

2024 年 12 月 11 日

報道関係者各位

慶應義塾大学
愛知医科大学
国立大学法人筑波大学

細胞の老化を高感度に可視化する画期的なラマン顕微画像化法を開発

ー変性タンパク質を指標とした、新たな非染色可視化法ー

慶應義塾大学理工学部の加納英明教授、愛知医科大学医学部の猪子誠人講師、筑波大学大学院応用理工学学位プログラム博士後期課程 3 年次の石橋茂雄らを中心とする医理工複合研究チームは、ラマン散乱(※1)と呼ばれる特殊な光学現象を用いて、細胞の老化を標識物質なしで可視化する顕微観察方法を共同開発しました。

細胞老化(※2)は、老化現象の根底にあると考えられています。老化現象のわかりやすい例は、筋肉量の減少・骨密度の低下・皮膚の弾力性低下など、年齢とともに現れる変化・機能の衰えです。細胞の老化は幹細胞の枯渇を引き起こし、これらの老化現象の元となります。それだけでなく、老化細胞は悪い物質を放出することで癌をはじめとしたさまざまな加齢性疾患にも関与することが、最近の研究から分かってきました。そのため、老化細胞を標識物質なしに可視化したりその程度を評価したりすることは、老化の仕組みの解明・関連疾患の基礎医学研究や、老化を画像評価できるような将来的な診断法開発の基盤技術として重要です。

今回の可視化では、老化細胞の核内(核小体)に特徴的な変性・凝集タンパク質の構造に注目しました。アミロイド(※3)とも呼ばれるこの凝集体は、 β シートと呼ばれる特徴的な折りたたみ構造が集まっていることで知られています。

本研究では、ラマン散乱を用いた顕微画像化法により、老化細胞に含まれる小さなアミロイド凝集体中の β シートの直接可視化に成功しました。これにより細胞の老化を検出し、またその程度を評価できる高感度な方法を開発しました。この技術は同様にアミロイドに基づいた生理・病態の研究や医療開発に幅広く寄与することが期待されます。

本研究の成果は 2024 年 11 月 11 日に *Scientific Reports* に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・最新の初代培養法(※4)を用いた細胞老化モデルと高感度ラマン顕微鏡で本法を開発しました。
- ・画像化では核小体タンパク質のアミロイド化、すなわち β シート構造の増加に注目しました。
- ・細胞老化に至る初期変化の検出にも成功しました。
- ・今後は細胞老化だけでなく、同様の機序に基づいた幅広い医学研究への応用が期待できます。

2. 研究背景

「不老長寿」は古くから伝説にも登場し、「人類の永遠の夢」とも言われています。しかし老化の仕組みが明らかになるにつれ、抗老化薬の開発も夢ではなくなってきました。こうした最新の医療研究開発では、老化細胞の直接的な可視化や評価が重要になってきます。

老化細胞の生物学的指標には p16、p21 などのタンパク質がありますが、その確認にはまず細胞を化学薬品で固定して、特異抗体で標識・可視化する操作が一般に必要です。これらの操作は観察の中断や侵襲を意味します。そのため、継続的な観察研究や将来的な診断応用においては障害となります。

標識せずに老化細胞を可視化する方法があれば、抗老化研究開発の推進に大きく寄与できると考えられます。

今回の可視化に際し、研究チームは「細胞内の小さな器官」である核小体に注目しました。核小体ではストレスや老化に際しタンパク質の蓄積が起こり、その一部はアミロイドと呼ばれる凝集した変性タンパク質であることが知られていました。これは β シートと呼ばれる折りたたみ構造の極端な集合を特徴とし、健全なタンパク質が α ヘリックスを適度に含むのとは対照的です。

3. 研究内容・成果

本研究の技術要素の1つは、CARS (※5) と呼ばれる光学過程を検出できる顕微鏡を用いた画像化法です (CARS 画像化法)。CARS はラマン散乱を「高感度に」観察可能にします。また実験に用いるヒト正常細胞には化合物を用いた「最新の初代培養法 (※4)」を用い、老化を抑えながら長期的に増殖させることで、実験精度を向上させました。

実際の実験では、まずヒト正常細胞をジヒドロサイトカラシン B (※6) という薬剤で強制的に2核化し、人工的に老化させた細胞を作成しました (図 1A 上)。その老化を p16 や p21 などの老化マーカーで確認しました (図 1A 下)。次に、この細胞に白色レーザー (※7) を照射し、そのラマン散乱を観測したところ、核小体におけるアミド I バンド (※8) のピークが高い波数 ($>1653\text{ cm}^{-1}$) にシフトしていることを発見しました (図 1B)。このシフトは β シートの増加を反映することが先行研究から知られています。そこでこの老化細胞核小体における β シート増加の原因をアミロイド染色試薬で確認したところ、アミロイド様凝集体の存在が確認できました (図 1C)。最終的に図 1B のシフトが見られる領域を青色で画像化すると、老化細胞特異的に核小体を可視化できました (図 1D)。論文では自然発生した2核老化細胞や、試薬でアミロイドを形成させた細胞でも可視化の再現性を確認しました。

最後にこの β シート検出能を使って、2核老化になる前の核小体の状態評価を検討しました。正常細胞の自然経過では、2核老化以前にも核小体の肥大などの老化の兆候が見られます (図 2A)。これらの1核細胞のアミド I シフトを画像化したところ、核小体の大きさと β シートの比率に相関が確認できました (図 2B)。すなわち、新開発の CARS 画像化法では、 β シートの比率によって2核化以前の核小体の健全性の程度も評価することができます。

以上のことから、高感度な本法は細胞老化の非染色検出だけでなく、小さな核小体の健全性の評価も可能なことがわかりました。

図 1：人工2核老化細胞のラマン散乱ピークシフト

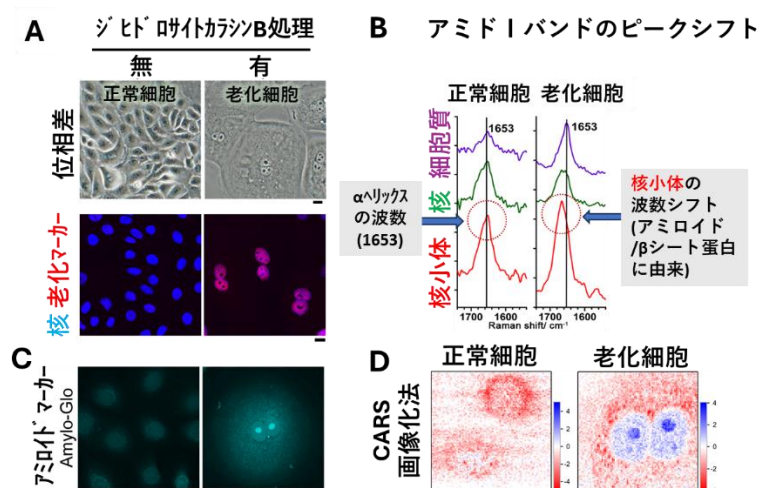
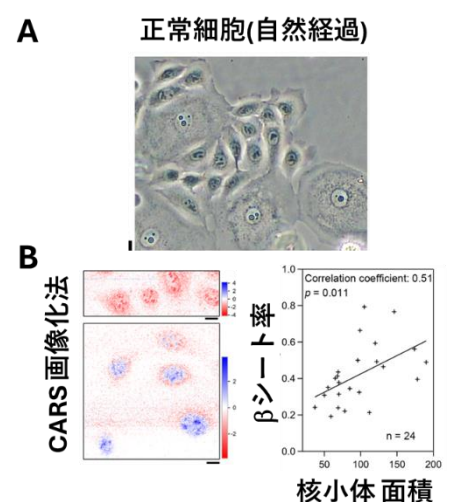


図 2：1核細胞の核小体評価



4. 今後の展開

本研究では小さな核小体の変性タンパク質が示す β シートの可視化に成功しました。この技術の特長は、特定の種類のタンパク質を識別するのではなく、その「分子構造を識別できる」点です。そのためタンパク質全体の品質管理・恒常性に注目した細胞生物学や、分子構造に基づいた分離現象に注目する「相分離生物学」などの基礎研究分野にも有用です。相分離生物学の第一人者である筑波大の白木賢太郎教授は「非破壊でタンパク質の集合状態を直接観察できる計測法で、特に生体内のアミロイドの研究において新たな発見があるだろう」と期待を寄せています。

また医学的には、ストレスなどでタンパク質の恒常性が破綻した変性疾患や癌を含む加齢性疾患の病態解明にも有効と考えられます。現在は患者生体での病態解析は難しいですが、まずはそのモデルとなる患者細胞や疾患マウスの解析に本手法を用いることで、今後研究が進展していくと考えられます。

<用語説明>

※1 ラマン散乱：物質に光を照射したとき、入射光の波長からずれた波長の光が散乱される現象。このずれは分子が持つ各分子振動に固有な値であるため、さまざまな分子構造を識別する手段になる。（文献 1）

※2 細胞老化：古典的には細胞分裂（細胞増殖）の不可逆的な停止と定義され、正常細胞特有の現象である。活性酸素などのさまざまなストレスが細胞中の DNA、蛋白質、脂質などを損傷し、その蓄積で細胞老化が起こる。老化細胞の傷ついた DNA は癌化を引き起こす可能性もあるため、これを増殖停止させることは癌の発症予防にも一役買う。（文献 2、3）

※3 アミロイド： β シート構造の積層やクロス β 構造の重合からなり、水に溶けない繊維状のタンパク質。液-液相分離と呼ばれる構造分離現象にも関わる。生理的に重要な一方で、その異常な凝集は加齢・変性疾患や全身性アミロイドーシスのような難病の原因にもなる。（文献 4、5）

※4 初代培養法：生体から採取した細胞を体外で培養し、増やす方法。以前の初代培養法は細胞老化による分裂回数の限界が指摘されていたが（ヘイフリック限界）、最近では化合物の使用により老化を抑えつつ数か月以上の長期的な細胞増幅が可能になってきた（文献 6、上皮細胞例）。初代細胞には分化可能な細胞が含まれており、再生医療の研究開発資源としても期待される。

※5 CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱：微弱なラマン散乱光を増幅し、高感度化する技術。具体的には、二色のレーザー光を分子に照射することで、照射された分子群が位相をそろえて振動する。その結果、ビーム状で、かつ明るいラマン散乱光（CARS 光）を発生させることができる。

※6 ジヒドロサイトカラシン B：細胞分裂の完了を阻害し、老化させる薬剤。この処理で細胞は 2 核化し、かつ紡錘体極となる中心体が倍化する。これが再分裂時に形成する多極紡錘体は染色体を物理的に傷害し、生じた遺伝子配列のエラーにより癌化する可能性がある。そのため 2 核細胞は意図的に増殖停止や細胞老化を発動させる。これにより癌化を防いでいる。（文献 7）

※7 白色レーザー：紫外から近赤外域まで幅広いスペクトル成分を持ち、集光することで小さいスポットに絞ることが出来る光源。「スーパーコンティニューム光」が正式な専門用語。

※8 アミド I バンド：主にペプチド結合の C=O に由来する。タンパク質の二次構造を反映する、ラマンスペクトルにおける特徴的なバンド。

<参考文献>

- 1) 濱口 宏夫, 岩田 耕一; ラマン分光法, 講談社, 2015
- 2) 城村由和, 中西真; 「細胞老化と個体の老化・老年病」, ドージンニュース,

<https://www.dojindo.co.jp/letterj/161/review/02.html>

- 3) 原英二ら／編；「細胞老化—真の機能を深く理解する」実験医学増刊；Vol. 42 No. 20, 2024
- 4) 白木賢太郎；相分離生物学，東京化学同人，2019
- 5) 廣瀬哲郎ら／編；「相分離メカニズムと疾患」実験医学増刊；Vol. 39 No. 10, 2021
- 6) Mou et al.；Cell Stem Cell, 2016；<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.012>
- 7) Lens & Medema；Nat Rev Cancer, 2019；<https://doi.org/10.1038/s41568-018-0084-6>

<原論文情報>

【題名】 Coherent Raman microscopy visualizes ongoing cellular senescence through amide I peak shifts originating from β sheets in disordered nucleolar proteins
(コヒーレントラマン顕微鏡は、無秩序化した核小体タンパク質の β シート構造に由来するアミドIのピークシフトによって、進行中の細胞老化を可視化する)

【著者名】 Shigeo Ishibashi†, Akihito Inoko†*, Yuki Oka, Philippe Leproux, Hideaki Kano*
(† 共同第一著者, * 共同責任著者)

【掲載誌】 *Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78899-x>

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、名古屋教育・医療記者会、筑波研究学園都市記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

・【研究内容についてのお問い合わせ先】

<分光光学に関すること>

慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 教授 加納 英明 (かのう ひであき)

筑波大学 客員教授

TEL : 045-566-1448 FAX : 045-566-1448

E-mail : hkano@bio.keio.ac.jp <https://kanolab.jp/>

<医学・生物学に関すること>

愛知医科大学 医学部 病理学講座 講師 猪子 誠人 (いのこ あきひと)

TEL : 0561-62-3311 FAX : 0561-61-2350

E-mail : inoko.akihiro.288@mail.aichi-med-u.ac.jp <https://researchmap.jp/inoko>

・【本リリースの配信元】

慶應義塾広報室 (望月)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

E-mail : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>

愛知医科大学 庶務課 (吉田)

TEL : 0561-61-5396 (直通) FAX : 0561-62-6690

E-mail : syomu@aichi-med-u.ac.jp

筑波大学広報局

TEL : 029-853-2040 FAX : 029-853-2014

E-mail : kohositu@un.tsukuba.ac.jp