

CARS 分光イメージング法による iPS 細胞の非染色・非標識イメージング

(筑波大・数理¹ 東大院・理² 筑波大・医³)

○米山弘亮¹, 瀬川尋貴², 西村健³, 福田綾³, 久武幸司³, 加納英明¹

Label-free imaging of iPS cells using CARS spectral imaging

(University of Tsukuba¹, The University of Tokyo², University of Tsukuba³)

○Hiroaki Yoneyama¹, Hiroki Segawa², Hisatake Koji³, Fukuda Aya³, Nishimura Ken³, and Hideaki Kano¹
hiro1028.bass@gmail.com

【序】現在、iPS 細胞を再生医療へ応用する研究が盛んに進められている。しかしながら、十分な多能性の有る良質な iPS 細胞を選別する方法が未だに確立されていない。iPS 細胞は、培養時に多能性の無い細胞が発生することがあり、この多能性の無い細胞が移植の際に混入すると、生体組織内に腫瘍を形成する可能性があるため、再生医療への大きな妨げとなっている。そこで本研究では、非線形ラマン分光イメージング法を用いて、非破壊・非侵襲・非染色・非標識にて iPS 細胞の分子イメージングを行い、多能性を有する良質な iPS 細胞を識別・スクリーニングする方法の開発を試みた。

【実験】測定には、研究室で開発したマルチプレックス CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) 分光システムを用いた。本研究では、図 1 に示す二種類の iPS 細胞を用いた。一つは通常通り準備した多能性を有する iPS 細胞、もう一つは、体細胞に導入する Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの転写因子のうち、Klf4 の導入量を減らすことでできる、多能性の無い細胞である[1]。両者は共に高い増殖能を持ち、同様な細胞塊を形成する。これら二種類の細胞の違いは、多能性発現の識別マーカーの一つである Nanog 遺伝子の発現の有無で確認できる。この遺伝子発現を図 2 のように緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) による蛍光イメージングで確認しながら、CARS 測定を行った。

【結果】

通常通り培養した iPS 細胞の実験結果を図 3、図 4 に示す。図 3 のスペクトルは、測定で得られた CARS スペクトルから最大エントロピー法 (Maximum Entropy Method: MEM) を用いて抽出した $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルを特異値分解 (Singular Value Decomposition: SVD) 解析して得られたものである。

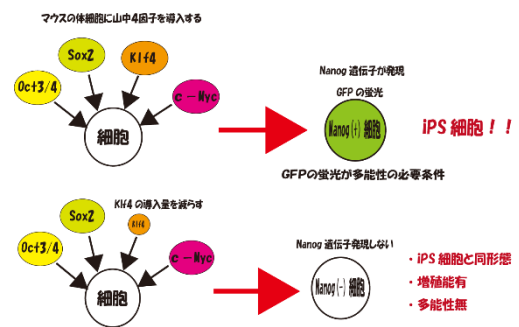


図 1 測定した二種類の細胞の概略

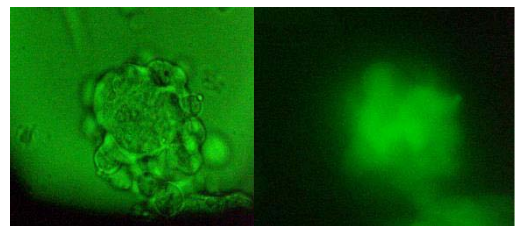


図 2 iPS 細胞塊の光学像(左)と GFP 蛍光像(右)

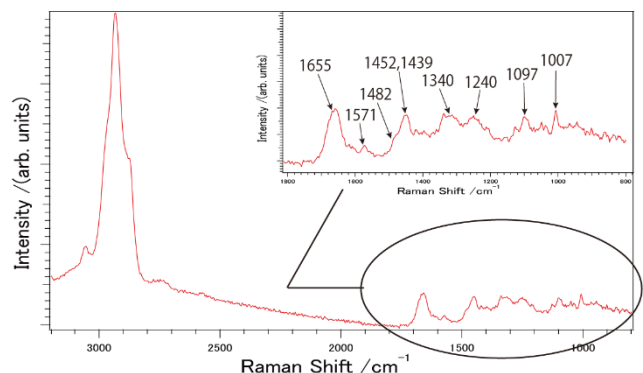


図 3 iPS 細胞の核小体の位置 (図 2 矢印) における $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル

図3のスペクトルは、図4の矢印で示した領域に対応しており、主にたんぱく質、核酸に由来するラマンバンドが観測された。

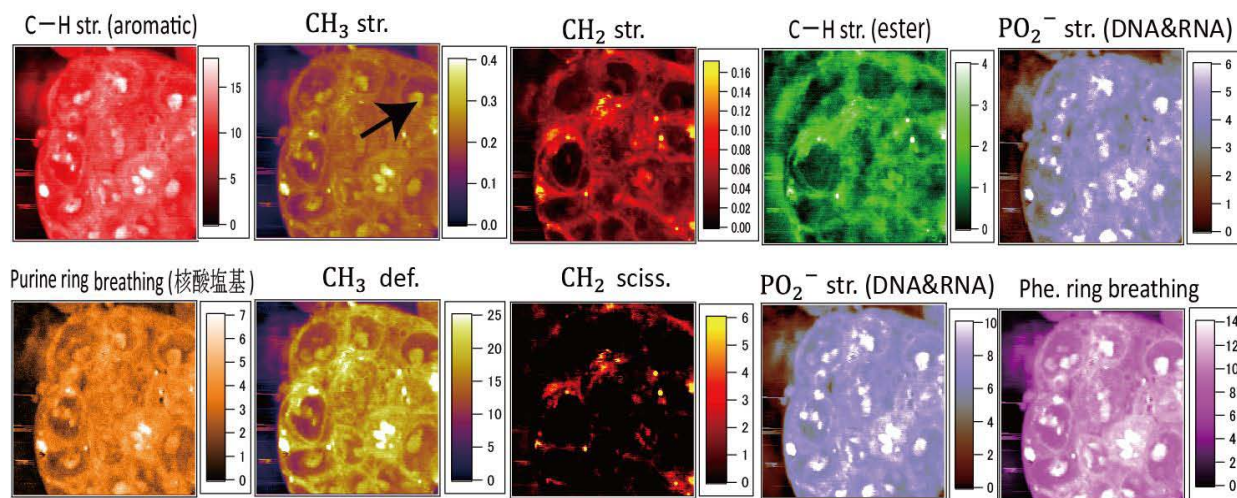


図4 各ラマンバンドから再構成したイメージ

図4に各ラマンバンドを用いて再構成したイメージを示す。複数の細胞がコロニーを形成している様子が可視化されている。特に、細胞の大部分の領域を細胞核が占めており、CH₂伸縮振動など脂質のバンドによるイメージでは、信号強度の弱い丸い領域が多数可視化されている。この中に複数の顆粒状のオルガネラがあるが、これらは核小体と考えられる（図4の領域）。

[1] K. Nishimura et al., J. Biol. Chem. 286, 4760 (2011)