

—基礎研究から学ぶ—

2. 組織細胞化学シリーズ (若手研究者へのヒント)

共焦点レーザー顕微鏡による形態, 機能解析
マルチモード顕微鏡による癌細胞の形態, 機能解析の実際 (2)

内藤 善哉

日本医科大学大学院医学研究科統御機構病理学

2. Histochemistry Series

Morphological and Functional Analyses of Cells, Using Confocal Laser Scanning Microscopy System:
Example for Morphological and Functional Analyses of Cancer Cells,
Using Multi-mode Microscopy System (2)

Zenya Naito

Department of Integrative Pathology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

The confocal laser scanning microscope (CLSM) is a device for obtaining high-resolution optical images of immunofluorescent staining. The CLSM can produce in-focus images of thick specimens, a process known as optical sectioning. The images are reconstructed with a computer, using 3-dimensional image software, allowing 3-dimensional reconstructions of topologically complex objects. On the same tissue sections, the CLSM can obtain the images of differential interference contrast. Recently, a special inverted CLSM—the multimode microscopy system—has been used to examine the morphology and functions of cells. A multimode microscopy system can be used to obtain images of CLSM, total internal reflection fluorescence, time-lapse, and micromanipulation. In the present study, we show images of pancreatic cancer cells as an example.

(日本医科大学医学会雑誌 2009; 5: 159-166)

Key words: confocal laser scanning microscopy, immunofluorescence,
differential interference contrast, three-dimensional image, cancer

はじめに

医学研究は、日々めざましい発展を遂げており、近年では induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞や癌幹細胞 (Cancer stem cell) といった、今までの常識を覆すような研究結果が報告されている。種々の疾患

においては、DNA, RNA, タンパク, タンパク結合糖鎖などの異常についての研究がなされ、DNA レベルでは、DNA の変異, 欠損, 増幅の解析, DNA を鋳型として作られる messenger RNA (mRNA) レベルの研究では mRNA の発現増加や発現抑制に加え、選択的スプライシング機構による様々なアイソフォーム mRNA の役割についての研究が盛んに行われている

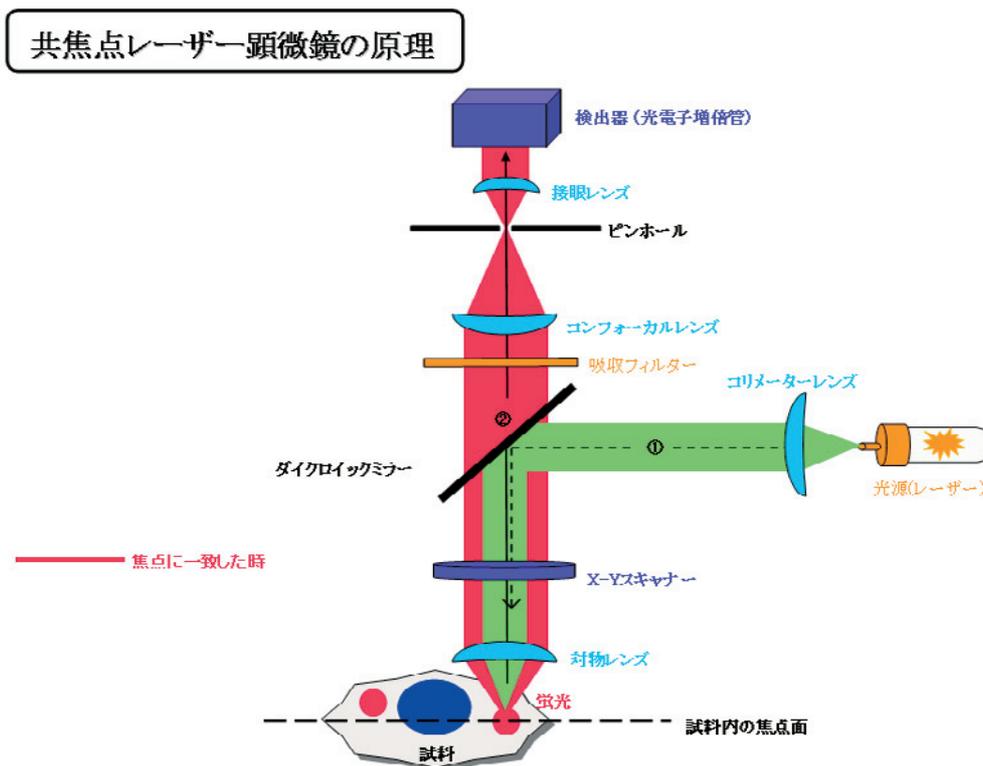


図1 共焦点レーザー顕微鏡の原理

レーザー光は①のようにダイクロイックミラーで反射した後、対物レンズを経て試料に照射される。その後反射したレーザー光は②のように検出器の前に設置されたピンホールにより焦点位置からのもののみが検出器に届く。

る。また、近年ではタンパクに翻訳されることなく、mRNA に直接作用する micro RNA が発見され、注目を集めている。これらの分子生物学的研究の多くは、培養細胞や組織標本をすり潰し、一様な溶液として調整し検討が行われている。しかしながら、実際のヒトの組織は単一の細胞から構成されるわけではなく、数種類また数十種類の細胞が複雑に混在し、それぞれが違った機能を果たしている。癌の組織でも、癌を栄養する毛細血管や癌周囲には線維化がみられ、多数の血管内皮細胞と線維芽細胞、炎症細胞が含まれている。これらの様々な細胞が産生する物質や、それを利用する細胞について検討を行うことが、疾患発生や進展の機序解明や疾患の治療へつながる基礎研究として重要である。このため、現在、組織標本上で細胞や周囲環境を観察する手段として、様々な組織細胞化学的手法が開発され広く利用されている。組織をすり潰すことなくスライドガラス上の組織標本をそのままの状態、目的とする細胞の DNA の増幅、欠損を検討することができる蛍光インサイチュア・ハイブリダイゼーション fluorescent in situ hybridization (FISH) 法、目的細胞での mRNA 発現を検討することが可能な in situ hybridization (ISH) 法、目的タンパクの局

在している細胞を観察することができる免疫組織化学染色 (immunohistochemistry, IHC) 法などが研究に使われている。これらの異なった染色法を連続切片で行うことで、目的とするタンパクを産生する細胞と、その分泌状況や局在する部位、さらにはそれを利用する細胞などを顕微鏡下で観察、決定することが可能である¹⁾。免疫組織化学法は、一般病理診断で広く使われている発色剤で陽性細胞を観察する酵素抗体法と、抗体に蛍光色素を結合させ蛍光顕微鏡で検出する蛍光抗体法に大別される。例えば、蛍光抗体法では、赤と緑など2種類の蛍光色素を同時に用いることで、目的とする2つのタンパクが陽性の細胞が黄色い蛍光を発し、両タンパクの局在を確認することができるという、酵素抗体法にはない特徴がある。しかし一方で蛍光抗体法では、形態像の詳細な観察が困難で、蛍光色素の退色による永久標本の作製が比較的困難である点や、蛍光色素同士の干渉により陽性細胞の正確な把握が困難などの問題もある。これらの問題への1つの解決策として、共焦点レーザー顕微鏡が開発され、現在広く研究に用いられるようになってきている。今回、倒立共焦点レーザー顕微鏡を中心に、その原理と応用可能な形態・機能解析法について述べたい。

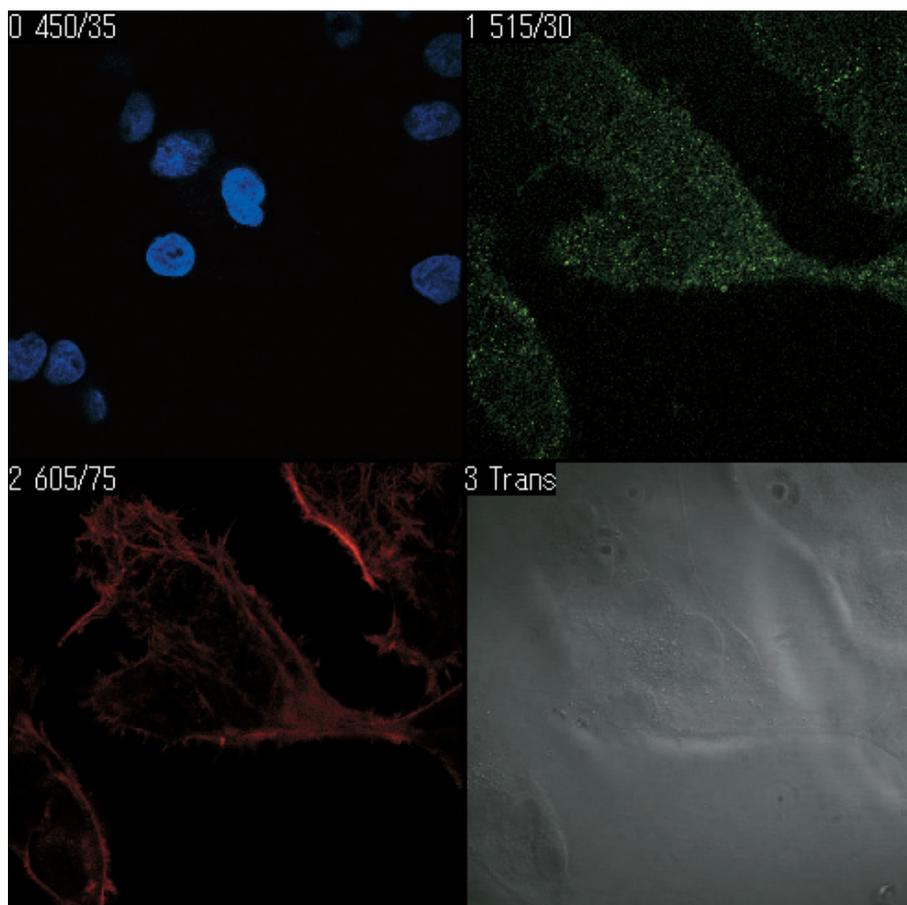


図2 共焦点レーザー顕微鏡による PANC-1 細胞像

共焦点顕微鏡により PANC-1 細胞の核が青色(左上), VI型の間径フィラメントの Nestin が緑(右上)に, アクチンフィラメントが赤色(左下)に観察される. 微分干渉像により細胞質の輪郭, 核周囲が明らかである(右下). 倍率: $\times 1,000$

1. 共焦点レーザー顕微鏡の原理

共焦点レーザー顕微鏡とは, レーザー光を用いて「共焦点方式」という方式で2次元走査を行い, 細胞, 組織面からの反射や散乱光を光検出器で検出するものである。「共焦点」とは, 図1に示すように光源の一点から出た光が検出器の一点に集まる状態をいう. 共焦点レーザー顕微鏡で光源として用いるレーザーは理想的な点光源で, 強度が強いという特徴がある. 通常の光学顕微鏡では, 観察したい焦点とさらにその上下方向からの光も含まれるため, 観察像が不鮮明となることが多い. しかし共焦点レーザー顕微鏡では, 検出器の前にピンホールが設置されており, 焦点位置からのみの散乱光を選択し不鮮明な像の原因となる上下方向からの光を遮断することができる. さらに厚さのある細胞, 組織などについても, 様々な深度でXY方向にスキャンし, 2次元画像を得ることが可能である. これらのZ方向に深度を変えて撮影した断層像を, パ

ソコン上で重ね合わせることで, 3次元画像(細胞, 組織の立体像)を構築することができる. これにより, 細胞や組織の構造や物質の局在などを非破壊的・3次元的に, 生きている状態でも観察することができる.

2. 共焦点顕微鏡で可能な形態, 機能解析

(1) 共焦点と微分干渉画像の重ね合わせ画像

共焦点顕微鏡では, 多種類の蛍光色素を使用することにより多数の目的物質を異なった色で観察することができる. 図2は膵臓癌細胞の PANC-1 細胞という, 腺癌細胞で, 核を青色に, 細胞の骨格タンパクの VI 型の間径フィラメントの Nestin を緑に, アクチンフィラメントを赤として観察したものである. さらに共焦点顕微鏡では, 微分干渉画像を撮影することが可能で, 無染色の状態でも癌細胞の細胞質の輪郭や, 核の周囲が明瞭に観察できる(図2右下). これらの画像を一枚の写真として合成することにより, 細胞質, 核といった細胞の構造, Nestin とアクチンといった

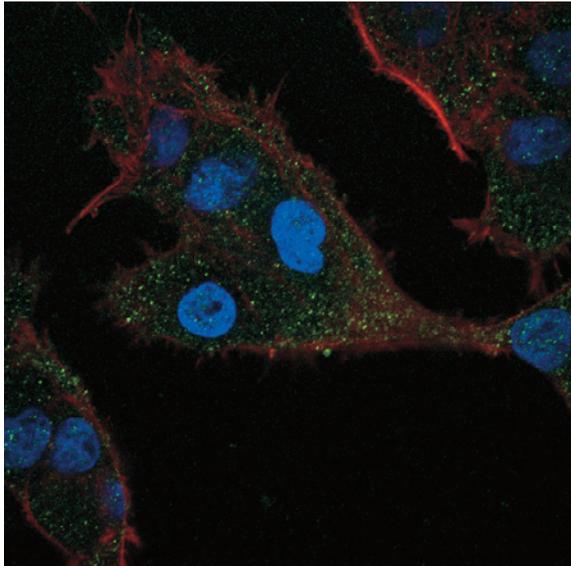


図3 共焦点レーザー顕微鏡による重ね合わせ画像
図2でみられた4枚の画像（細胞核，Nestin，アクチンフィラメント，微分干渉）を重ね合わせ同一画像とすることができる。倍率：×1,000

細胞骨格タンパクの分布を明瞭に観察することができる（図3）。

(2) 連続断層画像

さらに、共焦点レーザー顕微鏡の特徴である、細胞の縦方向（Z軸方法）の画像を連続して撮影できる機能を利用することで、細胞の表層側から深層（ガラスやプラスチックとの接地面）までの断層画像を撮影することができる。このことによって、目的のタンパクが細胞の細胞膜表面に存在するのか、核内にあるのか、細胞質内に局在するのかなどを明確に検討することができる。図4では緑色のNestinと赤色のアクチンが細胞質に豊富に認められている。

(3) 3次元画像

これらの断層画像はVolocity（Perkin Elmer社）などの3次元画像構築、解析ソフトウェアを用いることにより立体画像としてコンピューター上で示すことができる。この3次元画像は、360度自由に回転して観察が可能であり、回転速度や移動方向、距離も自由に

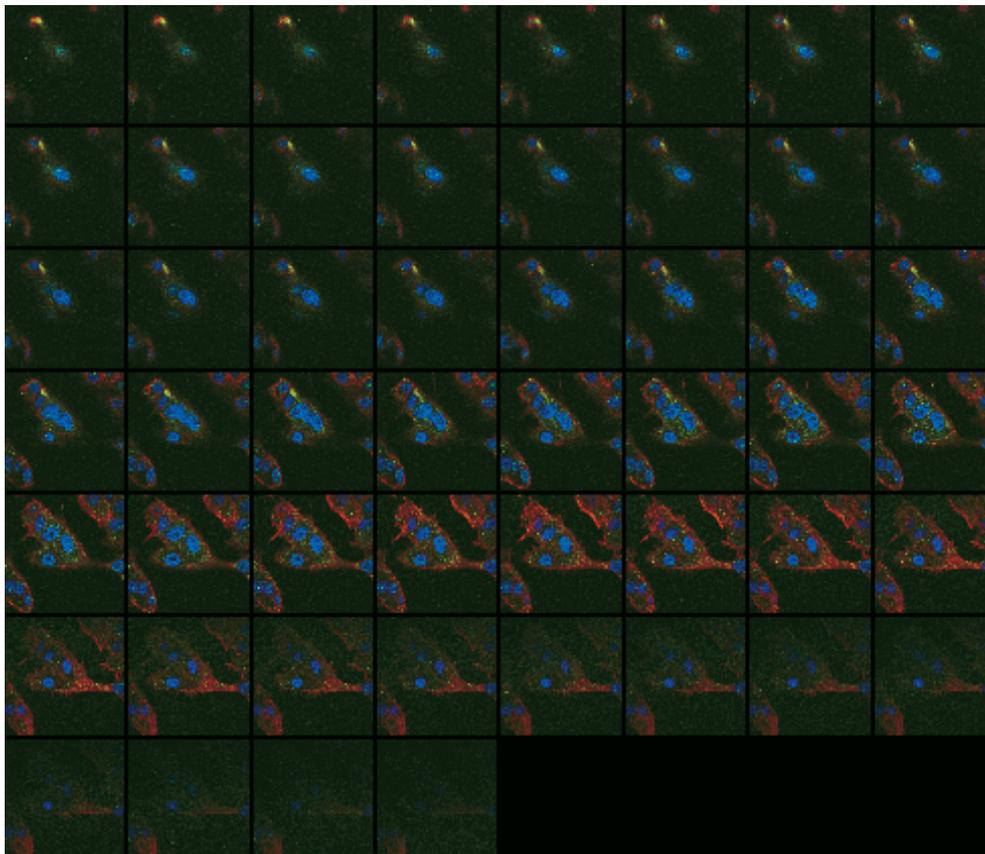


図4 共焦点レーザー顕微鏡によるPANC-1細胞の連続断層画像
PANC-1細胞の細胞表面（左上）からガラスとの接地面（右下）までの断層画像によりNestin（緑色）とアクチン（赤色）の細胞内での分布が明瞭となる。倍率：×1,000

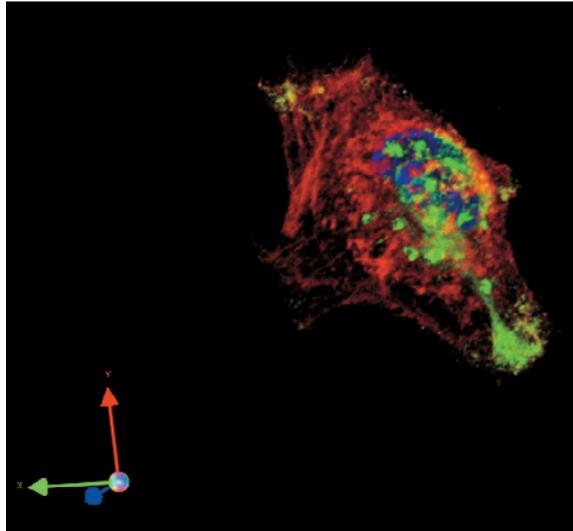


図5 共焦点レーザー顕微鏡で撮影された連続断層画像からの3次元画像の構築
 PANC-1細胞内のNestin(緑色)とアクチン(赤色)、核(青色)の分布が立体的に観察できる。倍率：×1,000

設定することができるため、目的のタンパク局在を立体的に確認することができる(図5)。

3. マルチモード顕微鏡による膵臓癌の実際の解析例

本教室では共焦点レーザー顕微鏡を中心として、同一サンプルの同一視野で細胞、組織の機能、形態を様々

表1 マルチモード顕微鏡システムで可能な画像解析

1. 1分子蛍光観察；近接場エバネッセントイメージング(TIRF)
2. ライブCell観察；一般蛍光・微分干渉位相差イメージング
3. セクショニングイメージ観察；共焦点コンフォーカルイメージング
4. 多面的画像計測—処理, 3D解析；蛍光イメージ画像解析
5. GFP発現などの時間軸記録；デジタルタイムラプス機能(T・λ・Z)
6. 各種試薬・遺伝子導入と細胞観察；マイクロマニピュレーションシステム

マルチモード顕微鏡システム構成図

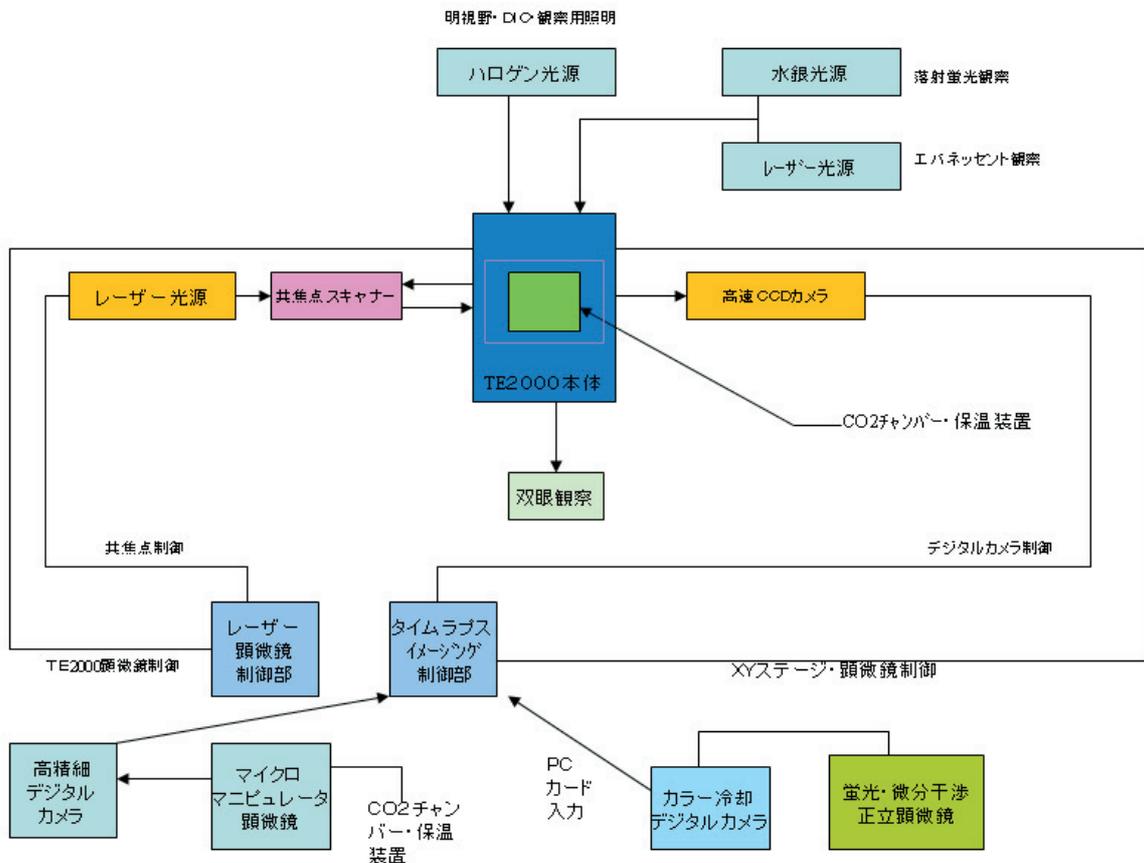


図6 マルチモード顕微鏡システム構成図

倒立型共焦点レーザー顕微鏡を中心に、タイムラプス撮影装置、マイクロマニピュレーター顕微鏡などからなり、細胞の形態、機能解析が多方面から可能である。



図7 マルチモード顕微鏡システム外観図
倒立型共焦点レーザー顕微鏡（中央）と解析用コンピューター（右）とタイムラプス用の培養装置（左）などからなっている。

な方法で観察，解析することが可能なマルチモード顕微鏡システムを用いて，膵臓癌，大腸癌，子宮癌細胞などについて研究を行っている．マルチモード顕微鏡は表1に示すように目的物質について，一分子レベルで局在を観察したり（1分子蛍光観察），生きた細胞を固定せずそのまま観察すること（ライブ cell 観察），断層像（セクショニングイメージ観察），立体画像（3D解析），顕微鏡上で培養を行い経時的に細胞の動きを観察（タイムラプス観察），試薬や遺伝子導入とその後の細胞観察を，1つのシステムで行うことが可能な，多機能の顕微鏡である（図6，7）。

(1) Scratch assay による癌細胞の遊走能の検討

細胞の機能解析を行う上では，細胞の運動能を検討することが必要である．特に癌研究においては，癌細胞のプラスチックやガラス上での移動性（遊走能）や，細胞外基質上での移動性（浸潤能）を検討することが広く行われている．現在教室にあるマルチモード顕微鏡では，顕微鏡のステージ上に小型の細胞培養装置を設置することにより顕微鏡上で24時間程度の細胞培養が可能であり，時間ごとに写真撮影することができる．Scratch assay（別名 wound healing assay）は細胞を，細胞培養用のプレートにコンフルエントになるように培養し，それをピペットチップなどで一本の線となるように，細胞を剝離する．そのまま顕微鏡のステージ上で培養を行い，24時間後に再び同じ部分を撮影する．剝離直後と剝離してから24時間後の写真を比較し，剝離部分の距離や剝離後に回復した部分の細胞数を計測することで，細胞の遊走能を検討することができる（図8）．この方法では，あらかじめI型コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質を

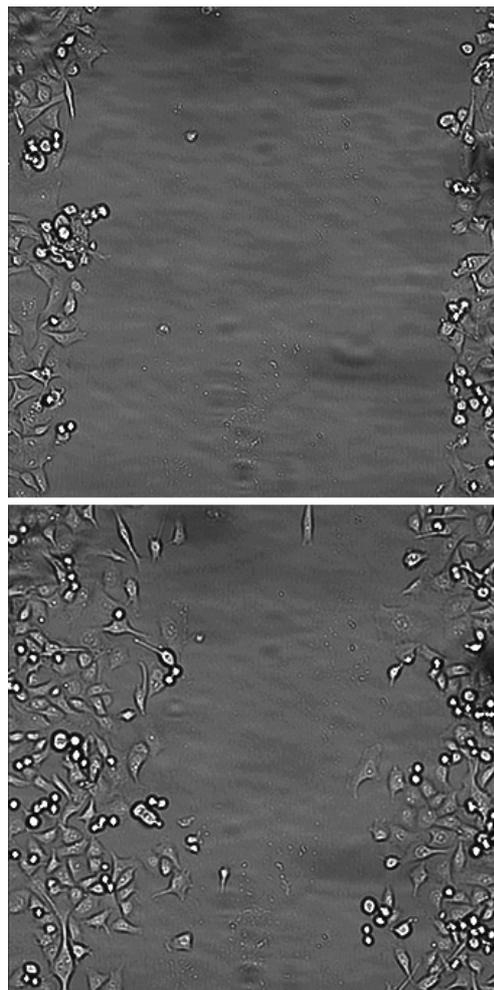


図8 Scratch assay による PANC-1 細胞の遊走能の検討

コンフルエントになった PANC-1 細胞をピペットの先で線状に剝離（上）した後，24時間後には，その部分に細胞が遊走して中央の剝離部分が狭くなっている．倍率：×100

コートすることで，癌細胞の細胞外基質への浸潤能の検討，またIV型コラーゲンやラミニンをコートし基底膜への浸潤能を *in vitro* で研究することも可能である．

(2) 軌跡解析による癌細胞の遊走能の検討

一つ一つの細胞の運動性についてさらに詳細に検討するためには，細胞の軌跡解析という方法を行うことがある．この方法では細胞同士の間隔が開いた状態で，顕微鏡上で培養を行い，5分ごとなど，定時的に顕微鏡写真を撮影する．この連続撮影された画像をもとに，数個の細胞を指定しそれらの平面的な動きの軌跡をソフトウェアで解析する（図9）．この解析方法では，細胞の移動距離，移動の方向，移動速度の変化などがそれぞれの細胞について解析可能である．癌細胞などに遺伝子操作を加えたり，抗癌剤を加えたりす

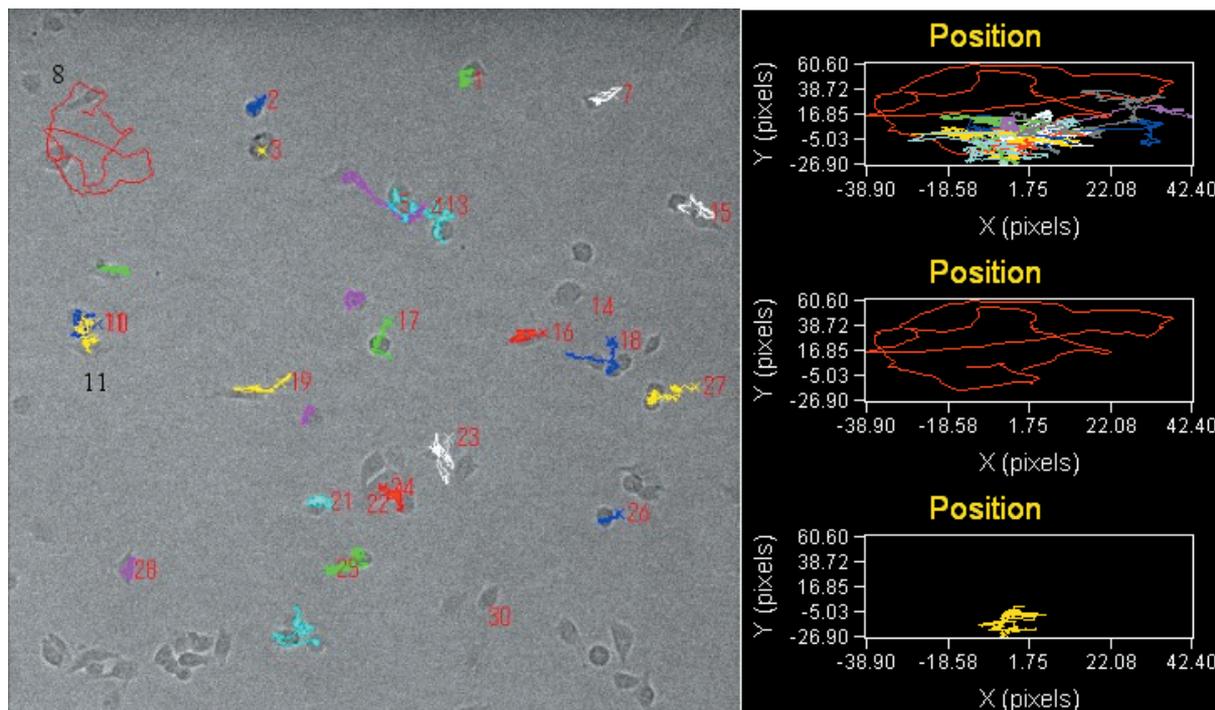


図9 軌跡解析による PANC-1 細胞の遊走能の検討

5分ごとに24時間、撮影した PANC-1 細胞の移動した軌跡を示す(左、番号は解析した細胞)。解析した全細胞(右上)、8番(右中央)と11番(右下)の細胞の移動した軌跡。倍率:×100

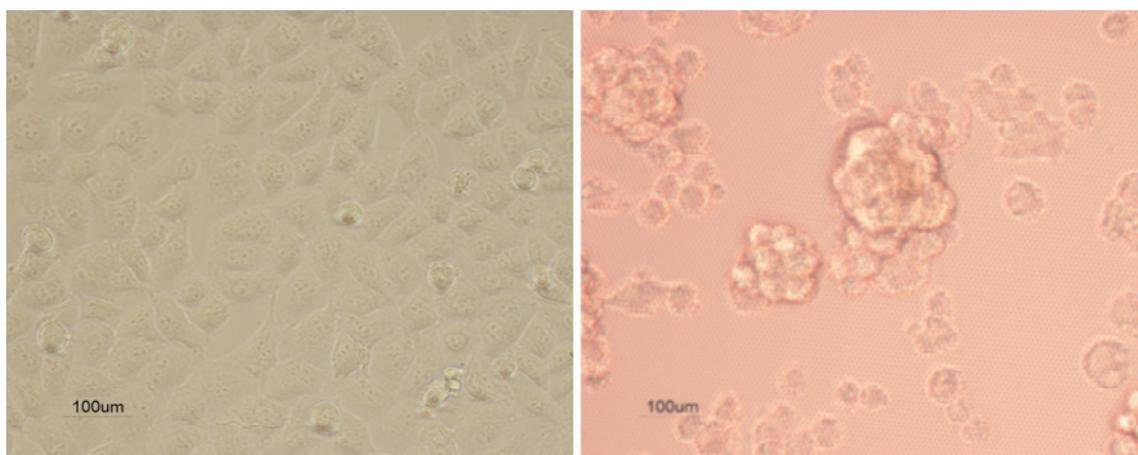


図10 通常の培養と3次元培養プレートでの PANC-1 細胞の培養

通常培養では一層に増殖する PANC-1 細胞も、3次元プレート上では多数の細胞が集まったコロニーとなり、立体的に増殖する。

ることで細胞の運動能の変化を検討することも可能である。この方法でも、プレート面に細胞外基質をコートし、癌細胞と基質との関連について解析したり、細胞増殖因子や薬剤などを離れた部位に置くことで、走化性について検討することも可能である。

4. マルチモード顕微鏡による最新の3次元培養細胞の解析

現在、幹細胞や、癌研究の分野において、培養細胞

を生体内の状態に近い3次元で(立体的に)培養する技術(スフェロイド)が注目されている。従来は2次元、すなわち単層(モノレイヤー)で培養していたが、生体内では大部分の細胞は3次元(立体的)に存在している。このため、生体環境に近い3次元細胞培養技術の開発が必要と考えられていたが、高度な技術が必要で、簡便かつ大量に、そして均一な接着スフェロイド形成できる培養手法の確立は困難であった。近年、最先端のナノテクノロジーを用いて、細胞培養プレートの細胞が接する面に、網目状などの隆起を作る

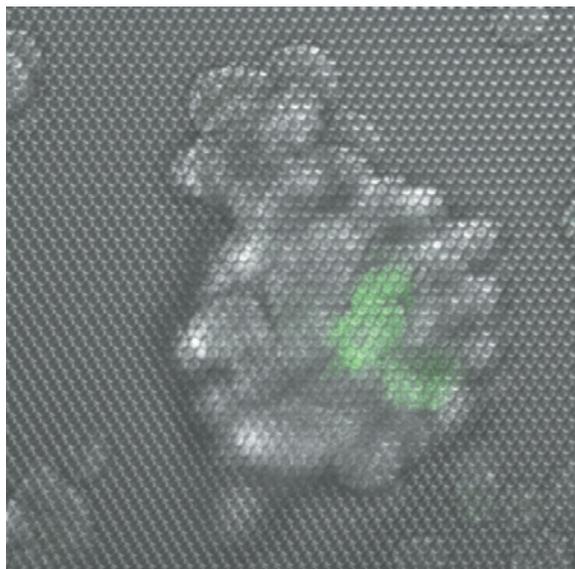


図11 共焦点レーザー顕微鏡による3次元プレート培養PANC-1細胞の検討
微分干渉像により立体的に増殖するコロニーに形態が観察され、遺伝子導入によりPANC-1細胞で発現するGFPがコロニーの中心部に認められる。網目状の模様は培養プレート上の隆起。倍率：×1,000

ことで安定的にスフェロイドを形成可能なプレート(NanoCulture®Plate, SCIVAX社)が開発された。このプレートの使用により、薬剤の感受性や細胞増殖因子の効果などについて同じ細胞でも平面的に培養された場合と3次元培養のスフェロイドでは異なるとの報告などもみられ、3次元培養の重要性が広く認識されてきている。膵臓癌細胞のPANC-1を培養すると、2次元培養と比較して隆起した多数の癌細胞塊(コロニー)が形成されてくる(図10)。染色体にGreen fluorescent Protein (GFP) 発現遺伝子を組み込み、GFPが安定的に細胞内に発現する無染色のPANC-1細胞を、マルチモード顕微鏡で観察した。隆起したコロニーの中央部の癌細胞ではGFPが多く発現し、増殖が盛んな周囲の癌細胞ではGFPの産生が少ないことが確認された(図11)。これらの細胞について、さらに蛍光染色を行うことでさらに多くの情報が得られる。図12は細胞核を青色、細胞内骨格のアクチンを赤色、細胞増殖因子受容体のfibroblast growth factor receptor (FGFR)-2を緑色で表した像で、コロニーの部位によりFGFR-2とアクチンの局在が異なっていることがわかる。

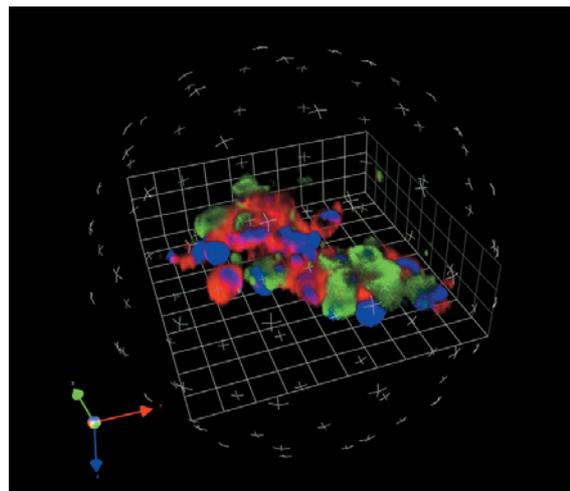


図12 3次元プレートで培養されたPANC-1細胞の立体画像
PANC-1のコロニーの表面ではFGFR2が豊富な部分(緑色)、アクチンが豊富な部分(赤色)、核が露出している部分(青色)がみられている。倍率：×1,000

まとめ

現在、広く組織細胞の形態、機能解析に用いられている倒立型共焦点レーザー顕微鏡と、多くの異なった機能解析法が可能なマルチモード顕微鏡について、原理と膵臓癌を具体的な解析例として示した。今後、このような研究を行う若手研究者の参考になることを期待している。

文献

1. Ishiwata T: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of lumican in colorectal carcinoma. In Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas. Volume 2, Molecular Pathology, colorectal carcinoma and prostate carcinoma. (Hayat MA, ed), 2005; pp 237-243, Elsevier Academic Press.
2. Shinji S, Naito Z, Ishiwata T, Matsuda Y, Seya T, Tajiri T: Poorly differentiated colorectal adenocarcinoma : Histology and immunohistochemistry (Methodology). In Methods of cancer diagnosis, therapy, and prognosis. (Hayat MA, ed), Volume 1. Springer (in press).
3. 高田邦昭, 斉藤尚亮, 川上速人編：染色・バイオイメージング実験ハンドブック。2006, 羊土社。
4. 稲澤謙治, 津田均, 小島清嗣監修：顕微鏡フル活用術イラストレイテッド, 2007, 秀潤社。

(受付：2009年4月6日)

(受理：2009年4月16日)