細胞を取り巻く「足場」の影響を取り除き、ラマン分光で細胞本来の化学情報を抽出

～複雑なハイドロゲル足場上のシングルセル解析の高精度化を実現～

ポイント

・地理学第一法則「近いものほど関連が強い」とAIを融合した革新的なラマン画像解析手法を開発。
・足場環境に由来する信号や照明むらを高精度にAI除去し、細胞固有のラマン情報の抽出に成功。
・がん幹細胞化のメカニズム解明に向けたラマン分光計測による新たな可能性を示唆。

概要

北海道大学総合イノベーション創発機構化学反応創成研究拠点（WPI-ICReDD）・電子科学研究所の小松崎民樹教授らの研究グループは、大阪大学大学院工学研究科、ドイツのライプニッツ光技術研究所、フランスのリール大学の研究機関などとの共同研究により、ハイドロゲルなどの細胞培養の足場環境が細胞のがん細胞化に及ぼす影響をラマン分光学に基づいて理解するため、ラマン画像に陰に混入する足場環境自身の化学情報を局所的に推定・除去する方法 Adaptive Local Intensity Variation Adjustment（ALIVA）[*1]を新規に開発することに成功しました。

ラマン顕微鏡[*2]は、染色や蛍光標識を用いずに、生きた細胞の分子組成を“化学的な指紋”として調べられる手法です。一方、細胞を生体に近い環境で培養するためのハイドロゲル自体もラマン信号を発するため、細胞の信号と重なり、さらに足場の不均一性やレーザー照明むらによって解析結果が左右されるため、足場環境存在下で細胞由来の情報を正確に評価することが困難でした。ALIVAは地理学で知られる「近いものほど互いに関連が強い」という Tobler の第一法則と機械学習におけるベイズ最適化[*3]をラマン画像に適用し、細胞の各画素について近傍の細胞外領域から足場環境由来の背景スペクトルを推定します。その際、近傍をどの程度重視するかを決めるガウス重みをベイズ最適化で画像ごとに自動調整し、細胞が位置するピクセルのラマンスペクトルの足場由来の複雑さを最小化し、細胞本来のスペクトルだけを抽出することに成功しました。

SS18-SSX1融合遺伝子を導入したマウスC2C12細胞を石英基板とPAMPSハイドロゲル[*4]上で培養・検証した結果、従来法に比べて足場由来のスペクトル差や画像間の不要なばらつきを低減し、細胞由来の生化学情報を抽出することに成功しました。本手法は、材料環境が細胞の状態をどのように変えるかを、足場そのものの信号と混同せずに調べるための基盤技術となります。ハイドロゲル足場誘導によるがん幹細胞化のメカニズムをその場ラマン分光により解明する手がかりが見出されるなど、今後、様々なその場ラマン分光解析の応用が期待されます。

なお、本研究成果は、2026年11月6日（金）公開の Analytical Chemistry 誌にオンライン掲載されました。

【背景】

細胞は、培養皿の上と生体に近い柔らかな足場の上とでは、形や代謝、遺伝子発現などが変化します。特にハイドロゲルは、細胞外マトリックスに近い力学的・化学的環境を設計できることから、幹細胞研究、がん研究、薬物送達、オルガノイド形成などで広く利用されています。研究グループはこれまで、PAMPS を含むダブルネットワーク（DN）ハイドロゲルが、がん細胞をがん幹細胞様の状態へ誘導し得ることを報告してきました（Suzuka ら *Nat Biomed Eng* 5, 914–925 (2021)）。ラマン顕微鏡は、分子の振動に由来する光の散乱を測ることで、細胞内のタンパク質、脂質、核酸などを標識なしで調べられます。しかし、ハイドロゲルや石英などの足場も固有のラマン信号を持ち、細胞の信号に重なります。また、ライン照明型ラマン顕微鏡では照明強度が場所によって異なり、足場自体にも空間的不均一性があります。従来の「画像全体で一つの背景スペクトルを引く」方法では、こうした局所差を十分に補正できませんでした。

【研究手法】

研究グループは、ラマン画像の各細胞画素について、その近くにある細胞外の画素から局所背景スペクトルを作り、細胞スペクトルから差し引く ALIVA を開発しました。この手法は、高波数領域のスペクトル形状の非対称性（歪度）を利用して細胞領域と背景領域を自動分離し、対象の細胞画素に近い背景ほど大きな重みを与えるガウス重み付き平均で足場由来の局所背景を推定します。ガウス重みの広がりを決めるパラメータを画像ごとにベイズ最適化により決定することで、細胞由来の生化学情報を抽出することに成功しました。この手法は、地理学で知られる「近いものほど互いに関連が強い」という Tobler の第一法則を、ラマン画像の空間的な事前知識として利用したものです。ライン照明の幾何学に合わせ、同じ照明強度を受ける方向の背景を使うことで、足場の局所差と照明むらの双方を補正することが可能となりました（図 1）。

【研究成果】

SS18-SSX1 融合遺伝子を導入したマウス C2C12 細胞を、石英底面皿と PAMPS ハイドロゲル上で培養し、13 枚のラマン画像から得た単一細胞データを用いて、開発した手法を評価しました。まず、ALIVA では、明視野画像をもとに定めた正解領域との一致度（Sørensen–Dice 係数、1 に近いほどよく一致）が石英で 0.92、PAMPS で 0.89 となり、単純な強度に基づく分離（0.67、0.70）より高い精度を示しました。従来の前処理では、石英と PAMPS 上の細胞は足場由来のピークによって大きく異なったスペクトルを与えました。また画像全体の平均背景を引く方法では、その差は小さくなるものの、局所的な過補正や補正不足が残りました。一方、ALIVA では、特に 500〜1100 cm^{-1}付近に見られた足場由来の変動が大きく低減し、主成分分析（PCA）でも異なる足場上の細胞がよりまとまった分布を示しました。従来法で補正したラマンスペクトルから「細胞が石英と PAMPS のどちらで培養されたか」をランダムフォレストという機械学習法で判別すると、ほぼ 100%の精度で足場を判別できました。しかし、判別の根拠を調べる重要度解析では、PAMPS そのもののピークが判断を支配しており、細胞の状態ではなく“足場を見分けている”ことが分かりました。それに対し、ALIVA での前処理後は足場の寄与が低下し、シトクロム、核酸塩基、フェニルアラニン、タンパク質など細胞由来の特徴が相対的に大きく寄与するようになりました。この結果は、ALIVA によって足場由来の信号の影響が抑えられ、細胞の化学情報に着目した比較がしやすくなったことを示唆しています（図 2）。

階層クラスタリングでは、ALIVA 後の細胞は足場だけで二分されず、両足場由来の細胞が混ざる一方、脂質関連のラマン特徴に富むサブグループが現れました。このサブグループは PAMPS 上の細胞

で 53.1%、石英上で 6.25%を占めました。この比率は Suzuka ら *Nat Biomed Eng* 5, 914–925 (2021) で見出されている DN ハイドロゲル上でのがん幹細胞化率とおおよそ対応する数値を示すことが分かりました。この集団ががん幹細胞様状態に対応するかどうかは今後さらなる検証が必要ですが、同一実験条件で撮影した異なる画像間のスペクトル差も ALIVA により大幅に縮小し、バッチ効果[*5]の低減が確認されるなど、ALIVA が持つ高い解析能を示すことができました。

【今後への期待】

ALIVA により、ハイドロゲルなどの材料が細胞へ与える生物学的影響と、材料そのものが測定に混入させる光学・分光学的影響を、従来よりも明確に切り分けられる可能性があります。これにより、細胞と材料の相互作用、代謝状態、がん幹細胞様状態などを、非侵襲かつラベルフリーで追跡する研究の精度向上が期待されます。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科研費（JP24K21076、JP22K18179、JP18H05408）、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 CREST（JPMJCR1662、JPMJCR2333）、文部科学省「物質・デバイス領域共同研究拠点」ダイナミック・アライアンス研究プログラム、Carnot 財団などの支援を受けて実施されました。WPI-ICReDD は文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム（WPI）により設置されています。

論文情報

論文名	Extracting Single-Cell Raman Signature in Scaffold Environments through Bayesian-Optimized Local Background Correction（ベイズ最適化を用いた局所背景補正による足場環境下のシングルセル固有のラマン特性を抽出する）
著者名	Jean-Emmanuel Clément[1]（研究当時）[,2]、Zannatul Ferdous[1]（研究当時）[,3]、Khalifa Mohammad Helal[1,4]、津田真寿美[1,5]、熊本康昭[6,7]、Menglu Li[6]、Thomas Bocklitz[8]、Jian Ping Gong[1,9]、藤田克昌[6,7]、田中伸哉[1,5]、小松崎民樹[1,7,10]（[1]北海道大学総合イノベーション創発機構化学反応創成研究拠点（WPI- ICReDD）、[2]リール大学・フランス国立科学研究センター（CNRS）、[3]パリ高等師範学校（ENS）カストレル・ブロッセル研究所・ソルボンヌ大学、[4]クミラ大学数学専攻、[5]北海道大学大学院医学研究院、[6]大阪大学大学院工学研究科、[7]大阪大学先導的学際研究機構、[8]イェーナ大学ライプニッツ光技術研究所、[9]北海道大学大学院先端生命科学研究院、[10]北海道大学電子科学研究所）
雑誌名	Analytical Chemistry（分析化学の専門誌）
ＤＯＩ	10.1021/acs.analchem.6c03142
公表日	2026 年 11 月 6 日（金）（オンライン公開）

お問い合わせ先

北海道大学総合イノベーション創発機構化学反応創成研究拠点（WPI-ICReDD）・電子科学研究所
教授　小松崎民樹（こまつざきたみき）

ＴＥＬ　011-706-9434　　ＦＡＸ　011-706-9434　　メール　tamiki@es.hokudai.ac.jp

ＵＲＬ　https://mlns.es.hokudai.ac.jp

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目）

ＴＥＬ　011-706-2610　　ＦＡＸ　011-706-2092　　メール　jp-press@general.hokudai.ac.jp

大阪大学工学研究科総務課評価・広報係（〒565-0871 吹田市山田丘 2 番 1 号）

ＴＥＬ　06-6879-7231　　ＦＡＸ　06-6879-7210

メール　kou-soumu-hyoukakouhou@office.osaka-u.ac.jp

【参考図】

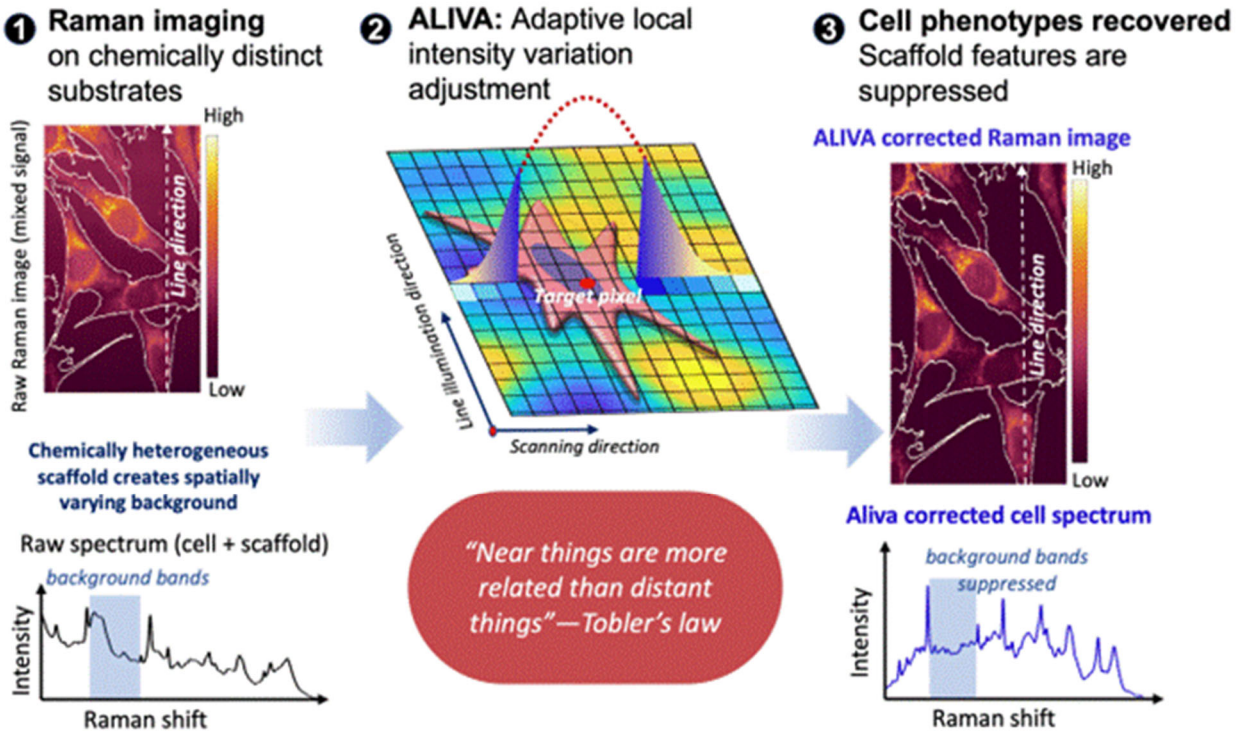


図 1. Adaptive Local Intensity Variation Adjustment（ALIVA）補正によるハイドロゲル上培養細胞のラマンスペクトルの解析。①足場環境のラマン信号の混入、照明ムラを反映したラマン画像。②Tobler の地理学における第一原理「「近いものほど互いに関連が強い」」とベイズ最適化に基づく局所環境補正の概念図。③ALIVA による局所環境補正後のラマン画像。

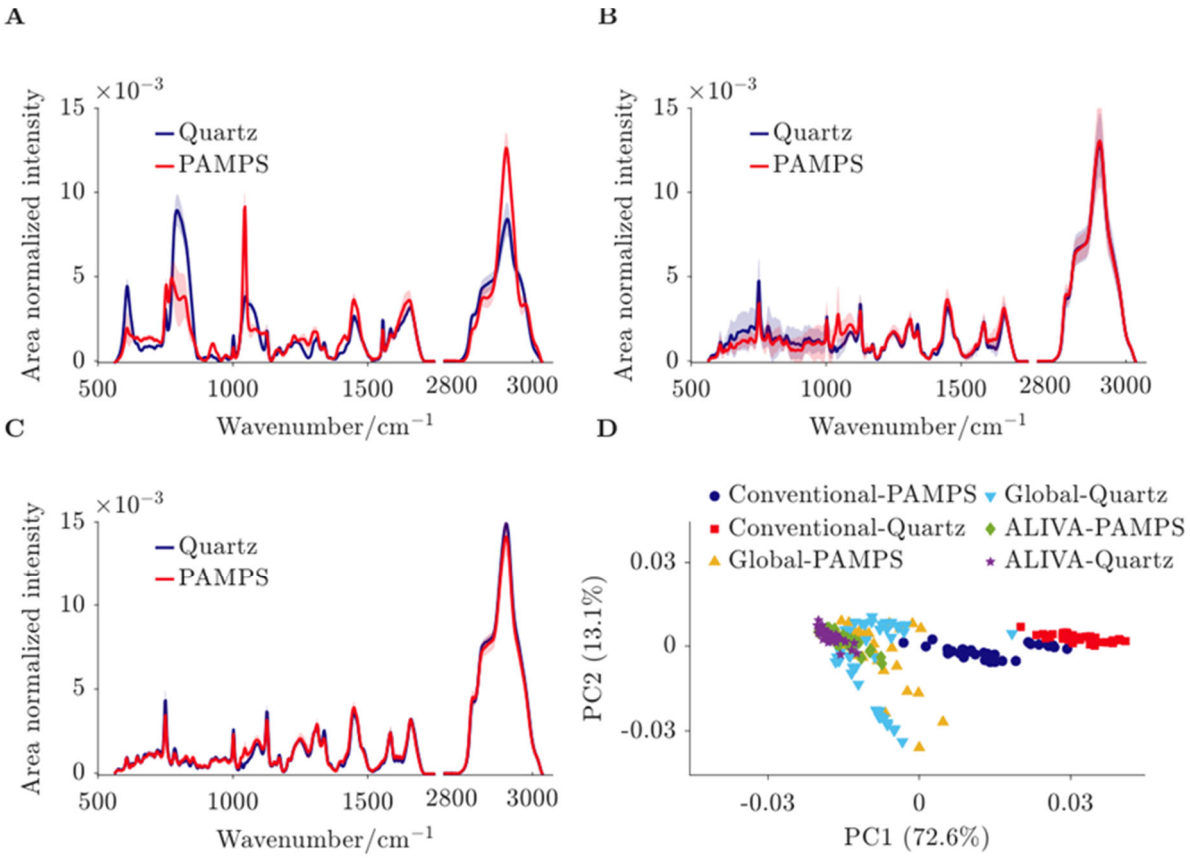


図 2. 石英基板及び石英基板上の PAMPS ハイドロゲルの足場環境で培養されたマウスの C2C12 SS18-SSX1 細胞のシングルセルの平均ラマンスペクトル。（A）従来法による前処理を施したもの、（B）足場ラマンスペクトルを非細胞領域全域にわたって平均化されたものを細胞領域のラマンスペクトルから差し引く前処理法を施したもの、（C）開発した ALIVA による前処理法を施したもの、（D）（A）-（C）の平均前の各シングルセルラマンスペクトルを主成分空間に投影したもの。最初の 2 主成分により 85.7%の全変動を表現しており、既存の前処理手法によるシングルセルラマンスペクトルは足場の違いにより大きく異なるのに対し（例：(A) で 800 cm-1 付近のピークは石英特有のピーク）、ALIVA ではそれらの差異は低減されていることが分かる。

【用語解説】

＊1 ALIVA … Adaptive Local Intensity Variation Adjustment の略。細胞画素ごとに近傍の細胞外領域から局所背景を推定し、足場由来のラマン信号や照明むらを補正する本研究の手法。

＊2 ラマン顕微鏡 … 物質に光を当てたときに生じるラマン散乱を測り、分子の振動に由来するスペクトルから化学組成を画像化する顕微鏡。蛍光標識などを用いずに細胞内の分子情報を得られる。

＊3 ベイズ最適化 … 評価に時間や計算コストがかかる条件探索で、これまでの結果から次に試すべき条件を確率的に選び、少ない試行で良い条件を探す方法。本研究では局所背景を作るガウス重みのパラメータ決定に用いた。

＊4 PAMPS ハイドロゲル … poly（2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid）を主成分とする含水性高分子材料。本研究では細胞培養の足場として用いた。

＊5 バッチ効果 … 測定日、画像、装置条件など、生物学的な違いではない測定上の要因によってデータに生じる系統的な差。

【WPI–ICReDD について】

ICReDD（Institute for Chemical Reaction Design and Discovery、アイクレッド）は、文部科学省国際研究拠点形成促進事業費補助金「世界トップレベル研究拠点プログラム（WPI）」に採択され、2018 年 10 月に北海道大学に設置されました。WPI の目的は、高度に国際化された研究環境と世界トップレベルの研究水準の研究を行う「目に見える研究拠点」の形成であり、ICReDD は国内にある 18 の研究拠点の一つです。

ICReDD では、拠点長の下、計算科学、情報科学、実験科学の三つの学問分野を融合させることにより、人類が未来を生き抜く上で必要不可欠な「化学反応」を合理的に設計し制御を行います。さらに化学反応の合理的かつ効率的な開発を可能とする学問、「化学反応創成学」という新たな学問分野を確立し、新しい化学反応や材料の創出を目指しています。