SRSにおける進展がシングルセルの代謝イメージングのブレークスルーを誘導する

バーバラ・ゲフェルト

非侵襲的でラベルフリーな技術である誘導ラマン散乱（SRS）によって、重要な発見やツールが可能となっている。

ラマンイメージングは、生物試料を傷つけることなく、研究者が試料を染色する必要がない、非侵襲的な技術である。このアプローチでは、組織をラスター走査するために励起レーザを用い、その成分の分子結合の分光学的特性に基づいて化学組成を決定する。この情報を用いて、ラマンイメージングは試料のポイントごとに3D描写する。

従来のラマン分光法は素晴らしく特異的な化学分析をもたらす一方で、極端に弱いシグナルには限界がある。その場合には、高濃度な試料、そして数分から数時間という多くの時間を必要とする。

米ハーバード大（Harvard University）のサニー・シェ氏（Sunney Xie）のグループの開発によって、誘導ラマン散乱（SRS）が、微弱で自然発生するラマンシグナルを1万倍以上に増幅させることで、標準的なラマン技術を改良する。これにより、ビデオレート（30フレーム／秒）な化学的なイメージングが可能となる。

DO-SRSが代謝産物の進行を明らかにする

SRSはさまざまな段階で開発されており、生きた細胞内の活動を描くなど、興味深い科学を可能としている。米コロンビア大（Columbia University）の研究者は最近、DO-SRSという、個々の細胞内の変化を追跡するために、SRSベースの新たな拡大手法であるDO-SRSを報告した。SRSに、化学トレーサーであるD_2O（重水）を組み合わせることで、代謝活動の可視化を可能とした[1]。

D_2Oは、通常の水にある水素原子を重水素に置き換えたもので、通常の水のように振る舞い、少量なら摂取しても安全である。D_2Oは*in vivo*（生体内）で細胞によって代謝され、新たに産生されるタンパク質や脂質、DNAに取り込まれる。炭素とともに、重水素は化学結合を形成し、研究者が発見したように、照射したときにさまざまな周波数で振動する。こうして、タンパク質、脂質、DNAといった高分子を同定でき、周波数特性を用いて、脳、皮膚、その他の臓器における*in vivo*での増加も追跡できる。

D_2Oは、以前は代謝性変化を追跡するためにタンパク質や脂質をラベルするのに使われていたが、これらの手法では多くの分光計と、体から細胞を大量に抽出する必要がある。新たな手法では、細胞内の変化をリアルタイムに、*in vivo*で可視化できる。以前は細胞内のダイナミクスのスナップショットしか得られなかったが、今では「生きた

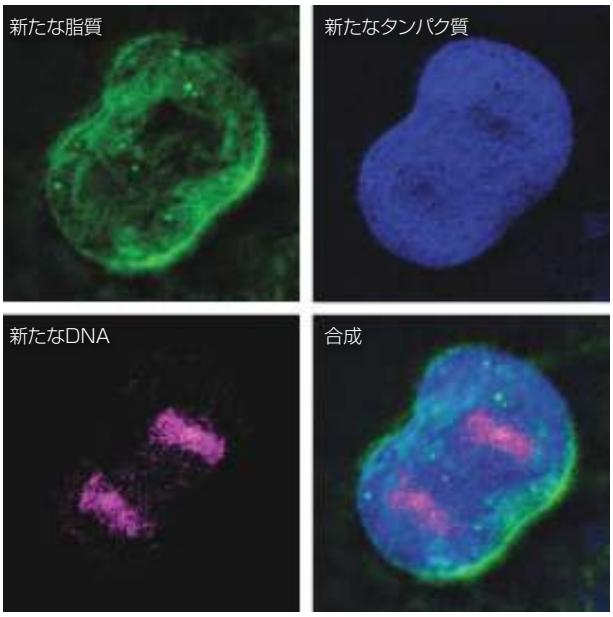

図1　生きた細胞が重水を取り込むと、新たに産生されるタンパク質や脂質、DNAに重水素が取り込まれる。SRS顕微鏡の照射下では、シングルセル内でさまざまな高分子を同定できる。米カリフォルニア大アーバイン校（University of California/Irvine）のエリック・ポトマ化学教授（Eric Potma）は、本研究に参加していないが、この技術を美しくシンプルだと言い、「顕微鏡がより小型になれば、重水素ラベルのSRSイメージングは、より早期の腫瘍発見に貢献するかもしれない」と述べる。（提供：コロンビア大ウェイ・ミン研究室）

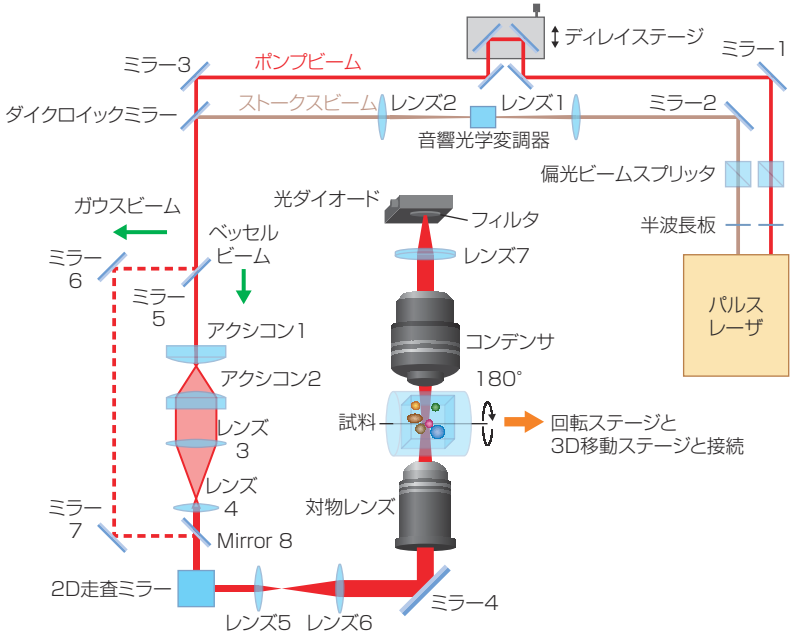

図2　SRP顕微鏡とトモグラフィイメージングシステムでは、調整可能なパルスレーザが、ポンプビームとストークスビームとして1組の同調したフェムト秒の列を発生する。ダイクロイックミラーで2つのビームを時空間的に組み合わせる前に、音響光学変調器がストークスビームを変調し、並進ステージがポンプビームを遅延させる。同一線上に重なったビームは1組のアキシコンに移り、そこではリング状のビームが発生する。ビームは、レーザ操作のために2Dのガルバノシステムに入り、対物レンズに移ってベッセルビームが生じる。試料を通過後、ベッセルビームはコンデンサで集束し、光ダイオードに向かう。光ダイオードの前に2つのショートパスフィルタでストークスビームの成分が除去される。シグナル検出のためのロックイン増幅器の前に、研究室で作った共振増幅器が、光ダイオードで発生する光電流を増幅させる。

動物細胞の内部で何が起きているのか、連続的な画像を得ることができる」と、共著者であるポスドク研究員のリンヤン・シー氏（Lingyan Shi）は言う。「新たなタンパク質、脂質、DNA分子が、いつ、どこで作られるのかを追跡することで、動物がどう成長し、加齢し、そして怪我や病気のときにどう悪化するのか、より多くのことを知ることができる」と、この研究の上席著者であるウェイ・ミン化学教授（Wei Min）は述べる。

この技術の将来的な応用には、腫瘍の切除、そして頭部損傷、成長・代謝異常の発見を迅速かつ正確に行うことが挙げられる。

試験では、通常の水とD_2Oの混合物を線虫、マウス、ゼブラフィッシュの胚に投与し、さまざまな組織で新たに重水素ラベルされたタンパク質、脂質、DNAが産生されるのを、SRSレーザを照射して数時間から数日にわたって観察した。実験により、健常組織とがん性組織の差の詳細な描写など、興味深いかつ有用な応用が明らかにされた。ある実験では、マウスの脳と大腸におけるがん性細胞の分裂を観察し、タンパク質と脂質が重水素を取り込み、腫瘍の周囲に明るいラインが現れることを観察した。これにより、「腫瘍をより容易に切除できる」とシー氏は言う。

実験により、細胞発生と老化に関する多くの知見も得られた。例えば、高齢の線虫ではタンパク質の凝集が観察されたことから、DO-SRSイメージングはタンパク質沈着に関わる、加齢に伴う疾患の追跡に利用でき得る。また、仔マウスの脳発生では、各細胞の周囲にミエリン鞘と呼ばれる絶縁性の脂質層の形成が観察された。この新たな技術により、子どもの適切な脳形成を追跡できるだけなく、脳のミエリンが攻撃されて情報フローが阻害される疾患である多発性硬化症　患者の発見にも貢献できるかもしれない。

体積イメージングのSRP

コロンビア大の研究は、先端研究に向けてSRSを活用する唯一の最新研究である。他の研究者は、別のSRSベースの技術を開発している。米パデュー大（Purdue University）のジーシン・チェン氏（Ji-Xin Cheng）のチームは、卵巣がん幹細胞（CSC）には非常に高レベルの不飽和脂質が含まれていることを明らかにするために、ハイパースペクトルSRSを用いた研究を率いた。そして、この特徴はそれらの細胞のマーカーのみならず、CSC特異的療法の標的となる得ることを示した[(2)]。現在、米ボストン大（Boston University）フォトニクス・光電子工学のムスターカス主席教授であるチェン氏（Cheng）は、化学種を分析する体積イメージング技術である誘導ラマンプロジェクション（SRP）の開発を続けている[(3)]。

体積イメージングは、複雑な3D試料の全体積における定量的な分子データを収集できるため、細胞代謝、脳機能、発生学の研究では極めて重要である。最もシンプルな方法は、軸方向で光学的に切片化することだ（強く集束したレーザビームを必要とする）。もう1つのアプローチは、複数の角度から

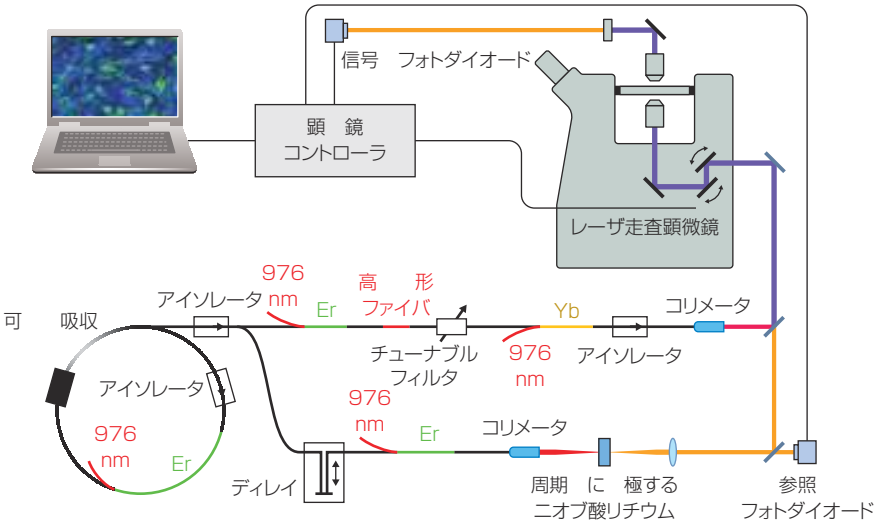

図3 臨床装置は手術室にある他の機器との互換性が容易でなければならないため、統合の容易さは、インベニオ･イメージング社の完全に統合されたポータブルイメージングSRH顕微鏡システムにおいて重要な点であった。この設計を可能とさせる重要な要素は、ファイバ結合した顕微鏡とモーター駆動ステージ、二波長ファイバレーザモジュール、レーザ制御モジュール、顕微鏡制御モジュール、そして画像の取得、表示、処理を行うコンピュータである。レーザの略図では、上の軸がストークスビーム(赤)の発生を示し、下の軸がポンプビーム(オレンジ)の配置を示す。2つのビームは、標本を通過する前に組み合わさる(紫)。

集めたイメージから3Dモデルを再構築するトモグラフィである。光シート蛍光顕微鏡(LSFM)と光プロジェクショントモグラフィが高解像度かつ高速で3Dイメージを行うが、これらは化学標的として蛍光ラベルを必要とし、生物学的機能を障害するかもしれない。

ラベルフリーなSRPによって、3Dのサブミクロン解像度で、高速な体積化学イメージングが可能となる。SRPでは、長距離にわたって軸方向に焦点を合わせ、インプットに使われるベッセルビームのレイリー長に従って、SRS強度と検出されたシグナルが統合する。

標準的なガウスビームベースのSRS顕微鏡と比較して、ベッセルビームベースのSRP顕微鏡は2次元の側方走査から3D体積の全化学組成を定量化できる。しかし、SRP顕微鏡は軸方向の解像度が失われるため、チームは随伴するトモグラフィ手法を開発した。SRPと試料回転を組み合わせることで、ガウスビームベースのSRS切片よりも高速に、光学的な空間解像度で化学組成の3D分布の再構築が可能となる(さらに、より大きい体積のものをより高速にイメージングできる)。

シングルセルの実験によって、SRS切片イメージよりもSRPトモグラフィイメージでは空間解像度がわずかに低いことが確認されたが(SRP計測における有効NAが低いことが原因だ、ガウスSRSは1.07に対してベッセルSRPは0.88)、SRPトモグラフィは3D体積における生体分子の*in vivo*イメージングに確かに応用できる。

チェン氏は、*in situ*(その場)で細胞内の小さな生体分子のモニタリングや代謝作用の理解を目的に、技術の有用性を見ている。知的メリットと広いインパクトに対するレビュー基準に基づいて、彼のチームはさらなる技術開発のために2018年7月に全米科学財団(NSF)の助成金を獲得し、広範な流通を目指した商業化を計画している。

手術中の組織病理に向けたSRH

チェン氏の想像するシステムは、SRSの商業用機器の第2の種となるかもしれない。その後、2012年に設立された米インベニオ・イメージング社(Invenio Imaging)は、ハーバード大化学・生化学科のシェ教授が率いる研究がベースとなっており、米ミシガン大(University of Michigan、UMich)のダニエル・オリンジャー氏(Daniel Orringer)の研究室に、最初に統合されたSRSの研究用顕微鏡を2015年に納品した。これは、NSFの中小企業技術革新研究(SBIR)プログラム、国立衛生研究所(NIH)の生体工学研究パートナーシッププログラム、UMichのトランスレーショナルリサーチ・商業化(MTRAC)プログラムによる。神経外科の准教授であるオリンジャー氏と彼のチームは、400人以上の患者から集めたサンプルを用いてシステムを評価した。そして、NIHの2016年のSBIRプログラムの資金を用いて、インベニオ社のチームはファイバレーザ技術を組み込んだ後続機器を開発した。これは、初の臨床の誘導ラマン組織学(SRH)イメージングシステムである。2017年、脳神経外科会議(CNS)は、SRHの開発におけるオリンジャー氏の役目に対して、イノベーター・オブ・ザ・イヤーに彼の名を挙げた。

SRS顕微鏡は、脳腫瘍の浸潤をフレッシュに、すなわちヒトの組織を処理せずに発見できることがすでに示されていた[4]。2017年、米ニューヨーク大（New York University）、米ブリガム・アンド・ウィメンズ病院（Brigham and Women's Hospital）、ハーバード大、米ダナ・ファーバーがん研究所（Dana-Farber Cancer Institute）、UMich、インベニオ・イメージング社と共同で書かれた論文で、オリンジャー氏は101名の患者から採取した未処理の神経学的標本に、手術中にポータブルシステムでSRS顕微鏡による最初の応用を記述した[5]。さらに、そのグループのSRHイメージを紹介した。すなわち、診断に必須の特徴を明らかにできるヘマトキシリン・エオジン染色組織の仮想的なスライドを作るためのベースとして、SRSイメージを使う処理法だ。グループは、92%以上の正確性と、予測診断においてSRHと従来の組織学の一致を示す特異度（コーエンのカッパ係数、κ >0.89）の両方を証明した。また、脳腫瘍のサブタイプを90%の正確性で予測できる機械学習処理を構築、評価した。

パワーを上げる

チェン氏は明確に述べる。「SRSはシングルセルの代謝イメージングにおいて非常にパワフルなツールとなっている」。光学技術がシステムを発展させ、研究者が応用を押し出すにつれて、SRSがパワーと性能を上げ続けることは疑いようがなく、*in vivo*で高い空間・時間解像度で代謝ダイナミクスのダイレクトな可視化も可能にするだろう。この種のイメージングは生体プロセスを理解するのに必要不可欠であるため、生物科学がさらに進展することが期待できる。

参考文献

(1) L. Shi et al., Nat. Commun., 6, 9, 1, 2995 (2018).
(2) J. Li et al. Cell Stem Cell, 20, 3, 303–314 (2017).
(3) X. Cheng et al. Nat. Commun., 8, 15117 (2017); doi:10.1038/ncomms15117.
(4) M. Ji et al., Sci. Transl. Med., 4, 5, 201, 201ra119 (2013).
(5) D. A. Orringer et al., Nat. Biomed. Eng., 1, 27 (2017).

LFWJ

無料購読お申込み方法

Laser Focus World Japanはレーザ/フォトニクス/オプトエレクトロニクス応用技術/製品の開発、研究、マーケティングなどに携わっている方に無料でお届けする雑誌です。ご希望の方は、お申込書、またはウェブサイトからご登録ください。ご登録内容を確認させていただいた上で読者として正式に登録させていただきます。正式登録完了後は、無料でお送りいたします。

●FAX：03-6721-9891

＊オンラインからのご登録も可能です。
●http://www.lfw-japan.jp
登録内容のご変更もこちらから可能です。

お問い合わせ：株式会社イーエクス プレス
Tel: 03-6721-9890 email: lfwj@lfw-japan.jp

個人情報に関する当社の方針はこちらをご確認ください。
≫ http://ex-press.jp/lfwj/privacy/

ご登録の流れ

お申し込み
FAXまたはURLから

登録審査
ご登録内容から、お申し込みの方が無料購読対象の方かどうか確認させていただきます。

登録完了/購読開始
登録完了後、約1～2ヶ月後の発行号から無料購読を開始いたします。

ご購読の更新
約1年毎に購読継続の確認をさせていただきます。
＊更新の段階で有料購読に切り替わることはありません。