

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（令和元年度）

			機関番号	1 4 6 0 3
所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学		
研究 代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	助教		
	氏名	安國 良平		

1．研究種目名

基盤研究(C)(一般)

2．課題番号

18K04977

3．研究課題名

ラマンスペクトル変化の深層学習による細胞の力学応答解析手法の開発

4．補助事業期間

平成30年度～令和2年度

5．研究実績の概要

本研究では、これまで申請者が培ってきた集光フェムト秒レーザーを用いた動物細胞への力学的刺激の付加、顕微分光技術による細胞の生理応答測定、ディーブラーニングによる解析を組み合わせ、細胞が識別している本質的な力学的刺激の詳細を明らかにする新しい手法を開発し、細胞の力学応答の作動機構の解明を目指している。

昨年度は細胞近傍の培養液中へ集光したフェムト秒レーザーが発生させる衝撃力の作用の時空間プロファイルに関してに詳細な評価を行った。平成31年度は、この衝撃力を細胞に作用させた場合の生理応答に関して顕微蛍光イメージングによる評価を行った。

緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入したマウス筋芽細胞(C2C12)にレーザー誘起衝撃力を作用させ、その前後の蛍光スペクトルと蛍光イメージの変化を測定した。その結果、衝撃力の作用後に細胞内に発現したGFPの蛍光スペクトルは変化しないものの、蛍光強度は変化し、この変化量は細胞内の核や細胞質のような細胞内小器官によって異なる様子が観測された。さらにこれらの応答は衝撃力の作用強度にも依存することが確認された。GFPの蛍光強度は細胞内の局所環境に依存することが知られており、観測されたGFPの蛍光強度変化はレーザー誘起衝撃力によって誘導された細胞状態の変化を反映していると考えられる。また同様の傾向は他のサル腎臓由来のCOS細胞でも確認された。

本結果は、簡単に測定可能なGFPの蛍光像の変化パターンで刺激に対する細胞状態変化の評価が可能であることを示しており、細胞制御に向けて重要な成果である。

6．キーワード

フェムト秒レーザー誘起衝撃力   メカノレスポンス   単一細胞解析   顕微蛍光分光   緑色蛍光タンパク質

7．現在までの進捗状況

区分	(2) おおむね順調に進展している。
理由	<p>本年度はレーザー誘起衝撃力により変化した細胞の状態に関して蛍光スペクトルとラマン散乱測定を行い、機械学習により細胞状態に変化を与えるレーザーパラメータのクラスター化を行う計画であった。</p> <p>細胞のラマン散乱をベースとした解析に関しては、既存の分光システムでは十分なシグナルを得ることが困難であったため実行が困難であった。しかし蛍光イメージングを用いた手法では、細胞状態の変化を可視化することに成功しており、照射するレーザーパラメータに依存した細胞状態変化も明らかになっていることから、計画はおおむね順調に進展していると言える。</p>

3 版

## 8．今後の研究の推進方策

最終年度では蛍光イメージングを用いた細胞状態の評価手法と、誘導される具体的な分子応答の探索に重点をおき、レーザーを用いて細胞状態を任意の状態へ変化させる方法論を開発する。スペクトルデータの解析から画像解析を主とした方法へのシフトに伴い、機械学習や深層学習に加えて、数理モデルを使った方法を新たに導入し、レーザー刺激に誘導される具体的な分子応答の解析を行う。

## 9．次年度使用が生じた理由と使用計画

実験計画の変更により当初予定していた光学素子の購入が少なかったことに加え、参加を予定していた学会などのキャンセルにより旅費が抑制された。次年度には実験計画の変更に伴って必要となる試薬の購入を予定している。

## 10．研究発表（令和元年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1．著者名 Taufiq Indra Rukmana, Gabriela Moran, Rachel Meallet-Renault, Misato Ohtani, Taku Demura	4．巻 9
2．論文標題 Enzyme-Assisted Photoinjection of Megadalton Molecules into Intact Plant Cells Using Femtosecond Laser Amplifier	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 17530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54124-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Ryohei Yasukuni, Raymond Gillibert, Mohamed N. Triba, Ruta Grinyte, Valery Pavlov and Marc Lamy de la Chapelle	4．巻 8
2．論文標題 Quantitative analysis of SERS spectra of MnSOD over fluctuated aptamer signals using multivariate statistics	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Nanophotonics	6．最初と最後の頁 1477-1483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/nanoph-2019-0041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1．発表者名 Keisuke Ide, Sohei Yamada, Kazunori Okano, Ryohei Yasukuni and Yoichiroh Hosokawa
2．発表標題 Evaluation of cellular response to femtosecond laser impulse based on spectral change of fluorescent proteins
3．学会等名 10th international conference on molecular electronics and bioelectronics (国際学会)
4．発表年 2019年

1．発表者名 田中幸宏, 山田壮平, 岡野和宣, 安國良平, 細川陽一郎
2．発表標題 フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞への分子導入における複数パルス照射効果
3．学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4．発表年 2019年

1．発表者名 安國良平, 井出敬佑, 山田壮平, 岡野和宣, 細川陽一郎
2．発表標題 細胞内の蛍光スペクトル変化に基づく細胞状態評価手法の開発
3．学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4．発表年 2019年

1．発表者名 安國良平, 井出 敬佑, 山田 壮平, 新岡 宏彦, 細川 陽一郎
2．発表標題 蛍光タンパク質の蛍光スペクトル変化を利用した細胞状態の評価
3．学会等名 光化学討論会
4．発表年 2019年

3 版

1．発表者名 井出敬佑，山田壮平，岡野和宜，安國良平，細川陽一郎
2．発表標題 フェムト秒レーザー誘起衝撃力に対する細胞応答の評価手法の開発
3．学会等名 OCU先端光科学シンポジウム
4．発表年 2019年

1．発表者名 田中幸宏，小柳朱里，山田壮平，岡野和宜，安國良平，細川陽一郎
2．発表標題 フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した、標的細胞への分子導入
3．学会等名 OCU先端光科学シンポジウム
4．発表年 2019年

1．発表者名 Ryohei Yasukuni, Sohei Yamada, Kazunori Okano and Yoichiroh Hosokawa
2．発表標題 Cellular Responses to Femtosecond Laser Induced Impulse
3．学会等名 International micro processes and nanotechnology conference (国際学会)
4．発表年 2019年

〔図書〕 計0件

1 1．研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

1 2．科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

## 1 3 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	CNRS	Universite Paris Saclay	ENS Paris Saclay	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

## 1 4 . 備考

-