

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03821

研究課題名(和文) 多細胞同時インテリジェント長期追跡を可能とするバイオ・ラマン顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of a Bio-Raman Microscope to Enable Long Term Monitoring of Single Cells

研究代表者

盛田 伸一 (Shin-ichi, Morita)

東北大学・理学研究科・准教授

研究者番号：40462741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在、生細胞の局所のラマンスペクトルを計測できるようになっている。生細胞に光を当てラマン散乱スペクトルを計測できるようなバイオリマン顕微鏡を開発し、数理解析することで、造血細胞HL60・HeLa細胞の内部状態について実験的な知見を得ることができた。細胞を顕微鏡ステージで飼育しながらラマン計測を行った。造血細胞HL60において、未分化状態から分化・アポトーシスに移行するダイナミクスは、未分化細胞の内部状態に依存することが、ラマン計測により明らかになった。任意の分化状態へ誘導しようとする再生医療の観点からも、得られた情報は重要である。複雑で大量なラマンスペクトルを数理解析する新規な方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Recently it became possible to measure Raman spectra of a single live cell using a standard Raman microscope. We developed a bio-Raman microscope in order to monitor the dynamics of cellular differentiation, proliferation, and apoptosis. To do so, living cells were incubated on the microscope stage. Using the bio-Raman microscope, we defined cellular states in a non-destructive and non-labeling manner. The obtained information of cellular conditions is very important to control cellular destinies aiming tissue engineering. Advanced mathematical methods, developed in this project, were found effective to spectral analysis in a general manner.

研究分野：振動分光

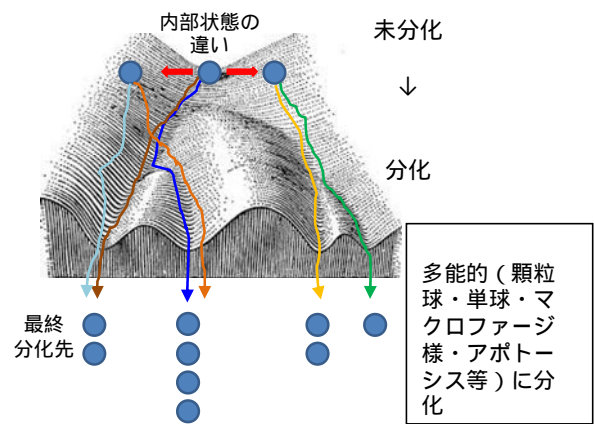
キーワード：ラマン顕微鏡 細胞 スペクトル解析

1. 研究開始当初の背景

現在、生細胞の局所のラマンスペクトルを計測できるようになっている(細胞の径は $\sim 20\ \mu\text{m}$ ,  $1 \times 1\ \mu\text{m}^2$ の小領域を $532 \cdot 785\ \text{nm}$ 励起で10秒露光). タンパク質・核酸・脂質などの分子は、もともと様々な振動数で連成振動している. これらの振動子と光は相互作用し、ラマン散乱光として検出できる場合がある. これを応用すると生体分子の細胞内分布について「ありのまま」分析できる(蘭国・ピュッペルス, *Nature*, 1990). この報告を機に、次々とラマン顕微鏡による生細胞研究についての報告が増えた. 2000年を過ぎるころには、市販のラマン顕微鏡で生細胞を観察できるようになった. 申請代表者の盛田伸一は、2005年頃に、細胞の分化・アポトーシス・増殖といった「生きているからこそ」の現象を、細胞内で起こるケミストリーの反応・変化として、ラマン顕微鏡で観察・追跡できることに気付いた. また、蛍光法と異なり対象を染める必要もなく、ラマン散乱光を、細胞のその後(運命)を予測するプローブ光として応用できることに気が付いた. 多能性をもつ未分化細胞に光を当てラマン散乱スペクトルを計測・数理解析することで、細胞の運命を予測できるようになる、つまりラマンプローブを利用すれば生細胞を傷つけずに望む分化状態へと誘導できそうな状況であった(再生医療への展開).

国内外の動向について、生細胞計測のできる先端的なラマン顕微鏡の開発という意味では、国内では、大阪大学の河田・藤田グループ(*Nature Protocols*, 2013), 東京大学の小関グループ(*Nature Photonics*, 2012), 国外では、台湾国・交通大学の濱口(*Biochemistry*, 2005), 米国ハーバード大学Xieグループ(*Science*, 2008)が有名であった. 彼らはラマン測定の感度向上・高速化・計測の三次元化について報告した(しかし、生細胞ラマン顕微鏡計測によるバイオ分析

のために非常に重要な長期計測(一週間程度)は実現しておらず、制御および解析機能の搭載は後回しになっておりジレンマとなっていた). ところで、理研の袖岡グループ(*J. Am. Chem. Soc.*, 2012)は生細胞系に親和するアルキンタグ等のラマンプローブ分子を開発、混沌とした生体分子集合の中で標的分子のコントラスト(識別能)を向上させた(しかし、そのプローブ分子自体の明るさ向上、網羅的なラマンプローブ開発が課題であった). 研究代表者の盛田らはこれまで「生細胞分化ダイナミクスのラマン顕微鏡による検出」について研究した(*S. Morita* ら, *Biophys. J.* 2014). ヒト乳がん細胞の未分化・分化状態をラマン顕微鏡で識別でき、分化過程における生細胞の内部状態に多様性を見出した. しかし、一つ一つの細胞を使い捨ててラマン顕微鏡計測するアプローチに留まっていた. 一つ一つの細胞を識別し一週間程度の長期培養をしながら、ラマン顕微鏡で観察し研究すれば、多能性をもつ未分化細胞の分化誘導プローブとしてラマン散乱を活用できるという状況であった.



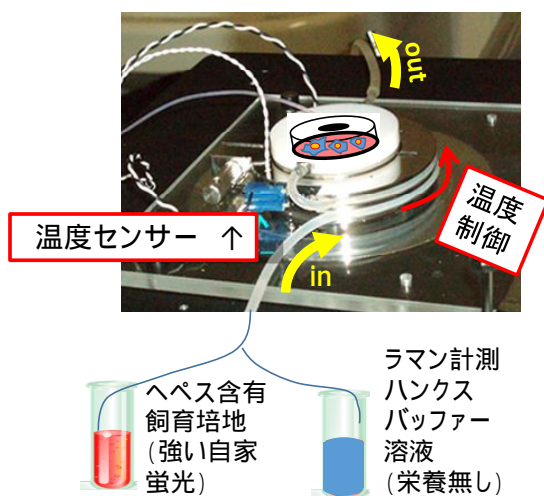
**細胞の内部状態の規定による分化誘導.** 未分化細胞の内部状態を規定できれば、多能性をもつ造血細胞の分化先を任意に誘導できる. 本研究では、これ以上、分化しないHeLa細胞を用い、生細胞の内部状態の違いを検出できた. その情報を踏まえ、多能性をもつ造血細胞(HL60)の薬剤投与による分化誘導ダイナミクスのラマン信号を単一細胞レベルで計測、造血細胞分化ダイナミクスのポテンシャル状態図(相図)を作成に成功した(図は概念図).

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、多細胞を一つずつ同時にかつ長期追跡できる、バイオ・ラマン顕微鏡を開発し、細胞の分化ダイナミクス研究をはじめとする、バイオ・ラマン研究に応用することであった。

## 3. 研究の方法

- (1) ラマン顕微鏡の基本骨格の構築
- (2) 一週間ほど長期培養しながらラマン顕微鏡観察できる仕組みを開発・搭載
- (3) 開発したバイオ・ラマン顕微鏡で細胞分化ダイナミクスを計測・解析
- (4) 分化ダイナミクスを理解するために、数理解析法を新規に開発

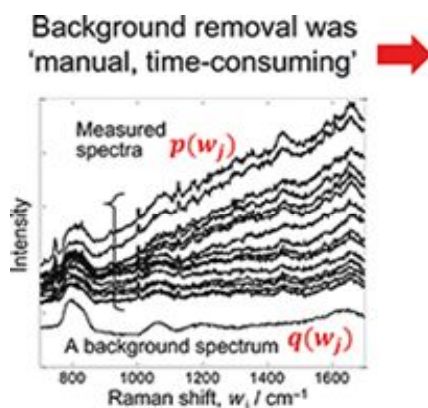


## 4. 研究成果

- (1) ラマン顕微鏡の基本骨格の構築。共焦点ラマン顕微鏡をバラックで組み立てた。
- (2) 一週間ほど長期培養しながらラマン顕微鏡観察できる仕組みを開発・搭載した。ネッパジーン社と連携してかん流装置をバイオ・ラマン顕微鏡に組み込んだ。HeLa 細胞を用い、3 日以上、かん流を続け、可視顕微鏡観察より、細胞が良好に増殖することを確認し、顕微鏡ステージ上で細胞をその場で飼育できるようにした。
- (3) 開発したバイオ・ラマン顕微鏡で細胞分化ダイナミクスを計測・解析した。バイ

オ・ラマン顕微鏡により、造血細胞の HL60 の分化ダイナミクスを計測し、主成分分析等を駆使して、細胞が分化する状態図の可視化に成功した。

(4) 分化ダイナミクスを理解するために、数理解析法を新規に開発した。



'Automatic' using  
1st deriv. spectra  $p'$ ,  $q'$

$$r(w_j) = p(w_j) - k q(w_j)$$

$$k = \frac{\sum_{j=1}^n p'(w_j) q'(w_j)}{\sum_{j=1}^n q'(w_j) q'(w_j)}$$

1つ目の方法は、スペクトルの最短の長さを考慮することにより、不必要な背景成分を自動的に除去する方法である。これにより、数百～千個のスペクトルを一括で自動的に、統計解析できるようになった。この手法は、混合物系における未知試料の濃度定量に応用することが可能で、一般的な分析化学の手法として、拡張できることが分かった。つまり、ラマン計測による単一生細胞のその場分析が可能な状況となった。もう一つの手法として、多変量のダイナミクスの信号変化を順序付ける手法を開発した。これにより、未分化細胞が分化する過程において、位相に相当する、内部状態の時間情報についても得ることができるようになった。ラマン計測を用いて、

未分化細胞の位相に相当する「細胞周期」を決定できそうだ，ということが分かった．

#### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Tatsuro SUGAWARA, Qi YANG, Takakazu NAKABAYASHI, Shin-ichi MORITA, A Proposal for Automated Background Removal of Bio-Raman Data, Analytical Sciences, 査読有, 33, 2017, 1323-1325.

DOI: 10.2116/analsci.33.1323

〔学会発表〕(計 6件)

盛田伸一, Raman Scattering of Live Cells Seeking Bio. Phys. Chem. About the Triple Point, 平成28年度化学系学協会東北大会, いわき明星大学, 2016年9月.(招待講演)

S. Morita, Bio. Phys. Chem. about the Triple Point and Bio-Raman Research, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium 14th Annual Meeting of the Japan Association of Medical Spectroscopy, 淡路夢舞台国際会議場, 2016年12月.(招待講演)

S. Morita, Bio-Raman Research on Cellular Differentiation to Detect the Reversible State, The 54nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, つくば国際会議場, 2016年11月.(招待講演)

盛田伸一, バイオ・ラマン研究による bio. phys. chem. 三重点の探索, 日本分析化学会年会第65年会, 北海道大学工学部, 2016年9月.(依頼講演)

盛田伸一, Bio-Raman Research on Live

Cells and Small Molecules, 第2回アジア分析科学シンポジウム (2nd Asian Symposium on Analytical Sciences), 九州大学伊都キャンパス, 2015年9月9日.(招待講演)

S. Morita, Raman analysis of live cells with and without chemical markers, 第53回日本生物物理学会年会シンポジウム:Alkyne-Tag Based Raman Probes and Bio-Imaging of Small Molecules, 金沢大学 角間キャンパス自然科学本館, 2015年9月13日.(招待講演)

#### 6．研究組織

研究代表者

盛田 伸一 (MORITA, Shin-ichi)

東北大学・理学研究科・准教授

研究者番号: 40462741