

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282117

研究課題名(和文)アルツハイマー病早期診断に向けたコヒーレント・ラマン水晶体イメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of coherent Raman imaging method for diagnosing Alzheimers Disease

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルツハイマー病(Alzheimer's Disease; AD)の診断マーカーとして水晶体中のA β にターゲットを絞り、コヒーレント・ラマン散乱の手法を用いることで、アミロイド(Amyloid; A β)タンパク質の高速検出を行う、全く新しいコヒーレント・ラマンAD診断法を開発することを目的として研究を行った。ヒト水晶体の非染色ex vivoイメージを得ることに成功したが、研究期間内にA β 由来のスペクトルパターンを見つけることはできなかった。本研究で特筆すべき点として、研究過程で偶然網膜視細胞における「線毛根」というオルガネラを可視化出来たことが挙げられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on amyloid beta (A β) proteins in an eye lens for diagnosing Alzheimer's disease (AD). Based on the coherent Raman scattering technique, we tried to develop a novel label-free diagnostic system to detect A β in an eye lens. We succeeded in obtaining label-free ex vivo images of human eye lens, but we could not find any spectroscopic signature of A β within the research period. One of the noteworthy results is that we unexpectedly visualized organelles called rootlet in photoreceptor cells with label-free manner.

研究分野：分子分光学

キーワード：ラマン CARS 水晶体 アルツハイマー

1. 研究開始当初の背景

我が国は未曾有の超高齢化社会を迎え、認知症の患者数も増加しつつある。特にアルツハイマー病(Alzheimer's Disease; AD)は、認知症の原因として最も高頻度に見られる神経変性疾患の一つであるため、ADの早期診断、治療法などの開発が、現在切に望まれている。これに関連してAD患者の水晶体に、脳内にも認められるアミロイド (Amyloid ; A)タンパク質が発見されることが米国のグループにより報告された。水晶体の検査によりこのタンパク質を検出できれば、ADの早期発見につながり、治癒のレベルまで病気を抑えることが可能であると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ADの診断マーカーとして水晶体中のAにターゲットを絞り、コヒーレント・ラマン散乱の手法を用いることで、Aの高速検出及び高速解析を行う、全く新しいコヒーレント・ラマンAD診断法を開拓することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、ラマン分光法を研究手法として用いた。ラマン分光法は、生きた細胞内の分子分布やそのダイナミクスを、非染色・非破壊・非侵襲で直接観測することのできるユニークな方法である。ラマンスペクトルは“分子の指紋”とも呼ばれ、分子の構造・骨格を鋭敏に反映した情報を与えるため、一本のスペクトルから非常に多くの有益な構造情報を得ることができる。ラマン散乱は微弱な光であるため、測定に長時間の露光を必要とするが、我々は Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)顕微鏡を用いることで、ラマンスペクトル及びイメージを高速に取得できる技術基盤を構築した。

CARSでは、一般に波長の異なる二つのレーザー光 (ω_1 , ω_2 光)を用いる。これら二つの入射光の振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ が試料分子の持つ振動モード(化学結合に対応する)の角振動数 Ω と一致すると、多数の試料分子の振動モードが共鳴的に励振される。このようにして生じた分子振動は、分子が三つ目のレーザー光 (ω_1 光)と相互作用することにより、 ω_{CARS} 光として取り出される。エネルギー保存則から、 $\omega_{\text{CARS}} = 2\omega_1 - \omega_2$ であることが要請される。CARS過程の大きな特徴の一つとして、 ω_{CARS} 光の信号強度が ω_1 光の強度の二乗に比例する、すなわち、 ω_{CARS} 光の信号強度が ω_1 光の強度に対して非線形に増大する、ということが挙げられる。これにより、微弱なラマン散乱光を増幅し、効率的にイメージングを行うことが可能になる。本研究では、このCARS過程に広帯域な光源(白色レーザー)を用いることで、試料分子の持つ複数の振動モード(化学結合)を同時に共鳴励振させ、分光計測により各々の振動共鳴(化学結合)についてのイメージを得ることができる。

本研究では、このCARS分光イメージング手法を水晶体測定に適用する。装置開発と並行して本研究を学内の倫理委員会に申請し、承認を得る。次に、眼科での白内障手術で除去したヒト水晶体を、固定せずフレッシュなまま測定する。これにより、水晶体に蓄積しているAに由来するスペクトルパターンを探索し、A検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 繰り返し1 MHz光源を用いた新規マルチモード非線形光学イメージング装置の開発

本研究では、水晶体イメージング用に新規白色レーザー光源の開発を行った。共同研究先であるフランス・リモージュ大学の研究者と共に、発振波長、パルス幅、繰り返し周波数、白色レーザーのスペクトル帯域などの最適条件を探索し、カスタムメイドの新規白色レーザー光源(基本波同時出力タイプ)を開発した。開発した光源のスペックは発振波長1064 nm, パルス幅85 ps, 繰り返し周波数0.82 MHz, 白色レーザーの近赤外域におけるスペクトル帯域1064-1800 nm, 尖頭出力23 kW(ω_1)及び11 kW(ω_2)である。本光源を用いた新しい装置図を図1に示す。

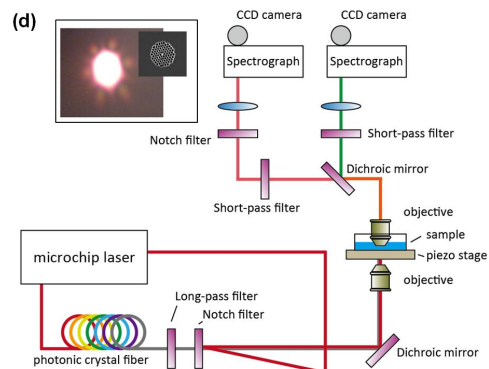


図1 新しい白色レーザー光源を用いた新規マルチモード非線形光学イメージング装置. 挿入写真は白色レーザー光のファー・フィールドパターン及び白色レーザー発生に用いたフォトニック結晶ファイバーの断面図

本装置のパフォーマンスを確認するため、細胞周期M期のHeLa細胞を測定した結果を図2に示す。染色体と紡錘糸が、CARSの核酸イメージ(798 cm^{-1})及び第二高調波発生(second harmonic generation; SHG)によりそれぞれ明瞭に可視化されていることがわかる。これに加え、和周波発生(sum frequency generation; SFG)第三高調波発生(third harmonic generation; THG)、三次和周波発生(third-order sum frequency generation; TSFG)、二光子励起蛍光(two-photon excitation fluorescence; TPEF)等、CARSを含む複数のチャンネルで非線形光学イメージングを行う技術基盤を整えた。本研究で開発し

たマルチモーダル非線形光学顕微鏡には、(1)電子励起を伴わないことによる光毒性効果の低減(低侵襲)、(2)多重観察(マルチモーダル・イメージング)による解析力の向上、(3)非線形光学効果による信号強度の増大(高感度)、(4)近赤外レーザーによる生体深部観察能、(5)1ミクロン以下の高い空間分解能、等様々な利点がある。

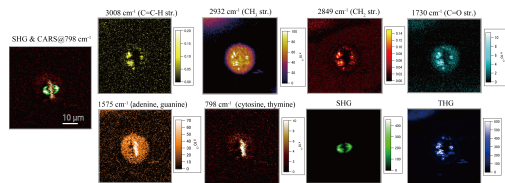


図2 M期 HeLa 細胞のマルチモーダル非線形光学イメージング (SHG, THG 及び複数の振動モードにおける CARS イメージ) (右) 及び CARS@798cm⁻¹ と SHG とのイメージ図(左)

(2) ヒト水晶体の測定

附属病院倫理委員会の承認を得た上で、ヒト水晶体の測定を行い、水晶体表面近傍の非染色非線形 *ex vivo* 断層イメージを得ることに成功した。研究期間内に A 由来のスペクトルパターンを見つけることはできなかったが、白内障を含む水晶体疾患の新しい検査装置として、本システムが有効であることを確認した。

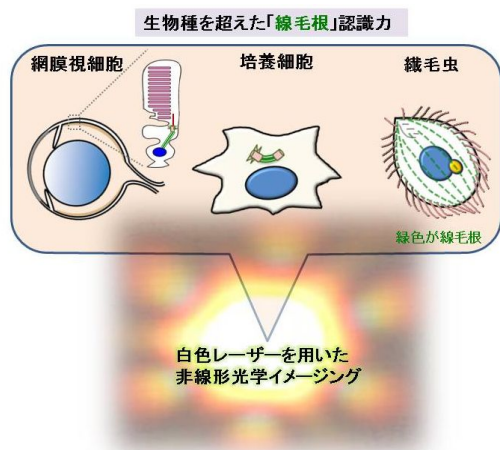


図3 種を超えた線毛根の可視化

(3) 網膜における線毛根の「そのまま」見える化に成功

本研究で特筆すべきは、眼組織を可視化する研究の過程で、偶然「線毛根」というオルガネラを可視化出来た点である。

線毛根は感覚器に顕著な線維構造で、視力・聴覚・触覚・力覚などの感覚受容に寄与することが知られている。この感覚寄与は哺乳類のみならず、ハエや線虫そして繊毛虫などの微生物においても保存されているため、生きたまま線毛根が可視化できれば、ヒトでの病態評価やモデル生物での感覚機能の理解に大きく役立つと考えられる。しかしなが

ら、染色・標識せずにそのままの線毛根を可視化した報告はなかった。

本研究では、新たに開発した本装置を用いることで、細胞の線毛根を標識物質なしに、しかも生物種に関わらず可視化できることを証明した(図3)。線毛根はルートレチン

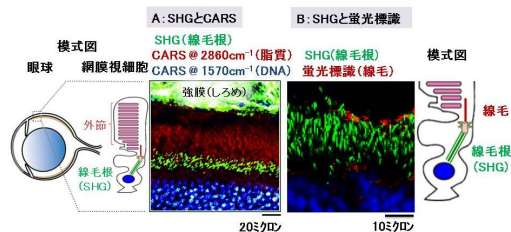


図4 マルチモーダル非線形光学イメージングによる線毛根の局在の特定

と呼ばれる蛋白質が重合した、1ミクロン径にも満たない線維状構造物である。本研究では、このルートレチンの重合状態を SHG を用いて特異的に検出することに成功した。生体組織ではこれまで、真皮のコラーゲン、筋肉組織のミオシン、神経細胞の軸索(微小管)等で SHG 信号が検出されることが知られていたが、ルートレチンについては、その信号強度が微弱であるため検出例は報告

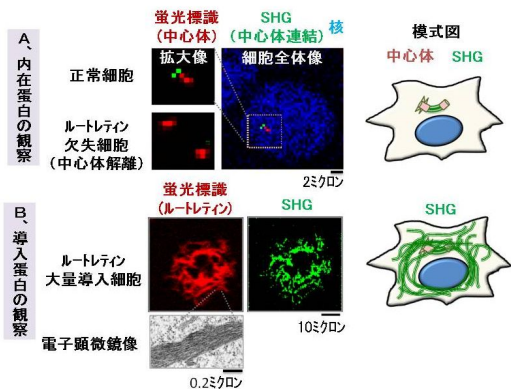


図5 培養細胞のマルチモーダル非線形光学イメージングによるルートレチンの可視化

されていなかった。本装置で検出した線毛根からの SHG 信号の強度は、しるめ部分(コラーゲン)からのその、実に 1/1000 程度であった。

本研究では、白色レーザーの利用により、生体組織を複眼的に可視化することができた。これにより、SHG 信号の発生源を網膜視細胞内の線維構造まで突き詰めることができた(図4)。また、実証実験として、線毛を赤く蛍光標識したサンプルを用いて SHG と同時観察を行ったところ、その発生源が線毛自体ではなく根部にあることが明確に示された(図4)。

さらに、培養細胞に対しても同様の実証実

験を行い、中心体連結への寄与でも知られるルートレティンが SHG として検出できただけでなく、ルートレティン欠失細胞が示す中心体解離状態では SHG の消失が確認できた(図 5A)。ルートレティンを大量導入した細胞は顕著な線維構造を形成することが電子顕微鏡観察により明らかとなり、導入しない細胞よりはるかに強い SHG が観察できた(図 5B)。以上により、重合ルートレティンを検出する SHG 特性は分子識別能の上でも有効であることが証明できた。

線毛は生物種を超えて存在する構造である。図 3 の繊毛虫の体表付近に見られる多数の SHG は同部位に存在する線毛根部を示唆しており、本技術の高い普遍性を裏付けている。今後、用いるレーザーの低出力化等、低侵襲化の検討を進めることで、網膜変性疾患の診断や広範な生物感覚研究への応用が期待される。

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 5 件; すべて査読有)

Toshihiro Akiyama, Akihito Inoko, Yuichi Kaji, Shigenobu Yonemura, Kisa Kakiguchi, Hiroki Segawa, Kei Ishitsuka, Masaki Yoshida, Osamu Numata, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Tetsuro Oshika, Hideaki Kano, "SHG-specificity of cellular Rootletin filaments enables naïve imaging with universal conservation", *Scientific Reports* 7, 39967 (2017), DOI: 10.1038/srep39967.

Claire Lefort, Rodney P. O'Connor, Véronique Blanquet, Laetitia Magnol, Hideaki Kano, Vincent Tombelaine, Philippe Lévêque, Vincent Couderc, and Philippe Leproux, "Multicolor multiphoton microscopy based on a nanosecond supercontinuum laser source", *Journal of Biophotonics* 9, 709-714 (2016), DOI: 10.1002/jbio.201500283

Hideaki Kano, Hiroki Segawa, Masanari Okuno, Philippe Leproux, and Vincent Couderc, "Hyperspectral coherent Raman imaging - principle, theory, instrumentation, and applications to life sciences", *Journal of Raman spectroscopy*, 47(1), 116-123 (2016), DOI: 10.1002/jrs.4853

Hiroki Segawa, Masanari Okuno, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Takeaki Ozawa, and Hideaki Kano, "Multimodal Imaging of Living Cells with Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS), Third-order Sum Frequency Generation (TSFG) and

Two-photon Excitation Fluorescence (TPEF) Using a Nanosecond White-light Laser Source", *Analytical Sciences* 31(4), 299 (2015), DOI: 10.2116/analsci.31.299

Hideaki Kano, Hiroki Segawa, Philippe Leproux, and Vincent Couderc, "Linear and nonlinear Raman microspectroscopy: History, instrumentation, and applications", *Optical Review* 21(6), 752-761 (2014), DOI: 10.1007/s10043-014-0123-9

[学会発表](計 19 件)

加納 英明, 「ラマンイメージングで捉えられる Pathogenesis」8th バイオメディカルインターフェース・ワークショップ、2017 年 3 月 11 日、宮古島市中央公民館(沖縄県宮古島市)(招待講演)

Hideaki Kano, "Coherent nonlinear optical spectroscopic imaging using a white-light laser source" (Invited) Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Dec. 4-7 (2016), 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)(招待講演)

加納 英明「Coherent nonlinear optical imaging using a white-light laser source (白色レーザーによるコヒーレント非線形光学イメージング)」、第 54 回生物物理学会年会・科研費新学術領域「レゾナンスバイオ」共催シンポジウム、2016 年 11 月 26 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)(招待講演)

Hideaki Kano "Label-free, Multi-color Imaging of Live Cells and Tissues Using a White-Light Laser Source", 10th International Symposium on Nanomedicine, Nov. 24-26 (2016), 産業技術総合研究所(茨城県つくば市)(招待講演)

秋山 敏宏、瀬川 尋貴、加治 優一、大鹿 哲郎、加納 英明、"マルチモーダル多光子顕微鏡を用いたラット眼組織の分子イメージング"、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)
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・分光学系合同研究会(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)(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)(招待講演)
秋山 敏宏、瀬川 尋貴、猪子 誠人、加治

優一、大鹿 哲郎、加納 英明、 “ マルチモーダル多光子分光顕微鏡を用いたラット網膜・視細胞の分子イメージング ”、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)

加納 英明、「生細胞・生体組織を染めずに見る~非線形ラマン顕微鏡による分子イメージング~」、食品微細科学研究会、2015年7月17日、筑波大学(茨城県つくば市)(招待講演)

秋山 敏宏、瀬川 尋貴、加治 優一、大鹿 哲郎、加納 英明、 “ マルチモーダル多光子顕微鏡を用いたラット網膜の分子イメージング ” 日本分光学会年次講演会、2015年6月1日~3日、東京工業大学(東京都目黒区)

加納 英明、 “ 生体組織を染めずに見る~白色レーザーを用いた非線形光学イメージング~ ”、機能物性融合科学研究会、2014年12月4日、物性研究所(千葉県柏市)

秋山 敏宏、瀬川 尋貴、加治 優一、大鹿 哲郎、加納 英明、「非線形マルチモーダル分光顕微鏡を用いたラット眼組織の分子イメージング」、日本光学会年次学術講演会、2014年11月5日~7日、筑波大学東京キャンパス(東京都文京区)

Hideaki Kano, “ CARS molecular fingerprinting of rat eye tissue using a white-light laser source ”, Biomedical Molecular Imaging 2014, Nov. 6, 2014, 水都温泉會館(台北、台湾),(招待講演)

Hideaki Kano, Visualization a single cell and tissue with molecular fingerprint using a white-light laser source, 第11回日中合同組織化学セミナー、2014年9月29日、松本コンベンションセンター(長野県松本市),(招待講演)

秋山 敏宏、瀬川 尋貴、加治 優一、加納 英明、「白色レーザーを用いたラット眼組織のマルチプレックス多光子分光イメージング」、第8回分子科学討論会、2014年9月21~24日、広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)

瀬川 尋貴、福武 直樹、加納 英明、小澤 岳昌、 “ 電子共鳴三次和周波発生分光法の開発と解釈 (Development and interpretation electronically resonant third-order sum frequency generation spectroscopy) ”、第8回分子科学討論会、2014年9月21~24日、広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)

Hideaki Kano, “ Multimodal nonlinear spectral imaging of tissue samples with CARS molecular fingerprint ”、第75回応用物理学会秋季学術講演会(JSAP OSA Joint Symposia 2014)、2014

年9月17~21日、北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)(招待講演)

Toshihiro Akiyama, Hiroki Segawa, Yuichi Kaji, Hideaki Kano,

“ Label-free visualization of rat eye tissue using multimodal and multiphoton

spectral-microscopy ”, Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy (TISRS 2014) and Taiwan Association of Raman Spectroscopy (TARS) Summer Camp, Jun.29-30, 2014, National Dong Hwa University (Hualien, Taiwan)

秋山 敏宏、瀬川 尋貴、加治 優一、加納 英明、 “ 非線形マルチモーダル顕微鏡を用いたラット眼組織のイメージング ”、平成26年度日本分光学会年次講演会・国際シンポジウム、2014年5月26~28日、理化学研究所和光キャンパス(埼玉県和光市)

[その他]

ホームページ等

<http://bukko.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

加治 優一 (KAJI, Yuichi)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：50361332