

[研究助成 (A)]

シーケンシングと機械学習が駆動する
細胞フェノタイピング技術にむけて

Toward multi-modal cell phenotyping for networked biophotonics

2181005



研究代表者

東京大学
先端科学技術研究センター

准教授

太田 禎 生

[研究の目的]

細胞は部品や設計図が分かっているにもかかわらず、働く仕組みまだまだ分からない、膜に包まれた直径10 μm オーダーの微小構造体です。そしてフェノタイプ（表現型）とは、ジェノタイプ（遺伝子型）と環境因子の関わり合いの結果として観察できる特徴セットであり、フェノタイピングはこれを調べていく研究と捉えています。もう少し噛み砕けば、細胞の設計図たる遺伝子型を知った上で、細胞に色々と問いかけてみてその応答を観察し、中で何が起きているのか、あるいは如何に求めた応答が得られるか、私たちは理解を目指していると言うことと考えています。

問いかけ方は、例えば薬を与えてみたり、環境を変えて飼ってみたり、様々です。それでは応答は何を見るのでしょうか。まず細胞内のある時点で構成分子の有無を、細胞を壊して網羅的に検出する分子フェノタイプ解析は、分子的な機序の説明を支持する上で、非常にパワフルなアプローチです。近年、1細胞毎の個性を高解像度に調べるシングル解析分野が興隆していますが、その中心は次世代シーケンシング技術による遺伝子発現解析は、この分子解析に含まれます。分子のレベルの解像度で、細胞の中の構成要素を定量的に測れるようになった技術の進歩には、本当に凄まじいものがあります。一方、構成分子が構造的にいかにか機能しているの

かを見るためにパワフルなのが、光イメージング技術です。光イメージング技術の長所は、壊してしまっても機能しないブラックボックスの応答を、迅速かつ安価に調べられる点にあります。どんなに細かく要素を計測できるようになっても、（細胞が計算機内で完全に再現でもされない限り）、こうして非破壊に問いかけなければ、人の仮説は検証するのは容易ではないためです。一方で、光イメージングが、塩基配列のような分子レベルの解像度と特異度を得るには、まだ時間がかかりそうです。

このように、細胞を壊して要素を調べる分子フェノタイプ解析と、細胞を壊さずに総体として観る光イメージングは一長一短で、いずれもが欠かせない技術です。今後は、この仕組みのわからないブラックボックスを様々な角度から計測し、データを紡いで理解していく方向性ますます重要になってくると考えられます。しかし従来法において、この分子フェノタイピングと非破壊イメージング技術を融合し、データの価値を活かしきるのは容易ではありませんでした。そこで私たちはこれを可能にすべく、イメージング技術とシーケンシング技術を繋ぎ合わせることで、機械学習の力をフルに引き出す技術基盤を目指しています。その基盤内の1つの重要な構成技術である高速三次元フローイメージング技術を、立石財団のサポートを頂きながら実現を目指してきたので、ここに報告し

ます。

[研究の内容, 成果]

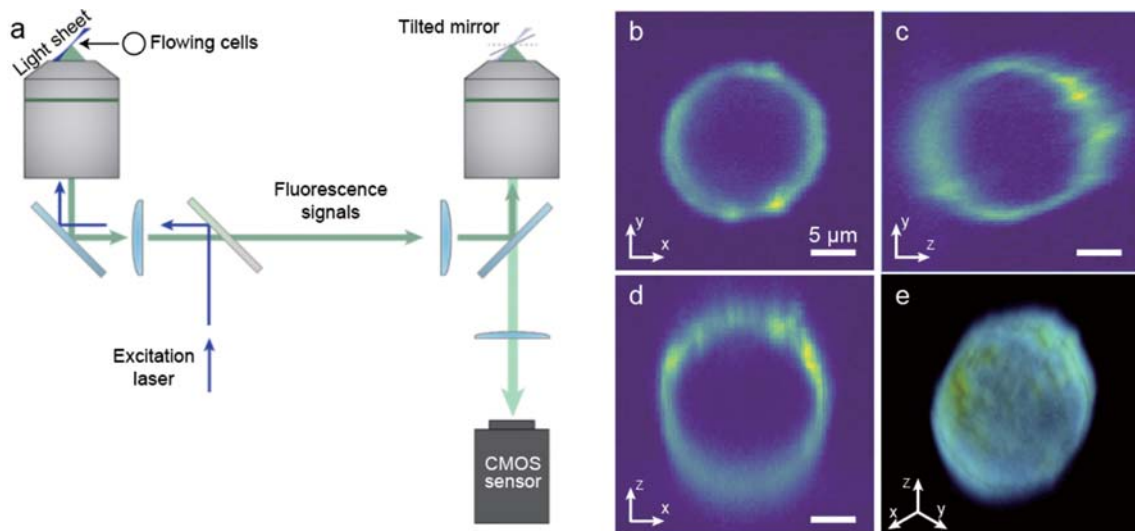
1. 3D イメージング技術背景

細胞は三次元の構造物ですので、その構造を評価する上で、細胞の三次元 (3D) イメージングは非常に有用です。しかし一般的に、カメラの二次元 (2D) 素子に結像する 2D イメージング手法と比べると、奥行き方向の空間情報を取得するために時間がかかってしまいます。そのため、細胞 3D イメージングのハイスループット化は容易ではありませんでした。そこで私たちが採用したのが、Axial-plane optical microscopy (APOM) と呼ばれる技術です[1]。APOM は、対物レンズの縦面 (光軸に平行な面) を直接カメラに結像する光学顕微鏡法であり、光シートで対物レンズ上のサンプルを励起し、光シートを通り過ぎる細胞の 2D 切断面を連続的に取得することができます。言い換えれば、サンプルを対物レンズ光軸に直交する方向に動かすだけで 3D 画像を取得でき、高速で連続的に大量の 3D 細胞画像を撮像できるようになるという仕組みです。私たちは本研究において、この高速 3D イメージング系を改変し、マイクロ流路を組み合わせ、流れる細胞のハイス

ループットなイメージング法を開発してきました。

2. 単一对物レンズ光シート顕微鏡の仕組み

図 1(a) に示すのは、本研究開発で構築した、改変 APOM 式の光流体ライトシート 3D 顕微鏡システムです。この系ではまず、サンプルに面した対物レンズとは離れた地点で、サンプルの光学像を同一なレンズを用いて結びます。そこに例えば 45 度に傾斜した鏡を配置しておく、鏡での反射により対物レンズ光軸に平行な縦平面を光軸直交平面にひっくり返す事ができ、その結果、光軸に垂直に配置する通常のカメラで縦平面画像を撮像する事ができます[1]。この光学系により、深さ方向に広がる平面の撮像を、スキャンすることなく実現することができます。本研究では、縦平面ではなく傾斜した平面を、オリジナル APOM よりも傾斜させた鏡により同様の仕組みを用いて、直接カメラに結像しました。これにより、収差に由来して生じる画像の歪みを減らし、傾斜した鏡からの反射してくる光信号の収率を高めています。そしてこの系に、カメラ結像面と一致するように光シート照明を導入し、単一对物 (サンプルに対して) レンズの上で、対象がシートを横切るように動かすと、対象の 2D 断面が連続的に



(a) 光学系模式図, (b)-(d) 二次元切断像, (e) 三次元再構成像

図 1 開発した単一对物レンズライトシート顕微鏡と、細胞蛍光三次元イメージング

取得され、3D ライトシート顕微鏡として機能することとなります。実験上においては、対象である細胞は電動ステージ上に載せて光学系の光軸に垂直に移動するか、マイクロ流路中にサンプルを流すことにより、連続的に2D画像を計測し、そこから細胞の3D画像を再構築しています。

3. 高速3Dイメージング実証

3Dイメージング実証においては、まず膜を蛍光染色した細胞を準備しました。k562細胞（直径約15 μm 、CellMask Green Plasma Membrane Stain 染色）を載せたサンプルを電動ステージで光軸に垂直に移動させることで2D断面画像を連続に取得し（図1b~1e）、この画像スタックから3D画像を計算機内で再構築しました。細胞膜をイメージングできている結果から、この光シート顕微鏡が、深さ方向にスキャンすることなく、深さ方向の解像能力を有することが実証されています。

本技術の長所は、深さ方向にスキャンする必要が無いため、他の手法よりも高速に三次元イメージングできる点です。また二次元イメージングと比べると、深度方向に重なり合っている細胞を空間的に識別できるという強みもあります。これらを実証するために広視野での細胞集団の撮像を行いました。この実験では、死細胞

蛍光染色（LIVE / DEAD Fixable Green Dead Cell Stain）を施した MIA PaCa-2 細胞をゲル中に固定し、このゲルを電動ステージを用いて0.5 mm 毎秒の速度で光軸に垂直に移動し、sCMOSカメラ（scientific Complementary metal-oxide-semiconductor camera）を880フレーム毎秒のフレームレートで用いて、光切断面を連続イメージングしました。図2(a)に示すのは切断面の蛍光画像であり、z方向は深さ方向の情報を持っています。そのため、深さ方向に重なっている細胞も、空間的に別々に見分けることができます。この連続光切断イメージングを1136ミリ秒行って、合計2791細胞を撮像し、図2(b)のように三次元画像を再構築しました。検出スループットにして、2457細胞毎秒と換算されます。

そして、この新しい顕微鏡を用い、PDMS（ポリジメチルキサン）とガラスで作られたマイクロ流路デバイスを流れる細胞の3Dイメージングの実証に進みました。蛍光染色された MIA PaCa-2 細胞を流路に送液し、光シートを通り抜けていく切断面像を連続的に撮像し（図2(c)）、細胞を高速に3Dイメージングすることができます（図2(d)）。お見せしているデータでは、52細胞毎秒相当のスループットで細胞が3Dイメージングされています。現在、さらに遥かに多くの細胞を、同時に流して撮像

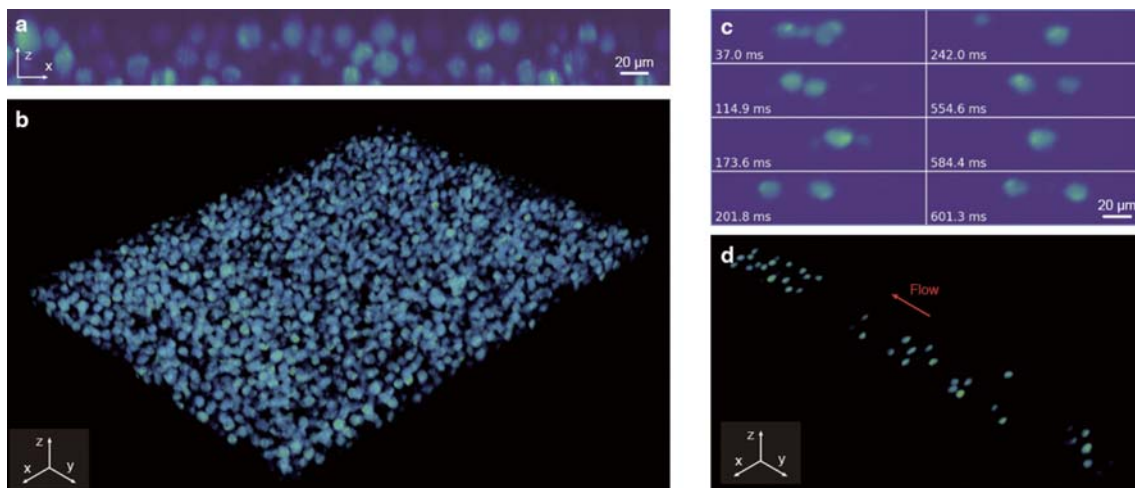


図2 開発した単一对物レンズライトシート顕微鏡によるハイスループット撮像

することができる流体技術を導入することにより、スループットは大幅に増加（1000 細胞毎秒以上）してきています。また、イメージングの多色化も進展しています。

4. まとめと今後の展開

以上のように、APOM 光学系を改変した単一对物レンズの光シート顕微鏡を構築しました。そして、最終的にはマイクロ流路技術と組み合わせることにより、ハイスループットな 3D 光流体イメージング技術を開発・実証しました。本研究期間内においては実現に至りませんでしたが、この高解像な細胞情報計測技術を、今後はシーケンシング技術と融合していきます。この融合システムの実証を通し、未だブラックボックスである細胞の網羅的なフェノタイプ

解析の進展に、大きく貢献していけると考えています。

[成果の発表, 論文等]

おかげさまで投稿論文に関しては、現在執筆中です。以下には、学会発表を記載します。

- [1] Masashi Ugawa, Sadao Ota, High-throughput optofluidic 3D imaging, *The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2019)*, 2019.

[参考文献]

- [1] T. Li, S. Ota, J. Kim, Z. J. Wong, Y. Wang, X. Yin, and X. Zhang, "Axial Plane Optical Microscopy," *Scientific Reports*, 4, 7253, 2014.