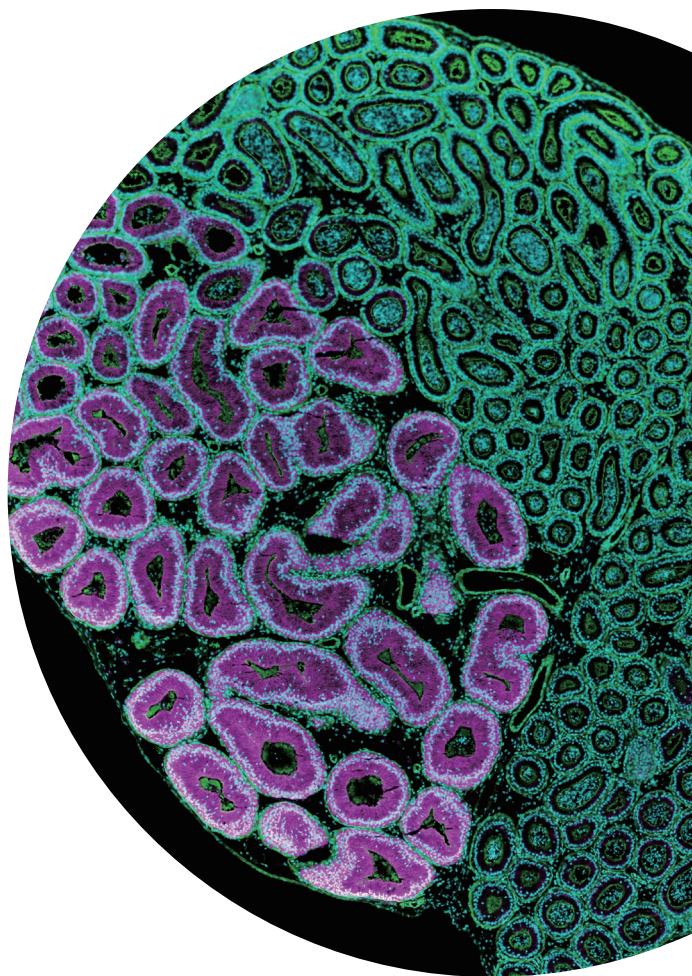


NIKON JOICO AWARD

2021



顕微鏡を通して

広げる世界

広がる世界

科学に基づく顕微鏡画像は、芸術性と学術性を兼ね備えている

こうした画像に触れた人々には新たな価値や創造がもたらされるのではないか

もっと多くの方々に顕微鏡を通して見える世界に触れてほしい、

そういう思いで2019年NIKON JOICO AWARDをスタートさせました。

顕微鏡を通して見える世界は、想像ではなく、科学に基づいて広がる世界です。

この世界は、研究者一人一人異なる世界であっても、

顕微鏡画像に秘められた最先端の科学、

そして何よりも研究者がワクワクとしながら取り組んでいる科学の世界は、

見るものを刺激し、新たな世界に導いてくれると信じています。

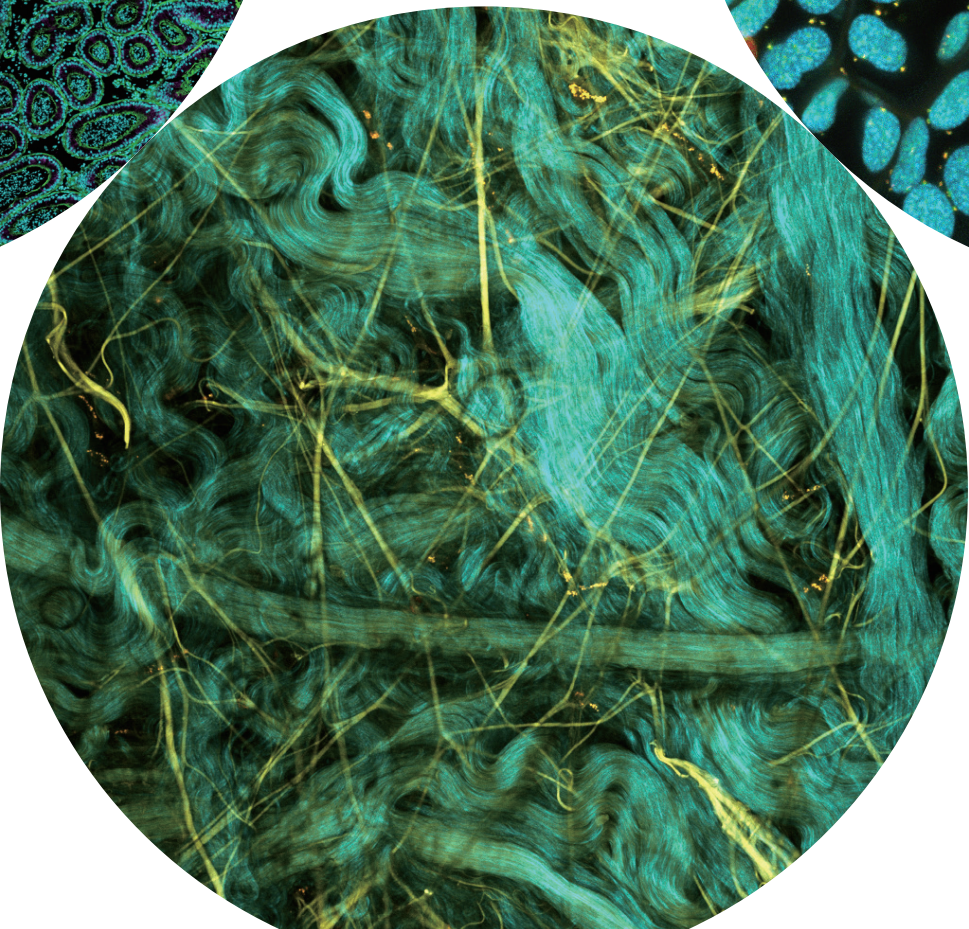
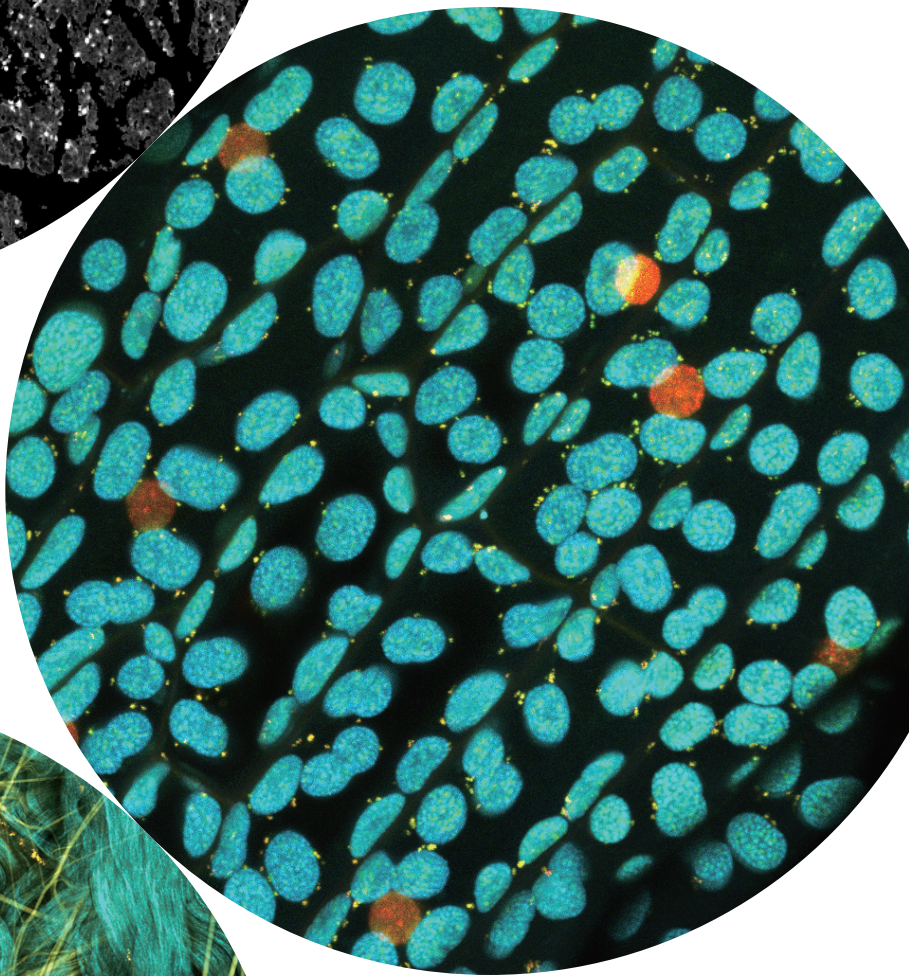
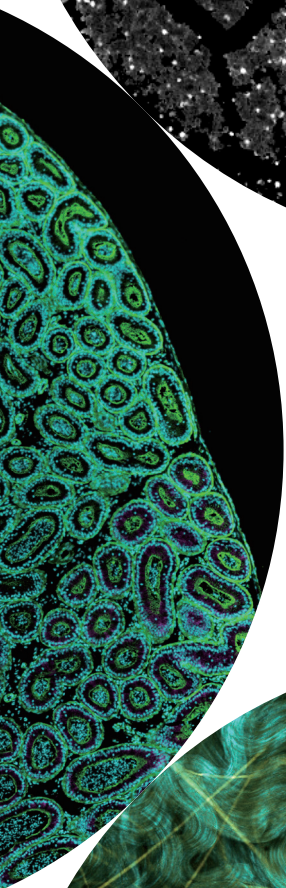
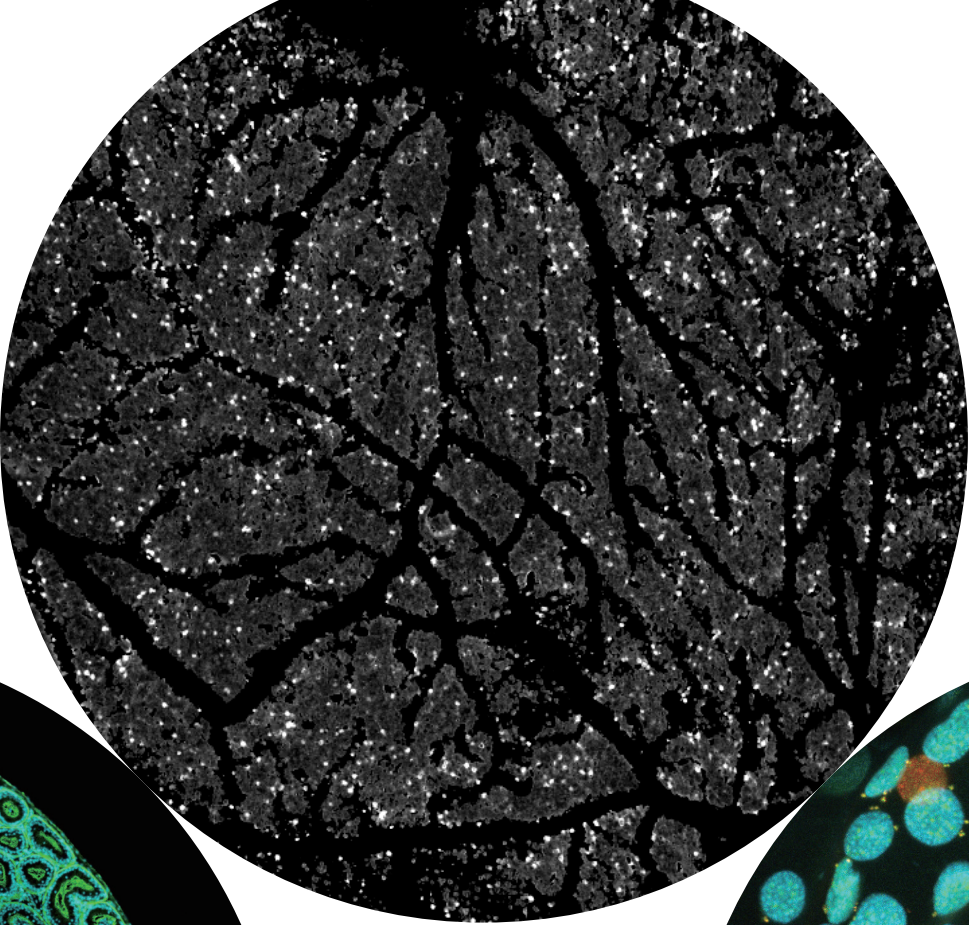
研究者の方々には、顕微鏡画像を通して、科学そして芸術を伝える場として

NIKON JOICO AWARDを訪れていただいた方々には、

顕微鏡を通して見える世界に触れていただく場として

顕微鏡を通して 世界が広がる 世界を広げる

を目指して活動してまいります。

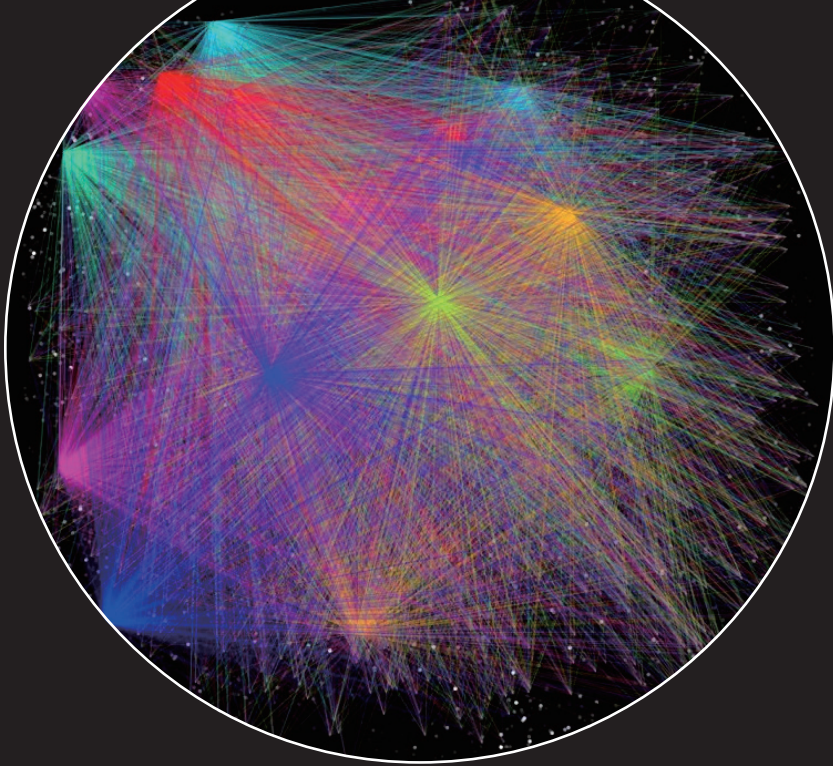


最優秀 JOCOO 賞

広視野 2光子顕微鏡が明らかにした
大脳新皮質神経細胞のネットワークダイナミクス

Network dynamics of cortical neurons revealed by wide-field two-photon microscopy





マウス大脳新皮質¹の神経細胞

サンプル詳細 : カルシウムセンサー (G-CaMP/GCaMP)²
 観察手法 : 多光子顕微鏡・正立・蛍光
 観察倍率 : 4x
 撮影年 : 2018
 顕微鏡データ : 動画



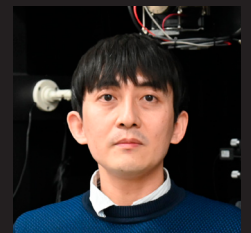
大脳新皮質の機能的ネットワークは、
 100以上の神経細胞と協調的に活動するハブ細胞が存在する
 スモールワールドネットワーク³であった。

受賞コメント

この度はNEURON JOURNAL AWARD 最優秀 JOURNAL 賞という名誉ある賞をいただきまして、大変光栄に存じます。

脳内では数多くの神経細胞が互いに影響し合っており、1つ1つの神経細胞の活動が生まれています。この活動から脳機能の成り立ちを解き明かすのが神経科学者の1つの夢です。動画に映し出された神経細胞の活動には法則が存在しないように見られますが、このような見ると無秩序な神経活動から私たちの日常(秩序)が生まれています。この不思議を一人でも多くの方に感じてもらえればこの上ない喜びです。

本作品は数多くの共同研究者の皆様と産み出した動画です。改めて深く感謝申し上げます。そして、本受賞を励みにして新しい発見ができるように今後も研究に邁進したいと思います。



おおた けいすけ
太田 桂輔

東京大学大学院医学系研究科
 脳神経医学専攻 神経生化学分野 助教
 理化学研究所 脳神経科学研究センター
 客員研究員

いけだ むねぎ
池田 宗樹

Department of Neurology, University of California
 San Francisco

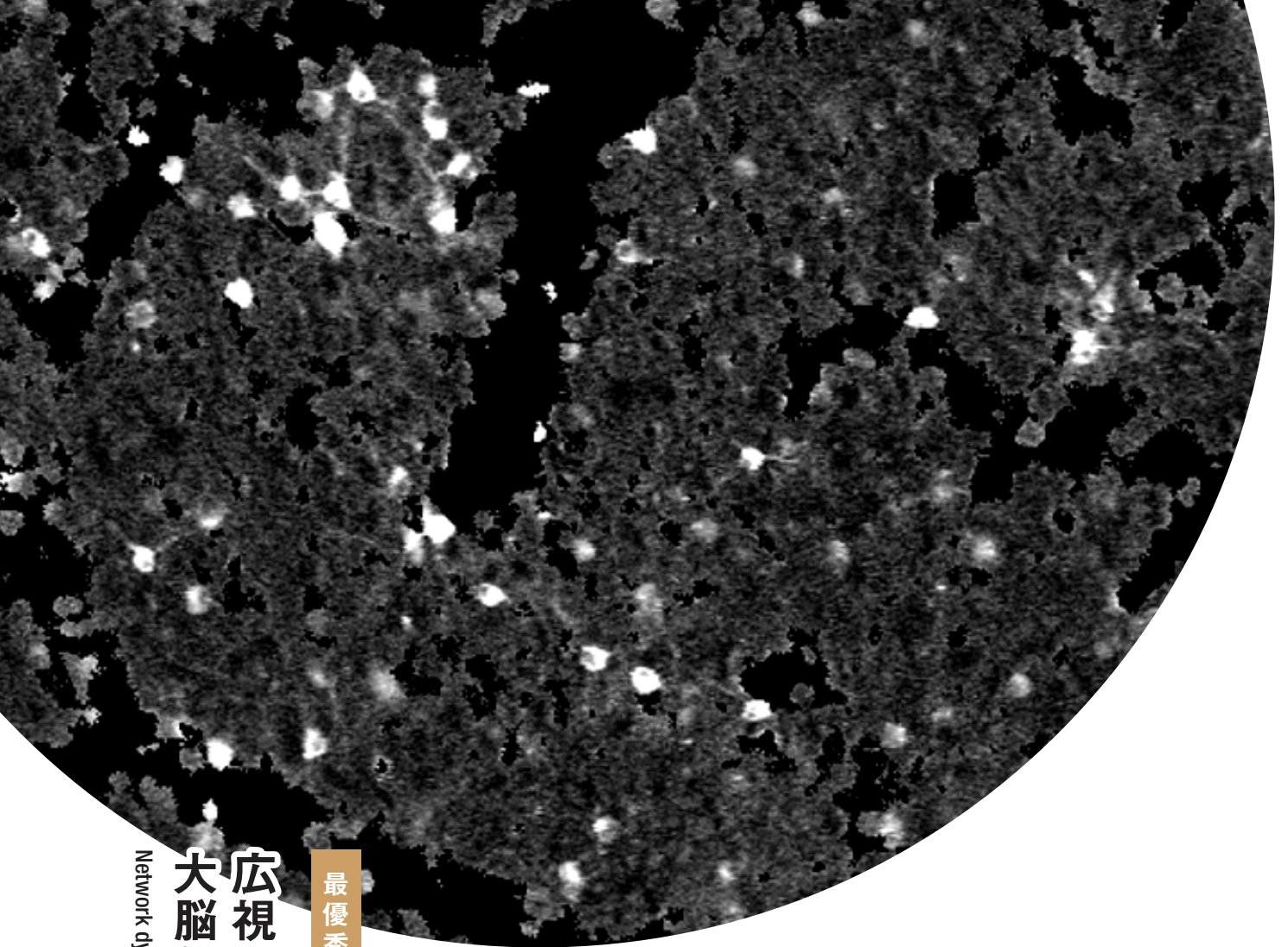
おおいずみ まさふみ
大泉 匡史

東京大学大学院 広域科学専攻 広域システム科学系

むらやま まさのり
村山 正宜

理化学研究所 脳神経科学研究センター

グループ名：理研、東大を中心とした共同研究グループ



最優秀 JOICO 賞

広視野 2 光子顕微鏡が明らかにした

大脳新皮質神経細胞のネットワークダイナミクス

Network dynamics of cortical neurons revealed by wide-field two-photon microscopy

研究概要

脳はさまざまな領域の集合体であり、領域間の相互作用により脳機能が発現すると考えられています。しかしながら、多領域から神経細胞の活動を計測できる顕微鏡は存在せず、広域ネットワークの機能的構造は不明でした。今回、我々は低倍率かつ高開口数を満たす大型対物レンズ、大口径・高感度・高出力光検出器を開発することで、広視野・高解像度・高速撮像・高感度・無収差を同時に満たす 2 光子顕微鏡⁴「FASHIO-2PM (fast-scanning high optical invariant two-photon microscopy)」を開発しました。マウス大脳皮質 2 層に存在する 1 万 6000 個以上の神経細胞の活動を、 9mm^2 (従来の 36 倍) の単一視野面から 7.5Hz の撮像速度で高感度に測定することに成功しました。また、脳表から深さ $500\mu\text{m}$ 程度のマウス大脳皮質 5 層から、6,000 個以上の単一神経細胞の活動を観測することに世界で初めて成功しました。単一神経細胞の活動に基づくネットワークを解析したところ、脳はスケールフリーネットワーク³ではなくスモールワールドネットワークであることが明らかになりました。同時に長距離の機能的結合も含め 100 以上の細胞と協調的に活動する非常にレアなハブ細胞 (存在確率は 1% 未満) の存在も明らかになりました。

論文

Keisuke Ota, Yasuhiro Oisi, Takayuki Suzuki, Muneki Ikeda, Yoshiki Ito, Tsubasa Ito, Hiroyuki Uwamori, Kenta Kobayashi, Midori Kobayashi, Maya Odagawa, Chie Matsubara, Yoshinori Kuroiwa, Masaru Horikoshi, Junya Matsushita, Hiroyuki Hioki, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Masafumi Oizumi, Atsushi Miyawaki, Toru Aonishi, Takahiro Ode, Masanori Murayama.

Fast, cell-resolution, contiguous-wide two-photon imaging to reveal functional network architectures across multi-modal cortical areas.

Neuron. 2021, 109(11), doi: 10.1016/j.neuron.2021.03.032

概要

脳はさまざまな領域の集合体であり、脳領域⁵間の相互作用により脳機能が発現すると考えられています。しかしながら、多領域から1つ1つの神経細胞の活動を同時に計測できる顕微鏡は存在せず、脳神経ネットワークの基本的な機能構造は不明でした。今回、私たちは低倍率かつ高開口数を満たす大型対物レンズ、大口径・高感度・高出力光検出器を開発することで、広視野・高解像度・高速撮像・高感度・無収差を同時に満たす2光子顕微鏡「FASHIO-2PM (fast-scanning high optical invariant two-photon microscopy)」を開発しました。マウス大脳新皮質2層に存在する1万6,000個以上の神経細胞の活動を、9mm² (従来の36倍)の単一視野面から7.5Hzの撮像速度で高感度に測定することに成功しました。単一神経細胞の活動に基づくネットワークを解析したところ、脳はスケールフリーネットワークではなくスモールワールドネットワークであることが明らかになりました。同時に長距離の機能的結合も含め100以上の細胞と協調的に活動する非常にレアなハブ細胞 (存在確率は1%未満)の存在も明らかにしました。本研究で得られた生理学的知見を示したイラストが *Neuron* 誌の表紙を飾りました。

脳機能の解明を目指した 広視野かつ高解像度、高速観察

脳機能は複数の脳領域に存在する神経細胞の協調的な活動によって生まれると考えられています。現在、生きた動物の脳内における神経活動を単一神経細胞レベルで記録するために2光子顕微鏡によるカルシウムイメージングが盛んに行われています。神経科学において2光子顕微鏡は脳機能を理解するために欠かせない光学計測機器です。しかしながら、これまでの2光子顕微鏡で観察できる視野は0.25mm²程度が限界でした。そのためマウスのように小さい動物の脳であっても複数の脳領域から神経細胞を同時に観察できませんでした (図1左)。近年、この限界を克服する目的で、観察視野を広げた2光子顕微鏡が報告されています。しかし、これらは空間解像度⁶が低く単一細胞の観察が保証されてない、

または神経細胞間の協調的な活動を捉えるには撮像速度が低速でした。このように技術革新は進んでいるものの、限界を完全に克服した状況にはありませんでした。脳機能発現を理解するために、複数領域から同時観察 (森の観察) し、かつ一つ一つの神経細胞も記録できる (木の観察) 解像度と、その活動を捉える十分な記録速度を実現する2光子顕微鏡の誕生が望まれていました。そこで私たちは、これら3つの技術要素を同時に満たす革新的な顕微鏡の開発に取り組み、従来視野 (0.25mm²) の36倍に相当する9mm²の視野から細胞レベルで活動を十分な速度 (7.5Hz) で観測する新しい2光子顕微鏡 FASHIO-2PM (fast-scanning high optical invariant two-photon microscopy) の開発に成功しました (図1右)。

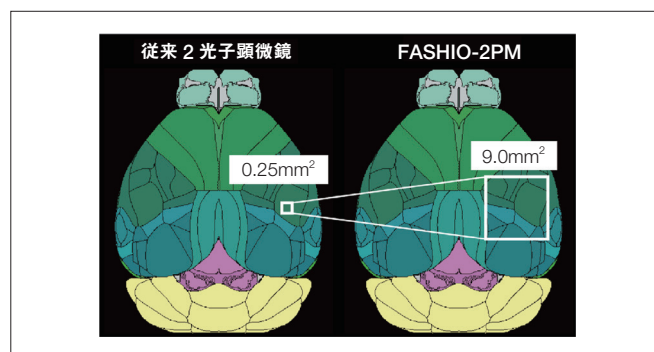
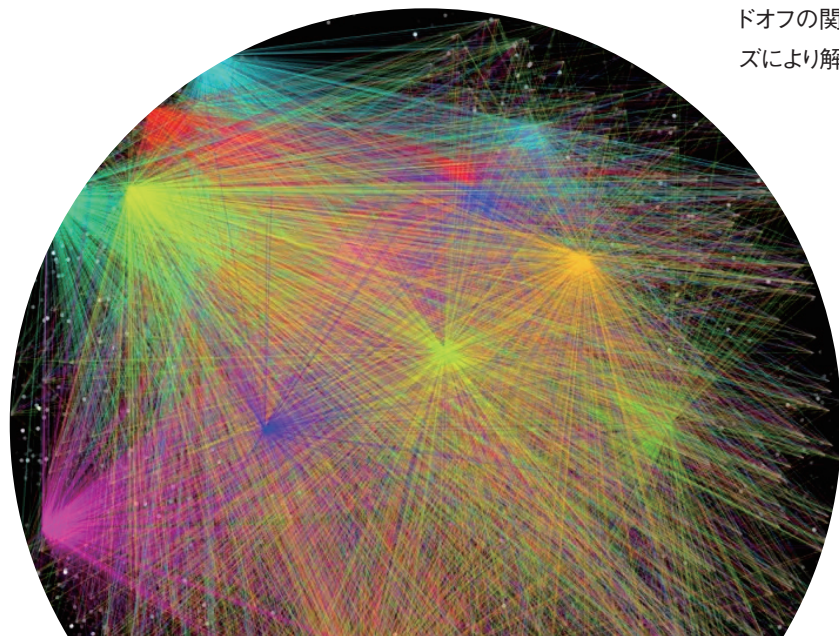


図1 マウス脳における従来の2光子顕微鏡の視野とFASHIO-2PMの視野の比較
白枠は観察視野、黒線は各脳領域の境界を示す。マウス脳の図は、Allen Mouse Common Coordinate Framework v3 (CCF) に基づいて作成した。

大きな瞳径を有する対物レンズによる 低倍かつ高 NA 顕微鏡の実現

一つ一つの神経細胞を観察するためには、高い光学的解像度を持つ顕微鏡でなければなりません。顕微鏡の光学的解像度は対物レンズの開口数 (NA: numerical aperture)⁷によって決まり、開口数が高いほど光学的解像度は上がります (図2A)。一方、広視野で観察するためには、顕微鏡は低倍率でなければなりません。2光子顕微鏡では対物レンズの焦点距離を延ばすことで倍率を下げられますが、対物レンズの焦点距離を延ばすと開口数は低下してしまいます (図2B)。このように低倍率と高い開口数は互いにトレードオフの関係にあります。このトレードオフは瞳径の大きな対物レンズにより解決できます (図2C)。



ただし、単純に瞳径の大きな対物レンズを製作すれば良いというわけではありません。2光子顕微鏡ではわずかな収差⁸によって励起効率が下がり、画像は暗くぼけてしまいます。しかしながら、収差を抑えた大型レンズを設計することは非常に困難でした。予備実験では、実体顕微鏡用の低倍でNAが0.4程度の対物レンズを2光子顕微鏡に取り付けてイメージングを行いました。その結果、収差はひどいものの2光子励起現象が生じる事を確認しました。そこで私たちは、瞳径が大きく、NAが0.4かつ無収差な対物レンズを製作することができれば、単一神経細胞レベルの解像度で広視野観察を実現できると推測しました。株式会社フォブ、株式会社ニコンと共同で、NA0.4かつ視野全域にわたり回折限界に近い励起光率を有する巨大対物レンズを製作しました(下記参照: 蛍光経路はNA0.8)。また、この対物レンズの性能を最大限に生かすための巨大なチューブレンズ⁹(結像レンズ)とスキャンレンズ⁹も開発しました(図2E)。さらに、浜松ホトニクス株式会社と連携して広視野観察用の大口径高感度光検出器(光電子増倍管)¹⁰を開発しました(図2F)。これにより、広視野かつ単一神経細胞レベルの解像度を実現しました。

最後に、高速撮像を実現しなければなりません。時々刻々と変化する神経活動を正確に観察するためには、わずかな時間で画像を1枚1枚撮像し続けなければなりません。広視野観察するために走査数(画素数)を上げると、1ピクセルに当たる励起パルス¹¹の数が1, 2回と低下してしまいます。このパルス数は通常の2光子顕微鏡の3-4倍も少ない値です。その分、2光子励起確率が落ちてしまい、撮像された画像は暗く、不鮮明となってしまいます。しかし、それだけ1ピクセル当たりの走査時間を短くしなければ、広視野での高速撮像は実現できませんでした。そこで私たちは、次に示す多角的なアプローチにより顕微鏡の光学性能を上げて、この問題を克服しました。

- (1) 神経活動由来の蛍光をより効率的に収集するため、対物レンズを高NA化(図2D)
- (2) 2光子励起効率を増加させるため、プリチャージ機構¹²を開発
- (3) 高い信号対雑音比を得るため、高感度光検出器(光電子増倍管)を大出力化(図2F)

これらの工夫により、高速撮像でも明るくコントラストの高い画像を得ることが可能となりました。

このように私たちは広視野・高解像度・高速撮像・高感度・無収差のすべてを同時に満たす2光子顕微鏡を世界で初めて開発し、「FASHIO-2PM (fast-scanning high optical invariant two-photon microscopy)」と名付けました。

※高いOptical invariantを有する顕微鏡は広視野かつ高解像度観察を実現します。

大脳新皮質 2/3 層と 5 層の神経活動像

マウス大脳新皮質に広範囲にカルシウムセンサーを発現させて2光子観察する手法を確立し、FASHIO-2PMを用いたカルシウムイメージング法によりマウス大脳新皮質2層(脳表から深さ100 μ m程度)から7.5Hzの撮像速度で観察を行いました。大規模な撮像画像から神経細胞を検出する方法も合わせて開発し、体性感覚野・視覚野・運動野などを含む全15脳領域から1万6,000個以上の神経細胞の活動を同時に観測することに成功しました(図3、作品動画8~53秒)。これは、単一視野面で記録された細胞数と撮像速度としては世界最大・最速です。さらにマウス大脳新皮質5層(脳表から深さ500 μ m程度)から、6,000個以上の単一神経細胞の活動を観測することに世界で初めて成功しました。

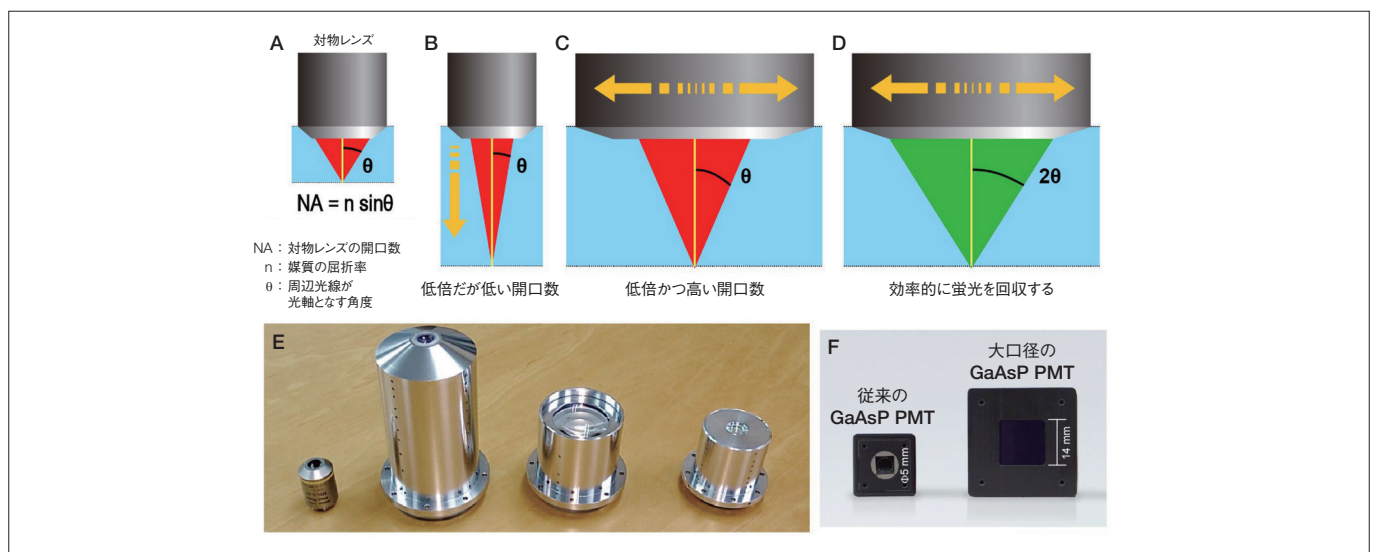


図2 広視野観察(低倍率)と高解像度観察(高開口数)のトレードオフ、トレードオフを解決した瞳径の大きな対物レンズと大口径PMT

A: 対物レンズの開口数(NA: numerical aperture)の定義。

B: 広視野観察と光学的解像度のトレードオフ問題 2光子顕微鏡の倍率は対物レンズの焦点距離を長くすることで下げられる(黄矢印)。しかしながら、開口数が下がり、光学的解像度が低下してしまう。

C: 瞳径の大きな対物レンズによるトレードオフ問題の解決。

D: 励起経路NA0.4の2倍となる蛍光経路NA0.8による効率的な蛍光回収。

E: 左から市販の10倍対物レンズ、本研究で開発した対物レンズ(焦点距離35.0mm、励起経路の開口数0.4、蛍光経路の開口数0.8)、チューブレンズ、スキャンレンズ。

F: 従来のGaAsP PMT(光電子増倍管)と浜松ホトニクス株式会社が開発した大口径のGaAsP PMTの写真。

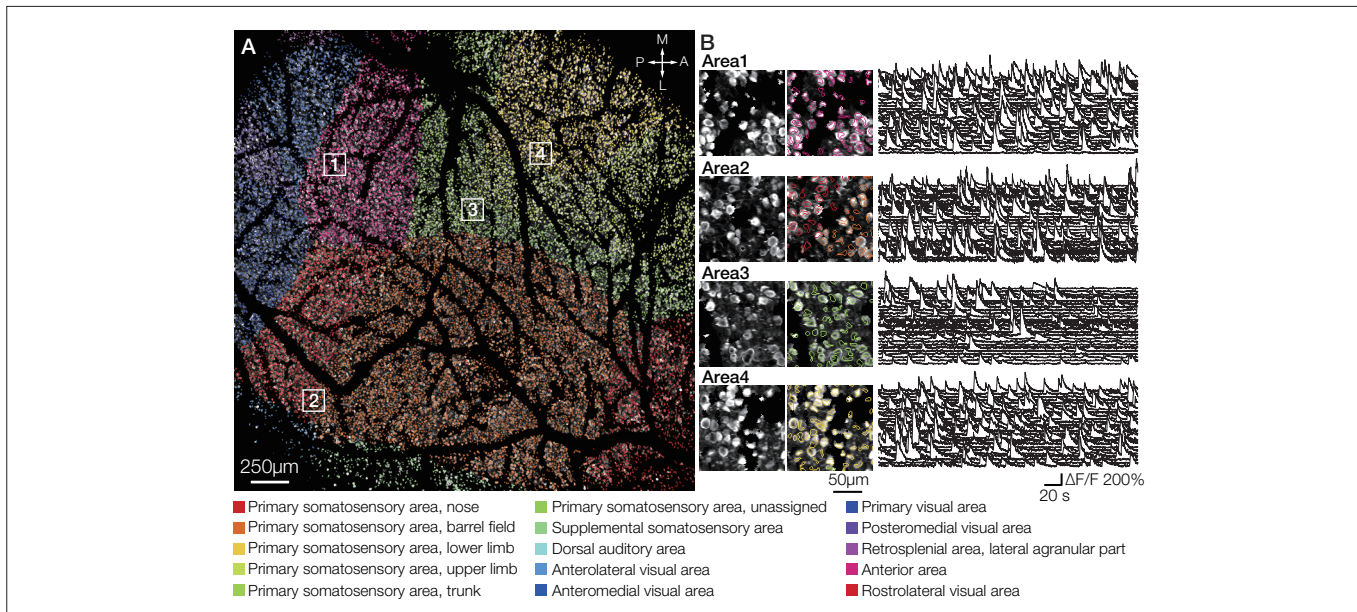


図3 FASHIO-2PMによって観測されたマウス大脳新皮質2層の神経細胞

A: FASHIO-2PMによって観測されたマウス大脳新皮質2層(深さ120μm)の神経細胞。各色は異なる脳領域を示す。全15脳領域から神経活動を計測できた。

B: 左図で囲まれた各領域内で検出された細胞の神経活動データ。

大規模イメージングによって明らかになった 大脳新皮質の機能的ネットワーク特性

単一細胞解像度での神経活動の同時計測は、神経細胞間の相互作用(機能的結合強度)を明らかにできます。そして大規模記録はその相互作用が生み出す大脳新皮質の機能的なネットワーク特性の評価を可能とします。私たちは、FASHIO-2PMで観測した神経活動データから機能的ネットワーク解析を行いました。そして、大脳新皮質の機能的ネットワークは、クラスター性(図4A)とスモールワールド性(図4B)という2つの特性を満たすスモールワールドネットワークであることを世界で初めて見出しました。クラスター性は、ある細胞に機能的に結合している二つの細胞も互いに結合している確率が高いことを意味します(自分の友人AさんとBさんを考えます。その2人も友人同士である確率が高いことを意味します)。一方、スモールワールド性は、無作為に選んだ2つの神経細胞はわずかな数の神経細胞を介するだけで機能的に結合していることを意味します(身近な例として、わずかな数人を介するだけで有名人と繋がることを意味します)。従って、この解析結果はクラスター内(短い結合で形成された神経細胞集団)で共有された活動情報は、長距離結合によって物理的に離れたクラスターとも効率的に共有されていることを示唆します。

驚くべきことに100以上の神経細胞と協調的な活動を示すハブ細胞も発見しました(図4C、作品動画54秒以降:動的に変化するハブ細胞を可視化しました)。ハブ細胞は極めて稀に存在します(存在確率は1%未満)。このハブ細胞の存在は、各神経細胞の活動がシステム全体に与える影響力は一律ではなく、細胞ごとに偏っている可能性を示唆します。脳の中に数えきれないほどの細胞が存在しますが、私たちの社会にもリーダーが存在するように、ハブ細胞のような稀に存在する細胞が脳システム全体の舵を取っているのかもしれない。

単一神経細胞の大規模記録はこれまでの観察スケールを単純に上げただけのように考えられますが、本研究に示すように神経科学における新しいブレークスルーを生み始めています。近年、神経科学では単一神経細胞を形態・mRNA・タンパク質などから分類する研究が盛んに行われています。ハブ細胞特異的な分子特性を調べることで、これまで明らかにされてこなかった新しい脳の側面を見つけることが期待されます。

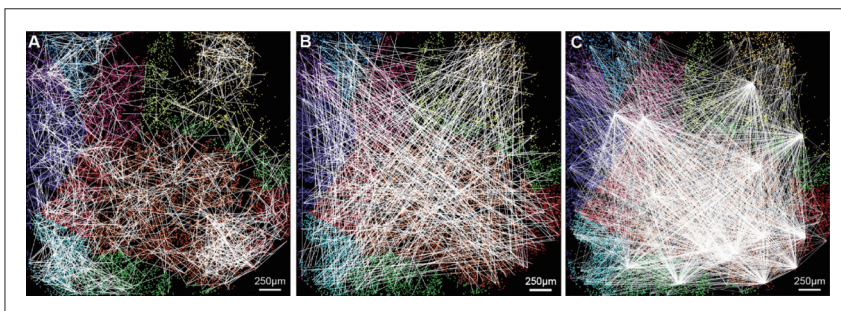


図4 大脳新皮質2/3層の機能的ネットワーク解析

A: 500μm以下となる機能的結合の代表例。機能的結合(白線)は、同一脳領域内に留まりクラスターを形成しているように見られる。

B: 2,500μm以上となる機能的結合の代表例。脳領域を超えてクラスターを結ぶように機能的結合が形成されている。

C: 120個以上の神経細胞と機能的結合を形成するハブ細胞…全視野において15個のみ存在した。

用語解説

1. 大脳新皮質

脳の表面を覆う部位であり、知覚・認知・意思決定・運動・記憶・推論などの高次脳機能を司る。脳表面から深部方向に1～6層の構造を形成し、各層の細胞はそれぞれ異なる役割を担っていると考えられている。2/3層の興奮性細胞は大脳新皮質内の脳領域に軸索を伸ばして、その活動を伝達する。5層の興奮性細胞は皮質下核や脊髄にも軸索を伸ばしており、大脳新皮質の情報を皮質外にも伝える。

2. カルシウムセンサー (G-CaMP/GCaMP)

カルシウムイオンと結合すると蛍光強度が変化するタンパク質。本研究では神経細胞の活動電位によって細胞内に流入したカルシウムイオンを検出するために最適化されたカルシウムセンサーを利用している。神経細胞の蛍光強度の変化は、神経細胞の活動電位を反映する。

3. スケールフリーネットワーク / スモールワールドネットワーク

どちらも現実世界の複雑ネットワークに観測される特性である。ネットワークはノード(点)と、ノードとノードを結ぶリンク(線)で描かれる。スケールフリーネットワークにおいては、他のノードとあまり結ばれていないノードが多く存在する一方で、多数のノードと結ばれたノード(ハブ)がごく稀に存在する。スモールワールドネットワークにおいては、無作為に選ばれたノードのペアが、わずかな数のリンクとノードを介するだけで繋がることできる。スモールワールドネットワークにハブが存在することもあり、両者は相反しない。

4. 2光子顕微鏡

一つの蛍光分子が二つの光子を同時に吸収して励起状態となる非線形光学現象(2光子吸収過程)を利用した顕微鏡。励起効率が光子密度の二乗に比例するため、光子密度が高い対物レンズの焦点でのみ蛍光分子を励起できる。近赤外線超短パルスレーザーを光源として用いることで、生体深部の蛍光分子の観察が可能となる。

5. 大脳新皮質の脳領域

大脳新皮質には視覚、聴覚、体性感覚、味覚を表現する感覚性皮質(一次感覚野、その高次感覚野)、随意運動に関わる一次運動野や高次運動野、感覚と運動の統合や認知・意思決定・記憶などに関係する連合野(前頭前野を含む前頭連合野、頭頂連合野、側頭連合野など)が存在する。大脳新皮質には機能局在性(各脳領域ごとに異なる機能を有する)があると考えられている。

6. 空間解像度

ここでは光学的な空間分解能を意味する。空間解像度が高いほど、より小さい対象物を識別できる。2光子顕微鏡においては、焦平面方向(XY方向)よりも光軸方向(Z方向)の空間解像度が低下する。光軸方向の空間解像度を高めることが単一神経細胞を観察するために欠かせない。

7. 開口数 (NA : numerical aperture)

レンズの空間分解能を定める主な指標。基本的には高いNAを有するレンズを利用することで、より明るく、鮮明な像が得られるが、収差のあるレンズではこの限りではない。

8. 収差

光学系において理想的な結像からのずれを意味する。収差には5種類の単色収差の2種類の色収差がある。収差が大きいと観察像にボケやゆがみが生じてしまう。

9. チューブレンズ / スキャンレンズ

励起光路において対物レンズ直前に位置するレンズ。スキャンレンズは、走査ミラーで反射されたレーザー光を一定のスポットサイズで焦点面に光を集める役割を果たす。チューブレンズは、スキャンレンズを通過した光を平行光線として対物レンズに伝播させる。無限遠補正光学系が実現され、チューブレンズと対物レンズの間にダイクロイックミラーなどの光学機器の挿入が可能となる。

10. 高感度光検出器 (光電子増倍管)

光電効果により光を光電子に変換し、その電子数をダイノードを利用して増倍させることで微小な光を検出する装置。

11. 励起パルス

2光子励起顕微鏡では対物レンズの焦点において高い光子密度を実現するために超短パルスレーザーが光源として利用される。パルスレーザーから出力されるパルス状(高強度かつ短い時間幅)の光を励起パルスと呼ぶ。

12. プリチャージ機構

2光子励起のための超短パルスレーザーは、標本に照射される前にさまざまな光学素子を通過する。この過程でパルス幅が歪んでしまい励起効率が低下する。プリチャージ機構はこの歪みを補正して、本来の励起効率を実現可能とする。



Q&A

Q1 1万6,000個以上の細胞を1視野で観察できたということですが、観察、また画像解析を行う上で苦労された点などありませんでしょうか。

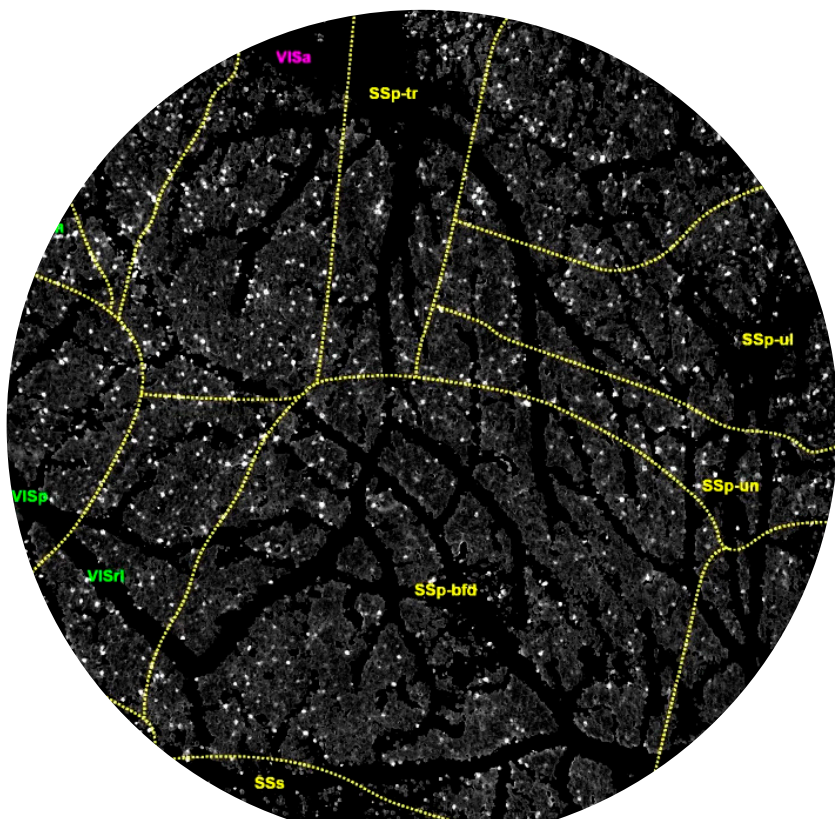
カルシウムセンサーを広範囲かつ高密度に発現させる手法を立ち上げることに大変苦労しました。顕微鏡を開発した当時はカルシウムセンサーを明るくかつ高密度に発現した遺伝子改変マウスは存在しなかったため、あらゆる遺伝子導入方法やベクターを試しました。また、撮像動画から単一神経細胞を検出することにも苦労しました。従来の細胞検出法はFASHIO-2PMで取得されるような大規模データへ適用されることは想定されていませんでした。計算コストを押さえつつ、正確に細胞を検出する細胞検出アルゴリズムを構築する必要がありました。

Q2 今回発見されたハブ細胞が、協調的な働きかけをする細胞との距離に限界はあるのでしょうか？ また今後ハブ細胞について、どのようなアプローチで研究を進めていかれるのでしょうか。

安静時の動物においては、ハブ細胞・非ハブ細胞ともにペアとなる細胞との距離が大きくなるにつれて協調的な活動は減少する傾向にあります。ただし、脳全体がより協調的に働く状況、例えば動物が課題を遂行しているときの活動を観測したならば、遠く離れた脳領域に存在する神経細胞群がより協調的に活動するかもしれません。今後は行動課題時の神経ネットワークのダイナミクスを評価するとともに、ハブ細胞の機能、形態、そしてそれらを運命づける遺伝的な特性を明らかにしたいと考えています。

Q3 広視野2光子顕微鏡により新たな知見が多く得られたということですが、この顕微鏡を用いて今後挑戦してみたいことはなんですか。

FASHIO-2PMでは光学顕微鏡の基本である対物レンズと光検出装置の性能を向上することで広視野・高解像度イメージングを実現しているため、高い拡張性を持ちます。様々な顕微鏡技術を組み込むことも容易であり、多種多様なサンプルの観察も柔軟に対応できると考えられます。今後は神経科学だけに留まらず、免疫、がん、植物などの生物分野において大規模観察に挑戦し、さらに工学、情報科学とも結びつくことで、これまでの仮説に頼らないデータ駆動型研究を各分野にもたらすことを目指したいと考えています。



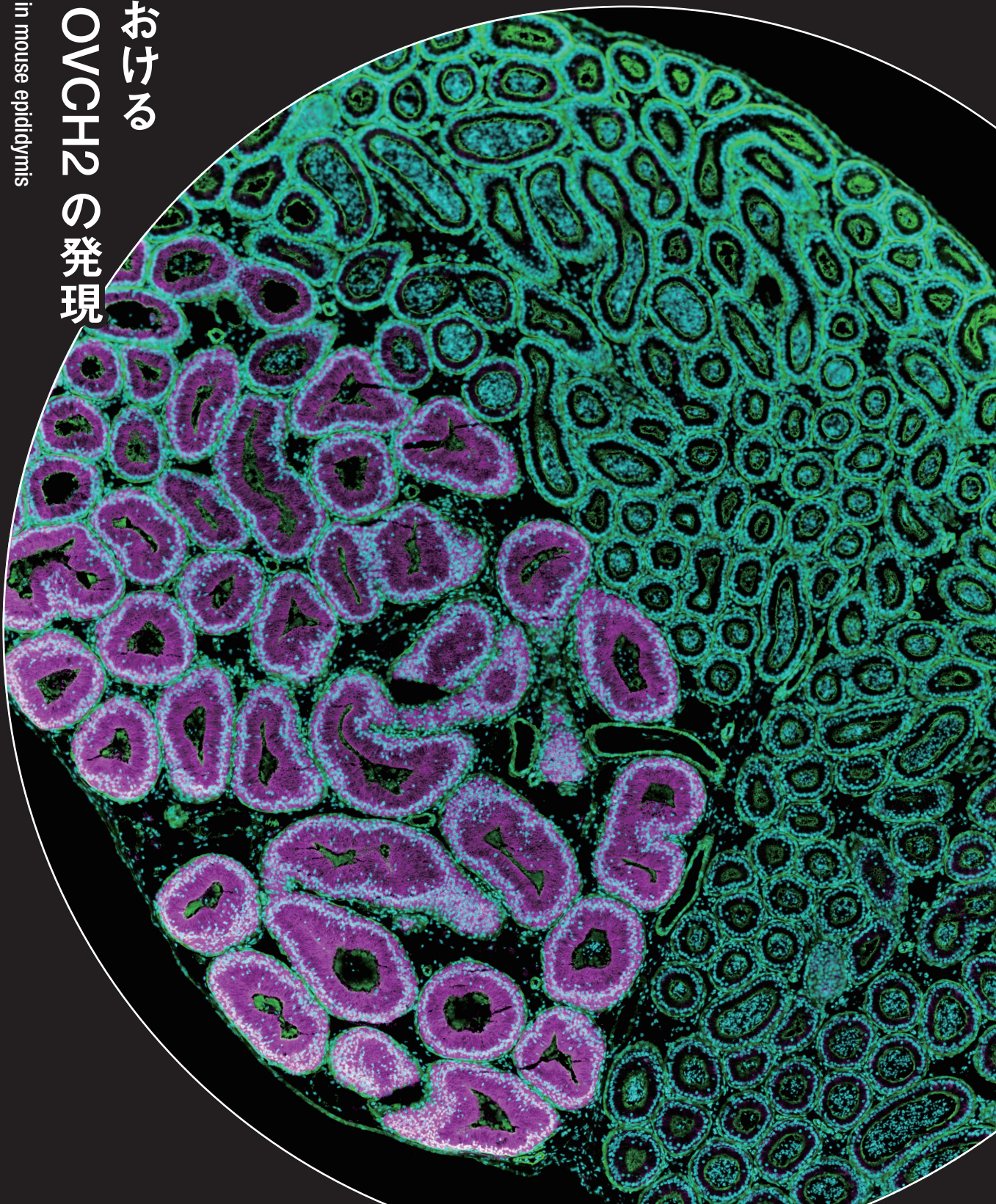
審査員より

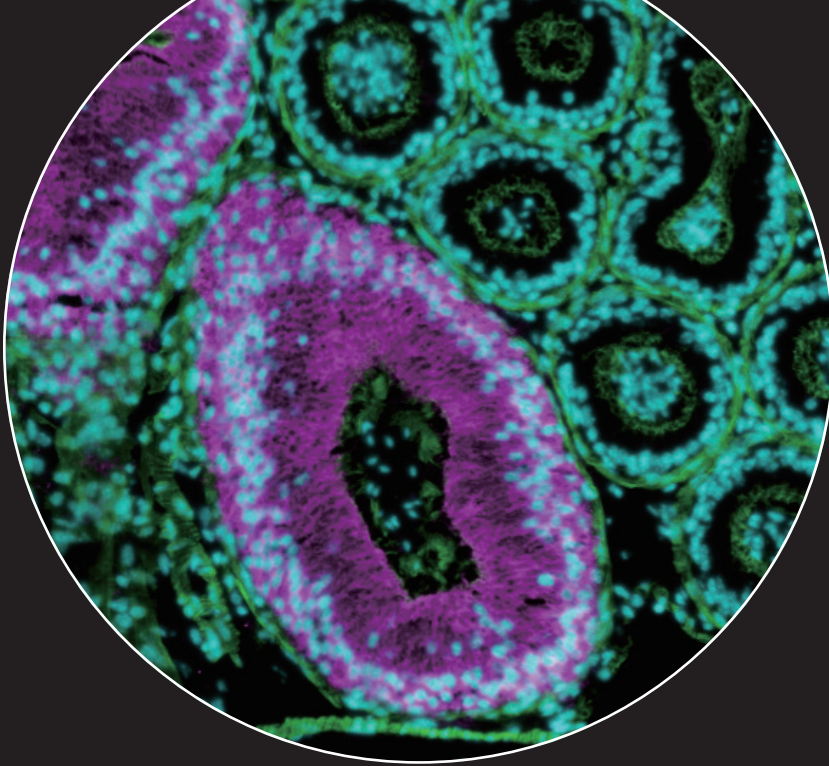
- 高い光学技術を駆使した優れた研究成果。
- 学術的には、宇宙一複雑な構造物である脳の神経活動を超広範囲で観察する革新的な新技術の開発に成功し、大脳の機能的ネットワーク特性を明らかにした画期的な研究であるといえる。芸術面においては、まるで、夏の夜に大群の蛍が樹木に集まっているのを、上空から眺めているかの様にも感じられる。こんな風景や活動が脳の中で行われているのだとまさに実感させられる。見る者に深い感銘を与える素晴らしい作品である。
- 美しくかつ学術的意義が高いことは疑いが無いです。
- 拡大像ではニューロンが軸索を介して情報をやり取りしている詳細まで確認でき、学術的にも芸術的にも優れている。
- 宇宙を感じる。
- 地表を覆う都市のような広大さを感じる。
- サイバー感、マトリックス的！ デジタルでは再現できない緻密で有機的な世界。
- 途中イルミネーションのような意外性がある、面白い。
- なぜか季節を感じる映像にひかれた。

優秀賞

マウス精巢上体における
分泌プロテアーゼ OVCH2 の発現

Expression of secreted protease OVCH2 in mouse epididymis



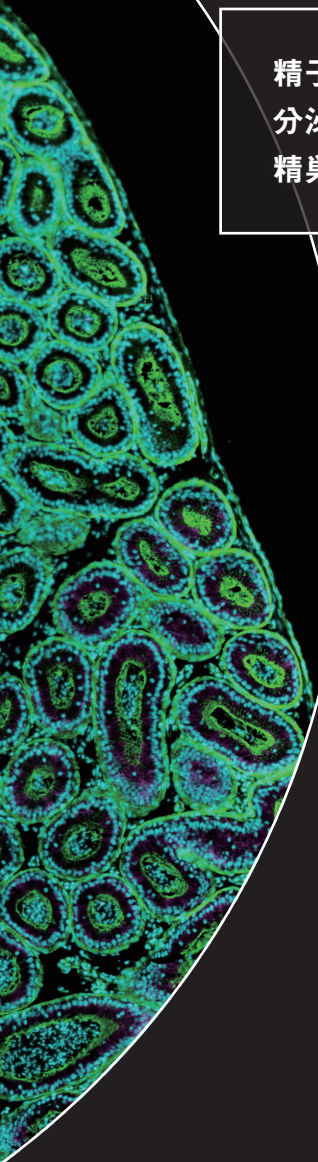


マウス精巣上部頭部¹・凍結組織切片

サンプル詳細 : 青:核 (Hoechst 33342)
緑: F アクチン (Alexa Fluor 488 標識ファロイジン)
赤: OVCH2² (一次抗体: 抗 OVCH2 抗体 (ウサギ)、
二次抗体: Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ IgG)

観察手法 : 倒立顕微鏡・蛍光
観察倍率 : 20x
撮影年 : 2020
顕微鏡データ : 静止画

精子の成熟に必要な
分泌プロテアーゼ³ OVCH2 の発現を可視化したことで、
精巣上部⁴ による精子成熟⁵ の分子メカニズムが明らかとなった。



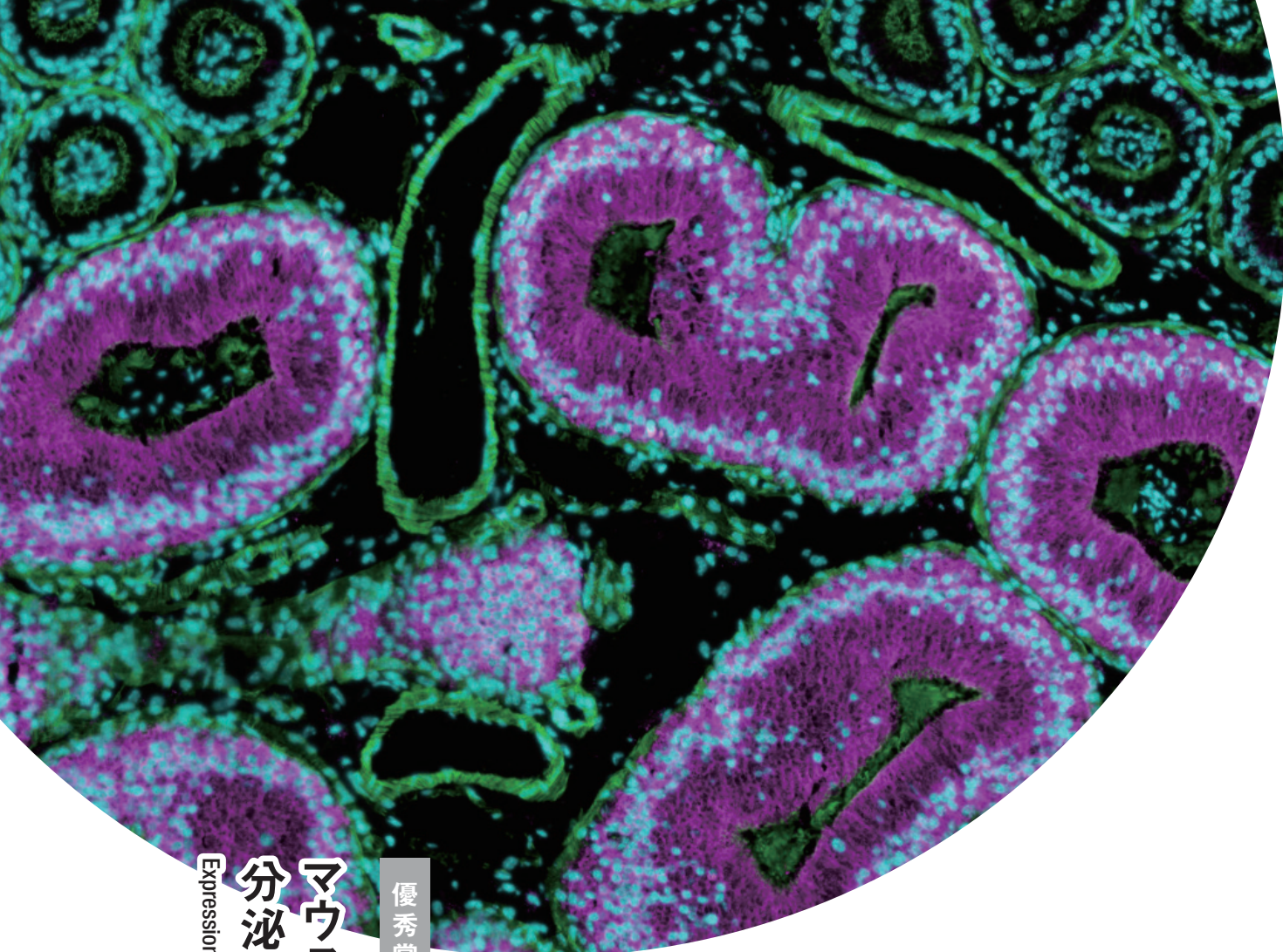
受賞コメント

この度は NICON JOKO AWARU 優秀賞に選んでいただき大変光栄です。
精子成熟を担うプロテアーゼ OVCH2 を免疫蛍光染色したことで、これまで
組織学的な特徴を見出しづらかった精巣上部に、精子成熟をさせるという生
理機能を可視化することができました。

同時にそこに浮かび上がったのは受精を確かなものに約束する生体メカニ
ズムの絶妙さであり、生命と生殖の神秘を改めて実感させてくれる美しさで
した。



きよずみ だいじ
浄住 大慈
大阪大学微生物病研究所
遺伝子機能解析分野 助教



優秀賞

マウス精巣上体における 分泌プロテアーゼ OVCH2 の発現

Expression of secreted protease OVCH2 in mouse epididymis

研究概要

精巣で作られたばかりの精子は受精能力を有していません。これは精子を成熟させる機能が精巣には備わっていないためです。精巣で作られた精子は、精巣上体へ送られ、「成熟」することで受精能力を獲得します。これまで、精子形成機構は盛んに研究されてきましたが、精巣上体における精子の成熟機構についてはほとんど研究が進んでいませんでした。

本論文では、精巣から分泌される NELL2⁶ というタンパク質がルミクリン⁷ という機構で精巣上体を刺激して分化誘導し、精子の成熟機構をオンにしていることを見出しました。分化した精巣上体はプロテアーゼ OVCH2 を分泌し、これが精子表面に作用することで精子の成熟を制御していることを明らかにしました。

精巣上体による精子成熟の制御機構を明らかにしたことで、本研究の成果は不妊症の病因解明に新たな視点を加えました。

論文

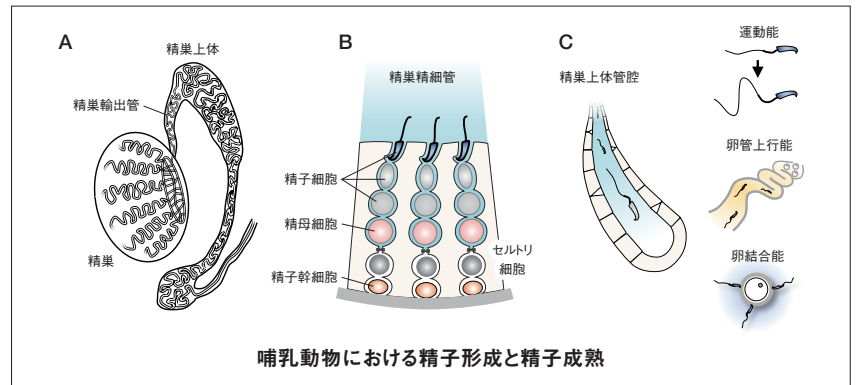
Daiji Kiyozumi, Taichi Noda, Ryo Yamaguchi, Tomohiro Tobita, Takafumi Matsumura, Kentaro Shimada, Mayo Kodani, Takashi Kohda, Yoshitaka Fujihara, Manabu Ozawa, Zhifeng Yu, Gabriella Miklossy, Kurt M Bohren, Masato Horie, Masaru Okabe, Martin M Matzuk, Masahito Ikawa

NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility.

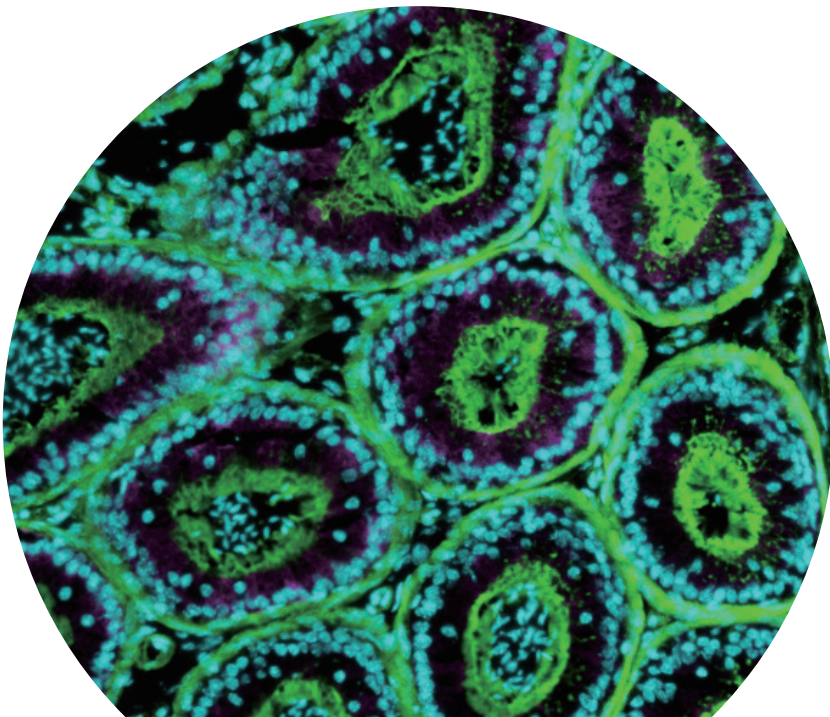
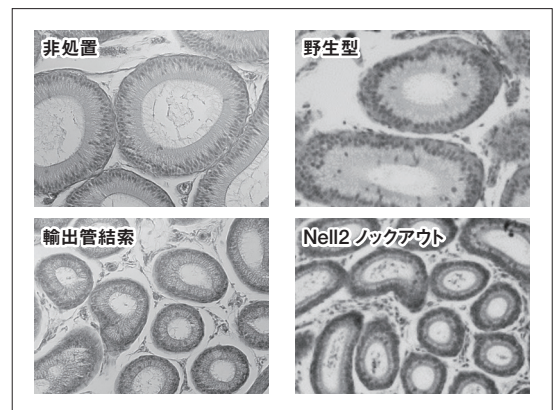
Science. 2020, 368(6495), doi: 10.1126/science.aay5134.

解説

精子が精巣で作られることは多くの人が知っています。セルトリ細胞のサポートを受けながら、毎日1億個もの精子が精子幹細胞から生み出されています。しかし精巣で作られたばかりの精子には受精能力が備わっていない、と言ったらどうでしょうか。精子は精巣で作られたのち、精巣上皮へと送られます。精巣上皮は上皮性管腔⁸、すなわち上皮のチューブからなる器官であり、精子はこの精巣上皮をゆっくりと輸送される間に、運動能や卵管を上行し卵と結合する能力を獲得します。これを精子の成熟といいます。精巣上皮には上皮のチューブが高度にコイル化してコンパクトに詰め込まれていますが、この延々と続くチューブが一体どのようにして精子を成熟に至らしめるのでしょうか。本研究ではそのメカニズムの解明に挑みました。

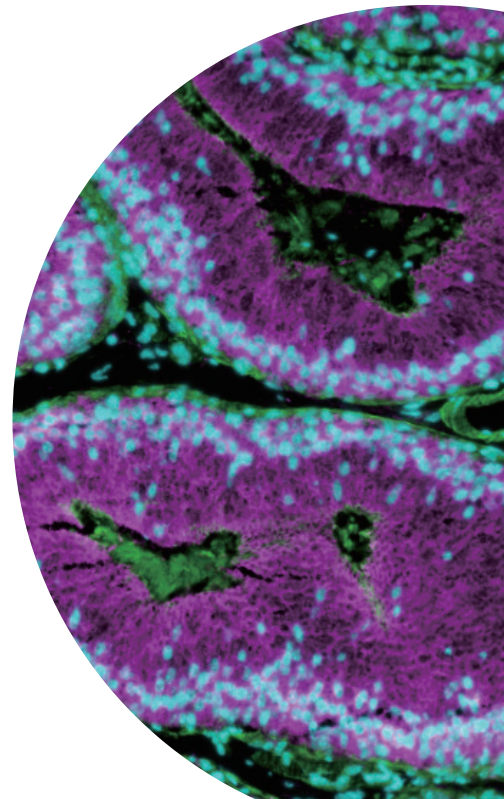
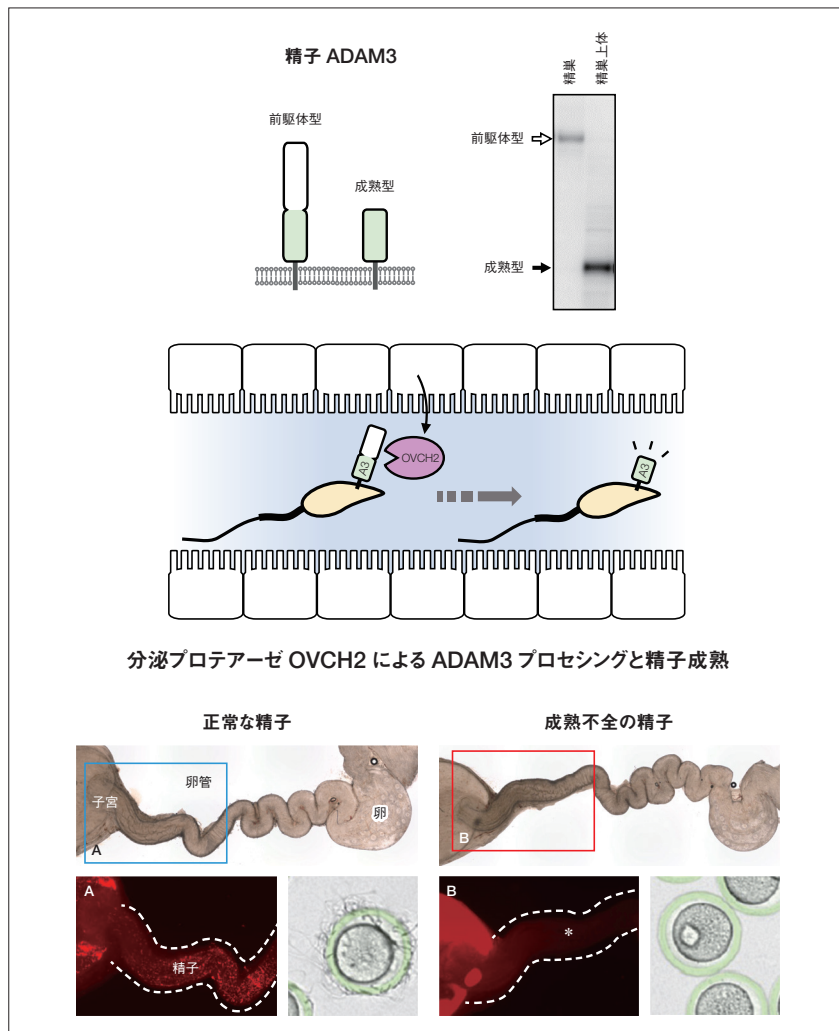


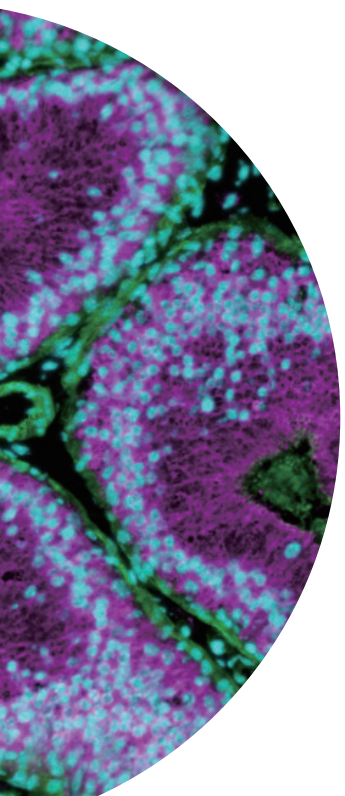
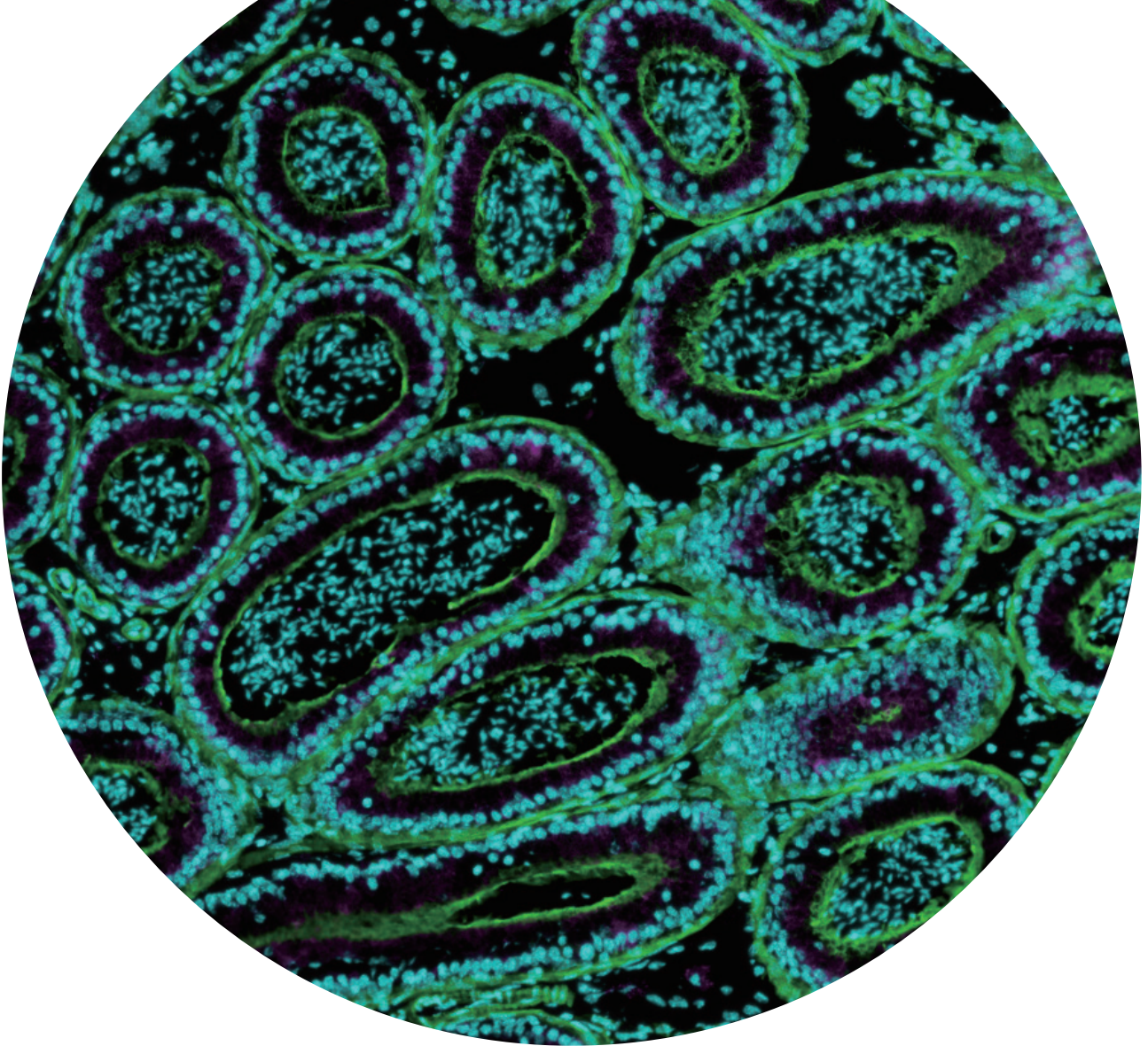
不妊のマウスの解析から、精巣から分泌されるタンパク質がスイッチとなって精巣上皮が持つ精子成熟機構のオンオフが制御されていることがわかりました。精巣は NELL2 というタンパク質を分泌し、これが生殖路を通じて精巣上皮に発現する受容体 ROS1 に作用します。NELL2 をノックアウトしたマウスでは、精巣上皮の精子成熟機構がオンにならず上皮組織が萎縮しますが、精巣と精巣上皮とを連絡する輸出管を結索し NELL2 の流れを遮断した場合にも同じことが観察されます。



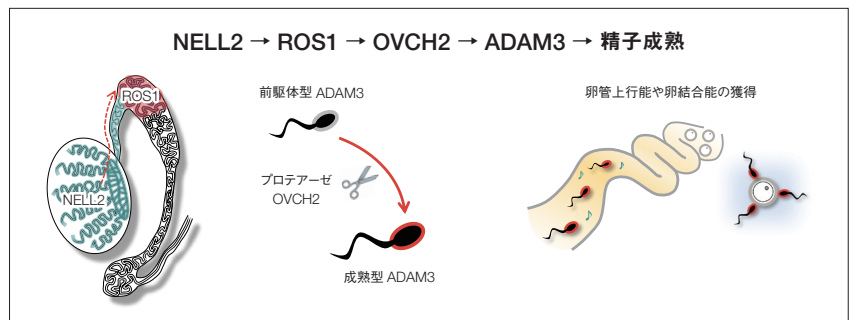
NELL2 に応答して精子成熟機構がオンになると、精巣上皮は OVCH2 というプロテアーゼを管の中心へ向けて分泌します。OVCH2 のノックアウトマウスは精子が成熟せず不妊となることから、OVCH2 が精子成熟に必須であることがわかります。マウス成体の精巣上皮をヘキスト色素と蛍光標識ファロイジンで染色すると、高度にコイルした特徴的な上皮性管腔構造と、その中を輸送される精子が認められます。ここに OVCH2 の免疫蛍光染色像を重ねてみると、精巣上皮の起始部に特異的な染色パターンから、精巣上皮に入ってきた精子に対して直ちに成熟機構が作用していることがわかりました。

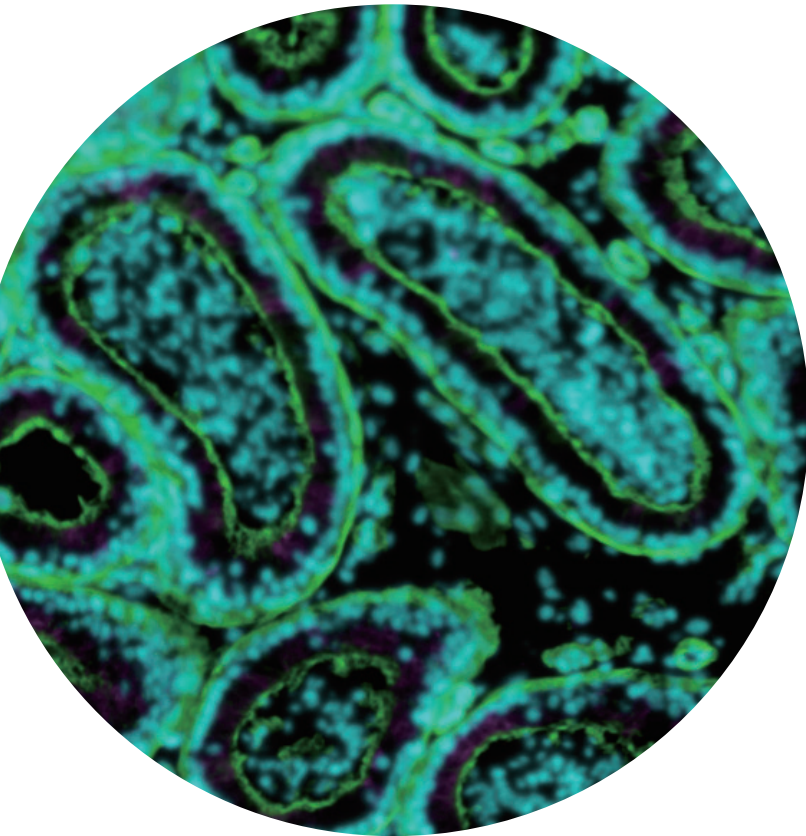
分泌された OVCH2 は精子の表面タンパク質 ADAM3⁹ の前駆体型から成熟型¹⁰ へのプロセッシング¹¹ に必須であり、これによってはじめて精子は卵管を上行し卵と相互作用する能力を獲得します。OVCH2 をノックアウトしたマウスでは、精巣上皮における精子 ADAM3 のプロセッシングがうまくいきません。この結果、精子が成熟して卵管上行能や卵結合能を獲得することができず、雄マウスは不妊となってしまいます。





このように、精巣から分泌された NELL2 が精巣上体の精子成熟機構をオンにしてプロテアーゼ OVCH2 を分泌させ、これが精子表面の ADAM3 をプロセッシングすることで精子を成熟させていることがわかりました。この研究によって、これまでわからないことの多かった精子成熟の解明を大きく前進させることができました。同時に、この研究で得られた精巣上体の非常に印象的な顕微鏡画像は、私に受精という生命の神秘を改めて感じさせてくれる素晴らしい機会をもたらしてくれました。





用語解説

1. 精巣上体頭部

精巣上体のうち最も精巣に近い側から、頭部、体部、尾部と呼ぶ。精子の成熟は主に精巣上体頭部が担っており、精子に作用する様々な因子が発現している。

2. OVCH2

精巣上体に発現する分泌プロテアーゼであり、OVCH2の発現は精巣から分泌される NELL2 によって制御されている。OVCH2は精子表面の ADAM3 に作用することで精子の成熟に必須の役割を果たしている。

3. 分泌プロテアーゼ

細胞の外へと分泌され、そこで蛋白質を切断する酵素。非特異的にタンパク質を分解するタイプと、特定の基質のみを切断するタイプとがある。特に後者の基質となるタンパク質は切断によって分子機能が制御されることが多い。

4. 精巣上体

精巣で作られた精子の成熟、輸送、貯蔵を担う器官。高度に折りたたまれた上皮性管腔であり、その引き伸ばすと長さはマウスでは 1m、ヒトでは 4-5m にもなる。

5. 精子成熟

精巣で作られたばかりの精子には泳いだり卵と受精する能力がない。この未熟な精子に何らかの変化が生じて受精に必要な能力を獲得すること。精子成熟は精巣上体が担っている。

6. NELL2

精巣で作られる分泌タンパク質。精巣上体が OVCH2 を発現し精子を成熟させる機構を制御しており、精巣上体に発現する受容体 ROS1 に結合する。NELL2 を欠くと精子成熟機構がオンにならず、精子が成熟できなくなり雄は不妊となる。

7. ルミクリン

分泌因子が管腔を通じて分泌送達されること。ルミクリンによって分泌因子は発現部位から離れたところまで作用することができる。

8. 上皮性管腔

上皮細胞が作るシート状組織がさらに管状構造となったもの。精巣上体や卵管などの生殖器官だけでなく、消化管、腎臓、分泌腺など体の中にはさまざまな上皮性管腔がある。

9. ADAM3

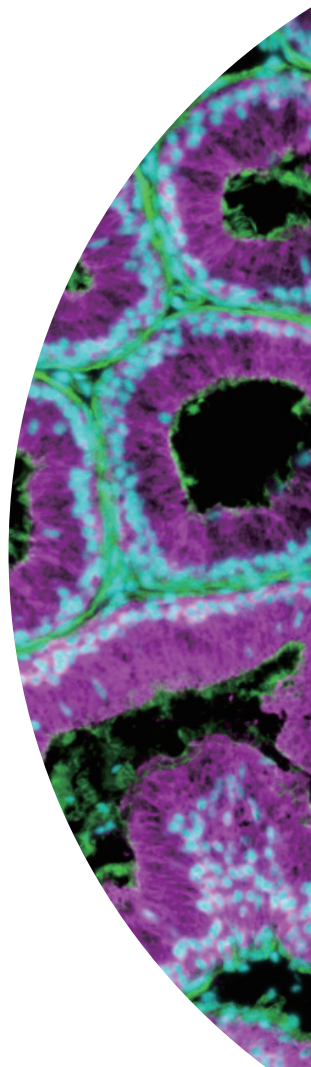
精子の細胞表面にある膜タンパク質。精子の成熟に不可欠であり、ADAM3 を欠損するマウスもまた精子成熟不全によって不妊となる。

10. 前駆体型→成熟型

多くのタンパク質は必要とされるとき以外は機能しないように不活性な前駆体型として作られる。前駆体はプロテアーゼによる部分切断のような翻訳後修飾を受けることで成熟型に変換され、はじめて分子機能を発揮する。

11. プロセシング

タンパク質に分子構造の変化を伴う何らかの処理が施されること。多くの場合はプロテアーゼによる切断を意味する。



Q&A

**Q1 精巣上体が精巣を成熟させるメカニズムに着目した理由はなんで
すか？ またどのように OVCH2 がそのメカニズムに必須である
ことを発見されたのでしょうか？**

精巣上体による精子成熟メカニズムについてはこれまでほぼブラックボックスでした。精巣で発現する NELL2 のノックアウトマウスの不妊の原因を調べると、精巣上体において、本来プロセシングされるべき精子タンパク質に異常が生じていることを見出しました。この知見から、精巣が NELL2 を通じて精巣上体の精子成熟機能をオンオフ制御していること、そして精子成熟機構の実行役は恐らく分泌プロテアーゼであることがわかり、NELL2 によって制御されるプロテアーゼを探索した結果 OVCH2 がプロセシングに関与していることを発見することができました。

**Q2 OVCH2 の発見、また制御メカニズムでわかっていることはあり
ますか？**

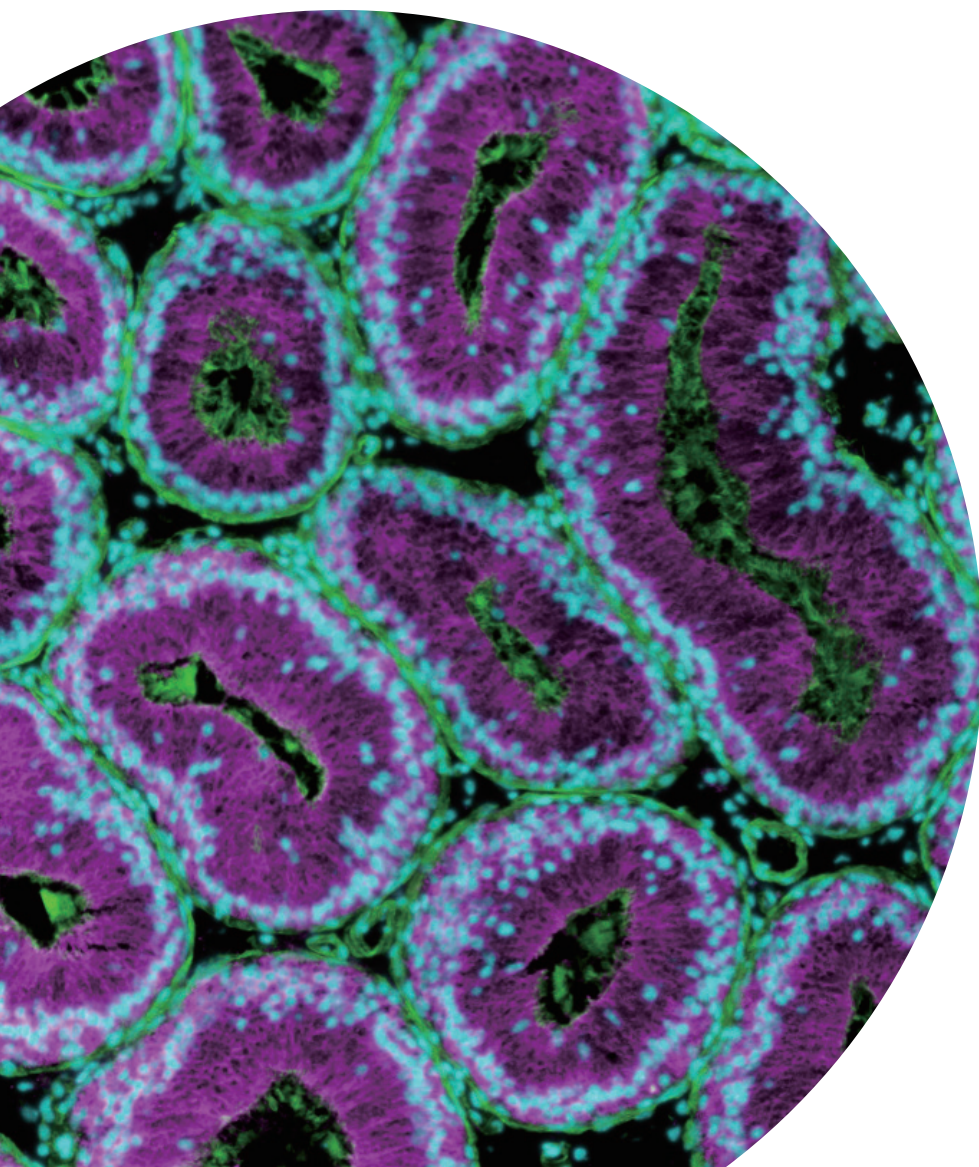
OVCH2 のが発現しているのは、精巣上体の中でも精子成熟を担う頭部に特異的です。この精巣上体頭部での OVCH2 の発現は、精巣で作られる NELL2 によるルミクリンシグナル伝達によって、厳密に制御されています。精巣で発現する NELL2 の量は動物が性的に成熟する思春期に上昇しますので、精巣上体頭部における OVCH2 の発現も、精子の成熟にとって必要なタイミングでのみ発現が誘導されるよう巧妙に制御されています。

**Q3 精巣上体が管腔構造、かつ高度にコイル化した構造をとること
と、この精巣上体内で 2 週間かけて精子の成熟プロセスが進む
ことは何か関係があるのでしょうか？**

精子はいったん作られたあとは自分自身を自律的に成熟させることができないため、外部の環境の助けを必要とします。この精子成熟のための外部環境を提供しているのが精巣上体です。一日に数千万から一億個もの精子が精巣で作られ次々と送り出されますが、これら大量の精子をじっくりと時間をかけて確実に成熟させるために精巣上体は長くなり、またそれをコンパクトに納めるために高度にコイル化したのではないのでしょうか。

審査員より

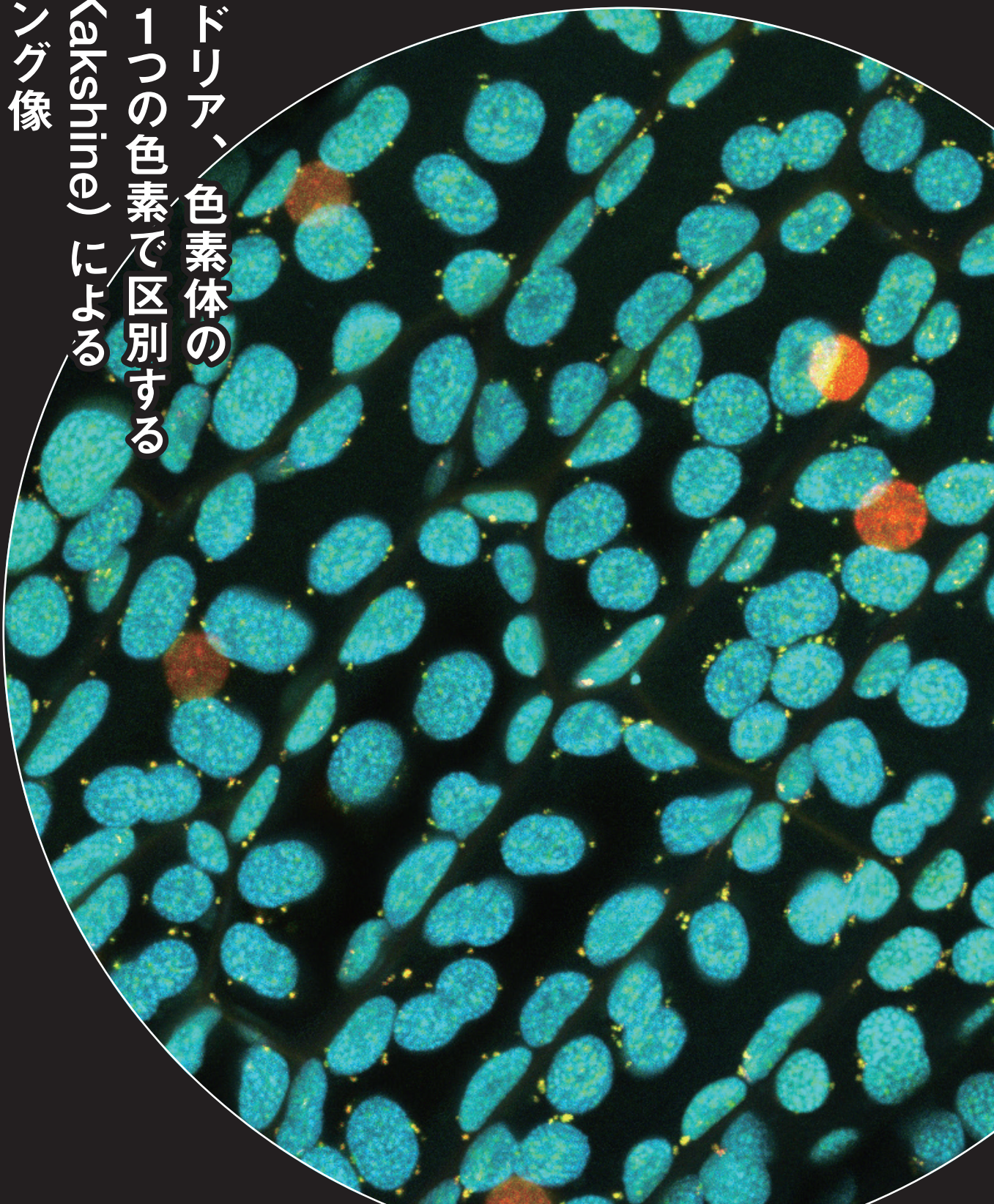
- 極めて高い学術性。精子形成における重要な発見である。映像としても魅力的。
- 学術的に、精子の成熟化のメカニズムを解明した素晴らしい研究成果である。また芸術面においては、幾何学性、集合性、神秘性を感じられる。なにかジブリ作品の様な雰囲気もあるといえる。高い学術性と芸術性の両方を兼ね備えた非常に素晴らしい作品であるといえる。
- 生物の美しさとサイエンスを兼ね備えている。
- 緑と紫の色味の対比と形状が独特の世界観を出しており、面白い。

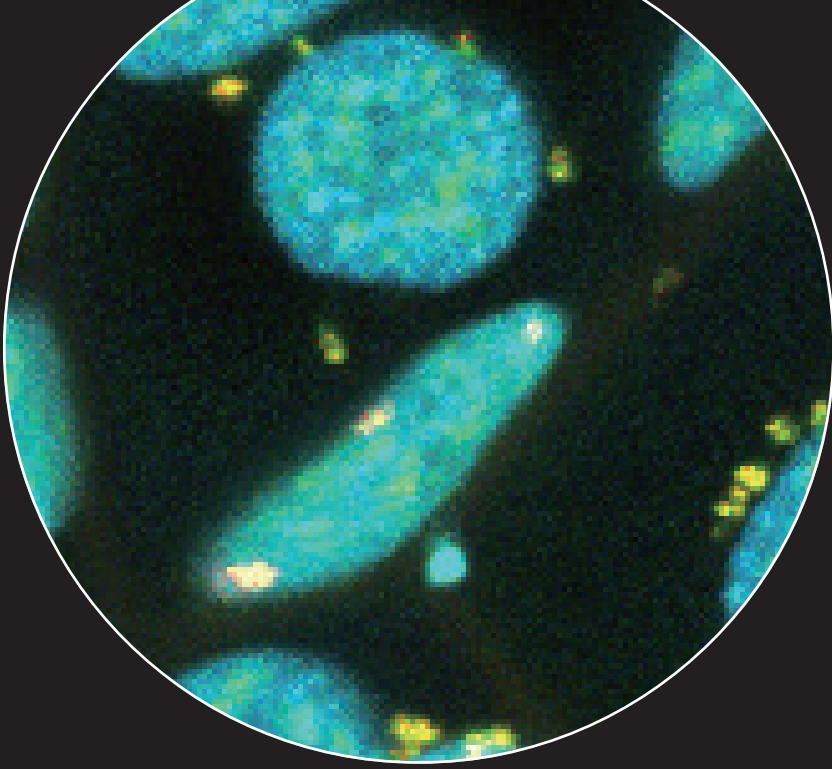


特別賞

細胞核、ミトコンドリア、色素体の
3種類のゲノムを1つの色素で区別する
DNA染色色素 (Kakshine) による
蛍光寿命イメージング像

Fluorescence lifetime image using Kakshine that distinguishes
three types of genomes (cell nucleus, mitochondria, and chloroplasts).

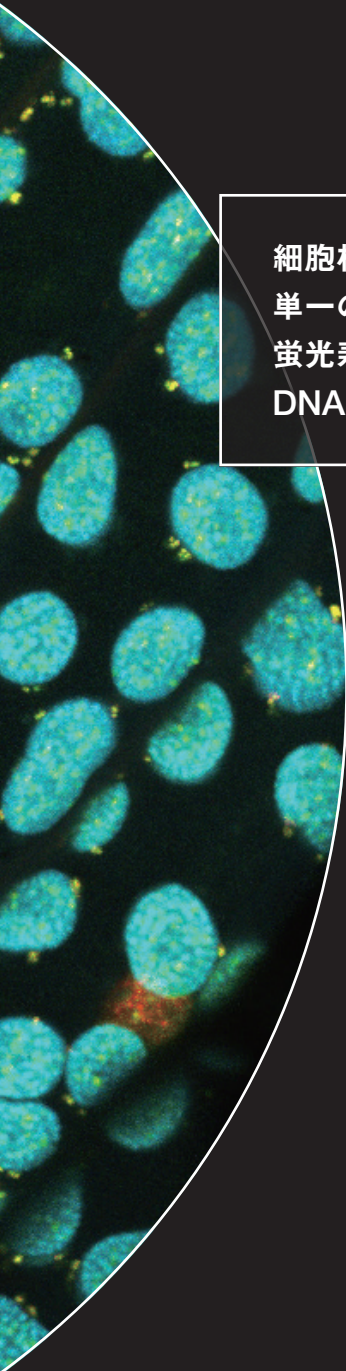




ヒメツリガネゴケ¹ (野生株) 茎葉体

サンプル詳細 : DNA 染色色素 Kakshine PC3 による生体染色
観察手法 : FLIM (蛍光寿命イメージング)²・倒立
観察倍率 : 93x
撮影年 : 2021
顕微鏡データ : 静止画

細胞核、ミトコンドリア、色素体のゲノムを
単一の色素でラベルし、
蛍光寿命の違いにより区別できる
DNA 染色色素の開発に成功した。

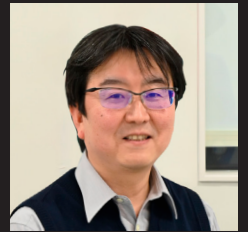


受賞コメント

この度は、NIKON JOICO AWARD 特別賞に選出していただき、誠にありがとうございます。化学者と生物学者が入り交じる「DM」から3人目の受賞者になることができました。

私は植物細胞生物学者ですが、DNA 染色色素のような長年研究されてきたありふれた蛍光色素であっても、新しい骨格を基盤に研究することにより優れた特性を宿らせてしまう有機合成化学の可能性を信じています。

これからも目の離せない研究成果を届けていきたいと思います。



さとう よしかつ
佐藤 良勝

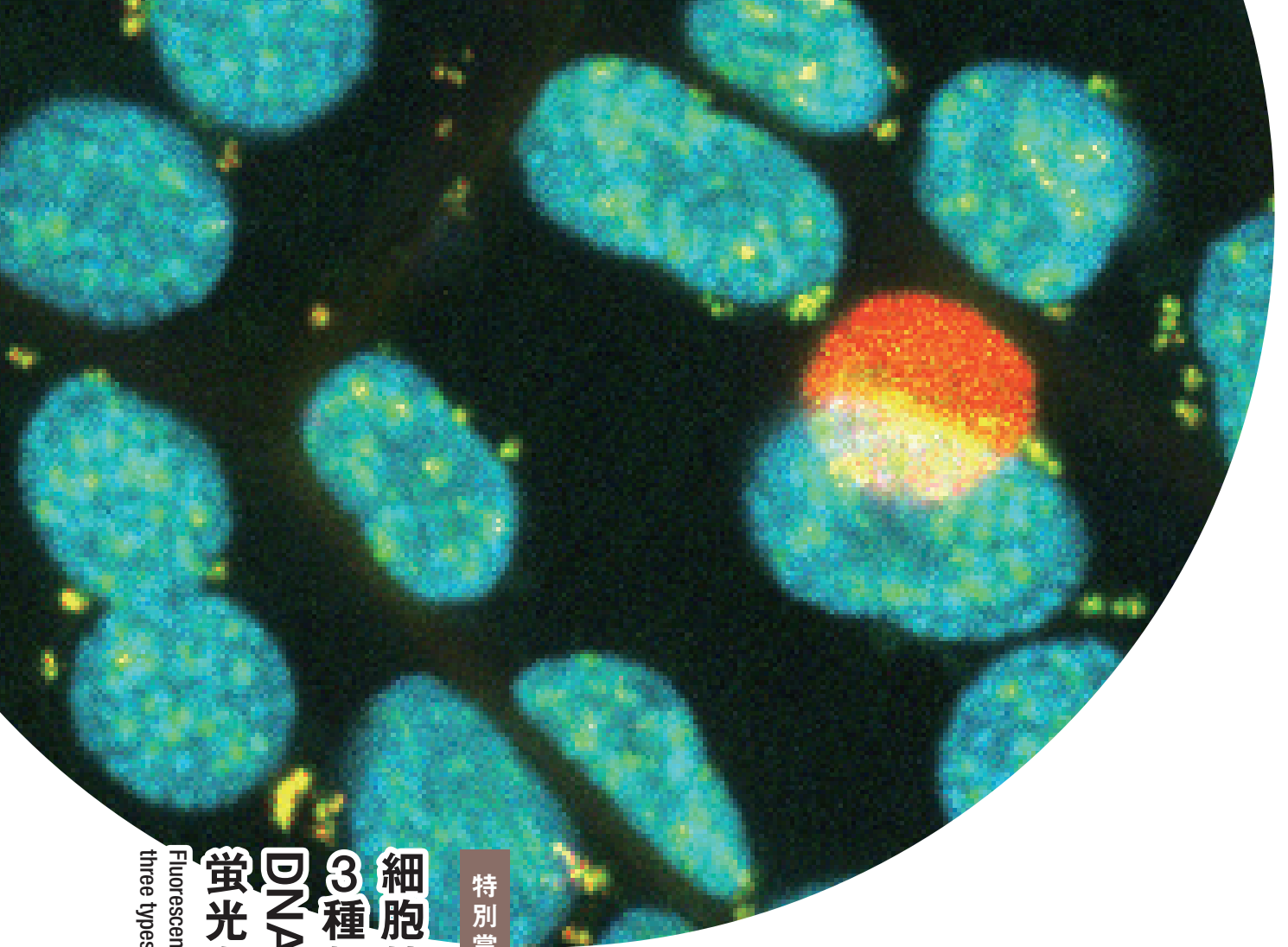
名古屋大学トランスフォーメティブ生命分子研究所
ライブイメージングセンター 特任准教授
名古屋大学院理学研究科生命理学専攻
光生物学グループ

すぎもと なぎさ
杉本 渚

名古屋大学トランスフォーメティブ生命分子研究所
ライブイメージングセンター

うの かきし
宇野 何岸

マックスプランク研究所 ナノバイオフォトニクス部門



特別賞

細胞核、ミトコンドリア、色素体の
3種類のゲノムを1つの色素で区別する
DNA染色色素 (Kakshine) による
蛍光寿命イメージング像

Fluorescence lifetime image using Kakshine that distinguishes
three types of genomes (cell nucleus, mitochondria, and chloroplasts).

研究概要

DNA 染色蛍光プローブの歴史は長くこれまで多くのプローブ³が開発されてきましたが、光毒性⁴、DNA 特異性、オルガネラ DNA 染色性などの点から一長一短と言わざるを得ない状況でした。本研究で開発した新規の DNA 染色色素は、従来のプローブの短所を補い長所を合わせ持つ性能を有しています。高い細胞透過性により植物細胞にも適用可能なことも評価され、本論文は日本植物形態学会賞〈平瀬賞〉を受賞しました。また、二光子励起顕微鏡⁵、超解像 STED 顕微鏡⁶、蛍光寿命顕微鏡などの先端顕微鏡にも適合することから *Nat Commun* 誌の Featured articles にも選ばれました。今後、生命科学分野の様々な研究における強力な DNA 検出技術として用途が期待されます。

論文

Kakishi Uno, Nagisa Sugimoto, Yoshikatsu Sato
N-aryl pyrido cyanine derivatives are nuclear and organelle
DNA markers for two-photon and super-resolution imaging.
Nature Communications. 2021, 12(2650), doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23019-w>.

概略

真核生物には3種類のゲノムDNAが存在します。DNAは細胞内の核に存在する他、細胞小器官（オルガネラ）のミトコンドリアと色素体にも独自のDNAが存在します。DNAは生物の遺伝情報の担い手といわれ、高感度にDNAを検出するDNA蛍光検出試薬は、生命科学研究を支える必須な分子ツールになっています。DNA蛍光検出試薬に求められる性質として、1) 高いDNA選択性があること、2) 光毒性の少ない可視光を利用できること、3) 適用できる生物種が広いこと、などが挙げられます。しかし、これまでこれらの性質すべてを満たす色素はありませんでした。私達がカクシャイン (Kakshine) と命名した色素は、これら3つの性質を満たすことに加え、4) 二光子励起顕微鏡による深部イメージングに適用可能であること、5) 核内のDNAおよびオルガネラのDNAの超解像STEDライブイメージング⁷に適用できること、の特徴も兼ね備えることがわかりました。今後、生命科学分野の様々な研究への応用や先端顕微鏡技術の普及への貢献が期待されます。

細胞内には多くのRNAが存在するため、DNAを選択的に染色するには、DNA染色色素の性質としてRNAに対してDNA選択性をもつことはとても重要な要素です。そこで私達は、開発した色素のRNAに対するDNA選択性を調べました。Kakshine PC1 (N-aryl Pyrido Cyanine Dye 1) は、二本鎖DNAのアデニン (A) とチミン (T) の配列領域に特異的に結合して大きく蛍光を増大する性質があり、汎用的に使用されるDNA染色色素として知られるHoechstやPico-Greenよりも、高いDNA選択性をもつことを明らかにしました (図1)。

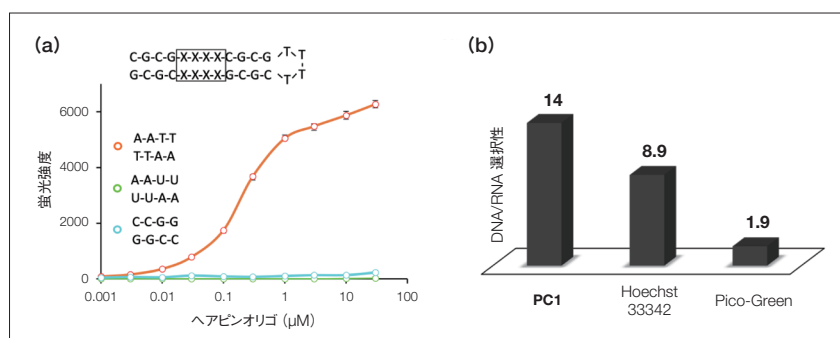
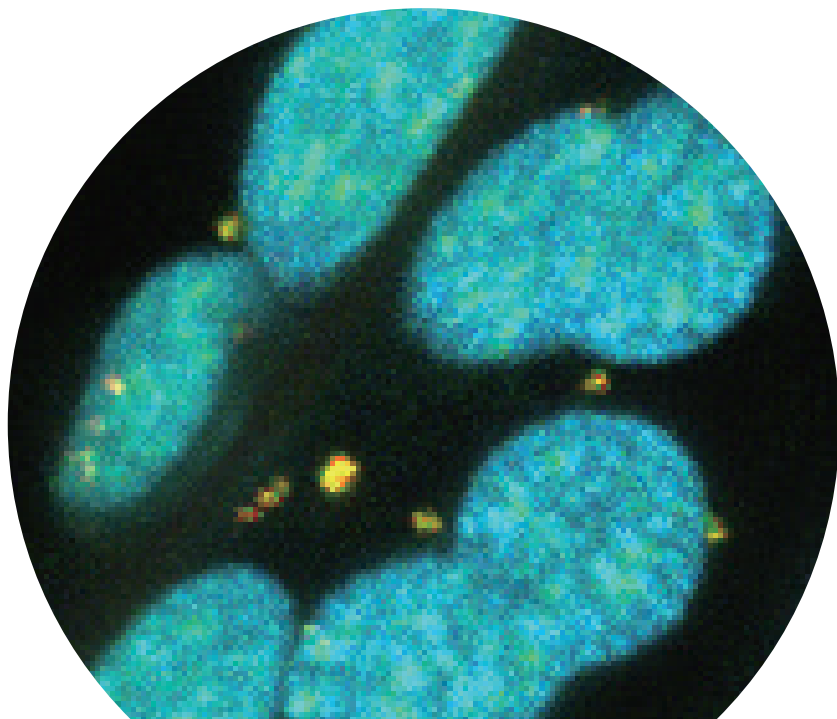


図1 Kakshine の二本鎖 DNA 結合の塩基配列特性と DNA/RNA 選択性

(a) Kakshine (PC1) は AT 配列をもつヘパリンオリゴ[®]のみ濃度依存的に蛍光が増大します。

(b) DNA 蛍光検出試薬の DNA 滴下時の蛍光増大率を RNA 滴下時の蛍光増大率で割った DNA/RNA 選択性。



次に、Kakshine は複数種類の動物培養細胞、シロイヌナズナ⁹の葉、根の細胞の核-DNA を生きたまま染色できることを示しました (図 2)。また、二光子励起顕微鏡を用いて観察したところ、Kakshine は深部にまで浸透し、根全体の細胞核をまるごと染色することがわかりました。

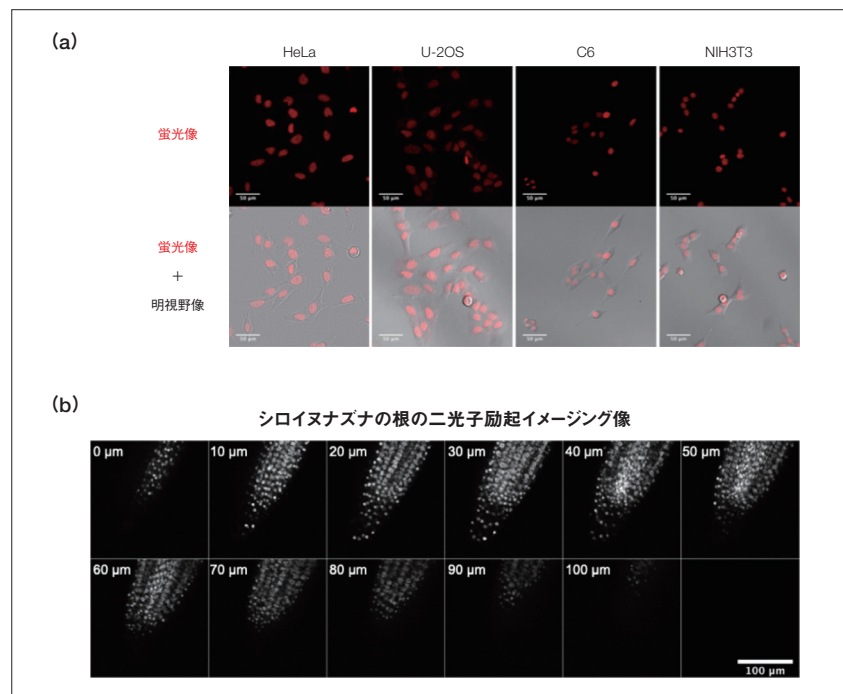
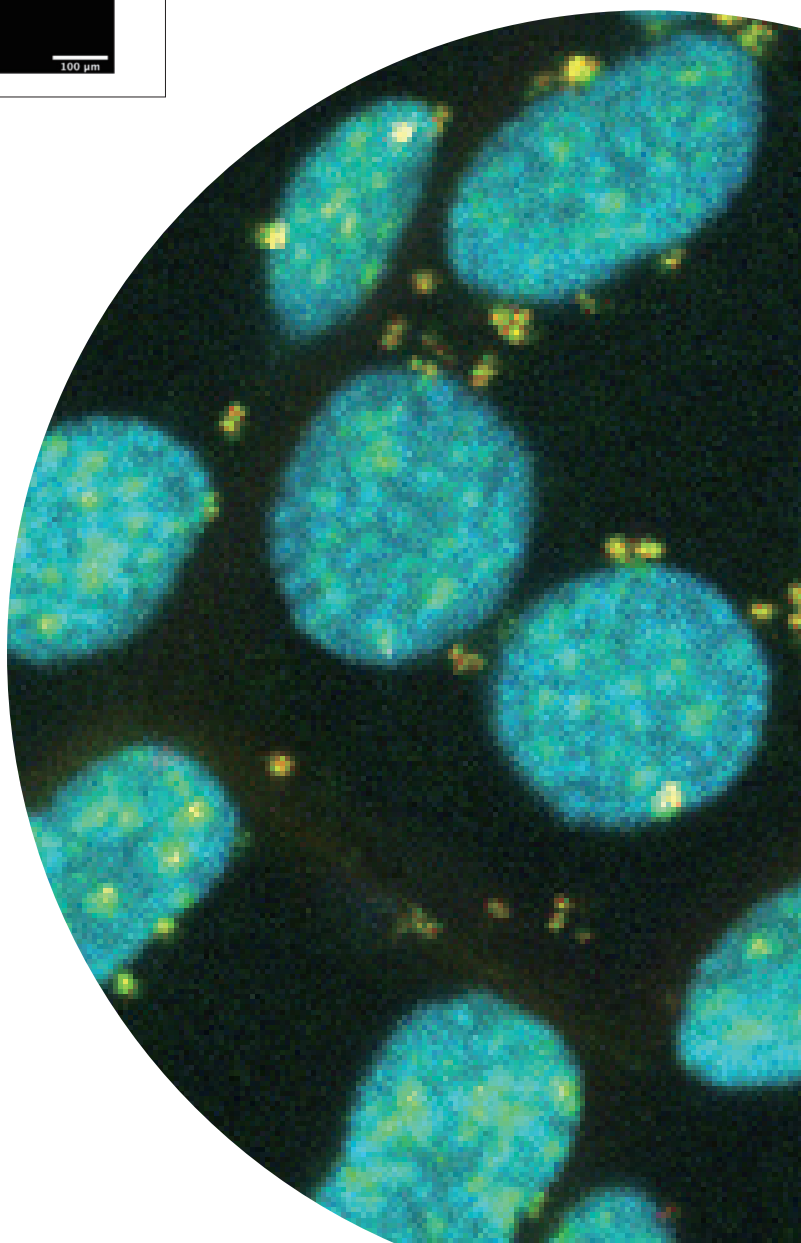
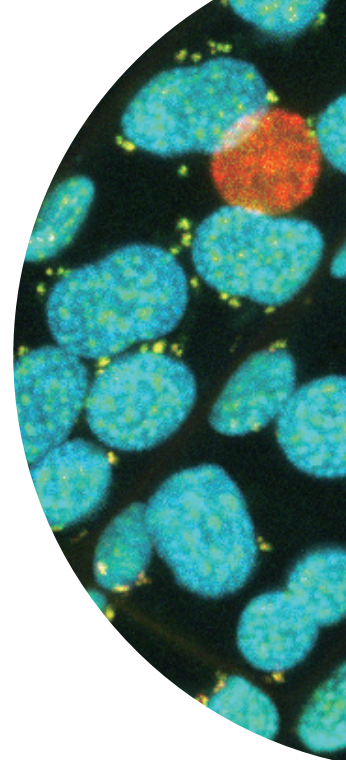


図 2 Kakshine によるライブイメージング

(a) 動物培養細胞の染色像

(b) シロイヌナズナ根の二光子励起顕微鏡像



次に私達は、HeLa 細胞を用いて Kakshine の染色濃度を検討したところ、低濃度 (10 nM) では核-DNA を特異的に染色し、超低濃度 (100 pM) ではミトコンドリア DNA (mt-DNA) を特異的に染色することを示しました。(図 3a)。すなわち、核-DNA と mt-DNA を濃度で染め分け可能であることを示しました。一方、両方が染色される濃度 (1 nM) では、蛍光寿命イメージングにより核-DNA と mt-DNA における色素の蛍光寿命の違いから、区別して可視化することに成功しました (図 3b)。さらに、植物細胞においては、核-DNA、mt-DNA に加えて、葉緑体 DNA (chl-DNA) が存在しますが、これら 3 種類の区別も 1 つの色素で可視化できることも示しました (図 3c)。

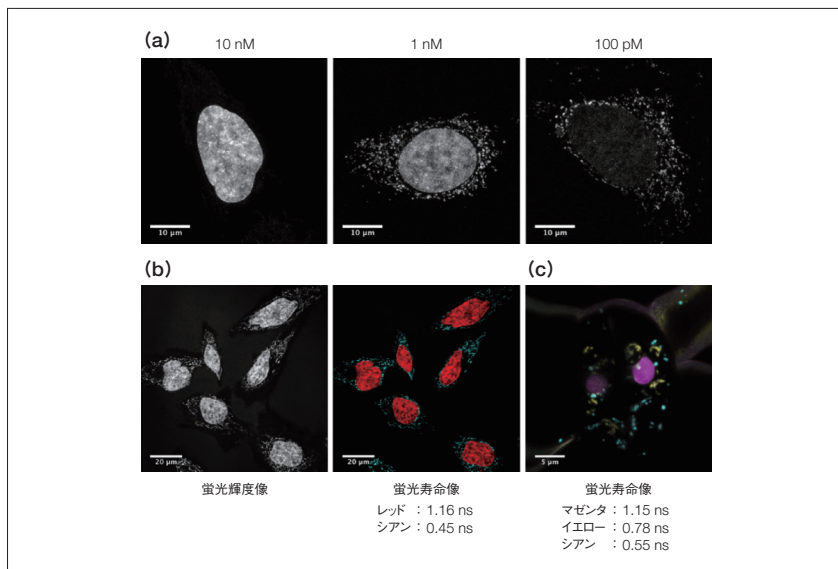


図 3 Kakshine のオルガネラ DNA 染色性と蛍光寿命イメージング

- (a) 核-DNA、mt-DNA 染色における Kakshine 濃度依存性
- (b) 蛍光寿命イメージングによる核-DNA、mt-DNA の分離
- (c) 蛍光寿命イメージングによる核-DNA、mt-DNA、chl-DNA の分離

さらに私達は、Kakshine PC3 を用いて、光の回折限界¹⁰を超える解像度を持つ超解像 STED イメージングを行いました。通常の共焦点顕微鏡では分離できない核-DNA 構造を高精細に捉え、ミトコンドリア核様体¹¹ 構造を明瞭に可視化することに成功しました (図 4)。得られた画像から見積もられるミトコンドリア核様体の大きさは、これまでの報告例と一致する約 100 nm であることを示しました。ミトコンドリア核様体構造を超解像 STED 顕微鏡でライブイメージング可能な蛍光色素は、ミトコンドリア研究者に待ち望まれたプローブであり、今後のミトコンドリア研究を加速させる有用な色素として期待されています。

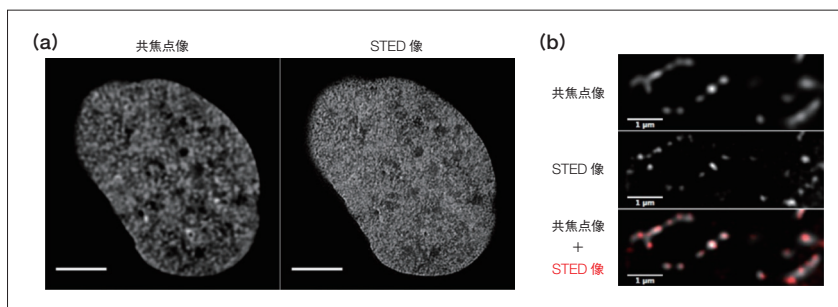
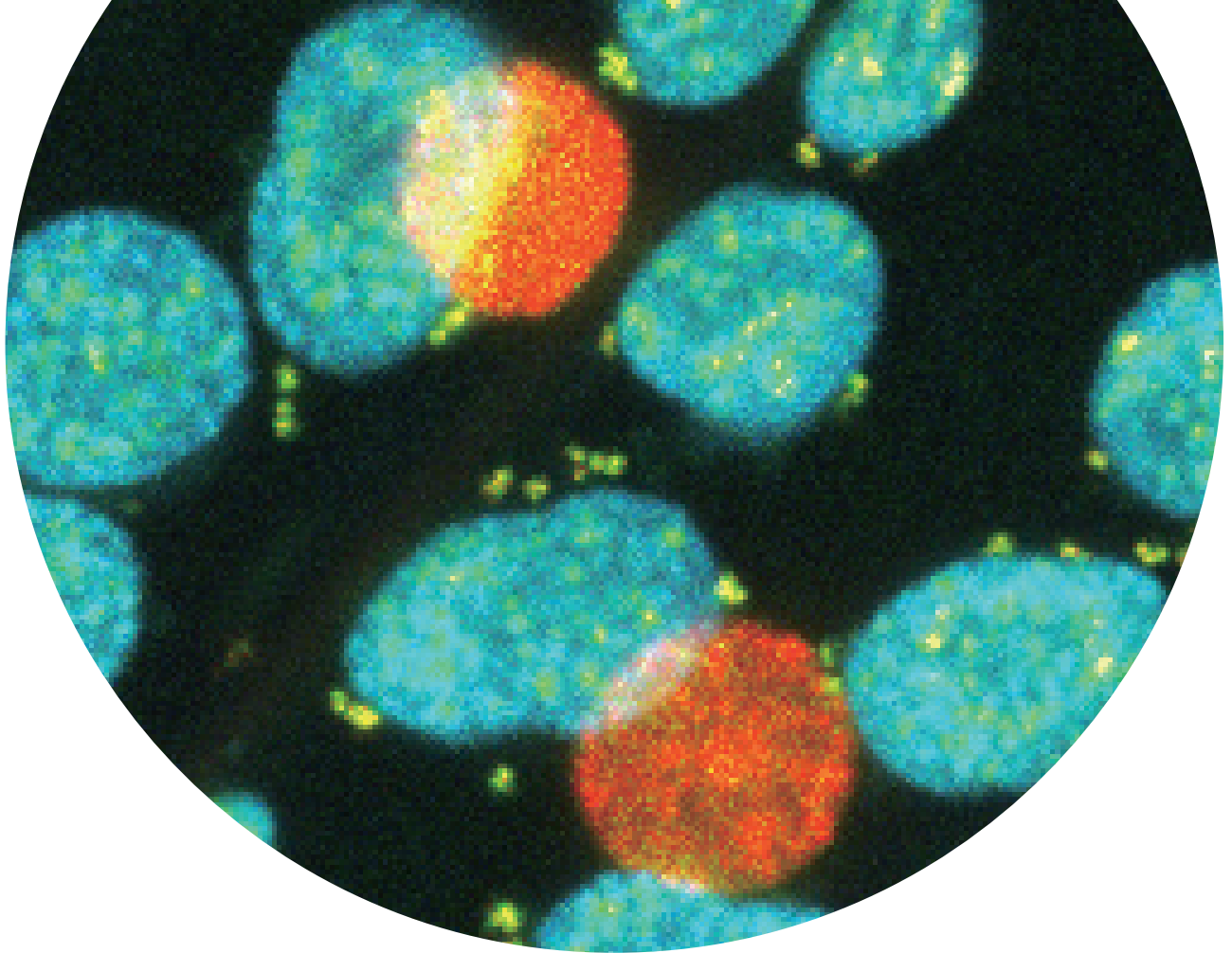


図 4 Kakshine を用いた超解像 STED ライブイメージング

- (a) Kakshine (PC3) による核-DNA の超解像 STED 像
- (b) Kakshine (PC3) による mt-DNA の超解像 STED 像



用語解説

1. ヒメツリガネゴケ

学名は *Physcomitrium patens*。コケ植物蘚類の一種で、2008年にゲノムが解読された。高効率で相同遺伝子組換えによる形質転換が可能な陸上植物である。

2. 蛍光寿命イメージング； Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)

蛍光分子が光により励起されてから蛍光を発してもとの状態に戻るまでの時間を計測しマッピングする方法。蛍光波長の強度による解析の欠点を補うイメージング手法として注目されている。

3. プローブ

もともとは探針や探査機という意味であるが、イメージング分野においては分子の局在や量を測定する分子ツールのことを指す。

4. 光毒性

蛍光イメージングを行う際、紫外線などの短い波長を強い光量で用いたときに生じる細胞へのダメージを言う。

5. 二光子励起顕微鏡

1つの蛍光分子が1つの光子を吸収して発した蛍光を検出する通常の蛍光顕微鏡観察に対し、二光子励起では1つの蛍光分子が2つの光子を同時に吸収して励起される。通常の蛍光観察で使用する波長の約2倍程度長い近赤外領域の波長を使用するため、生体深部イメージングに用いられている。

6. 超解像 STED 顕微鏡

STED 顕微鏡は、誘導放出抑制 (STED: stimulated emission depletion) を利用した超解像顕微鏡法の1つ。誘導放出とは、励起状態にある分子に対して外部から光子を加えると、入射光と同じ位相、周波数、進行方向の光が放出される現象であり、レーザー (LASER: Light Amplification Stimulated Emission of Radiation) の光増幅にも応用されている。

7. ライブイメージング

顕微鏡下で生体サンプルを生きた状態で観察すること。

8. ヘアピンオリゴ

1本鎖の核酸配列内の相補的なヌクレオチド配列の塩基対形成によって生じるヘアピン状構造のこと。

9. シロイヌナズナ

植物で初めて全ゲノム配列が解読されたアブラナ科の植物であり、ゲノムサイズが小さい、世代が短い、個体サイズが小さく栽培が容易であることなど、研究材料として優れていることから、モデル植物として研究者に広く利用されている。

10. 回折限界

光は波としての性質をもち、回折現象が見られる。顕微鏡などの光学系において光の回折現象が原因となる分解能の理論的な限界を「回折限界」と言う。

11. ミトコンドリア核様体

ミトコンドリアの DNA がタンパク質と結合して折りたたまれた構造体のこと。

Q&A

Q1 Kakshine PC1 は1つの色素で核、ミトコンドリア、色素体（葉緑体）を染色しますが、なぜ濃度依存的に染色することができるのでしょうか。また染色された場所で、蛍光寿命が異なるのはなぜですか。

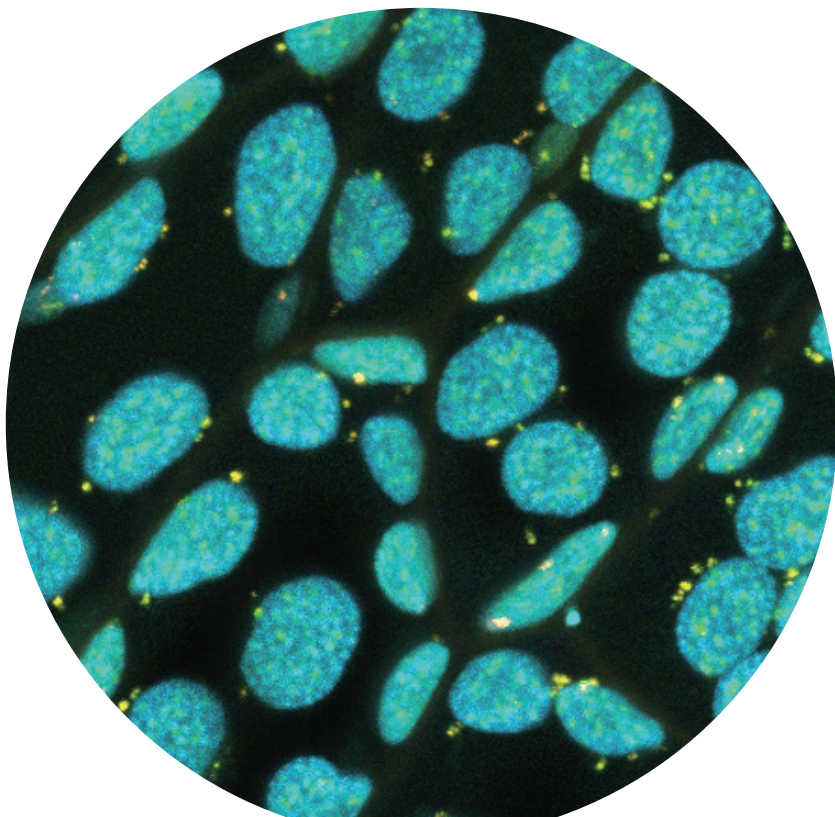
Kakshine は正に荷電したカチオン性の DNA 染色色素です。カチオン性の分子は膜電位により負に帯電した膜の内側に蓄積しやすい性質を持つため、核内よりも膜電位の強いミトコンドリアや色素体内に集積しやすくなります。また、核内の DNA とオルガネラ DNA とでは Kakshine 分子が結合しうる DNA 領域の量が大きく異なります。核、ミトコンドリア、色素体における Kakshine の蛍光寿命の違いは、このような膜電位による蛍光分子の蓄積しやすさと DNA 量の違いによる Kakshine の凝集状態を反映しているものと考えられます。実際、一定濃度のプラスミド DNA 存在下において、Kakshine の蛍光寿命は濃度上昇に伴い短くなることが分かっています。核内における Kakshine の蛍光寿命も同様であり、Kakshine の濃度上昇に伴い短縮し、高濃度ではミトコンドリア DNA における蛍光寿命に近づくことも分かりました。

Q2 Kakshine PC3 を用いて観察されたミトコンドリア核様体構造。ミトコンドリア核様体は、数、形状などが正常を維持するのに重要なのかイメージングでわかったことはありますか？ また核様体をライブイメージングできたことで、今後期待することはありますか？

ほとんどの哺乳類のミトコンドリア核様体には mtDNA が 1 コピーだけ含まれていることが証明されており、主要な構成タンパク質としてミトコンドリア転写因子 A (TFAM) が知られています。クローン化した mtDNA にリコンビナント TFAM タンパク質を混合させた実験により、TFAM 単独で mtDNA を圧縮させることができることから、TFAM はミトコンドリアの数や形状を制御する重要な因子であると考えられています。今後は、これらの分子機能の解析を生きている細胞内で解析するツールとして、ミトコンドリア内膜を可視化する「MitoPB Yellow」(2019 年に JOICO Award 特別賞受賞) や Kakshine などを活用し、ミトコンドリアダイナミクス研究の発展を期待したいです。

Q3 Kakshine はじめ、蛍光色素は生命現象を解き明かしていくうえでも必要不可欠なツールです。Kakshine という画期的な蛍光色素を開発する際、見たいものを見る、からスタートするのか、それとも、偶然得られる成果なのでしょうか。あわせて今後先生が挑戦されたい蛍光色素とはどのようなものか教えてください。

仰っしゃるとおり、蛍光色素はまさにライブイメージング研究において不可欠な研究ツールです。特に有機合成小分子は、染色してすぐに観察できる長所があります。しかし、市販の蛍光色素の中には適用できる細胞種が動物培養細胞に限定されるなど細胞透過性に課題のある色素もあります。特に植物細胞に適用できる蛍光色素は限られています。私は植物科学者として、植物細胞に適用可能な蛍光色素の開発に興味があります。Kakshine の成果が戦略的なのか偶然なのかという点に関しては、半分半分といったところでしょうか。構造的に新規な長波長蛍光性の DNA 結合色素を開発しようというところは、Kakshine シリーズ全ての合成を行った宇野何岸氏(当時大学院生)との共通の認識でした。一方、調べれば調べるほど従来の DNA 結合色素よりも優れた特徴を見出すことができたのは幸運(偶然)であったと思います。そして、このような幸運を呼び寄せることができたのは、支援センター所属の私を含め誰もが分野の垣根を超えて自由なチャレンジができる ITbM であったからだと思います。恵まれた環境にいることに感謝し、今後も戦略の先にある偶然にも期待して、植物科学に資する色素の開発を進めたいと思います。



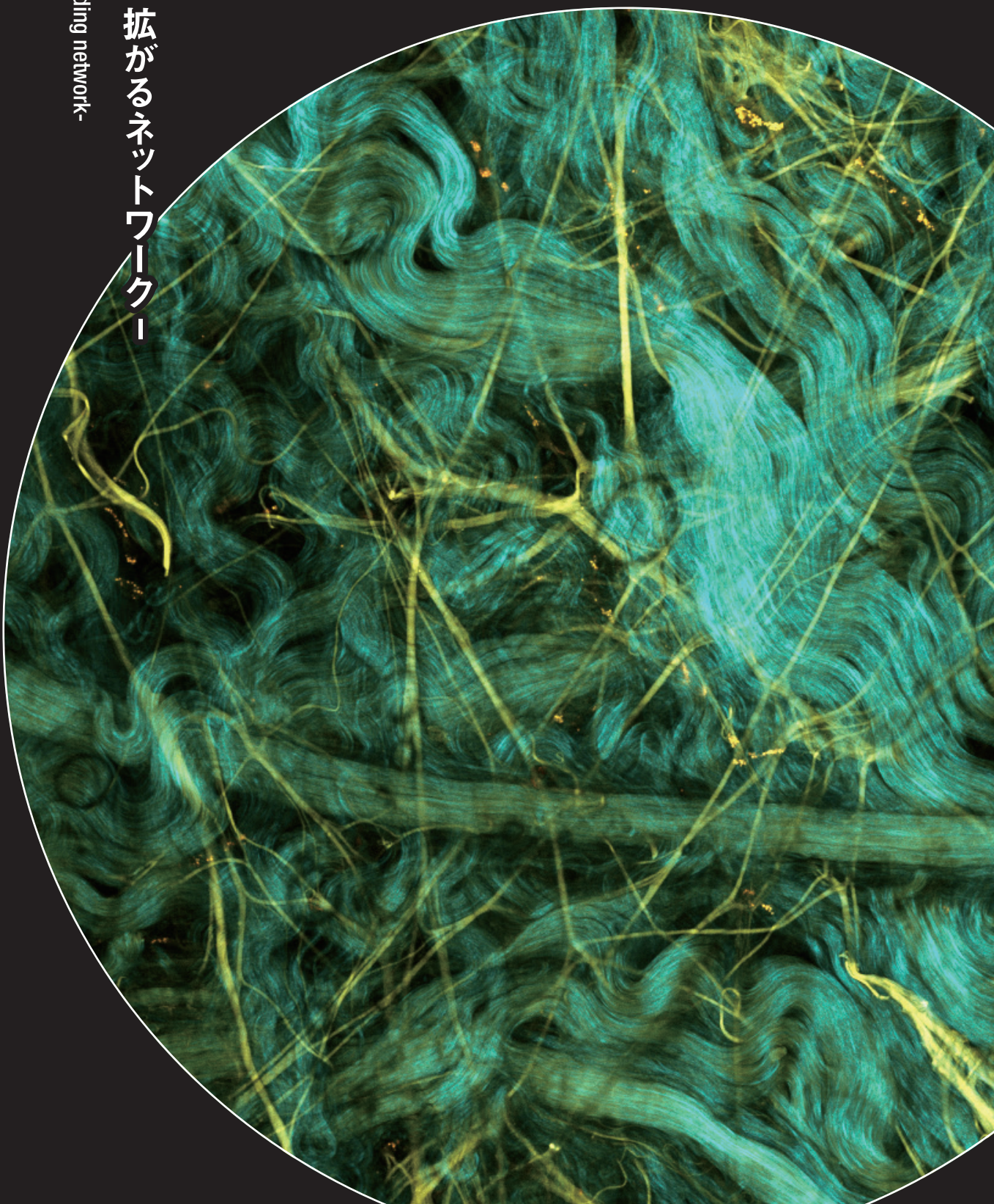
審査員より

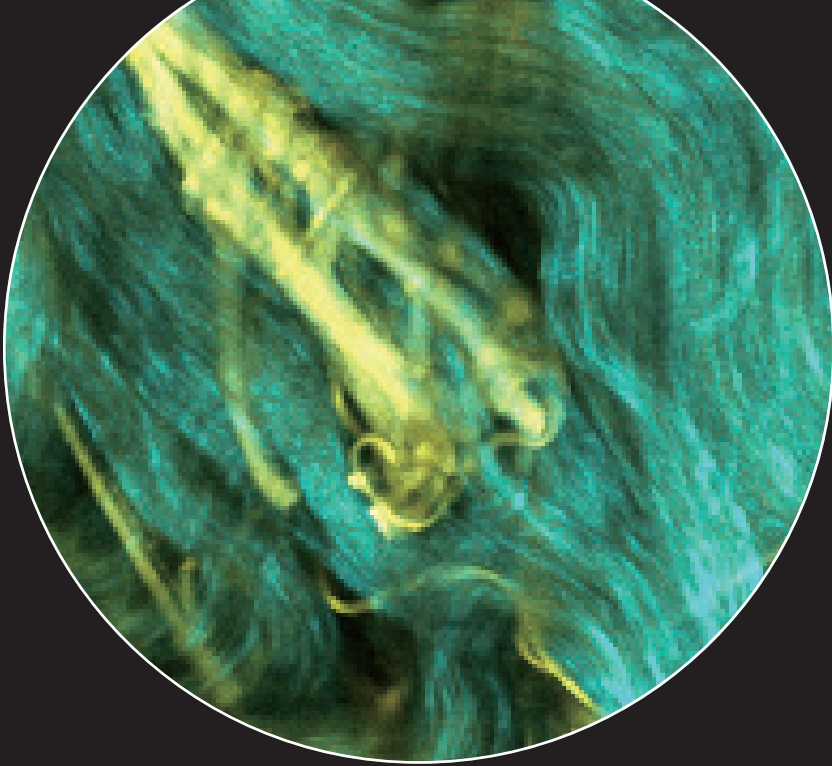
- 技術的に優れた研究成果である。
- 美しいのみならずバイオイメージング手法としても興味深い。
- 細胞核、ミトコンドリア、色素体を区別できる DNA 染色蛍光プローブの発見は学術的に価値が高い。
- ターコイズ色の繊細な細胞とオレンジ色の補色関係が美しい。
- 浴衣がらのようで綺麗。

特別賞

ヒトの筋膜構造 | 拡がるネットワーク |

Superficial Fascia of the human - Expanding network -

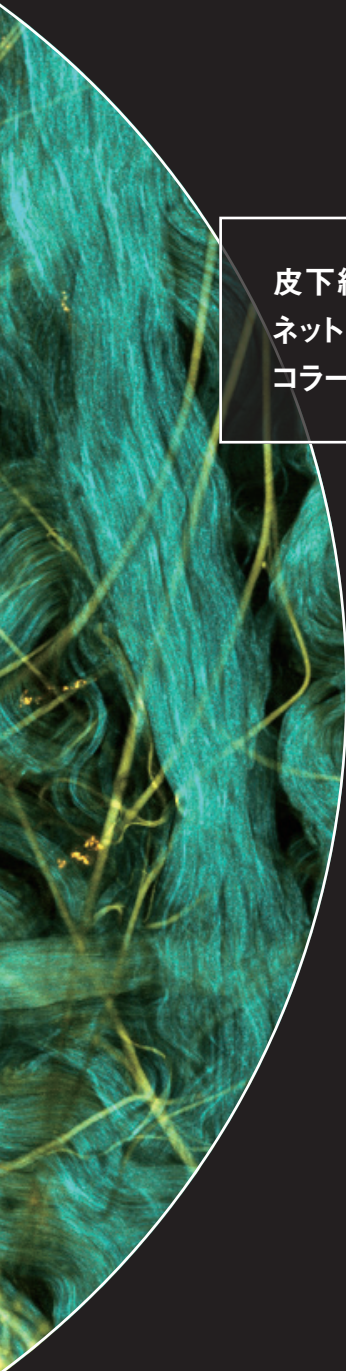




ヒト由来筋膜¹

サンプル詳細 : 無染色
観察手法 : 二光子励起顕微鏡 (SHG²光)・倒立・蛍光
観察倍率 : 25x
撮影年 : 2021
顕微鏡データ : 静止画

皮下組織に存在する「筋膜」の構造が明らかになった。
ネットワーク構造を持ったエラスチン³と、
コラーゲン線維⁴がお互いに支え合うように存在していた。



受賞コメント

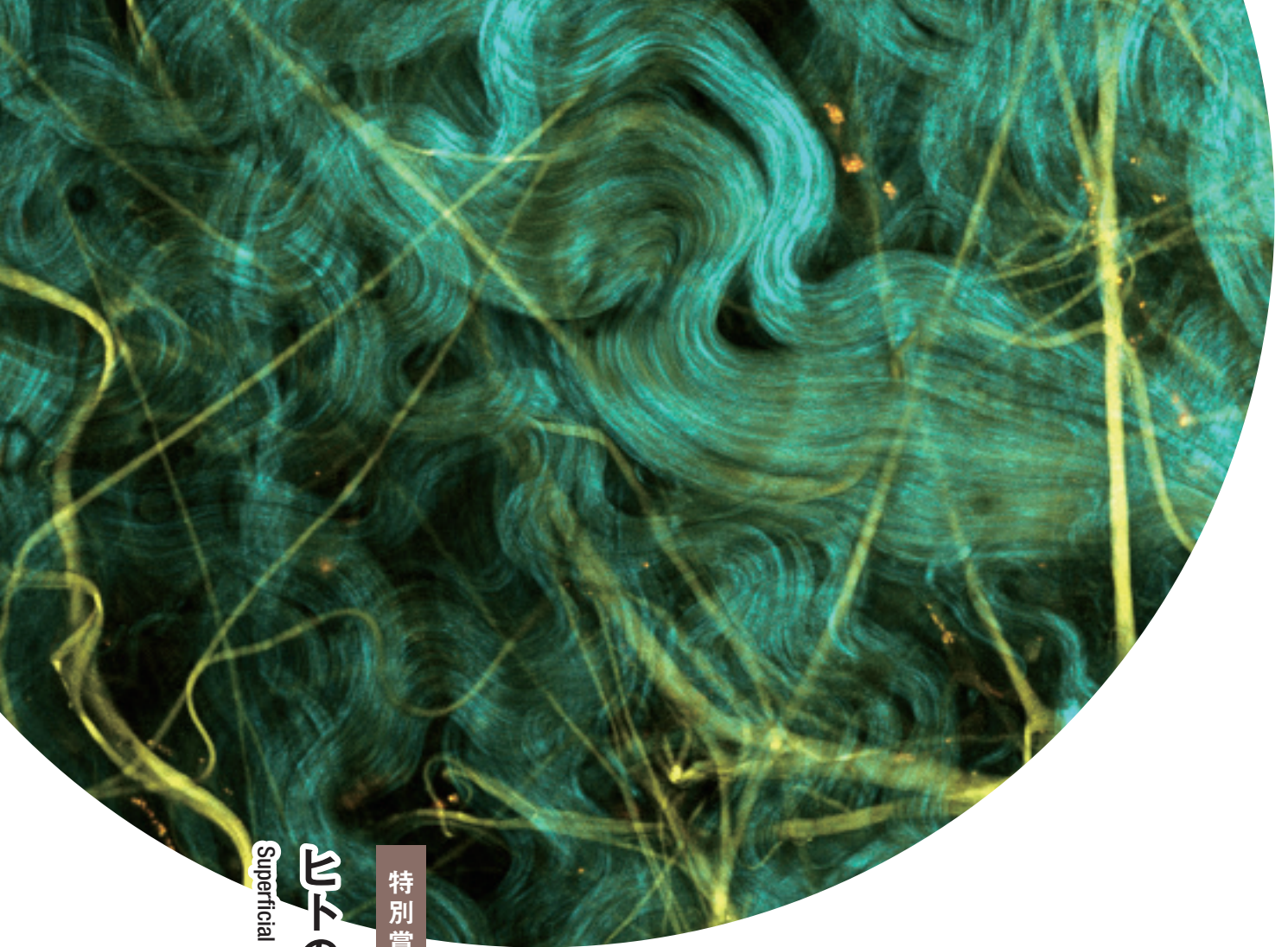
この度は輝かしくNIKON JOICO AWARD 特別賞に選出いただき、大変光栄に存じます。

「イメージをはるかに超越した驚異的な作品」という栄誉な審査員コメントをいただいたように、本作品をイメージングしたとき、胸が高鳴ったことを覚えております。イメージングは、サンプルの準備や顕微鏡のセットアップなど地道な作業が必須であり困難なことも多いですが、想像を超えた構造を捉えることができたときの喜びは何物にも代えがたいです。

これからも、驚きと感動を与えてくれるイメージングツールを活用し、皮膚科学研究に尽力していきます。



にしざわ しのぶ
西澤 志乃
株式会社ファンケル総合研究所
研究員



特別賞

ヒトの筋膜構造 | 拡がるネットワーク |

Superficial Fascia of the human -Expanding network-

研究概要

炎症が起きると、末梢血を流れている好中球⁵が血管内皮細胞と相互作用 (Rolling adhesion) し、組織に浸潤していく。生体防御としては重要な反応ではあるが、組織への浸潤が過剰になると、臓器障害などが引き起こされるため、過剰な遊走を抑える必要がある。そこで、生体イメージング技術を活用し、好中球の動態をリアルタイムに解析したところ、トロンボモジュリン⁶ アルファのD1ドメインが、好中球のRolling adhesionを抑制することで抗炎症に働く可能性を見出した。(2015年～2017年 大阪大学大学院生命機能研究科 / 医学系研究科 免疫細胞生物学教室にて)

論文

Shino Nishizawa, Junichi Kikuta, Shigeto Seno, Masahiro Kajiki, Ryuichi Tsujita, Hiroki Mizuno, Takao Sudo, Tomoka Ao, Hideo Matsuda, Masaru Ishii

Thrombomodulin induces anti-inflammatory effects by inhibiting the rolling adhesion of leukocytes *in vivo*.

Journal of Pharmacological Sciences. 2020, 143(1), doi: 10.1016/j.jphs.2020.01.001.

皮膚のイメージング 血管や筋膜の可視化

血管をパトロールする免疫細胞を可視化

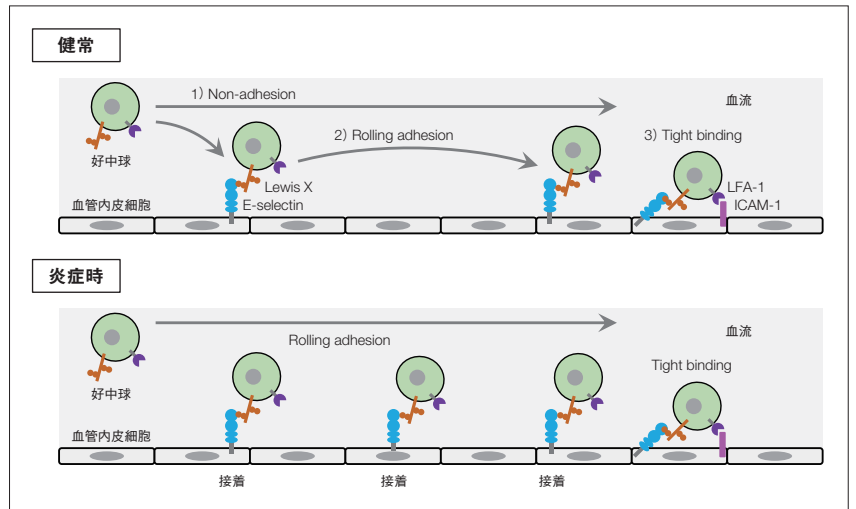


図1 血管を遊走する好中球の模式図(健常、炎症時)

炎症とは、異物を排除して生体の恒常性を維持しようとする防御的な反応です。急性炎症の際、免疫細胞の一種である好中球は局所において細菌の除去に働きます。しかし血管や組織への過剰な集積は臓器障害を引き起こすため、過剰な炎症を抑えることが必要とされます。末梢血を流れてきた好中球は 1) Non-adhesion, 2) Rolling adhesion, 3) Tight binding という3段階の過程を経て組織に浸潤していきます。健常時、好中球は血管内を遊走していますが、炎症時には **Rolling adhesion = 血管内皮細胞と弱い接着を繰り返し、組織へ浸潤していきます** (図1)。私たちは、好中球の動態を可視化するために、1秒あたり30フレームの撮影が可能な共焦点顕微鏡を活用しました。LPS⁶により急性炎症を引き起こしたところ、Rolling adhesionする好中球の増加が観察され、DIC⁷の治療薬として汎用されているトロンボモジュリンアルファ(TM alfa)を投与すると、好中球のRolling adhesionが抑制されました(図2)。

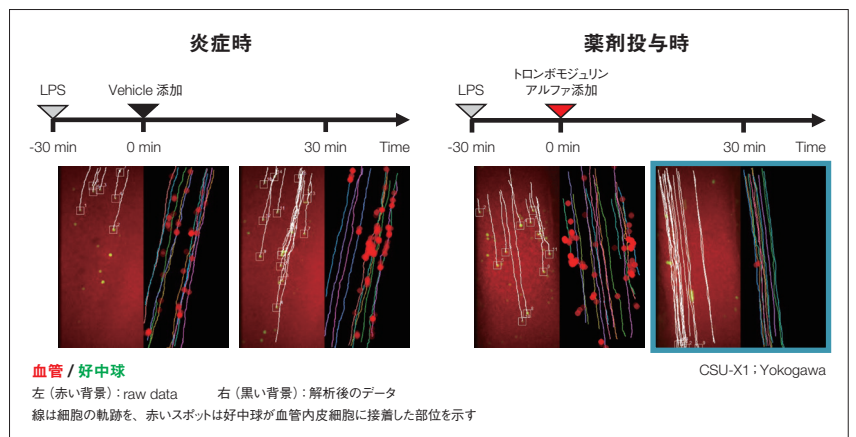
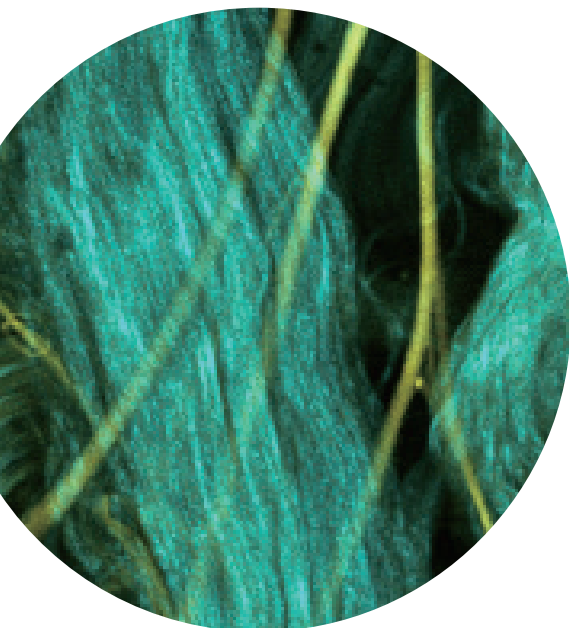


図2 炎症時及び薬剤投与時の好中球の動態

トロンボモジュリン アルファによる薬効評価

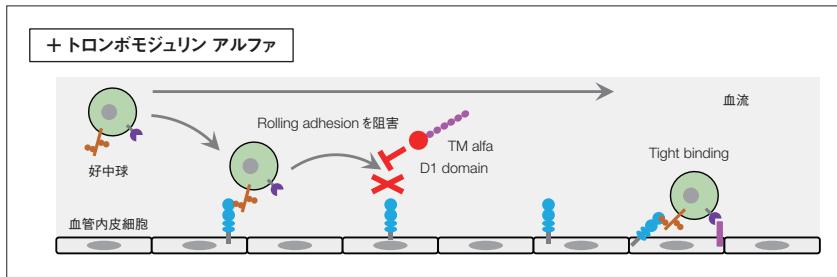


図3 血管を遊走する好中球の模式図 (薬剤投与時)

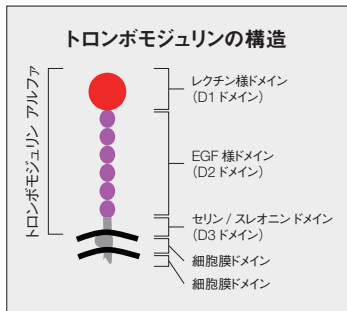


図4 トロンボモジュリンの構造

次に、TM alfa が Rolling adhesion を抑制したメカニズムを追いました。

TM は、細胞外に3つのドメインを持つ膜タンパク質です (図4)。どのドメインが、Rolling adhesion を抑制しているか確かめるために、D1 ドメインと D2 ドメインをそれぞれ投与し、好中球の動態を検証しました。

その結果、D1 ドメインは Rolling adhesion を抑制したのに対し、D2 ドメインの効果は見られませんでした (図5)。

よって、これらの結果から TM alfa の D1 ドメインが Rolling adhesion を抑制することにより、組織への好中球の集積を抑制し、抗炎症に働いている可能性が示唆されました (図3, 5)。これまでの組織切片を用いた研究では、*in vivo* における好中球のダイナミクスの変化に焦点を当てるのが難しかったですが、今回のような生体イメージングを用いた研究により薬効評価の幅が広がりました⁽¹⁾。

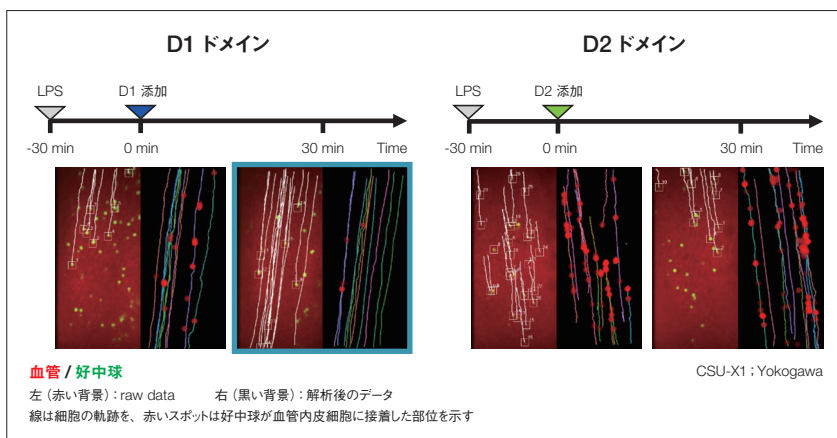
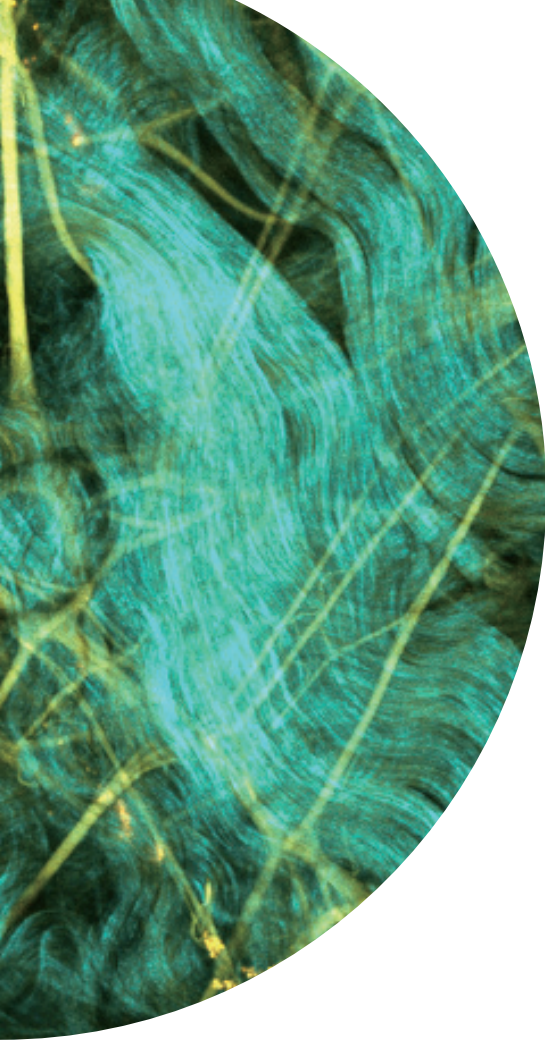


図5 D1 ドメイン及び D2 ドメイン投与時の好中球の動態



筋膜組織の構造を高精細に可視化

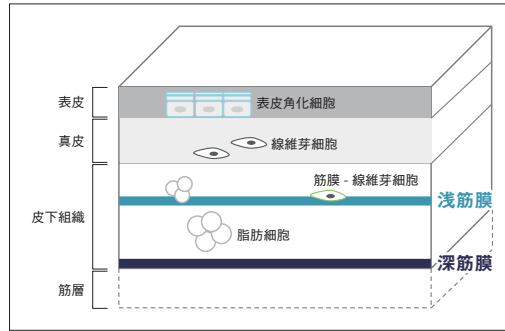


図6 皮膚+筋層の断面模式図

皮膚は、私たちの身体の中で最大の面積を持つ臓器であり、からだの恒常性を維持する重要な役割を持っています。皮膚は、表皮・真皮・皮下組織の3層構造を有し、その下に筋肉が存在する筋層があります(図6)。

「浅筋膜」は、皮下組織の間に存在し、コラーゲンとエラスチン、脂肪組織から構成されており、様々な免疫細胞や脂肪細胞、血管が分布し、顔面部位では表在性筋膜(SMAS)⁸とも呼ばれています^(2,3)。

一方、「深筋膜」は皮下組織と筋層の間に存在し、筋肉を包み込んでいます⁽⁴⁾。

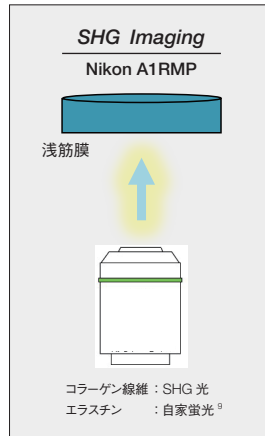


図7 倒立型二光子励起顕微鏡での観察

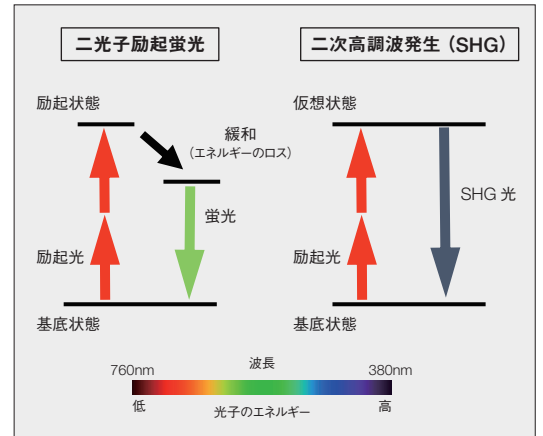


図8 二光子励起顕微鏡の原理

筋膜は、物理的・解剖学的に皮膚や全身を支える役割を持つことは知られていましたが、「忘れ去られた構造」と揶揄されるほど、生理学的な意義の解明は進んでいませんでした⁽⁶⁾。しかし、近年、画期的な実験手法の発展とともに、筋膜は骨や脂肪への分化能力を持つ前駆細胞の新しい場所であったり⁽⁷⁾、創傷部位に遊走する細胞がプールされる場所であることがわかってきました⁽⁸⁾。また、筋膜を引っ張り上げ、たるみを除去するというリフトアップ施術も汎用されていることから、加齢に伴う筋膜の変化を司る細胞や構造体を見つけないというモチベーションの元、研究を進めています。ヒト皮膚検体の筋膜を二光子励起顕微鏡にて観察された例はなく、今回初めて筋膜のラベルフリーイメージングに成功し(図7, 8)、コラーゲンとエラスチンがネットワーク構造を形成していることが分かりました。

今後は、イメージング手法や細胞の機能解析などを組み合わせ、筋膜と皮膚の関わりや、筋膜の生理的意義を明らかにしていきたいです。

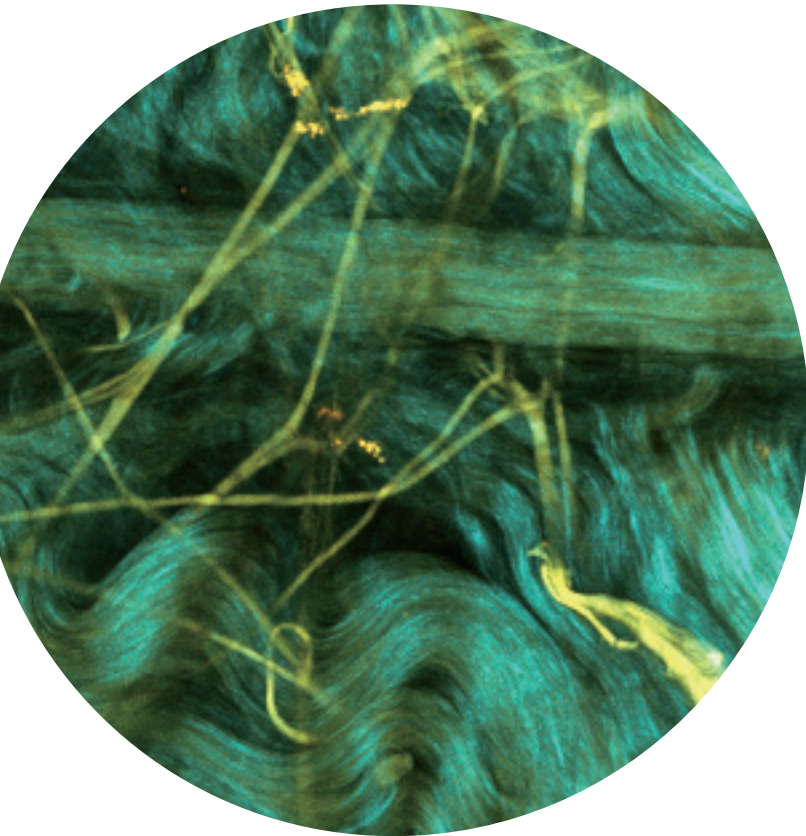
参考文献:

- (1) *J Pharmacol Sci.* 2020 May;143(1):17-22.
- (2) *Stem Cells.* 2016 May;34(5):1407-19.
- (3) *Tissue Cell.* 2020 Dec;67:101437.
- (4) *J Bodyw Mov Ther.* 2016 Jan;20(1):139-140.
- (5) *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 20;22(16):9006.
- (6) *Ital J Anat Embryol.* 2011;116(3):127-38.
- (7) *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2021 Nov;1866(11):159024.
- (8) *Nature.* 2019 Dec;576(7786):287-292.

共同研究先:

大阪大学大学院医学系研究科・免疫細胞生物学教室 石井 優先生
大阪大学大学院医学系研究科・器官制御外科学講座 形成外科学 久保 盾貴先生

2017年～ 株式会社ファンケル 総合研究所 所属時



用語解説

1. 筋膜

皮下組織の間にある浅筋膜と、皮下組織と筋層の間にある深筋膜の二種類が存在する。コラーゲンやエラスチン、脂肪細胞から構成されている線維状の構造であり、筋膜には血管やリンパ管、神経も存在する。

2. SHG

Second harmonic generation ; SHG (二次高調波発生) は、励起される物質の極性と光に対する配向性に依存して発生する。SHGを誘起する線維は、コラーゲンやアクチンなど極性を持った物質が同じ方向を向いて集合した構造をとる。

3. エラスチン

弾性線維の主成分である。皮膚や血管などの臓器に存在し、弾力性を与えている。

4. コラーゲン線維

膠原線維ともいう。真皮における主な線維成分であり、真皮乾燥重量の70%を占める。きわめて強靱な線維であり、皮膚の力学的な強度を保つ支持組織である。

5. 好中球

白血球の中の顆粒球の一種であり、白血球全体の約45~75%を占めている。強い貪食能力を持ち、細菌や真菌感染から体を守る主要な防御機構に寄与する。

6. トロンボモジュリン (thrombomodulin ; TM)

主に血管内皮細胞、気道や腸管の粘膜上皮細胞などに存在する高親和性トロンピン受容体である。

6. LPS : Lipopolysaccharide

大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性細菌の細胞壁を構成する成分。糖と脂質が結合した構造をしているので、「糖脂質」あるいは「リポ多糖」と呼ばれる。様々な毒性を示す生物活性を持つことから内毒素(エンドキシン)とも言われる。

7. DIC

播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation ; DIC) は、様々な基礎疾患によって凝固系が活性化され、全身の微小血管内に血栓(微小)が多発する病態であり、重症化すると臓器障害などが起きる症候群である。

8. 表在性筋膜 (SMAS)

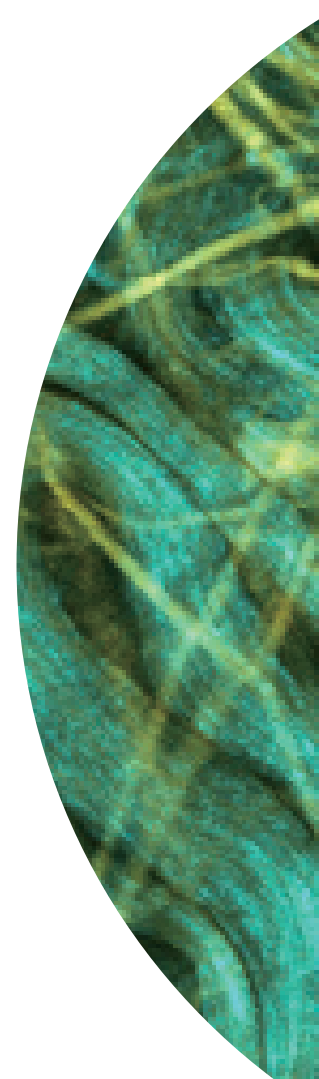
Superficial Musculoaponeurotic System ; SMASは、顔面部位や首に存在する浅筋膜を示す。

9. 自家蛍光

エラスチン線維やコラーゲン線維のような生物学的構造が、光を吸収した際に起こる光の自然放出(フォトルミネセンス)。

10. マクロファージ

体内に侵入した細菌やウイルスなどの病原体、ウイルスに感染した細胞や細胞の死骸などを貪食する細胞。異物一般に対する防御機構である自然免疫を担い、炎症反応の誘導やT細胞に異物の情報を伝え活性化させるなどさまざまな役割を持つ。



Q&A

Q1 今回発見されたトロンボモジュリンの抗炎症作用ですが、どういった点が新しい発見になるのでしょうか。

生体イメージング技術を活用し、好中球の動態をリアルタイムに解析したところ、トロンボモジュリン アルファの D1ドメインが、好中球の Rolling adhesion を抑制することで抗炎症に働く可能性を見出しました。

Q2 血管内皮に発現しているトロンボモジュリンはどのようにして抗炎症作用を制御しているのでしょうか？ なにかメカニズムでわかっていることはありませんでしょうか。

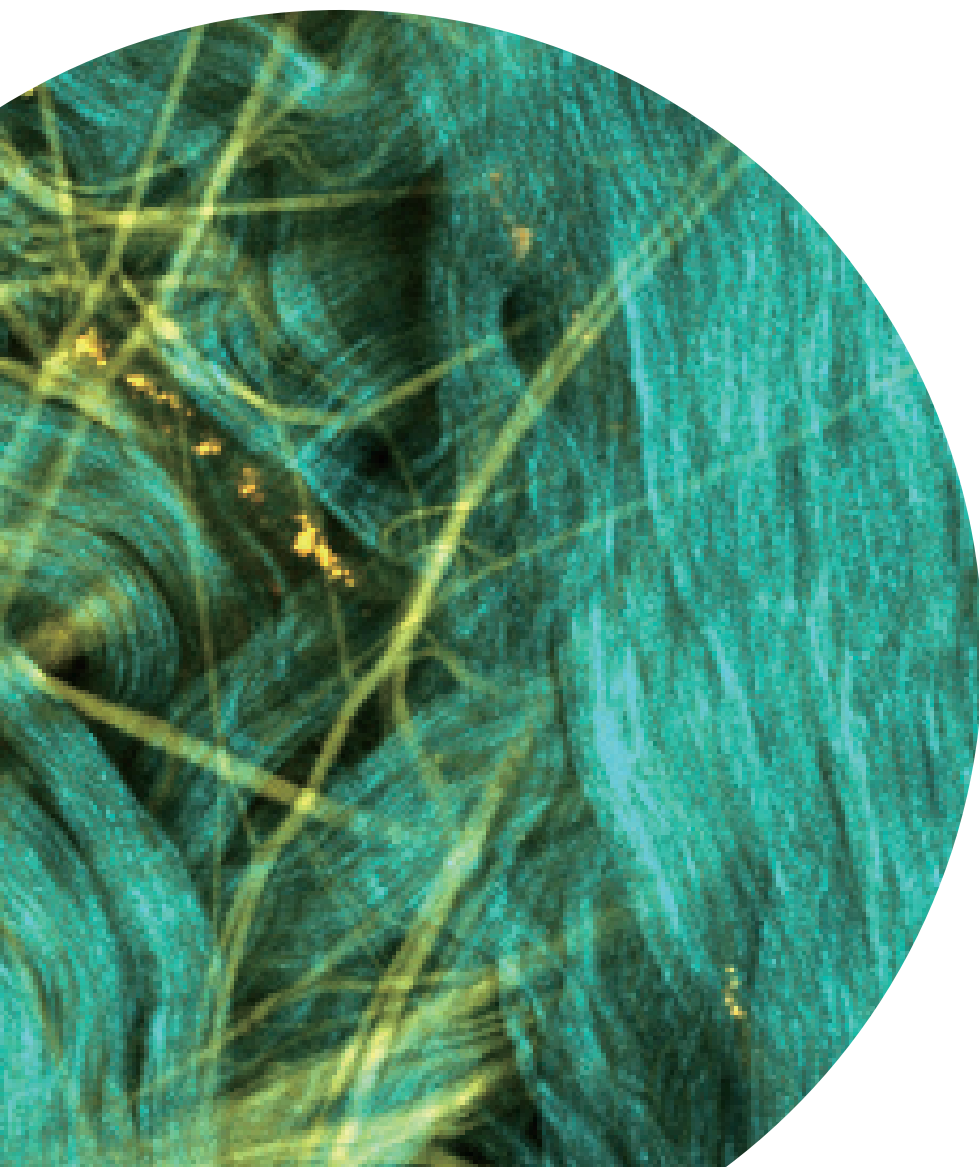
トロンボモジュリンの Lectin like Domain (D1ドメイン) が、壊死細胞やマクロファージ¹⁰ から放出される HMGB1 を吸着中和することで炎症を抑制することや、他にもヒストンや Lipopolysaccharide (LPS) を吸着中和することで抗炎症作用を発揮することが報告されています。

Q3 肌を研究されていくうえで、浅筋膜はどういった点で注目されているのでしょうか。ご研究されるうえでのイメージングの重要性とともに、今後の展望についてもお聞かせください。

筋膜は、単純に筋肉の滑りの緩衝材として捉えられてきたが、近年筋膜は骨や脂肪への分化能力を持つ前駆細胞の新たな場所や、創傷部位に遊走する細胞がプールされる場所であることがわかってきました。未知な部分が多い筋膜に魅せられ、今後はイメージング手法と細胞機能解析などを組み合わせることで、筋膜の新たな役割や、皮膚との関係性を探していきたいと思っています。

審査員より

- 絡み合う力強い流線形。毛糸の束と糸が絡み合った裁縫箱の中身のよう。
- 顕微鏡で撮影された写真でありながら、ゴッホやモネの絵画をほうふつさせられる。我々が常々抱えている顕微鏡画像の想定やイメージをはるかに超越した驚異的な作品であるといえる。
- 詳細で美しい画像である。
- picturesque! ちょっと吸い込まれる。映画のポスターの背景に使いそう。
- 絵画みたい。
- 繊細さと大胆さを持って描かれた抽象画のよう、細部の描写に引き込まれる力がある。
- 緑の色相の中で異なる深みがあり、まるで筆で描いたようなタッチが勢いがあり、美しい。
- 有機的で繊細に重なり合う組織構造は丁寧に塗り重ねた油彩画やテンペラ画のように美しい!
- 色と線が絵画のよう。

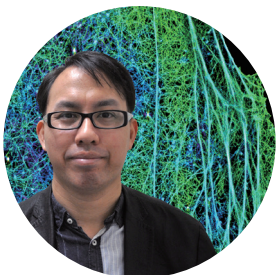




石川 智愛
慶應義塾大学 医学部・薬理学 助教

優秀賞

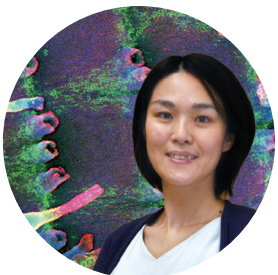
セルトリ細胞皮質下アクチン繊維
ナノアーキテクチャーの超解像イメージング



タムケオ デイン
京都大学 医学研究科 創薬医学講座 特定准教授

最優秀 JICO 賞

皮膚再生を司る上皮幹細胞コンパートメント
〜見ることで見えてくる幹細胞の不思議〜



佐田 亜衣子
熊本大学国際先端医学研究機構
皮膚再生・老化学講座 特任准教授

2020 受賞者



水多 陽子
名古屋大学 高等研究院・トランスフォーメティブ生命分子研究所
特任助教

最優秀 JICO 賞

植物の長距離・高速カルシウムシグナル

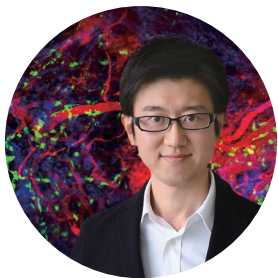


豊田 正嗣
埼玉大学大学院 理工学研究科 准教授

2019 受賞者

特別賞

関節破壊を惹起する悪玉破骨細胞の同定



長谷川 哲雄

慶應義塾大学 医学部 リウマチ膠原病内科 助教
川崎市立川崎病院 リウマチ膠原病内科 副医長

特別賞

高精度な配線が実現する
記憶再生時のシークエンス入力

特別賞

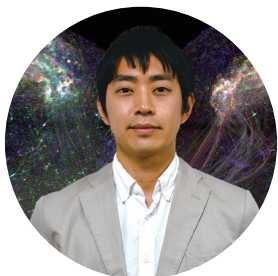
細胞飢餓状態で発達した
ミトコンドリア内膜の超解像画像

多喜正泰

名古屋大学 トランスフォーメティブ生命分子研究所
特任准教授

特別賞

両耳間時差を検出する脳幹聴覚神経回路



江川 遼

名古屋大学大学院 医学系研究科 細胞生理学分野
特任助教

優秀賞

花のなかの秘密

審査員



石井 優 先生

大阪大学大学院
教授



小原 圭吾 先生

関西医科大学
講師



根本 知己 先生

生理学研究所
教授



平井 宏和 先生

群馬大学大学院
教授



宮脇 敦史 先生

理化学研究所
チームリーダー

記念品・参加特典



受賞者の方々への記念品、そしてご応募いただいた方へお送りする参加特典は、ニコンでデザイン、またできる限りニコンで制作をしています。

記念品となる盾は、ニコンの金属 3D プリンター Lasermeister を用いて造形、受賞者の方々のお名前をレーザー刻印しています。最優秀 JOICO 賞は、ニコンが 1925 (大正 14) 年に発売されたニコン設計による初の顕微鏡“JOICO”をイメージした盾を立体的に作成、優秀賞、特別賞もまた“JOICO”をデザイン、造形しています。また参加特典となるワッペンも、毎年 NIKON JOICO AWARD をイメージし、異なるデザイン、色で表現しています。

NIKON JOICO AWARD だけでは実現できない記念品や参加特典。ぜひ研究者の皆様方に手に取っていただきたく、来年のご応募をお待ちしております。

“JOICO (ジョイコ)”とは、当時の社名である日本光学工業株式会社を直訳した“Japan Optical Industry Co.”の頭文字をとってつくられた商標です。

株式会社ニコン デザインセンター

橋本 信雄

センター長

岩村 暢彦

エクスペリエンスデザイングループ
グループ長

今野 純

コミュニケーションデザイングループ
グループ長

馬場 健司

ID グループ
グループ長

前川 明哉

UI & インタラクションデザイングループ
グループ長

斎藤 久美子

コーポレートブランディンググループ
グループ長

制作・デザイン：株式会社ニコン

小林 佑規

デザインセンター

鳴嶋 弘明

デジタルソリューション事業部

中村 明日香

デザインセンター

真栄田 千愛

デザインセンター

NIKON JOICO AWARD

発行責任者：株式会社ニコンソリューションズ
バイオサイエンス営業本部 営業企画部 営業戦略課

〒140-0015 東京都品川区西大井 1-6-3

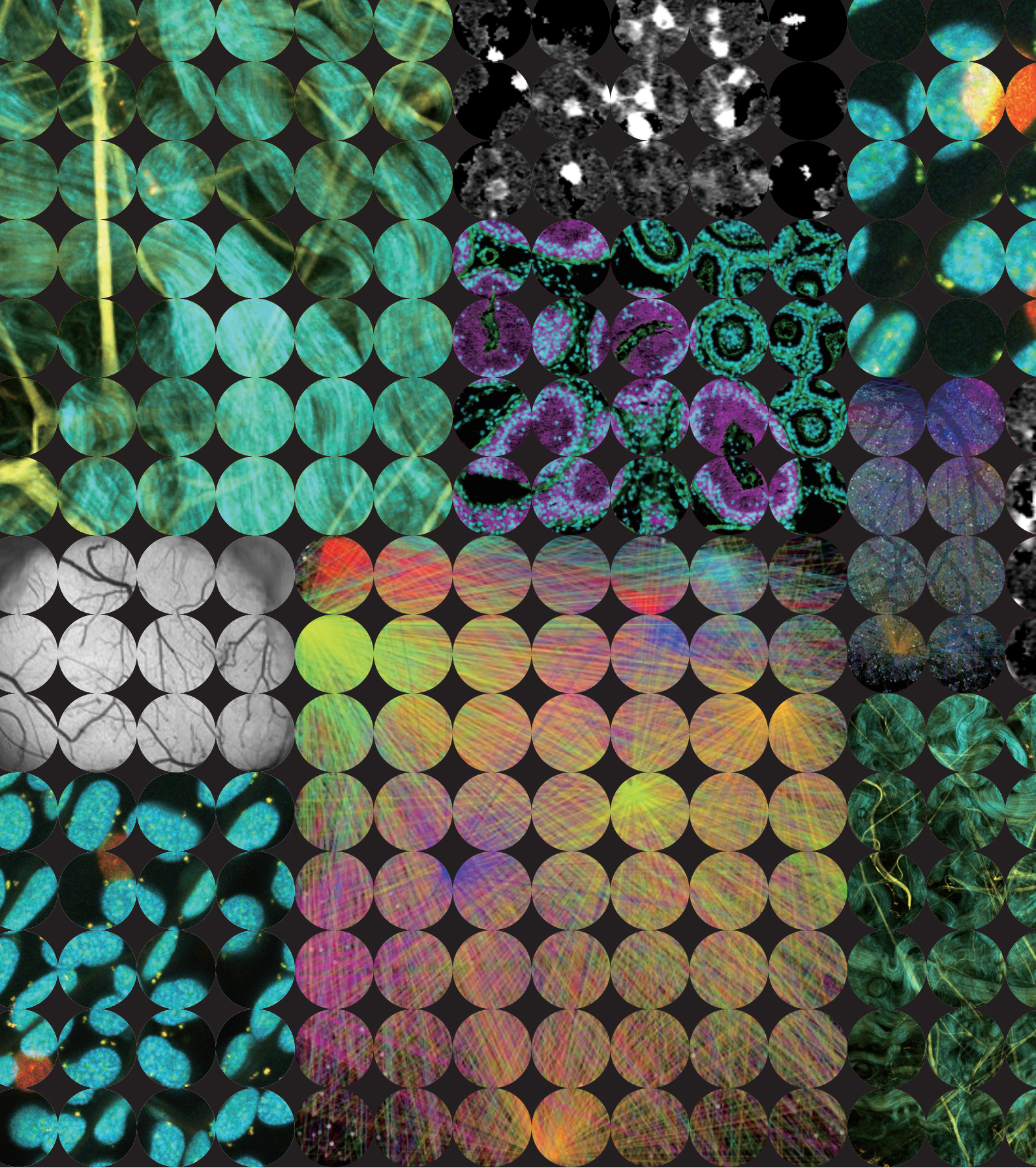
TEL：03 (3773) 8138

E-mail：Nsl-bio.Marketing@nikon.com

Website：https://www.healthcare.nikon.com/ja/ss/joicoaward/

株式会社ニコンソリューションズ





NIKON SOLUTIONS CO., LTD.