

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23500523

研究課題名(和文)次世代型細胞診断をめざした画像相関分析によるオルガネラ動態スペクトロスコピー

研究課題名(英文)Next generation organelle spectroscopy using image correlation analysis

研究代表者

野村 保友 (Nomura, Yasutomo)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：80237883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞レベルで細胞内小器官や特定の機能性タンパクの動的特性を定量評価できる画像相関分析の確立を目指した。ミトコンドリア遺伝子や低酸素誘導因子などいくつかの成功例を報告できた。これらは次世代型の細胞診断の到来を示唆するだけでなく、新たなドラッグスクリーニング法にもつながることが期待される。さらにその可能性を広げるべく、細胞自身動きがオルガネラやタンパクの動的挙動とオーバーラップするような場合を想定した心筋細胞を用いた実験及び再生医工学で特に重要な細胞外マトリクスの検討ができるように予備実験も行った。後者についてはこれからの展開次第ではますます画像相関分析の重要性が増すかもしれない。

研究成果の概要(英文)：This project was conducted to build the basis on the next generation diagnostic methods using image correlation spectroscopy. The methods were focused on organelle and biomolecules dynamics such as mitochondrial genome within mitochondrion and transcription factors within nucleus. For example, diffusion coefficient of mitochondrial genome in single living cells was two digits smaller than that in vitro, and was comparable to that of mitochondria. This suggests that mitochondrial genome may be bound to an internal structure of mitochondria matrix. Movements of most cells used above were quite inactive. However, the organelle spectroscopy would be possible to apply to cells with active motion, judging from experiments using primary culture of rat myocardiocytes and iPS myocytes. These fruitful outcomes would give a strong impact on previous diagnose and drug screening.

研究分野：生体医工学

キーワード：画像相関分析 拡散定数 ミトコンドリア ミトコンドリアゲノム 低酸素誘導因子 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

診断の機会が増えるミトコンドリア DNA (mtDNA) 異常に対して、その検出システムの開発が望まれていたが、従来法(ゲル電気泳動やサザンプロットなど)では操作が煩雑すぎるため、申請者らは科研費(平成 20-17 年、基盤研究 C(一般)17500299、代表:野村保友)のもと、蛍光相関分光法(FCS, Fluorescence correlation spectroscopy)を用いて、多サンプルを対象とする mtDNA 異常検出システムを開発した。

FCS は共焦点光学系を使って均一な溶液中にフェムトリットルの微小な観察領域を作り、その領域をレーザー光で照射する。蛍光分子がブラウン運動により観察領域を出入りする様子を蛍光強度揺らぎとして計測し、その時系列データを自己相関分析することによって蛍光分子の分子量と濃度を得るものである。しかし細胞のような不均一な系では、このようにいわば一点の定点観察では、その細胞の特徴を十分に抽出することは困難である。そこで申請者は FCS の観察領域を多点あるいは面へ拡張すれば不均一なサンプルを測定できると考えた。必要に応じて動画像の中から興味ある領域を選び、その領域内の全ピクセルに対して蛍光強度揺らぎから自己相関分析を行い、その自己相関関数の平均から動画像の選択範囲内にある mtDNA のような蛍光粒子の動態解析が可能であると考え、理論およびシミュレーションを行っていた。

この画像相関分光法(ICS, Image correlation spectroscopy)は高く評価され、この画像相関分光法を含めて細胞を測定対象とした最近の光学計測法の進歩をまとめるようにとのリクエストがあった。Guest Editor として Current Pharmaceutical Biotechnology 誌(インパクトファクター 3.404 の専門誌)に世界的に著名な研究者からの総説を中心に 16 編を集め特集号を企画した。申請者の巻頭言、画像相関分光法と画像解析の 2 報を含む 16 編全てが Editor in Chief によってアクセプトされた。当時の状況から判断して ICS の有用性が認められつつある段階に達したと考えた。

2. 研究の目的

ほとんどの細胞診断あるいはバイオプシーでは、各科の専門医が免疫反応を使って疾病特異的に標識された染色画像から定性的に判断している。しかしながら、例えばミトコンドリア病はミトコンドリア機能異常を原因とする病気の総称であるが、その症状は、単なる易疲労性から死に至るような神経・筋症状を伴う重篤なものまで多様であり、「原因不明な変性疾患をみたら、まずミトコンドリア病を疑え」といわれるほど臨床的にミトコンドリア病を診断することは容易でなく、煩雑な生化学的検査が要求される。症状の多くはミトコンドリアのエネルギー生成に強

く依存する神経系や骨格筋に現れやすいが、時には容易に採取可能な皮膚線維芽細胞にもミトコンドリア機能不全の兆候が現れる。したがって固定した組織片の免疫染色画像では得られないダイナミクスに関する情報について、生きた皮膚線維芽細胞のようなバイオプシーサンプルから抽出する解析法を確立できればそのメリットは極めて大きい。

本申請課題では ICS を細胞診断、さらにはドラッグスクリーニングに適用した場合のポテンシャルの高さを示すための実証的な研究として、(1)ミトコンドリア機能阻害剤の影響をミトコンドリアと mtDNA の拡散時間から検討した。(2)続いてミトコンドリアと同様に多彩な動的挙動が細胞機能に対して重要な役割を果たすと考えられる核などの細胞内小器官とそこに局在するタンパクにも注目した。その結果から多くの疾病への関与やその知見に基づいた薬物スクリーニング法も検討した。(3)接着したほぼ動かない細胞のオルガネラのダイナミクスだけでは細胞診断やドラッグスクリーニングには不十分であった。細胞自身が動いている環境にあるオルガネラのダイナミクスを解析できれば適用範囲が大いに広がると期待されたため拍動する心筋細胞も用いた。また(4)細胞外マトリクスの局所的な物性を解析する意義も大きい。例えば iPS 細胞の分化誘導のキーポイントは細胞外マトリクスにあると考えられており、本手法の確立は再生医工学にも大きく貢献できるものと考えられる。

従来の画像の相関分析では、2 枚の画像の類似点を抽出したり、あるいは移動物体の抽出などが主な使い方、時間軸上で動画像間の相関分析による動態解析は実用的にはほとんど行われてこなかった。これまでの動画像からの動態解析には注目するいくつかの粒子を抽出して軌跡解析することが多かったが、オルガネラの場合には形態がきわめて複雑であることなど軌跡解析が困難な場合が少なくなかった。これを解決すべく申請者らは蛍光相関分光法の研究からヒントを得て、動画像から動態解析を行うことは大変ユニークな試みであった。ICS は 1 枚 1 枚の画像内の対象の形態によらず、ピクセル一つ一つの時系列データの自己相関関数に、対象とする事象をもっともよく表す物理モデルから導出された解析式をフィッティングして拡散係数などの数値解を得るものであった。主観的判断が多かった細胞診断に定量的な手掛かりを与える可能性がある大変重要な研究である。

3. 研究の方法

3.1 mtDNA

細胞分裂など細胞自身の動きの影響がミトコンドリアの動的特性にほぼ影響しない測定対象として株化細胞 HEK293 及び COS7 を用いた。蛍光色素としてミトコンドリアを

MitoTracker DeepRed で、mtDNA を PicoGreen で二重染色した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000, Olympus) を用いて動画像を記録した。画像相関分析のプログラムは MATLAB で作成し、動画像を解析した。

3.2 低酸素誘導因子の核移行

低酸素誘導因子を遺伝子工学的に蛍光タンパクでラベルした。その発現プラスミドを HEK293 細胞に安定発現させた。上記顕微鏡で動画像を記録し、蛍光相関分析した。

3.3 細胞運動とオルガネラ

妊娠したウイスターラットを麻酔した。胎児ラットから摘出した心室筋を細切し、無菌的に初代培養した。自発的な拍動を開始した心筋細胞に対して電気刺激を行いペースングした。培養細胞用倒立顕微鏡で明視野観察し、オルガネラの挙動を評価した。膜電位依存性蛍光色素や量子ドットで染色し、蛍光観察した。

3.4 iPS 心筋細胞の分化

購入した凍結 iPS 心筋細胞を融解して培養した。培養面の形状を調節し、細胞塊の形成を促した。自発拍動開始までの推移を顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

4.1 mtDNA

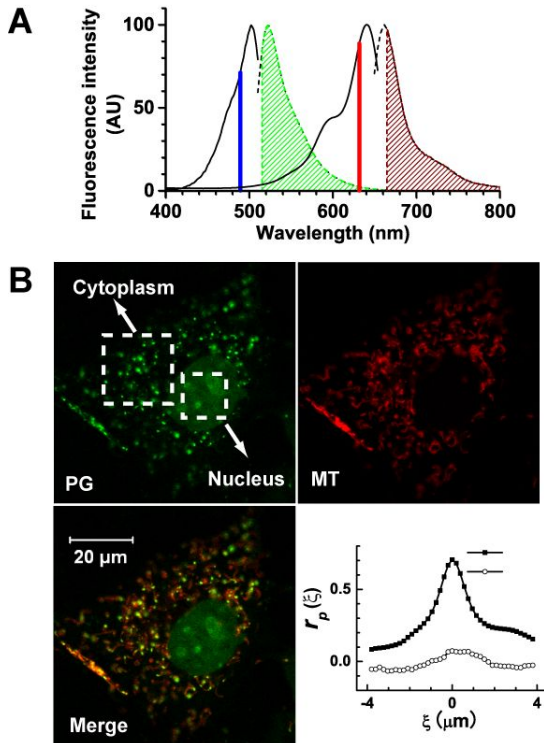


図1 mtDNA 染色実験 A:PicoGreen と MitiTracher deepRed のスペクトル。B:ミトコンドリアと mtDNA の二重染色像。図書 2 より改変。

図 1 に示すように培養細胞 HEK293 細胞内のミトコンドリアの中に mtDNA が局在することを空間的な画像相関分析により確かめた。

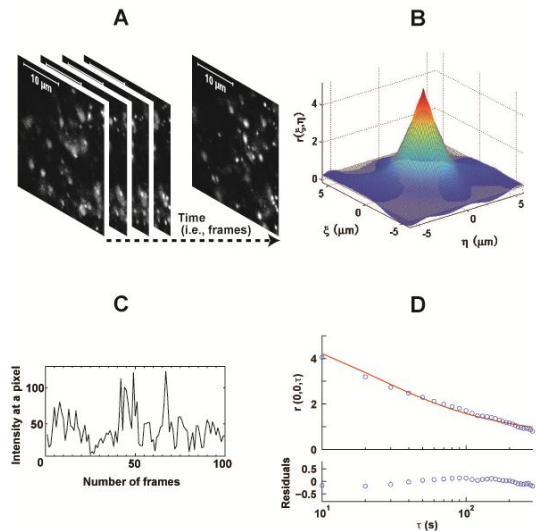


図 2 細胞内 mtDNA の時間領域の画像相関分析。論文 4 より改変。

図 2 に示すように画像相関分析による mtDNA の拡散定数を評価できた。得られた値はミトコンドリア画像を解析した値に近かった。このことは mtDNA がミトコンドリア内膜に結合しているという免疫化学的に確認されたデータと矛盾しなかった。それらの静的なデータと今回の動的なデータを比較できたことの意義は大きい。さらにミトコンドリア機能阻害剤アンチマイシン A 処理でミトコンドリア及び mtDNA の拡散定数の減少傾向を観察し、その原因の一つに活性酸素生成が疑われた。

4.2 低酸素誘導因子の核移行

この研究は、細胞を用いた薬効評価に対して蛍光相関分光法を応用する新たな試みである。従来のように細胞から標的タンパクの抽出を必要としないなど数多くの利点を含んでおり、その第一歩として選んだ低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α ,) は抗がん剤のターゲットとして近年注目されている。まずそれを蛍光タンパク (Green fluorescent protein, GFP) でラベルして観察した。

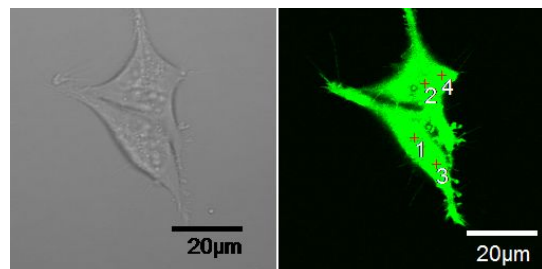


図 3 低酸素誘導因子の蛍光ラベル

GFP-HIF-1 安定発現株の蛍光写真を図3に示す。左図は位相差像であり、右図は同一細胞の蛍光像である。細胞質と核の領域を選びその蛍光強度の時間揺らぎを相関分析した。細胞質においても核内においてもこの蛍光タンパクが単純拡散すると考えたモデルの解析式にフィッティングした。このタンパクは

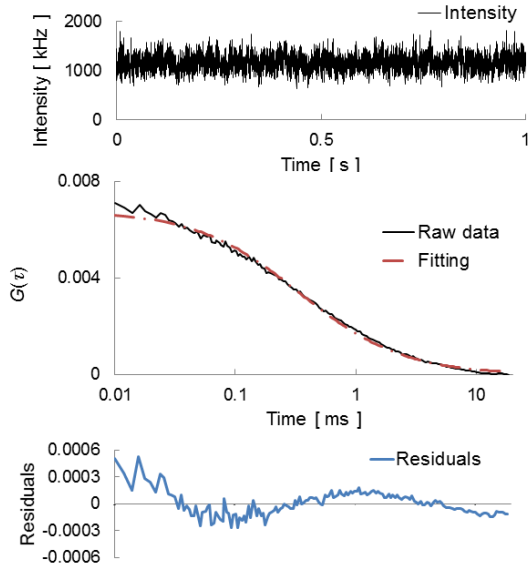


図4 コバルト処理した細胞の細胞質データの典型例

低酸素状態で活性化されるが、コバルト処理においても同様に活性化されることが知られている。コバルト処理した細胞質の計測された蛍光強度揺らぎの時系列データを自己相関解析した。図4に示すように得られた自己相関関数と、2成分フィッティングした結果がよく合っており、単純拡散のモデルに矛盾しない。拡散定数を用いて生細胞の細胞質・核に対して2成分解析し、遅い成分を図5にまとめた。遅い成分は低酸素誘導因子の活性に伴う現象と期待される。細胞質では遅

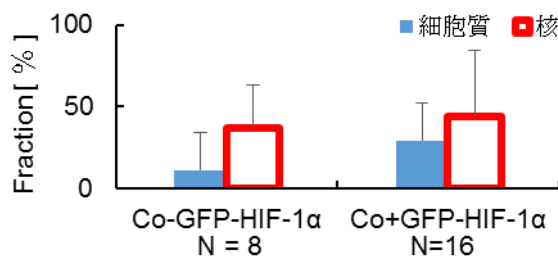


図5 遅い成分に対するコバルトの効果

い成分の割合に有意差(p<0.05)が得られた。したがってコバルト処理によって、GFP-HIF-1 の分解が抑制されたことを示唆した。

細胞内の蛍光強度揺らぎを相関分析すると、その活性化に伴って拡散定数が統計的に有意に小さくなることが明らかになった。以

上のことから薬物評価の領域への貢献は大きいと考えられる。

4.3 細胞運動とオルガネラ

通常の培養細胞ではその細胞自身の動きを考えることなく細胞内のオルガネラのダイナミクスを検討できるが、細胞自身の動きを無視できない場合もある。そこで本研究では心筋細胞にも注目した。

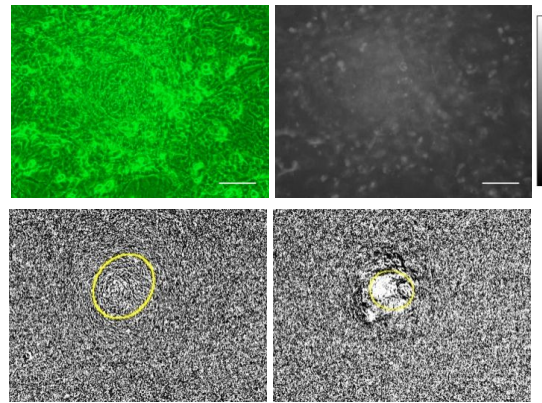
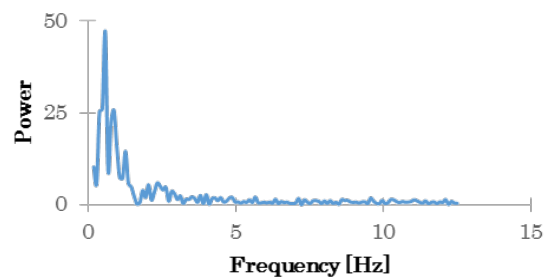


図6 ラット初代心筋細胞の位相差像(A)、蛍光像(B)、位相差像の差画像(C)、蛍光像の差画像(D)、画像内の楕円：ROI、スケールバー100 μm。

ラット胎児の初代心筋細胞は培養後2~3日で自発的な拍動を開始した。拍動を形態か



ら可視化するために明視野観察するとともに、心筋細胞の活動電位発生に伴う拍動の観

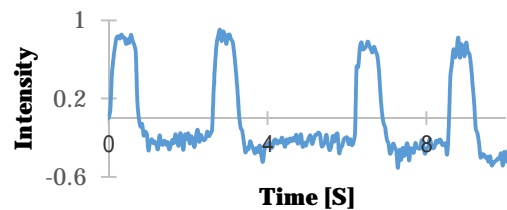


図7 心筋細胞の自発拍動(上)とそのフーリエ解析

点から膜電位感受性色素で染色した。図6では明視野像(上左)と蛍光像(上右)で観察し、拍動前後の差画像を左下および右下に示

した。さらに明視野像で設定した ROI の輝度値の経時変化とそのフーリエ解析を図 7 に示した。生体内よりは遅いが周期的な拍動を確認した。細胞内のオルガネラの動的挙動の解析はまだ済んでいないが、本実験からあらたな方向へ研究が進展した。それは新規量子ドットを用いて新たな生体電気活動の無侵襲計測法の確立である。従来の膜電位感受性色素の特徴を確認して当該量子ドットが満たすべき条件を整理し、実際の電気活動計測に適用できるのか検討した。現有の計測機器の制約から活動電位の脱分極時間が長いラット初代心筋細胞を用いて、拍動に伴う蛍光シグナルを従来色素と同様に新規量子ドットで確認した。拍動に伴うモーションアーチファクトを取り除いた電気活動に伴う蛍光シグナルを量子ドットで確認する必要性を指摘した。無侵襲生体計測領域への貢献は大きい。

4.4 iPS 心筋細胞の分化

細胞塊形成は自発的に拍動するために重要な要素であることがわかった。細胞塊の形成は細胞外マトリクスの培養ディッシュへの接着の抑制および細胞塊形成促進のためにディッシュ形状の工夫が必要であった。試行錯誤の末に最適化した培養ディッシュで心筋細胞塊が安定して形成され、ほとんど細胞塊は 3 日以内に自発的に拍動した。細胞外マトリクスの微環境（微小粘性など）を検討したい。

4.5 まとめ

当該課題では主に培養細胞レベルで細胞内小器官や特定の機能性タンパクの動的特性を定量評価できる画像相関分析の確立を目指した。ミトコンドリア遺伝子や低酸素誘導因子などいくつかの成功例を報告できた。これらは次世代型の細胞診断の到来を示唆するだけでなく、新たなドラッグスクリーニング法にもつながることが期待される。さらにその可能性を広げるべく、細胞自身の動きがオルガネラやタンパクの動的挙動とオーバーラップするような場合を想定した心筋細胞や再生医学で特に重要な細胞外マトリクスの検討ができるように予備実験も行った。後者についてはこれからの展開次第ではますます画像相関分析に重要性が増すかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1 Nomura Y

Challenges and Advances in Near Infrared Spectroscopy for Evaluating Hemodynamics in Brain

Biomed Sci Eng. 2015, 3(2), 35-40

2 Nomura Y, Nishimoto K, Nakayama K, Sugawara T

Current Optical Evaluation of Freshness of Seafoods
Studies in Chemical Process Technology 1(2), 25-29, 2013

3 Nomura Y.

Direct quantification of mitochondria and mitochondrial DNA dynamics.
Curr Pharm Biotechnol. 2012 Nov; 13 (14): 2617-22.

4 Matsuo T, Nakayama K, Nishimoto K, Nomura Y

Image Processing Methods for Quantitative Analysis of Mitochondrial DNA Dynamics.
Biochem & Anal Biochem 2012 S3:001. doi: 10.4172/2161-1009.S3-001

5 Goto T, Sato M, Takahashi E, Nomura Y.

Image analysis of colocalization of nuclear DNA and GFP labelled HIF-1 α in stable transformants.
Curr Pharm Biotechnol. 2012 Nov; 13 (14): 2547-50..

6 Nomura Y, Kinjo M.

Editorial: Current optical procedures used in cell biology.
Curr Pharm Biotechnol. 2012 Nov; 13 (14): 2545-6.

7 Sugawara T, Nomura Y, Kato S, Yoshioka T, Kinoshita Y, Oda I

Fluorescence Spectroscopy in Rapid Analysis of Scallop Adductor Muscle
IEEJ Trans. FM. 131(1): 51-52, 2011

〔学会発表〕(計 10 件)

1 宮本一範、村上可法、糸谷俊之、廣瀬智紀、神 隆、野村保友
生体電気活動の無侵襲計測をめざした近赤外量子ドットの研究～心筋細胞を用いた基礎的検討
電気学会東京支部群馬栃木支所研究発表会、前橋、平成 28 年 3 月

2 糖化ヘモグロビンの蛍光相関分析に及ぼす吸収の影響
野村保友、松尾篤史、千葉真優香
バイオプティクス 2015、浜松平成 27 年 11 月

3 松尾篤史、野村保友、丸山恭平、中山恭兵、千葉真優香
蛍光相関分光法によるヘモグロビン A1c の計測
生物物理学学会年会、金沢、平成 27 年 9 月

4 野村保友、田中悠樹
蛍光性低酸素誘導因子の蛍光相関分析
招待講演 バイオプティクス 2014 (12 月、

阪大豊中)

5 Nomura Y, Nakayama K.

Detection of glycated hemoglobin using
fluorescence correlation spectroscopy
AMT-BHI (Maebashi), 56, 2013

6 野村保友, 松尾俊貴

ミトコンドリア DNA の細胞内ダイナミクス
の画像相関分析
招待講演 バイオプティクス 2013 (1 2 月、
東京農工大)

7 中山恭兵、西本一紀、白石真也、多々良健
太、阿部孝成、野村保友

蛍光相関分光法による HbA1c の定量的評価を
目指した解析方法の比較
生体医工学シンポジウム 2012(阪大基礎工)

8 西本一紀、高尾淳史、中山恭兵、松尾俊貴、
野村保友

コラーゲン生体模擬モデルを用いた蛍光測
定による糖化過程の解析
生体医工学シンポジウム 2012(阪大基礎工)

9 野村保友、田中悠樹、松尾俊貴、中山恭兵

蛍光性低酸素誘導因子発現細胞の画像分析
招待講演 バイオプティクス 2012 (1 2 月、
山口大理)

10 野村保友、中山恭兵、西本一紀、金城政
孝

糖化ヘモグロビンの蛍光相関分析
招待講演 バイオプティクス 2011 (1 2 月、
東京農工大)

〔図書〕(計5件)

1 田中悠樹、野村保友

蛍光性低酸素誘導因子の相関分析
前橋工科大学研究紀要 18, 23-25, 2015

2 中山恭兵、金城政孝、野村保友

糖化ヘモグロビンの蛍光相関分析
化学工業, 64(8), 574-579, 2013

3 Nomura Y

Evaluation of Mitochondrial DNA Dynamics
Using Fluorescence Correlation Analysis,
Current Frontiers and Perspectives in Cell
Biology, 2012, Prof. Stevo Najman (Ed.), ISBN:
978-953-51-0544-2, InTech,

4 野村保友、西本一紀、古沢麻衣

光トレーサとしてのヘモシアニン酸素解離
曲線の実験的検討(第2報)イカヘモシアニ
ンの貯蔵に伴う変化
前橋工科大学研究紀要 15, 89-92, 2012

5 野村保友、西本一紀

光トレーサとしてのヘモシアニン酸素解離

曲線の実験的検討

前橋工科大学研究紀要 14, 55-57, 2011

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 電気刺激器具

発明者: 今村一之、石川保幸、岡田富男、小
田垣雅人、野村保友、原川哲美、
向井伸治、織間 稔、下田真也、遠藤隆志
権利者: 今村一之、石川保幸、岡田富男、小
田垣雅人、野村保友、原川哲美、
向井伸治、織間 稔、下田真也、遠藤隆志
種類:

番号: 特願 2014-22143

出願年月日: 平成 2 6 年 2 月 7 日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.maebashi-it.ac.jp/department/department/sle/teacher/images/nomura-lab.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村保友 (NOMURA YASUTOMO)

公立大学法人 前橋工科大学 システム

生体工学科 教授

研究者番号: 80237883

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者

松尾篤史 (MATSUO ATSUSHI)

前橋工科大学 大学院 院生

宮本一範 (MIYAMOTO KAZUNORI)

前橋工科大学 大学院 修了生

田中悠樹 (TANAKA YUHKI)

前橋工科大学 大学院 修了生

松尾俊貴 (MATSUO TOSHIKI)

前橋工科大学 大学院 修了生

西本一紀 (NISIMOTO KAZUKI)

前橋工科大学 大学院 修了生

中山恭兵 (NAKAYAMA KYOHEI)

前橋工科大学 大学院 修了生