

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01843

研究課題名（和文）培養細胞シート内の全細胞解析を目的とした超広視野三次元蛍光イメージング

研究課題名（英文）Ultra-wide field 3D fluorescence imaging for all cell analysis in cultured cell sheets

研究代表者

市村 垂生（Taro, Ichimura）

大阪大学・先導的学際研究機構・特任准教授（常勤）

研究者番号：50600748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、iPS細胞を利用した再生医療が進展しているが、その組織形成過程の理解は不十分で、イメージング技術の不足が一因である。これを解決するために、本研究では細胞シート内の全細胞を三次元で観察できる新しいイメージング法の開発に取り組んだ。具体的には、広視野イメージング法と計算器生成ホログラム技術を組み合わせた斜入射ライトシート蛍光顕微鏡を提案し、試料内の特定の面を選択的に励起する技術を確立し、生命科学や再生医療への応用可能性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞シートのように薄くて広い組織の三次元イメージングに適した蛍光イメージング技術を開発し、生命科学者に提供することで、細胞シートの形成メカニズムの理解を進め、高効率な細胞シート作成の技術革新を誘導できる。また、細胞生物学やシステム生物学など、生物学の複数の領域において、多細胞システムと単細胞間関係を、スケール階層を跨いで理解するための研究スキームを提供することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, regenerative medicine using iPS cells has made progress, but our understanding of the process of tissue formation is insufficient, partly due to a lack of imaging technology. To address this issue, this study was undertaken to develop a new imaging method that enables three-dimensional observation of all cells in a cell sheet. Specifically, we proposed a oblique incidence light-sheet fluorescence microscope that combines a wide-field imaging method and a computer-generated hologram technique, established a technique to selectively excite specific planes in a sample, and demonstrated its potential for life science and regenerative medicine.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：バイオイメージング 蛍光顕微鏡 培養細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞を利用した再生医療が急速に発展しており、心筋や網膜・角膜など培養細胞シートの移植手術への応用が始まっている。一方で、iPS 細胞から組織形成される過程の基礎的理解は十分ではなく、原理が未解明のまま応用が進んでいる状況にある。この原因の一つは、イメージング技術の不足にある。培養細胞シートのイメージングに求められる要件として、「多数の細胞を同時に観察できる三次元視野」、「ライブ観察可能な低光毒性」、「単細胞解像可能な三次元分解能」、「基板直上を観察可能」が挙げられる。従来のイメージング法にはこれらを同時に満たす方法が無かった。各種ライトシート顕微鏡は全脳や全個体イメージングに広く用いられているが[Power, et al. Nat.Methods 14, 360 (2017)]、培養細胞シートのように広くて浅いスケールのライブ観察には使えない。一方、脳神経組織の広視野・深部の二光子励起蛍光法も多数報告されている[Lu, et al., Nat. Methods 17, 291 (2020)など]が、今回ターゲットとする 1cm 以上の視野を実現した報告はない。そもそも、広視野観察には低倍率低 NA のレンズ系を用いるので、二光子や共焦点などのレーザー走査型は相性が悪い。

上記条件を満たすイメージング技術を開発し、生命科学者に提供することで、細胞シートの形成メカニズムの理解を進め、高効率な細胞シート作成の技術革新を誘導できる。また、細胞生物学やシステム生物学など、生物学の複数の領域において、多細胞システムと単細胞間の関係を、スケール階層を跨いで理解するための研究スキームを提供できる。

2. 研究の目的

この状況に鑑み、本研究では 1 cm を超える細胞シート内の全細胞解析できる三次元イメージング法の確立を目的とする。研究代表者がこれまでに開発した広視野イメージング法と、計算器生成ホログラム技術を利用した照明法を組み合わせた新規イメージング法を提案・開発する。この技術が確立すると、基礎生物学分野から、再生医療などの医療現場までの幅広い応用が期待できる。

3. 研究の方法

上述したように、本研究では細胞シート内の全細胞解析を目的とした広視野三次元イメージング法の確立を目指す。この目標を達成するために、本研究では、斜入射ライトシート蛍光顕微鏡を提案する。細胞培養ディッシュを簡単に観察するために倒立顕微鏡構成を採用し、ガラスプリズム上に試料を、マッチングオイルを介して設置する。入射系に配置した反射型空間光変調器 (LCOS-SLM) の CGH によってライトシートを作成し、プリズム斜面の窓から導入して、シート内の蛍光分子を面選択的に励起する。このとき、シートの焦点 (ビームウエスト) が試料内に位置するように CGH をデザインする。シート上で励起され放出された蛍光信号を、長作動レンズ系によってセンサーに結像する。斜入射ライトシート上の異なる深さからの蛍光を同時結像する。ライトシートを試料内で平行移動させながら、都度撮像していくことにより、試料内の三次元ボリュームすべてを記録できる仕組みである。

4. 研究成果

上記のコンセプトに基づき、488nm と 561nm の 2 色の励起レーザーを搭載した光学系を独自設計し、構築した。空間光変調器とガルバノミラーを用いた照明系によって励起光を試料内に入射し、長作動対物レンズによって観察系を組み合わせた。空間光変調器での計算器生成ホログラム (CGH) によって励起光の波面を操作し、試料内の特定の面内を選択的に励起できることを確認した。蛍光ビーズをゲルに埋め込んだ試料を用いた実験により、およそ 10mm の視野内で横分解能 1.2 μ m、奥行き分解能 6.5 μ m 程度の三次元分解能を達成できることを実証した (図 1)。

また、試料側の屈折率に合わせて、屈折率の異なるプリズムと照明角を選定することで、屈折率の異なる各種透明化試薬に対応できる方法を考案し、プリズムマウントなどの周辺器具を含めて、新規開発した。開発したイメージング系の生命科学応用として、マウス ES 細胞のコロニー

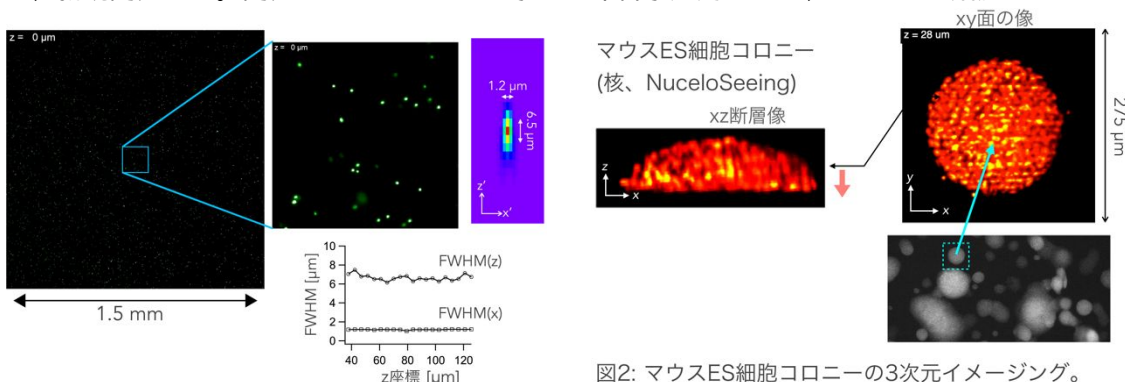


図1: 蛍光ビーズ(波長510nm、径200nm)による光学性能検証。

図2: マウスES細胞コロニーの3次元イメージング。細胞を化学固定し、核をNucleoSeeingで染色した。

の3次元イメージングを実施した。これにより、コロニー内の任意のレイヤーを選択的にイメージングできることを示すことができた(図2)。また、透明化したウズラ胚の三次元観察を実施した。血管内皮細胞にYFPが発現するトランスジェニックマウスを用いた。これにより、ウズラ内の血管ネットワークの三次元構造を観察できることを実証し、生命科学への応用を示した。これらの成果については現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ichimura T., Kakizuka T., Horikawa K., Seiriki K., Kasai A., Hashimoto H., Fujita K., Watanabe T. M., Nagai T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Exploring rare cellular activity in more than one million cells by a transscale scope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95930-7	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 市村垂生, 永井健治	4. 巻 33
2. 論文標題 100万以上の細胞を同時観察可能なトランススケールスコープ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 画像ラボ	6. 最初と最後の頁 17-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pan Xiuxi, Chen Xiao, Nakamura Tomoya, Yamaguchi Masahiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Incoherent reconstruction-free object recognition with mask-based lensless optics and the Transformer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Express	6. 最初と最後の頁 37962-37962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OE.443181	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 市村垂生, 垣塚太志, 永井健治	4. 巻 40
2. 論文標題 ミクロとマクロを同時に観る! トランススケールスコープAMATERASの構築方法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2302-2310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 市村垂生	4. 巻 51
2. 論文標題 広視野細胞動態イメージング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 269-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 市村垂生, 永井健治	4. 巻 33
2. 論文標題 100万以上の細胞を同時観察可能なトランススケールスコープ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 画像ラボ	6. 最初と最後の頁 17-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichimura Taro, Kakizuka Taishi, Sato Yuki, Itano Keiko, Seiriki Kaoru, Hashimoto Hitoshi, Itoga Hiroya, Onami Shuichi, Nagai Takeharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Volumetric trans-scale imaging of massive quantity of heterogeneous cell populations in centimeter-wide tissue and embryo	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.93633.1	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 Ichimura Taro, Kakizuka Taishi, Sato Yuki, Fujioka Yoichiro, Ohba Yusuke, Horikawa Kazuki, Nagai Takeharu	4. 巻 21
2. 論文標題 Strength in numbers: Unleashing the potential of trans-scale scope AMATERAS for massive cell quantification	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e211017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v21.s017	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 市村垂生, 糸賀裕弥, 垣塚太志, 大浪修一, 永井健治	4. 巻 34
2. 論文標題 細胞画像ビッグデータによるバイオDX	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 48-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichimura Taro, Kakizuka Taishi, Sato YuKi, Itano Keiko, Seiriki Kaoru, Hashimoto Hitoshi, Itoga Hiroya, Onami Shuichi, Nagai Takeharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Volumetric trans-scale imaging of massive quantity of heterogeneous cell populations in centimeter-wide tissue and embryo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.08.21.553997	査読の有無 無
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 市村垂生, 垣塚太志, 橋本均, 永井健治	4. 巻 52
2. 論文標題 センチメートルスケールの多細胞集団内のマイクロ現象を捉えるトランススケールスコープ	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 322-331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 市村垂生, 糸賀裕弥, 垣塚太志, 大浪修一, 永井健治	4. 巻 61
2. 論文標題 巨大データを生み出すトランススケールスコープとその取扱いを可能にする情報プラットフォーム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 光技術コンタクト	6. 最初と最後の頁 43-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 市村垂生
2. 発表標題 ブリルアン散乱で見る細胞の弾性イメージング
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taro Ichimura, Taishi Kakizuka, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Trans-scale optical imaging for direct observation of singularity phenomena
3. 学会等名 Pacifichem 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市村 垂生
2. 発表標題 センチメートル視野で多細胞動態を観るトランススケールスコープ
3. 学会等名 レーザー顕微鏡研究会第46回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市村 垂生
2. 発表標題 100万を越える細胞集団中の稀少細胞の探索を実現するトランススケールスコープ
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会 2021年6月16日（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Nakamura
2. 発表標題 Image Sensing with Optical Encoding
3. 学会等名 Joint Symposium on Symbiotic Intelligence and Data Futures (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Nakamura
2. 発表標題 Extended depth-of-field computational lensless imaging
3. 学会等名 The 11th Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Ichimura
2. 発表標題 Trans-scale scope for dynamic observation of all cells in a centimeter field of view
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市村垂生
2. 発表標題 トランススケールスコープで見えたもの、これから見えるもの
3. 学会等名 第31回日本バイオイメージング学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市村垂生
2. 発表標題 シンギュラリティ現象を直接観るトランススケールスコープAMATERAS
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taro Ichimura
2. 発表標題 Seeing dynamics of over-million cells for exploring rare special cells
3. 学会等名 The 13th International Meeting of the Asian Network of Research Resource Centers (ANRRC2022)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市村垂生
2. 発表標題 大視野細胞イメージング技術を基軸とする画像ビッグデータ駆動生物学
3. 学会等名 第333回研究会『光の日』シンポジウム「光エレクトロニクスの将来」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市村垂生
2. 発表標題 シンギュラリティ現象を直接観るトランススケールスコープAMATERAS
3. 学会等名 新学術領域「シンギュラリティ生物学」成果公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市村垂生
2. 発表標題 大視野細胞イメージング法と生命科学への応用展開
3. 学会等名 第17回日本分子イメージング学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taro Ichimura
2. 発表標題 Three-dimensional imaging of micrometer-scale cellular dynamics in centimeter-scale multicellular systems
3. 学会等名 EMBO Satellite Meeting “New Approaches for the Properties of Bio-materials”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taro Ichimura, T. Kakizuka, K. Itano, K. Seiriki, H. Hashimoto, Y. Sato, T. Nagai
2. 発表標題 Trans-scale scope for volumetric imaging of micrometer-scale cellular dynamics in centimeter-scale multicellular systems
3. 学会等名 The 20th International Microscopy Congress (IMC20)（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 佐藤 荘	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 211
3. 書名 シン・マクロファージ あらゆる疾患を制御する機能的多様性	

1. 著者名 武部貴則	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 230
3. 書名 オルガノイドがもたらすライフサイエンス革命：あなたの研究に、どう使う?進化と深化を生む未来型研究30選	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 蛍光イメージング装置	発明者 市村垂生、垣塚太志、永井健治、藤田克昌、橋本均	権利者 国立大学法人大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-104163	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 蛍光イメージング装置	発明者 市村垂生、永井健治、橋本均	権利者 国立大学法人大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-077341	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	中村 友哉 (Nakamura Tomoya) (70756709)	大阪大学・産業科学研究所・准教授 (14401)	

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
---------	---------