

令和元年5月21日現在

機関番号：32612  
研究種目：挑戦的研究（萌芽）  
研究期間：2017～2018  
課題番号：17K20031  
研究課題名（和文）Bio-imaging without targets

研究課題名（英文）Bio-imaging without targets

## 研究代表者

岡 浩太郎（OKA, KOTARO）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：10276412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生命現象を解析する際に様々なイメージング技術が使われており、とりわけ蛍光色素やタンパク質を利用した、事前に見る対象を決めたイメージング技術開発は目覚ましい。我々はこの様な Bioimaging with targets 研究に対して、事前に見る対象を決めない Bioimaging without targets 研究を提案した。この研究では無染色標本から可視光域でのハイパースペクトルやラマン分光イメージング法により画像を取得し、様々な情報処理技法を用いることで、細胞温度の計測や脳地図の自動生成を行うことに成功した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では組織染色を行うことなく、細胞や組織のイメージングを行う新規な手法を提案した。この手法は多チャンネルのイメージング技術の進歩の他に、深層学習などに代表される情報処理技術を併用することにより、これまで見過ごされて来た様なシグナルを抽出することができ、発見的な新規なバイオイメージング研究ツールとして利用することが可能である。また非染色であるために、例えばiPS細胞の品質チェックなど染色することが好ましくない標本への適用が可能となる。またこのbioimaging without targets法は従来のバイオイメージング技術と相補的なものと理解できる。

研究成果の概要（英文）：A variety of imaging techniques are used in analyzing biological phenomena, and in particular, development of imaging techniques targeted for specific molecules in advance using fluorescent dyes and proteins is remarkable. We proposed a Bioimaging without targets study that did not decide, in advance, the target for such a Bioimaging with targets study. In this research, images were acquired from unstained biological specimens (Hela cells and brain slices) by a hyperspectrum camera in the visible light region or Raman spectroscopic imaging method, and various information processing techniques succeeded in measuring cell temperature and automatically generating brain map.

研究分野：生体生命情報学・神経科学・生物物理

キーワード：生体生命情報学 生物物理 バイオインフォマティクス 人工知能

### 1. 研究開始当初の背景

これまで私は複数の蛍光プローブを用いて、細胞内情報伝達過程を調べる研究を進めてきた。これらの研究では選択性が高く、また生体内での至適濃度を計測するプローブの開発が重要なことであることを示してきた。しかしながらこれらの研究は大変な労力を必要とするものであり、他の研究室と知らず知らずの間に競争関係になることもしばしば生じる。

またこれら蛍光プローブを利用する研究では、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) と呼ばれる技術がよく用いられている。この手法を利用するためには2種類の蛍光タンパク質や色素を用いるため、1種類の物質濃度を定量するのに2種類の蛍光波長の計測が必要となる。つまり複数の細胞内物質濃度の定量には広域にわたる蛍光波長を計測する必要がある。我々は以前細胞内の主要なセカンドメッセンジャーである cAMP、cGMP 及び Ca イオンの3セカンドメッセンジャーの同時イメージングに成功している (Niino et al. 2010)。この研究では蛍光シグナルを独自に開発したアルゴリズムで分けて定量している。しかしながら「事前に何か見るものを決めて」調べる研究の難しさは否めない。そこで、「特定の計測対象を選ばずにイメージングを行い、適切なアルゴリズムにより、時空間的なスペクトル変化を検出し、それが何かを他のオミックス技術から逆に明らかにして行くようなヒューリスティックなイメージング技術 (Bio-imaging without targets) 研究」の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究ではラマン分光顕微鏡やハイパースペクトルカメラ (可視光像) などの画素毎にスペクトルデータを取得できるイメージング技術を利用して、「事前に観察対象を決めることなく生物材料をイメージングする」ことにより、大規模なスペクトルデータを取得する。この大規模データに「人工知能」に代表されるような種々の情報処理技術を適用することにより、従来不可能であった **Bio-imaging without targets** (事前に何をみるかを決めないで大規模データを取得し、取得データから特徴的な時空間パターンを抽出することにより、隠れていた生命現象を抉り出す技術と定義する)の開発を進める。またこの技術を細胞分化、発生過程、脳ドラフトマップ作成等に適用することにより、本手法の生命科学分野での有用性を検証する。これにより従来行われてきた、「特定分子をイメージングするための技術 (Bio-imaging with targets)」と相補的で、ヒューリスティックな新たなバイオイメージング技術を創出する。

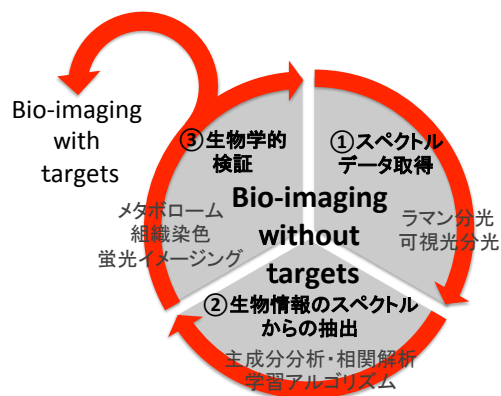


図1 本提案研究の概要

### 3. 研究の方法

そこでラマン分光法やハイパースペクトルカメラなどの非染色イメージングを利用して、様々な生物試料からスペクトルを取得して、そのスペクトルの意味付けを行った。本研究では最初に様々な細胞や、線虫、ホヤなどの生物資料にこれら手法を適用し、まずはスペクトルの取得の可能性とその意味付けについて検討した。最終的には、ラマン分光法による細胞温度計測の可能性の検討と、脳の非染色標本から簡便に脳地図をハイパースペクトルカメラで取得したスペクトルデータから作成する手法の2点に絞って研究を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) ラマン分光法を用いた細胞温度の計測

生体内では様々な化学反応により熱生成するものと考えられている。そのため単一細胞レベルで熱生成を測定することは、局所的な生化学反応と熱産生との関係を明らかにするために大変重要である。従来細胞内熱を測定する方法としては、蛍光イメージング (Qiao ら、2018)、量子ドットの利用 (Wang ら、2018)、非常に小さい熱電対温度計 (Yang ら、2017) が利用されてきた。しかし、蛍光イメージングでは、細胞にプローブを取り込ませることが必要であり、それ自体が生化学反応に影響を与える可能性がある。また熱電対温度計の場合、それを細胞に挿入する必要がある、細胞に損傷を与える可能性がある。本研究では、非侵襲的かつ無標識の細胞内温度記録の新しい方法を提案する。

本研究では非侵襲的温度測定にラマン分光法を用いた。ラマン分光法は、被験体にレーザーを照射し、散乱光のストークスシフトを読み取る手法である。ストークス光の強度には温度依存性があり、以前の研究では純物質について温度の推定が行われている (Saltonstall, Serrano, Norris, Hopkins, および Beechem, 2013)。

我々は *in vivo* ラマン分光法のターゲットとして H<sub>2</sub>O (OH 振動) を定めた。水中の OH の振動は、ラマンシフト 3000~3800 cm<sup>-1</sup> に広いピークを有する。そこでこの領域のスペクトルに着

目して、細胞での温度計測について検討した。計測対象としては HeLa 細胞を選んだ。図 2 に HeLa 細胞で実際に取得したラマンスペクトルを示す。

ガラスベースディッシュを加工して作製したディッシュで HeLa 細胞を培養した。また同様なディッシュを HBSS で満たし、純水でのスペクトル計測と温度校正を行なった。ラマン計測は、inVia™共焦点ラマン顕微鏡 (Renishaw) を用いて行った。画像取得には 63 倍の水浸対物レンズを用い、レーザーの波長は 532 nm、照射時間は 1 秒とした。同時に、ワイヤ型熱電対温度計 (IT-24P Ultra Fine Flexible Microprobe, Physitemp) を用いて細胞近傍の水温も測定した。このプローブの先端径は 100  $\mu\text{m}$  であった。様々な温度環境下でラマンスペクトルを記録するために、氷結または加熱によって様々な温度の HBSS を調製し、測定前に添加することによって温度を変化させた。まず HBSS について、3000~3800  $\text{cm}^{-1}$  近辺のラマンスペクトルがどの程度変化するかを調べた (図 2)。

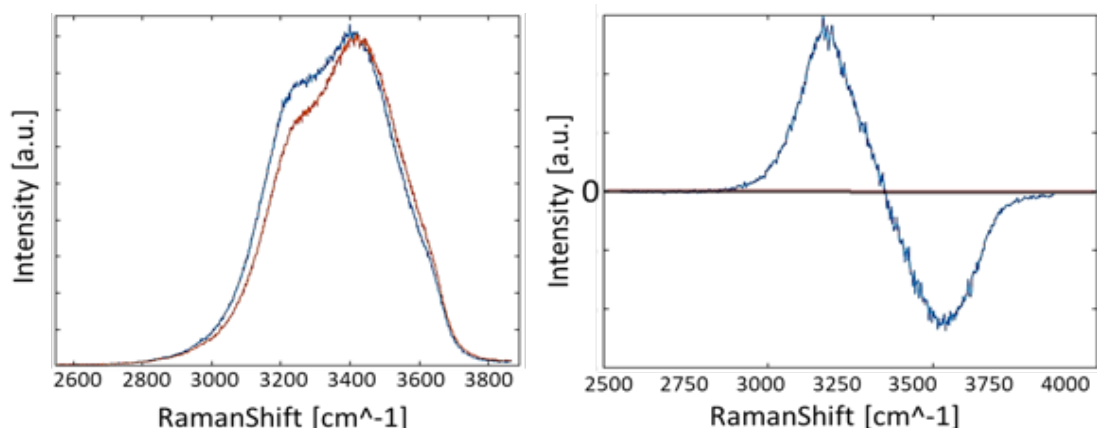


図 2 ラマンスペクトルの温度変化 (HBSS)

左の図で青のラインは 25°C、赤のラインは 46°C のスペクトルを示す。右の図は差分スペクトルを示している。

この結果、図 2 の左の差分スペクトルから差分が正の部分の面積と負の部分の面積の比 ( $R_r$ ) により、温度計測ができるかを調べた。

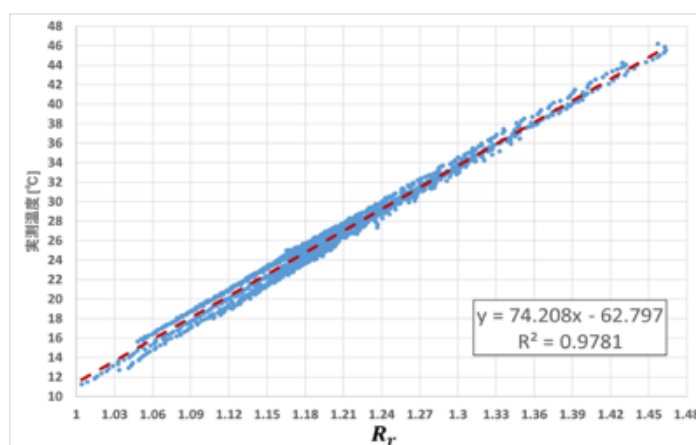


図 3  $R_r$  と温度との関係

図 3 に示すように、温度と  $R_r$  との間には良い相関があることから、同様な手法を HeLa 細胞についても適用した。OH 振動範囲のラマンスペクトルを HBSS 中の HeLa 細胞に関して室温で 100 回測定した。HeLa 細胞の場合には、2800 から 3100  $\text{cm}^{-1}$  に比較的鋭く小さいピークが現れた。これは、細胞内のさまざまな生体分子に基づいた CH 振動のスペクトルと考えられた。このため、このラマンシフト範囲に基づく解析では、測定温度との相関結果が著しく悪化した。したがって、CH 振動の影響を軽減するための追加の分析が必要であると考えた。

そこでさまざまな温度環境で測定した純粋な HBSS のラマンスペクトル ( $n=3800$ ) に Multivariate curve resolution alternating least square (MCR-ALS) 法を適用し、ラマンスペクトルを 2 成分スペクトルに分解することを試みた。その結果、「温度上昇と共に強度が増加する成分スペクトル」と「温度上昇と共に強度が減少する成分スペクトル」とに分離することができた (図 4)。この分離された成分スペクトルを CH 振動の影響を減らすために、3123.5 から 3567.9  $\text{cm}^{-1}$  の範囲に限定して調べた。その結果 HBSS の場合、分離 2 成分の強度比 ( $R_c$ ) と測

定された温度との間に高い相関が見られた。一方、HeLa 細胞の場合、 $R_c$  と測定温度との相関は  $R_r$  からわずかに改善されたが、それほど大きな違いはなかった。しかしながら、細胞毎に調べた場合では高い相関を示した。このことは、ラマン分光法により細胞温度計測を行う場合にはラマンスペクトルを取得後、個別細胞毎に温度較正を行う必要があることを示している。

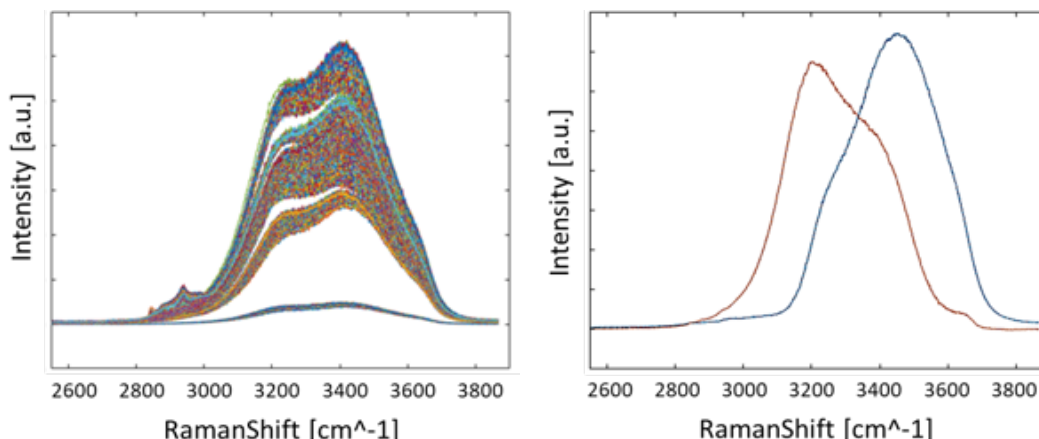


図 4 MCR-ALS によるラマンスペクトルの 2 成分分離

左は HBSS でのラマンスペクトル、右は MCR-ALS により 2 成分に分離した結果

(2) 非染色脳標本へのハイパースペクトルカメラの適用による脳地図作成法

脳地図は、様々な動物の脳神経科学研究の基盤を与える役割を果たしてきた。脳地図作製には、脳切片を染色し神経細胞やミエリンの分布等を可視化する必要があった。一方最近になって生体組織の無染色イメージング法が発達してきている。無染色手法では、染色の時間や費用が不要で、また個々の研究者の染色技術に依存しないイメージングが可能である。また、イメージング後でも他の実験に標本を使用可能であるといった多くの利点がある。一方でラマン分光法などの従来の無染色法では、撮影に必要な時間が非常に長く (~80 ms/pixel)、広範囲での脳の撮影は困難であった。そこで、本研究では無染色かつ高速な脳地図作製の新手法を確立することを目標とした。

ハイパースペクトルカメラを用いて、マウスおよびキンカチョウ (*Taeniopygia guttata*) の無染色脳切片の透過光から、透過率スペクトルを取得する。通常のデジタルカメラや人間の目は光を赤青緑の 3 色に分光して認識するが、ハイパースペクトルカメラは 100 以上に分光し、スペクトルを取得でき (図 5)、無染色脳切片から構造検出を行うための大規模データが得られる。また、この撮影は他の無染色手法と比較して非常に高速であり (0.01 ms/pixel)、1000 × 1000 pixel の画像を約 10 秒で取得できる (前述のラマンイメージングでは約 22 時間)。しかしながら、ハイパースペクトルイメージングでは数百万 pixel 分のスペクトル解析が必要であり、そのデータ量が膨大であるため、ヒトが視覚的に理解し、比較検討をすることは困難であった。それに伴い、過去の研究ではスペクトルの一部の波長帯にのみ注目する解析が一般に行われてきた。

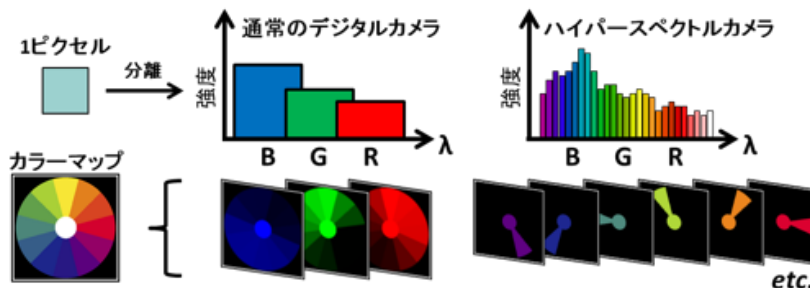


図 5 ハイパースペクトルカメラの原理

その課題を解決するため、本研究ではフーリエ級数展開に基づいたフェーザ解析を透過率スペクトルに適用した。この解析手法は、多重蛍光染色におけるスペクトル分離などにおいて、その有用性が示されている。これによりハイパースペクトルイメージにおける 1 pixel が有する透過率スペクトルを、その全波長帯域のスペクトル形状に基づいて、フェーザ平面上の一点に変換できる。

無染色脳切片のハイパースペクトルイメージを取得し、それらを構成する全ての透過率スペ

クトルをフェーザ平面上にマッピングした。フェーザ点の分布は、透過率スペクトルの形状を反映していた。これにより解析するデータ量を60分の1以下に圧縮し、全ての点データを密度ヒートマップとして同時に図示することで、スペクトルデータの比較が可能となった(図3)。その分布に対し12個の混合ガウシアンモデルのフィッティングを行い、フェーザ平面状に強度分布を作成、それに基づいて脳切片の再画像化を行った(図6左)。再画像化した画像は、脳切片組成の差異を検出していると考えられる。統一規格のガウシアンモデルを、マウスおよびキンカチョウの脳切片全体を構成する約1億個の透過率スペクトル群に対して適用することによ

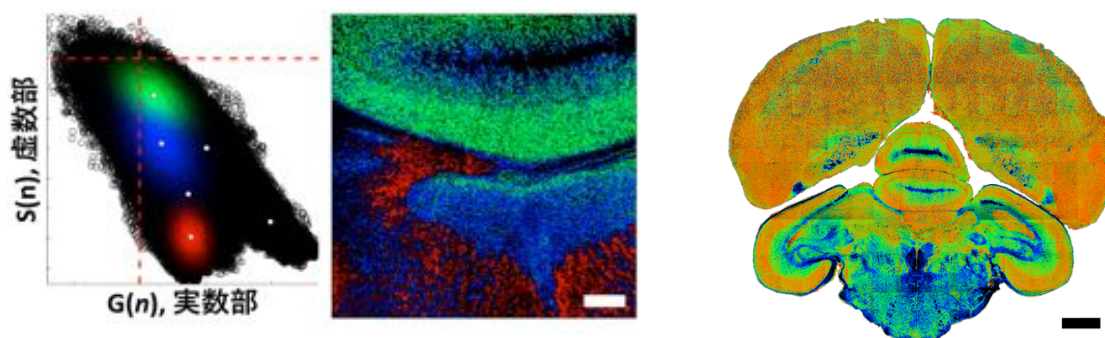


図 6 無線色標本の再画像化

左は混合ガウシアンモデルによる脳切片画像化の例(バーは200 $\mu$ mを示す)。右は同様な手法を利用して鳥脳切片全体を可視化した例(バーは1mmを示す)。

り、脳切片全体のイメージングも可能であった(図6右)。また、取得した画像は、脳地図の先行研究や蛍光染色で確認できるニッスルやミエリンの構造を反映していることがわかった。

本研究では、透過光に基づいたハイパースペクトルイメージと、ガウシアンモデルを用いたフェーザ解析により、無染色脳切片の組成・構造検出に成功した。この新手法は、無染色脳切片から高速で画像取得が可能であるという実験の簡便性と、スペクトルを点に変換することでデータを圧縮しつつ視覚的に評価と分類ができるという解析での利便性を併せ持っている。

これ以外にも高速に脳地図を作成する方法として、細胞核の染色画像を用いて、脳標本にボロノイ分割を適用し、一意に脳領域図を生成する手法の開発にも成功している。これらの非染色と染色の新規手法を併用することにより高速に脳地図を作成する準備は整った。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 7 件)

- ① Inoue S, Hotta K, Oka K.: Identification of brain regions by hyperspectral imaging without staining. Neuroscience 2018, 2018.
- ② Inda M, Hotta K, Oka K.: Temporal tuning system for acoustic factors in female avian auditory cortex. Neuroscience 2018, 2018.
- ③ 院田雅裕, 堀田耕司, 岡浩太郎, 鳥類高次聴覚野における神経応答と音響要因の経時的相関について, 第41回日本神経科学大会, 2018.
- ④ 遠藤実夏, 井上俊成, 院田雅裕, 堀田耕司, 岡浩太郎, 透明化手法とボロノイ分割による鳴禽類の脳における3次元構造の評価, 第41回日本神経科学大会, 2018.
- ⑤ Inoue S, Hotta K, Oka K.: Identification of specific brain regions by triple fluorescent images and Voronoi tessellation. Neuroscience 2017, 2017.
- ⑥ 井上俊成, 堀田耕司, 岡浩太郎, 多重蛍光染色とボロノイ分割によるキンカチョウ脳地図の作製, 第40回日本神経科学大会, 2017.
- ⑦ 岡浩太郎, 染めるべきか、染めざるべきか?それが問題だ。第48回JASSセミナー, RIKEN Singapore Representative Office, 2017.

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 院田 雅裕

ローマ字氏名: (INDA, masahiro)

研究協力者氏名: 井上 俊成

ローマ字氏名: (INOUE, shunsei)

研究協力者氏名: 遠藤 実夏

ローマ字氏名: (ENDO, mika)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。