

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H05952

研究課題名(和文)革新的イメージング技術とがんモデルメダカを駆使したがん転移研究

研究課題名(英文)Cancer metastasis research that makes full use of innovative imaging technology and medaka as a model of cancer

研究代表者

今村 健志 (Imamura, Takeshi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70264421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 113,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん転移メカニズム解析と創薬のために、革新的生体イメージング技術とがんモデルメダカを開発した。機器開発として、ベッセルビームを用いて、広視野の均一化した新規2光子励起光シート型顕微鏡の開発に成功した。実際に、メダカ稚魚の全身の高解像イメージングおよび長期間の生態観察に成功した。画像解析については、テクスチャ画像情報を用いた定量形態計測および制御系ソフトウェアを改良した3Dイメージングに成功した。さらに、生体深部観察のため、ナノシートを応用した界面の屈折率差のミスマッチ改善に成功した。また、メダカを免疫不全化し、移植したヒトがん細胞の動態とがん微小環境を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体イメージング法は未だ開発途上の研究手法で、さまざまな問題点が蓄積している。本研究では、新規光源を用いて革新的蛍光イメージングシステムを開発し、さらにイメージング用メダカがんモデルを樹立し、両者を融合して生きているメダカの中でがん細胞の動態と機能をイメージングすることに成功した。当該技術は、これまでの蛍光顕微鏡システムでは観察が困難であった生体全体の深部で起こるさまざまな生命現象を外部から細胞または分子レベルで捉えて画像化して解析することを可能にする手法であり、生命現象を時空間的に理解するために大きく貢献することが期待され、がんの骨転移研究のみならず広く生命科学研究分野に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：We have developed an innovative bioimaging technology and cancer model medaka for analysis of cancer metastasis mechanism and drug discovery. As an instrument development, we succeeded in developing a new two-photon excitation optical sheet microscope with a uniform wide field of view using a Bessel beam illumination. In fact, we succeeded in high-resolution imaging of the whole body of medaka fry and long-term ecological observation. For image analysis, we succeeded in quantitative morphology measurement using texture image information and 3D imaging with improved control software. Furthermore, for deep observation of the living body, we succeeded in improving the mismatch of the refractive index difference at the interface by applying nanosheets. In addition, we were able to analyze the dynamics of cells and the cancer microenvironment of human cancer cells transplanted into immunodeficient medaka.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：バイオテクノロジー 癌 遺伝子 タンパク質 細胞・組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん転移は治療抵抗性であり、患者の生活の質(Quality of life; QOL)を著しく低下させる。そのため、現代のがん治療においては、転移の防止と治療の進歩が急務になっている。がん転移は、がん細胞が原発巣の局所に止まらず、遠隔臓器に移動して増殖する全身性のダイナミックな病態である。そのために、がん転移のメカニズムの解明および新たな治療法の開発、創薬のためには、培養細胞を用いた *in vitro* 解析だけでなく、生きている動物の個体全体を高時間・空間分解能で解析する *in vivo* の新しい技術の開発が望まれている。申請者は JST「光展開」(平成 26 年度終了 1 年延長)で「新規補償光学型長波長 2 光子励起顕微鏡」を開発し、さらに、新学術領域研究「蛍光生体イメージ」(平成 26 年度終了)において、蛍光実体顕微鏡をベースに、マウスの全体像から細胞レベルまでの観察を高空間分解能で可能な新規生体蛍光観察システムを開発するなど、*in vivo* 対応顕微鏡開発を進めてきた。しかし、がん転移の研究に必要な、生きているモデル動物の個体全体のイメージングに関しては、蛍光の特性に依存するさまざまな障害のために成功していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、がん転移メカニズム解析と創薬応用のために、新規がんモデルメダカと革新的生体イメージング技術を開発する。ヒトがん細胞の移植が可能で、全身の高解像度蛍光イメージングに適したメダカがんモデルを開発し、さらにメダカ個体を丸ごと蛍光観察可能な革新的生体イメージング技術を開発することで、生きているモデル動物の個体全体のイメージングを実現し、がん転移のメカニズムの解明とその抑制・治療のために、メダカに移植したヒトがん細胞のがん微小環境のイメージング・解析を行う。

具体的には、新たながんモデル動物として、薬剤投与による免疫不全化と遺伝子改変による免疫不全化の 2 種類の方法を用いて、ヒトがん細胞の移植が可能な免疫不全メダカを樹立する。革新的生体イメージング機器開発として、光源を巧みに改変し、広視野の均一化した新規 2 光子励起光シート型顕微鏡の開発を行い、メダカ全身の高解像イメージングおよび長期間の生態観察を実現する。画像解析については、定量形態計測およびソフトウェア改良による新たな 3D イメージングを実現する。さらに、共焦点レーザー顕微鏡と 2 光子励起顕微鏡に関しても、サンプルヘナノシートを応用し、界面の屈折率差のミスマッチ改善による生体深部観察を実現する。

3. 研究の方法

ヒトがん細胞の移植が可能な新規がんモデルメダカを開発し、光源を巧みに改変した広視野の均一化した新規 2 光子励起光シート型顕微鏡の開発とメダカ全身の生体イメージングが可能な革新的生体イメージング技術の開発を行い、がん転移メカニズム解析と創薬スクリーニングに応用する研究課題を進める。

免疫不全メダカの樹立に関しては、薬剤投与による免疫不全化と遺伝子改変による免疫不全化の 2 種類の方法を行う。

新規 2 光子励起光シート型顕微鏡の開発として、レンズや光学系に工夫を凝らした光シート型顕微鏡の開発を目指す。特に、ベッセルビームによってより広視野の均一化した励起シート光を実現する光シート型顕微鏡を開発する。さらに、制御系ソフトウェアを改良し、3D + タイムラプスの 4D イメージングを実現化する。

また、Z 軸の空間分解能を改善し、生体深部での蛍光観察を可能にする走査型多光子励起顕微鏡の開発を進める。液晶アクティブ光学素子に加え、サンプルヘナノシートを応用し、共焦点レーザー顕微鏡と 2 光子励起顕微鏡に関しても、界面の屈折率差のミスマッチ改善による生体深部観察を実現する。さらに、光シート顕微鏡の特性を活かす透明化技術の開発・応用を進める。画像解析については、領域内の共同研究を進める。

4. 研究成果

がん転移メカニズム解析と創薬応用のために、ヒトがん細胞の移植が可能で、全身の高解像度蛍光イメージングに適した新規がんモデルメダカを樹立し、さらにメダカ個体を丸ごと蛍光観察可能な革新的生体イメージング技術を開発し、がん転移のメカニズムの解明とその抑制・治療のために、メダカ全身の生体イメージング、メダカに移植したヒトがん細胞とがん微小環境のイメージング・解析に成功した。

免疫不全メダカの樹立に関しては、薬剤投与による免疫不全化と遺伝子改変による免疫不全化の 2 種類の方法を行った。デキサメタゾン等数種類の薬剤を用いた免疫不全化によって、ヒトがん細胞の移植が可能であることを確認したが、易感染性などの問題が明らかになった。一方

で、遺伝子改変については、DNA 依存性プロテインキナーゼである Prkdc 遺伝子 (SCID) と IL-2 受容体 鎖遺伝子 (XSCID) のノックアウトメダカを作成し、ウロコの移植によってある程度の免疫不全化は確認できたが、ヒトがん細胞の移植の生着効率は低かった。さらにダブルノックアウトメダカを作製しても生着効率が上がらなかったため、以後は薬剤投与による免疫不全化を進めた。

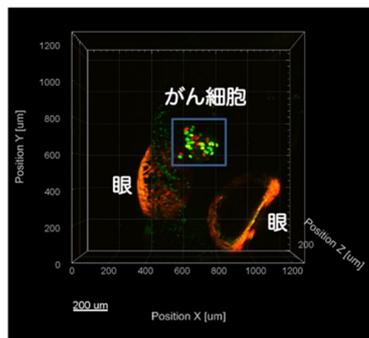


図1 免疫不全メダカの脳内に移植したヒトがん細胞の細胞周期 (赤色: G1期、緑色: S/G2/M期) の生体イメージング

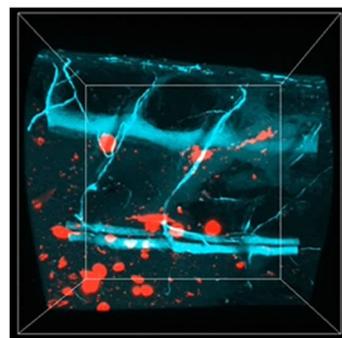


図2 免疫不全メダカの腹部に移植したヒトがん細胞 (赤色) が血管 (青色) に侵入する様子の生体イメージング

薬剤投与による免疫不全化に関して、デキサメタゾ

ンの投与量の検討と飼育方法の工夫を進め、最終的には、ヒトがん細胞を移植し、がん細胞の動態や細胞周期のような機能、がんと血管のようながん微小環境との相互関係をイメージング・解析することができた。具体的には、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) 遺伝子を導入したヒト線維肉腫 HT1080 細胞を免疫不全メダカの脳内に移植し、その動態と細胞周期をイメージングして解析した (図1)。また DsRed 遺伝子を導入した HT1080 細胞を免疫不全メダカの腹腔内に移植し、蛍光血管造影剤 AngioSense で血管造影を行い、ヒトがん細胞が血管に侵入する様子をイメージングすることに成功した (図2)。

新規2光子励起光シート型顕微鏡の開発に関しては、光毒性の少ない2光子励起光源において、アキシコンレンズによるベッセルビームを導入することで、従来のガウシアンビームに比べ、細長いビームを形成することに成功し、1.5 mmの幅の均一なシートを実現し、より広視野の均一化した2光子励起光シート型顕微鏡の開発し、メダカ全身の生体イメージングに成功した。具体的には、開発した新規2光子励起光シート型顕微鏡を用いて、FLT4 プロモーター支配下で EGFP が発現してリンパ管がイメージングできる遺伝子改変メダカに dextran-conjugated rhodamine を注射して、メダカ全身で血管とリンパ管を同時に生体イメージングすることに成功した (図3)。

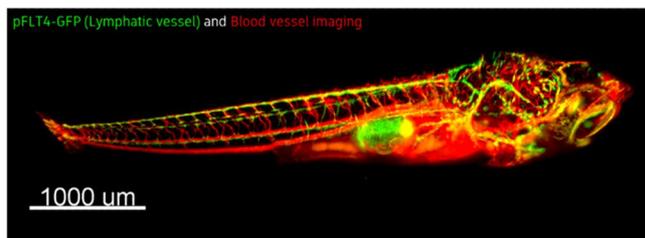


図3 メダカ全身の生体蛍光イメージング
緑はリンパ管、赤は血管を表す。

また、新規2光子励起光シート型顕微鏡を用いたメダカの脳全体の生体イメージングにおいては、神経軸索の詳細を描出する解像度を得ることができた。さらに、制御系ソフトウェアを改良し、1.5 mm³でタイムラプス 3D イメージング (4D イメージング) を実現化し、メダカ胚においてカルシウムオシレーションを 4D イメージングすることに成功した。

液晶アクティブ光学素子を駆使した Z 軸の空間分解能を改善した走査型多光子励起顕微鏡の開発については、PSF (point spread function) の改善率が低かったため、サンプル表面にナノシートを適用し、界面の屈折率差のミスマッチ改善による生体深部観察を実現した。

さらに、光シート顕微鏡の特性を活かす透明化技術については、透明化試薬 CUBIC に加え、LUCID の応用を行った。画像解析については、領域内の共同研究を進め、テクスチャ画像情報を用いた定量形態計測に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Takanezawa Sota, Saitou Takashi, Imamura Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Wide field light-sheet microscopy with lens-axicon controlled two-photon Bessel beam illumination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23249-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 -
1. 著者名 Watanabe Takao, Ninomiya Hiroko, Saitou Takashi, Takanezawa Sota, Yamamoto Shin, Imai Yusuke, Yoshida Osamu, Kawakami Ryosuke, Hirooka Masashi, Abe Masanori, Imamura Takeshi, Hiasa Yoichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Therapeutic effects of the PKR inhibitor C16 suppressing tumor proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61579-x	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 -
1. 著者名 Ieda Takeshi, Tazawa Hiroshi, Okabayashi Hiroki, Yano Shuya, Shigeyasu Kunitoshi, Kuroda Shinji, Ohara Toshiaki, Noma Kazuhiro, Kishimoto Hiroyuki, Nishizaki Masahiko, Kagawa Shunsuke, Shirakawa Yasuhiro, Saitou Takashi, Imamura Takeshi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment? colorectal cancer network	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52816-z	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 -
1. 著者名 Inoue Masatoshi, Takeuchi Atsuya, Manita Satoshi et al.	4. 巻 177
2. 論文標題 Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1360. e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Saitou Takashi, Takanezawa Sota, Ninomiya Hiroko, Watanabe Takao, Yamamoto Shin, Hiasa Yoichi, Imamura Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Tissue Intrinsic Fluorescence Spectra-Based Digital Pathology of Liver Fibrosis by Marker-Controlled Segmentation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2018.00350	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 -

1. 著者名 Grzybowski Marek, Taki Masayasu, Senda Kieko, Sato Yoshikatsu, Ariyoshi Tetsuro, Okada Yasushi, Kawakami Ryosuke, Imamura Takeshi, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 57
2. 論文標題 A Highly Photostable Near-Infrared Labeling Agent Based on a Phospha-rhodamine for Long-Term and Deep Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 10137 ~ 10141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201804731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ida-Yonemochi Hiroko, Morita Wataru, Sugiura Nobuo, Kawakami Ryosuke, Morioka Yuki, Takeuchi Yuka, Sato Toshiya, Shibata Shunichi, Watanabe Hideto, Imamura Takeshi, Igarashi Michihiro, Ohshima Hayato, Takeuchi Kosei	4. 巻 8
2. 論文標題 Craniofacial abnormality with skeletal dysplasia in mice lacking chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35412-5	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 -

1. 著者名 Nakai Yuta, Okamoto Kazuo, Terashima Asuka, Ehata Shogo, Nishida Jun, Imamura Takeshi, Ono Takashi, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Efficacy of an orally active small-molecule inhibitor of RANKL in bone metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41413-018-0036-5	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 -

1. 著者名 Watanabe Takao, Imamura Takeshi, Hiasa Yoichi	4. 巻 109
2. 論文標題 Roles of protein kinase R in cancer: Potential as a therapeutic target	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 919 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13551	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 -

1. 著者名 Imamura Takeshi, Saitou Takashi, Kawakami Ryosuke	4. 巻 109
2. 論文標題 In vivo optical imaging of cancer cell function and tumor microenvironment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 912 ~ 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13544	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 -

1. 著者名 Imamura Takeshi, Saitou Takashi, Takanezawa Sota, Kawakami Ryosuke	4. 巻 1
2. 論文標題 In Vivo Imaging of Lymphatic Vessels and Lymph Nodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lymph Node Metastasis in Gastrointestinal Cancer	6. 最初と最後の頁 159 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-4699-5_7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitou T, Kiyomatsu H, Imamura T.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Quantitative Morphometry for Osteochondral Tissues Using Second Harmonic Generation Microscopy and Image Texture Information.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21005-9.	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 -

1. 著者名 Yamamoto S, Oshima Y, Saitou T, Watanabe T, Miyake T, Yoshida O, Tokumoto Y, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Imamura T	4. 巻 8
2. 論文標題 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).	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 277-283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2016.09.010	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 -

1. 著者名 Hikita A, Imura T, Oshima Y, Saitou T, Yamamoto S, Imamura T	4. 巻 76
2. 論文標題 Analyses of bone modeling and remodeling using in vitro reconstitution system with two-photon microscopy	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 5-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2015.02.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiuchi H, Oshima Y, Ogata T, Morino T, Matsuda S, Miura H, Imamura T	4. 巻 16(7)
2. 論文標題 Evaluation of Injured Axons Using Two-Photon Excited Fluorescence Microscopy after Spinal Cord Contusion Injury in YFP-H Line Mice	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15785-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms160715785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 13件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 バイオフィotonics技術開発とがん研究応用
3. 学会等名 第73回日本顕微鏡学会学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 がん細胞とリンパ管の生体内蛍光イメージング
3. 学会等名 第42回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 革新的バイオフォトニクス開発と次世代創薬応用
3. 学会等名 第29回新薬創製談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 革新的バイオイメージング技術と次世代バイオマテリアル研究
3. 学会等名 日本金属学会2018秋期講演大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 がん研究におけるバイオイメージング技術の進歩
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Imamura
2. 発表標題 Development of optical imaging techniques in BMP signaling and cancer research
3. 学会等名 BMP Conference 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 がん三次元培養のための革新的イメージング技術開発と応用
3. 学会等名 第2回がん三次元培養研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 革新的バイオフォトンクス技術開発と次世代医学研究
3. 学会等名 東京医科歯科大学第580回難研セミナー・第153回難治疾患共同研究拠点セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 革新的蛍光イメージング技術が拓く次世代病理学
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Imamura
2. 発表標題 Development and application of advanced intravital imaging technique in oncology and lymphology
3. 学会等名 The 40th Annual meeting of the Japanese Society of Lymphology (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takeshi Imamura
2. 発表標題 In vivo cancer imaging by advanced multi-photon laser excitation microscopy
3. 学会等名 The 41st Naito Conference on Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 脳神経外科手術応用を目指した革新的バイオイメージング技術開発
3. 学会等名 第16回日本術中画像情報学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 骨・軟骨イメージングのための顕微鏡開発
3. 学会等名 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 先端的バイオイメージング技術の薬理学応用
3. 学会等名 第69回日本薬理学会西南部会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	出口 友則 (Deguchi Tomonori) (30415715)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	川上 良介 (Kawakami Ryosuke) (40508818)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301)	
研究分担者	齋藤 卓 (Saitou Takashi) (60588705)	愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員) (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 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
---------	---------