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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士 (情報科学)　氏名　一本嶋　佐理

審査担当者　主　査　教　授　根本 知己
副　査　教　授　西野 吉則
副　査　教　授　岡嶋 孝治
副　査　准教授　上野 貢生

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）

近年、非線形光学現象である 2 光子励起過程を用いたイメージングは、神経科学を中心とした生命科学の領域で盛んに利用されるようになってきている。この 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、生物学や医学研究に広く普及してきている。一方、本論文において取り扱う表皮は、様々な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、角化し、やがて剥がれ落ちる。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る。表皮の構造や厚さは体の部位によって異なるが、各々の部位の維持機構には不明な点が多い。また、近年の生きたマウス皮膚の 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。そこで、皮膚の構造や厚さの維持機構の解明のため、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の樹立を目指した。そのため、全身の細胞核がラベルされた遺伝子改変マウス (R26H2BEGFP マウス) と、体毛と色素がない系統のマウスとを交配することにより R26H2BEGFP ヘアレスマウスを樹立し、それを利用した。また、各部位に応じた皮膚の保定方法を確立することで、安定的にマウス皮膚深部を観察することを可能とした。次に、各部位の皮膚について 4 時間、3 次元的に撮像した結果、どの部位においても高精細に細胞分裂を可視化することに成功した。また、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のに対し、尻尾と足の裏では一部の細胞は斜め方向に分裂していることが判明した。そこで、基底細胞の基底膜に対する 3 次元的な分裂方向を計測した結果、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 度) に分裂していた。一方で、足の裏と尻尾の interscale 領域では、7 割は平行分裂で、3 割は斜め方向 (20 - 70 度) の分裂 (斜め分裂) であった。更に、尻尾の scale 領域では 5 割強が斜め分裂だった。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、斜め分裂頻度の違いが表皮の厚さの違いに関係す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長波長のレーザーを用いるため、通常の共焦点顕微鏡よりも空間分

解能が低下する。近年、高次径偏光 (HRP) ビームという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。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り得られる集光パターンを確認しながら補正環で厳密に補正することで、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。これを要するに、著者は、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した。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。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。

これらの成果は、2 光子生体イメージングを更に普及するための技術的開発だけではなく、皮膚の生理学的な知見へも貢献するところがある。よって、著者は、北海道大学博士 (情報科学) の学位を授与される資格あるものと認める。