

「音響フォノン計測で拓く超次元力学イメージング」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：市村 垂生

1. 研究のねらい

生命システムの様々な細胞機能において、力学作用と機能の関係の重要性が認識されている。とくに、組織形成では、物理的な力を介した細胞間相互作用が多く含まれており、その詳細な理解を進めることが望まれている。力学作用の理解は、組織発生の制御にも繋がり、人工組織・臓器の安定提供に貢献する可能性がある。しかしながら、この領域を推進するうえで、基礎研究のための計測ツールが足りておらず、その開発は急務の課題である。とくに、3次元粘弾性体である細胞・組織内の力学(弾性、応力)イメージング法が存在しない。MRI、超音波イメージングなどを利用した力学計測法も存在するが、原理的に細胞スケールの高空間分解能イメージングは難しい。「組織内で」「細胞レベルで」というスケールで使えるツールが存在しない。

この状況を打破すべく、本研究では、音響フォノンによる非弾性散乱分光を基軸とする計測技術を開発し、「非接触」「非染色」「サブ細胞分解能」の力学イメージング法の確立を目指す。音響フォノンは光子と相互作用して、光子の周波数をシフトさせる。周波数シフト量(ブリルアンシフト)が媒質の弾性特性に依存するため、散乱光のスペクトルを調べることで、組織内の弾性特性を知ることができる。これまでは、スペクトルの解釈は等方的媒質の仮定の下、ピーク周波数から縦弾性係数をスカラー量として推定するだけであった。真に生物学で使える力学計測ツールへと発展させるために、スペクトルに含まれる情報を発掘し、その物理学的、生物学的意味を理解することが重要であると考えた。

本研究では、従来よりも空間の次元と情報の次元を増やして、超次元力学情報のイメージングを実現することを目指して研究に着手した。多細胞システム内力学構造の推定法として確立し、本手法をメカノバイオロジーの標準研究ツールに押し上げることを目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、上述の目的を達成するために、以下の3つの課題を重要課題と位置づけ、これらを解決すべく、要素技術開発、装置系開発および応用研究に取り組んだ。

【課題1】細胞の音響フォノンのスペクトルの生物学的意味の解釈

【課題2】スペクトルから弾性異方性情報の抽出

【課題3】生物学研究への応用

いずれの課題も道半ばではあるが、ここまでの取り組みと成果について以下にまとめる。

なお、課題3は研究開始当初の予定にはなかったが、研究期間半ばに方針変更により追加した。

(2) 詳細

本研究で用いる量子効果は、伝搬光子と媒質内の音響フォノンの相互作用によって生じる散乱現象である(図 1)。ブリルアン散乱と呼ばれるこの現象によって、散乱光には媒質の弾性特性に依存した周波数シフト(ブリルアンシフト)が起こる。生体組織のようなソフトマテリアルにおいては、周波数シフト量は GHz オーダーである。レーザー走査しながら各点でのスペクトルを計測することで、細胞内外の弾性分布を知ることが出来る。

本研究では、独自に開発した分光器とレーザー顕微鏡を組み合わせたイメージング装置によって、細胞の弾性分布を計測する装置系を開発した。他の物理量を同時に計測可能なマルチモーダルイメージング装置として設計して、必要に応じて適宜改良を加えながら、開発を進めた。

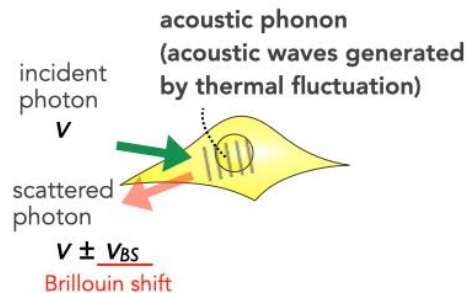


図1: 本研究で用いる量子効果。伝搬光子が音響フォノンによって散乱され、その周波数が弾性定数に依存してシフトする。

【課題1】細胞の音響フォノンのスペクトルの生物学的意味の解釈

ブリルアン散乱イメージングによって得られる周波数シフト量マッピングによって、“弾性像”と呼ぶべき像を取得できるが、それ単独では生物学的な意味の解釈は難しいため、生物学的な基礎理解を固めることを一つの目標として設定した。この目的を達成するために、他の物理量を同時に計測し分布を比較できるマルチモーダルイメージング装置を構築した。具体的にはラマン散乱と蛍光によるイメージング機構を付加した。

マルチモーダルイメージングによって得られた細胞の画像例を図2に示す。図2a、図2bはそれぞれ、ブリルアン散乱/蛍光およびブリルアン散乱/ラマン散乱の組合せでイメージングした結果である。図2aの蛍光イメージングでは、核内クロマチンに ECFP が共発現するマウス ES 細胞株を用いることで、核の位置と弾性分布の相関を調べた。核内に高弾性の領域が分布していること、核外にも弾性の分布があることがわかった。また、図2bでは、上皮細胞を用い、ブリルアン散乱/ラマン散乱の同時イメージングを実施した。図2bは分裂期の細胞に特徴的に観察される細胞内分布である。ブリルアン散乱で得られた弾性分布は、細胞内中心付近に高弾性領域が局在している。ラマン散乱では核酸塩基に特徴的な振動モード(1480 cm^{-1})のピーク強度が同じ領域で局在していることがわかる。このことは、細胞内の高弾性領域が核内の DNA の凝集に起因すると考えられる。このような分布は分裂期以外の細胞では観察されなかった。

以上のことから、細胞周期とくに細胞分裂における核内の DNA の分布は、細胞内弾性に対して大きく寄与していることがわかった。一方で、細胞質にも弾性分布がある。心筋細胞な

ど、細胞全体で高周波数(高弾性)となる細胞もあるので、細胞種、細胞周期によって Brillouin 散乱で観察される「高弾性」の意味するところが異なる。今後、細胞種、細胞周期による弾性分布の多様性について包括的に纏めたい。

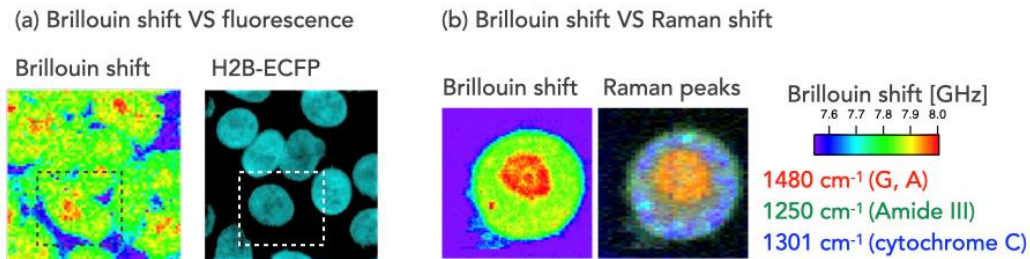


図3: マルチモーダル観察による細胞内弾性の生物学的解釈。(a)mES 細胞の Brillouin 散乱と蛍光像。(b) M 期の上皮細胞 (HaCaT 細胞) の Brillouin 散乱とラマン散乱像。

【課題2】スペクトルから弾性異方性情報の抽出

従来の Brillouin 顕微鏡では、弾性はスカラー量として扱われてきたが、本来、細胞や組織の複雑な力学構造では構造異方性およびその配向が存在する。生体内での力学特性を理解するためには、その大きさだけでなく方向性、異方性が重要である。この情報をスペクトルから抽出すれば、細胞や組織の中の3次元的な力学構造を明らかにできると考えた。

顕微鏡イメージング下において弾性に異方性があることを実証するために、コラーゲン繊維束をモデル試料として、繊維軸と光軸の角度によってスペクトルが変化することを実測した。この結果、繊維軸と光軸の角度が大きくなるにつれてスペクトルのピークが低周波数側にシフトしていることを確認出来た。

この結果を基礎として、同一細胞内の弾性異方性の計測を実現する方法として、特定の入射角、散乱角のスペクトルを選択的に計測することで、弾性の異方性をプローブすることを提案した。実際に、幾つかの異なるパターンで入射してスペクトルを比較した結果、細胞計測において弾性の異方性を検出できる可能性を示すことができた。

【課題3】生物学研究への応用

生物学研究への応用研究を推進した。心筋細胞などの筋繊維の力発生時、細胞分化、傷回復現象などのイベントにおいて、イメージングを実施し、弾性分布に多様性があることを明らかにした。この結果は、本手法による細胞弾性計測法を生物学研究現場で応用できる可能性を示した重要な一歩であると言える。一方で、課題1で対象とした核の弾性との識別や、課題2で検証した弾性異方性を含めての議論が必要である。今後、課題1と2で培った技術と知見を今後の共同研究にも適用して、データの蓄積、解析に取り組む予定である。

3. 今後の展開

将来的には、生物学研究における弾性計測のツールとしての確立に尽力したい。とくに、発生生物学や再生医療などが対象にする、細胞集団の状態が不連続に転移する現象を対象とする分野で、その状態転移における細胞弾性や力発生を計測する方法として威力を発揮すると考えてい

る。技術的には、既存の生命科学研究との親和性のためには、蛍光や位相などとのマルチモーダル観察、低倍広視野イメージングとのマルチスケール観察機構は必須であり、生命研究とシームレスに融合できる装置系を開発する。当該分野の研究者との人脈を形成し、3年後には有効な研究ツールとして生命科学者に認識されることを目指して、研究を進めていきたい。

4. 自己評価

量子技術の生命科学研究への応用を、個人研究として実施できたことは私の強みであると考えている。応用物理学出身でありながら生命科学研究を推進しており、先端の計測技術を直ちに生命科学研究に応用できる実施体制を構築し、生命科学応用を常に意識したマインドセットを持って研究計画を立案できる。本研究においても、新しい要素技術の開発から生細胞観察への適用は、タイムラグ無く実施することが出来た。この体制およびマインドセットは、量子生体分野、とくに計測技術開発を主軸とするタイプの研究に対してのモデルケースになると思っている。

一方で、個々の研究課題の達成状況がいずれも道半ばであることは反省すべき点である。この理由としては、課題の進め方のマネジメントが適切でなかったことが挙げられる。また、領域内の他の研究者やアドバイザーと研究の毛色が異なっていたことから、領域会議において研究内容をうまく伝えることが出来ていない場面が多々あったと感じている。このことは、今後このような研究プログラムに参画する機会があれば、改善したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. Junichi Kaneshiro, Yasushi Okada, Tomohiro Shima, Mika Tsujii, Katsumi Imada, **Taro Ichimura (責任著者)**, Tomonobu M. Watanabe, "Second harmonic generation polarization microscopy as a tool for protein structure analysis," *Biophysics and Physicobiology* 16 147-157 (2019).

細胞内および in vitro の系において、微小管の構造変化を非線形光散乱によって計測する手法を提案した。入射偏光角に対する依存性を調べ、一軸性結晶との仮定の下構築した理論モデルによって、オングストロームレベルの構造変化を検出できることを見いだした。細胞弾性を司る要素である微小管の分布と弾性分布の相関を実測するために、音響フォノンとの同時イメージングの実施を見越している。

2. **Taro Ichimura (責任著者)**, Taishi Kakizuka, Kazuki Horikawa, Kaoru Seiriki, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto, Katsumasa Fujita, Tomonobu M. Watanabe, Takeharu Nagai, "Exploring rare cellular activity in more than one million cells by a transscale scope," *Scientific Reports* 11(1) 16539 (2021).

対角 1.8 センチメートルの視野の中で個々の細胞の動態を観察できる新規イメージング装置系を提案した。ワンショットで最大100万以上の細胞を観察・解析を実現し、0.1%以下の稀少細胞の検出が可能であることを示した。稀少細胞の弾性計測のために、本研究の音響フォノンイメージング機構との融合を見越している。

(2)特許出願

研究期間全出願件数:1件(特許公開前のもも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

1. “ブリルアン散乱で見る細胞の弾性イメージング”
市村垂生
第95回日本薬理学会年会(福岡国際会議場, 2022年3月7-9日)
2. “Trans-scale optical imaging for direct observation of singularity phenomena”
Taro Ichimura, Taishi Kakizuka, Takeharu Nagai
Pacifichem 2021(オンライン開催, 2021年12月16-20日).
3. “センチメートル視野で多細胞動態を観るトランススケールスコープ”
市村 垂生
レーザー顕微鏡研究会第46回講演会(オンライン開催, 2021年11月4-5日)
4. “100万を越える細胞集団中の稀少細胞の探索を実現するトランススケールスコープ”
市村 垂生
第60回日本生体医工学会大会(オンライン開催, 2021年6月15-17日)
5. “散乱分光イメージングで細胞状態を定量する”
市村垂生
2020年度日本分光学会北海道支部シンポジウム(オンライン開催, 2021年1月15日)
6. “非線形および非弾性散乱イメージングを駆使した生命システム理解への取り組み”
市村垂生
レーザー学会学術講演会第41回年次大会(オンライン開催, 2021年1月18-20日)
7. “フォノン-フォトン相互作用に基づく細胞状態計測”
市村垂生
量子生命科学会第2回大会(オンライン開催, 2020年12月23-24日)
8. “散乱分光イメージングで細胞状態を定量する”
市村垂生
2019年度日本分光学会北海道支部シンポジウム(北海道大学情報科学研究院, 2020年3月2日)
9. “Quantifying macromolecules and cells via nonlinear and inelastic light scattering”
Taro Ichimura,
Cold Spring Harbor Asia Conference (Suzhou, China, September 2-5, 2019)
10. “多細胞システムのブリルアン散乱分光イメージング”
市村垂生
第16回医用分光学会(北海道大学, 2018年11月21-22日).

【受賞】

Biophysics and Physicobiology 誌から第7回 Biophysics and Physicobiology Editors' Choice



Award を授賞. 2020 年 9 月.

【プレスリリース】

大阪大学からプレスリリース (2021 年 8 月 19 日)

「0.01%の稀少細胞を検出！従来比 1000 倍の細胞 100 万個を同時観察する“トランススケールスコープ”を開発～スケール階層を越えて生命システムを理解する次世代生物学のツール～」 https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/hot_topics/topics_20210819_01/