HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規2光子励起顕微鏡法を用いた表皮の恒常性維持に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	一本嶋, 佐理
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第12633号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65617
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sari_Ipponjima_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　内　容　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　　博士（情報科学）　　氏名　一本嶋　佐理

学　位　論　文　題　名

新規 2 光子励起顕微鏡法を用いた表皮の恒常性維持に関する研究
（Study on epidermal homeostasis using novel two-photon microscopy）

非線形光学過程を用いた 2 光子励起顕微鏡法は、近赤外の励起光の使用により生体組織の深部まで観察することが可能で、かつ 3 次元的に細胞レベルで可視化できる。その強力な利点により、近年、生物学や医学研究に広く普及してきている。一方、本論文において主として取り扱う皮膚は生体防御を担う重要な臓器であり、その最も外側の構造の表皮は、様々な物理的、化学的刺激から守るバリアとしての機能を有する。表皮を主として構成する細胞は、表皮の下層に存在する基底細胞が細胞分裂し増殖することにより生じ、徐々に皮膚表面に向かって押し上げられる。その後、押し上げられた細胞は角化し、皮膚の摩擦などにより剥がれ落ちる。このターンオーバーの繰り返しにより表皮の構造は維持され、健康な状態を保っている。この表皮の構造や厚さは体の部位によって異なる。マウスの場合、背中や耳の表皮は薄く、足の裏はそれらの表皮と比べて厚い。また尻尾の表皮は 2 種類の表皮、scale(「鱗」) 領域と interscale 領域からなり、これらは足の裏と同程度もしくはそれ以上に厚い表皮をもつ。しかし、表皮の構造や厚さを維持するためのメカニズムには不明な点が多い。また、近年の生きたマウス個体における皮膚の 2 光子励起顕微鏡法による可視化解析では、皮膚の免疫細胞の細胞運動や細胞増殖シグナルに関する報告がなされているが、そのほとんどは観察しやすい耳の皮膚で実施されている。

本博士論文では、皮膚の構造や厚さの維持機構の解明のため、まず、生きたマウスの様々な部位 (背中、耳、足の裏、尻尾) の皮膚の経時的な 3 次元イメージング法を樹立することを目指した。細胞核の挙動を可視化するため、ヒストン 2B タンパク質 H2B と緑色蛍光タンパク質 eGFP の融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウス (R26H2BEGFP マウス) の譲渡を受けた。そして皮膚の研究によく使われる体毛と色素がない系統の HR1/Hos マウスと交配することにより R26H2BEGFP ヘアレスマウスの系統を樹立した。また、各部位に応じた皮膚の保定方法を確立することで、長時間にわたり安定的にマウス皮膚深部を観察することを可能とした。このように新たにマウス皮膚内部の細胞核のライブイメージング法を確立した。更に、真皮コラーゲン線維からの第二次高調波発生 (SHG) 光により、表皮と真皮の境界面は描出でき、基底膜上の細胞を基底細胞と特定できた。そこで、背中、耳、足の裏、尻尾の皮膚を対象に 4 時間にわたり 3 次元的に撮像した結果、基底細胞の細胞分裂を高精細に可視化することに成功した。その結果、耳と背中では、ほとんどの基底細胞が基底膜に対し平行に分裂していた。一方で、尻尾と足の裏では、一部の細胞は基底膜に対し斜め方向に分裂していることが判明し、また、その娘細胞の 1 つは基底層の上層に位置していた。そこで、各部位の 3 次元ライブ画像から、基底細胞の基底膜に対する 3 次元的な分裂方向を高精度で計測した。その結果、背中と耳では、全ての細胞が基底膜に対してほぼ平行 (0 - 20^{o}) に分裂していた (平行分裂)。一方で、足の裏と尻尾の interscale 領域では、7 割は平行分裂し、3 割は斜め方向 (20 - 70^{o}) に分裂 (斜め分裂) していた。更に、尻尾の scale 領域では 5 割強も斜め分裂をしていた。次に、表皮の厚さと斜め分裂頻度の関係を調べると、強く相関するという結果が得られた。以上よ

り、各々の部位における表皮では分裂方向の角度分布に違いがあり、分裂方向の分布の違いが表皮の厚さの違いを生んでいる可能性が示唆された。すなわち、厚い表皮では表皮のターンオーバーが速いと考えられていることから、斜め分裂は上の層への細胞の供給を早める役割を担っているかもしれない。

一方、2 光子励起顕微鏡法は一般に生体観察や深部観察に有用だが、長波長のレーザーを用いるため、分解能が通常の共焦点顕微鏡よりも悪くなるという欠点を有した。近年、高次径偏光 (HRP) ビームという新規レーザー光であるベクトルビームを集光させた場合、集光スポット径は直線偏光 (LP) ビームの回折限界よりも小さくなるという数値計算結果が報告された。ここで HRP ビームとは、ビーム断面において偏光方向が径方向を向き同心円状の位相の反転を伴うビームである。先行研究では、LP ビームを HRP ビームに変換する液晶素子を開発し、共焦点顕微鏡では HRP ビームにより分解能が向上することを実験的に確認していた。そこで本論文では、HRP ビームを用いて 2 光子励起顕微鏡の空間分解能の向上を試みた。ここで用いた液晶素子は位相変調量を電気的に制御するので、まず励起光の波長における最適印加電圧を決定した。ここでは、偏光板とビームプロファイラによりビーム断面の偏光分布をモニタし、大まかな印加電圧を決定した。更に集光スポットの強度分布を数値計算結果と比較しながら電圧変化をわずかに変化させる方法により、正確に最適印加電圧を決定した。次に、対物レンズ位置での励起レーザーのビーム径について検討を行なった。ビーム径を大きくしていくにつれて、HRP ビームの集光スポットの形状が理想的な形状に近づくが、集光点でのレーザーパワーが減少することが判明した。よって対物レンズの瞳径に対するビーム径の比が 0.85 となる場合を最適ビーム径として決定した。また、実験の過程で球面収差が HRP ビームの集光パターンに強く影響を及ぼすことが判明したので、微小蛍光ビーズの観察によって得られる集光パターンを確認しながら補正環を使って厳密に補正することにより、数値計算結果と同様の集光パターンを得た。空間分解能を測定した結果、予想通り HRP ビームによって通常よりも 2 割程度向上した。また、様々な蛍光色素を用いて免疫染色を行なった固定 COS-7 細胞の微小管を観察した結果、どの蛍光色素を用いた場合においても HRP ビームによる分解能の向上が確認できた。更に、生細胞の COS-7 細胞のアクチン動態を高分解能に捉えることにも成功した。よって本技術は、生細胞内の微細構造のダイナミクスを可視化するための有用な技術となると考えられる。

本博士論文では R26H2BEGFP マウスや観察方法の樹立を含めた新規 2 光子励起顕微鏡法を皮膚に適用することにより、長時間の観察で細胞分裂を高精細に観察可能になった。更に、表皮が厚いほど斜め分裂の頻度が高いことが判明し、斜め分裂の生理的意義が示唆された。また、今回、真皮コラーゲンの可視化に用いた SHG 顕微鏡法は、無染色な標本にも適用可能であることから、基礎医学研究や医療などに応用することが期待できる。その一方で、新規レーザー光である HRP ビームを用いることにより 2 光子励起顕微鏡の高分解能化も達成した。今後は、HRP ビームを使って生きたマウス表皮を、分子レベルで高分解能に観察できることが期待される。また、HRP ビームは光軸方向の電場成分が強いという特徴をもつことから、3 次元的な分子配向を可視化することも期待されている。このような新規 2 光子励起顕微鏡法を用いることで、既存の技術では解明できない生命科学の事象に関する新しい知見が得られることが期待される。