

平成 29 年 5 月 29 日

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) 未来医療を実現する医療機器・システム研究開発事業
(英語) Development of Medical Devices and Systems for Advanced Medical Services

研究開発課題名：(日本語) 生体多光子励起イメージング技術を利用した新規低侵襲・高解像度がん診断装置の開発
(英語) Development of novel cancer diagnostic device with less-invasiveness and high resolution using intravital multiphoton excitation imaging technique

研究開発担当者 (日本語) 大学院医学系研究科 教授 石井優
所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Medicine, Osaka University, Professor. Masaru Ishii.

分担研究 (日本語) ヒトがん細胞・組織の観察に適した光学観察機器の開発
開発課題名：(英語) Development of optical observation equipment for human cancer cells and tissues

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

研究開発分担者 (日本語) 大学院工学研究科 教授 菊地和也
所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Engineering, Osaka University, Professor. Kazuya Kikuchi.

分担研究 (日本語) ヒトがん細胞・組織の標識用蛍光プローブの開発
開発課題名：(英語) Development of fluorescent probes for labeling human tumor cells and tissues

研究開発分担者 (日本語) 大学院医学系研究科 教授 森正樹
所属 役職 氏名：(英語) Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University. Professor. Masaki Mori.

研究開発分担者 (日本語) 大学院医学系研究科 教授 澤芳樹

所属 役職 氏名: (英語) Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, Professor. Yoshiki Sawa.

分担研究 (日本語) ヒトがん細胞の光学特性の解析と新規がん診断装置としての有用性の検証
開発課題名: (英語) Analysis of optical properties of human cancer cells and verification of usefulness for cancer diagnosis.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(日本語)

本プロジェクトでは、多光子励起顕微鏡を元にした生体イメージング (IMP) をヒト生体組織に適用して、局所でのがん細胞の性状や浸潤・転移能を生検することなく低侵襲で評価する方法論を開発し、次世代の医療を実現するための新たな診断機器開発を行うことを目的としている。平成 28 年度は対象となるがん組織の光学特性に関する基礎データの収集をまず行った。森正樹教授 (大阪大学大学院医学系研究科・消化器外科学)、椛島健治教授 (京都大学大学院医学研究科・皮膚科学)、加藤聖子教授 (九州大学大学院医学研究院・婦人科学産科学)、大野真司センター長 (がん研有明病院・乳腺センター)、澤芳樹教授 (大阪大学大学院医学系研究科・心臓血管外科学) らのグループと共同研究体制を構築した。そのうえで各研究分担施設において倫理委員会の審査を完了し、その後可及的速やかに各施設での臨床研究により各種ヒトがん組織の試料を得て、IMP による組織の観察を行った。ヒトがん組織に対する IMP 観察系を開発するため、組織に対して染色処理を行わなくても IMP で観察することのできる自家蛍光や、IMP 観察に特徴的なシグナルである二次高調波発生 (Second Harmonic Generation) などの非線型光学現象を用いて画像データを取得した。また得られた IMP 画像は従来のヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin and Eosin; HE) 染色による病理組織標本との比較を行った。いずれのがん組織においても IMP 画像は従来の HE 染色標本と極めて類似した形態像を示し、各部位に特徴的な組織形態が認識できた。またいずれの組織でも、中間目標として設定した観察表面から深部 100 μm まで、1 細胞の形状観察が可能な解像度での観察が可能であり、IMP 画像はがん組織と非がん組織の識別に十分有効であることを証明できた。

がん細胞の標識用蛍光プローブの開発については、菊地和也教授 (大阪大学大学院工学研究科) のグループが多光子励起顕微鏡を用いた診断に利用できるような光安定性の評価を行った結果、プローブに用いる蛍光色素として carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) を選択した。そのうえで TAMRA を抗体に標識したがん細胞標識プローブを作製し、色素と抗体の濃度比の検討を行って、合成供給手法を確立した。さらに作成した蛍光標識プローブと担がんマウスモデルを用いて、多光子励起顕微鏡による生体イメージングを行った。

光学観察機器及び画像解析技術の開発については、清田泰次郎室長 (株式会社ニコン・マイクロスコープ・ソリューション事業部・ステムセル事業開発室) のグループが医療用対物レンズ試作品及び対物レンズ保護用アダプタの試作品を開発・作成し、これらを

用いて IMP 画像を取得した。また取得した IMP 画像に対して、がんと非がんとを分類するような画像解析のアルゴリズムの開発を行った。このアルゴリズムの開発については機械学習法による分類法と現在の病理診断アルゴリズムを参考にした分類法の 2 通りを用いて設計した。これまでに撮像した IMP 画像を用いて設計した診断アルゴリズムの検証を行ったところ、いずれのアルゴリズムにおいても、感度 90%以上、特異度 88%以上の高い精度でがんと非がんの分類が可能であった。

(English)

In this project, we aim for the development of new diagnostic instruments that make it possible to practice future medical care, by developing the methodology to evaluate properties of cancer cells in a minimally invasive manner without biopsy, using intravital multiphoton excitation (IMP) imaging technique. In FY2016, we first gathered basic data on optical properties of human cancer tissues. After the establishment of collaborative research system with Drs. Masaki Mori (Department of Gastroenterological Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine), Kenji Kabashima (Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine), Kiyoko Kato (Department of Gynecology and Obstetrics, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences), Shinji Ohno (Breast Oncology Center, Japanese Foundation for Cancer Research Cancer Institute Hospital) and Yoshiki Sawa (Department of Cardiovascular Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine), reviews by the Institutional Review Board (IRB) was held at each facility. After human cancerous and non-cancerous tissues were collected based on the clinical research approved by the IRB, the observation with IMP technique was performed. In order to develop the observation system using IMP technique for human organs, IMP images were obtained by autofluorescence and nonlinear optical phenomena such as second harmonic generation. Furthermore, we compared the IMP images with conventional pathological images with fixed and thin-sectioned specimens stained with hematoxylin and eosin (HE) dyes. IMP images are basically identical to conventional HE staining in all cancer tissues and we were able to recognize distinctive histological features by IMP images. It was possible to observe the area with a depth of 100 μm from surface, intermediate goal of this project, with high resolution possible to detect the morphology of each cell. These results indicated that it was very useful to use IMP images for the classification of cancerous and non-cancerous regions.

For the development of fluorescent probes that detect cancer cells, the research group of Dr. Kazuya Kikuchi (Osaka University Graduate School of Engineering) carried out the evaluation of the photostability of fluorescent dyes that could be used for the diagnosis using IMP imaging. They selected carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) for suitable fluorescent dye for the probe. They produced fluorescent probe of cancer cells by labeling the cancer cell specific antibody with TAMRA, and established the synthetic supply method after concentration ratio study of the dye and antibody. Moreover, they performed intravital imaging research with the fluorescent probe and cancer-bearing mouse model.

For the development of optical observation equipment and image analysis technology, the

research group of Yasujiro Kiyota (Manager of Stem Cell Business Development Section, NIKON Corporation) produced a prototype of medical objective lens as well as a prototype adapter for objective lens protection. They also tried to develop algorithms for IMP images that enabled classification of cancerous and non-cancerous regions. They designed the algorithms in two different ways; classification method by machine learning method and that with reference to current pathology diagnosis system. According to verification of the diagnostic algorithms using IMP images taken so far, both of these two algorithms showed high classification accuracy of cancerous and non-cancerous regions with sensitivity 90% and specificity 88% or more.

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 4 件、国際誌 10 件)

1. 菊田順一, 石井優. 免疫細胞の生体イメージング. 医学のあゆみ 2016, 257(6):727-731.
2. Maeda H, Kowada T, Kikuta J, Furuya M, Shirazaki M, Mizukami S, Ishii M*, Kikuchi K. Real-time intravital imaging of pH variation associated with cell osteoclast activity and motility using designed small molecular probe. Nat Chem Biol. 2016, 12(8):579-85.
3. Otani K, Naito Y, Sakaguchi Y, Seo Y, Takahashi Y, Kikuta J, Ogawa K, Ishii M. Cell-cycle-controlled radiation therapy was effective for treating a murine malignant melanoma cell line in vitro and in vivo. Sci Rep. 2016, 2;6:30689.
4. Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara I, Ishii M. Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction. Mol Cell Biol. 2016, 16;36(11):1610-20.
5. 水野紘樹, 石井優. 生体イメージング. 再生医療 2016, 15.3.259-276.
6. 水野紘樹, 石井優. 生体イメージングを用いたがん細胞の動態解析. Medical Imaging Technology. 2016, No. 2 p. 76-81.
7. 菊田順一, 石井優. 生体イメージング. 骨粗鬆症治療 2016, 15(1):59-63.
8. Ishii M. Immunology provides a great success for treating systemic autoimmune diseases - a perspective on immunopharmacology - IUPHAR Review X. Br J Pharmacol., in press.
9. Miyachi Y, Tsuchiya K, Komiya C, Shiba K, Shimazu N, Yamaguchi S, Deushi M, Osaka M, Inoue K, Sato Y, Matsumoto S, Kikuta J, Wake K, Yoshida M, Ishii M, Ogawa Y. Roles of cell-cell adhesion and contact in obesity-induced hepatic myeloid cell accumulation and glucose intolerance. Cell Rep. 2017, 18(11):2766-2779.
10. S. Mizukami, M. Kashibe, K. Matsumoto, Y. Hori, *K. Kikuchi, "Enzyme-triggered compound release using functionalized antimicrobial peptide derivatives", *Chem. Sci.* (2017). DOI: 10.1039/C6SC04435B
11. S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki, *K. Kikuchi, "Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-glycosylation in Intracellular Trafficking", *Nat. Chem. Biol.*, 12, 853-859 (2016) .DOI: 10.1038/nchembio.2156
12. S. Sotoma, J. Iimura, R. Igarashi, K.M. Hirose, H. Ohnishi, S. Mizukami, K. Kikuchi, T.K. Fujiwara, *M. Shirakawa, *H. Tochio, "Selective Labeling of Proteins on Living Cell Membranes Using

- Fluorescent Nanodiamond Probes”, *Nanomaterials*, 6, 56, 9p (2016). DOI: 10.3390/nano6040056
13. T. Wasin, K. Enomoto, T. Sakurai, V. Padalkar, H. Cheng, M. Tang, A. Horio, D., Sakamaki, M. Omichi, A. Saeki, K. Kikuchi, Y. Hori, A. Chiba, Y. Saito, T. Kamiya, M. Sugimoto, *S. Seki, “Fabrication of ‘Clickable’ Polyfluorene Nanowires with High Aspect Ratio as Biological Sensing Platforms”, *ACS Sensors*, 6, 766-774, (2016). DOI: 10.1021/acssensors.6b00070
 14. M. Minoshima, and *K. Kikuchi, “Photostable and Photoswitching Fluorescent Dyes for Super-resolution Imaging”, *J. Biol. Inorg. Chem.*, in press, (2017). DOI: 10.1007/s00775-016-1435-y

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 生体イメージングによる生物学的製剤の作用機序解明, 口頭, 石井優, 第 60 回日本リウマチ学会総会, 2016/4/22, 国内.
2. Intravital microscopy of bone and bone marrow, 口頭, Masaru Ishii, 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress, 2016/5/15, 国外.
3. In vivo bone imaging: opening a new era of bone and mineral research, 口頭, Masaru Ishii, The 4rd Seoul Symposium on Bone Health in conjunction with the 28th the Spring Scientific Congress of the Korean Society for Bone and Mineral Research, 2016/5/21, 国外.
4. Intravital imaging analysis of different macrophages, bone tissue maintaining osteoclasts and residential macrophages in adipose tissues, 口頭, 石井優, 第 68 回日本細胞生物学会, 2016/6/16, 国内.
5. Novel imaging techniques open a new era for revealing immune cell dynamics and inflammatory bone destruction, 口頭, 石井優, 3rd Diabetes Research Innovation Symposium 2016, 2016/7/9, 国内.
6. 蛍光生体イメージングによる生きた細胞動態の解析, 口頭, 石井優, 第 34 回日本ヒト細胞学会学術集会, 2016/7/16, 国内.
7. 蛍光生体イメージングによる生きた細胞動態の解析～新しいサイトメトリー技術として～, 口頭, 石井優, 第 26 回日本サイトメトリー学会学術集会, 2016/7/24, 国内.
8. 蛍光生体イメージングによる生きた細胞動態の解析, 口頭, 石井優, 第 24 回分子複合医薬研究会講演会, 2016/7/29, 国内.
9. pH 応答性蛍光プローブによる破骨細胞の骨吸収制御機構の解明, ポスター, 菊田順一, 菊地和也, 石井優, 第 2 回 Neo Vitamin D ワークショップ, 2016/8/26, 国内
10. 蛍光生体イメージングで解く細胞動態ネットワークの世界, 口頭, 石井優, 第 1 回神戸免疫感染症セミナー, 2016/9/6, 国内.
11. 蛍光生体イメージングで解く細胞動態ネットワークの世界, 口頭, 石井優, 関西再生医療産業コンソーシアム (KRIC) 第 4 回テーマ別勉強会, 2016/9/27, 国内.
12. Intravital multiphoton imaging revealing cellular dynamics in inflammation and bone destruction in vivo, 口頭, 石井優, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内.
13. Visualizing the anti-leukemia immunity in living bone marrow by intravital 2-photon microscopy. 口頭, 水野紘樹, 山下英里華, 石井優, 第 78 回 日本血液学会学術集会, 2016/10/14, 国内.
14. Dynamic analysis of activated hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow, 口頭, Takao Sudo, Hiroki Mizuno, Masaru Ishii. 第 78 回 日本血液学会学術集会, 2016/10/14, 国内.
15. 生体イメージングによる生命科学研究の新展開, 口頭, 石井優, 九州大学歯学研究院大学院特別講義, 2016/10/13, 国内.
16. Innovative/emerging imaging techniques: 4D imaging of cells. 口頭, 石井優, Imaging Excellence

- Summit III (Abbvie), 2016/10/22, 国内.
17. 蛍光生体イメージングによる破骨細胞の骨吸収制御機構の解明, 第3回六甲医学研究会, ポスター, 菊田順一, 菊地和也, 石井優, 2016/10/28, 国内
 18. 皮膚の生体イメージングによる1細胞動態解析, 第3回六甲医学研究会, ポスター, 粟生智香, 菊田順一, 石井優, 2016/10/28, 国内.
 19. 蛍光生体イメージングを用いた骨髄内での抗白血病免疫の動的解析, 第39回日本分子生物学会年会, 口頭, 水野紘樹, 山下英里華, 石井優, 2016/11/30, 国内.
 20. Control of dynamic behaviors of adipose tissue-resident macrophages: as a new line of therapy against metabolic diseases. 口頭, 石井優, 第45回日本免疫学会大会, 2016/12/6, 国内.
 21. Intravital multiphoton imaging revealing immune cell dynamics in inflammation and bone destruction in vivo. 口頭, 石井優, 第45回日本免疫学会大会, 2016/12/7, 国内.
 22. 最新の生体イメージング技術で解析する生きた細胞動態の世界, 口頭, 石井優, 第2回 DCDC, 2017/1/13, 国内.
 23. 蛍光生体イメージングで読み解く細胞競合現象, 口頭, 菊田順一, 吉岡真吾, 昆俊亮, 藤田恭之, 石井優, 新学術領域 細胞競合・ダイニングコード 合同若手ワークショップ, 2017/1/18
 24. 蛍光生体イメージングで解く細胞動態ネットワークの世界, 口頭, 石井優, 第17回 AKUA 学術集会, 2017/3/3, 国内.
 25. Vascular permeability in bone marrow microenvironment analyzed by intravital two-photon microscopy. 口頭, 菊田順一, 石井優, 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, 2017/3/17, 国内.
 26. K. Kikuchi, "Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity Using BODIPY Based Two Photon Excitation Probes", *The 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC VIII)*, Auckland, New Zealand, Dec 5-9 (2016).
 27. K. Kikuchi, "Intracellular Protein Labeling by Functional Probes with Tunable Chemical Switches", *Molecular Sensors & Molecular Logic Gate 2016*, Bath, U.K., Jul 24-28 (2016).
 28. K. Kikuchi, "Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity Using BODIPY Based Two Photon Excitation Probes", *ICPP-9, 9th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines*, Nanjing, China, Jul 3-8 (2016).
 29. 大腸癌幹細胞の抗癌剤抵抗性におけるリソソーム・オートファジー活性の役割の検討 原口直紹、高橋秀和、西村潤一、畑泰司、山本浩文、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹 第71回消化器外科学会学術集会 2016/7/14
 30. 大腸癌における低 ROS 発現細胞特異的マーカーの分離と細胞学的特性の解析 原口直紹、高橋秀和、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹 第72回日本大腸肛門病学会 2016/11/18
 31. 大腸癌における新規治療抵抗性マーカーの検索 原口直紹、北原知洋、竹田充伸、高橋秀和、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹 JDDW2016 2016/11/3
 32. 大腸癌幹細胞における Autophagy・Lysosome 活性の動態の解析 竹田充伸、原口直紹、高橋秀和、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹 第117回日本外科学会定期学術集会 2017/4/27
 33. 心臓の in vivo imaging について ポスター 松浦良平、澤芳樹 ニューオーリンズ 2016年

11月14日 米国心臓学会

34. 心臓の in vivo imaging について 口頭（優秀演題）松浦良平、澤芳樹 仙台国際会議場 2017年3月9日 日本再生医療学会

35. 心臓の in vivo imaging について ポスター 松浦良平、澤芳樹 金沢 2017年3月17日 日本循環器学会

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 該当なし

(4) 特許出願

該当なし