

研究終了報告書

「極限的分子感度・空間分解能・時間分解能を有する分子イメージング法の創出」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：南川 丈夫

1. 研究のねらい

脂質は、タンパク質、核酸、糖質などとともにヒトや動物の細胞や組織を構成する主要な要素であるが、過剰に体内に蓄積されると脂質代謝異常が発現し、様々な疾患を誘発することが知られている。これらの疾患では、脂質分子の分子構造の違いに由来する代謝異常が疾患の進行、予後に大きく影響していることが指摘されている。しかし、脂質分子の構造的違いが、細胞や組織に分布し、どのようにタンパク質等と相互作用して疾患に繋がるかの根幹的なメカニズムについては不明な点が多い。これは、特に脂質の分布や構造の時空ダイナミクスの解析に適したイメージング技術の不足に起因する。

そこで本研究では、分子の構造をその分子振動から捉えることが可能なラマン散乱分光法に着目し、申請者らが実証してきたマイクロメートルオーダーでのプラズモニック光増強機構(リモートプラズモニック光増強)を基盤とする、従来法の検出感度・空間分解能・時間分解能を超える革新的分子イメージング法の開発を行う。そして、分子構造に基づいた脂質分子の生理学的、病理学的メカニズムの解明を目指す。

そのため、本研究では以下の2点を重点的に行う。

まず、申請者らが実証してきたリモートプラズモニック光増強メカニズムの解明とそれを応用した革新的分子イメージング法への展開を行う。リモートプラズモニック光増強とは、申請者らが実証してきたマイクロメートルオーダーでの長距離プラズモニック光増強である。この現象は、従来のプラズモニクスでは説明が困難である。そこで、まず長距離プラズモニック光増強機構を光学的観点から明らかにする。さらに、リモートプラズモニック光増強機構を活用し、生体内分子を高感度・高空間分解能・高速に観察可能な革新的分子イメージング法の開発を行う。

次に、脂質の構造に着目した細胞や組織中の脂質分子機構の解明を行う。細胞や組織に蓄積する脂質分子に着目し、飽和脂肪酸/不飽和脂肪酸などの脂質の分子構造が細胞生理・病理機能へ与える影響の解明を試みる。特に、細胞に蓄積される脂肪滴と、脂質と共有結合することで脂肪滴やそのオートファゴソームに関わるタンパク質の相互関係について着目する。また、脂質の分子構造の関与が示唆されている非アルコール性脂肪性肝炎の解析も行い、脂質構造がいかに疾患と結びつくのかを明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、分子の構造をその分子振動から捉えることが可能なラマン散乱分光法に着目し、申請者らが実証してきたマイクロメートルオーダーでのプラズモニック光増強機構(リモートプラズモニック光増強)を基盤とする革新的分子イメージング法の開発を行った。また、生体イメージングへ応用し、非アルコール性脂肪性肝疾患における脂質分子の異常分布を明らかにし、脂質分子機能に基づく肝臓病理学の可能性を拓いた。

本研究では、まずリモートプラズモニック光増強基板の開発を行った。その結果、金属ナノ構造と接触していない状況下においても、高いラマン散乱光増強(10^4 以上)を得られることを明らかにした。さらに、非線形光学への応用も行い、光増強基板による非線形ラマン散乱光の増強特性を明らかにした。

次に、光増強基板を組み込み可能なラマン分光法を含むマルチモーダル光学顕微鏡の開発を行った。その結果、同視野観察が可能で回折限界分解能を有するラマン散乱分光顕微鏡・第二次高調波発生顕微鏡・蛍光顕微鏡の構築に成功した。また、波長特性を取得可能な多波長対応型ラマン分光計の構築にも成功した。

最後に、細胞・組織イメージングへの応用を行った。その結果、非アルコール性脂肪性肝疾患の肝臓組織に蓄積した脂肪滴において、脂質分子が異常分布することを明らかにした。特に、小滴性脂肪滴と大滴性脂肪滴において脂質分子種(中性脂肪、コレステロールなど)や脂肪酸不飽和度が異なることを明らかにした。次に、光増強基板を用いた生体組織イメージング法の開発を行った。その結果、開発した光増強基板を用いて高感度ラマンイメージングを実現できることを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマA「リモートプラズモニック光増強機構の考察」

リモートプラズモニック光増強の増強機構について実験的、理論的に考察を行った。その結果、実験的手法では、様々な光増強基板の製作条件、測定分子、励起波長などを検討することで、ラマン散乱が増強する条件を明らかにした。また、理論的手法では、電磁場シミュレーションを用いた光増強基板中の電磁場解析を行い、誘起される電磁場分布を明らかにした。これらにより、リモートプラズモニック光増強の物理描像を明らかにした。

研究テーマB「リモートプラズモニック光増強基板の最適化」

最適なリモートプラズモニック光増強基板の開発を行った。具体的には、プラズモニック構造を作成するための基板の選定、金微粒子およびプラズモニック構造の製作条件の検討を行い、最適な光増強基板の条件を検討した。その結果、金属ナノ構造と接触していない状況下においても、高いラマン散乱光増強(10^4 以上)を得られることを明らかにした(図1)。さらに、非線形光学への応用も行い、光増強基板による非線形ラマン散乱光の増強特性を明らかにした。

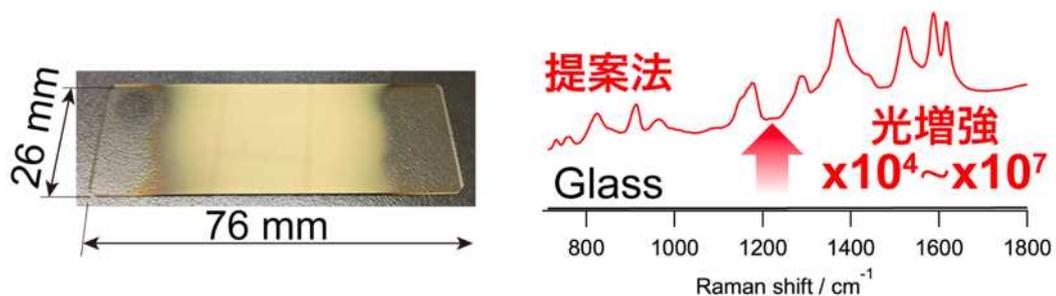


図1 リモートプラズモニック光増強基板による高感度ラマン分光

研究テーマ C「リモートプラズモニック光増強を援用したラマン散乱分光イメージング法の開発」

次に、光増強基板を組み込み可能なラマン分光法を含むマルチモーダル光学顕微鏡の開発を行った。具体的には、新たに高感度分光器、高感度2次元検出器を導入し、ガルバノミラーを用いた各試料位置をランダムアクセス可能なレーザースキャン型光学顕微鏡を構築した(図 2)。その結果、同視野観察が可能で回折限界分解能を有するラマン散乱分光顕微鏡・第二次高調波発生顕微鏡・蛍光顕微鏡の構築に成功した。また、波長特性を取得可能な多波長対応型ラマン分光計の構築にも成功した。

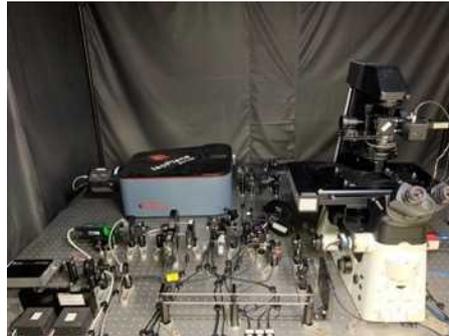


図 2 光増強基板を組み込み可能なラマン散乱分光イメージングシステム

研究テーマ D「細胞・組織イメージングへの応用」

最後に、細胞・組織イメージングへの応用を行った。まず、非アルコール性脂肪性肝疾患のモデルマウスを用い、開発したマルチモーダル光学顕微鏡を用いて脂質分子の解析を行った。その結果、非アルコール性脂肪性肝疾患の肝臓組織に蓄積した脂肪滴において、脂質分子が異常分布することを明らかにした(図 3)。特に、小滴性脂肪滴と大滴性脂肪滴において脂質分子種(中性脂肪, コレステロールなど)や脂肪酸不飽和度が異なることを明らかにした。次に、光増強基板を用いた生体組織イメージング法の開発を行った。その結果、開発した光増強基板を用いて高感度ラマンイメージングを実現できることを明らかにした。

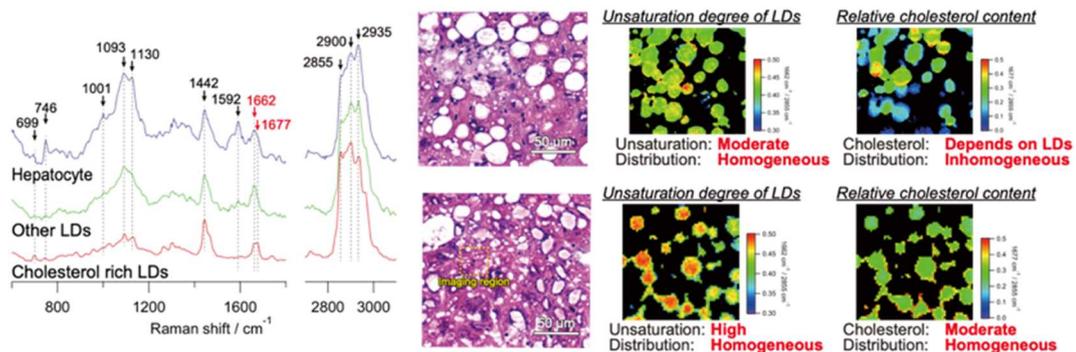


図 3 脂肪性肝炎モデルマウスの肝組織におけるラマン分光解析

3. 今後の展開

本研究では、分子の構造をその分子振動から捉えることが可能なラマン散乱分光法に着目し、申請者らが実証してきたマイクロメートルオーダーでのプラズモニック光増強機構(リモート

プラズモニック光増強)を基盤とする革新的分子イメージング法の開発を行った。この成果は、金属ナノ構造との直接的接触を必要としない新しい光と分子の相互作用の探求に繋がり、リモートプラズモニクスという新しい学術分野の開拓につながる。さらに、金属との直接的接触を伴わないため、金属との直接的接触による弊害(測定分子の劣化、金属ナノ構造の劣化など)を回避した新しい分子検出法への展開にも期待が持てる。

また、本研究では、非アルコール性脂肪性肝疾患における脂質分子の異常分布を明らかにした。この成果は、脂質分子の病原性物質としての可能性を示すものであり、脂質分子に基づいた新たな非アルコール性脂肪性肝疾患の病理メカニズムの解明、および脂質分子に基づく診断法への展開が期待できる。これらから、脂質分子機能に基づく肝臓病理学という新しい学術分野の開拓につながる。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究では、まずリモートプラズモニック光増強の増強機構の解明と最適化を実施した。これらの結果、リモートプラズモニック光増強の物理描像の一端を明らかにし、金属ナノ構造と接触していない状況下における高いラマン散乱光増強(10^4 以上)の実現、線形ラマン散乱および非線形ラマン散乱光の増強特性を明らかにできたことから、研究目的は概ね達成できた。しかし、増強機構について未だ不明な点もあり、増強の厳密な数理モデル化に至らなかった点は反省点である。今後のさらなる検討が必要である。

次に、リモートプラズモニック光増強を援用したラマン散乱分光イメージング法の開発を行った。光増強基板を組み込み可能なラマン分光法を含むマルチモーダル光学顕微鏡の構築に成功し、また、波長特性を取得可能な多波長対応型ラマン分光計の構築にも成功したことから、装置開発という観点では研究目的を達成できた。しかし、当初は非線形光学効果による、より高速・高感度なイメージングへの展開を目指していたが、想定とは異なる増強機構が明らかとなったため、方向転換が求められた。そのため、リモートプラズモニック光増強の非線形光学への展開については、さらなる検討が必要である。ただし、自発ラマン散乱においても 10^4 以上の高感度化を達成できたことから、概ね当初の目標値を達成することはできた。

最後に、細胞・組織イメージングへの応用を行った。まず、開発したマルチモーダル光学顕微鏡を用いて脂質分子の解析を行い、脂質分子が異常分布することを明らかにできた。また、光増強基板を用いて高感度ラマンイメージングを実現した。これらから、研究目的を概ね達成できた。

以上のことから、本さきがけプロジェクトで設定した研究目的は、概ね達成できた。しかし、数理モデル化などの点が十分実現できていない点や、非線形光学へ応用など方向転換が求められた点もあることから、今後、さらなる検証を進める必要がある。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

本研究は、当初の計画通り、概ね順調に研究を進めることができた。また、既存、あるいは新規の共同研究を含め、研究を進めるのに十分な実施体制も構築することができた。ただし、新型コロナウイルスの影響で、一部、共同研究等の実施が困難であった面もある。

研究費の執行についても、当初の予定通り、リモートプラズモニック光増強基板の製作環境

の整備, ラマン散乱を含むマルチモーダル光学顕微鏡の環境整備を行い, 研究費を執行できた. 2020年度は, 新型コロナウイルスの影響により, 国内外の学会発表が無くなったが, その分の旅費を実験経費に回すことができ, 効果的な予算執行ができた.

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究は, マイクロメートルオーダーでのプラズモニック光増強機構(リモートプラズモニック光増強機構)という新しい光と分子の相互作用を基盤とした革新的分子イメージング法の開発と脂質分子機能に基づいた非アルコール性脂肪性肝疾患の解析を実現した. このように, 本研究は, リモートプラズモニクスという新たな科学知識に基づく創造的な革新的技術のシーズの創出を実現した. そのため, 本成果は, 科学技術及び社会・経済への波及効果が期待できる. 具体的には下記のとおりである.

リモートプラズモニック光増強機構は, 従来のプラズモニクスのコンセプトを大きく変えることに繋がり, プラズモニクスの学術的に深化させるとともに, プラズモニクスの更なる応用展開の可能性を広げることに繋がるため, フォトニクス分野への学術的な波及効果が期待できる. また, 今後, さらにリモートプラズモニック光増強機構を活用した検出法を社会へ還元していくことで, 産業への波及効果も期待できる.

また, 脂質分子機能に着目した非アルコール性脂肪性肝疾患の解析は, 従来解析法が乏しかったために見過ごされてきた脂質分子が疾患中でどのように働くかを明らかにすることに繋がり, 脂質分子機能病理学の開拓につながることから, 医学分野への学術的波及効果も期待できる. さらに, 本研究が更に発展し, 脂質分子に基づいた非アルコール性脂肪性肝疾患の診断法に繋がれば, 脂質分子機能診断に基づく新たな医療基盤の創成に繋がり, 医療という観点での波及効果も期待できる.

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: 4件

1. Tsunehisa Yamamoto, ***Takeo Minamikawa**, Yoshinori Harada, Yoshihisa Yamaoka, Hideo Tanaka, Hitoshi Yaku, and *Tetsuro Takamatsu, "Label-free evaluation of myocardial infarct in surgically excised ventricular myocardium by Raman spectroscopy", *Scientific Reports*, **8** (1), 14671 (2018).

虚血性心疾患に対する外科的治療方針の決定には, 心筋機能の回復能力(心筋バイアビリティ)の評価が強く求められるが, 心筋バイアビリティを分子機能に基づいて手術中にその場で評価する手法は存在しない. そこで本研究では, 左室形成術時に切除したヒト心筋梗塞組織の機能を組織レベルで評価するための新たな手法の開発を目指し, ラマン散乱分光法を用いた新たな虚血性心疾患診断法の開発を行った. その結果, 心臓機能を反映する情報(チトクロームなどの心筋組織における機能分子, 細胞・組織形態など)を染色すること無く抽出・描出可能であることを実証した.

2. ***Takeo Minamikawa**, Mayuko Ichimura-Shimizu, Hiroki Takanari, Yuki Morimoto, Ryosuke Shiomi, Hiroki Tanioka, Eiji Hase, Takeshi Yasui, and Koichi Tsuneyama, "Raman imaging

analysis of microvesicular and macrovesicular lipid droplets in non-alcoholic fatty liver disease”, *Scientific Reports*, (in press).

非アルコール性脂肪性肝疾患は、生活習慣病を代表する典型的な脂質代謝異常蓄積を伴う疾患であるが、その発症機序は未だに不明な点が多い。そこで本研究では、ラマン散乱分光顕微鏡を用いることで、蓄積した脂肪の分子構造という観点から非アルコール性脂肪性肝疾患を解析可能な手法の開発を行った。その結果、非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスにおいて、肝組織における脂肪滴の特徴的な分布を明らかにした。特に、大滴性脂肪滴と小滴性脂肪滴で、脂質の不飽和度やコレステロール/トリグリセリド比などが異なることが明らかにした。

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のものも含む)

(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)

1. 日本機械学会奨励賞
2. 徳島大学若手研究者学長表彰
3. 南川丈夫, 術中医療診断を目指したラマン散乱分光法～分子振動に基づく新たな無染色組織分子診断法～, 分光研究, 68 (4), 142-149 (2019).
4. 南川丈夫, ラマン散乱分光法を用いた無染色分子組織診断, 第 58 回日本生体医工学会大会, 沖縄, 2019 年 6 月 6-8 日
5. 南川丈夫, ラマン散乱分光法による生体組織機能情報の可視化, レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会, Online, 2021 年 1 月 18-20 日