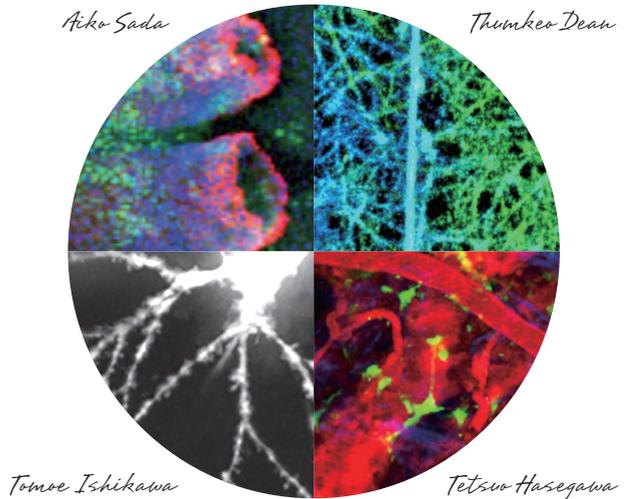


2 0 2 0
2 0 2 0
2 0 2 0

NIKON
JOICO
AWARD



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と
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。

A fluorescence microscopy image of skin epidermis. The image shows a dense population of cells with various fluorescent markers. There are several distinct, elongated, and somewhat irregularly shaped regions of high fluorescence intensity, primarily in shades of red and orange, set against a background of lower-intensity green and blue fluorescence. These regions represent compartmentalized stem cell populations. The overall appearance is that of a complex, organized cellular structure.

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～

Compartmentalized stem cell populations in the skin epidermis

不均一な幹細胞集団が
皮膚の中で規則的なパターンを作り
高度に領域化していることを発見した

さ だ あ い こ
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



受賞コメント

この度は、NIKON JOICO AWARD 最優秀 JOICO 賞にお選びいただき、誠にありがとうございます。

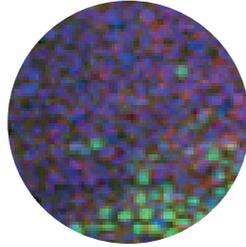
研究を行う上で大切にしていることは、顕微鏡下でじっくり見ること。受賞した作品は、顕微鏡観察をもとにした「小さな気づき」から、想像を膨らませ、辛抱強く実験を重ねることで意外な発見に繋がった思い入れのある写真です。

美しく、不思議な皮膚幹細胞の実態に迫るような研究を今後も続けていきたいです。

マウス由来皮膚

サンプル詳細：H2B-GFP tet-off マウス由来尾部皮膚
緑：H2B-GFP (分裂頻度の低い細胞)
赤：K14 (表皮細胞マーカー)
青：核染色

観察手法：共焦点顕微鏡、倒立、蛍光
観察倍率：10x
撮影年：2014
顕微鏡データ：静止画



皮膚再生を司る 上皮幹細胞¹ 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～

Compartmentalized stem cell populations in the skin epidermis

研究の概要

皮膚の最も表面に位置する表皮は、外界から身体を守るバリアとして働くほか、水分量の調節や傷の修復など、生命維持に必須の役割を果たす。本研究では、独自に確立した幹細胞マーカーと *in vivo* 動態解析ツールを用い、マウス表皮では分裂頻度の低い細胞だけでなく、本来幹細胞ではないと考えられてきた活発に分裂する細胞も幹細胞として働くことを見出し、幹細胞研究における新たな概念を提唱した。これら2種類の表皮幹細胞²は、組織の中で規則的かつ領域化した局在パターンを示した。本論文は F1000Prime に選出され、当該分野で高い評価を受けている。表皮幹細胞コンパートメントは、損傷修復やがん、老化に関与する可能性があり、さらなる研究の発展が期待される。

論文

Sada A, Jacob F, Leung E, Wang S, White BS, Shalloway D and Tumber T
Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin.
Nature Cell Biology. 2016, 18(6), doi: 10.1038/ncb3359

はじめに

組織幹細胞は、生涯にわたって自分自身を維持（自己複製）しながら、分化細胞を作り出す能力を持つ特別な細胞です。その高い再生能により、再生医療の優れた細胞ソースとして注目を集めています。組織幹細胞に異常が現れると、臓器や組織は正常に機能することができなくなり、がん化や老化を引き起こす場合もあります。よって、組織幹細胞を正確に同定し、その性質や制御メカニズムを知ることが、再生医療への応用や、がん、老化の理解に向けての重要な第一歩であると言えます。

皮膚において組織幹細胞の「分裂ダイナミクス」を可視化することで見てきた幹細胞の不思議について、応募した顕微鏡画像にまつわる研究成果を紹介します。

表皮幹細胞を用いた再生医療の発展と残された課題

皮膚の上皮組織は、毛包³間表皮と毛包から主に構成され、それぞれの細胞系譜を生む幹細胞が、恒常的なターンオーバーと損傷からの再生を担っています(図1)。表皮、毛包の幹細胞は、恒常状態では独立して機能しますが、損傷に应答して分化運命を転換し、異なる細胞系譜へと寄与する可塑性も保持しています。

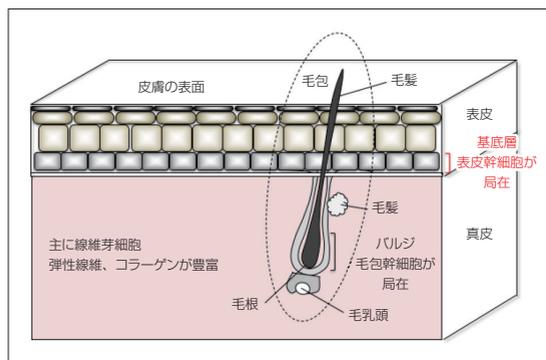


図1. 皮膚の構造と幹細胞

1980年代、ヒト表皮幹細胞の体外培養と自家移植による熱傷治療が世界で初めて成功して以来、皮膚に関する再生医療は大きく発展してきました。2017年には、遺伝性難病である表皮水疱症⁴患者に対し、遺伝子導入幹細胞⁵を含む表皮シートを移植することで、全身の約8割以上の皮膚再生に成功したことが報告されています。しかし、臨床的有用性が示されているのは、組織の最も表層にある「表皮」の再建にとどまり、結合組織⁶

P10に用語解説があります(上付き番号に対応)

も含めた複雑な皮膚の構造を完全に再生することは技術的に困難です。また、安定した表皮シートの形成や生着率を達成するには、表皮幹細胞の基礎的特性の理解が不可欠ですが、**生体内で表皮幹細胞が皮膚組織のどこに局在し、どのようにふるまうか**については、不明な点が多く残されていました。

分裂頻度の異なる表皮幹細胞の領域化を発見

古典的なモデルにおいて、組織幹細胞は、分裂頻度を低く抑えることで、DNA 損傷・テロメア⁷短縮等の影響を最小限にし、老化やがん化を防ぐと考えられてきました。一方、活発に分裂する細胞は、幹細胞能力を持たない前駆細胞⁸であるとされていました。

本研究で、佐田らは、新たに同定した分子マーカー (Dlx1⁹、Slc1a3¹⁰) と、分裂頻度の違いによって細胞を可視化する H2B-GFP tet-off システム¹¹ を用い、**マウス毛包間表皮では、分裂頻度の低い細胞と高い細胞が 2 種類の独立した幹細胞として働くことを報告しました** (*Nat Cell Biol*, 2016)。この系では、ドキシサイクリン¹² 非存在下で、表皮細胞特異的な K5 プロモーターの下流でヒストン H2B-GFP が転写され、GFP タンパク質が細胞内に蓄積します。マウスにドキシサイクリンを投与すると転写が抑制

され、細胞内の GFP タンパク質が分裂ごとに半減します。よって、活発に分裂する細胞は GFP シグナルを徐々に失っていきませんが、分裂頻度の低い細胞は長期にわたって GFP を高レベルに保持し、Label-retaining cell (LRC) として検出されます (図 2)。興味深いことに、分裂頻度の異なる 2 種類の表皮幹細胞は、組織の中で規則的、かつ領域化した局在パターンを示すことが分かりました。

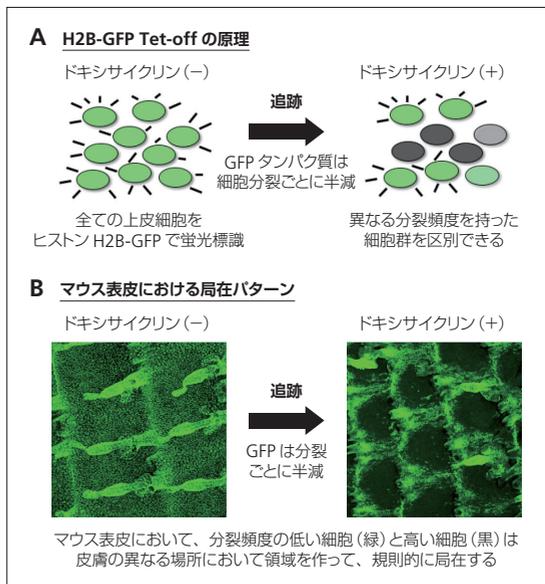


図 2. 分裂頻度の異なる表皮細胞を可視化する系

本研究の学術的独自性と今後の展望

従来の幹細胞モデルでは、組織幹細胞は分裂頻度を低くすることで、分裂に伴うストレスやダメージを回避していると考えられてきました。しかし我々は、マウス表皮では分裂頻度の低い細胞だけでなく、活発に分裂する細胞も幹細胞として働くことを見出し、さらにこれらの幹細胞が組織の中で高度に領域化しているという現象を発見しました。上皮幹細胞コンパートメントは、**皮膚の損傷修復機構やがんを始めとする皮膚疾患、老化プロセス**などに関わる可能性が示唆されていますが、存在意義はまだ分かっていません。

機能的な皮膚の再生には、幹細胞と環境因子をより複合的に理解し制御する必要があります。今後は、皮膚組織を構成する細胞や分子を三次元的に捉え、理解を深めることで、生体に近い臓器再生に向けた基盤をつくりたいと考えています(図3)。

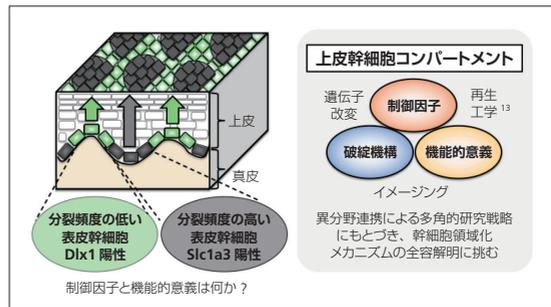


図3. 今後の展望：皮膚組織を三次元的に捉え、組織再生と破綻のメカニズムを解明する

1. 上皮幹細胞

上皮とは、体表や組織の表面を覆っている細胞層のこと。皮膚は上皮組織である表皮と、結合組織である真皮から構成される。その他、腸管上皮、角膜上皮、口腔粘膜上皮なども上皮の仲間。上皮組織に存在する幹細胞は、広く上皮幹細胞と呼ばれる。

2. 表皮幹細胞

皮膚の表皮をつくる幹細胞。表皮のターンオーバーや損傷の修復を担う。表皮幹細胞は、基底層に局在し、分化に伴って、上層へと移動する。

3. 毛包

毛を取り囲む器官のこと。毛包は層構造をとり、中心部から、毛髪、内毛根鞘、コンパニオン層、外毛根鞘と呼ばれる、毛包幹細胞(毛をつくる幹細胞)は外毛根鞘のバルジと呼ばれる領域に局在する。

4. 表皮水疱症

表皮と真皮とが解離し、弱い刺激で水ぶくれ(水疱)やびらんが生じてしまう皮膚の疾患。表皮と真皮の接着にはたらくヘミデスマゾーム構成タンパク質の遺伝子異常等が原因となる。

5. 遺伝子導入幹細胞

ウイルスベクターを使用し、ラミン遺伝子を導入した培養表皮幹細胞を移植することで、表皮水疱症の治療に成功したことが、M De Lucaらのグループにより2017年 *Nature* 誌に報告された。

6. 結合組織

組織の間をうめる支持組織。例えば、皮膚の真皮は結合組織であり、線維芽細胞や細胞外マトリックス(コラーゲンやエラスチンなど)から成る。

7. テロメア

染色体の末端にある構造で、細胞分裂に伴い長さが短くなることが知られる。テロメアの長さは、老化やがん化の制御に重要であると考えられている。

8. 前駆細胞

幹細胞から産生された比較的未分化な細胞であるが、幹細胞のような長期的な自己複製能をもたない。限られた数だけ分裂し、最終分化へと向かう。

9. Dlx1

分裂頻度の低い表皮幹細胞のマーカーとしてマイクロアレイ解析により同定した遺伝子。Dlx ファミリーに属する転写因子。

10. Slc1a3

分裂頻度の高い表皮幹細胞のマーカーとしてマイクロアレイ解析により同定した遺伝子。グルタミン酸トランスポーターとしてはたらき、幹細胞やがん細胞の代謝制御に重要な機能を持つ。

11. H2B-GFP tet-off システム

細胞の分裂頻度を可視化することが可能なトランスジェニックマウス。ヒストン H2B に緑色蛍光タンパク質 GFP をつなぐことで細胞の核を安定的に標識する。ドキシサイクリンによって転写を抑制している間に起こった細胞分裂の数を GFP の蛍光強度として検出できる。

12. ドキシサイクリン

テトラサイクリンの誘導体で、tet-off システムにおいて転写を止めるのに使用する薬剤。テトラサイクリン依存性転写活性化因子 tTA が、プロモーター配列 TRE に結合するのを阻害する。

13. 再生工学

細胞や細胞外マトリックスなどの生体材料を用い、組織の損傷等を人工的に再生させることを目的とした医学と工学の融合分野。次世代の医療として注目されている。

Q1 なぜ分裂頻度の違いに着目したのですか？

皮膚の毛包において、細胞分裂の遅い細胞はバルジ領域に局在し、長期的な幹細胞としてふるまうことが分かっています。また他の組織においても、分裂頻度の遅い細胞は、特別な機能を持つ細胞として働くことが提唱されていました。しかし表皮においては、組織幹細胞の実態について不明な点が多く、分裂頻度の違いに着目した研究もほとんどなかったため、何か面白いことが見つかるのではないかと考えました。

Q2 皮膚の損傷修復、がんなどの皮膚疾患時には、2種の分裂細胞の異なる上皮幹細胞のバランスや上皮幹細胞コンパートメントはどうなるのでしょうか？

そこをまさに知りたい！と思って研究しております。皮膚の損傷時には、2種類の表皮幹細胞は、それぞれの系譜に貢献できる可塑性を持っていることが分かっています。がんや皮膚の炎症では表皮幹細胞は活発に分裂する一方で、老化すると分裂能が下がっていきます。異なる状況下で、2つの幹細胞のバランスやコンパートメントが変わるのであれば、異なる幹細胞集団が存在することの生物学的意義の理解へもつながると考えています。

Q3 上皮幹細胞コンパートメントの制御機構でわかっていることはありますかでしょうか。

上皮幹細胞のコンパートメントの制御の一つとして真皮からのシグナルが重要であると言われています。例えば、真皮における Wnt シグナルに応じてコンパートメントのサイズが変わります。また表皮幹細胞の自律的因子、血管のパターンや細胞外マトリクス、力学的環境もコンパートメントの制御に働くと考えていますが、まだ詳細なメカニズムについては分かっています。

／ 審査員より ／

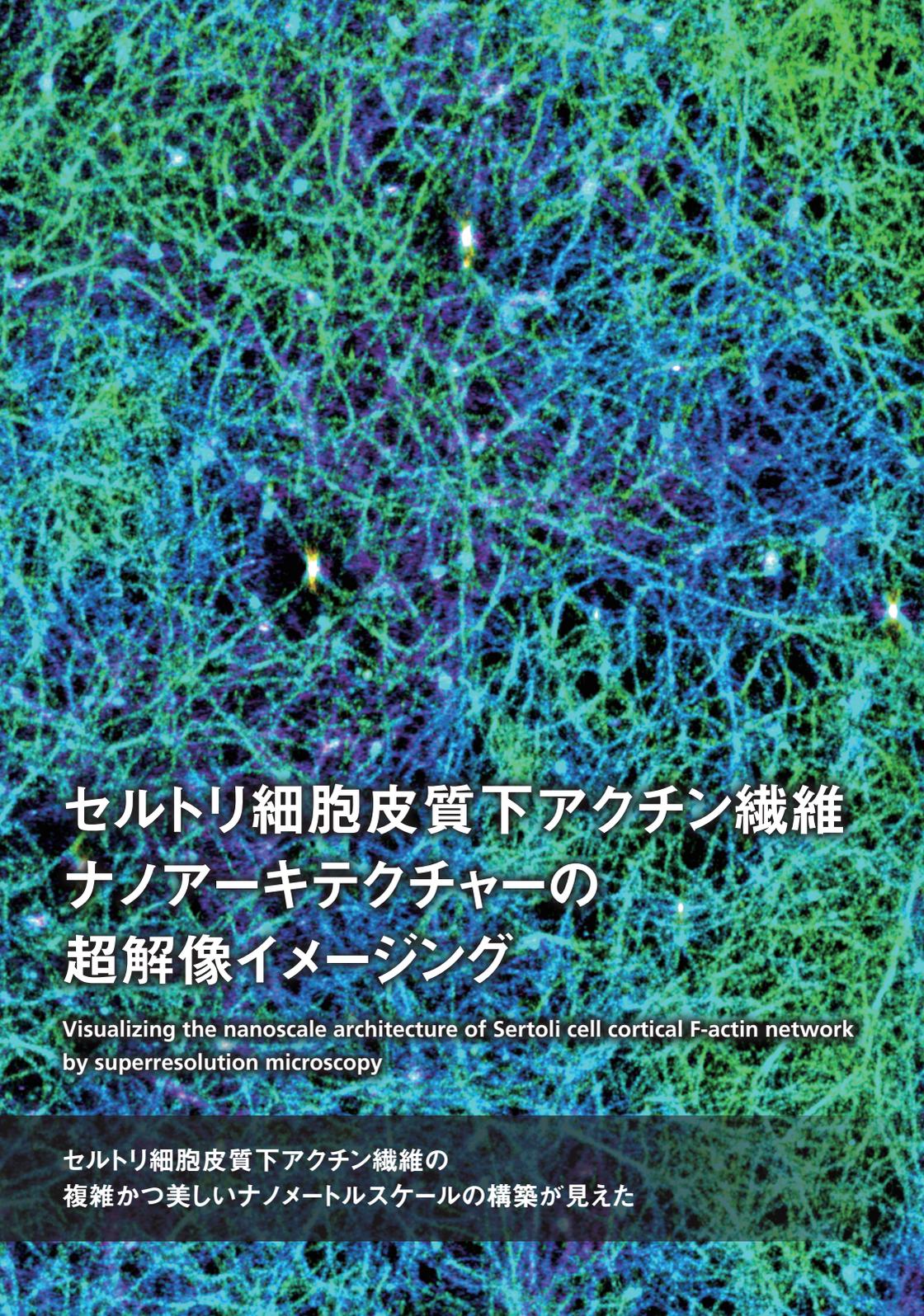
地面から這い出してくるような不気味な構造物の描写が素晴らしい。学術的にも価値が高い。

幹細胞の分裂頻度を GFP の蛍光強度で可視化するアイデアは独創的である。分裂頻度の異なる2種類の幹細胞が規則的に領域化した局在パターンは科学的価値が高いだけでなく、美しく芸術性も高い。

既存の定説を覆して、上皮幹細胞のコンパートメントを発見した画期的な研究であると言える。幻想的で生命感を感じる作品である。

美しい上に学術的な価値もある。

安定にクロマチンに結合して存在するヒストンタンパク質を GFP でラベルしたプローブを活用することでこれまで未知の皮膚に存在する幹細胞の動態を解明した点は学術的に高く評価できる。



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

Visualizing the nanoscale architecture of Sertoli cell cortical F-actin network
by superresolution microscopy

セルトリ細胞皮質下アクチン繊維の
複雑かつ美しいナノメートルスケールの構築が見えた

タムケオ ディーン

京都大学 医学研究科 創薬医学講座 特定准教授



受賞コメント

この度は、NIKON JOICO AWARD 優秀賞をお贈りいただきまして、大変光栄に存じます。ありがとうございます。

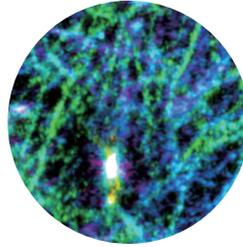
私が研究を始めた頃は、従来の光学顕微鏡を使って培養細胞のアクチン繊維を観察しても、はっきりと繊維状に見えたのは、数十～数百本のアクチン繊維が束になっている一部の太いアクチン束だけでした。しかし、超解像度顕微鏡を用いることにより、この作品のように、神秘的なナノスケールアクチン繊維の3次元ネットワーク構築が捉えられるようになりました。

今後も、未知のアクチン構造を明らかにするために、様々なイメージング技術を取り入れ、研究に邁進したいと考えております。

マウス精巣由来のセルトリ細胞の初代培養

サンプル詳細 : Alexa647-Phalloidin 染色
Z軸方向 : -300 ~ 300 nm を
pseudo color 表示

観察手法 : 超解像顕微鏡、倒立、蛍光
観察倍率 : 100x
撮影年 : 2015
顕微鏡データ : 静止画



セルトリ細胞¹ 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

Visualizing the nanoscale architecture of Sertoli cell cortical F-actin network by superresolution microscopy

研究の概要

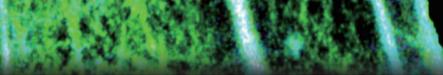
独特の形をしている精子は精巣の精細管内で小球形の精子細胞から作られていることが知られている。これまでの研究報告により、正常な精子の形態形成には精子細胞と精細管内に存在している支持細胞であるセルトリ細胞の密接な相互作用が重要であることが分かっている。その際、形成される精子細胞～セルトリ細胞間接着は、細胞間接着分子²と裏打ち³の細胞骨格⁴アクチンから構成されているが、生体内においてセルトリ細胞側の裏打ちアクチンがどのような構造をしているのか、そして、どのように形成・維持されるのかについてはほとんど不明であった。本研究では、超解像度イメージング STORM⁵ や一分子イメージングなどを用いて、mDia1/3 タンパク⁶はセルトリ細胞内で、網目状アクチンを重合させ、それに連続する収縮性アクトミオシン⁷を作り出し、セルトリ細胞～精子細胞間接着を形成・維持することで、正常な精子の形態形成に寄与していることを明らかにした。

論文

Sakamoto S*, Thumkeo D*#, Ohta H, Zhang Z, Huang S, Kanchanawong P, Fuu T, Watanabe S, Shimada K, Fujihara Y, Yoshida M, Ikawa M, Watanabe N, Saitou M, Narumiya S#

*Equal Contribution, #Corresponding Author

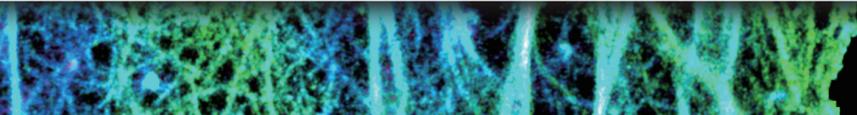
mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility. *PLoS Biology* 2018, 16(9), doi: 10.1371/journal.pbio.2004874



独特の形をしている精子は精巣の精細管内で小球形の精子細胞から作られていることが知られている。これまでの研究報告により、正常な精子の形態形成には精子細胞と精細管内に存在している支持細胞であるセルトリ細胞の密接な相互作用が重要であることが分かっている。その際、形成される精子細胞～セルトリ細胞間接着は、細胞間接着分子と裏打ちの細胞骨格アクチンから構成されているが、生体内においてセルトリ細胞側の裏打ちアクチンがどのような構造をしているのか、そして、どのように形成・維持されるのかについてはほとんど不明であった。また、その生理的な意義についても明らかではなかった。

本研究では、応募者はまず、mDia1/3 二重欠損マウスが雄性不妊であることを見出した。次に精子と精細管の観察を行い、雄性不妊の原因が精子形成不全にあることを突き止めた。さらに、mDia1 及び mDia3 の発現を確認したところ、両方ともセルトリ細胞に高発現しているため、mDia1/3 欠損マウスの精子形成不全の原因は精子細胞側ではなく、セルトリ細胞側にあることが分かった。次に、セルトリ細胞内の mDia1/3 の働きを明らかにするために、確率論的な再構築光学顕微鏡法 (STORM) 超解像度顕微鏡を用いて、初代培養セルトリ細胞のアクチン線維を約 20 ナノメートルの XY 軸解像度及び約 50 ナノメートルの Z 軸解像度で観察を行なった。その結果、セルトリ細胞膜直下にメッシュの孔のサイズが約 100 ナノメートルの網目状アクチンの構造が存在し、このアクチン構造は、mDia1/3 の二重欠損により密度が著しく減少することが分かった。また、網目状アクチンの動態を観察するため、初代培養セルトリ細胞内のアクチン線維を蛍光標識し、スピニングディスク共焦点顕微鏡で高速かつ高解像度のライブイメージングを行った。その結果、網目状アクチン構造を構成するアクチン繊維の重合速度には、平均 $0.4\mu\text{m/s}$ と $1.3\mu\text{m/s}$ の 2 成分が混在し、mDia1/3 欠損細胞では速い重合速度 ($1.3\mu\text{m/s}$) を示すアクチン繊維が特異的に消失していることを見出した。この速度は、mDia3 の一分子イメージングから計算した mDia3 のアクチン重合速度⁸ とほぼ同じであった。これらのことから、mDia1/3 は網目状アクチン構造の形成・維持に寄与していると考えられる。

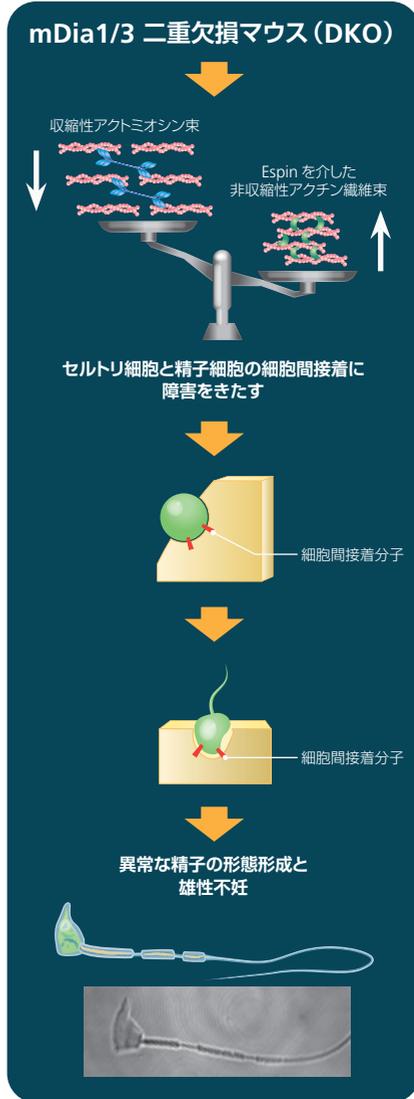
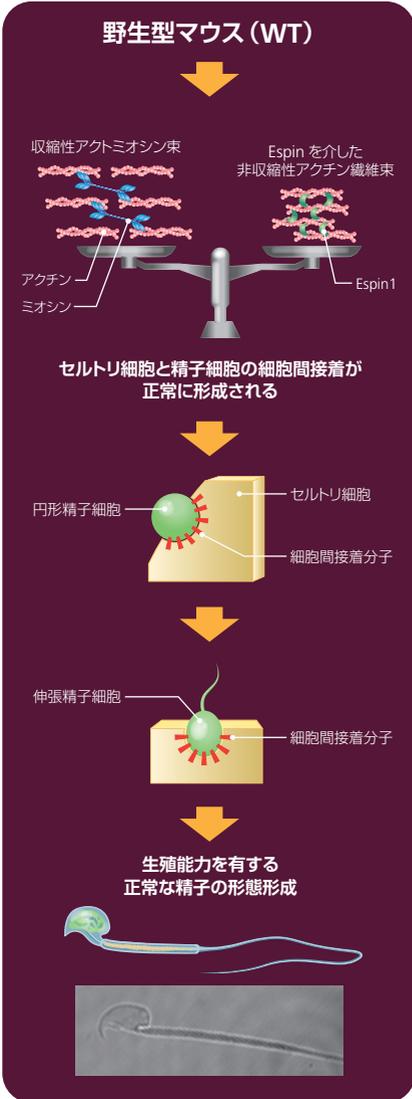
P18 に用語解説があります (上付き番号に対応)

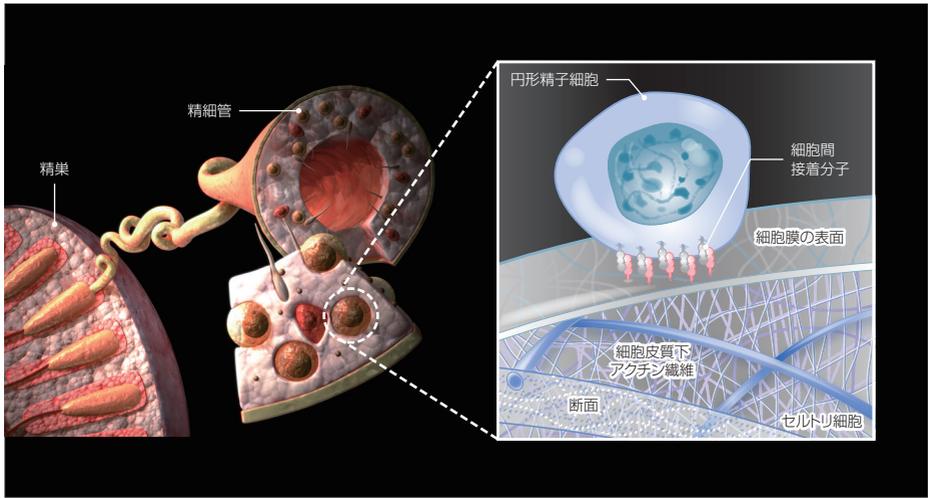


本研究で明らかになった mDia1/3 の働き (モデル図)

mDia とアクチン (アクチン、Espin⁹) の関わり

セルトリ細胞における mDia1/3 依存的細胞皮質下 F-アクチンメッシュワークの形成





概略図： mDia1/3 が作るセルトリ細胞皮質下アクチン繊維がセルトリ細胞と小球型の精子細胞の細胞間接着に必要であり、精子の形態形成に不可欠である。

これまでの培養細胞を用いた研究では、収縮性のあるアクチン線維束は細胞間接着の形成・維持に重要であることが知られていたが、本研究では、さらに STORM 超解像度顕微鏡を用いた解析により、初代培養セルトリ細胞において mDia 依存的な網目状アクチン構造を構成するアクチン繊維は、収縮性のあるアクチン線維束とつながっていることを見出した。また、mDia1/3 二重欠損セルトリ細胞ではアクチン線維束が有意に減少し、収縮性のない Espin 結合アクチン線維束が増加していることを突き止めた。これらのことから、mDia1/3 二重欠損は網目状アクチン構造につながっている収縮性アクチン線維束の減少と非収縮性の Espin 結合性アクチン線維の増加をきたし、セルトリ～精子細胞の接着形成・維持に障害をきたすと考えられる。

以上、本研究は、mDia1/3 はセルトリ細胞内で、網目状アクチンを重合させ、それに連続する収縮性アクチン線維束を作り出し、セルトリ細胞～精子細胞間接着を形成・維持することで、正常な精子の形態形成に寄与していることを明らかにした。このことは、セルトリ細胞内のアクチン細胞骨格系の異常が男性不妊の原因の一つとなりうることを示唆している。男性不妊の原因の多くを占める精子形成障害のうち、約半数は原因不明である。男性不妊の原因の一端を解明した本研究は、一部の男性不妊の新しい治療法開発の糸口になる可能性があると考えられる。

Q1 本研究で解明された mDia1/3 タンパク質は、精子細胞より前の精原細胞、精母細胞にも重要な働きをしているのでしょうか？

本研究では、丸い形をしている円形精子細胞 (round spermatid) が楕円形の形をしている伸長精子細胞 (elongated spermatid)・精子への分化に、セルトリ細胞での mDia1/3 の働きが不可欠であることを明らかにした。さらに、それに加えて、セルトリ細胞同士の細胞間接着で形成される血液精巣関門にも寄与していることを示した。この血液精巣関門は精原細胞・精母細胞に適した微小環境維持に関わっているとされているので、mDia1/3 はこれら細胞の分化の進行にも影響を与えている可能性が考えられる。

Q2 mDia1/3 二重欠損の場合に起こる、アクチン重合速度の違い、またメッシュ孔のサイズの違いでなぜ精子の形態異常がおきるのでしょうか？

精子の形態形成には、精子細胞とセルトリとの結合が不可欠であるが、細胞間接着分子の接着力を調節するのは細胞間接着分子を裏打ちするアクチン束とそれにつながっている細いアクチンのメッシュ構造体である。これらのアクチンは重合と脱重合を繰り返して、絶えず remodeling が起こるが、mDia1/3 を二重に欠損させると、アクチン重合が脱重合に追いつかず、結果的にアクチンフィラメントの総量が減少し、細胞間接着の裏打ちアクチンが弱くなり、接着が外れやすくなっていると考えている。

Q3 少子化が社会的な問題となっていますが、今回の mDia1/3 の新たな知見は、今後の男性不妊の診断や治療開発へどのようにつながっていくと考えられますでしょうか。

男性不妊の原因の多くを占める精子形成障害のうち、約半数は原因不明ですが、本研究ではセルトリ細胞内のアクチン細胞骨格系の異常が男性不妊の原因の一つになりうることを示し、診断には mDia1/3 遺伝子の変異が有用である可能性を示唆した。また、本研究では、一部の精子形成の障害の原因がセルトリ側の問題であることを明らかにしたことから、セルトリ細胞を標的とした不妊治療法開発 (変異した遺伝子の導入によるレスキューあるいは変異遺伝子の機能を補うような薬物の創薬) の可能性も提唱したい。

／ 審査員より ／

アクチン重合制御因子である mDia の精巣における機能を解明する目的で、localization microscopy を活用したアクチン線維のセルトリ細胞内での局在解析を行った成果は学術的な価値が高い。得られた画像の質も極めて高い。

とても美しい。

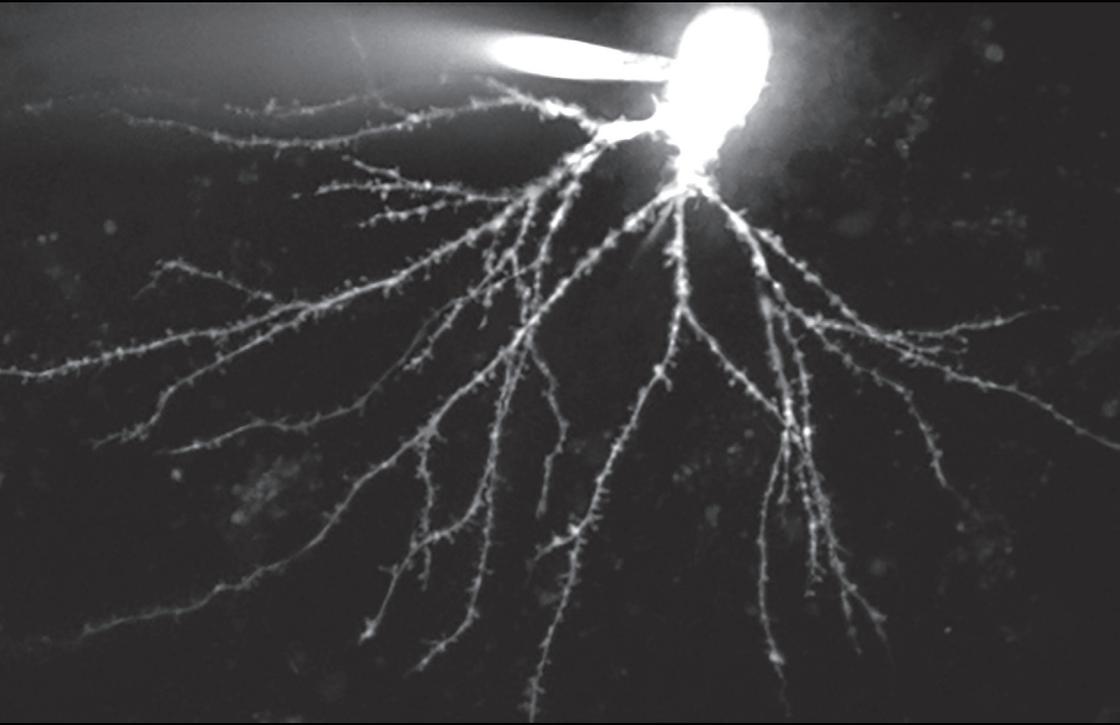
超解像顕微鏡のポテンシャルを十分に活かしたインパクトのある研究である。幻想的なナノスケールの世界が感じられる。

アクチン細胞骨格の精細で美しい構造を超解像顕微鏡を用いて見事に捉えている。

緑と青の色と細かな線形表現が美しく、繊細さの表現に心が動かされる。構造の繊細さとダイナミックさがバランスよく捉えられている。

アクチン細胞骨格のナノ構築の美しさに魅了された応募者の感動が伝わる。

樹海を想起させる緑と青の線の重なりが綺麗。青でも緑でもない独特の色調が生み出されている。



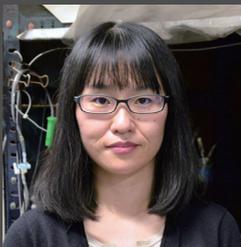
高精度な配線が実現する 記憶再生時のシーケンス入力

Sequential synaptic inputs during memory replay

大規模高速イメージングを用い
海馬の一部の神経細胞が
記憶再生時にシーケンス入力を受け取ることを発見した

いしかわ ともえ
石川 智愛

慶應義塾大学 医学部・薬理学 助教



受賞コメント

この度は特別賞に選出していただき、大変光栄に存じます。

「暗闇で光る線香花火」という素敵な評価をいただきましたが、脳内の情報伝達の様子はとても美しく、いつまで見ても飽きることはありません。そして、一見無秩序に見えるシナプス入力が数 μm というオーダーで緻密に制御されていることに日々驚かされます。今後も脳の世界を構成する規則を少しでも読み解いていけるよう、研究に邁進していきたいと思っております。

このムービーを通して、脳の美しさと精巧さの一端を感じていただけたら幸いです。

ラット由来脳(海馬 CA1 野)

サンプル詳細 : カルシウム蛍光指示薬 (Fluo-4)

観察手法 : 共焦点顕微鏡、正立、蛍光

観察倍率 : 60x

撮影年 : 2019

顕微鏡データ : 動画



高精度な配線が実現する 記憶再生¹時のシーケンス入力²

Sequential synaptic inputs during memory replay

研究の概要

記憶再生時によく観察される Sharp wave ripple³ という脳波の発生時に特定のスパイン⁴ が特定の順番で入力を受けるシーケンス入力の存在を発見しました。この入力は近傍のスパインに収束し、方向性を持つことも明らかにしていました。この結果から、高精度に配線された神経回路では上流のニューロン⁵ 集団の発火パターンが下流の一部のニューロンの樹状突起上に表象されることが明らかになり、記憶再生時に特定の発火させるための新たな脳内アルゴリズム⁶ を提示しました。

論文

Ishikawa, T., Ikegaya, Y.

Locally sequential synaptic reactivation during hippocampal ripples.

Science Advances. 2020, 6(7), doi: 10.1126/sciadv.aay1492

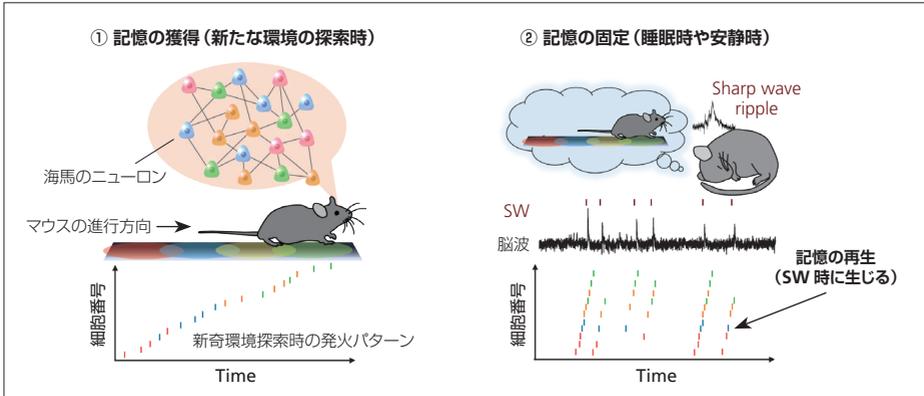
Ishikawa, T., Kobayashi, C., Takahashi, N., Ikegaya, Y.

Functional multiple-spine calcium imaging from brain slices.

STAR Protoc. 2020, doi: 10.1016/j.xpro.2020.10012

背景 1

記憶を長期的に保存するための 2 つのステップ



新しい記憶を長期的に保存するためには、①獲得、②固定という 2 つのステージを経ることが知られている。しかし、獲得時に発火したニューロンがなぜ自発的に発火するのか、すなわち記憶再生のメカニズムに関しては明らかになっていなかった。

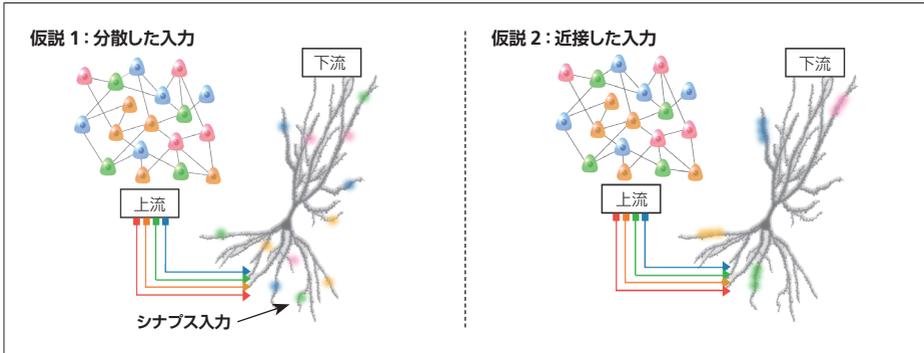
背景 2

記憶再生時のシナプス入力⁷の時空間パターン (仮説)

ニューロンは他の (上流の) ニューロンからシナプス入力を受けることで発火する。

また、ニューロンの発火パターンはシナプス入力の時空間パターンに大きく左右される。

では、記憶再生が頻繁に観察される SW 時にはどのようなシナプス入力を受け取っているのだろうか？



目的

撮影面積・速度共に世界最先端のイメージング技術を用いて、SW 発生時のシナプス入力の時空間パターンを大規模に捉えることで、記憶再生の基盤の一端に迫る

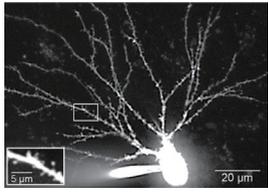
P26 に用語解説があります (上付き番号に対応)

大規模高速スパインイメージング法⁸の開発

(Ishikawa, *Star protoc*, 2020)



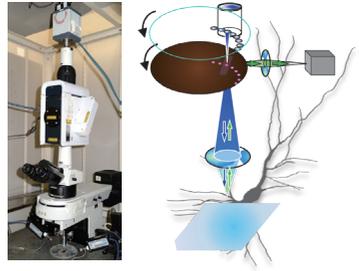
光学系の改良



本研究で撮影した視野
(平均 244 スパイン)



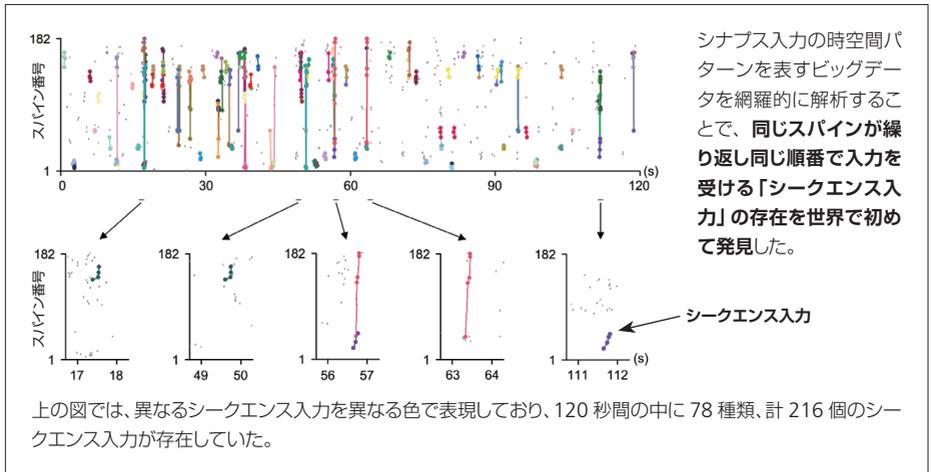
従来の視野
(~20 スパイン程度)



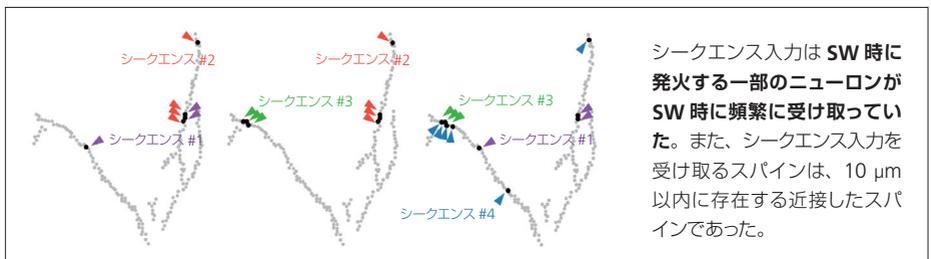
大規模・高速イメージングを実現する
ニポウディスク式⁹ 共焦点スキャノユニット

数百スパインからの入力を 100 Hz という高速で捉えることで初めて、シークエンス入力の検出が可能になった。

シークエンス入力の存在を世界で初めて発見！



シークエンス入力は SW 時に観察され、近傍のスパインが受け取る



1. 記憶再生

新たな記憶の形成時に観察された神経細胞の発火パターンがその後の安静時や睡眠時に繰り返されること。記憶再生と記憶再生時によく観察される脳波が記憶を長期的に保存する上で重要な役割を担うと考えられている。

2. シークエンス入力

特定のシナプスが同じ順番でシナプス入力を受けること。本研究では、上流のニューロン集団で生じた記憶再生が下流のニューロンにおいてシークエンス入力として受容されることを発見した。

3. sharp wave (SW) ripple

安静時や睡眠時に観察される脳波の一種。2-30 Hz の SW と 125-250 Hz の ripple の組み合わせによって構成される。SW ripple と記憶再生は密接な関係にあり、どちらも記憶を長期的に保存する上で重要な役割を持つと考えられている。

4. スパイン

樹状突起上に存在する突起状の構造物で、主に興奮性シナプスの後部(受け手)として働く。シナプス前部から神経伝達物質が放出されると、スパインに存在する受容体に結合し、ナトリウムイオンやカルシウムイオンが流入することで下流のニューロンの発火に貢献する。

5. 上流・下流ニューロン

脳内では神経細胞が互いに結合し、ネットワークを形成している。そのネットワーク内で情報が伝達されていくが、情報の送り手を上流のニューロン、受け手を下流のニューロンと呼ぶ。

6. 脳内アルゴリズム

神経細胞間で情報を伝達する際のルール。今回新たに発見したシークエンス入力は効率よく細胞体を活性化させると想定されるため、例えばニューラルネットワークに組み込むことで、より脳に近いシステムの構築につながるかと期待している。

7. シナプス入力

上流のニューロンが発火するとシナプス前部から神経伝達物質が放出され、受け手側(下流)のシナプス後部に存在する受容体に結合するとイオンが流入する。これをシナプス入力とよび、今回の実験では興奮性伝達によるカルシウムイオン流入を蛍光強度変化として捉えている。

8. 大規模高速スパインイメージング法

ニポウディスク式のスキャナと CMOS カメラを組み合わせることによって、高速かつ広視野でシナプス入力を捉える手法。平均 200 以上のスパインから 100 Hz での撮影は現時点では世界最大数かつ最速である。

9. ニポウディスク式

ニポウディスクはらせん状に穴の空いた円盤で、これを高速回転させることでレーザーを分割し、多数の点から同時に記録することができる。ニポウディスク式の共焦点顕微鏡を用いることで、高速かつ広視野で、褪色の少ないイメージングが可能になる。

10. 膜電位変動

他のニューロンから受けるシナプス入力などによって細胞膜の電位が変化すること。興奮側に傾くことを脱分極と呼び、ある閾値に達すると発火に至る。

11. 脱分極

細胞膜は通常、負に帯電している。興奮性のシナプス入力を受けることによって膜電位が 0 に近づくことを脱分極と呼ぶ。脱分極の程度がある閾値に達すると発火し、さらに下流のニューロンへと情報が伝達される。

Memo

Q1 どのような実験系を組まれたのでしょうか？

今回の実験は海馬を 300 μm の厚さにスライスし、10 日から 20 日程度培養しました。海馬培養スライスの CA1 野の錐体細胞に電極を密着させセルアタッチ記録を行い、その後陰圧をかけることで細胞の膜に穴を開けます。このとき対象とする神経細胞の周囲 50 μm 程度にもう一本の電極を置き、局所場電位も記録しました。細胞膜に穴が空くと電極に入っていたカルシウム蛍光指示薬が細胞へと広がり、カルシウム濃度変化を捉えることが可能になります。シナプス入力をつえた後は観察された画像の上に手作業で観察領域を設定し、蛍光強度変化を計算しました。

Q2 今回発見された細胞選択的なシーケンス入力の制御メカニズムは为什么呢？

とても重要な質問なのですが、答えはわかっていません。上流のニューロンと下流のニューロンの結合様式が深く関わると考えられますが、どのような細胞同士がシナプスを形成するののかについても明らかになっていないことがたくさんあるからです。また、ニューロンは今回観察した興奮性の入力（脳内のアクセルとして動く）だけでなく、抑制性入力（脳内のブレーキ）なども受け取っているのですが、抑制性入力による調節も存在するのではないかと考えています。

Q3 今回得られた知見と、記憶障害等の疾患との関連性で分かっていることはありますか？

シーケンス入力は一部の細胞のみで観察されたことから、シーケンス入力の存在が細胞選択的な発火パターンの形成に重要な役割を果たすのではないかと考えています。そのため、シーケンス入力を阻害すると記憶障害なども生じる可能性が高いと推測されますが、シーケンス入力自体が発見されたばかりの現象ですので阻害した実験などは報告されていません。今後、新しい技術などを導入し、シーケンス入力の機能にも迫っていければと考えています。

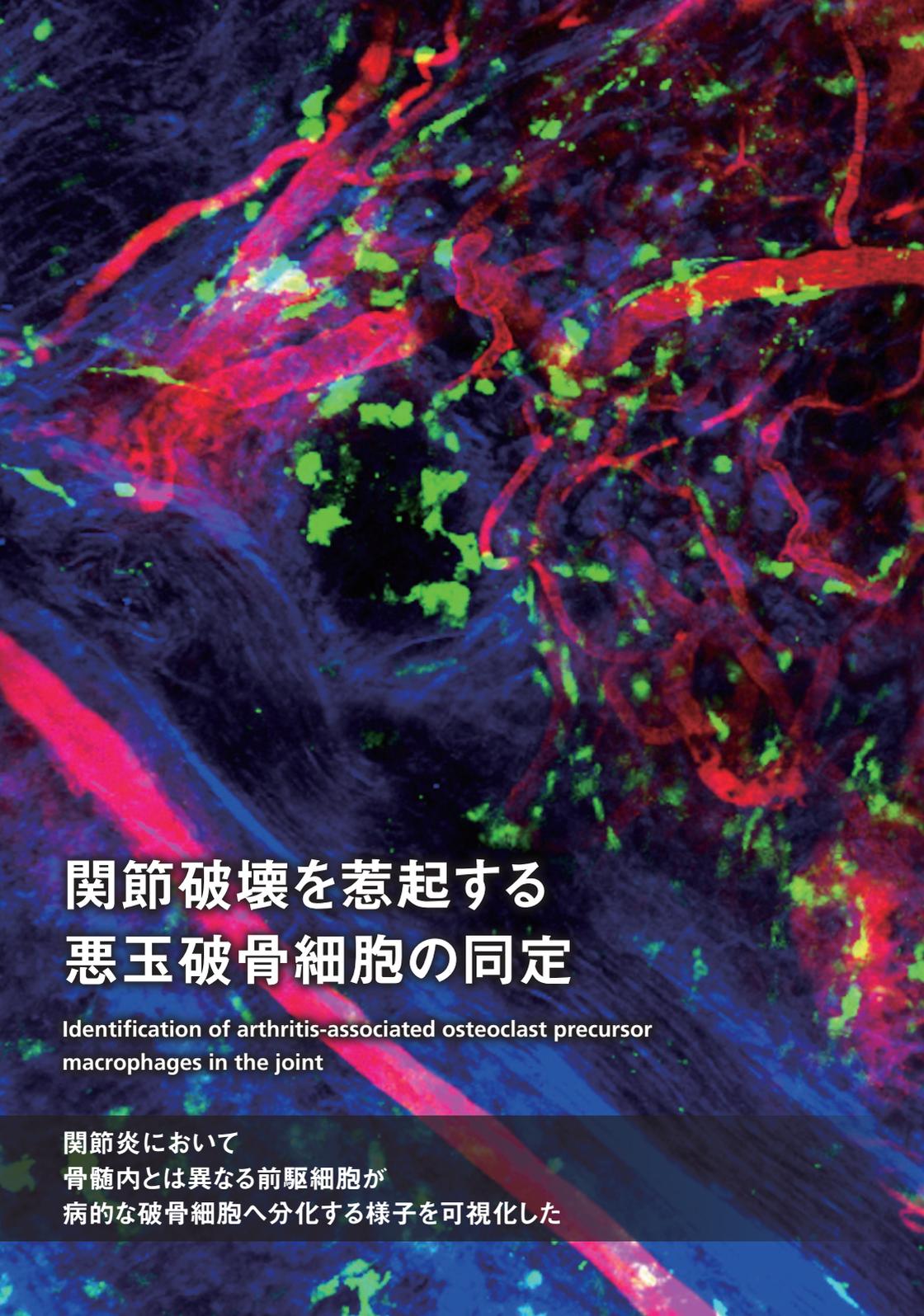
／ 審査員より ／

学術的に価値の高いものである。

記憶再生時のシナプスのシーケンス入力を、高い空間的および時間的解像度で捉えることに成功しており学術性は極めて高い。またこの現象を捉えた動画は、暗闇の中の線香花火を彷彿させて芸術性も兼ね備えている。

スライス標本において、シーケンス入力の存在を示すことに成功した重要な発見である。

高い時間解像度で神経細胞間の情報伝達のあるスパインシナプスの活動を捉えた画像は価値が高い。



関節破壊を惹起する 悪玉破骨細胞の同定

Identification of arthritis-associated osteoclast precursor
macrophages in the joint

関節炎において
骨髄内とは異なる前駆細胞が
病的な破骨細胞へ分化する様子を可視化した

は せ が わ て つ お
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

い し い ま さ る
石井 優

大阪大学大学院 医学系研究科
免疫細胞生物学教室¹ 教授

き く た じ ゅ ん い ち
菊田 順一¹

准教授



受賞コメント

この度は栄誉ある NIKON JOICO AWARD 特別賞に選出頂き、大変光栄に存じます。

「百聞は一見にしかず」と言うように、生体内の現象をありのままに映し出すイメージング技術は、時に多くの数値データ以上に説得力を持って病態の真実を私達に訴えかけます。

日々膠原病患者さんの診療に携わる私にとり、病的な関節破壊が燃え盛る炎のように惹起される瞬間を生体内で捉えた時の驚きと興奮は、そのまま病気の根治を目指す研究のモチベーションへと繋がっています。

今回の受賞を励みに、自己免疫疾患の病態解明にさらに邁進していきたいと思います。

マウス (DBA1/J) 由来炎症関節

サンプル詳細 : 青 : second harmonic generation (線維組織)

赤 : AF647 (血管)

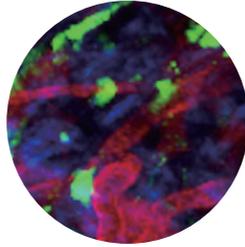
緑 : CX3CR1 (破骨前駆細胞)

観察手法 : 二光子励起顕微鏡、倒立、蛍光

観察倍率 : 25x

撮影年 : 2019

顕微鏡データ : 静止画



関節破壊を惹起する悪玉破骨細胞の同定

Identification of arthritis-associated osteoclast precursor macrophages in the joint

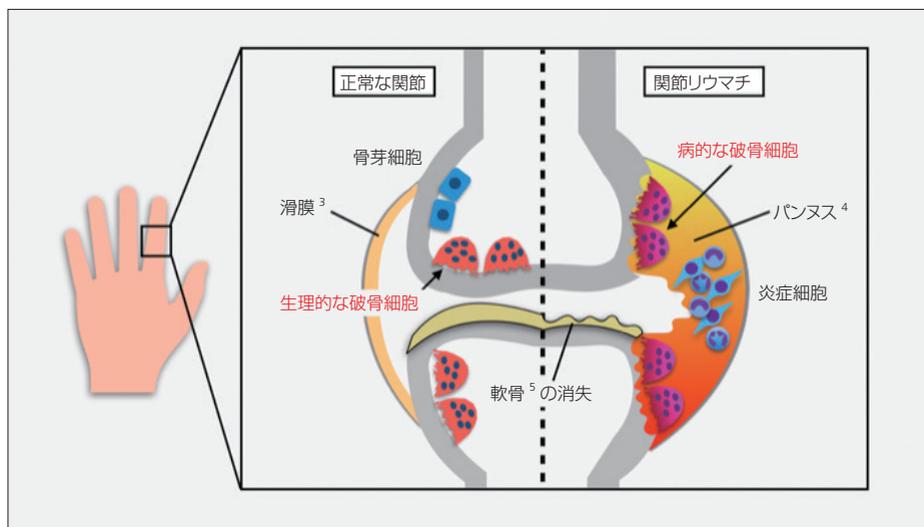
研究の概要

生体内で唯一骨を吸収する能力を持つ破骨細胞¹は、平常時は骨髄内で生理的な骨の新陳代謝に関わる一方、関節リウマチでは炎症関節で病的な骨破壊を惹起する。本研究は、これら病的な破骨細胞が「どこで」「どのようにして」形成されるのか明らかにすべく、シングルセル遺伝子発現解析²や二光子励起顕微鏡の技術を組み合わせることで、生体内で病的な関節破壊が起こるプロセスを詳細に解析・可視化したものである。

論文

1. Tetsuo Hasegawa, Junichi Kikuta, Takao Sudo, Yoshinobu Matsuura, Takahiro Matsui, Szandor Simmons, Kosuke Ebina, Makoto Hirao, Daisuke Okuzaki, Yuichi Yoshida, Atsushi Hirao, Vladimir V. Kalinichenko, Kunihiro Yamaoka, Tsutomu Takeuchi, Masaru Ishii
Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. *Nature Immunology*. 2019, 20(12), doi: 1038/s41590-019-0526-7
2. Tetsuo Hasegawa, Junichi Kikuta, Takao Sudo, Erika Yamashita, Shigeto Seno, Tsutomu Takeuchi, Masaru Ishii
Development of an intravital imaging system for the synovial tissue reveals the dynamics of CTLA-4 Ig *in vivo*. *Scientific Reports*. 2020, 10(1), doi: 1038/s41598-020-70488-y

骨を吸収する破骨細胞はどこにいる？



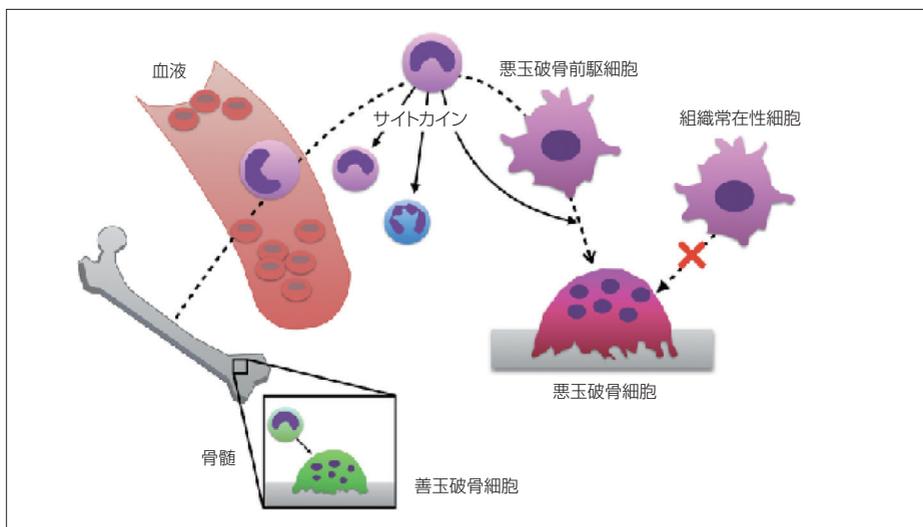
骨破壊を担うユニークな多核細胞である破骨細胞は、**骨の内側(骨髄)で骨を作る骨芽細胞と協調して働くことで、骨の恒常性維持**に重要な役割を果たします(骨リモデリング)。

一方、**関節リウマチでは関節を包む膜(滑膜)が炎症を起こし、骨の外側と滑膜が接する部分に病的な破骨細胞が形成**されます。この病的な破骨細胞である「悪玉破骨細胞」は、関節の骨を外から破壊していくことで、リウマチ患者さんの身体機能・生命予後を大きく悪化させます。

これまで数多くの研究が、骨髄・脾臓・血液といった組織の細胞を探索・解析してきましたが、**関節リウマチの病変の主座である「炎症を起こした滑膜」は、マウスにおいて非常に小さい組織であるため単離することが難しく、どのような細胞がどのようにして病的な骨破壊に関わるのか、そして骨髄の中で生理的に起こる骨の新陳代謝と関節の骨破壊は何か違うのか、実証する報告は限られていました。**

P34 に用語解説があります(上付き番号に対応)

関節の悪玉破骨細胞は、どこからやってくる？



骨髓キメラマウス⁶を用いた解析により、関節を破壊する悪玉破骨細胞は、関節に元から存在する常在性マクロファージ⁷ではなく、骨髓細胞⁸が血液へ出た後に、関節組織へ流入し分化・形成されることが示されました。さらに、これら悪玉破骨細胞へ分化する前駆細胞は、骨髓内に存在する生理的な前駆細胞と異なり、抗原提示に関わる表面マーカーを顕著に発現すること、炎症性サイトカインによって直接破骨細胞分化を促される特性を持つこと、前駆細胞のうち実際に成熟破骨細胞まで分化する細胞は約1割に過ぎないことがわかりました(文献1)。

しかしながら、生きた個体の中で実際にこれら悪玉破骨細胞の前駆細胞が血液から滑膜へ流入しているのか、それら前駆細胞が成熟破骨細胞へ分化するのか、さらに悪玉破骨細胞がどのように関節の骨を破壊しているのか確認する手段がありませんでした。

生体イメージング技術を用いて関節組織を可視化する！



そこで私達は、多光子励起顕微鏡⁹を用いて関節炎を発症したマウスの関節組織を生きのまま可視化するプロトコルを作成致しました。全身の関節の中で、100 μ mの深達度で病的な骨破壊が起こる滑膜と骨の接触部位 (Bare area) まで到達でき、かつ適切な視野を得られる関節として、第3中手指節間関節に注目しました。マイクロ剪刀と実体顕微鏡の観察下で第3中手指節間関節を露出することで、悪玉破骨細胞が病的な骨破壊を惹起する Bare area を特定し、この部位をマウスが生きのまま倒立多光子励起顕微鏡を用いてイメージングを行いました。

結果、血管内 (赤) から関節組織へ流入した病的な破骨前駆細胞 (CX3CR1¹⁰-EGFP 陽性細胞: 緑) や骨を破壊する病的な破骨細胞がリアルタイムで観察され、加えて炎症を起こした滑膜組織が精緻な新生血管の3次元構造により形成されていることがわかりました。

これまでの破骨細胞の研究は、*in vitro* で培養した細胞を用いることが常でしたが、本研究成果により、関節炎の病変局所の現象を直接観察・解析することが可能になり、さらなる関節リウマチの病態解明につながることを期待されます。

1. 破骨細胞

生体内で骨を溶かす能力を持つ唯一の多核細胞であり、単球マクロファージ系の前駆細胞が分化・融合して形成される。生理的環境下では骨の内側(骨髄)に存在し、骨の新陳代謝に関わる一方、関節リウマチでは骨の外側から関節骨を破壊し不可逆的な機能障害を引き起こす。

2. シングルセル遺伝子発現解析

微量でそのままでは解析できない遺伝子を増幅することで、1つの細胞の発現遺伝子を網羅的に調べる解析手法。

3. 滑膜

関節を包む関節節の内側に存在する膜であり、生理的環境下では関節液を産生することで関節の円滑な運動をサポートする。一方関節リウマチでは、炎症を起こして顕著に腫大し、病的な骨破壊に関与する。

4. パンヌス

関節リウマチにおいて、関節の滑膜組織は炎症を起こして腫大し、骨との接触面に炎症性の肉芽組織を形成する。これをパンヌスとよび、骨や軟骨に浸潤し関節破壊の原因となる。

5. 軟骨

骨の関節面を覆う弾力性のある組織で、関節のクッションとして働く。

6. 骨髄キメラマウス

放射線照射や化学療法後に骨髄移植を行うことで、骨髄細胞を他個体由来の骨髄細胞で置換したマウス。特定の細胞や病態が骨髄細胞に由来・惹起されるか評価する際に用いられる。

7. マクロファージ

白血球の1種で、全身の組織に広く分布し、主に体内の死細胞や侵入した細菌の消化・貪食に関与する。一方、周囲の微小環境に応じて多彩な機能を獲得し、骨髄では破骨細胞、肝臓ではクッパー細胞、脳ではミクログリアなど各臓器に特異的な特徴を保有する。

8. 骨髄細胞

骨の内側にある骨髄に存在する細胞。造血幹細胞に由来する血液細胞や、間葉系の細胞が含まれる。

9. 多光子励起顕微鏡

蛍光物質は、通常1光子により励起され蛍光を発するが、波長が2倍、すなわちエネルギーが1/2の光子を2個同時に当てて励起させる2光子励起過程を用いた顕微鏡。長波長光を用いることで、組織の深部まで低侵襲で到達し蛍光物質を励起することが可能になり、生体イメージング研究において重要なツールとなっている。

10. CX3CR1

ケモカインの一種であるCX3CL1の受容体であり、フラクタルカイン受容体とも呼ばれる。単球マクロファージ系の細胞や一部のリンパ球の表面マーカーとして主に用いられる。

Memo

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Q1 なぜ血管から流入した骨髄細胞と、常在性マクロファージの性質が異なるのですか？

破骨細胞へ分化するためには、receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) と macrophage colony stimulating factor (M-CSF) の二種類のサイトカインによる刺激が必須ですが、滑膜表層の常在性マクロファージには M-CSF の受容体である CSF1R が発現しないことが報告される一方、血液から流入した単球・マクロファージ系細胞には CSF1R が発現しています。この相違や、エピジェネティックな制御を含め多彩な要素が破骨細胞への分化能に関与していると思われます。

Q2 イメージングにおいて、先生が最も苦勞された点はなんですか？

炎症を起こしたマウスの関節組織は、血流に富み多彩な免疫細胞の浸潤により腫大するため、膝や足関節のイメージングでは滑膜 - 骨境界領域まで二光子励起顕微鏡で可視化することができません。よって、第3中手指節間関節という非常に小さな関節をマイクロ剪刀を用いて低侵襲に露出させる手技の構築や、呼吸による視野の変動を最低限にするプロセスに苦勞しました。

Q3 今回の研究成果をふまえ、新たな関節リウマチの治療へとつなげるために先生が今後期待されることはなんですか？

関節組織のイメージング技術の向上や、破骨細胞の骨吸収能を可視化する新たな蛍光プローブの開発により、より正確に病的な破骨細胞の挙動が明かされることで、炎症性骨破壊を特異的に制御する治療が可能になると期待しています。

／ 審査員より ／

関節リウマチにおける主要な病変部である滑膜において、破骨細胞の前駆細胞の動態や滑膜組織の再編成の過程を個体レベルで可視化する技術を開発した点は学術的に高く評価できる。

解像度も高く美しい。

迫力と躍動感があり、強いインパクトを感じる。

躍動感と破壊の圧力が絶妙に表現されていて、研究者の興奮が伝わるようである。

とにかく力強さを感じる。

燃える赤い炎の中に飛び散る緑の火の粉のような描写がきれい。関節炎のイメージングにも相応しい。

／ 審査員紹介 ／



石井 優 先生

大阪大学大学院 医学系研究科
免疫細胞生物学研究室
教授



岡部 繁男 先生

東京大学大学院 医学系研究科
医学部 神経細胞生物学分野
教授



小原 圭吾 先生

関西医科大学 生命医学研究所
細胞機能部門
部門長 講師



根本 知己 先生

自然科学研究機構
生命創成探究センター
バイオフィotonics研究グループ
生理学研究所
バイオフィotonics研究部門 (兼任)
教授



平井 宏和 先生

群馬大学大学院 医学系研究科
脳神経再生医学分野
教授

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

Life Imaging Lab
室長

今野 純

エクスベリエンスデザイングループ
グループ長

馬場 健司

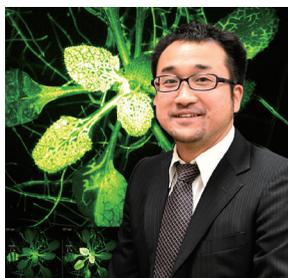
ID グループ
グループ長

前川 明哉

UI & インタラクシオ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



/ 最優秀賞 JOICO 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



/ 優秀賞 /

花のなかの秘密

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



/ 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



/ 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

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/>

Website



株式会社 **ニコン** ソリューションズ



NIKON SOLUTIONS CO., LTD.