

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14827

研究課題名（和文）ラマン分光法とDNB解析を組み合わせた細胞遷移状態分岐点解析技術開発

研究課題名（英文）Detection of transition state in living cells using Raman Spectroscopy and Dynamical Network Biomarker Theory

研究代表者

竹谷 皓規（Taketani, Akinori）

富山大学・学術研究部教育研究推進系・特命助教

研究者番号：50825312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：当初目標としていた、ラマン分光法とDynamical Network Biomarker(DNB)理論による揺らぎ解析の組み合わせ技術を用いることで、炎症刺激を与えたマウスマクロファージ細胞が特定の時点で揺らいでいることを確認した。細胞が揺らいだ時点が正しいか複数回による再現性確認実験による検証を行い、細胞遷移状態の時点特定することに成功した。本成果を複数の学会で発表を行い、現在は細胞遷移状態において炎症刺激を与えた細胞にどのような変化が生じているのかを従来解析法を用い明らかにし、論文化を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dynamical Network Biomarker(DNB)理論は様々な状態が移行する際の予兆を揺らぎとして検出できることが分かっており、生命現象においても適応が期待されていた。本研究はDNB理論とラマン分光法と組み合わせることで、実際の生命現象において揺らぎを観測し遷移点を特定できた、DNB理論を実用化できた例となる。検出された炎症細胞の遷移点はこれまでの炎症の研究で着目されていない時点であり、DNB理論とラマン分光法の組み合わせは、知られていた生命現象に対し新たな知見を与える技術であると言える。

研究成果の概要（英文）：We confirmed the tipping point of inflammation model cells using the combination of Raman spectroscopy and Dynamical Network Biomarker (DNB) theory. We checked the correctness of the tipping point from stimulation of inflammation in the cells fluctuation by performing multiple reproducibility experiments. We succeeded in identifying the time point of the cellular transition state. We presented these results at several academic conferences. Currently, we are working to clarify what kind of changes occur in the tipping point of inflammation cells using conventional analysis methods to publish a paper on this study.

研究分野：生体機能光学解析/生物分析化学

キーワード：ラマン分光法 DNB解析 炎症細胞モデル 遷移点解明

1. 研究開始当初の背景

(1) 分化や炎症などで細胞や組織の状態が変化するとき、細胞や組織は正常か異常かなど変化前と変化後という二元論の説明がなされているが、実際はこれらの状態の変化は連続的で不規則な状態にあり、変化前後どちらにも属さない中間状態がある。中間状態は不安定で大きく分散し、この分散が「ゆらぎ」として観測される。細胞の遷移状態を調べるためには、非侵襲的に連続計測可能なラマン分光法と、不安定な中間状態をゆらぎから検出することができる DNB 理論を組み合わせて用いることを考案した。

(2) ラマン分光法はサンプルに光を照射した際に波長が変化したラマン散乱光を観測することで、サンプルの組成や構造の情報を得ることができる技術である。ラマン分光法はサンプルの固定や染色などの標識を行わず低侵襲で計測ができることから、生きたままサンプルの連続的な計測が可能な技術であり、多変量解析によるデータの単純化を行うことで、疾病検査など生体応用に期待がされてきた。ラマン分光法により、生体の変化の追跡を非侵襲的に追うことが可能であることが示唆されてきたが、実際の生体変化は非線形的であり、変化前にも変化後にも分類されない不安定な中間状態のデータに対し、これらがどのような状態を反映しているのかを多変量解析のみでは説明することが難しい問題が生じた。生体変化において、多変量解析とは別の中間状態を解釈する手法が必要となってくる。

(3) DNB 理論は、数学の一領域である力学系理論をもとに、従来の正常と異常を判別するバイオマーカーではなく、動的なバイオマーカーを観測することで、数値が大きく分散している状態、いわゆる「ゆらぎ」の状態を数値的に解析することができる理論であり、2012 年に東京大学の合原一幸教授らが作り上げた(Luonan Chen et al., Sci. Rep., 2, 342 (2012))。DNB 理論を用いた解析は、この相関を持ちつつ広く散乱するゆらぎを持った中間状態を、数理的技術によって数値的に扱うことができる解析法である。ゆらぎの状態は、ラマン分光法で避けてきた中間の状態であり、ラマン分光法にゆらぎの解析ができる DNB 理論を導入することで、これまで解釈が困難であった中間状態のデータ群に対し新たな意味を与え、非線形的な生体反応を解釈可能な技術になることが期待される。ラマン分光法の非侵襲かつ連続で情報を取得できる利点を生かしつつ、ラマンスペクトルの膨大なデータに対し DNB 理論を用いることで状態遷移中の中間状態解明を行い、生体の変化を追跡できることを証明できれば、生体の変化追跡に新たな技術として確立できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、未病状態のモデルとして細胞の炎症を用い、炎症が発生した時間をラマン分光法と DNB 解析を用いて明らかにし、その未病状態において生じている遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法などにより網羅的に解析し補完することで、ラマン分光法と DNB 解析の評価を行うことを目的としている。

(2) 細胞炎症モデルを解析し未病状態を突き止めることで、ラマン分光法と DNB 解析の組み合わせは、未病状態など静的バイオマーカーが存在しない不安定な状態を解明することができる新たな技術であることを証明する。

3. 研究の方法

(1) RAW264.7 細胞に LPS を投与してから 4 時間ごとに 48 時間連続でラマン計測を行い、得られたラマンスペクトルに対し DNB 解析を用いることで、ゆらぎが生じた時間を特定する。ゆらぎが生じた時間に対しマイクロアレイ法によって、細胞に発現した DNA を調べ、変化したラマンスペクトルの領域と遺伝子変化が対応するか調査する。以上のことを行い、DNB 解析とラマン分光法の組み合わせ技術の評価する。これらが達成され次第、他の細胞種に対しても同様の実験を行い本技術のさらなる有用性を検証していく。最終的には DNB 解析とラマン分光法の組み合わせ技術が未病解明に有用なツールであることを証明し、実際の疾患と未病状態の解明への応用を目指す。

4. 研究成果

(1) RAW264.7 (1×10^5 cell/ml) を 3 cm 石英ガラスディッシュに播種し、24 時間培養した。LPS 刺激前の正常状態細胞を測定し、これをコントロール群としコントロール群の測定開始から 1 時間後に LPS (最終濃度: 100 ng/ml) で炎症誘導刺激を与えた。その後、LPS 刺激から 4 時間おきに 48 時間まで、ラマンスペクトルの測定を行った。ラマン計測時間は 30 秒 2 回積算で行い、各時間の計測で 10 細胞をランダムに選び、核に焦点を当ててラマンスペクトルを取得した。得られたラマンスペクトルから DNB 解析を行い、中央絶対偏差、相関強度を求め、両者を掛け

合わせた DNB スコアを算出し、揺らぐ時点の探索を行った。図 1 がその結果であり、上から DNB スコア、中央絶対偏差、相関強度である。DNB スコアがピークを示す時点が、揺らぎが大きくなっているとされている。図 1 の DNB スコアを確認すると、12 時間時点で大きなピークを形成しており、最も大きく揺らいでいることを確認した。炎症反応開始から 12 時間ごろに細胞の遷移点があることが本実験から示された。

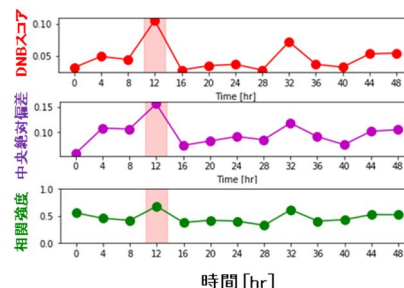


図 1:炎症刺激 48 時間 DNB 解析

(2)本結果から、揺らぐ時点は 24 時間より前にあると仮定した。マイクロアレイなど詳細な解析を行うにはより細かく時点を決める必要があった。揺らぐ時点をより詳細に解析するために、同様の実験を 0~24 時間で 2 時間ごとに測定することで確認を行った。その結果を図 2 に示す。上から DNB スコア、中央絶対偏差、相関強度である。DNB スコアは 18 時間時点でピークを形成しており、18 時間時点で細胞が揺らいでいることを確認した。18 時間時点の揺らぎは 48 時間計測では確認されていなかったが、測定時間を細分化したことで埋もれていた揺らぎを検出したと推察される。加えて、12 時間時点の揺らぎが消失したことに関しては、時間の区分を 48 時間から短くしたことで、短期のより揺らぐ時間を観測したからだと推測される。

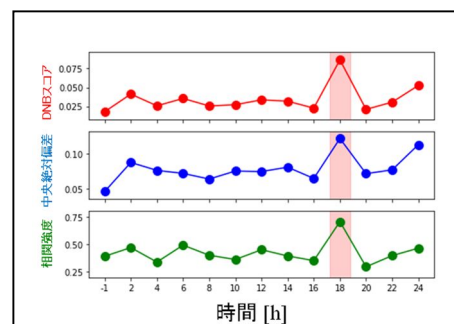


図 2:炎症刺激 24 時間 DNB 解析

(3)図 2 の結果に対し、図 1 とは異なる結果が得られたことを鑑みて、測定誤差による影響を懸念し複数回再現性の確認を行ったが、5 回の実験で同様の結果が得られたことから、炎症刺激後 18 時間時点が揺らいでおり、ここが炎症刺激の遷移点であると推定された。

(4)測定による細胞への影響を考慮し、同一のディッシュで計測を行う実験と、各時間違うディッシュを用意し計測した実験の 2 つを行い検証したが、双方 18 時間時点で揺らいでいることを確認した。

(5)(4)において各時間測定の後、細胞の培養液と細胞の RNA を回収を行い、ELISA による炎症刺激マーカーの TNF- α と IL-6 の定量解析を行った。18 時間時点でわずかに TNF- α と IL-6 の発現量が減少していた。マクロファージ細胞に LPS 炎症刺激を加えるとマクロファージ細胞は M1 分極化されることが知られており、揺らいだ時点で分極化の際に何かしらの炎症反応変化が生じていることが考えられる。本結果に対し有意差検証を行うため現在はサンプル数を増やし、同様の実験で検証を行っている。加えて、得られた RNA から次世代シーケンサーを行い、18 時間前後のマクロファージ細胞の変化の追跡を行い、これらの結果が集まり次第論文化を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Akinori Taketani
2 . 発表標題 Detection of transition state in living cells using Raman Spectroscopy and Dynamical Network Biomarker Theory
3 . 学会等名 APLS2023（国際学会）
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 竹谷 皓規
2 . 発表標題 ラマン分光法とDNB解析を用いた生細胞分岐点探索
3 . 学会等名 レーザー学会第44回年次大会
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 竹谷 皓規，山崎 萌絵，田原 旬，小泉 桂一，山本 武，大嶋 佑介，春木 孝之，和田 暁法，佐藤 勉
2 . 発表標題 ラマン分光法とDNB解析による細胞遷移状態における分岐点解明技術開発
3 . 学会等名 レーザー学会研究会第566回研究会 光・レーザーの医学・医療応用
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 竹谷 皓規，山崎 萌絵，田原 旬，小泉 桂一，山本 武，大嶋 佑介，春木 孝之，和田 暁法，佐藤 勉
2 . 発表標題 ラマン分光法とDNB解析の組み合わせによる炎症反応における細胞遷移状態の解明
3 . 学会等名 レーザー学会第43回年次大会
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------