

2023 年度年次報告書

多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出

2019 年度採択研究代表者

藤田 克昌

大阪大学 大学院工学研究科
教授

多細胞の包括的分子イメージング技術基盤の構築

主たる共同研究者:

袖岡 幹子 (国立研究開発法人理化学研究所 開拓研究本部 主任研究員)

田中 秀央 (京都府立医科大学 大学院医学研究科 特任教授)

研究成果の概要

本研究では、多細胞システムや生体組織内の分子間および細胞間の相互作用を包括的、かつ定量的に観察する技術基盤の構築を目指している。本目標の実現に向け、顕微鏡観察下で試料を瞬時に凍結させる顕微凍結装置の開発、多種の光学効果を同時に利用し、複数の細胞内分子・化学環境情報を取得できるクライオマルチモーダル光学顕微鏡の開発、および各種生体分子や薬剤の顕微鏡観察を可能とする分子標識プローブの開発に取り組んでいる。最終目標達成に向け、概ね研究計画通り研究を進めることができており、今年度には、これまでに得られた成果、判明した課題を踏まえ、装置改良をさらに進め、細胞だけでなく生体組織試料の凍結観察も本格化させた。

顕微凍結装置の開発では、今年度、顕微鏡観察下の試料に液体寒剤を任意のタイミングで接触させられるシステムを開発し、光刺激で誘起した心筋細胞内のカルシウムウェーブを高精度の時間決定精度で凍結固定させることに成功した。

クライオマルチモーダル光学顕微鏡の開発では、これまで開発してきたクライオラマン顕微鏡に波長の異なる 3 色の励起光源を導入し、観察できる対象の多重化に成功した。さらに、複数種類のラマンプローブを利用することで、標識分子/内分子の多重クライオラマン観察にも成功した。また、試料観察時の収差を補正し、高空間分解能観察を実現する補償光学技術の導入を行った。組織試料の観察への応用では、ラット摘出灌流拍動心の拍動収縮期、拡張早期、拡張末期の状態を観察し、心組織内の分子状態が心臓の拡張・収縮と連動して変化することを発見した。

分子標識プローブの開発では、細胞や組織内で選択的に検出できると考えられるラマンプローブ、および生体内化学反応を追跡できるラマンプローブを開発し、最終年度におけるクライオマルチモーダル光学顕微鏡による試料観察に十分量のプローブを提供できる見通しがたった。

【代表的な原著論文情報】

- 1) K. Temma, M. Wincott, K. Fujita, and M. J. Booth, Deflectometry based calibration of a deformable mirror for aberration correction and remote focusing in microscopy, *Opt. Express*. **31**, 28503-28514 (2023), doi: <https://doi.org/10.1364/OE.497277>
- 2) M. Li, Y. Ueyama-Toba, M. Lindley, G. Kongklad, Y. Nawa, Y. Kumamoto, S. Ishida, Y. Kanda, S. Fujita, H. Mizugushi, and K. Fujita, Label-free evaluation of maturation and hepatotoxicity of human iPSC-derived hepatocytes using hyperspectral Raman imaging, *Anal. Chem.* **95**, 9252-9262 (2023), doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00976>
- 3) H. Yamakoshi, D. Shibata, K. Bando, S. Kajimoto, A. Kohyama, S. Egoshi, K. Dodo, Y. Iwabuchi, M. Sodeoka, K. Fujita, and T. Nakabayashi, Ratiometric analysis of reversible thia-Michael reactions using nitrile-tagged molecules by Raman microscopy, *Chem. Commun.* **59**, 14563-14566 (2023), doi: <https://doi.org/10.1039/D3CC05015G>
- 4) Y. Tsuji, T. Ogata, K. Mochizuki, S. Tamura, Y. Morishita, T. Takamatsu, S. Matoba, and H. Tanaka, Myofibroblasts impair myocardial impulse propagation by heterocellular connexin43 gap-junction coupling through micropores, *Front. Physiol.*, *Front. Physiol.* **15**, 1352911, doi: [10.3389/fphys.2024.1352911](https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1352911)