

ラマン顕微鏡を用いた未病検出技術の開発

申請代表者	渡邊 朋信	理化学研究所生命機能科学研究センター・ 先端バイオイメージング研究チーム	チームリーダー
所外共同研究者	市村 垂生	大阪大学先導的学際研究機構・ 超次元ライファイメージング研究部門	特任准教授
所外共同研究者	春木 孝之	富山大学学術研究部都市デザイン学系	准教授
所外共同研究者	吉田 泰彦	富山大学工学部	学部生
研究統括者	門脇 真	病態制御研究部門消化管生理学分野	教授
所内共同研究者	小泉 桂一	臨床科学研究部門漢方診断学分野	准教授

■背景・目的

中国最古の医学書「黄帝内経」（こうていだいけい）の中に未病の概念が記されているが、その存在は科学的には証明されていなかった。研究統括者の門脇、小泉、奥（和漢研）ら、および東京大学生産技術研究所 合原教授らの共同研究グループは、複雑系数理学の「動的ネットワークバイオマーカー」理論（DNB理論）を用いて¹⁾、生体の遺伝子レベルでのゆらぎを捉える事で、メタボリックシンドロームの未病の存在を世界で初めて科学的に証明した²⁾。このことにより、今後、従来の枠組みを超えた未病に対する先制医療戦略の構築が期待されている。しかしながら、この基礎研究の成果を臨床の場実装するには、DNB理論によって検出される生体のゆらぎ情報を非侵襲的に計測可能な技術の開発が必須である。現在、情報処理の専門家である富山大学都市デザイン学部の春木らも参画し、これらを積極的に推進しているところである。

一方で、ラマン散乱現象がチャンドラセカール・ラマンによって初めて発見されたのは1928年のことであり、材料科学では、物質の組成・構造の標準的な分析法の1つとして一翼を担ってきた³⁾。現在、ラマン顕微鏡は細胞イメージングへの応用が積極的に推し進められている⁴⁾。具体的には、細胞内をラマン計測する場合、観測されるラマンスペクトルは、細胞に含まれる多種多様な生体分子のスペクトルを同時に含んでおり、ほぼすべての生体分子がラマン活性であるため、原理的には、そこにあるすべての分子の情報を内包していることになる。研究代表者の渡邊（理研）、市村（阪大）は、細胞のラマンスペクトルを「細胞の指紋」と見做し、細胞状態によってスペクトルが異なるのであれば、それらの非侵襲的な識別・同定に使用できると考え、すでに成果を報告している⁵⁾。各種細胞株や分化前後等、様々な細胞の種類や状態が、ラマン散乱スペクトルの形状により異なっており、多変量解析などを用いることで細胞毎に分離される^{5, 6)}。さらに、上記手法により細胞の状態遷移がエネルギー地形上の「アトラクター」の消失と出現として可視化される⁷⁾。アトラクターの消失と出現にはタイムラグがあり、細胞状態が遷移する際には不均一性が増加する、すなわち「細胞状態はゆらぐ」ことが確認された。細胞状態の遷移とは、細胞内で遺伝子発現の変化である。遺伝子発現の変化に伴い構成分子の種類や比率も変化し、それに伴いラマン散乱スペクトルも変化すると考えられる。渡邊らは、薬剤耐性大腸菌を研究題材とし、ラマン散乱スペクトルが遺伝子発現と相関があることを実証し⁷⁾、未知の薬剤耐性菌の遺伝子発現の推定にも挑戦している。ラマン散乱スペクトルは、代謝ネットワークに大きく依存する。ラマン散乱光スペクトルと遺伝子発現パターンとの相互関係をクラスタリングすることで、これまでの分析・分解型研究では別々に扱われていた、代謝ネットワークと遺伝子発現ネットワークと言う層の異なるネットワーク間の関連性を同時に扱える。すなわち、従来のサイエンスとは異なり、多層を交えた定義が定量的に可能になる。本手法は、従来の分析・分解型研究では別々に扱われていた代謝ネットワークと遺伝子発現ネットワークと言う層の異なるネットワーク間の関連性を同時に扱うこととなる。細胞内にある素子間の共同性が細胞の内部状態の「ゆらぎ」を抑制している。遺伝子発現が揺らぐより

種目（特定研究）

前に、かならず、相互相関の減少が確認されるはずである。DNB 理論により相互相関のゆらぎを解析することで、「遺伝子レベルでのゆらぎ」よりさらに早く細胞の状態遷移を予測できる可能性がある。

従って、本共同研究は和漢医薬学研究所で遂行されている未病検出技術の開発に関する課題を、研究代表者の渡邊（理研）らの革新的な技術で解決するのみならず、ラマン顕微鏡のデータ解析手法に DNB 理論を応用することも可能であり、和漢医薬学研究所および研究者代表者ら双方にとって Win-Win の理想的な共同研究形態である。

■方法

1. ES 細胞の分化過程および T 細胞活性化におけるラマン波長情報の集積

細胞のラマン散乱スペクトルは、倒立顕微鏡（Nikon Ti）を基盤とした、ラボラトリー製分光システムにより計測された。細胞はシリンドリカルレンズを通じた線状に集光した波長 532 nm のレーザー光により照射される。発せられたラマン散乱スペクトルは、開口数 1.27 の 40 倍水浸対物レンズ（Nikon CFP Plan Apo IR）により集められ分光計（MK-300、日本分光）により取得される。通常用いられるガラスボトムディッシュでは、ガラスに含まれる不純物が意図しないラマン散乱スペクトルを発するため、細胞はシリカカバースリップ上に接着させる。細胞のラマンスペクトルは、測定された生のスペクトルからバックグラウンドスペクトルを差し引いて求められる。ES 細胞の状態遷移や T 細胞の活性化状態は、表面マーカーの発現により確認した。

2. DNB 解析

先行研究⁷⁾で取得された T 細胞活性化データに対して DNB 解析を試みた。なお、T 細胞の活性化は、定法に従って、抗 CD3 と抗 CD28 抗体の刺激により行われた。0h（naive、活性化前）、2 h、6 h、12 h、24 h、2 d（active、活性化後）の各時点の生体分子に対応するラマンシフト（入射光と散乱光のエネルギー差）のデータを基に、ガラス基板の光の強度（背景スペクトル）を除去後（規格化1段階目）、標準化処理（規格化2段階目）を行った（図1）。これらに対して、クラスタリング、ネットワーク解析を基に DNB 解析を行なった。

- T-cell-data(raw).csv（以下、**生データ**）
- T-cell-data(standardization-1).csv（以下、**規格化1段階目**）
生データに対して、ガラス基板などのバックグラウンドスペクトルの除去
- T-cell-data(standardization-2).csv（以下、**規格化2段階目**）
規格化1段階に加えて、スペクトルの「標準化」を適用

各ラマンデータの詳細

行 → 観察の経過時間 or 分化の状態

[naive、2h、6h、12h、24h、2d]

活性化前

活性化後

対照群 実験群

列 → ラマンシフト（従来の遺伝子、タンパク質に該当）

本研究では、振動数の数値をそのままIDとして取り扱う

	生データ	規格化1段階目	規格化2段階目
時間 or 状態	492	492	492
ラマンシフト数	2,048	2,048	2,048

DNB 解析

図1. 解析データの内訳と DNB 解析までの手順

■結果

DNB 解析により、T細胞の活性化にいたる過程の2 hにおいて以下に示す2つの範囲の波長が、6 hにおいても2つの範囲の波長が、「ゆらいでいる」ラマンピークとして検出された(表1)。

表 1. DNB 解析により検出されたラマンピーク波長

2 h	6 h
920-964 cm^{-1}	1010-1013 cm^{-1}
1613-1645 cm^{-1}	1086-1120 cm^{-1}

■考察

本年度には、主にT細胞の活性化について試行した。このプロセスには通常48時間以上を要する。一方で、DNB解析では、活性化誘導後、わずか2 h~6 hでもっとも揺らぎが大きかった(表1)。先行研究⁷⁾により、表面マーカー(CD69)計測においても発現量の分布はひろく、CD69の発現ゆらぎが大きいことが確認できていることから、DNB解析が確かにラマン散乱スペクトルから細胞の状態遷移前の「ゆらぎ」を検出できることが実証された。また、先行研究⁷⁾において、T細胞の活性化を判定するピークとして、1000 cm^{-1} 前半、および、1600 cm^{-1} 前半を報告している(図2)。今回の研究において「ゆらいでいる」と検出されたラマンピークも、主に1000 cm^{-1} 前半(1010-1013 cm^{-1})、および、1600 cm^{-1} 前半(1613-1645 cm^{-1})であった。従って、主成分分析の判別では、48 hで判別可能であったT細胞の活性化が、DNB解析においては早期の2または6 hで判別できる可能性が示唆された。また、ラマンスペクトルにおいては、トリプトファンは1000 cm^{-1} 前半、および、1600 cm^{-1} 前半のピークに含まれる。CD69は、Lトリプトファンの細胞内取り込みを制御していることで知られており、今回のDNB解析は、CD69発現によるLトリプトファン取り込みの開始を検出したのかも知れない。これらの因果関係の解明のために、今後、詳細な生化学的な解析が必要である。

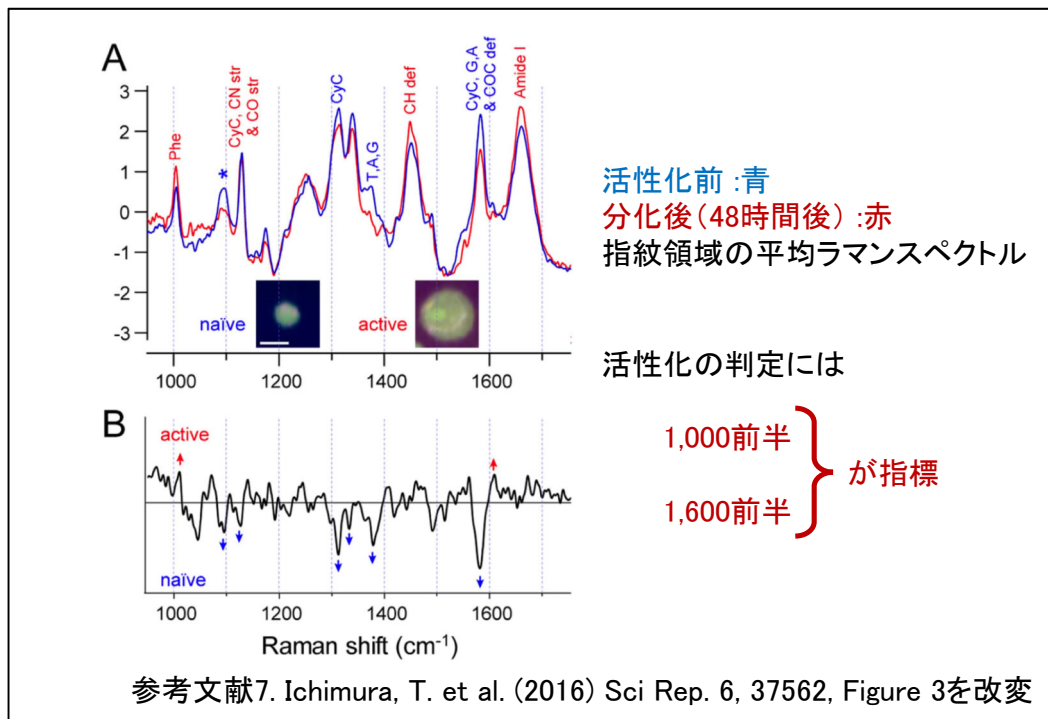


図 2. T細胞活性化状態におけるラマンスペクトルの変化

■結論

ラマン顕微鏡のデータ解析手法に対しても、DNB理論が適応可能であることが明らかとなった。

このラマン顕微鏡技術をヒト臨床検体、特に血液細胞に適応することで、DNB理論によって検出される生体のゆらぎ情報を非侵襲的に計測し、未病状態を検出することが可能となると思われる。また、未病状態の検出のためには、多くの生体分子の計測を行い、生体分子とラマンシフトの対応付けが不可欠である。この対応付けによって、DNB解析のラマン顕微鏡へのさらなる適用が可能となる。

■参考文献

- 1) Chen, L. (2012) *Sci Rep.* **2**, 342. doi: 10.1038/srep00342.
- 2) Koizumi, K. (2019) *Sci Rep.* **9**, 8767. doi: 10.1038/s41598-019-45119-w.
- 3) 市村垂生 (2014) *生物物理* **54**, 315-317. DOI: 10.2142/biophys.54.315
- 4) 市村垂生, 河田聡 (2010) *生物物理* **50**, 300-301. DOI:10.2142/biophys.50.300.
- 5) Ichimura, T. et al. (2014) *PloS One* **9**, e84478. DOI: 10.1371/journal.pone.0084478.
- 6) Ichimura, T. et al. (2015) *Sci Rep.* **5**, 11358, doi:10.1038/srep11358.
- 7) Ichimura, T. et al. (2016) *Sci Rep.* **6**, 37562, doi:10.1038/srep37562.
- 8) Arno, G. et al. (2018) *Comm. Biol.* **1**, 85, doi:10.1038/s42003-018-0093-8 (Jul. 2018).