

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム
(英語) Development of Advanced Measurement and Analysis System

研究開発課題名： (日本語) 1細胞分子診断システム
(英語) Single-Cell Molecular Diagnosis System

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人 理化学研究所 生命システム研究センター センター長
兼チームリーダー 柳田 敏雄

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Quantitative Biology Center, Team Leader, Tsutomu Masujima

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 臨床応用での本手法検証・樹立と指標探索
開発課題名： (英語) Investigation and Establishment of the Developed Method via Clinical
Application

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 広島大学 自然科学研究支援開発センター 教授 檜山 英三
所属 役職 氏名： (英語) Hiroshima University, National Science Center for Basic Research and
Development, Professor, Eiso Hiyama

分担研究 (日本語) ロボット1細胞成分捕捉装置開発
開発課題名： (英語) Development of a Robot System for Collecting Single-Cell Content

研究開発分担者 (日本語) (株)デンソーウェーブ 広島営業所 顧問 益田 博文
所属 役職 氏名： (英語) Denso-Wave Corporation, Hiroshima Branch, Advisor, Hirofumi Masuda

分担研究 (日本語) 臨床応用での本手法検証・樹立と指標探索
開発課題名： (英語) Investigation and Establishment of the Developed Method via Clinical
Application

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 教授 菅野 雅元
所属 役職 氏名: (英語) Hiroshima University, Graduate School of Biomedical and Health Sciences,
Professor, Masamoto Kanno

分担研究 (日本語) 臨床応用での本手法検証・樹立と指標探索
開発課題名: (英語) Investigation and Establishment of the Developed Method via Clinical
Application

研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター研究所 ユニット長 本田 一文
所属 役職 氏名: (英語) National Cancer Center Research Institute, Laboratory Head, Kazufumi
Honda

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

1 細胞分子診断システムの開発においては、3D ホログラフィー顕微鏡を用いて非染色で細胞の構造を可視化し、ガラスマイクロビーズをコントロールとして用いることで、細胞吸引量を pL オーダーで正確に定量することに成功した。続いて、得られた一細胞質量分析データを主成分解析などの機械学習によって解析するソフトウェアを開発し、他チームにおける各種疾患状態の判別に提供した。

ロボット開発においては、1 細胞捕捉ロボットの先端にナノスプレーチップを自動装着後、針先先端を認識し顕微鏡視野の細胞へアプローチし、ターゲットの1細胞へ針先補正を掛け、捕捉できるようになった。

小児がん診断への応用では神経芽腫と悪性リンパ腫、成人がでは肺癌を中心に、血中循環がん細胞 (CTC) を捕捉して、1 細胞創薬・分子診断ソフトウェアに蓄積して行くと同時に、マーカー探索を進めた。実際には、CTC を捕捉するために、細胞形態や非血液系マーカーによるソーティングと磁気ビーズにて濃縮し、CTC を採取して一細胞 MS 解析したところ、神経芽腫と悪性リンパ腫では別のクラスターとして分別され、さらに CTC としての特異性も認められ、CTC の分別は可能となった。薬剤投与後の腫瘍細胞治療効果の予測へ応用することを目的に、薬剤投与による CTC の変化について検討を追加した。

母乳研究においては、栄養乳幼児のアトピー性皮膚炎発症に関する母子コホート研究から、自然免疫系に着目し、母乳中の原因物質・マーカー分子を同定した (数種類の飽和脂肪酸)。さらにその動物モデルを確立し、予防法を見出した。さらに同様の手法を敗血症患者にも応用した。

また CTC を効率的に分離する方法として抗体を用いない手法を開発した。マイクロニードルとマイクロマニピュレーター利用して1細胞 CTC から細胞抽出液を抽出する方法を確立した。質量分析を用いて大腸がん、胃がんの1細胞 CTC からメタボローム解析を実施した。このデータ解析・診断の過程で影響の大きかった代謝物・脂質分子など約 40 種をバイオマーカー候補としてリストアップすることに成功した。

In the development of single cell diagnosis system, 3D-holography microscope was employed for non-staining visualization of cellular structure. By using finely prepared glass microbeads, volume quantitation was calibrated and accurate volume-estimation of aspirated cellular contents was achieved in the order of pL. We also developed a software for single cell diagnosis based on the machine learning technologies like principle component analysis, which was provided to other teams for clinical application.

A robot system was also developed successfully. In this system, firstly, a nano-spray tip was automatically inserted in the single-cell capture device. The tip end then approach to a single cell observed by a microscope, where cellular content was aspirated.

In the application to childhood cancer, circulating tumor cells (CTCs) from neuroblastoma and malignant lymphocyte patients were analyzed. From adult patients, CTCs derived from pancreatic cancers were analyzed. We improved the software of single-cell drug discovery and single-cell molecular diagnosis, where screening of biomarkers was also carried out. The method for capturing CTCs was also optimized by using morphology-based cell sorting and enrichment via magnetic beads. As a typical result of single cell diagnosis, neuroblastoma and malignant lymphocytes are classified into different clusters. Separation of CTCs from other cells are also possible. CTCs before and after drug administration was also analyzed and its efficacy was investigated.

In the research of mother's milk, we focused on innate immune system according to the cohort research on mother-child and their pathogenesis of atopic dermatitis. Some of pathogen and biomarkers in mother's milk were identified to be several species of saturated fatty acids. Its animal model was established for prevention of pathogenesis, which was also applied to patients of sepsis.

We also established a new isolation method of single CTCs by micro needles and micro manipulator after enrichment of CTCs from peripheral blood of the patients using microfluidic separation tool without antibody. We analyzed the metabolomics profiles of single CTCs by the high-resolution mass spectrometry and about 40 biomarker candidates (metabolites and lipids) are found.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 7 件）

1. Emara S, Amer S, Ali A, Abouleila Y, Oga A, **Masujima T**. Single-Cell Metabolomics. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2017, 965, 323-43.
2. Tanaka M, Esaki T, Kenmoku H, Koeduka T, Kiyoyama Y, **Masujima T**, Asakawa Y, Matsui K. Direct evidence of specific localization of sesquiterpenes and marchantin A in oil body cells of *Marchantia polymorpha* L. **Phytochemistry**. 2016, 130, 77-84.
3. Horiyama S, Hatai M, Takahashi Y, Date S, **Masujima T**, Honda C, Ichikawa A, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M, Takayama M. Intracellular Metabolism of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds, Acrolein, Crotonaldehyde and Methyl Vinyl Ketone, Active Toxicants in Cigarette Smoke: Participation of Glutathione Conjugation Ability and Aldehyde-Ketone Sensitive Reductase Activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo). 2016, 64(6), 585-93.
4. Yamamoto K, Takahashi K, Mizuno H, Anegawa A, Ishizaki K, Fukaki H, Ohnishi M, Yamazaki M, **Masujima T**, Mimura T. Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single-cell MS. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. 2016, 113(14), 3891-6.
5. Kawashima M, Kojima M, Ueda Y, Kurihara S, **Hiyama E**. Telomere biology including TERT rearrangements in neuroblastoma: a useful indicator for surgical treatments. **Journal of Pediatric Surgery**. 2016, 51(12), 2080-2085.
6. Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Sueda T, **Hiyama E**. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**. 2016 Jun 28;115(1):59-65. doi: 10.1038/bjc.2016.175.
7. **KANNO, M.**, Kong, W.-S., Inoue, H., Shimojo, N., Tsuyama, N., Arita, M., Guo, Y. Identification of DAMPs molecules in mother's milk of a cohort study on atopic dermatitis in breastfed infants: Mouse model study and correlation with gut ILCs. **EUROPEAN J. IMMUNOL.** 46, S1: 1-1238, 2016
8. Shoji H, Tada K, Kitano S, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Takashima A, Kato K, Boku N, **Honda K**, Yamada T, Heike Y, Hamaguchi T. The peripheral immune status of granulocytic myeloid-derived suppressor cells correlates the survival in advanced gastric cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. **Oncotarget** In press.
9. Kakuya T, Mori T, Yoshimoto S, Watabe Y, Miura N, Shoji H, Onidani K, Shibahara T, **Honda K**. Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2017 Apr 3. pii: S0901-5027(17)31345-0. doi: 10.1016/j.ijom.2017.03.001.
10. Miura N, Kamita M, Kakuya T, Fujiwara Y, Tsuta K, Shiraishi H, Takeshita F, Ochiya T, Shoji H, Huang W, Ohe Y, Yamada T, **Honda K**. Efficacy of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer assessed by metastatic potential associated with ACTN4. **Oncotarget**. May

31;7(22):33165-78, 2016.

11. Takahashi N, Iwasa S, Fukahori M, Sudo K, Sasaki Y, Shoji H, Honma Y, Okita NT, Takashima A, Hamaguchi T, Boku N, Shimada Y, **Honda K**, Yamada T, Yamada Y. A phase I study of the combination of panitumumab and bevacizumab in KRAS wild-type colorectal cancer patients previously treated with fluoropyrimidine, oxaliplatin, irinotecan and bevacizumab. **Cancer Chemother Pharmacol**.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 膵癌患者における circulating tumor DNA の検出と予後、口頭、村上 義昭, 上村 健一郎, 橋本 泰司, 近藤 成, 中川 直哉, 末田 泰二郎, 檜山 英三, 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016 年 4 月 14~16 日. 大阪国際会議場 (大阪市) (ワークショップ 4/14)
2. Exome sequencing of hepatoblastoma identifies biological signatures and potential therapeutic targets, 口頭, Hiyama E. International Pediatric Liver Tumor Symposium, Texas Medical Center Houston (Texas, USA), February 25-26, 2016, 国外.
3. Telomere biology in neuroblastoma: focusing on alteration of TERT promoter lesion, 口頭, Hiyama E, Kawashima M, Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Hiyama K. Advances in Neuroblastoma Research Congress (ANR) 2016, Cairns Convention Centre (Queensland, Australia), June 19-23, 2016, 国外.
4. 予後良好な神経芽細胞腫で発現していた 3 遺伝子の機能解析. (Functional analysis of three genes expressed in favorable neuroblastoma), ポスター, 山岡絵美, 林 陽子, 檜山英三, 第 75 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016 年 10 月 6-8 日, 国内.
5. Circulating Tumour Cells and Circulating Free DNA in Childhood Solid Tumors., 口演, Hiyama E, Kurihara S, Ueda Y, Kawashima M, Hiyama K. Cancer Fluid Biopsy Using 48th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). Dublin, Ireland (The Convention Centre Dublin). October 19-22, 2016. 国外
6. 神経芽腫細胞株における分化誘導候補因子の解析、ポスター、山岡 絵美, 金輪 真佐美, 田川 浩美, 福場 郁子, 久保 陽子, 古屋敷 なぎさ, 平野 尚子, 深澤 賢宏, 檜山 英三. (広島大・自然科学セ). 第 39 回日本分子生物学会年会..パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 11 月 30 日~12 月 2 日、国内
7. Identification of DAMPs molecules in mother's milk of a cohort study on atopic dermatitis in breastfed infants: Mouse model study and correlation with gut ILCs. (口頭) Kanno, M., Kong, W.-S., Inoue, H., Shimojyo, N., Tsuyama, N., Arita, M., Guo, Y. Internationa Congress of Immunology (ICI2016), Melbourne Australia, 2016/8/20-27 国外
8. アトピー性皮膚炎・出生コホート解析: 母乳中 DAMPs 活性物質の同定、免疫学的作用機序の検討 (口頭) 菅野雅元、Kong Weng-Sheng、津山尚宏、有田 誠、升島 努、郭 芸、下条直樹、井上洋子 第 65 回日本アレルギー学会 東京国際フォーラム 東京 2016/6/17-19 国内
9. Involvement of ILCs in the pathogenesis of atopic dermatitis mouse model. (口頭)Kong, W.-S.,

- Inoue, H., Shimojyo, N., Tsuyama, N., Arita, M., Guo, Y. and Kanno, M. 第45回日本免疫学会
 学術集会 Okinawa convention Center 宜野湾市 沖縄 2016/12/5-7 国内
10. A role of the Ubiquitin-modifying enzyme A20 in regulatory T cells. (ポスター) Yun Guo,
 Fuqiang Chen, Weng-Sheng Kong¹, Hiroaki Honda and Masamoto Kanno 第45回日本免疫学
 会学術集会 Okinawa convention Center 宜野湾市 沖縄 2016/12/5-7 国内
11. 造血幹細胞の低線量被曝に対する分子応答の解析 (口頭) 大野芳典、鈴木—竹立恭子、山藤
 幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、大坪素秋、仲一仁、安永晋一郎、瀧原義宏 第39回日
 本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 横浜市 2016/11/30-12/2 国内
12. Molecular mechanisms of Low-dose radiation effects on Hematopoietic stem cell (ポスター)
 Y.Ohono, K.Suzuki, M.yamafuji, Y.Guo, M.Kanno, N.Shirasu, K.Naka, S.Yasunaga and
 Y.Takahara 「放射線災害・医科学研究拠点」第1回原医研**国際シンポジウム**「Scientific
 Underpinning for Restoration from a Radiation Disaster」広島市 2017/2/21-22 国内
13. Identification of DAMPs molecules in mothers' milk of a cohort study on atopic dermatitis in
 breastfed infants: Mouse model and correlation with gut/skin ILCs. (口頭) Masamoto Kanno,
 Weng-Sheng Kong, Yun Guo, Fuqiang Chen, Zhichao Cao, Naoki Shimojyo, Tsutomu Masujima,
 Naohiro Tsuyama and Hiroko Inoue. International KTCC (Kyoto T Cell Conference)
 Shiran-kaikan Kyoto 13-17 Mar 2017/3/13-17 国内
14. A role of the Ubiquitin-modifying enzyme A20 in regulatory T cells. (ポスター) Yun Guo,
 Fuqiang Chen, Weng-Sheng Kong, Hiroaki Honda and Masamoto Kanno International KTCC
 (Kyoto T Cell Conference) Shiran-kaikan Kyoto 13-17 Mar 2017/3/13-17 国内
15. Shoji H, Kato K, Yoshimoto S, Kakizaki F, Furuta K, Onidani K, Miura N, **Honda K**. Next
 generation sequencing of circulating tumor cells isolated from peripheral blood of patients with
 head and neck, or gastric cancer. European Society Molecular Organization Congress 2017 Oct
 7th – 11th. Denmark Copenhagen (poster presentation)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 血球系細胞の観察について、菅野雅元 免疫ふしぎ未来 2016、東京科学未来館 2016/8/7 国
 内

(4) 特許出願