

令和元年6月13日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21441

研究課題名（和文）多点同時多変量ラマンスペクトル分解による細胞識別法の開発

研究課題名（英文）Development of cell discrimination method by using Raman spectroscopy and multivariate curve resolution

研究代表者

安藤 正浩（ANDO, MASAHIRO）

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・その他（招聘研究員）

研究者番号：50620803

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：顕微ラマン分光法によって、非破壊・非染色の分子分析が可能となる。細胞の種類や状態の違いを、ラマンスペクトルを通じて、分子マーカーを特定しながら識別する新規技術の開発を行った。細胞内部構造を反映した多点測定ラマンスペクトルをデータセットとして、多変量スペクトル分解を施すことで、細胞識別に寄与する分子スペクトルを抽出することが可能となった。ここで得られるスペクトルは、候補となる分子マーカーのスペクトルと比較することで、その分子構造情報まで考察できるところに特徴がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命現象の理解において、細胞を分子レベルで統合的に解析することは大変重要な課題である。蛍光顕微鏡に代表されるような、分子生物学や生化学に基づいた手法は、各種分子の高選択、高感度検出が可能であり、極めて高精度なレベルに達している。一方で、細胞内の構成分子を統合的に、非破壊・無染色で解析することは、幹細胞の分化制御や、医学臨床における細胞識別・状態解析など、幅広い応用研究において、今後必要性が増すものと考えられる。本研究では、ラマン分光法と多変量解析の手法を用いることで、分子科学的知見と共に、無染色で細胞を識別する新規技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：Raman microspectroscopy enables non-destructive and label-free molecular analysis of living cells. We have developed a new technique for discriminating cell types and different conditions through identifying molecular marker by using Raman spectroscopy. By applying multivariate spectral decomposition with multi-point measured Raman spectra that reflects the cellular internal structure, it has become possible to extract several molecular spectra that contributes to cell discrimination. It is characterized in that even the information on molecular structures can be considered by comparison with the authentic spectra of molecular markers.

研究分野：分子分光学

キーワード：ラマン分光法 細胞 多変量解析 分子解析 非破壊分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命現象の理解において、細胞を分子レベルで統合的に解析することは大変重要な課題である。蛍光顕微鏡に代表されるような、分子生物学や生化学に基づいた既存の手法は、各種分子の高選択、高感度検出が可能であり、極めて高精度なレベルに達している。一方で、細胞内の主要な構成分子を統合的に解析することは、幹細胞の分化制御や、医学臨床における細胞識別・状態解析など、幅広い応用研究において、今後必要性が増すものと考えられる。特に、個々の細胞において、非染色・非侵襲的に分子レベル解析が可能な手法として、顕微ラマン分光法が挙げられる。

ラベル標識を伴わず、非侵襲測定が可能な顕微ラマン分光法は、基礎生物学の分野にとどまらず、臨床医用分野等においても応用可能であり、細胞識別や、分子レベルでの状態解析に有用な手法となることが予想される。しかし、そのような応用を考えた場合、現段階ではまだ幾つかの問題点を抱えている。主要な問題として、解析手法における困難さが挙げられる。細胞のラマンスペクトルでは、細胞内構造や多様な構成分子成分を反映し、非常に複雑なスペクトル形状を示す。従って、一般的に用いられるような、各ラマンバンドの強度やピーク位置に着目した解析では、構成分子成分の情報を十分に引き出すことは困難である。個々の空間分解スペクトルには多数の分子に関する情報が含まれていることを考慮すると、多変量解析を用いた系統的な解析法が必要である。これまで、特異値分解(SVD)や主成分分析(PCA)などの手法により、スペクトル・位置の相関を通じたスペクトル分離が行われてきた。しかし、これらは数学的に明解な手法ではあるが、その物理的な解釈には困難が伴い、構成分子そのもののラマンスペクトルとして情報を引き出すことは容易ではない。近年では PCA やクラスター分析を用いて、細胞の識別や、病理切片を用いた臨床診断等におけるラマン分光の応用研究が報告されている (J.W. Chan, et al., *Anal. Chem.* **80**, 2180, 2008; C. Kendall, et al., *Analyst*, **134**, 1029, 2009)。これらは細胞 1 個体平均、或いは組織レベルの測定を通じた解析であり、細胞内部構造まで反映した識別手法はとられていない。また、個々のスペクトルを個別に扱い、各スペクトルの類似性から識別判定が行われている。細胞内構造は複雑であり、そこに含まれる多様性を考慮に入れて多変量解析を行うことで初めて、より精度・確度の高い細胞識別が可能となるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、物理化学的に解釈可能なスペクトル分解の手法として、多変量スペクトル分解 (multivariate curve resolution; MCR) の開発・応用を通じ、細胞識別の新たな手法を構築することを目的としている。MCR では、構成分子成分に関する予備知識なしにスペクトル分解が可能であり、また、非負拘束条件の適用により、分解スペクトルから直接、分子構造情報に基づいた物理的解釈につなげることが可能となる。本研究では、研究代表者が研究を進めてきたラマン分光イメージングでの多変量スペクトル分解の有用性を発展させ、細胞識別への適用が可能なる解析手法を構築する。細胞内部を空間分解し、多数のスペクトルを測定し、それをデータセットとして多変量解析を施すことで、細胞内部構造の多様性を細胞判別に取り込むことができ、それによって初めて、高速で高精度の細胞識別・状態解析が可能となると期待される。

3. 研究の方法

(1) 一細胞から得られるスペクトルデータセットの多変量解析

生細胞の空間分解ラマン測定で得られるスペクトルを一つのデータセットとして扱い、非負値拘束、ノルム制約を課した多変量スペクトル分解を行うことで、細胞内部構造を反映した、それぞれのオルガネラや分子群が有する、特徴スペクトルを抽出する解析プログラムを構築する。

(2) 複数の細胞群を分離識別するのに特徴的なスペクトル成分の抽出

(1)で得られる抽出スペクトルセットを基盤にして、種類の異なる細胞群を分離識別するために特徴的なスペクトルの抽出および、細胞識別のためのそれらスペクトル成分の寄与量を見積もるプログラムを構築する。スペクトル解析の基盤としては MCR を用い、その初期推測データに(1)のスペクトルを用いることで、分子認識可能な形で、細胞識別に寄与するスペクトル成分の半定量解析を行う。

(3) 細胞・組織切片サンプルへの応用

上記(1),(2)で開発した細胞識別の手法を、癌細胞や癌組織の識別、異なる条件下における細胞構成成分の変化追跡(脂質やタンパク質、多糖類など)に応用する。

4. 研究成果

(1) 一細胞から得られるスペクトルデータセットの多変量解析

一細胞由来の空間分解ラマンスペクトルセットの中から、物理的に解釈が可能なスペクトル成分のセットへとスペクトル分解ができるような多変量解析の手法を、非負値行列分解、細胞内部での分子成分の局在性を考慮したL1 ノルム正則化項などを基盤にしたMCR解析アルゴリズムの構築により、実現した。これにより、局在性を一にする分子成分由来のスペクトル抽出が可能となり、その分解スペクトルのピーク位置の解析から、分子同定にまでつなげることが可能となった。これにより、核酸、脂質、タンパク質、酵素、糖質、色素などの分子成分の内部構造情報を同時に取得できるようになった。本手法は、既知の分子成分を予め含めることなく、分子同定に繋がるスペクトル分解が可能であることが特徴である。

(2) 複数の細胞群を分離識別するのに特徴的なスペクトル成分の抽出

上記項目(1)では、既知の分子成分情報を含めず、ランダムな初期値や、実測データの特異値分解解析(SVD)から推察した初期値を用いることで、細胞内から得られる分子スペクトルの抽出を試みた。本項目では、それらの結果を踏まえ、対象とする細胞群を区別するために特徴的なマーカースペクトルの抽出を実現することを目的としている。主に2つの方法により、細胞群の識別に有用な手法を構築した。

第一の方法は、個々の一細胞解析で得られる特徴的なスペクトル成分を、多数の細胞群のMCR解析の際、初期値に含める方法である。これを予め固定成分として解析に含め、他の未知成分もランダムやSVD初期値を起点として同時に最適解を求める手法を構築した。これにより、多数の細胞群全体のスペクトルに対し、最小二乗最適化された分解スペクトルが得られる一方、その中の複数成分は事前に個々の細胞で得られている特徴的なスペクトルを含む解となる。

第二の手法は、MCRを通じて分解されたスペクトルの中に、細胞群を識別するマーカー分子として知られる標準物質由来のスペクトルに一致する成分が含まれるか、数値的に判定する手法である。この手法により、スペクトルを通じて群間の識別が可能となるのに加え、生理化学的な理解に直結する形で、識別が可能となる。本手法は予め標準スペクトルが正しい形で得られていることが前提となるが、客観的な基準を持つ有効な識別法となる者と考えられる。

(3) 細胞・組織切片サンプルへの応用

上記項目(1)および(2)で構築した手法を用い、様々な細胞、組織の識別・状態解析に応用した。一つの例として、癌や炎症の診断に繋がる解析を、細胞、組織切片の分析に応用した(発表論文3,4)。これまでのラマン解析では、PCAや機械学習などにより、診断に繋がる識別は可能であったが、その区別に寄与している分子マーカーを明確に特定することは困難であった。本研究では、上記MCR手法を利用することにより、口腔癌識別におけるスペクトルマーカーとしてケラチン成分を、好酸球識別におけるマーカーとしてペルオキシダーゼを、それぞれ指標として、高確度でMCRにより識別できることを発表した。

その他にも、細胞の状態により内部の分子成分がどのように変化するのかの研究へも応用が広がった。核酸、脂質、タンパク質、酵素、糖質、といった一般的な分子情報と共に、多糖類(発表論文1)や脂質成分(発表論文2)などの特定の分子がどのような特徴的分子構造を示すのかを同時に解析し、細胞の状態による識別に繋がる研究が可能であることを示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

1. H. Noothalapati, T. Sasaki, T. Kaino, M. Kawamukai, M. Ando, H. Hamaguchi & T. Yamamoto. "Label-free Chemical Imaging of Fungal Spore Walls by Raman Microscopy and Multivariate Curve Resolution Analysis." *Sci. Rep.* **6**, 27789 (2016).
2. M. Motoyama, M. Ando, K. Sasaki, I. Nakajima, K. Chikuni, K. Aikawa & H.-O. Hamaguchi. "Simultaneous imaging of fat crystallinity and crystal polymorphic types by Raman microspectroscopy." *Food Chem.* **196**, 411–7 (2016).
3. H. Noothalapati, S. Uemura, N. Ohshima, Y. Kinoshita, M. Ando, H. Hamaguchi & T. Yamamoto. "Towards the development of a non-biopic diagnostic technique for eosinophilic esophagitis using Raman spectroscopy." *Vib. Spectrosc.* **85**, 7–10 (2016).

4. P.-H. Chen, R. Shimada, S. Yabumoto, H. Okajima, M. Ando, C.-T. Chang, L.-T. Lee, Y.-K. Wong, A. Chiou & H.-O. Hamaguchi. "Automatic and objective oral cancer diagnosis by Raman spectroscopic detection of keratin with multivariate curve resolution analysis." *Sci. Rep.* **6**, 20097 (2016).

5. H. Noothalapati, K. Iwasaki, C. Yoshimoto, K. Yoshikiyo, T. Nishikawa, M. Ando, H. Hamaguchi & T. Yamamoto. "Imaging phospholipid conformational disorder and packing in giant multilamellar liposome by confocal Raman microspectroscopy." *Spectrochim. Acta PART A-MOLECULAR Biomol. Spectrosc.* **187**, 186–190 (2017).

6. H. Noothalapati, R. Ikarashi, K. Iwasaki, T. Nishida, T. Kaino, K. Yoshikiyo, K. Terao, D. Nakata, N. Ikuta, M. Ando, H. Hamaguchi, M. Kawamukai & T. Yamamoto. "Studying anti-oxidative properties of inclusion complexes of α -lipoic acid with γ -cyclodextrin in single living fission yeast by confocal Raman microspectroscopy." *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **197**, 237–243 (2018).

〔学会発表〕(計 6件)

1. 安藤正浩、浜口宏夫、新しいケモメトリクス法「仮想添加多変量微分スペクトル解析」による複雑系のラマンスペクトルの定量解析、分子科学討論会、2015
2. M. Ando, S. Yabumoto, H. Hamaguchi, Quantitative spectrometry of complex mixture systems by hypothetical addition multivariate analysis, Asian Spectroscopy Conference, 2015
3. M. Ando, H. Hamaguchi, Lipid composition analysis of cells and tissues by Raman spectroscopy coupled with multivariate curve resolution analysis, Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, 2016
4. 安藤正浩、浜口宏夫、多変量スペクトル分解による脂質・タンパク質解析、医用分光学研究会、2017
5. 安藤正浩、ラマン分光多変量解析による生細胞の分子イメージング、レーザー学会学術講演会、2019
6. Masahiro Ando, Label-free molecular distribution imaging of single-cells by Raman hyperspectral analysis, International workshop on approaches to single cell analysis, 2019

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。