ID 265487. Epub doi: 10.1155/2012/265487
10. Tanaka K, Morimoto Y, Toiyama Y, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Kimura K, Mizoguchi A, Kusunoki M. Intravital dual-colored visualization of colorectal liver metastasis in living mice using two photon laser scanning microscopy. *Microsc Res Tech.* 査読有 2012. 75(3):307-315. doi: 10.1002/jemt.21059
11. Kuroda K, Yamada S, Tanaka M, Iizuka M, Yano H, Mori D, Tsuboi D, Nishioka T, Namba T, Iizuka Y, Kubota S, Nagai T, Ibi D, Wang R, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Asai N, Kimura K, Kiyonari H, Abe T, Mizoguchi A, Sokabe M, Takahashi M, Yamada K, Kaibuchi K. Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene in the mouse. *Hum Mol Genet.* 査読有 2011. 20(23):4666-4683. doi: 10.1093/hmg/ddr400
12. Morimoto Y, Tanaka K, Toiyama Y, Inoue Y, Araki T, Uchida K, Kimura K, Mizoguchi A, Kusunoki M. Intravital Three-Dimensional Dynamic Pathology of Experimental Colitis in Living Mice Using Two-Photon Laser Scanning Microscopy. *J Gastrointest Surg.* 査読有 2011. 15(10):1842-1850. DOI:10.1007/s11605-011-1632-5
13. Koike Y, Tanaka K, Okugawa Y, Morimoto Y, Toiyama Y, Uchida K, Miki C, Mizoguchi A, Kusunoki M. In vivo real-time two-photon microscopic imaging of platelet aggregation induced by selective laser irradiation to the endothelium created in the beta-actin-green fluorescent protein

transgenic mice. J Thromb Thrombolysis.

査読有 2011. 32(2):138-145.

DOI: 10.1007/s11239-011-0600-y

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

1. 名称: 多光子レーザー診断治療装置

発明者: 溝口 明、木村一志、田中光司

権利者: 三重大学

種類: 特許

出願番号: 特願 2013-075256

出願日: 2013/3/29

2. 名称: 生体染色剤

発明者: 溝口 明、木村一志、田中光司

権利者: 三重大学

出願番号: 特願 2013-075150

出願日: 2013/3/29

3. 名称: 腫瘍細胞染色剤

発明者: 溝口 明、木村一志、田中光司

権利者: 三重大学

出願番号: 特願 2013-074953

出願日: 2013/3/29

4. 名称: 生体染色法

発明者: 溝口 明、木村一志、田中光司

藤原武志、王 淑杰、崔 煌植

権利者: 三重大学

種類: 国際特許

整理番号: AC552-PCT

出願年月日: 2014. 3. 28

国内外の別: 国際

受付番号: 51400684008

出願番号通知: PCT/JP2014/59351

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(0)

溝口 明 (MIZOGUCHI, Akira)

三重大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90181916

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号:

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号: