

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	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	富山大学大学院 理工学教育部 知能情報工学専攻	修士1年
研究統括者	小泉 桂一	研究開発部門未病分野	教授

■背景・目的

これまでに統括研究者の小泉らは、複雑系数理学の DNB 理論を用いて¹⁾、生体の遺伝子レベルでの揺らぎを捉える事により未病状態（健康から疾病の遷移状態）を検出することが可能であることを報告した²⁾。現在我々は、この報告を深化させることで、DNB 理論は未病状態のみならず細胞分化の遷移状態も検出可能であるとの仮説のもと基礎研究を行っている。従って、本研究は、和漢医薬学総合研究所の重点研究・未病・予防先制医療研究（未病バイオロジーの深化）に直結するものである。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揺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、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²⁾。研究代表者の渡邊らは、細胞のラマンスペクトルを細胞の状態や種類を識別する「指紋」と見做し、スペクトル形状が細胞の種類や分化状態に依存して異なること、ならびに、分化・リプログラミングの非侵襲的な識別・同定に使用できることを報告している³⁾。

昨年度の研究においては、T 細胞の分化過程において、ラマン顕微鏡により経時的にラマンスペクトルを計測し DNB 解析を行った。その結果、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。

そこで本年度の研究では、昨年度の成果をヒト臨床検体へ適応するために、iPS 細胞の心筋細胞への分化過程における遷移状態の検出を試みた。同時に、この遷移状態の生物学的な特徴を明らかにするために、網羅的な遺伝子発現情報を取得し、情報解析を行った。

■結果・考察

ラマンスペクトルを細胞の複雑系システムにおける離散的な構成要素と仮定して、iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導前（Day 0）の iPS 細胞を対照群として、Day 1、2、4、7、10、14 においてラマン顕微鏡を用いて細胞の全ラマンスペクトルを計測した（図 1）。なお、計測細胞数は全日数において 21~34 個であり、ラマンシフトは全日数で同一の 3001 個（500.00-2,000.00 cm^{-1} 、刻み：0.5）であった。

種目 (特定研究)

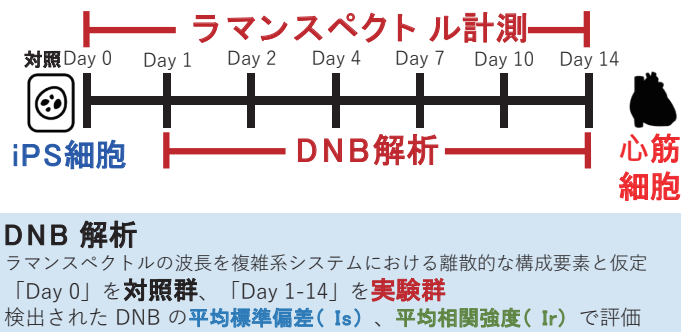


図 1. iPS 細胞の心筋細胞分化過程におけるラマンスペクトル計測および DNB 解析のプロトコル

なお、計測したラマンスペクトルのデータに対してバックグラウンド補正の処理を行い、その後その特性を精査した結果、負の値や欠損値はないことから、DNB 解析に供するための前処理は不要であることが確認できた (図 2)。

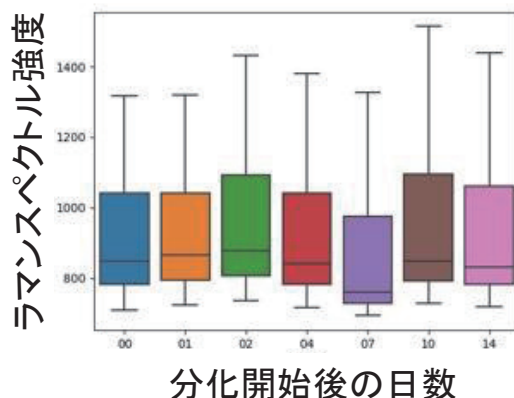


図 2. 各日 (Day 0-14) におけるラマンスペクトル強度の分布特性

次に、抽出された DNB のラマンシフトおよびそのシフトに由来する分子、分子結合 4) を示す (図 3)。Day 1 ではほぼすべてのラマンシフト (583.50-2,000.00 cm⁻¹) がゆらいでいるが、Day 10 では 2 か所の局所的なラマンシフト (500.00-988.50 cm⁻¹ および 1,700.00-2,000.00 cm⁻¹) のみがゆらいでいることが明らかとなった。

	Day 1	Day 10
DNB のラマンシフト	583.50-2,000.00	500.00-988.50 1,700.00-2,000.00
分子、分子結合	A, C.T.BK, C-C str, Phe, C-Nstr, C-C str, Phe Tyr, Phe Tyr, Amide III, CH def, A G, CH ₂ def, G A, Amide I	A, C.T.BK, C-C str Amide I

図 3. Day 1 および Day 10 において抽出された DNB のラマンシフトと対応する分子、分子結合

種目（特定研究）

そこで、Day 1 および Day 10 で抽出された DNB のラマンシフトに関して、Day 0~Day 14 におけるラマンスペクトルの平均強度（いわゆる従来の静的バイオマーカー）および DNB の 2 条件（平均標準偏差 (Is) と平均相関強度 (Ir)）をそれぞれ算出した。Day 1 で DNB として抽出されたラマンシフト (583.50-2,000.00 cm⁻¹) において、ラマンスペクトルの平均強度は、Day 2 で最高値に到達していることが明らかとなった。一方で、Day 1 において、平均標準偏差と平均相関係数の上昇が確認されることから DNB の 2 条件を満たしていることが明らかとなった。この結果から、iPS 細胞の心筋細胞への分化初期過程における遷移状態が Day 1 であることが示唆された。

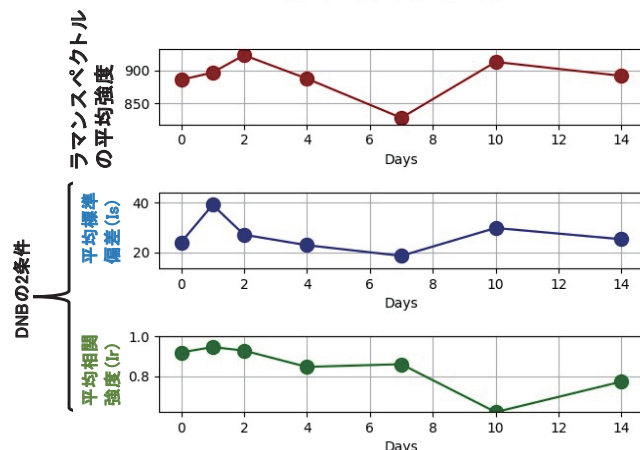


図 4. Day 1 で DNB として抽出されたラマンシフト (583.50-2,000.00 cm⁻¹) の経日的な変化

おおむね 1,700.00-2,000.00 cm⁻¹ および 500.00-988.50 cm⁻¹ のラマンシフトの領域は、Day 1 および Day 10 において、DNB の 2 条件を満たしていることが明らかとなった。一方で、ラマンスペクトルの平均強度は、Day 2 および Day 10 で上昇していることが明らかとなった。この結果から、iPS 細胞の心筋細胞への分化後期過程における遷移状態が Day 10 であることが示唆された (図 5)。

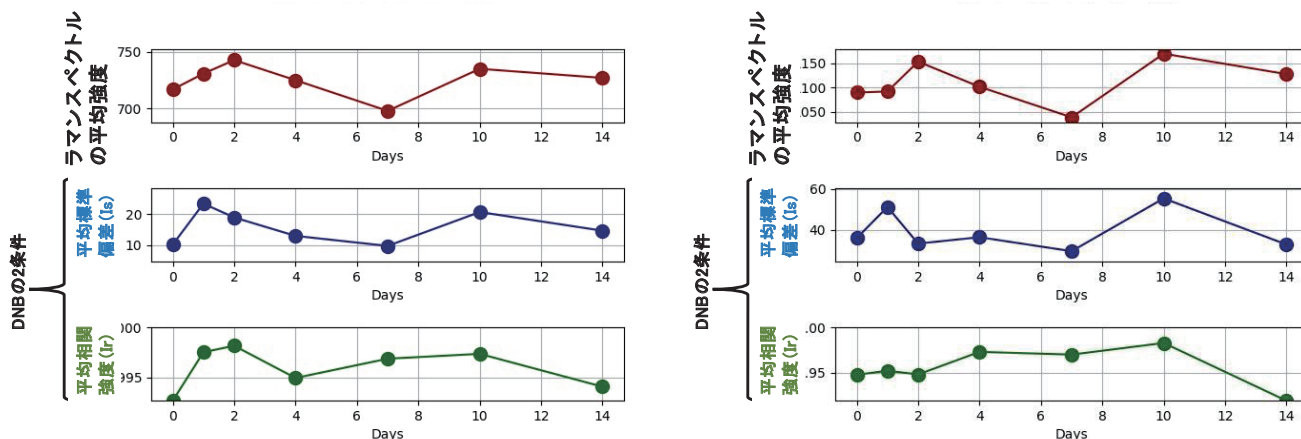


図 5. (左) Day 10 で DNB として抽出されたラマンシフト (1,700.00-2,000.00 cm⁻¹) および (右) ラマンシフト (500.00-988.50 cm⁻¹) の経日的な変化

細胞が発するラマン散乱スペクトルは構成する全ての分子の情報を含むため、分解分析が困難なほどに複雑となる。これまでの生命科学におけるラマン散乱スペクトル解析は、従来の多変量解析を用いても大きく変化する物質にのみ適用できるに過ぎなかった。ラマン顕微鏡技術に DNB 解析を応用することで「量」

種目（特定研究）

ではなく「揺らぎ」が評価軸となる。これにより、従来物質還元的な解析から脱して、分解分析できない信号を用いて物質に還元することなく解析できるようになる。

上記のように、本手法により分化状態を規定できる「揺らぎ」が同定できることが示された。「揺らぎ」を抑制/増幅するような薬剤を探索し投与することで、詳細な遺伝子相互作用が分からずとも、iPS 細胞分化をコントロールできる可能性がある。つまり、本研究は、「揺らぎ」の概念を取り入れることで、物質還元せずとも数値データに基づく科学的議論が可能になることを実証したことになる。

そもそも生命は複雑すぎて分解分析で理解することは出来ない可能性が、近年、認められつつある。本研究課題が「量」を指標とした研究から「揺らぎ」を指標とした新しい生命科学の創造につながるよう、引き続き研究開発を行っていく。

■結論

iPS 細胞の心筋への分化過程における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。今後は、このラマン顕微鏡技術を疾患特異的、例えばミトコンドリア病やファブリ病由来の iPS 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揺らぎ情報を非侵襲的に計測し、分化異常の前兆（未病）を検出する予定である。さらに、DNA 理論を空間的揺らぎ（不均一性）に拡張することで、静的情報である画像データから動的情報を推定することにも挑戦したい。

参考文献

1. Koizumi, K. (2019) Sci Rep. 9, 8767. doi: 10.1038/s41598-019-45119-w.
2. Ichimura, T. et al. (2014) PloS One 9, e84478. DOI: 10.1371/journal.pone.0084478.
3. Ichimura, T. et al. (2015) Sci Rep. 5, 11358, doi:10.1038/srep11358.
4. 渡邊朋信「ラマン散乱光スペクトルによる遺伝子発現予測/推定技術の開発」
<https://www.secomzaidan.jp/tokutei/advanced-medical/interview/watanabe/index2.html>