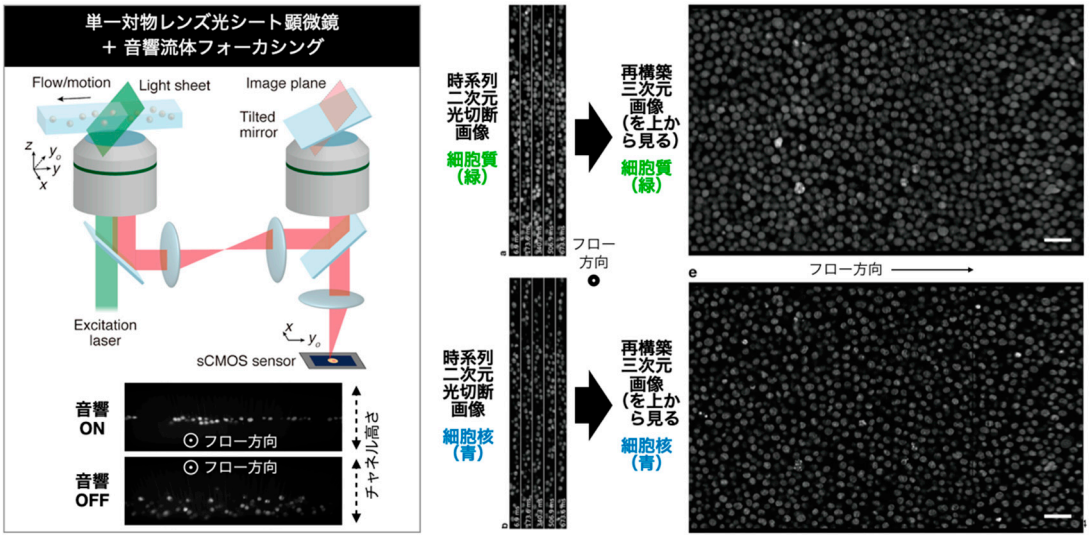
221　計測機器間の断絶を越えた超多角細胞計測技術の開発	太田　禎生

【目的】大量データの真価を生かして自然科学の可能性を拡張すべく、生物データを教師とする機械学習モデル BSML（Biologically supervised machine learning）の実現が最終的な目標である。この BSML を実現すべく、本研究では、時間や装置間の断絶を越えて異計測データを 1 細胞単位に紐付ける光核酸バーコーディング技術を軸に、大量細胞の形態・応答・遺伝子発現情報をハイスループットに多角計測する細胞マルチモーダル計測技術開発を目指してきた。

【方法】光核酸バーコーディング技術では、まず、光学イメージ識別情報と 1 対 1 対応する固有 DNA バーコードで修飾した、イメージ核酸バーコードハイドロゲルビーズ（optical and DNA barcode beads：odBB）を、新規開発した手法に基づき、大量に作製した。細胞と共に微小ユニット液滴中に封入することにより、大量の細胞をユニークに光学バーコーディングされる。このユニットを光イメージングして、各ユニットに含まれる odBB を光イメージ情報から同定した上で、1 細胞シークエンシングを行って、各細胞の遺伝子発現と同じユニットにいた odBB を DNA バーコードから同定し、1 細胞単位に形態と発現情報を紐付けした。一方で、本研究のスループットの律速の一つは、イメージング技術にあることが浮き彫りとなり、そこで、ライトシート光顕微鏡技術と音響を用いたマイクロ流体細胞整列技術の融合により、高速の三次元蛍光イメージング技術を開発した。

【結果】光核酸バーコーディング法の開発を達成した。odBB の大量安定生成手法の開発と、効率的な核酸と色素の修飾手法の開発に成功した。そして市販装置を用いたイメージング、機械学習を用いた光学イメージからの迅速かつ正確なビーズ同定手法の開発、odBB・1 細胞遺伝子発現計測系の確立、イメージデータ中の odBB とシークエンスデータ中の odBB の照合を実現し、数百細胞の明視野画像と遺伝子シークエンシング情報のマルチモーダル計測を達成した。さらに、世界最速のスループットで、流路を流れる細胞の高速な三次元光イメージングを達成し、これを適用して、光核酸バーコーディング法のスループットとスケールの向上を進めている。本報告では、既に論文を公開している、解析パイプラインの中核をなす新規イメージング技術の実証データを中心に報告する。

単一対物レンズライトシートイメージング技術と音響粒子整列技術の融合による
高速三次元イメージングフリーサイトメトリー技術



221. 計測機器間の断絶を越えた超多角細胞計測技術の開発

太田　禎生

東京大学 先端科学技術研究センター ロボティック生命光学分野

Key words：光イメージング，1 細胞解析，マルチモーダル計測，バーコーディング，ハイドロゲル

緒　言

従来の細胞のイメージ判別は、人の経験や勘、またはそれに頭打ちされた機械学習技術に頼っており、大量細胞画像データの真価を引き出せていない。この課題を解決すべく、本研究は、細胞自身の遺伝子発現データに学ぶ機械学習法による、究極の細胞イメージ判別マシン構築を最終的に目指している。そのためには、大量の細胞の１つ１つから、画像計測と、細胞を壊しての遺伝子発現計測を両立させる必要がある。しかし、現存の全ての技術は顕微鏡とシークエンサーという異計測器間で、細胞計測データが断絶してしまう。我々は、大量細胞を流してイメージングしてシークエンスするだけで迅速に画像 - 遺伝子発現を多角計測できる一気通貫型の光・流体・遺伝子融合計測技術の開発を目的として、研究を行った。本報告では、解析パイプラインの中核をなす新規光イメージング系開発に関わるデータを報告する。

方　法

1. 光核酸バーコーディング技術

光核酸バーコーディング技術は、光強度やサイズと言った光学識別情報と 1 対 1 対応する固有 DNA バーコードで修飾した光核酸バーコードビーズ（optical and DNA barcode beads：odBB）を用いる事で、光流体デバイス中に細胞を通してイメージングし、丸ごと一細胞遺伝子シークエンシング解析するだけで、1 細胞毎に結びついた光画像と遺伝子発現情報を大量計測できる仕組みである。具体的には、odBB を大量に用意し、細胞と共に微小液滴中に封入することで、まず多数の細胞画像を固有に光学バーコーディングする。さらに互いに全て異なる DNA バーコードで修飾した別のビーズ（市販品）と組み合わせ、一細胞遺伝子発現シークエンシングを行う事で、細胞の遺伝子プロファイルを DNA バーコードでラベルできる。結果、1 細胞単位に形態と発現情報が紐付く仕組みである。

本研究では、まず結合する色素分子濃度、結合する DNA オリゴ濃度などを調節した、大量並列 odBB 合成法を開発した。アルギン酸のハイドロゲールビーズを乳化法によって作製し、これを別々のロットに分けた上で、光イメージングにより判別可能な色素コードと、これに一対一対応した DNA オリゴを結合させた。その結果、作られたビーズライブラリを光イメージングし、その輝度スペクトル情報を解析した結果、スペクトル情報により、しっかりと分類可能であることが検証された。

2. 高速ライトシートイメージング技術と流体内音響細胞フォーカシング技術の融合による、新規高速三次元蛍光流体内イメージング手法の開発

光核酸バーコーディング技術の現在のスループットの律速の一つは、市販の装置を使った際のイメージングスピードである。そこで我々は、Axial-plane optical microscopy（APOM）と名付けた光学系を改変することにより、単一の対物レンズを用いてライトシート励起光を作り［1］、同じ対物レンズを用いてライトシート内で励起された対象の 2D 切断面を、カメラの検出素子に結像する装置を開発し、高速な 3D イメージング系を確立した（図 1A）。より具体的には、図 1A 左の顕微鏡光学系の模式図に示すように、まずサンプルに接する対物レンズ 1 とは離れた位置にリモートレンズ 2 を設置し、サンプル 3D 像を 1 から 2 へと転送し、その位置に傾斜した鏡を配置することで、深さ方向に広がる平面像を光軸に垂直な平面像に変換した。そしてライトシート照明光を入射することで、単一対物レンズでの 3D ライト

シート蛍光顕微鏡システムを実現した。また、sCMOS カメラの稼働素子を図 1A 右のように狭めることでフレームレート上げ、後述する流体技術に合わせてイメージングを高速化できるように工夫した。検証においては、蛍光標識した細胞をウェルプレートに載せ、電動ステージを用いて移動し、2D 光断面画像を連続取得した上で 3D 画像を再構築した（図 1B、C）。深さ方向の解像度を有していることを示しており、3,000 細胞毎秒を超える検出スループットでの三次元蛍光細胞画像撮像を達成した［2］。

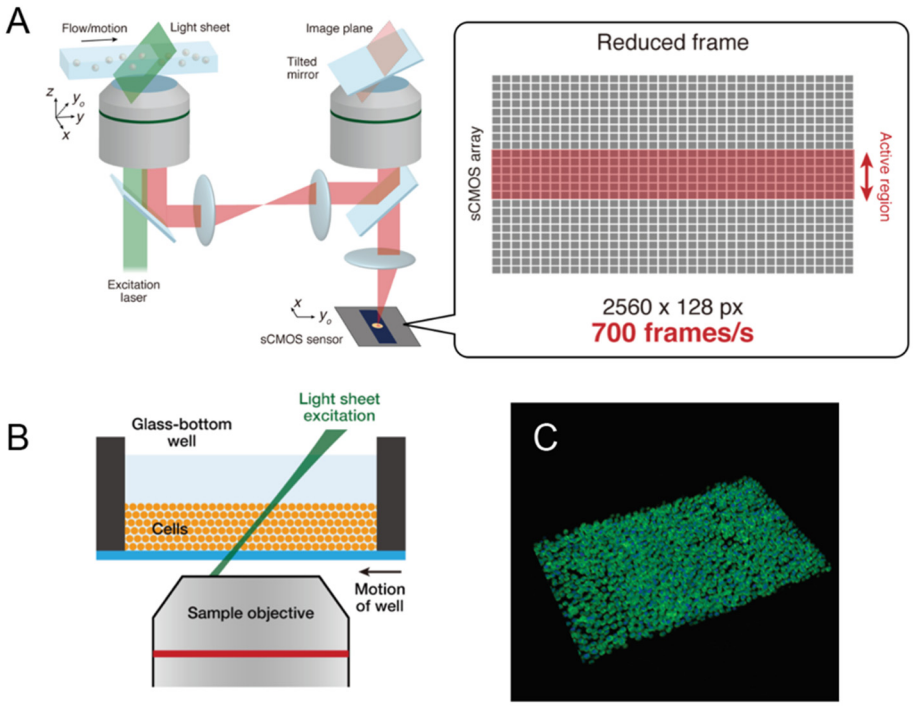


図 1. 高速ライトシートイメージング技術の開発

A） 単一対物レンズライトシート顕微鏡の模式図。

B） 左側の対物レンズ上に作られたライトシート励起光の中で発された蛍光は、リレー光学系を通ったのちにリモートレンズ上に再生され、傾いた鏡によって反射された後に、カメラの素子面に結像された。カメラの撮像エリアは、後述の流路内活用のために限定されて使われている。

C） 蛍光標識した細胞に対し、電動ステージを用いて二次元の光切断イメージを連続的に得た後で、三次元画像を構築し、3,000 細胞毎秒以上のスループットでの撮影を実証した。

前述のライトシート顕微鏡上に、流路を流れる細胞をそのままイメージングしようとすると、流路内の流速分布に従って細胞の速度はバラツいたり、回転したりするため、うまく三次元イメージングすることができない。そのため、細胞を並列化させて等速かつ無回転で移動できる流体技術を開発した。具体的には、断面が平たい長方形をしたキャピラリーにピエゾ電圧素子を用いて音響振動を印加すると、流路内で共振を起こし、定在波のノード部分へと粒子が引き寄せられる力が働く。ここに細胞を送液すると細胞は断面の 1 方向に整列され、そのまま流路を並進する仕組みである（図 2A 左）。実際に前述のライトシート顕微鏡を用いて、流れる細胞の位置をみると、音響がかかっていない際には細胞は重力で沈んでおり、音響がかかると流路の中心に整列していることが確認された（図 2A 右）。さらに、明視野顕微鏡を用いて（図 2B）、流れる細胞の速度を計測・解析したところ、音響がかかっていない際には細胞の速度は大きくバラつき、音響がかかると流路の中心に整列して速度が揃うことが確認された（図 2C）［2］。

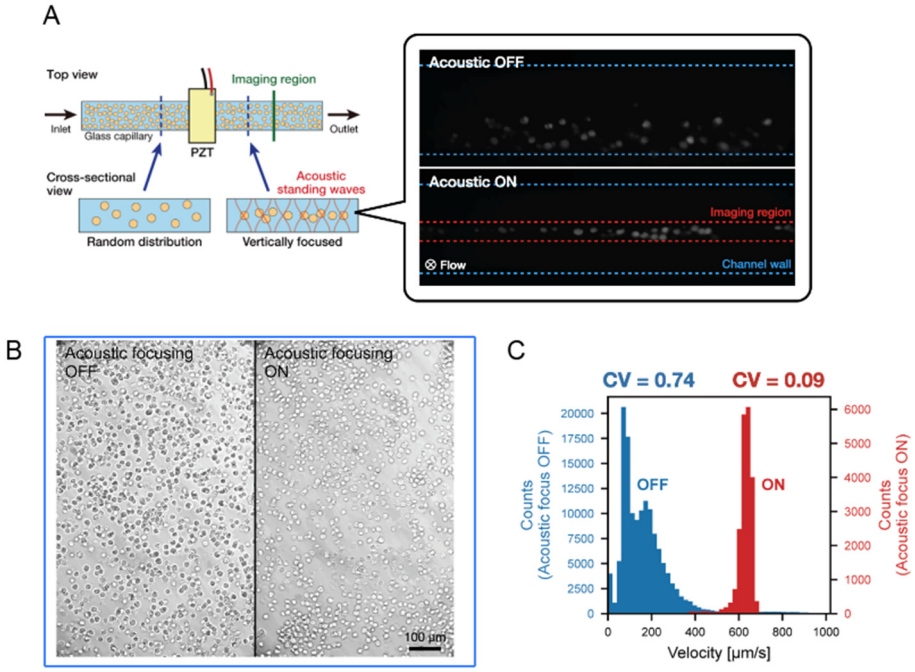


図 2. 音響フォーカシングによる流路内細胞一次元整列技術の開発技術の開発

A) 断面積が横長の長方形であるガラスキャピラリーを音響素子により振動させることにより、細胞を一次元に流路高さの半分の位置で整列させ、並進させた。

B) 明視野イメージングにより各細胞の流速を計測・解析した結果。

C) 音響がかかっていない際には細胞の速度は大きくバラつき、音響がかかると流路の中心に整列して速度が揃うことが確認された。

結果および考察

1. 光核酸バーコーディング技術によるマルチモーダル 1 細胞解析の実証

K562 細胞株と HEK 細胞株を用いて、光核酸バーコーディング技術の実証を行った。マイクロ液滴生成技術を用いて、odBB と細胞をアガロースゲルビーズに内包し、odBB で標識されたユニットを作製した。その上で、市販ハイコンテンツアナライザー装置によりイメージングを行い、細胞画像を得ると同時にビーズ画像を得た。この画像に対し、機械学習を用いた odBB のデコーディングを行い、各ユニットゲルに含まれる odBB の同定を行った。そして同じユニットゲル群をマイクロ液滴技術を用いた 1 細胞遺伝子発現解析アッセーにかけ、次世代シークエンサーによって、1 細胞遺伝子発現と odBB 由来の DNA バーコードを読み取って紐づけることに成功した。最終的に、イメージング下で読み出された odBB と、シークエンス下で読み出された odBB を照合することで、細胞の顕微鏡画像と遺伝子発現情報を紐づけることに成功した。現在数百細胞スケールのマルチモーダル解析に成功しているが、律速となっている光イメージング速度と、1 細胞遺伝子発現アッセーの改善を進めることで、数千、数万のマルチモーダル解析が実現できると期待される。

2. 新規高速三次元蛍光イメージング手法による大量細胞三次元画像計測と解析

培養細胞の細胞質と細胞核をそれぞれ緑色と青色に染め、前述のデバイスに送液し、流路内にて音響により整列されて並進している細胞の、ライトシート光切断二次元画像を連続的に得た上で、三次元画像を構築した。その結果、世界最速スピードでの、2,000 細胞毎秒以上の検出スループットでの撮影に成功した（図 3）[2]。さらに、分裂中の K562 細胞の核形態の解析を、迅速大規模に行った。5 分間程度で撮影された 40 万程度の細胞に対し、核染色に用いた DAPI と MPM-2 の輝度から、Mitotic Phase 中の細胞をゲートした。そして、この細胞の三次元画像から核をセグメンテーションした。そして PCA（Principal Component Analysis）に基づいた手法により、迅速に楕円体である核の長軸・

短軸を自動的に計算し、アスペクト比を算出した（図 4）。その結果、二次元画像の解析で得られるアスペクト比に比べて、三次元画像の解析ではより大きな比が得られた［2］。より正確な、細胞内構造の解析に有用である証左となったと考えている。

今後は、ここに開発された高速の三次元蛍光イメージング群［2～3］、ならびにその解析技術を用いて、光核酸バーコーディング技術のスケールアップや、高速化を進めていけると考えている。

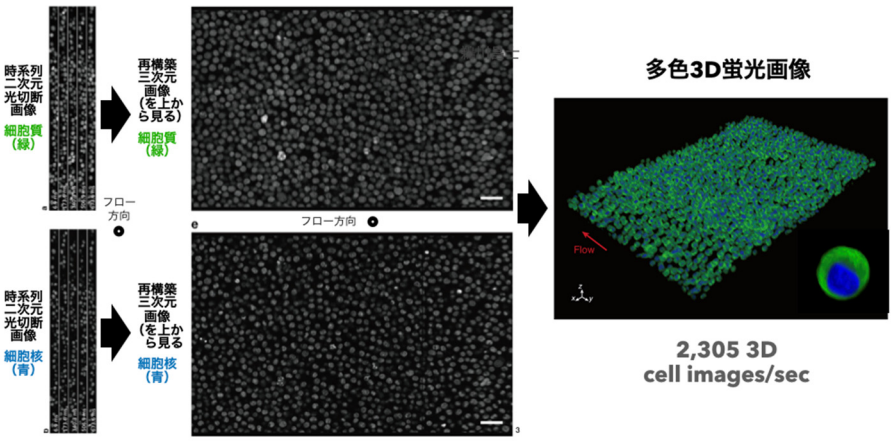


図 3. 音響技術により流路内で整列した細胞の高速三次元蛍光イメージング結果

二色に蛍光染色した細胞に対して、光切断 2D 画像から 3D 画像を構築し、2,000 細胞以上のスループットでの三次元画像撮影を実験的に実証した。

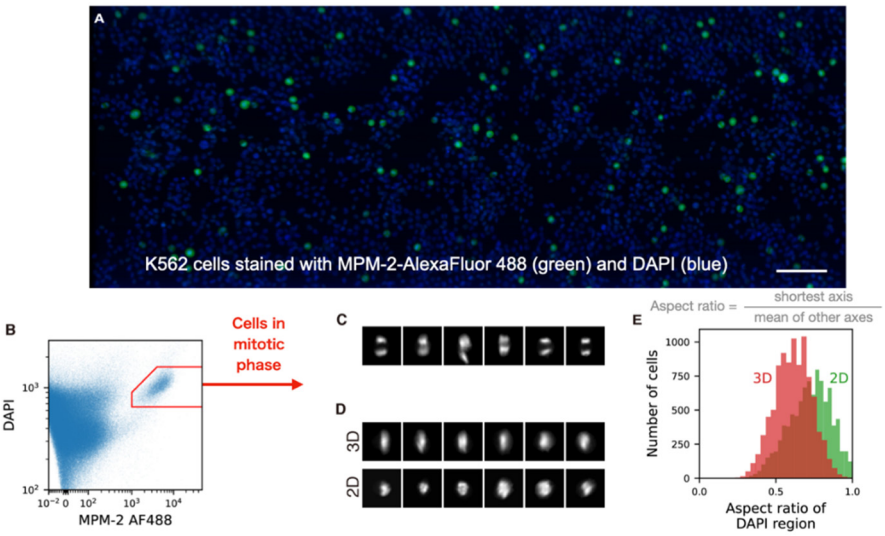


図 4. 核形態解析

5 分間程度で撮影された 40 万程度の細胞に対し、核の三次元画像と MPM-2 の輝度から、Mitotic Phase 中の細胞の核の形態解析を行った。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院情報理工学系研究科コンピュータ科学専攻の佐藤一誠、東京大学定量生命科学研究所 RNA 機能研究室泊研究室の河﨑史子、早稲田大学理工学術院総合研究所次席研究員の三森隆広である。本研究は、共同研究者はもとより、上原記念生命科学財団、ファンドエージェンシー、大学教員や職員など、様々な方にサポートされており、この場を借りて御礼を申し上げたい。

文　献

1) Li T, Ota S, Kim J, Wong ZJ, Wang Y, Yin X, Zhang X., Axial plane optical microscopy. Sci. Rep. 2014. Dec 1;4:7253. PMCID: PMC4248283. DOI: 10.1038/srep07253

2) Ugawa M, Ota S. High-throughput parallel optofluidic 3D-imaging flow cytometry. Small Science. 2022 2100126. https://doi.org/10.1002/smsc.202100126

3) Ugawa M, Ota S. High-speed 3D imaging flow cytometry with optofluidic spatial. Biomed Opt Express. 2022. 6:3647-3656. PMID: 35781959 DOI: 10.1364/BOE.455714