

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18038

研究課題名（和文）非線形光散乱を駆使した線維化における細胞機能解析

研究課題名（英文）Analysis of cellular functions in fibrosis using nonlinear light scattering

研究代表者

長谷 栄治（HASE, Eiji）

徳島大学・ポストLEDフォトンクス研究所・特任助教

研究者番号：50805512

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）：本研究では、線維化を詳細に評価する光学的手法の開発を目的として、1．SHG光観察および偏光分解SHG解析の観察系構築と線維化生体組織の観察への応用を行い、偏光分解SHG解析から得られるコラーゲン配向度が線維化のステージを反映しうることを示した。次に、2．ブリルアン散乱顕微鏡を開発とMASHモデルマウスの肝臓組織中の脂肪滴観察への応用により、脂肪滴の力学的特性の観点からMASLD進行評価の実現可能性を示した。最後に、3．線維化進行によるコラーゲン分布および局所的な弾性率の変動の可視化を目指したSHG顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡の融合によるマルチモーダル顕微鏡を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、1．病理学分野の観点から、新たな光学診断法の可能性を示し、2．医用分光学分野の観点から、脂肪の硬さ（粘弾性）から病態を判別しうることを示し、最後に3．光工学分野の観点から新たなイメージ・コントラストを提供する可視化手法の開発を行った。これらの成果は、社会的には医療現場での診断精度向上や患者への迅速な治療提供に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop optical methods for the detailed evaluation of fibrosis. First, we constructed polarization-resolved second-harmonic-generation (PR-SHG) microscopy and demonstrated that the collagen orientation degree obtained from PR-SHG analysis could reflect the stages of fibrosis. Next, we developed a Brillouin scattering microscope and applied it to the observation of lipid droplets in the liver tissues of MASH model mice, demonstrating the feasibility of evaluating MASLD progression from the perspective of the mechanical properties of lipid droplets. Finally, we developed a multimodal microscope combining SHG microscopy and Brillouin scattering microscopy, aiming to visualize collagen distribution and local elasticity variations due to fibrosis progression.

研究分野：生体医工学，光工学

キーワード：線維化 SHG ブリルアン散乱

1. 研究開始当初の背景

線維症では、様々な臓器において細胞外マトリックスの過剰な沈着(線維化)が起こることで組織が硬化し、臓器の機能不全を引き起こす。代表的な線維化疾患には肝硬変、糖尿病性腎症、肺線維症などがあるが、線維化は患者の予後を著しく悪化させる疾患でありながら、現在有効な治療法が存在しないため、その治療法の開発や疾患の発生・進展メカニズムの解明が急務となっている。これまでの研究では、線維化発生・進展の機序は組織増殖因子 TGF- β の作用や各種炎症性サイトカインに焦点を当てた免疫機能の亢進の観点から進められてきた。しかし最近では、筋線維芽細胞(Myofibroblast)が線維化の主要な役割を果たすことが注目されている。筋線維芽細胞はその形態的特徴から組織の収縮を引き起こすと考えられており、その由来は TGF- β の作用を受けた線維芽細胞などが平滑筋アクチン(SMA)を発現することで分化転換することが示されており、これらの研究は線維化における間葉系細胞の機能を明らかにし、新たな治療戦略の創出に寄与する可能性がある。しかし、これら細胞集団と産生されたコラーゲン線維の時空間的關係についての詳細な評価は現状では不足している。通常、線維芽細胞と筋線維芽細胞は無染色顕微鏡観察では見分けが難しく、ファロイジン-ローダミン染色や SMA に対する免疫蛍光染色を併用する必要があるが、免疫蛍光染色には技術的なハードルがあることや、染色法自体が外因性物質を細胞内に取り込む必要がある方法である。また、コラーゲンの評価には ELISA 法が広く用いられるが、この方法では目的物質の総量を計測するのみで、その空間情報は失われる。加えて、近年の研究において、線維症が可逆的な病態であることが示されつつあることから、線維化の時間的進展や消退を可視化することがそのメカニズム解明に重要である。従って、線維化において線維芽細胞、筋線維芽細胞、コラーゲンの時空間的關係を評価するためには、高分解能イメージングによって空間関係を把握し、非侵襲かつ非染色な測定によって時系列的測定を可能にする手法が求められ、それが実現されれば線維化のメカニズム解明と新たな治療戦略の開発に寄与すると期待される。

2. 研究の目的

そこで本研究では、線維化過程における線維芽細胞、筋線維芽細胞、コラーゲンの三者をターゲットとし、非線形散乱光という非侵襲・ラベルフリーな新しい光プローブを用いて、三者の時空間的關係を評価し、線維化における細胞の機能を解析することを目的とする。具体的には、パルス誘導ブリルアン散乱光と第2高調波発生(SHG: Second Harmonic Generation)光を使用し、ISBS 光で細胞の硬さを計測しながら二つの細胞を分類し、SHG 光でコラーゲンの線維構造や産生量を時空間的に調査することを本研究の最終的な目的とする。今回はこの目的実現の前段階として、対象の粘弾性を測定可能な自発ブリルアン散乱光の観測のための顕微光学系の開発と線維化肝臓組織観察への応用、また SHG 光観察および線維化コラーゲンのより詳細な情報の抽出が可能な偏光分解 SHG 観察系の構築および線維化生体組織の観察への応用およびブリルアン散乱・SHG 同時観察系の構築を行い、これらの手法の線維化組織への応用の有用性の基礎的検討を実施することを研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主に以下の3点について実施した。

- (1) SHG 光観察および偏光分解 SHG 解析の観察系構築と線維化生体組織の観察への応用
- (2) 自発ブリルアン散乱顕微鏡の開発と線維化生体組織の観察への応用
- (3) SHG 顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡の融合によるマルチモーダル顕微鏡の開発

4. 研究成果

- (1) SHG 光観察および偏光分解 SHG 解析の観察系構築と線維化生体組織の観察への応用

はじめに、線維化の進行度(ステージ)が異なる生体組織を用いて、SHG イメージングの線維化評価への有用性の確認を行った。ここでは、図1に示すように、単純な SHG イメージングに加えて、コラーゲン線維の配向の方向(角度)とその度合いを評価可能な偏光分解 SHG 顕微鏡装置を構築した。光源には波長可変のフェムト秒レーザーを用い、中心波長を 800 nm に設定した。繰り返し周波数は 80 MHz、パルス幅は 120 fs 前後である。レーザー光の偏光状態は、ガルバノミラーとリレーレンズ、対物レンズ(NA = 0.9)からなるレーザー走査型顕微鏡に入射する前に設置している波長板により、単純な SHG イメージングの際には円偏光に、偏光分解 SHG イメージングの際には直線偏光になるよう調整される。また、偏光分解 SHG 解析の際には直線偏光の方位角を変化させながらその際の SHG 光強度を測定し、理論式に当てはめることによって、コラーゲン線維の配向角 および 2 次非線形感受率の比でありコラーゲン線維の配向度合いに反比例する $\chi^{(2)}$ の値をピクセルごとに計算する。検出系は透過型の構成となっており、光学フィルター等を用いてレーザー光成分と SHG 光成分を分離した後、フォトンカウンティング型の光電子増倍管で検出する。上記の構築装置を用いて、研究協力者より提供された、アルコール摂取由来のヒト肝臓線維化組織の観察を行った。新犬山分類にしたがって分類された、F0 から F4 の線維化ス

ステージの異なるホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、単純 SHG イメージングおよび偏光分解 SHG 解析を行った結果を図 2, 3 に示す。まず、図 2 (a) は取得した SHG 画像から SHG 光が発生した面積を計算し、線維化ステージごとに比較したものである。どちらの結果でも、線維化ステージが進むにつれてその値が増大していく様子がわかる。また、図 2 (b) の連続切片のシリウスレッド染色画像で同様な計算を行った結果との比較から、SHG イメージングはシリウスレッド染色と同等の線維抽出能力を持つことが確認でき、単純 SHG イメージングにてラベルフリーで線維化の分布に関する組織学的情報を抽出可能であるということが確認できた。

次に、同様に異なる線維化ステージの肝臓組織切片を用いて偏光 SHG 解析を行った結果を図 3 に示す。ここでは、配向角度 (ϕ)、配向度 (ρ) 画像と各画像のヒストグラムを線維化ステージごとに示している。配向角については、どのステージでも線維がランダムな角度で等方的に配向する様子が可視化されており、配向角度に関して群間で有意差や特徴的な傾向は見られなかった。一方、配向度に関してはその平均値がステージ F3 まで進行するにつれて増加し、F4 では同じ群における平均値の分散が有意に小さくなった。また、配向度のヒストグラムから画像における配向度の値の乱雑さを計算したところ、F3 では乱雑さの群間の変動が増大し、F4 ではその変動が減少する様子が確認できた。上記の結果は F4 における線維化進行の収束を表している可能性があり、このような偏光 SHG 解析を用いることによって肝臓線維化におけるコラーゲン動態に関する新たな知見が得られる可能性があることが示された。

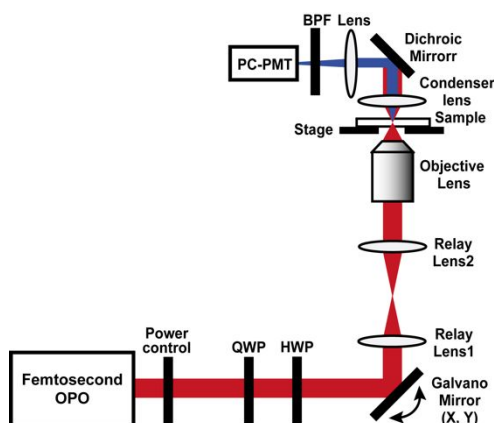


図 1 偏光分解 SHG 顕微鏡の概略図。

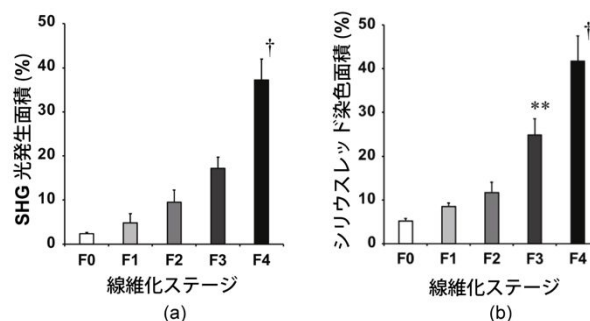


図 2 各線維化ステージにおける (a) SHG 光発生面積および (b) シリウスレッド染色面積。

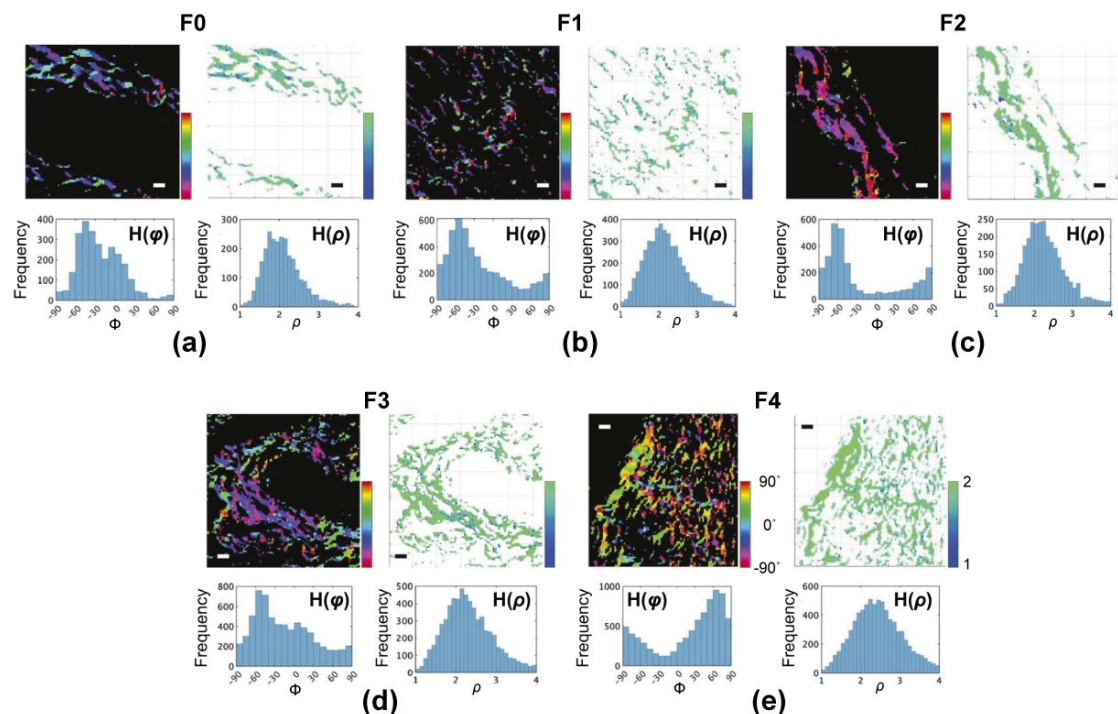


図 3 線維化ステージごとの偏光分解 SHG 解析結果。(a) F0, (b) F1, (c) F2, (d) F3, (e) F4。

(2) 自発ブリルアン散乱顕微鏡の開発と肝臓組織観察への応用

次に、自発ブリルアン散乱顕微鏡を開発し、開発した顕微鏡装置を肝臓組織の観察に応用した。

図4に実験装置の概略図を示す。光源には狭線幅・単一周波数発振のCWレーザー($\lambda = 532\text{ nm}$, $\nu < 1\text{ MHz}$)を用いた。光源を倒立顕微鏡に導光し、対物レンズ(20X, NA = 0.6)を用いて垂直入射下で試料に入射させた。試料から発生したブリルアン散乱光は同じ対物レンズで集められ、SMF経由でタンデムVIPA分光計に入射させた。分光器内では、直交配置されたVIPA(FSR = 30 GHz, フィネス = 65)により、高いスループットと中程度のスペクトル消光を実現し、従来のファブリ・ペロー干渉計と比較して高速にブリルアン信号の取得が可能である。このような分光器を用いてEMCCDカメラにより分光された成分を計測することによって、露光時間100 ms程度でブリルアンスペクトルを取得できる。また、ブリルアンシフト成分を損失することなく弾性(レイリー)散乱成分による背景ノイズを抑制するため、リヨフィルター(空間フィルター)を使用した。また、装置構築後は溶液(水, エタノール, メタノール等)の標準サンプルの測定を行って計測の妥当性を確認した。加えて、2次元イメージの際には顕微鏡ステージを走査することにより各位置のスペクトルを測定する。スペクトル解析においては、特に対象の縦波弾性率を反映する値であり、入射光周波数とブリルアン散乱光周波数の差であるブリルアンシフトに着目して解析した。

測定対象として、給餌により誘導されたMASHモデルマウスの肝臓組織を使用した。試料は研究協力者より提供された。試料は凍結ミクロトームで10 μm の厚さに切片化した後、未固定・無染色の状態ですライドガラスにマウントし、PBSを滴下してウェットな状態を保ちながらブリルアン解析に使用した。ここでは、代謝異常に関連する脂肪性肝疾患(MASLD)において従来見過ごされてきた脂肪の物性に着目して計測を行った。特に、図5に示すように、偏光顕微観察により脂肪滴中の脂質の結晶性を3つに分類し、それぞれに対してブリルアンイメージングを行った。実験結果から、構築したブリルアン散乱顕微鏡を用いることで脂肪滴中の不均一や結晶性の違いによるブリルアンシフトの変化が詳細に確認できる。図5(a)のような十字コントラストが見られる構造はMASLDがMASHに進行するときしばしば観察され、脂質分子が放射状に配向している脂肪滴である。図5(g)の平均ブリルアンシフトの比較では、このような十字コントラストが存在する際にもっともシフト量が大きくなり、結晶性に応じてブリルアンシフトが変動する様子が確認できた。これらの結果は、従来、偏光顕微鏡で定量評価することが難しかった個々の脂肪滴の物性をブリルアンイメージングにより力学的特性の観点から可視化し、MASLD進行の評価へ応用できる可能性を示唆している。

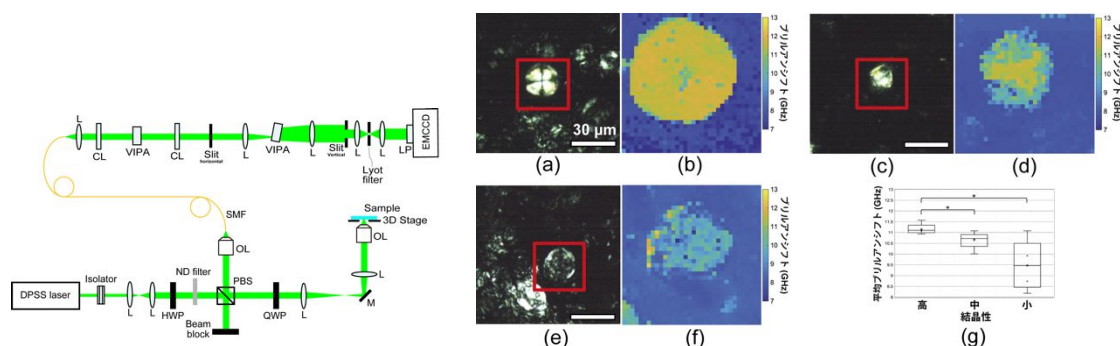


図4 ブリルアン散乱顕微鏡の実験装置。

図5 結晶性が高い脂肪滴の(a) 偏光顕微画像および(b) ブリルアンシフト画像。同様に(c), (d) 中程度の結晶性, (e), (f) 低い結晶性の脂肪滴の観察結果。(g) 脂肪滴の平均ブリルアンシフトと結晶性の関係。

(3) SHG 顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡の融合によるマルチモーダル顕微鏡の開発

最後に、SHG 顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡を一つの顕微鏡筐体に統合したマルチモーダル顕微鏡の開発を行った。ここでは、線維性コラーゲンに着目して SHG 光強度および同一箇所でのブリルアンシフトの測定を行うことで、マルチモーダルイメージングの妥当性を検討する。実験装置の図は記載を省略するが、光源にフェムト秒レーザーを用いたレーザー走査型顕微鏡の構成とし、反射配置、デスクャン方式を採用した SHG 顕微鏡を図4のブリルアン散乱顕微鏡に組み合わせ、両者を切り替え可能とすることでマルチモーダル顕微鏡とした。また、発生した SHG 光は、ダイクロイックミラーおよび光学バンドパスフィルターによって反射レーザー光成分と分離した後、フォトンカウンティング型 PMT により測定した。マルチモーダル顕微鏡構築後には、生体計測における有用性・妥当性を確認するため皮膚組織の測定を行った。組織固定によって対象の粘弾性特性が変化するため、ブリルアン測定では凍結切片等の新鮮試料の測定が妥当ではあるが、新鮮生体試料準備の用意や実験タイミングの都合により、今回は他の実験で使用したホルマ

リン固定された皮膚組織を代用して測定試料として用いた． 図 6 に実験結果を示す． 測定位置として、コラーゲン線維が豊富に存在する真皮層を対象とした 図 6 (a)および(b)に示すように、ブリルアンシフト画像では SHG 画像のコラーゲン線維が存在する箇所にて高いブリルアンシフト量を示しており、両者においておよそ同様の構造が可視化できていることがわかる． 図 6 (a)のブリルアンシフト画像では、ホルマリン固定の影響によりブリルアンシフトの解析が困難となるピクセルが存在しており、その部分は黒色で表示している． 図 6 (c)はこれら 2 つの画像における同一位置 (ピクセル) の値を抽出したプロットであり、両者の間に中程度の相関があることが確認できた． 以上のように、開発したマルチモーダル顕微鏡を用いることで、対象のコラーゲン分布と弾性率分布をラベルフリーかつサブ μm 程度の空間分解能で可視化することが可能となった． 本手法は線維化進展によるコラーゲン分布の様子やその際の局所的な弾性率の変動などを可視化するための有力なツールとなると期待される．

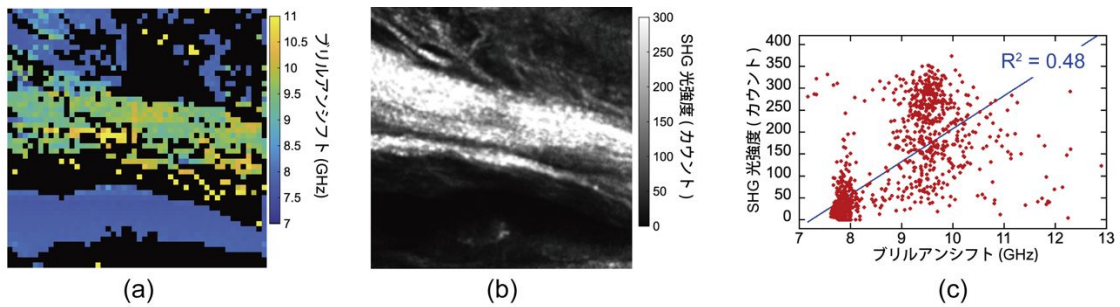


図 6 皮膚真皮層のマルチモーダルイメージング結果． (a) ブリルアンシフト画像， (b) SHG 画像， (c) 両者の相関．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuzaki Saya, Hase Eiji, Takanari Hiroki, Hayashi Yuri, Hayashi Yusaku, Oshikata Haruto, Minamikawa Takeo, Kimura Satoko, Ichimura-Shimizu Mayuko, Yasui Takeshi, Harada Masafumi, Tsuneyama Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Quantification of collagen fiber properties in alcoholic liver fibrosis using polarization-resolved second harmonic generation microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22100-22100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-48887-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamikawa Takeo, Hase Eiji, Ichimura-Shimizu Mayuko, Morimoto Yuki, Suzuki Akihiro, Yasui Takeshi, Nakamura Satoko, Tsutsui Akemi, Takaguchi Koichi, Tsuneyama Koichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Assessment of Ultra-Early-Stage Liver Fibrosis in Human Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by Second-Harmonic Generation Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3357-3357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23063357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Eiji Hase and Takeshi Yasui
2. 発表標題 Development of second-harmonic-generation microscopy and its application to human skin diagnostics
3. 学会等名 OPIC2023 (LDC2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eiji Hase, Naoya Okubo, Kazuki Yasumaru, Yu Tokizane, Takeo Minamikawa, and Takeshi Yasui
2. 発表標題 Molecular imaging analysis of lipid droplets in nonalcoholic fatty liver disease by use of Brillouin scattering microscopy
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2024 (BiOS2024) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Naoya Okubo, Eiji Hase, Kazuki Yasumaru, Yu Tokizane, Takeo Minamikawa, and Takeshi Yasui
2. 発表標題 Analysis of Accumulated Lipid Molecular Properties in Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Use of Brillouin Scattering Microscopy
3. 学会等名 33rd International Symposium on Imaging, Sensing, and Optical Memory (ISOM23) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大久保 直哉、長谷 栄治、安丸 和樹、時実 悠、南川 丈夫、安井 武史
2. 発表標題 ブリルアン・ラマン散乱顕微鏡を用いた非アルコール性脂肪性疾患における脂質の分子物性解析(2) -蓄積脂肪滴のブリルアンイメージング-
3. 学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大久保 直哉、長谷 栄治、時実 悠、南川 丈夫、安井 武史
2. 発表標題 ブリルアン散乱顕微鏡を用いたヒト皮膚の力学的特性解析
3. 学会等名 第71回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長谷 栄治、南川 丈夫、時実 悠、安井 武史
2. 発表標題 ブリルアン・ラマン散乱顕微鏡を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患における脂質の分子物性解析(1) -ブリルアン散乱顕微鏡の構築と肝組織のブリルアンイメージング-
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 E. Hase, T. Minamikawa, Y. Tokizane, and T. Yasui
2. 発表標題 Analysis of lipid molecular properties in nonalcoholic fatty liver disease by use of Brillouin microspectroscopy
3. 学会等名 SPIE Biomedical Imaging and Sensing Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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