

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650280

研究課題名（和文） ラマンスペクトル計測による細胞分化ダイナミクスの検出

研究課題名（英文） Raman spectrum analysis of cell differentiation dynamics

研究代表者

佐甲 靖志 (SAKO YASUSHI)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・主任研究員

研究者番号：20215700

研究成果の概要（和文）：

ヒト乳癌由来培養細胞 MCF-7 は培地への heregulin 添加によって、乳腺細胞様に分化する。分化に伴う細胞の内部状態変動を Raman 分光法により追跡した。多次元の細胞内部状態を、単一細胞かつ非破壊で検出する方法として Raman 分光法は最も適当な方法である。我々は最長 12 日間に及ぶスペクトル変動を解析し、主要細胞内成分がサイクルを描きながら変化していくことなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

A human breast cancer cell line, MCF-7 differentiates into mammalian grand-like cells upon addition of heregulin to the culture medium. In this study, we traced changes of cellular internal states by means of Raman spectrum measurement, which is a potent method to detect multi-dimensional intracellular dynamics in single cells with minimal disruption. Analysis of the Raman dynamics up to 12 days though the differentiation process has revealed pseud-circular trajectory of the major intracellular components.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：1 細胞計測、多成分解析、分光

1. 研究開始当初の背景

細胞外信号に対する個々の細胞応答は、クローン集団内においても大きく変動する。従って、単一細胞診断や再生医療における分化制御を実現するには、応答変動の原因のひとつである細胞状態を定義し、その遷移則を理解した上で、細胞操作を行う必要がある。

多くの研究で使われている遺伝子や蛋白質などの分化マーカーは、マーカーが未知の過程や、マーカーの変動以前の初期段階の検出には適用できない。細胞集団あるいは単一細胞での、網羅的な遺伝子・蛋白質発現・代謝産物解析法も精力的に開発されつつある

が、現在の所、破壊的であり、同一試料の時系列変化は追跡できない。これらの方法と相補的な計測法として、マーカーを使わず（無染色）に、非侵襲で、単一細胞の状態変化ダイナミクスを追跡する方法が求められている。

我々は、既にヒト乳癌由来の MCF-7 細胞の heregulin (HRG) 依存的な分化過程におけるラマンスペクトルを予備的に計測し、分化前後のスペクトル変化のみならず、分化の中間過程における、特徴的なダイナミクス変動を発見した。そこで、ラマンスペクトルを利用して、細胞分化過程を追跡し、特徴的なダイナミクスを明らかにすることが可能であると

期待して本研究に着手した。

生体試料のラマン計測はこれまでも行われていたが、単一細胞レベルで、細胞分化過程の多次元ダイナミクス追跡に応用する試みは、我々の知る限り初めてであった。

2. 研究の目的

単一細胞（細胞小器官レベルの解像度）のラマンスペクトル計測・解析法を開発して、細胞分化過程のダイナミクスを追跡する。細胞の個性、細胞分化の過程に依存した細胞状態を定義し、その変動や遷移の法則を明らかにして、細胞応答を予測する。そのため、単一細胞の分化過程を連続的に計測するシステムを導入し、MCF-7 細胞の分化過程を解析する。

従来の生体ラマン分光研究は、スペクトルが得られた後、ほぼ例外なく個々のピークの分子同定に向かってきた。我々は細胞レベルのラマン計測の利点は、具体的な成分分析よりは、総体的なダイナミクス解析にあると考える。詳細な成分分析なら、ゲノム、プロテオーム、メタボロームそれぞれの計測法種々考案され実用化されている。本研究で対象とする細胞の分化過程は、我々の共同研究者によって、細胞集団レベルで網羅的なゲノム・プロテオーム解析が行われている。単一細胞・時系列ダイナミクスの視点から、網羅的方法を補うことがラマン分光の目標である。

3. 研究の方法

当研究室で所有する倒立型レーザー蛍光顕微鏡装置にラマン分光装置を組み込み、顕微鏡下で長期細胞培養しながら、単一細胞～細胞内小器官の空間レベルで、継続的にラマンスペクトルを計測・記録するシステムを立ち上げる。

顕微鏡下で細胞分化を誘導し、最適化した計測条件で、単一細胞から得られたラマンスペクトルの変動を記録する。多次元スペクトル解析の種々の手法を適用し、また、新たな解析法開発を行う。乳癌細胞の分化システムを計測対象とする。以前に得られている単一細胞の分光計測結果に付いても、新たな解析法で詳細な分析を行う。

計測結果に基づいて、細胞分化の状態遷移図を書き、細胞分化ダイナミクスの一般的性質を明らかにする。

4. 研究成果

顕微ラマン分光装置の組み立て

現有装置に本予算で購入した分光装置を導入し、単一細胞ラマン分光計測を可能にした。装置は 532 nm および 561 nm の固体レー

ザーを励起光源とし、CO₂ インキュベータ培養装置を持つ倒立型蛍光顕微鏡下で、石英ガラス上に培養した細胞に水浸対物レンズで回折限界に絞り込んだレーザーを照射する。レーザー光は、ガルバノメータミラーで後述する分光器のスリット方向へ走査可能に設計している。顕微鏡上で数日間の細胞培養が可能であることを確認した。

試料からのラマン散乱その他の発光を同じ対物レンズで捉え、長波長側をダイクロイックミラーとラマンノッチフィルターで励起光と分離して、分光器のスリットへ導入する。光路の切り替えによって、試料の透過および蛍光画像を EM-CCD カメラで取得し、照射位置を確認する。

分光器でスリットの垂直方向へ分光した発光スペクトルを背面照射型冷却 CCD カメラのチップ上に積算し、読み出す。装置制御の電子回路を設計・製作した。

本装置は、片側スリット式の共焦点顕微鏡であり、長期細胞培養の都合上、倒立顕微鏡に組み立てられているので、石英カバーガラスを通した計測になっている。しかし、インデンやシリコンなどの標準試料や、さらに生細胞のスペクトルにおいても、市販品のピンホール型共焦点顕微ラマン装置で、カバーガラスを使わない水浸レンズを使用して取得したスペクトルと遜色ない計測データが得られている。

細胞分化過程の分光計測 1

ヒト乳癌由来の培養上皮細胞 MCF-7 は、小蛋白質 heregulin (HRG) の培養液添加によって乳腺細胞様に分化し、脂肪滴の蓄積、アルブミン分泌など代謝経路を変化させる。分化過程は 2 週間程度の連続的 HRG 添加で完了する。ラマンスペクトル計測によって、分化過程の追跡を行った。

HRG 添加前(0 日)、添加後 1, 3, 6, および 12 日目の細胞の細胞質において 532 nm 励起で発光スペクトル計測を行った。3 日後以降は細胞質中に脂肪滴が観測される。計測は脂肪滴を避けて、細胞質中 (~1 μm³ の体積) で行った。積算時間 30 秒で、ラマンシフト 600~2,000 cm⁻¹ の領域に多数のピークを含むスペクトルが得られた。また、ラマンバンドの背景に、細胞の自家蛍光に由来すると思われるなだらかな信号を検出した。

背景光部分を取り除いたラマンスペクトルの持つピークには、核酸・蛋白質・脂質等に由来すると同定されるものが多数あった。細胞分化過程につれたこれらの時間変化は数種類のパターンに類別される。たとえば核酸由来のピークの全スペクトル強度に対する割合は、1 日目に増加し 3 日目に減少した後、6 日目には再び増加する。脂質由来のピークの割合は核酸と反相関して、1, 6 日目に

少なく、3日目に多い。蛋白質は中間的である。これらの動態は分子種毎にはっきり区別できる訳ではないが、分化過程の進行に伴って、細胞質組成が複雑に変動することを示している。

全てのラマンスペクトルを集めて主成分解析し、第3主成分までの相空間に0日目、12日のスペクトルをプロットすると、両者の分布は分離しており、分化前後の細胞がラマンスペクトルで区別できる。

第1、第2主成分平面に、各日のスペクトルをプロットすると、第1主成分軸方向を底辺とする2等辺3角形の辺上にスペクトルが集まっていた。3頂点付近には、それぞれ蛋白質、脂質、水に富むスペクトルが観察された。すなわち対向する各辺上には蛋白質成分の少ないスペクトル、脂質成分の少ないスペクトル、蛋白質と脂質に富む高濃度のスペクトルが集まっていることになる。興味深いことに、各日のスペクトルは3辺を周期的に移動していた。0日目は高濃度、1日目は低脂質、3日目は低蛋白質、6日目は高濃度に戻り、12日目は再び低脂質となる。完全分化に近いと思われる12日目で低脂質となるのは、細胞質溶液中の脂質の多くが油滴へ輸送されたためであろう。

以上のようにラマンスペクトルのダイナミクス解析から、細胞成分が周期的に変動しながら分化へ向かう様子が見えてきたが、周期性を持つと言うことは、全ての分化過程を区別することができないということである。そこで背景光信号の情報を加えて分化を追跡することを考えた。

脂質酸化物には、可視光領域で強い蛍光を発するものがある。また、NAD, NADHやある種のビタミン、ヘムの代謝物なども今回の観測領域に蛍光を持つ。ラマンスペクトルの背景光は、これらの代謝産物の蛍光（細胞の自家蛍光）に由来すると思われる。

ラマン散乱と自家蛍光を含む全発光スペクトル情報を可視化するため、SIMCA (soft independent modeling of class analogy)法を用いた。0日目のスペクトルをモデルとして、第1、第2主成分平面と平均値（原点）を求め、各々のスペクトルについて、原点からの距離（長さ）を横軸に、第3成分以降による平面までの距離を縦軸にプロットした。このプロット上では、0日目と3日目、1日目と12日目を分離することができ、分化ダイナミクスを可視化できた。このプロットに基づいて、未知試料の分化状態を推定できるはずである。

細胞分化過程の分光計測2

先の実験は単一細胞の分光計測ではあるが、同一の細胞を連続的に計測して得たデータに基づくものではない。分化および増殖応

答の初期過程を、同一細胞で連続的に計測することを試みた。

epidermal growth factor (EGF)はHRG類似の蛋白質であるが、MCF-7細胞に分化ではなく増殖促進をもたらす。細胞培養液にHRGまたはEGFを添加し、20分おきに2時間の間同一細胞のラマンスペクトルを計測した。24時間後から2時間の間にも同様の計測を行った。対照として無処理の細胞でも同様に2時間の計測を行った。

光毒性を軽減するため、励起レーザーの強度を下げて、各条件で数10個の細胞をランダムに選び、それぞれの時間に細胞質と細胞核を合わせて単一細胞から15点の計測を行った。細胞毎に、細胞質および核のスペクトルをそれぞれ平均して1細胞の計測データとした。以下、細胞質の平均スペクトルの第1、第2主成分空間でのダイナミクスを論じる。

2時間の計測時間内の時間情報を無視して多細胞・多時刻のスペクトル分布を見た。無処理細胞の分布に比べて、最初の2時間の分布はEGF（増殖）、HRG（分化）どちらの信号を受けた細胞でも標準偏差が20~30%広がっていたが、分布の重心に明確な差は認められなかった。24時間後にはHRGで分布のさらなる広がり(~70%)と重心の変位（標準偏差と同程度）が認められたのに対し、EGFでは分布幅は2時間よりも縮小し、重心の変位もなかった。どの分布の中にも、明確な下位構造は存在しなかった。

2時間の間の単一細胞のスペクトルダイナミクスは、どの場合もほぼランダム運動（拡散運動）であり方向性は見えないが、運動範囲は著しく制限されており、20分（計測の1ステップ）で計測時間（2時間）内の最大平均2乗変位の70~80%に達する。1ステップの平均変位を比較したところ、EGF, HRGいずれの場合も添加後の時間に関わりなく、無処理時よりも変位速度が大きくなっていることが分かった。HRGでは特に変位速度の増大が著しく、無処理時の2倍程度に達する。

以上の結果は、無刺激時の細胞においても細胞質代謝産物の構成が、限られた範囲内ではあるが10分の単位で動的・ランダムに変化していること、増殖・分化因子によって、変化の範囲は多少大きくなるが、変化の内容はランダムであり、むしろ変化速度（拡散係数）の増加が目立つこと、分化刺激(HRG)では24時間後に代謝産物構成の細胞間平均の変化が認められるが、細胞間の差異や、単一細胞内の時間変化が、平均値の差と同程度であること、それに対して増殖刺激(EGF)24時間後では、無刺激時に比べて大きな分布幅や変化速度が維持されているものの、刺激前の状態へ収束しつつあること、などを示している。

要約すると、増殖・分化の初期過程における細胞内部状態ダイナミクスは、特定方向へのベクトルの移動というよりは、乱雑さの増大であり、分化過程においては、乱雑な変動をしながら状態の分布が変位していく。この変位が、あらかじめ存在する2つのポテンシャル間を個々の細胞が細胞移動することで起こるのか、一つのポテンシャルが徐々に位置を変えていくのかは、まだ明らかでない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件) 全て査読有り

1. Ishihara, J., Tachikawa, M., Mochizuki, A., Sako, Y., Iwasaki, H., and Morita, S. (2013) Raman imaging of the diverse states of the filamentous cyanobacteria. Proc. SPIE 2013 in press.
2. Morita, S.-i., Takanezawa, S., Date, A., Watanabe, S., Murakami, T. N., Kawashima, N., Sato, H., and Sako, Y. (2012) Raman spectroscopic analysis of H₂O₂-stimulated three-dimensional human skin models. J. Spectroscopy 2013, 903450 (6 pages).

[学会発表] (計8件)

1. Takanezawa, S., Morita, S.-i., Ozaki, Y., and Sako, Y. (2012.9.22) Measurements of single cell dynamics upon stimulation with a differentiation factor using Raman micro-spectroscopy. 日本生物物理学会第50回年会 名古屋
2. 高根沢聡太、盛田伸一、佐甲靖志、尾崎幸洋 (2012.5.19-20) 細胞分化ダイナミクスのラマン計測と相関分光 第72回分析化学討論会 鹿児島
3. 伊達朗、盛田伸一、遠山和美、佐甲靖志 (2012.3.29) ヒト皮膚表皮における振動分光法によるシミの超早期発見の検討(2) 新規可視化法の開発 日本薬学会第132年会(ハイライト講演)、札幌
4. 高根沢聡太、盛田伸一、廣島通夫、三井敏之、尾崎幸洋、佐甲靖志 (2012.3.15-18) ラマン分光法による細胞分化の識別 2012年春季 第59回 応用物理学関係連合講演会、東京
5. 盛田伸一、高根沢聡太、伊達朗、尾崎幸洋、佐甲靖志 (2012.3.15-18) ヒト皮膚色素化のラマン計測 2012年春季 第59回 応用物理学関係連合講演会、東京

6. 佐甲靖志、細胞運命決定のゆらぎ (2012.2.15) 自然科学研究機構プロジェクト合同シンポジウム「脳神経情報の階層的構造」「機能生命科学における揺らぎと決定」 岡崎

7. Morita, S.-i., Takanezawa, S., Hiroshima, M., Mitsui, T., and Sako, Y. A phase diagram of cell differentiation based on Raman spectroscopic measurements. (2011.9.16) The 49th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Himeji

8. 佐甲靖志、細胞内反応とそのゆらぎ (2011.5.13) 光エレクトロニクス第130委員会 創立50周年記念シンポジウム「光による新しい科学技術・産業の創成」 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.go.jp/cell-info/>

http://www.riken.go.jp/research/labs/chief/cell_inf/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐甲 靖志 (SAKO YASUSHI)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・主任研究員

研究者番号：20215700

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

盛田 伸一 (MORITA SHINICHI)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・協力研究員

研究者番号：40462741