

令和元年6月18日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05912

研究課題名(和文)医療応用のための非線形分光・イメージング技術を基盤とした顕微鏡システムの開発

研究課題名(英文)Label-free imaging technique based on nonlinear optics in biological tissues for medical application

研究代表者

大嶋 佑介(OSHIMA, YUSUKE)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10586639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラマン分光分析や多光子励起イメージングなどの非線形光学効果を利用した生体の光学的解析の新規技術の創出を目的として、医療現場における治療・診断への応用を見据えた装置開発と生体試料の網羅解析を行った。その主な成果のひとつとして、「マラン分光法による骨粗鬆症モデルの骨質計測」に成功した。骨質変化に起因する骨折リスクの予測因子として、骨のミネラル基質中の炭酸塩/リン酸塩比、ミネラル/マトリックス比、およびマトリックス中のコラーゲンの比率の変化を解析したところ、骨のミネラル基質中の炭酸塩の含有量および石灰化度を表す値に変化を認めたことから、骨質計測の新しい手法として今後の応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は骨強度が低下する疾患であり、骨粗鬆症性の骨折では死亡リスクも増加する。これまで骨折リスク評価は、おもに骨密度計測によって行われてきたが、近年では骨密度が必ずしも骨強度と正の相関を示さず、骨密度だけでなく、骨質の低下が骨折リスクを増大させることが明らかになったが、骨質を計測し、骨折リスク評価を行う方法は確立されていないのが現状である。そこで本研究では、骨密度に加えて骨質の評価を行う新しい計測技術の開発とその臨床応用を目的として、骨の分子組成を非侵襲的に計測可能なラマン分光法に着目し、骨質計測に成功した。骨粗鬆症の病態を理解し、予防・診断および治療法の開発につながる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Optical imaging technology is a reliable tool for biomedical research filed and clinical diagnostics in various diseases. We developed and evaluated own microscopy system for biomedical applications in the field of orthopedic surgery. Osteoporosis is a major bone disease that connotes the risk of fragility fractures. Bone strength arises from both bone quantity and quality. Assessment of bone quality and bone quantity is important for prediction of fracture risk. Bone mineral density is used to determine the bone strength in the current diagnosis of osteoporosis. However, there is no practical method to measure chemical composition of bone tissue including hydroxyapatite and collagen non-invasively. Raman spectroscopy is a powerful technique to analyze chemical composition and material properties of bone matrix non-invasively. Here, we successfully obtained Raman spectral data of bone matrix to evaluate the bone quality in the osteoporosis model.

研究分野：医用光工学

キーワード：ラマン分光 骨粗鬆症 骨質 がん 無染色イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん、糖尿病や骨粗鬆症などの生活習慣病は依然として増加傾向にあり、新たな診断・治療法の開発が急務である。近年これらの疾患の多くにおいて、細胞のみならずその周辺の細胞外マトリクスや微小環境の異常が疾患の発症からがんの悪性化まで広く影響を与えることがわかってきた。しかし、細胞と細胞外マトリクスの相互作用、細胞外マトリクスの量的・質的变化を検出・評価できる手法はほとんど見当たらない。これまでに第2高調波発生(SHG)などの非線形光学効果を利用したイメージング技術や生体分子の振動状態に基づくラマン分光分析技術の開発・応用を行ってきたが、これらをさらに開発・高度化することによって、生体組織深部の細胞観察や細胞外マトリクスを構成するコラーゲンの量的・質的变化の検出・評価が可能になり、将来の組織・病理学診断法としての応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ラマン分光分析を基盤とする最先端の光学技術を融合した革新的顕微鏡システムを開発し、細胞のみならずこれまで着目されてこなかった細胞外マトリクスの病的変化を解析できる新しいコンセプトの医学・医療応用ツールを提案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨の分子組成を非侵襲的に計測できるラマン顕微鏡を用いて、骨粗鬆症モデルマウスの骨質の評価を試みた。マウスの片側坐骨神経切除を行い、従来法にて骨密度の測定、マイクロCTを用いて骨の微細構造の測定、ラマン顕微鏡を用いてラマンスペクトルの計測を行い、健康な骨との比較において、骨基質(マトリクス)の分子組成変化の解析を行った。

(2) 軟骨の損傷は自然治癒困難であり、軟骨基質(マトリクス)の変性メカニズム解明および再生軟骨評価のため、独自に開発したラマン顕微鏡を用いてマウス関節症モデルの軟骨組織の解析を行った。マウス変形性膝関節症(Osteoarthritis: OA)モデルの軟骨組織については市販の多光子励起顕微鏡を用いたSHGイメージングによる解析も同時に行い、病理組織学的所見との比較検討を行った。

(3) 生体組織をリアルタイムに可視化できる光イメージング技術として、外科領域におけるナビゲーション手術の実現を目指して、ラマン分光法・多光子励起蛍光顕微鏡を用いた、ラベルフリーでがんを可視化するための基礎実験を行った。ヒトがん細胞を移植した動物モデルを用いて、がん転移巣と原発巣におけるがん細胞とその周辺環境の分析を独自に構築したラマン分光システムを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 骨粗鬆症モデルでは、対照群との比較において、骨量減少に加えて、ハイドロキシアパタイトおよびコラーゲン架橋の質的な変化を示唆するラマン散乱強度の有意な変化を認めたことから、ラマン分光イメージングの実用化を目指した技術開発を進めている。

(2) マウス関節症モデルの軟骨組織および正常軟骨ラマンスペクトル測定の結果、OA軟骨では、正常軟骨と比較して、軟骨下骨由来のラマンピークの増加、およびコラーゲン由来のピークの明らかな減少が確認された。また、組織切片のSHGイメージングでは、軟骨基質のコラーゲンの分布および形態に顕著な変化を認めた。これらの結果から、非破壊的に軟骨組織の分子組成変化や無染色で軟骨組織のコラーゲンの形態を可視化することで、変形性関節症をはじめとする骨軟骨変性疾患における軟骨組織の質の評価へ応用できることが示された。

(3) 原発巣と転移巣において細胞外基質の分子組成に明らかな差を認めた。これらの結果に基づいて、ヒト検体を用いた解析を行った結果、ラマン分光法および多光子励起イメージングにより、がん細胞の特徴を明らかにすることに成功した。さらに、動物実験での結果をもとに、胃癌や大腸癌の摘出標本において、同一患者の正常組織の粘膜層および癌病変部のラマンスペクトルを解析し、癌組織に特徴的な情報を抽出し、早期診断や効果的な治療法の開発につなげていく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Kristen A. Engevik Hikaru Hanyu Andrea L. Matthis Tongli Zhang Mark R. Frey **Yusuke Oshima** Eitaro Aihara Marshall H. Montrose, “Trefol Factor 2 activation of CXCR4 requires calcium mobilization to drive epithelial repair in gastric organoids,” *The Journal of Physiology*, 597 (10) pp 2673–2690 (2019) 査読有 DOI: 10.1113/JP277259
2. Yasumitsu Ishimaru, ***Yusuke Oshima**, Yuuki Imai, Tadahiro Iimura, Sota Takanezawa, Kazunori Hino and Hiromasa Miura, “Raman Spectroscopic Analysis to Detect Reduced Bone Quality after Sciatic Neurectomy in Mice,” *Molecules*, 2018, 23(12), 3081 (2018) 査読有 DOI: 10.3390/molecules23123081
3. **Yusuke Oshima**, Yasumitsu Ishimaru, Hiroshi Kiyomatsu, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, “Evaluation of degenerative changes in articular cartilage of osteoarthritis by Raman

- spectroscopy,” Proceedings of SPIE 10497 (2018) 査読有 DOI: 10.1117/12.2291383
4. Shigehiro Koga, Yuji Watanabe, **Yusuke Oshima**, “Raman spectroscopic analysis for gastric and colorectal cancer in surgical treatment toward molecular-guided surgery,” Proceedings of SPIE 1047806 (2018) 査読有 DOI: 10.1117/12.2291435
 5. Yasumitsu Ishimaru, **Yusuke Oshima**, Yuuki Imai, Tadahiro Imura, Sota Takanezawa, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, “Detection of changes in bone quality of osteoporotic model induced by sciatic nerve resection by using Raman spectroscopy,” Proceedings of SPIE 1049722 (2018) 査読有 DOI: 10.1117/12.2291258
 6. Shintaro Yamaoka, ***Yusuke Oshima**, Hideki Horiuchi, Tadao Morino, Masayuki Hino, Hiromasa Miura and Tadanori Ogata, “Altered Gene Expression of RNF34 and PACAP Possibly Involved in Mechanism of Exercise-Induced Analgesia for Neuropathic Pain in Rats,” International Journal of Molecular Sciences, 18(9), 1962- (2017) 査読有 DOI: 10.3390/ijms18091962
 7. **Yusuke Oshima**, Mayu Akehi, Hiroshi Kiyomatsu, Hiromasa Miura, “Label-free characterization of articular cartilage in osteoarthritis model mice by Raman spectroscopy,” Proceedings of SPIE 10054 (2017) 査読有 DOI: 10.1117/12.2250673
 8. Shigehiro Koga, **Yusuke Oshima**, Mitsunori Sato, Kei Ishimaru, Motohira Yoshida, Yuji Yamamoto, Yusuke Matsuno, Yuji Watanabe, “Raman spectroscopy for cancer detection and characterization in metastasis models,” Proceedings of SPIE 10060 (2017) 査読有 DOI: 10.1117/12.2250748
 9. Shin Yamamoto, **Yusuke Oshima**, Takashi Saitou, Takao Watanabe, Teruki Miyake, Osamu Yoshida, Yoshio Tokumoto, Masanori Abe, Bunzo Matsuura, Yoichi Hiasa, Takeshi Imamura, “Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM),” Biochemistry and Biophysics Reports 8, 277–283 (2016) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.09.010
 10. Shuang Liu, Muhammad Novrizal Abdi Sahid, Erika Takemasa, Takeshi Kiyoi, Miyuki Kuno, **Yusuke Oshima**, Kazutaka Maeyama, “CRACM3 regulates the stability of non-excitatory exocytotic vesicle fusion pores in a Ca²⁺-independent manner via molecular interaction with syntaxin4,” Scientific Reports 6, 28133 (2016) 査読有 DOI: 10.1038/srep28133

〔学会発表〕(計 29 件)

1. **大嶋佑介**、清松悠、明比麻由、石丸泰光、日野和典、三浦裕正、「ラマン分光・非線形光学イメージングによる骨軟骨疾患の診断応用」レーザー学会学術講演会第 39 回年次大会、2019 年 1 月 13 日、東海大学高輪キャンパス(東京)一般講演
2. 小川雄大、**大嶋佑介**、平塚孝宏、赤木智徳、鈴木浩輔、柴田智隆、上田貴威、當寺ヶ盛学、白下英史、衛藤剛、白石憲男、猪股雅史「ラマン分光法を用いたヒルシュスプルング病における無神経節腸管の可視化」レーザー学会学術講演会第 39 回年次大会、2019 年 1 月 13 日、東海大学高輪キャンパス(東京)一般講演
3. 石丸泰光、**大嶋佑介**、今井祐記、飯村忠浩、高根沢聡太、日野和典、三浦裕正「ラマン顕微鏡を用いた糖尿病モデルマウスの骨質の計測」第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川)ポスター発表
4. **大嶋佑介**「癌診断・癌治療のための光イメージング技術最前線」第 9 回癌・炎症と抗酸化研究会ミニレクチャー, 2018 年 11 月 24 日、ホルトホール大分,(大分)招待講演

5. 石丸 泰光、**大嶋 佑介**、今井 祐記、飯村 忠浩、高根沢 聡太、日野 和典、三浦 裕正「ラマン顕微鏡を用いた糖尿病モデルマウスの骨質の計測」第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年 10 月 11-12 日、奈良春日野国際フォーラム（奈良）ポスター発表
6. **大嶋佑介**「消化器外科手術におけるラマン分光・非線形光学イメージング技術の実用化をめざして」第 3 期第 2 回一般社団法人レーザー学会「レーザーバイオ医療」技術専門委員会、2018 年 9 月 7 日、仙都会館（宮城）招待講演
7. **大嶋佑介**、古賀繁宏、渡部祐司「ラマン分光法・非線形光学による術中がんイメージング技術の開発」第 57 回日本生体医工学会大会、2018 年 6 月 21 日、札幌コンベンションセンター（北海道）一般講演
8. **Yusuke Oshima**, Yasumitsu Ishimaru, Hiroshi Kiyomatsu, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, “Evaluation of degenerative changes in articular cartilage of osteoarthritis by Raman spectroscopy,” SPIE Photonics West2018 BiOS, 27 January - 1 February 2018, San Francisco Moscone Center, San Francisco, CA 一般講演
9. Shigehiro Koga, Yuji Watanabe, **Yusuke Oshima**, “Raman spectroscopic analysis for gastric and colorectal cancer in surgical treatment toward molecular-guided surgery,” SPIE Photonics West2018 BiOS, 27 January - 1 February 2018, San Francisco Moscone Center, San Francisco, CA 一般講演
10. Yasumitsu Ishimaru, **Yusuke Oshima**, Yuuki Imai, Tadahiro Imura, Sota Takanezawa, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, “Detection of changes in bone quality of osteoporotic model induced by sciatic nerve resection by using Raman spectroscopy,” SPIE Photonics West2018 BiOS, 27 January - 1 February 2018, San Francisco Moscone Center, San Francisco, CA 一般講演
11. 國枝 俊秀, 出口 和樹, 前田 康大, **大嶋 佑介**, 佐藤 英俊 「高感度生体用 CARS 分光システムの開発：高出力化と安定化」レーザー学会学術講演会第 38 回年次大会、2018 年 1 月 24～26 日、京都市勧業館みやこめっせ（京都）一般講演
12. 石丸 泰光、**大嶋 佑介**、今井 祐記、飯村 忠浩、高根沢 聡太、日野 和典、三浦 裕正「ラマン顕微鏡を用いた骨粗鬆症モデルマウスの骨質の計測」第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年 10 月 26-27 日、沖縄コンベンションセンター（沖縄）ポスター発表
13. **大嶋佑介**、石丸泰光、三浦裕正、今井祐記、飯村忠浩「ラマン分光・イメージングによる骨粗鬆症モデルの骨質評価」第 37 回日本骨形態計測学会シンポジウム、2017 年 6 月 23 日、大阪国際会議場（大阪）招待講演
14. 橋本真奈、長岡 紀幸、**大嶋 佑介**、飯村 忠浩、原 徹、上岡 寛「直行配置型 FIB-SEM でみる、骨細胞ネットワーク形成とコラーゲン細線維構築の関与」第 37 回日本骨形態計測学会シンポジウム、2017 年 6 月 23 日、大阪国際会議場（大阪）招待講演
15. **Yusuke Oshima**, Mayu Akehi, Yasumitsu Ishimaru, Hiroshi Kiyomatsu, Hiromasa Miura, Tadahiro Imura, Yuuki Imai, “Development of Raman spectroscopic technique for bone and cartilage tissue” 日本分光学会シンポジウム「ラマン分光のバイオ応用展開 (International symposium on Raman spectroscopy for biomedical applications)」2017 年 5 月 24 日 早稲田大学西早稲田キャンパス（東京）ポスター発表
16. **Yusuke Oshima**, Mayu Akehi, Hiroshi Kiyomatsu, Hiromasa Miura, “Label-free characterization of degenerative changes in articular cartilage by Raman spectroscopy,” Biomedical Imaging and Sensing Conference, April 18-21, 2017 Pacifico Yokohama, Japan 一般講演

17. Yasumitsu Ishimaru, **Yusuke Oshima**, Yuuki Imai, Tadahiro Iimura, Sota Takanezawa, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, “Evaluation of bone quality in osteoporosis model mice by Raman spectroscopy” Biomedical Imaging and Sensing Conference, April 18-21, 2017 Pacifico Yokohama, Japan ポスター発表
18. 上岡 寛、橋本 真奈、長岡 紀幸、飯村 忠浩、**大嶋 佑介**、原 徹、「FIB-SEM で探るコラーゲン細線維の集束化と骨細胞ネットワーク形成の関連について」第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム 2017/3/28-30 (28) 長崎大学坂本キャンパス(長崎)招待講演
19. **Yusuke Oshima**, Mayu Akehi, Hiroshi Kiyomatsu, Hiromasa Miura, “Label-free characterization of articular cartilage in osteoarthritis model mice by Raman spectroscopy,” SPIE Photonics West2017 BiOS, 28 January - 2 February 2017, San Francisco Moscone Center, San Francisco, CA 一般講演
20. Shigehiro Koga, **Yusuke Oshima**, Mitsunori Sato, Kei Ishimaru, Motohira Yoshida, Yuji Yamamoto, Yusuke Matsuno, Yuji Watanabe, “Raman spectroscopy for cancer detection and characterization in metastasis models” SPIE Photonics West2017 BiOS (*Invited Paper*), 28 January - 2 February 2017, San Francisco Moscone Center, San Francisco, CA 招待講演
21. **Yusuke Oshima**, Mayu Akehi, Yasumitsu Ishimaru, Hiroshi Kiyomatsu, Yuuki Imai, Tadahiro Iimura, Hiromasa Miura, “Changes in chemical composition of bone and cartilage matrix in animal disease models detected by Raman spectroscopy” Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016/12/6 Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan 招待講演
22. Yasumitsu Ishimaru, **Yusuke Oshima**, Tadahiro Iimura, Yuki Imai, Sota Takanezawa, Kazunori Hino, Hiromasa Miura “Evaluation of bone quality in osteoporosis model mice by Raman spectroscopy” Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016/12/6 Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan ポスター発表
23. 石丸 泰光、**大嶋 佑介**、飯村 忠浩、今井 祐記、高根沢 聡太、日野 和典、三浦 裕正、「ラマン顕微鏡を用いた坐骨神経切除マウスの骨質の計測」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30-12 月 2 日(12/2) パシフィコ横浜(神奈川)ポスター発表
24. **大嶋佑介**、明比麻由、清松悠、三浦裕正、「変形性関節症モデルマウスを用いた関節軟骨の変性過程のラマンスペクトル解析」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30-12 月 2 日(11/30) パシフィコ横浜(神奈川)ポスター
25. **大嶋佑介**、石丸泰光、明比麻由、清松悠、飯村忠浩、今井祐記、日野和典、三浦裕正、「ラマン分光法による骨・軟骨疾患モデルの基礎的検討と診断応用」第 43 回日本臨床バイオメカニクス学会、2016 年 10 月 8-9 日(10 月 8 日)北海道立道民活動センター かでる 2・7(北海道)一般講演
26. 上岡 寛、橋本 真奈、長岡 紀幸、飯村 忠浩、**大嶋 佑介**、原 徹、「FIB-SEM で探る骨形成-コラーゲン細線維の集束化と骨細胞ネットワーク形成の関連について-」第 43 回日本臨床バイオメカニクス学会、2016 年 10 月 8-9 日(10 月 8 日)北海道立道民活動センター かでる 2・7(北海道)招待講演
27. 橋本真奈、長岡紀幸、飯村忠浩、**大嶋佑介**、原徹、上岡寛「骨細胞ネットワーク形成に与えるコラーゲン線維集束化の関与」第 58 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム、8 月 24 日~26 日(8/24) 札幌コンベンションセンター(北海道)口頭発表

28. Toshihiro Imada, Shigeru Nakamura, Ryuji Hisamura, **Yusuke Oshima**, Tomomi Nemoto, and Kazuo Tsubota “In vivo imaging of Ca²⁺ dynamics in lacrimal gland of Yellow Cameleon-Nano transgenic mice.”, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2016, May 5, 2016, The Washington State Convention Center, Seattle (USA) ポスター発表

29. 古賀繁宏, **大嶋佑介**, 審良太郎, 吉田素平, 石丸 啓, 山本祐司, 松本紘典, 渡部祐司, 今村健志「2光子励起蛍光顕微鏡を用いたがん転移モデルの in vivo イメージング」第71回日本消化器外科学会、2016年7月15日、あわぎんホール(徳島)口頭発表

〔図書〕(計3件)

1. **大嶋佑介**, 佐川倫子, 平塚孝宏, 衛藤剛, 猪股雅史「多光子励起顕微鏡の進歩と医学応用」医療と生物学に貢献する光計測技術特集号「レーザー研究」第47巻2号89-93ページ, 一般社団法人レーザー学会(2019)
2. **大嶋佑介**「共焦点レーザー顕微鏡と多光子励起顕微鏡」Clinical Neuroscience 中外医学社、36巻8号898-902ページ(2018)
3. **大嶋佑介**「多光子励起顕微鏡を用いたがん転移モデルの in vivo イメージング」光アライアンス, 日本工業出版, 7月号26-29ページ(2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 観察装置

発明者: **大嶋佑介**、鈴木智

権利者: 株式会社イントロテック、愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願2017-085581

出願年: 2017年

国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 観察用具及び観察装置,

発明者: **大嶋佑介**, 根本知己, 鈴木智

権利者: 株式会社イントロテック、愛媛大学

種類: 特許

番号: 特許第6153191号

取得年: 2017年

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 石丸 泰光

ローマ字氏名: ISHIMARU Yasumitsu

研究協力者氏名: 清松 悠

ローマ字氏名: KIYOMATSU Hiroshi

研究協力者氏名: 古賀 繁宏

ローマ字氏名: KOGA Shigehiro

研究協力者氏名: 小川 雄大

ローマ字氏名: OGAWA Katsuhiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。