

## 大量細胞集団を超網羅的に問診するロボットの実現

研究代表者

氏名 太田禎生 東京大学 先端科学技術研究センター 准教授

共同研究者

氏名 林洋平 理化学研究所 バイオリソース研究センター チームリーダー



### 1. 研究の背景と達成目標

細胞の構造(イメージ)情報を判別する際に、私たちは既存の知識や経験・勘に頼って来ました。最近では、AIを使った解析も進んでいます。しかし AI を使っても、教えるのが私たち人である限り、未知の対象に対して意味のある判別を行うのは困難です。この人の限界を越えるための一つのアプローチは、大量の細胞ひとつひとつからイメージデータと分子(シーケンス)データを多角計測し、その統合データからイメージ情報を判別する解析モデルを開発することだと考えました。

そこで本研究では、観察対象を閉じ込めた微小ゲル/液滴に対して、新規「イメージ核酸(ID: Image and DNA)バーコーディング」とインプットDNAバーコーディングを行い、装置間の壁を越えて識別することにより、迅速かつ網羅的に解析を行う ID サイトメトリーを開発することを目指しました。この手法を、様々な細胞モデルに適用し、技術の実証を行うと共に、細胞応答機構や疾患機構解明や細胞機能制御を、大量のノンバイアスデータの統合的解析から図ることを提案しました。このような系の開発により、最終的には、生きた細胞の状態をイメージングデータから読み取り、適した摂動を与えることで私達生体の構成ユニットでありながら未知に包まれた大量の細胞との、最適なコミュニケーションの術を探索できることを目指しています。

### 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

イメージ核酸バーコーディング技術の開発: idBB (image and DNA barcoding beads) の安定・大量作製手法を開発して、イメージ核酸バーコーディング手法の開発に成功しました。また、idBB の正確な読み取りのための機械学習手法も開発しました。本手法により、浮遊したゲルや液滴ユニットごとに、様々な手法や装置で計測されたデータを、計測後にバーコーディング情報で、マルチモーダルに繋ぐことができるようになりました(論文査読中、5項の論文[1][2])。本手法により、idBB を実用化して細胞の多角解析技術として利用することが考えられるだけでなく、人の能力・知識で及ばない精細・迅速な細胞形態医療診断などに繋がると期待しています。

光流体三次元イメージング解析装置の開発: 細胞三次元構造情報と、idBB にエンコードされた蛍光コード情報を、正確に読み出すための、高速三次元多色蛍光イメージング計測手法を開発し、数十万細胞の解析を実施しました(論文査読中、5項の論文4、5番)。世界最速の三次元蛍光イメージングフローサイトメトリー法であり、研究用装置だけでなく、高精細・迅速な細胞形態医療診断などに繋がると期待しています。

三次元細胞培養系の開発: ハイドロゲルビーズを細胞培養の担体として用いた多細胞スフェロイド培養系を開発し、単一細胞イメージングだけでなく、相互作用をしている複数細胞モデル系を開発し、その画像解析プラットフォームも開発しました。上記のマルチモーダル計測系や三次元イメージング計測系と組み合わせることで、様々な生命科学の研究や、細胞表現型創薬スクリーニングなどにおいて、活用可能性があると考えています。

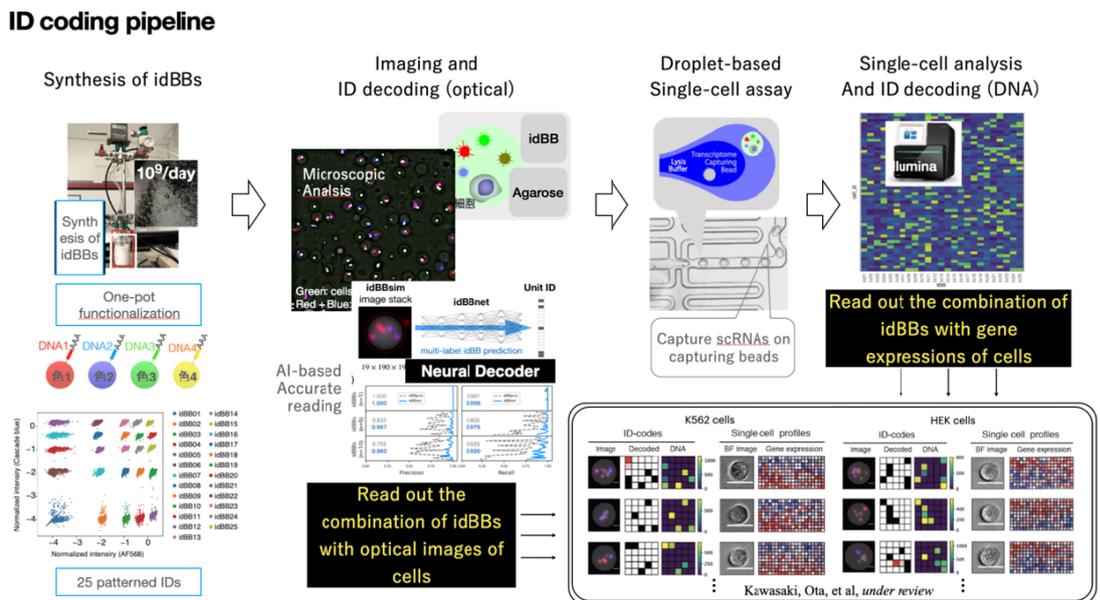
### 3. 研究成果

#### イメージ核酸バーコーディング技術の開発

本技術は、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(image and DNA barcode beads: idBB)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ケンシング解析するだけで、一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す。具体的には、数十種の idBB を大量に用意し、細胞と共に複数・ランダムに微小液滴中に封入すると、idBB の組み合わせ爆発により多数の細胞を固有に光学バーコーディングします。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ケンシングを行う事で、1細胞単位に形態と発現情報が紐づく仕組みです。

より具体的に本研究では、idBB 担体としてアルギン酸のハイドロゲルビーズを採用し、光イメージングにより判別可能な色素の 25 種類の組み合わせと、対応した DNA オリゴを修飾させる作成法を開発しました。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 25 種に分類可能であることが検証されました(下図左)。

次に、作製した idBB のライブラリが複数閉じ込められる濃度で、細胞と共にアガロースハイドロゲルビーズに、マイクロ液滴生成技術を用いて包埋することで、idBB の組み合わせで標識されたユニットを作製しました。こ

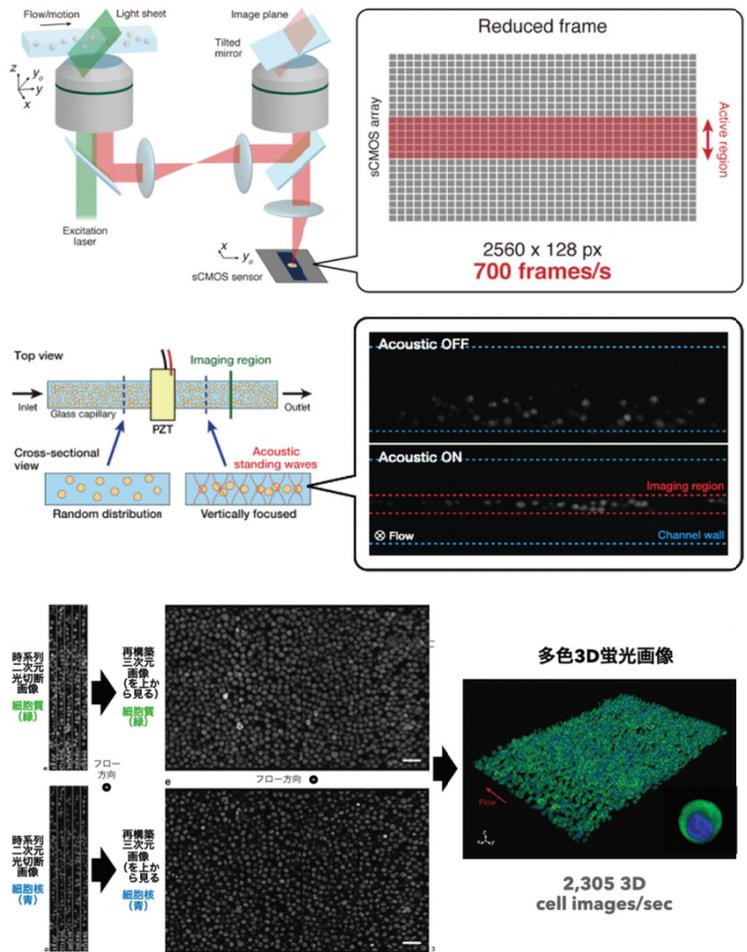


の上で、ユニットを市販イメージング装置で迅速に大量撮影を行い、細胞画像を得ると同時にビーズ画像を得て、画像解析によりビーズの組み合わせを読み出します。その後、撮影を終えたユニット群を、マイクロ液滴技術を用いた、1細胞遺伝子発現解析アッセイにかけ、シーケンシング解析を行うことにより、1細胞遺伝子発現情報と共に、一緒にいた idBB を標識していた DNA オリゴの組み合わせが読み出されます。最終的に、イメージング下で読み出された idBB の組み合わせと、シーケンシング下で読み出された idBB の組み合わせを照合することで、細胞の顕微鏡画像と遺伝子発現情報を紐づけ、プールさせた細胞集団のマルチモーダル解析を実現しました[1, 2]。

#### 光流体三次元イメージング解析装置の開発

市販の装置を使った際のイメージング速度では足りなかったため、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、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ました。次頁の左上図の顕微鏡光学系の模

式図に示すように、単一对物レンズでの 3D ライトシート蛍光顕微鏡システムを実現しました。また、sCMOS カメラの稼働素子を右上図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ました。検証として、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てガラス管でできた光音響デバイスに送液し、流路内にて音響により整列されて並進している細胞の(右図中断)、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ました。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ました(右図下段 [5])。さらに、分裂中の K562 細胞の核形態の解析を、迅速大規模に行いました。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、細胞の三次元画像から核をセグメンテーションし、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ました。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ており[5]。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ます。



### 三次元細胞培養系の開発

数十  $\mu\text{m}$  直径のハイドロゲルビーズを、細胞培養の担体として用いた多細胞スフェロイド培養系を開発し、相互作用をしている複数細胞モデル系を開発しました。このモデル系に対して、上記の三次元イメージング計測解析を適用し、大量に多色蛍光観察したスフェロイド系に対して、画像解析プラットフォームを開発しました(論文投稿準備中)。さらに、マイクロデバイス内に液滴やゲルを捕獲・アレイ化する手法を開発し、長時間の培養・観察に適した系を確立させています[3]。

## 4. 今後の展開

上記に開発した光学核酸バーコーディング計測法、高速三次元計測手法、そして三次元培養細胞モデルを融合し、細胞応答機構や疾患機構解明や細胞機能制御を、大量のノンバイアスデータの統合的解析から図る挑戦を進めています。上記のマルチモーダル計測系や三次元イメージング計測系と組み合わせることで、様々な生命科学の研究や、細胞表現型創薬スクリーニングなどにおいて、活用可能性があります。そして、生きた細胞の状態をイメージングデータから読み取り、適した摂動を与えることで、大量の細胞に対する最適なコミュニケーションの術を研究していきます。

## 5. 発表実績

### 論文発表

1. Kawasaki F, Mimori T, Mori Y, Sato I, Ota S\*, Identification of In-droplet Multicellular Communities by Light-induced Combinatorial DNA Barcoding, under review.
2. Kawasaki F†, Mimori T†, Mori Y, Aburatani H, Yachie N, Sato I\*, Ota S\* († equal contributions), Computational microdroplet design for optical cell barcoding, under review.
3. Hattori K, Goda Y, Yamashita M, Yoshioka Y, Kojima R, Ota S\*, Droplet array-based platform for parallel optical analysis of dynamic extracellular vesicle secretion from single cells, *Anal. Chem.* 94, 32, 11209–11215, (2022).
4. Ugawa M, Ota S\*, High-speed 3D-imaging flow cytometry with optofluidic spatial transformation, *Biomedical Optics Express* 6:3647-3656, (2022).
5. Ugawa M, Ota S\*, High-throughput parallel optofluidic 3D-imaging flow cytometry, *Small Science*, (2022).
6. Ota S., Sato, I. and Horisaki, R., Implementing Machine Learning Methods for Imaging Flow Cytometry. *Microscopy.* 69 (2), 61-68 (2020).

### 特許

1. Y. Tsuyama, Y. Yoshioka, S. Ota, 高速液滴分析装置, 2022. 出願番号: 63/422611
2. M. Ugawa, S. Ota, 3次元画像撮像装置, 2022, 特願 2022-037527
3. F. Kawasaki, Y. Mori, S. Ota, 細胞標識分子及び細胞の分析方法, 2021, 特願 2021-157113
4. M. Ugawa, S. Ota, Imaging Flow Cytometer, 2020, 特願 2020-152331
5. S. Ota, Image-barcoded cytometry 2020, 62/959,420, 特願 2020-065988 号
6. S. Ota, Tsubouchi, A., Kawasaki, F., New Method for cell-based phenotypic screening, 2020

### 主な国際学会発表

- Ugawa M, **Ota S**, High-speed 3D light-sheet imaging of cells flowing at over 10 m/s, High-Speed *Biomedical Imaging and Spectroscopy VIII, part of SPIE BiOS* (2023).
- Yamashita M, Hattori K, Kirisako H, Chen X, Ugawa M, **Ota, S**, High-throughput parallel optofluidic 3D-imaging of adherent cells in adherent state, *The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* (2022).
- Ugawa M, **Ota, S**, High-speed 3D imaging flow cytometry, *The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* (2022).

### 主な招待講演(国際)

- The 1st Virtual Human Development Consortium Workshop, Vancouver, Canada, 10/2022
- The 1st SIG meeting of Data Analytics for Imaging Systems (DAISy), Glakso Smith Kline, Online 03/2021

- The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021, High-dimensional flow cytometry for studying heterogeneity of small particles, 2021