

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560200

研究課題名(和文) iPS細胞の多能性を可視化する新しい分子イメージング法の開拓

研究課題名(英文) Development of novel molecular imaging method for visualizing pluripotency of iPS cells

研究代表者

加納 英明 (KANO, Hideaki)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：70334240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在、iPS細胞を再生医療へ応用する研究が盛んに進められている。しかしながら、十分な多能性の有る良質なiPS細胞を選別する方法が未だに確立されていない。そこで本研究では、非線形ラマン(CARS)分光イメージング法を用いて、多能性を有する良質なiPS細胞を識別する方法の開発を試みた。特に本研究では、iPS細胞の培養日数依存性を調べた。4つの因子導入後5日目と7日目の細胞の比較を行ったところ、細胞核内のスペクトルにおいて複数のバンドの違いが見られた。これらは、リプログラミング過程に依存して変化するラマンバンドである可能性が考えられるため、今後更に詳細な研究を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells (iPS cells) have potential to differentiate wide variety of tissues and organs. Recently, various kinds of studies have been carried out in order to apply iPS cells to tissue engineering and regenerative medicine. However, it is still difficult to find pluripotency of living iPS cells without staining or molecular tagging. In the present study, we have performed molecular vibrational imaging of iPS cells using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy to explore the spectroscopic signatures of pluripotency. We used home-built multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microspectroscopic system. As samples, we used different two kinds of iPS cell colony; 5- and 7-days ones after introducing four factor for the reprogramming process. The intranuclear CARS spectral profiles in 5- and 7-days shows spectroscopic difference in two bands around 1560 and 790 cm^{-1} . These might be useful to marker bands for pluripotency.

研究分野：分子分光学・分子分光イメージング

キーワード：ラマン CARS iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、iPS 細胞を再生医療へと応用する研究が盛んに進められているが、重要な問題点が未解決のまま残されている。十分な多能性を有する良質な iPS 細胞を識別する方法が、未だ確立されていないのである。多能性が不十分な iPS 細胞を分化誘導すると、未分化細胞が混入するため、再生医療において腫瘍を形成するリスクがある。安全で信頼できる再生医療を実現させるためには、良質な iPS 細胞を非染色・非標識・非破壊・非侵襲にて識別・スクリーニングする方法を確立することが、一刻も早く望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、非線形ラマン分光法を基盤とした非染色・非標識・非破壊・低侵襲分子イメージング法を用いて、多能性を保った良質な iPS 細胞を選択的に識別し、かつスクリーニングする方法論の開拓を行った。

3. 研究の方法

本研究では、申請者が世界に先駆けて開発した Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 分光イメージングの手法をより高度化することで、多能性を有する良質な iPS 細胞を非染色にて識別する新しい方法論の開拓を行った。分子の指紋であるラマンスペクトルを丹念に“読む”ことは、細胞内分子の構造・機能・相互作用を“観る”ことにつながる。iPS 細胞は、リプログラミングの過程で動的にその形態を変化させるため、その時間軸の情報も効果的に活用することで、時空間的に多能性の可視化を試みた。さらに、CARSに加えて、第二高調波、第三高調波、三次和周波など、様々な非線形光学過程も有効に活用することで、iPS 細胞における多能性についてユニークな可視化の創出を目指した。

4. 研究成果

本実験ではまず、通常の iPS 細胞 (Nanog(+)) 細胞) と、多能性の無い細胞 (Nanog(-)) 細胞) の 2 種類を測定した。多能性のある iPS 細胞では緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein ; GFP) が発現しているため、細胞を測定する際には、GFP の一光子励起蛍光イメージングによって、多能性が十分にあることを確認しながら測定を行った。この 2 種類の細胞では、4 つの因子を導入するベクターが異なっている。多能性の無い細胞では、転写因子 Klf4 の導入量が、多能性のある iPS 細胞と比べて少ない。これにより、細胞の見た目や増殖能は通常の iPS 細胞と変わらないが、多能性のみが失われた細胞及び細胞コロニーを作り出すことができる。このような 2 種類の細胞を共同研究者 (西村博士) から提供頂き、測定を行った。測定は、培養開始から 2 日後の細胞を、室温かつコントロール無しで行った。iPS 細胞

はコロニーを形成するという特徴があり、同一コロニー内にも多能性の有る細胞と無い細胞が混在している可能性があることがわかっている。そこで共同研究者により、細胞コロニーと、コロニーをばらして単一細胞にした状態で培養したものの 2 種類をご用意頂き、どちらも同一条件で測定した。iPS 細胞を培養する際は、フィーダー細胞と呼ばれる、iPS 細胞の下敷きとなる細胞と一緒に培養を行うが、本研究で用いた iPS 細胞は、共同研究者の技術によりフィーダーレスで培養されている。通常の iPS 細胞 (Nanog(+)) 細胞) と多能性の無い細胞 (Nanog(-)) 細胞) を CARS 顕微鏡にマウントしたところ、光学像の見た目では違いが判別できないが、iPS 細胞では GFP による蛍光が確認できたため、GFP の蛍光を確認しながら測定を行うことができた。2 種類の細胞の CARS 分光イメージを見ると、細胞核内の核小体がコントラスト良く可視化されることがわかった。2 種類の細胞は発現している遺伝子の量が異なるため、DNA/RNA の構造や分布が異なるのではないかと考え、タンパク質や DNA/RNA に存在する核酸塩基などの分子構造由来のバンドでイメージを再構成し、様々なバンドで検討を行ったが、2 種類の細胞で大きくは異ならなかった。

そこで次に、iPS 細胞の培養日数依存性を調べた。本実験では、マウス線維芽細胞に、4 つの因子を導入することで細胞が初期化 (リプログラミング) されていく際に、細胞内で生じている変化を CARS で追跡するために、因子導入後 5 日目と 7 日目の細胞を共同研究者からご提供頂き、比較を行った。因子導入後 5 日目の細胞は、動物細胞のような形状をしているが、7 日目の細胞は、コロニーを形成し、また細胞 1 つの形状も丸くなっており、iPS 細胞の特徴が表れていた。本実験では、2 mL の培地の入ったガラスボトムディッシュに培養した細胞を用いたため、上側対物レンズは water dipping のものを用いて測定した。これにより、通常の細胞の形状をできるだけ反映したイメージングを行うことができた。

iPS 細胞の測定と平行に、最終年度には、研究室のマルチプレックス CARS 顕微鏡のスペックアップを行った。具体的には、光源をより高ピーク強度のものにすることで、信号強度の大幅な増強を実現した。新規光源は、cw Q スイッチ発振マイクロチップ Nd:YAG レーザーをマスターオシレーターに持ち、それを光増幅器により出力増強した、MOPA (master oscillator & powered amplifier) と呼ばれる形式のものである。主なスペックとしては、繰り返し周波数 0.82MHz、パルス幅約 85ps である。これまでの光源同様、このレーザーからの出力を 2 つに分け、一方をポンプ光、もう一方は PCF を通すことで広帯域な波長幅を持つスーパーコンティニューム光とした。新規光源を用い

たセットアップでは、非軸放物面鏡 (Protected Silver Reflective Collimator, 450 nm-20 μm, 4 mm, FC/APC) にスーパーコンティニューム光を導入し、コリメートすることでストークス光 (σ_2) として用いた。PCF からの光出射のコリメート法を対物レンズから非軸放物面鏡へ変更した理由は、スーパーコンティニューム光の一部を対物レンズが吸収しており、それが CARS シグナルへ悪影響を及ぼしていると考えたためである。対物レンズでコリメートを行うことで、長波長側の波長成分が特に減少していたが、放物面鏡を用いることで、広帯域の波長成分において一様な強度でのコリメートを実現した。これに加え、色収差も抑えることができたため、スーパーコンティニューム光のすべての波長成分を効率よく集光することができるようになった。また、オシロスコープを用いて新規光源のポンプ光、ストークス光のパルス間の時間差を測定したところ、既存の系違っていたため、両者の光路長を補正する光学系を開発した。パワーメーターを用いて測定した平均パワーから算出したパルスエネルギーとピーク出力を、既存の光源と新規光源で比較・検討した。パルスエネルギーは、これまでの光源の方がポンプ光、ストークス光共に高いが、新規光源のパルス幅は既存の光源の 1/10 程度であるため、ピーク出力は新規光源の方が数倍高くなっていることが分かった。一方で、新規光源の繰り返し周波数は従来光源に比べて 25 倍程度高いため、新規光源を用いることで、非線形光学過程の発生効率を下げることなく、高速での測定が見込めることが予想された。実際、新規光源を用いることで、高効率 CARS 発生を実現した。モデル細胞株である HeLa 細胞にて測定を行ったところ、M 期において、染色体や紡錘糸等を CARS や第二高調波発生 (second harmonic generation) などの非線形光学効果で非染色マルチカラー可視化することも出来た。

励起光源の最適化など様々な検討を行った上で、因子導入後 5 日目と 7 日目の細胞の再測定を行い、両者の比較を行った。その結果、細胞核内の平均スペクトルにおいて、1560 cm^{-1} (アデニン、グアニンに存在するプリン環由来) のバンドと 790 cm^{-1} (シトシンとチミンに存在するピリミジン環由来) のバンドに違いが見られた。これらは、リプログラミングに依存して変化するラマンバンドである可能性がある。今後、同じ細胞、細胞コロニーにターゲットを絞ることで、リプログラミング過程の詳細な追跡を行い、本研究で見出したラマンバンドが多能性のマーカーバンドとなり得るかどうかが検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 8 件)

1. 米山 弘亮, 瀬川 尋貴, 西村 健, 福田 綾, 久武 幸司, 加納 英明, “iPS 細胞の多能性評価に向けた非線形分光イメージング”, 第 62 回応用物理学会春季学術講演会, 2016 年 3 月 11 ~ 14 日, 東京工業大学(東京都目黒区)
2. (招待講演) 加納英明, 秋山敏宏, “生体組織の非線形ラマン分光イメージング”, 医用光学・分光学会合同研究会 (*Medical Optics & Spectroscopy 2015*), 2015 年 12 月 3 日, ホテルグランドヒル市ヶ谷(東京都新宿区)
3. (招待講演) 加納英明, 秋山敏宏, “生細胞・生体組織を染めずに見る ~ コヒーレント・ラマン分光によるラベルフリーイメージング ~”, 第 36 回日本レーザー医学総会, 2015 年 10 月 24 日, 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
4. 米山 弘亮, 瀬川 尋貴, 西村 健, 福田 綾, 久武 幸司, 加納 英明, “非線形マルチモーダル顕微鏡を用いた iPS 細胞のリプログラミング過程の in vivo 追跡”, 第 9 回分子科学討論会, 2015 年 9 月 16 ~ 19 日, 東京工業大学(東京都目黒区)
5. Hiroaki Yoneyama, Hiroki Segawa, Ken Nishimura, Aya Fukuda, Koji Hisatake, and Hideaki Kano, “CARS Molecular Fingerprinting of iPS Cells-Toward Visualizing Pluripotency”, ICAVS-8, 12th ~ 17th, Jul. 2015, Vienna University of Technology (Vienna, Austria)
6. Hiroaki Yoneyama, Hiroki Segawa, Ken Nishimura, Aya Fukuda, Koji Hisatake, and Hideaki Kano, “Nonlinear Multimodal spectral Imaging of Living Cells”, The Third Taiwan International symposium on Raman Spectroscopy & TARS Summer School, 30th, Jun. ~ 3rd, Jul. 2015, Sun Moon Lake (Nantou, Taiwan)
7. 米山 弘亮, 瀬川 尋貴, 西村 健, 福田 綾, 久武 幸司, 加納 英明, “CARS 分光イメージング法による iPS 細胞の非染色・非標識イメージング”, 第 8 回分子科学討論会, 2014 年 9 月 24 日, 広島大学

(広島県東広島市)

8. 米山 弘亮, 瀬川 尋貴, 西村 健, 福田 綾, 久武 幸司, 加納 英明,
“ iPS 細胞の多能性可視化に向けた C A R S 分光イメージング法の開発 ”, 分光学会年次講演会, 2014年5月26日, 理化学研究所 (埼玉県和光市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bk.tsukuba.ac.jp/~CARS/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 英明 (KANO, Hideaki)
筑波大学・数理物質系・准教授
研究者番号：70334240

(2) 研究分担者

西村 健 (NISHMURA, Ken)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：80500610