

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「力学場と生化学場の相互作用の計測・
操作と予測」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：今吉 格
(京都大学 大学院生命科学研究科
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究課題では、哺乳類神経系の発生・発達過程やその可塑性の背景となる動作原理を解明すべく、遺伝子発現や細胞シグナル伝達の可視化と操作技術の開発(今吉 G)、組織深部イメージングや撮動実験を可能にする光学・顕微鏡技術の開発と事業化への展開(磯部 G と浜ホト G)、及び、三次元組織中の力学的相互作用の予測やシミュレーションを可能にする新規数理モデリング技術(奥田 G)の開発を行った。それらの項目について、以下箇条書きにて記載する。

- ・新規遺伝子発現の光操作システムの開発 (PA-Gal4cc (Yamada et al., *iScience* 2020), eGAV (Nagasaki et al., *CSF* 2022)、青色光感受性 Tet システム PA-TetV (Fukuda et al. in prep)、光・薬剤制御可能な PA-Gal4 転写因子 DD-sGAV (Nagasaki et al. in prep)、近赤外光感受性 Tet システム NiRA-tet (Nagasaki et al. in prep)、細胞周期フェーズ依存的青色光感受性 Gal4-UAS/Tet システム PA-DD-Gucci/PA-Tucci (Nagasaki et al. in prep)、赤外光および青色光感受性 LexA 転写因子(Nagasaki et al. in prep)): 今吉 G
- ・神経幹細胞において転写因子が、振動発現を含む様々な発現動態を示す意義の解明 (Yamada et al., in prep): 今吉 G
- ・新規高輝度・高感度の赤色 Ca^{2+} センサーチタンパク質 RCaMP3 と緑色 cAMP センサーチタンパク質 cAMPinG1 の開発 (Yokoyama et al., *Nat Methods* 2024): 今吉 G
- ・発生期のマウス脊髄インターニューロンに特異的に発現する bHLH 型転写因子 Hes2 の機能解析と、V2a/b インターニューロンの人為的操作による機能解明 (Hayashi et al., *eLife* reviewed preprint 2023) : 今吉 G
- ・マウス成体脳における休眠期神経幹細胞を活性化できる遺伝子セット iPd の同定と評価 (Kaise et al., *Genes Dev* 2022) : 今吉 G
- ・Hey1 転写因子によるマウス成体脳における神経幹細胞の起源細胞の制御メカニズムの解明 (Harada et al., *Nat Commun* 2021) : 今吉 G
- ・マウスの空間探索と記憶形成における空間スペースサイズが与える影響とその神経基盤の解析 (Tachiki et al., *eNeuro* 2023) : 今吉 G
- ・スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた Serial Tomography (順次断層撮影法)によるマウス全脳イメージング技術の開発: 今吉 G
- ・1細胞の長時間における複雑な三次元変形動態を記述する非保存性連続体膜モデルの開発(Okuda et al., *EPJE* 2022): 奥田 G
- ・連続体膜間の長時間相互作用モデルの開発と壁面における細胞の長時間接着動態の予測 (Okuda et al., *PRE* 2023): 奥田 G
- ・連続体膜モデルによって記述された多細胞の成長・収縮環形成・分裂動態の定式化(Okuda et al., *EPJE* 2023): 奥田 G
- ・立体組織の弾塑性計測技術の開発と上皮組織の折り目における弾塑性転移現象の解明 (Teranishi et al., *bioRxiv* 2023 (*Nat Commun* 査読中)) : 奥田 G
- ・三次元バーテックスモデルによるレイヤー構造形成のシミュレーションと力学機構の解明(論文準備中): 奥田 G
- ・生きた立体組織内部の弾性と蛍光のマップを同時計測する ex-vivo SIM-AFM の開発(Shioka et al., *bioRxiv* 2024 (*Acta Biomatter* 査読中)) : 奥田 G
- ・機械学習による網膜オルガノイドの分化領域の推定 (Fujimura et al., *Sci Rep* 2024): 奥田 G
- ・深部イメージングと試料へのダメージを抑制できる多光子顕微鏡技術(数 MHz の繰り返し周波数を用いたフェムト秒レーザーの開発・評価。広受光面積光電子増倍管を用いた散乱蛍光の高効率検出システム。1 ピクセル 1 パルス照射の同期イメージング技術など) (特願 2024-054974): 磯部 G、浜ホト G

- ・波面補償技術の開発(試料内部の焦点面におけるスペクトル位相を補償する技術)(Ishikawa et al., Opt. Express 2021) : 磯部 G, 浜ホト G
- ・パターン照明技術の開発(遺伝子発現制御など空間分解能を重視した多点集光を用いたパターン照射技術、神経活動操作など時間分解能を重視した時空間集光を用いたパターン同時照射技術) (Isobe, Photonics Review 2024): 磯部 G, 浜ホト G, 今吉 G
- ・空間集光の場合と同等の空間分解能を実現可能な、透過型エッセル回折格子を用いた時間多重化マルチライン時空間集光(Inazawa et al., Appl. Phys. Express 2021, Ishikawa et al., Appl. Phys. Express 2022, Inazawa et al., submitted) : 磯部 G, 浜ホト G, 今吉 G
- ・超広視野蛍光顕微鏡と光刺激装置の開発(マウスの大脳と小脳背側の全領域を網羅でき 100 Hz で観察可能な超広視野1光子励起蛍光マクロ顕微鏡と光刺激装置の開発) (Michikawa et al., 準備中): 磯部 G
- ・フェムト秒レーザー誘起衝撃波の制御: 磯部 G
- ・超高速波長可変レーザーとマルチカラーイメージング技術の開発(特願 2024-054974、特願 2024-055050、特願 2024-054943、特願 2024-054981): 磯部 G, 浜ホト G
- ・レーザーサージェリー中の力学的な過渡応答を観察するために、サージェリーと2光子イメージングの完全同時実験技術の開発: 磯部 G, 奥田 G
- ・広受光面積光電子増倍管に 30 MHz の速電流電圧変換増幅器を搭載したモジュールの開発と製造: 浜ホト G
- ・空間光変調器における多点集光装置において問題となるゼロ次光除去の空間フィルターを搭載した多点集光装置の開発・製造: 浜ホト G
- ・磯部 G と浜ホト G で開発し、今吉 G や奥田 G も含めて機能評価した多光子顕微鏡技術のエッセンスを搭載した顕微鏡について、事業化を意識した試作品を設計・製造して、顕微鏡メーカーへの展示を実施した。: 浜ホト G, 磯部 G, 今吉 G, 奥田 G
- ・高感度・低ノイズ・ハイダイナミックレンジをもつ蛍光シグナル検出器のフローサイトメーターでの評価と分光技術の開発(2024 CYTO 学会 企業セミナー): 浜ホト G, 今吉 G

(2)顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. 新規光遺伝学ツールを用いた神経幹細胞の転写制御メカニズムの解明

様々な遺伝子発現の光操作ツールを開発し、それらが幹細胞の増殖・分化メカニズムの解析に応用可能であることを示した。本研究課題で主眼としている3次元組織における応用に先んじて、神経幹細胞の2次元培養モデルを用いて、転写因子 Ascl1 の発現動態が、下流遺伝子群の発現にどのように影響を与えて、異なる細胞表現型を誘導するのかについて、次世代シーケンサーを用いて定量的な解析を行った。その結果、Ascl1 の遺伝子発現が、振動する場合と蓄積していく場合とでは異なるクロマチンリモデリング活性を發揮し、それにより異なる下流遺伝子群の発現を制御することが明らかとなった。この発見は、Ascl1 の異なる遺伝子発現動態がそれぞれに対応するユニークな細胞表現型を神経幹細胞に付与しているという新規コンセプトの樹立につながった。現在、最終実験を行い、論文投稿準備中である。また本研究課題は、幹細胞の光操作という再生医学の新技術としても発展が期待される。

2. 多細胞システムの解析と操作を可能にする先鋭的光学技術の開発

試料へのダメージを抑制するために、従来よりも低い数 MHz の周波数をもつフェムト秒レーザーを用いた多光子含むイメージング技術の開発、遺伝子発現や神経細胞の光刺激遺伝学のための3次元パターン照明技術の開発を行った。中でも、確立したレーザー走査を一切行わずに用いずに、3次元1細胞分解能を有する精密な3次元パターン照明技術は、世界的にも達成されておらず、論文投稿中である。また、パルス毎に超高速で波長可変なフェムト秒パルスレーザーは、単一の検出器でマルチカラーイメージングを可能とするものである。

3. 形態形成の不可逆性を担う機械特性の解明

形態形成プロセスにおいて、上皮シートは「折り目」を作りながら複雑な三次元構造を形成する。この折り目形成は不可逆的であり、形態形成の一方向性を保証している。しかし、この折り目の不可逆性を確立するメカニズムは全く不明であった。本研究では、上皮シートの弾塑性を計測する世界で初めての計測装置を開発して、上皮シートの折り目の不可逆性を担う新規の力学特性を発見した。さらに、発見した弾塑特性は、メカノセンサー分子を介した細胞の力学感知と細胞骨格のリモデリングによって引き起こされ、細胞内の分子動態によって調節可能であった。この発見により、発生生物学において長年疑惑であった形態形成の方向性の決定機構が解明された。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. 開発した多細胞システムの解析と操作を可能にする先鋭的光学技術の事業化

3次元生体組織やオルガノイドモデルにおいて、高感度深部イメージングを可能にする多光子イメージング技術を開発し、また、狙った細胞や細胞集団に多光子レーザーをパターン照射する顕微鏡システムを開発した。本技術は、浜松ホトニクス社によって製品としての設計が進められている。レーザー、光学系、光電子増倍管、信号処理手法など、本 CREST 課題において開発・発展した技術について、それらを組み込んだ試作品を作成し、顕微鏡メーカーに対して展示を行い、製品化(事業化)を見越した共同開発を開始している。

2. 次世代フローサイトメーターの要素技術の開発と事業化

C3 課題(永楽 G、今井 G と共同)にて、フローサイトメーターにおける蛍光シグナル検出の高感度化と分光シグナル取得の新技術の実証を行った。浜松ホトニクス社に加えて、フローサイトメーターの主要メーカーである BD Bioscience 社とも共同開発を開始し、次世代のフローサイトメーターへの技術導出の相談を実施している。検証した新技術の検証結果は、英国エジンバラで開催されたフローサイトメーター学会 CYTO2024 にて企業主催セミナーを実施し、大きな反響を得た。現在、複数の研究機関やフローサイトメーターメーカーとの共同開発を議論している。また、本研究で得られたパイロットデータは、採択になったワクチン開発のための WPI サポート機関(ヒト免疫に関する京都大学サポート機関)の申請にも活用され、免疫系の基礎研究、感染症研究、ワクチン開発、再生医学などの発展に将来寄与すると期待される。

3. 三次元組織内の機械特性マップの構築

生きた組織はそれぞれが独自の力学特性を持ち、その力学特性が細胞の振る舞いを調節する重要な環境因子となっている。しかし、立体構造を有する生体内の力学特性の時空間ダイナミクスとその役割は、計測技術の欠如によりほとんど分かっていない。そこで本研究では、構造化照明顕微鏡 (SIM) と原子間力顕微鏡 (AFM) を組み合わせた新規の SIM-AFM 技術を開発した。この技術により、立体的な生体組織内の弾性率マップと蛍光マップを正確に同時に計測することが可能になった。この SIM-AFM 技術は、生体組織の力学特性と分子局在の空間相関を明らかにできる新しい方法として、器官の形成や機能発現のメカノバイオロジー研究を推進する強力なツールである。

＜代表的な論文＞

1. Yamada, M., Nagasaki, C.S., Suzuki, Y., Hirano, Y. and Imayoshi, I. (2020) Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells. *iScience*, 23, 101506, September 25, 2020. doi.org/10.1016/j.isci.2020.101506

概要: 遺伝子発現制御系である Gal4/UAS システムの光制御技術の改良を行った。この論文では青色光スイッチである Cry2/CIB1 を利用している。この論文報告内容の研究を実施する過程で得た予備データやノウハウを使って、2光子レーザーで効率の良い励起が可能な別種の青色光スイッチである VVD を組み込んだ、新規 Gal4/UAS システムや Tet システムの光制御ツールの開発の成功につながった。現在、これらの新規遺伝子発現の光操作システムについても論文発表準備を行なっている。

2. **Okuda, S.** and Sato, K. (2022) Polarized interfacial tension induces collective migration of cells, as a cluster, in a three-dimensional tissue. *Biophysical journal*, 121, 10, 1856-1867. doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.018

概要:細胞が動く物理的な仕組みに着目し、独自の3Dバーテックスモデルを開発することで、立体組織中を細胞が動く仕組みを明らかにした。まず、「一つ一つの細胞内で偏った界面張力が細胞や細胞塊(クラスター)の移動を引き起こす」という仮説を立てた。そして、3Dバーテックスモデルを使って計算機シミュレーションを行い、この仮説の妥当性を確かめた。さらに、細胞の偏った界面張力は、細胞と周囲との界面に一方向的な流れを生じることで、細胞やクラスターが動くための推進力を生み出すことを明らかにした。加えて、この計算機シミュレーションにより、がん浸潤や胚発生にみられる複数の異なる動きのパターンが再現され、各パターンが生じる物理的な条件が特定された。

3. Yokoyama, T., Manita, S., Uwamori, H., Tajiri, M., **Imayoshi, I.**, Yagishita, S., Murayama, M., Kitamura, K. and Sakamoto, M. (2024) A multicolor suite for deciphering population coding of calcium and cAMP in vivo. *Nature Methods*, 21(5):897-907. doi: 10.1038/s41592-024-02222-9.

概要:大幅に性能が向上した改良版赤色カルシウムセンサー(RCaMP3と命名)を開発した。また、細胞内cAMPの新規緑色蛍光タンパク質センサーも同時に開発し、合わせて論文報告を行なった。これにより、神経細胞の活動電位発生に伴う、細胞内Ca²⁺とcAMPという細胞シグナル経路の重要な構成要素の定量的イメージング計測が可能になり、神経発達や可塑性の研究にとって重要なツールの開発となった。

§2 研究実施体制

1. 研究チームの体制について

1) 今吉グループ (今吉 G)

① 研究代表者:

今吉 格 (京都大学 大学院生命科学研究科／医生物学研究所 教授)

② 研究項目:

- ・多細胞解析に必要な先鋭的光学システムの開発・製造
- ・多細胞システムを構成する、生化学的・細胞生物学的・力学的パラメーターの定量的計測
- ・多細胞システムを構成する、生化学的・細胞生物学的・力学的パラメーターの光操作法の開発と検証
- ・神経組織の発生過程を制御する、多細胞システムの作動原理の解明

2) 奥田グループ (奥田 G)

① 主たる共同研究者:

奥田 覚 (金沢大学大学新学術創生研究機構ナノ生命科学研究所 准教授)

② 研究項目:

- ・多細胞システムにおける分子・細胞・組織動態の連成シミュレーション手法の開発
 - 生化学場と多細胞の三次元力学動態を連成した新規三次元バーテックスモデルを開発
 - 分子集団から多細胞までのマルチスケール動態を記述する新規数理モデルの開発
- ・多細胞システムにおける生化学・細胞生物学・力学パラメーターを定量化するための数理基盤
- ・神経組織の発生過程を制御する、多細胞システムの作動原理の予測と理解
- ・神経性網膜組織と大脳皮質原基の形態形成
- ・網膜と大脳皮質のレイヤー／カラム構造の形成

3) 磯部グループ (磯部 G)

① 主たる共同研究者:

磯部 圭佑（理化学研究所 光量子工学研究センター 上級研究員）

② 研究項目：

- ・高精細深部イメージング技術
- ・広視野深部イメージング技術
- ・多点同時走査によるパターン照明技術
- ・パターン同時照射技術
- ・深部マイクロ・ナノサージェリー技術
- ・フェムト秒レーザー誘起衝撃波を用いた応力場制御技術

(4) 浜松ホトニクスグループ（浜ホト G）

① 主たる共同研究者：

武宮 孝嗣（浜松ホトニクス株式会社・電子管事業部 電子管企画部・主任部員）

② 研究項目：

- ・波面補償装置
- ・広視野レンズ
- ・広受光面積光電子増倍管
- ・多点集光装置

2.国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

まず、多細胞 CREST 内連携では、今吉 G が関与するものとして、永樂チーム、榎本チーム、新宅チームとの連携を行っている。永樂チーム・永樂 G とは、シングルセル RNAseq 解析とフローサイトメーター開発(C3 課題)に取り組んでおり、榎本チーム・榎本 G と宮道 G とは、遺伝子改変マウスリソースの開発と共有を行っている。榎本チーム・今井 G とは、全脳イメージングと、多色蛍光タンパク質標識サンプルにおける色分別技術の組み合わせについて共同研究を行っている。新宅チーム・阪上・沢野 G とは、細胞周期特異的に遺伝子発現を可能とする光操作技術開発を行っている。

次に、奥田 G は、独自技術である力学計測・解析手法を基盤として、藤原チーム・藤原 G、同チーム長山 G との共同研究を展開している。藤原 G は、体表プラコードのテレスコープ動態を支える多細胞間相互作用の理解を目指しているが、その力学的な側面の理解は未だ不十分である。そこで、奥田 G の原子間力顕微鏡(AFM)による弾性率計測と 3D バーテックスモデルによる力学解析技術を藤原 G の実験系に導入し、プラコード形成の力学過程の定量的な理解を目指している。C3 によって得られたサポートにより、新規の AFM のセットアップの開発に成功し、これまで不可能だった生きた厚肉の皮膚サンプルの弾性率を網羅的に計測することに成功した。

2022 年度の第 74 回の細胞生物学会年会における多細胞 CREST 企画のシンポジウムでの招待講演など、国内外の学会において、研究チームの成果のアップデート・発表を随時心がけてきた。これらの学会発表を通じて、開発した技術の導出や、あらたな共同研究の発掘に心がけた。また、今吉、奥田、磯部、浜松ホトニクスと、個々のグループメンバーの専門分野が大きく異なることから、CREST 課題を通じて形成されたネットワークは多岐に渡っている。

顕微鏡技術の普及については、カールツァイス(第 44 回 神経科学会年会・ランチョンセミナー) やオリンパス／エビデンント(Inovation Forum 2021)主催のセミナー、ニコンソリューションズ(NEURO2024・ランチョンセミナー)において講演を行い、意見交換を行ってきた。

また、浜松ホトニクス社には、本 CREST 課題で開発した技術の製品化を加速させるために、京都大学 生命科学研究所と医生物学研究所に、産学共同ラボを設置してもらい、その担当教員に磯部が就任することで、実用化のスピードアップを図っている。この産学共同ラボの活動を通じて、将来の技術導出先となり得る、顕微鏡メーカー、光学メーカー、医療機器メーカーと活発な意見交換と協働の可能性を探るとともに、産業界でのネットワーク形成に努めている。

さらに、奥田 G は、独自技術である力学計測・解析手法を基盤として、株式会社ニコンとの共同研究を展開している。ニコンは、顕微鏡の開発・生産技術において世界をリードしており、特

に生体組織を対象とした顕微鏡技術においては、撮影した画像に付加価値を与える画像処理技術に注力している。そこで、顕微鏡により撮影した画像に対して数理モデルによる予測技術を適用し、顕微鏡技術だけでは取得困難な物理量を予測する新規技術の開発に取り組んでいる。加えて、奥田 G は、多細胞システムの理解に対する機械工学的なアプローチの重要性を布教するため、国内外の学会においてシンポジウムやワークショップを主宰している。2022 年 5 月に開催された日本発生生物学会では、機械工学分野の研究者を招いたシンポジウムを企画した。また、2022 年 6 月に企画したメカノバイオロジーを主題とする国際シンポジウムでは、国内外から 13 名の講演者と 70 名あまりの参加者が集まり、今後の発生生物学と機械工学の融合について議論した。2022 年 7 月に開催された WCB(バイオメカニクス世界大会)では、多細胞の力学をテーマとして若手研究者を中心としたシンポジウムを企画し、国際連携の可能性について議論した。

他の CREST 領域との連携としては、今吉 G、磯部 G は、オプトバイオ CREST の小坂田チームとの連携を行った。深部イメージング技術やパターン照明技術、光源開発に取り組んでおり、本 CREST 課題と相互に技術の共有を行った。浜松ホトニクス G からは、本 CREST 課題で開発した広受光面積光電子増倍管を深部イメージング用に提供していた。また、今吉 G は、同オプトバイオ CREST の小澤チーム、柚崎チームと、光操作ツールの開発と応用について緊密な連携を行っており、現在も継続している。