

# 研究報告書

## 「分化・発生を理解する多次元定量計測技術の基盤開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 渡邊 朋信

### 1. 研究のねらい

生命科学の進歩は、計測技術の進歩と共に在る。例えば、1990 年、生命の機能を要素に分解・分析すれば、医学・生命科学に多大な貢献が成されると期待され、ヒトが持つ全ゲノム配列を解読するヒトゲノム計画が開始されたが、それに伴いシーケンサやマイクロアレイ技術の開発が爆発的に発展した。今や、ゲノム情報は圧倒的速度で解析可能となり、遺伝子・蛋白質発現やそれらの相互作用などの情報が網羅的に取得可能である。シーケンサ・マイクロアレイ技術の発展は、生物・医学的情報に、革命的な変化をもたらした。しかしながら、未だ生命の仕組みは解明されていない。例えば、一卵性双生児は、例えゲノム情報が全く同じであったとしても、同じ人間に成長することはありえないが、上記をこれまでの生命理解だけでは説明することはできない。分析・分解型の情報だけでは、生命は語れないのである。21 世紀に入り、生命科学は、生命現象を、従来の要素分解型の理解に留まらず、分解された要素達の相互作用が織り成す複雑系の動的平衡として理解していく段階へと向かっている。生命現象を形成する素子とその現象全体の振る舞いとを層を超えた観察・計測が求められ、そのための技術開発もまた求められる。

生命科学に必要な技術開発は、計測技術に限ることではなく、アッセイ法の開発やゲノム編集法、細胞株の樹立など、生化学的・細胞生物学的手法でも行われている。近年、山中伸弥教授により人工多能性幹細胞(iPS 細胞)が発明された。iPS 細胞は、生命倫理・拒絶反応問題を回避できる幹細胞として、生命研究にパラダイムシフト起し、日本における iPS 細胞に関する研究、あるいは、iPS 細胞を用いた研究は、基礎・応用ともに盛んに行われている。一方、計測技術においては、光学顕微鏡を基盤技術とし、生命を形作る素子である蛋白質の機能や細胞を実時間観察・計測する技術の開発が進んでいる。しかしながら、上記二つの技術は、双方共に日本が世界最先端であるにも関わらず、日本におけるこれら二つを用いた融合研究は、世界から遅れていると言わざるを得ない。今後も当該分野において日本が世界に向けてイニシアティブを示す為には、融合研究をさらに推し進めることが必須であろう。来たる次世代の生命科学研究に向けて、生命現象の『動的』挙動を観察・計測するための様々技術開発、本研究では特に iPS 研究に係る技術開発を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

細胞の分化・リプログラミングのメカニズムには未だ不明な点が多い。その大きな要因として、細胞の「多能性」は、様々な種類の遺伝子発現、エピジェネティクスなどの複雑な相互作用により制御されている事が挙げられる。近年盛んに開発が進んでいるオミックス技術は、遺伝子・蛋白質発現やそれらの相互作用などの分解・分析的情報の網羅的解析を可能とし、上記の問題解決に貢献している。しかしながら、これらは一瞬を切り取った静的

情報であり、また、大量の細胞群のアンサンブルから得られる平均化された情報である。細胞は決して均一な集団ではなく、ひとつひとつが個性を持つ(ヘテロジェナリティ)。ヘテロジェナリティの動的変化が生命現象において決定的な役割を果たすことが明らかになりつつあり、現在の生命科学における計測技術開発の方向性は、『動的』かつ『単細胞精度』へ向かっている。本研究課題においても、細胞の状態を、『動的』かつ『単細胞精度』で観察し、識別・選別し得る技術の開発を中心に行った。

本研究課題の技術開発は、主に光学顕微鏡技術を基盤としたが、その他、生体蛍光プローブの開発や、ナノ・マイクロデバイス技術、質量分析技術など、幅広く技術を取り入れて、総合的・統括的に行った。光学顕微鏡では、広範囲と高解像度との両方を同時に達成できる超解像顕微鏡法、波長 1 ミクロンを超える光を用いた新規深部イメージング装置を開発し、従来の仕様を超えた顕微鏡画像を取得することを可能とした。培養インキュベータに二光子顕微鏡を組み込んだ顕微鏡システムは 1 週間以上の長期培養中の観察を可能とし、さらに、観察対象(例えば、細胞隕)の自動走査や細胞自動認識アルゴリズムを組み込むことで、統括的な観測システムとした。上記により、未分化マーカー発現パターンの細胞と細胞隕間とのバイスケールでヘテロジェナリティを同時観察することができた。生体内プローブの開発では、世界で初めて蛍光蛋白質に疎水感受性を持たせることにより、細胞核内における DNA の凝集を「色」として可視化することに成功した。計測技術のみならず、リプログラミングを促進する技術の開発も行い、既存技術の仕様改善を含めると、合計11の技術開発を行った。

本報告書では、本研究期間中に開発された技術の中で、iPS 研究に有用であった、あるいは、今後有用であると予想される技術のみ、下記に詳細を記す。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「細胞の分化状態を非染色で定義できる光学技術と方法論の開発」

従来は、細胞種を定義するために、遺伝子や蛋白質の網羅的な発現パターンが用いられている。この方法を単細胞レベルで行うことは難しい。一方、細胞種を定義するだけなら、細胞種特有の情報であれば何でも良いと言える。また、iPS 細胞由来の細胞・組織の医療応用を見すえた場合に、細胞分化の状態を蛍光マーカー等で標識することは好ましくなく、非染色・非浸襲での細胞観察が望まれる。そこで我々は、細胞種を識別する『指紋』として、非染色観察が可能な顕微鏡法の一つであるラマン散乱分光法を用いて、細胞の分化状態を定義する技術の開発を行った。

ラマン散乱光とは、物質に光を照射した際における散乱光の一つであり、物質を構成する全ての分子振動の情報を含む。細胞は、様々な物質から構成されているため、細胞のラマン散乱スペクトルは、複雑すぎて要素分解不可能であるが、細胞種によって異なる可能性が強く示唆されている。しかしながら、ラマン散乱光は、非常に微弱であり、信号取得のためには細胞に損傷を与えるほどの強い光照射を必要とする。本研究課題では、ラマン散乱分光顕微鏡の感度を従来の約 100 倍程度向上させ、細胞のラマン散乱分光スペクトルを、細胞を生きのまま取得できる装置を構築した。

上記顕微鏡装置を用いて、細胞株がラマン散乱分光スペクトルにより識別・分離できる

こと、および、分化前後でラマン散乱分光スペクトルが変化することを示した。さらには、胚性幹細胞(ES 細胞)が、未分化維持培養時から分化誘導を行った際に、ラマン散乱分光スペクトルにより定義された細胞状態が、分化誘導後の経時に従い変化する様子を追跡することに成功した。

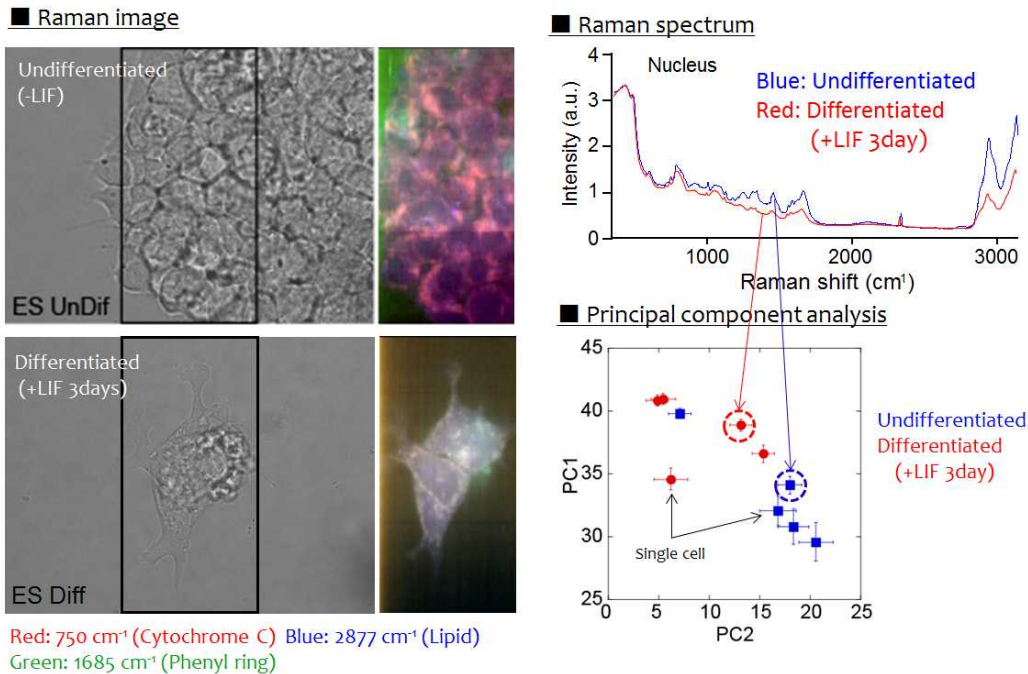


図 1. LIF 除去前と除去後 3 日目の ES 細胞から得られたラマン散乱スペクトル

ラマン散乱光による細胞指紋法に合わせ、我々は、非線形効果の一つである、第二高調波発生を用いた細胞分化状態の識別法も開発してきた。第二高調波は、蛋白質の電氣的偏向による発生する光であり、微小管や筋肉など繰り返し構造から強く発生する光であり、また、その内部の構造情報を含む。我々は、神経細胞における微小管の状態の違い、あるいは、筋肉細胞内における筋肉繊維の状態の違いを、第二高調波により識別できる方法を確立した。本手法は、神経細胞や心筋細胞の分化状態の確認や品質確認、病理診断などに応用する予定である。

#### 研究テーマ B「単細胞セクレトミクス技術の確立」

本研究期間内で開発された技術の中で、もっとも有効的であり、迅速な実用化が見込まれる技術が、単細胞セクレトミクス技術である。現在のオミックス技術の解析標的は、細胞内に在る物質に限られており、分泌液のオミックス技術(セクレトミクス)は確立されていない。細胞外への分泌物質は培養溶液に速やかに拡散し大幅に希釈されるため、検出困難だからである。本研究課題では、マイクロデバイスの開発、および、ナノスプレー技術の応用等により、単細胞感度での分泌液網羅解析(単細胞セクレトミクス技術)を確立した。

本研究期間内に我々は、単細胞をマイクロウェルに閉じ込め、その周辺の隙間にある僅から細胞外液を用いることで、単細胞における細胞外分泌液の質量分析に成功している(図 2、特願 2013-114722)。我々が作成したマイクロウェルでは、ガラス表面に細胞ひとつが収まる大きさ(直径 10~40 $\mu$ m)の円状の親水性被膜が配列されている。その他の部分は、疎水性被膜により覆われている。溶液に含まれる細胞が、重力により十分にガラス表



面近傍に近づいてくるまで待った後に油を散布することで、親水性被膜上にドーム型の小さなウェルが生成され、そこに細胞が捕捉される。

本手法をもちいて、完全な多能性を示す人工多能性幹細胞(iPS 細胞)と不完全な iPS 細胞とを、分泌液の違いで識別することに挑戦した。上記二つの iPS 細胞では、分泌液の成分に、僅かではあるが確実な違いが発見された。251m/z 付近に特徴的なピークが検出され、これは Pentadecane であると考えられる。Pentadecane と分化多能性との関連性の詳細は不明ではあるが、本研究課題で解発された単細胞分泌液質量分析によって、細胞の未分化状態維持には Pentadecane の放出が関連していることが、世界で初めて示された。

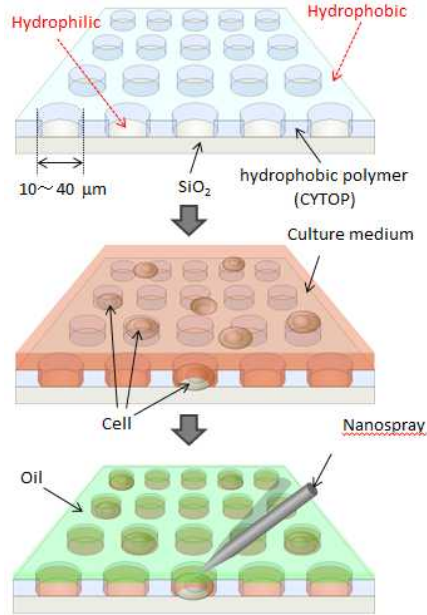


図 2. 単細胞分泌液質量分析法の概略図

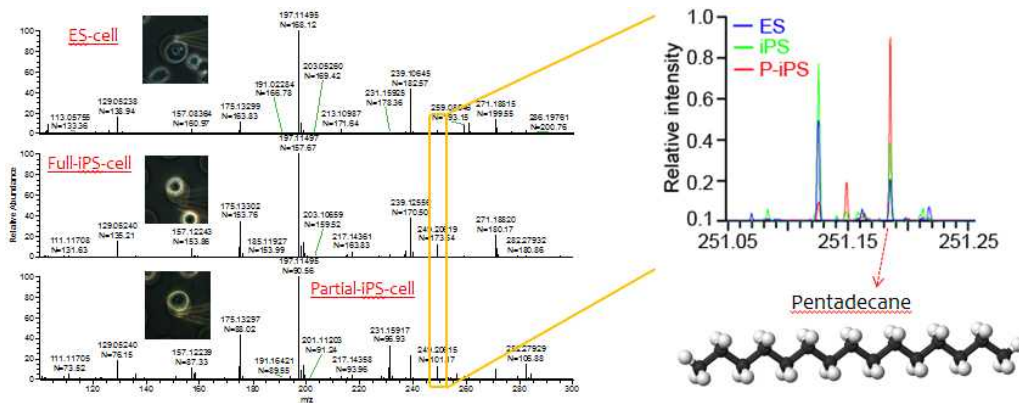


図 3. ES 細胞、partial-iPS、full-iPS 細胞ひとつの分泌液質量分析

### 研究テーマ C「力学刺激による iPS リプログラミングの促進と誘導」

複雑系理論によれば、細胞と言う複雑系が大きく変わる際には、要素間の相互作用には、自己触媒反応、つまり、ポジティブフィードバックが必ず存在する。即ち、リプログラミングの結果に表れる細胞状態の変化を、リプログラミング前の細胞に刺激として強制的に与えれば、その細胞のリプログラミングが促進されるはずである。本研究では、この仮説の是非を試みる実験を行った。

体細胞が iPS 細胞にリプログラミングされると、アクチンフィラメントがモノマー化し、細胞コロニーは丸い形状に変化する。本研究課題では、0.2~1.0kPa の硬さのゲル基盤を作製した。繊維芽細胞を上記ゲル基盤上で培養することで、細胞は球状コロニーを形成する。0.2kPa 状で培養したマウス繊維芽細胞では、約 4 日後に、ほぼ全てのコロニーにおいて、Oct4, Nanog, Rex 陽性であり、ヒト繊維芽細胞ではさらに SSEA3 陽性であった。Oct3/4 の発現増加より前に、Rock2 の発現が著しく低下しており、Rock2 の発現低下が Oct3/4 の発

現を促進していると考えられる。しかしながら、アルカリホスファターゼ活性は、一部のコロニーにしか確認できず、また、このコロニーから得られた細胞には、テラトーマ形成能が無かったことから、未分化マーカーを発現しているものの、未分化能は獲得していないことが分かった。一方で、ゲルの硬さの刺激のみで、リプログラミングに関連する遺伝子発現が修飾されていることは間違いなく、山中ファクターを加えた iPS 細胞の樹立においては、柔らかいゲルを用いることで、樹立効率は 5 倍程度向上した。今後、より詳細に調べると共に、ES/iPS 細胞の安定培養などにも応用していく予定である。

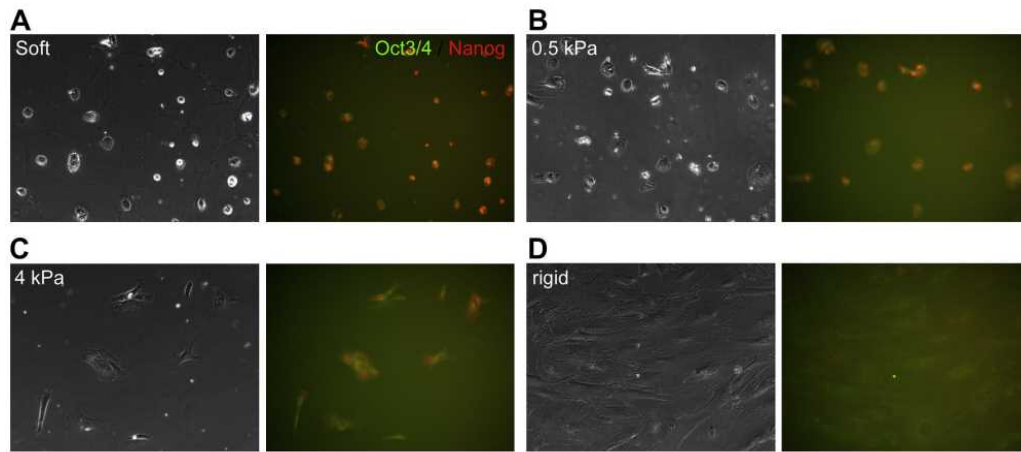


図 4. 様々な硬さのゲル状で培養した繊維芽細胞の顕微鏡像

### 3. 今後の展開

分解・分析型の研究が発展し、遺伝子や蛋白質が要素として複雑に相互作用を成し、複雑系として働くと言う概念が、定着しつつある。一方で、系全体が系外部から受ける信号によって、個々の要素の振る舞いが変わる。生命を複雑系として正しく理解するためには、要素のネットワーク(局視的視点)と系全体の挙動(巨視的視点)との二つの層をまたぐ情報が必要となる。今後は、本研究課題で開発された技術を使用しながら、時に、さらなる技術開発を行いながら、細胞分化・リプログラミングを遺伝子発現ネットワーク、および、細胞間相互作用の層の異なる複雑系として解き明かす予定である。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

研究開始時に計画していた研究結果には遠く及ばない結果となった。上記は、当該研究者の iPS 研究に関する知識・技術不足が大きな要因である。この点に関し、本研究課題は低評価であると言わざるを得ない。特に当該研究者は、当該研究者の保有する基盤技術・知識だけを基盤として、目下の技術開発を行っていたことは否めない。上記は、ひとえに当該研究者の本研究領域における技術的課題・問題点を理解していなかったことに原因がある。しかしながら、3年半の研究期間において、iPS/ES 細胞に関して 3 本の論文を掲載するまでに至り、研究期間終了後にはなるが、今後は、iPS 研究者のひとりとして技術開発が行えると考えている。さきがけ終了後は、染色体異常を単細胞単位で生きたまま検出する、mRNA の発現の生

細胞内網羅的計測など、本領域における根本的問題を解決しえる抜本的な技術基盤の開発を行う。

一方で、計測技術と iPS 研究を繋ぐことに関しては、一定の基準に到達したと言える。三年間で実に 11 個もの新規技術を開発し、その中で 4 つに関しては、iPS 研究を専門とする研究者に評価され共同研究が開始されている。単細胞セレクトミクス技術に関しては、世界で初めて技術を確立した結果となり、本さがけ領域の指針とは多少ずれるものの、生命研究において基盤となりうる技術を開発したと言える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

工学技術を融合するという研究計画で採択されたが、さがけ期間内には期待通りの結果は殆ど得られなかった。ただ幸いな事に少しずつではあるが、他の研究者との共同研究も生まれ始めており今後に期待したい。もともと機器開発はこのグループの本来の研究領域であるため、論文の数は十分であり、この点は評価できる。今後は、工学と生物学研究の本当のブリッジになるためには何をすれば良いのか、この点を更に深く突き詰めていって欲しいと考える。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Higuchi S, <u>Watanabe TM</u> , Kawauchi K, Ichimura T, Fujita H. Culturing of mouse and human cells on soft substrates promote the expression of stem cell markers. J Biosci Bioeng., 2014, in press                           |
| 2. Ichimura T, Chiu LD, Fujita K, Kawata S, <u>Watanabe TM</u> , Yanagida T, Fujita H. Visualizing cell state transition using Raman spectroscopy. PLoS One. 2014, 9, e84478   |
| 3. <u>Watanabe TM</u> , Fujii F, Jin T, Umemoto E, Miyasaka M, Fujita H, Yanagida T. Four-dimensional spatial nanometry of single particles in living cells using polarized quantum rods. Biophys J. 2013, 105:555-564             |
| 4. <u>Watanabe TM</u> , Tsukasaki Y, Fujita H, Ichimura T, Saitoh T, Akira S, Yanagida T. Distinct modulated pupil function system for real-time imaging of living cells. PLoS One. 2012, 7, e44028.                               |
| 5. <u>Watanabe TM</u> , Higuchi S, Kawauchi K, Tsukasaki Y, Ichimura T, Fujita H. Chromatin plasticity as a differentiation index during muscle differentiation of C2C12 myoblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2012, 418, 742-747 |

(その他 6 件)

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

1.

発 明 者 : 藤田英明, 升島努, 渡邊朋信, 野地博行, 金秀炫

発明の名称： 細胞分泌液網羅的分析装置、および、方法  
出願人： (独) 理化学研究所  
出願日： 2013/5/20  
出願番号： 特願 2013-114722

2.

発明者： 渡邊朋信, 慶澤景子  
発明の名称： 細胞内蛋白質濃度計測方法  
出願人： (独) 科学技術振興機構  
出願日： 2013/1/13  
出願番号： 特願 2013-016819

3

発明者： 渡邊朋信  
発明の名称： 観察装置及び観察方法  
出願人： 大阪大学  
出願日： 2011/2/7  
出願番号： PCT/JP2011/052543, 特願 2012-509339

4

発明者： 渡邊朋信, 慶澤景子  
発明の名称： 改変蛍光蛋白質  
出願人： (独) 科学技術振興機構  
出願日： 2010/11/12  
出願番号： PCT/JP2011/075932, 特願 2012-516252

### (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)

国際学会・シンポジウムにおける招待講演

1. Tomonobu M Watanabe, Resolution Enhancement Method using a Wide Field Fluorescence Microscope, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry , Kyoto, 8/29/2012
2. Tomonobu M. Watanabe, Katsumi Imada, Keiko Yoshizawa, Masayoshi Nishiyama, Chiaki Kato, Fumiyoshi Abe, and Toshio Yanagida, Intracellular Pressure Measurement by using Pressure sensitive yellow fluorescent protein, 56th Annual Meeting on Biophysical Society, San Diego, California, USA , 2/4/2012
3. Tomonobu M Watanabe, High speed superresolution & pressure indicative fluorescent protein, Seminar at Research Center for Applied Sciences Academia Sinica (RCAS), Taipei, Taiwan, 10/25/2011
4. Tomonobu M. Watanabe, Yoshikazu Tsukasaki, Tatsuya Saitoh, Shizuo Akira, Toshio Yanagida, High speed Resolution Enhancement by optical pupil function modulating system, 55th Annual Meeting on Biophysical Society, Baltimore, Maryland, USA , 3/8/2011
5. Tomonobu M Watanabe, Simple Superresolution Methods by Using a Conventional Fluorescent Microscope, International Symposium on Photonic Bioimaging, Hokkaido, 2/08/2011

(その他 3 件)

国内学会・シンポジウムにおける招待講演

1. 渡邊朋信、物理パラメーターを計測する蛍光蛋白質の開発、第 6 回 CREST 講演会・光が拓いた新しい細胞解析技術、東京、2013 年 8 月 24 日
2. 渡邊朋信、光学顕微鏡で生細胞の内部を観て測る、日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会、大阪、2013 年 5 月 22 日
3. 渡邊朋信、Resolution enhancement method focusing on usability and applicability for cell biology、第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸、2012 年 5 月 31 日
4. 渡邊朋信、高速超解像技術と圧力感受性蛍光蛋白質の開発、第 5 回 NIBB バイオイメージングフォーラム、岡崎、2011 年 1 月 11 日
5. 渡邊朋信、ナノシステムを定量する新規計測技術の総合的開発、第 84 回日本生化学会学会大会、京都、2011 年 9 月 16 日

(その他 11 件)

和文書籍・総説・解説

1. 渡邊朋信, 市村垂生, 「15 章 1 分子を見る光学顕微鏡」, 化学同人「1 分子生物学」(2014)
2. 渡邊朋信, 市村垂生, 神隆「生体分子のナノスケール動態を光で追う」日本興業出版、光アライアンス 2013 年 4 月号(2013)
3. 渡邊朋信, 「超解像光学顕微鏡で観える HIV-1 の成熟過程」羊土社 実験医学 2013 年 4 月号 (2013)