

BIO INDUSTRY

試し読み版

工業化をめざすバイオ専門情報誌
バイオインダストリー

SAMPLE

ラマン散乱スペクトルによる細胞指紋法の提案

Cellular Fingerprinting using Raman Spectroscopy

渡邊朋信^{*1}, 市村垂生^{*2}, 藤田英明^{*3}

正常細胞とがん細胞との識別や良質な人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の選種など、細胞の種類や状態の判断を必要とする状況は、基礎医学分野、生命科学分野において多々ある。本項では、我々が、考案・開発してきた、ラマン散乱スペクトルを細胞の種類 / 状態を識別するための「指紋」として用いる方法を紹介する。

1 はじめに

パソコンやスマートフォンで、セキュリティ対策として指紋認証が使われている。双子のように同一ゲノムを持つ個人同士でも指紋の形状が異なっているからである。つまり、個人を識別するためには、その人のゲノム情報など必要ではなく、指紋の情報のみで十分なのである。この「指紋認証」というコンセプトを、生命科学用ツールに使えないだろうか？ 我々の研究の始まりは、ここからである。

我々の体を構成するおよそ 60 兆個の細胞は、200 種類程度に分類されている。これらの細胞の種類を定義・識別するために、従来では、遺伝子や蛋白質の発現パターンが情報として使用されている。近年は、マイクロアレイ技術や次世代シーケンサ技術を用いて、3 万を超す遺伝子種の存在量や、RNA・DNA-タンパク質相互作用、DNA 塩基修飾、転写因子発現・結合など様々な情報を網羅的に計測できるようになり、細胞の種類のみならずその状態なども細かく定義されるようになってきている。一方で、細胞の分類や識別をするだけなら、このような網羅的な情報ではなく、指紋のように表面的な情報であっても細胞種特有でさえあれば何でも良いとも言える。分化多能性細胞由来の細胞・組織の医療応用を見すえた場合には、細胞分化の状態を蛍光

*1 Tomonobu M. Watanabe 理化学研究所 生命システム研究センター 先端バイオイメージング研究チーム チームリーダー

*2 Taro Ichimura 理化学研究所 生命システム研究センター 研究員

*3 Hideaki Fujita 理化学研究所 生命システム研究センター 客員研究員

マーカー等で標識することは好ましくなく、非染色・非侵襲での細胞状態判別が望まれる。内在的な情報でなく、表面的な情報で細胞種を識別することができれば、非破壊・低侵襲な細胞状態判定が可能となり、上記の希望を叶えることができる。網羅的な情報を扱うオミックス技術の開発が発展するなか、我々は、流行とは逆行する形で、網羅的な情報を必要とせず細胞を識別する技術「細胞指紋」の開発に乗り出した。

2 「細胞指紋」と成り得る物理量

「細胞指紋」となるには、細胞の状態を表す情報を含み、かつ、定量可能なパラメータである必要がある。各種オミックス情報は、スペクトルとして並べ数学的処理を施されることによって、十二分にその条件を満たすことができる。しかし、従来のオミックス技術で得られる情報は、細胞を破碎した内溶液を用いる必要があり、計測対象である細胞に損傷を与えている危険性がある。細胞指紋は、非侵襲的に取得可能な細胞の表面的な情報である必要がある。過去に、我々と同様のコンセプトの元で細胞を識別できる情報で使用されたのが、モルフォロジー（形）である。病理医は、自己の知識と経験の元、がん細胞と正常細胞との差を、様々な特徴点から観察し、おおよそ識別できる。これを数値化することで、画像診断を行う試みである。上記は、ある程度の成功を収めており、細胞種の識別にオミックス情報が必要ないことの傍証となっているが、一方で、特徴点の数（つまり変数）の不足により精度・定量性がまだ十分であるとは言えない。「細胞指紋」には、表面的で、かつ、多くの特徴点を示す物理量が適している。そこで我々が選択した物理量は、ラマン散乱の分光スペクトル（以下、ラマンスペクトル）である。ラマンスペクトルによる細胞の状態識別は、がんの画像診断や、がん摘出手術時のがん組織の識別、あるいは、赤血球のマラリア感染の診断などでも使用されており、医学・生物学分野と親和性が高い。同様の物理量として、分泌液の質量分析スペクトルも試行しているが、本稿では割愛させて頂く。

ラマン散乱は、物質と光の相互作用の一つで、分子結合の固有振動数だけシフトした振動数の光を散乱する現象である。振動数のシフト量は、分子結合や格子結合の固有振動数と一致する。ラマン散乱には様々な様式があるが、単に「ラマン散乱」というときは、熱による自発的な分子振動に起因する「自発ラマン散乱」のことを指す。また、実計測においては、通常、低振動数側（長波長側）にシフトしたストークスラマン散乱光を計測する。2原子分子では、分子内に振動モードが1つしかないが、3原子以上で構成されている分子には、複数の異なる振動数のモードが存在し、ラマン散乱のスペクトルはそれぞれの振動モードに対応するピークを持つ。すなわち、分子の組成・構造に応じてラマンスペクトルの形状は異なるため、スペクトル形状から計測元の分子種を推定することができる。このため、ラマン散乱は古くから「分子の指紋」と呼ばれてきた。細胞から発せられるラマン散乱光のスペクトルは、細胞を構成する全ての分子振動の重ね合わせであり非常に複雑であるため、そのスペクトルから、構成される分子を特定することは

困難である。しかしながら、全ての分子振動を含むのであれば、細胞のラマンスペクトルは、構成物質の種類や含有比によって、細胞種ごとに異なり「細胞指紋」として適用できる可能性がある。

3 細胞のラマンスペクトルの取得

細胞のラマンスペクトルの観察は、これまでも成されており、その適用も、例えば、アポトーシス中のミトコンドリア形状変化の観察と言った細胞生物学的な応用¹⁾から、癌細胞の画像診断のような医療応用²⁾まで多岐に渡っている。

ラマン散乱の発見は1928年であり、ラマン散乱に関する研究は、長い歴史を持つ。しかし、ラマン散乱は非常に微弱であるため、光損傷閾値が低い生細胞への適用は難しいとされてきた。1980年代に入り、マルチチャンネル分光器や高感度 CCD 検出器の高感度化、誘電体多層膜フィルターの技術発展に伴い、細胞が発する微弱なラマン散乱光の解析が可能となってきた³⁾。ラマンスペクトルを検出する顕微鏡（以下、ラマン顕微鏡）の実装としては、現在のところ、多くの研究室で、共焦点光学系が採択されている。共焦点光学系では、レーザー光を細胞内に集光し、集光スポット内の分子からラマン散乱光を発生させ、その光を、レンズ系を通して分光器の入射スリット（またはピンホール）に再び集光し、スペクトルとして検出する。従来の共焦点顕微鏡と同様に、集光スポットの位置を試料内で走査することで、各画素ひとつひとつがスペクトルの情報を持つ、ラマンスペクトル画像の取得が可能となる。

さて、細胞を構成するほぼすべての分子がラマン散乱光を発生する。そのゆえに、細胞からのラマンスペクトルには、細胞を構成するあらゆるタンパク質や脂質、ヌクレオチドなどの多種多様な分子種の情報が含まれており、それらは分解不可能なほどに重ね合わされている。つまり、ラマンスペクトルから個々の分子情報を分離・抽出することは困難を極める。我々が、「指紋として使う」と言うには、ここにトリックがある。我々は、このスペクトル情報を分解分析するのではなく、スペクトルをひとつの「画像」として使うのである。すなわち、スペクトルの「形」から、細胞の種類や状態を定義する。これは、上述した、細胞のモルフォロジーから細胞状態を決定する画像診断と同じ概念である。異なるのは、情報として使用するのが、単純な細胞の画像ではなく、複雑な形状を示すスペクトルであるため、特徴点が多いと言う点にある。

では、これ以降、実際の解析例を持って、ラマンスペクトルによって、細胞の種類や状態を可視化する方法について述べていく。

4 主成分分析を用いて様々な細胞株を識別する

細胞が発する微弱なラマン散乱光を検出するためには、細胞に強い光を照射する必要がある。強い光は、細胞に損傷を与え、時に細胞を死滅させる。大阪大学大学院工学研究科・藤田克昌准

教授は、この問題を解決し、生きた細胞のラマンスペクトルを検出できる顕微鏡を開発している⁴⁾。我々は、藤田克昌准教授の協力のもと、様々な体組織から株化された細胞株種のラマン散乱分光スペクトルを実測し、画像化した (図1)。ラマンスペクトルを画像化するために、多くの場合は、各特徴的なスペクトルピーク値に色を載せた疑似カラー画像を作る。3つの分子結合のピーク (753 cm^{-1} , 1686 cm^{-1} , 2850 cm^{-1}) の強度で、三種類の細胞株のラマンスペクトルを画像化した例を図1Aに示す。 2850 cm^{-1} は CH_2 伸縮モードに起因するピークであり、おもに脂質の主鎖に含まれる。また、 753 cm^{-1} はシトクロムCに帰属されるピークである。これらは、おもに細胞核を除く細胞質内に分布していた。一方では、 1686 cm^{-1} はペプチド結合に起因するピークであり、タンパク質に含まれる。そのため、細胞質のみならず細胞核にも分布している。こうして作られたラマン画像を比較することで、三種類の細胞株間で、ラマンスペクトルに違いがあるのが分かる。さらに、神経細胞分化、脂肪細胞分化のモデルとされる細胞株の分化前後の画像も取得してみた。いずれの場合においても、細胞分化前後におけるラマンスペクトルの変化が確認された (図1B)⁵⁾。

さて、細胞核から得られたラマンスペクトルを平均化したスペクトルを見てみると、細胞株間

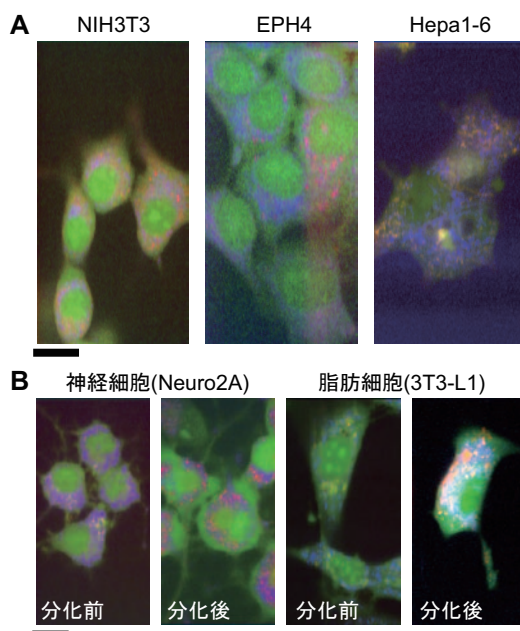


図1 様々な細胞株のラマン顕微鏡画像

(A) マウス由来線維芽細胞株 (NIH3T3)、マウス由来乳腺上皮細胞 (EPH4)、および、マウス由来肝細胞癌株 (Hepa1-6) のラマン顕微鏡画像。各ピクセルがスペクトル情報を含み、これらの画像は、代表的なピーク強度 (青： 753 cm^{-1} 、緑： 1686 cm^{-1} 、赤： 2850 cm^{-1}) により色付けしてある。(B) 神経細胞分化モデル株 (マウス由来神経芽細胞腫 (Neuro2A))、および、脂肪細胞分化モデル株 (マウス由来線維芽細胞株亜種 (3T3-L1)) の分化前後のラマン顕微鏡画像。黒線は $10\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

の差は、僅かではあるが、明らかに確認される (図 2A)。ところが、従来のように、主要ピークによる比較を試みてみると、その違いに有意差が無い (図 2B)。一見すると矛盾しているようだが、これは、解析を行うことで情報を失っていることを示しているのである。したがって、出来る限り情報を保持したまま解析する方法が求められる。我々は、膨大な変数で記述されたデータを少数個の独立変数に縮約して分析する方法である主成分分析法を、ラマンスペクトルを用いた細胞種識別に適用した。主成分分析の前処理として、平均スペクトルを引き、標準偏差が一致するように規格化する。その後、全スペクトルデータに対して主成分分析を実行し、主成分スコアを二次元の座標軸に投影した (図 2C)。図 2C 下のひとつのプロットは、ひとつの細胞を、エラーバーは細胞内におけるラマン分光スペクトルの分散を示している。主成分分析の結果により、三種の細胞種が、明確に分離されていることが分かる。それと共に、細胞種内においても、細胞間でその値がばらついていることも分かる。このように、複雑なスペクトル信号であっても、特徴点を個別に評価するのではなく、全体像を捉える解析を行うことによって、その信号の違いを判別できるのである。この結果により、我々は、ラマンスペクトルが「細胞指紋」とし

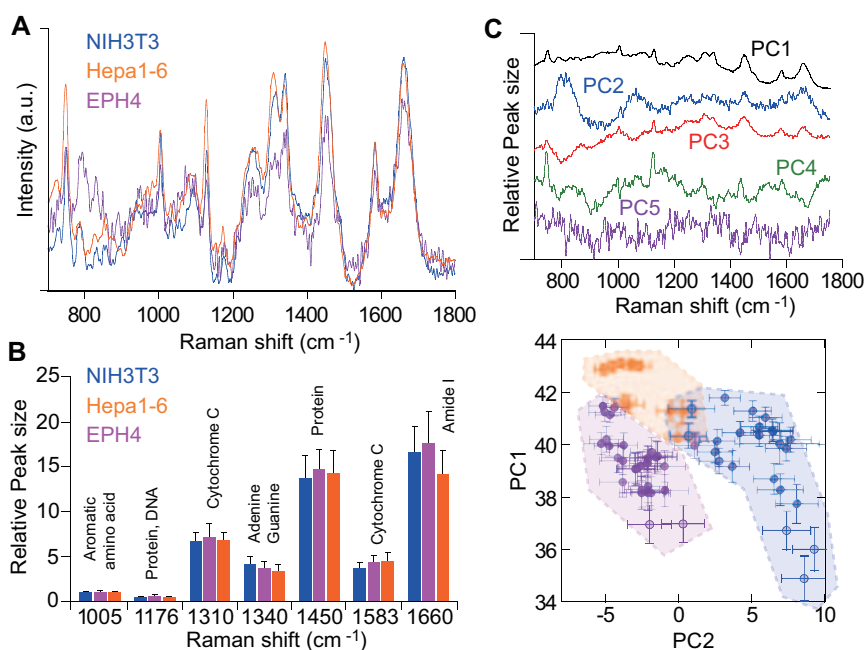


図 2 ラマンスペクトルの解析例

(A) 三種類の細胞株 (NIH3T3, EPH4, Hepa1-6) の細胞核内から得られたラマンスペクトル。各スペクトルは、細胞核内で平均されている。(B) それぞれのラマンスペクトルの代表的なピーク値の強度比較。エラーバーは標準偏差を示す。(C) 主成分分析の結果。一つの細胞から得られたラマンスペクトルは新しい主成分 (PC) に分解され、本図では PC1~PC5 までを示す (上)。PC1 と PC2 を軸とする座標系にプロットしていくことで、分布を得る (下)。ひとつのプロットは、ひとつの細胞から得られた主成分スコアの平均値を示し、エラーバーは標準偏差 (細胞内の主成分スコアのばらつき) である。

て有効であることを示した。

5 ラマンスペクトルを用いた、細胞状態遷移の表現

これまで、細胞の状態が安定している姿を観察してきた。次は、「細胞の分化状態の遷移を、ラマンスペクトルの変化として捉えることができないか」と、その可能性を検証した。具体的には、筋肉分化モデル細胞株であるマウス筋芽 C2C12 細胞が分化する過程における、細胞の状態遷移のラマンスペクトル計測を経時的に行った。C2C12 細胞は、分化に伴い、その形態が大きく変わるので、分化の状態を識別しやすい。図 3 に、分化誘導前 (Day -3)、分化誘導直後 (Day 0)、分化誘導 3 日後 (Day 3)、筋管分化後 (Day 7) の C2C12 細胞の明視野顕微鏡像 (A)、および、ラマン散乱顕微鏡画像 (B) を示す。細胞株間でラマンスペクトルが異なるように、C2C12 細胞のラマンスペクトルは、分化過程の各段階で変化していくことが分かる。特に

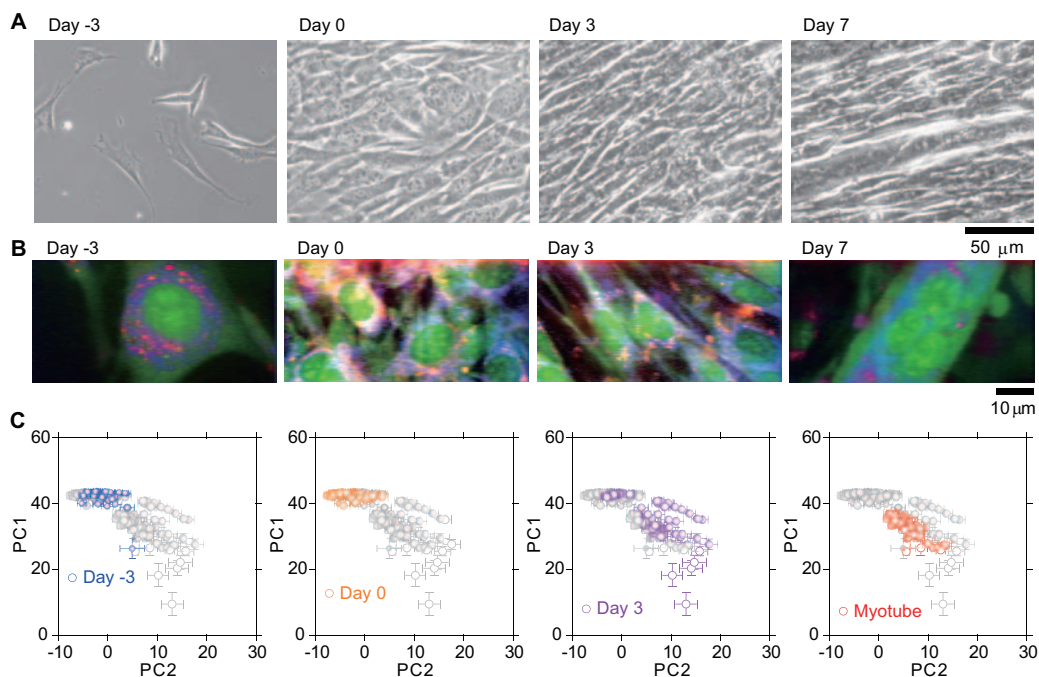


図 3 マウス筋芽 C2C12 細胞の分化に伴う細胞指紋の変化

(A, B) 分化誘導前 (Day -3)、分化誘導直後 (Day 0)、分化誘導 3 日後 (Day 3)、筋管分化後 (Day 7) の C2C12 細胞の明視野顕微鏡像 (A)、および、ラマン散乱顕微鏡画像 (B) を示す。ラマン散乱顕微鏡画像は、代表的なピーク強度 (青: 753 cm^{-1} , 緑: 1686 cm^{-1} , 赤: 2850 cm^{-1}) により色付けしてある。(C) 細胞核内のラマンスペクトルを用いて主成分分析を行った結果。ひとつのプロットは、ひとつの細胞から得られた主成分スコアの平均値を示し、エラーバーは標準偏差 (細胞内の主成分スコアのばらつき) である。分化状態に依らず全ての細胞をプロットした結果は灰色で示してある。