



2018年4月20日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
国立研究開発法人 科学技術振興機構

表面増強ラマンによる非標識・無染色でのがん代謝の可視化に成功 ーバイオマーカー分子を指標とした自動病理診断の実現へー

慶應義塾大学の末松誠客員教授（本務：国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 理事長）、同医学部医化学教室の山本雄広専任講師らの研究グループは、富士フィルム株式会社先端コア技術研究所の塩田芽実研究員、納谷昌之研究主幹らとの共同研究により、表面増強ラマンイメージング（Surface-enhanced Raman Spectroscopy imaging：以下、SERS imaging）を用いて、マウス凍結病理組織切片におけるがん部と非がん部の代謝プロファイリング解析を行い、両者の違いを統計的に分析することによって、がんの所在を非標識・無染色で自動的に可視化することに成功しました。

SERS imaging は金のナノ粒子をランダムに敷き詰めた特殊基板に近赤外レーザー光を照射することによって発生する近接場光（強力な電磁場の増強スポット）を利用し、基板上の生体試料に含まれる各種の代謝物の原子間振動を反映するラマン散乱光（注1）を増強して、代謝物の2次元画像として検出する先端技術です。

がん細胞には細胞増殖や細胞死の制御に関わる硫黄原子を含有する機能分子が豊富に含まれており、それらは金ナノ粒子と相互作用することによって固有の原子間振動を反映したラマン散乱光を発生させます。ラマン散乱光を画像化することで生体試料の2次元上のどの位置に機能分子が存在するか可視化することができます。これまではがん細胞の形態や核の特徴に着目した組織染色により病理診断を実施されてきましたが、検体処理過程に生じる酸化などが正確な解析を困難にする原因でした。研究グループは、がん部と非がん部の SERS imaging を用いることによって非標識・無染色の凍結組織でがん部の検出を可能としました。

病理医の診断所見とラマン散乱光のプロファイリング所見のマッチングによる解析技術は、がんの質的自動病理診断の実現につながる道を開きました。

本研究成果は、2018年4月19日（木）19時（英国標準時 4月19日正午）に英国科学誌『Nature Communications』のオンライン速報版で公開されました。

1. 研究の背景と概要

がんは遺伝子変異によって、自らの生存に有利な各種の代謝物を生成し、周囲の非がん組織と異なる代謝特性を示します。また活発に周囲の正常組織から自らの生存に必要な代謝物

を収奪し増殖していることが、近年の研究で明らかにされてきました。そのような代謝物の中でもグルタチオン（注 2）やシステイン（注 3）、硫化水素などの硫黄を含む代謝物（含硫代謝物）は強力な抗酸化物質として、がん細胞の生存、増殖や薬剤耐性などに関与することが示唆されていますが、実態は明らかではありませんでした。

一方、がんの病理診断は主として染色や抗体による標識を施した組織試料を病理の専門家が光学顕微鏡で調べることによって行われます。生化学的な自動補助診断技術の開発は、病理医の業務の負担軽減につながるだけでなく、抗がん剤に対する耐性の有無や悪性度の判定など、がんの患者さんに資する「質的診断」に役立つ可能性があります。そこで本共同研究ではがん固有の多様でかつ多数の代謝物の分子情報を包括的に把握する方法として SERS imaging を利用することを検討しました。

2. 研究の内容と意義

SERS imaging は金のナノ粒子をランダムに敷き詰めた特殊基板に近赤外レーザー光を照射することによって発生する近接場光を利用し、代謝物の原子間振動を反映するラマン散乱光を増強することで、生体試料中の代謝物を 2 次元画像として検出する先端技術です。

本研究では、富士フイルム株式会社が金ナノ粒子の自己組織化を利用し、世界に先駆けて開発した SERS 基板【図 1：ソラマメ状の金ナノ粒子：Gold-nanofève (GNF) がランダムに配列した基板】を用い、数センチ角の病理組織中の代謝物について、発生するラマン散乱光を高感度・高解像度で画像化する技術を確立しました。

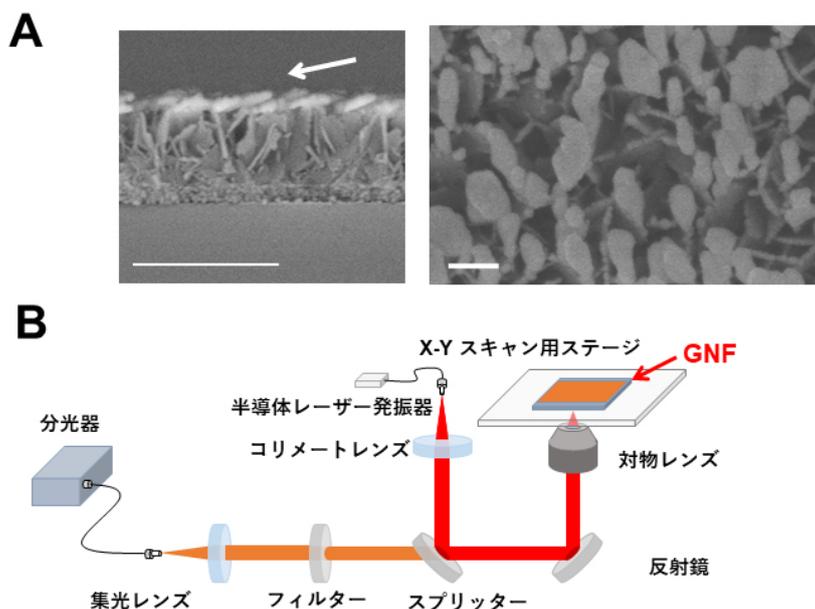


図 1 金ナノ粒子の造形技術により作られた GNF 基板 (A: 左が側面像、右が上面像) と GNF を用いた SERS imaging のシステム (B)。A の矢印は金を蒸着させた方向を示す。白く光っている部分が「そらまめ状」の金ナノ粒子であり、それを上から見た写真が右になる。A のバーは左が 500nm、右が 100nm。

この技術を用い、ヒト大腸がん細胞株を免疫不全マウスの脾臓に移植してできる異種移植肝転移モデルと、共同研究者である慶應義塾大学医学部先端医化学研究所の佐谷秀行教授らが開発した、Ink4a/Arf ノックアウトマウス由来の神経幹細胞に H-RasV12 遺伝子を導入後に移植して発生する同種神経膠芽腫モデルの、2 つの実験モデルで得られるラマン散乱光の

スペクトル上にあるピーク（以下、SERS 信号）を、がん部、非がん部で詳細に分析しました。これらのモデルのがん組織は実際のヒトの悪性腫瘍と同様の複雑な様相となっています。

異種移植大腸がんモデルのがん部を含む組織切片の SERS imaging を隣合った切片の質量分析イメージングのデータと照合することにより 298 cm^{-1} の SERS 信号がシステインから生成される還元型グルタチオン（GS）を、 978 cm^{-1} が同じくシステインから生成されるヒポタウリン（HT）を反映する SERS 信号であることを特定しました（図 2）。

画像上で行ったがんの診断所見（図 2 上段 がん部は暗い部分）と照らし合わせた結果、大腸がん肝転移モデルではがん部にグルタチオンが豊富に検出できる一方（図 2 中段）、ヒポタウリン（注 4）はむしろがんの外側の肝臓実質に存在することが分かりました（図 2 下段）。

この結果から、多数の代謝物から検出される原子間振動の、がん部と非がん部の特徴の違いに基づき、がんの所在を検出できる可能性が示されました。

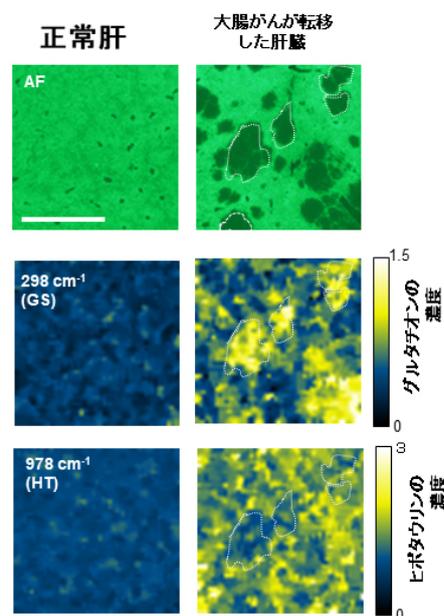


図 2 SERS imaging によるヒト大腸がん肝転移モデルにおけるグルタチオン (GS)、ヒポタウリン (HT) の組織内検出

AF: 自家蛍光像 バーは 1mm

そこで研究グループは、複数の代謝物の SERS 信号をがん部、非がん部で区別して統計的に分析し、それぞれの部位に特異的な SERS 信号を多数抽出しました。さらに、これらの特異的な信号をバイオマーカー・シグニチャーとして利用し、これを病理医によるがん部、非がん部の診断結果のセットと共に「教師データ」として SERS imaging を解析する画像処理技術を開発しました。この技術は、がん部と非がん部の境界判定が難しい神経膠芽腫（グリオブラストーマ）モデルにおいても、未知の検体のどこにがんが存在するかを自動的に抽出することができました（図 3 上段）。

また、このモデルのがん部で高いピークを示す化合物の同定を行ったところ、 485 cm^{-1} の SERS 信号に対応する活性硫黄であるポリスルフィドと、 726 cm^{-1} の SERS 信号に対応するヒポキサンチンやイノシン 1 リン酸（IMP）などのアデニン環含有代謝物が、神経膠芽腫のがん部に豊富に含まれることが明らかになりました（図 3 下段）。

この技術創出により、熟練した病理医が診断したがん部、非がん部における SERS 信号を「教師データ」として収集することが可能になり、未知の凍結組織切片を用いて非標識・未

染色で自動的にがん部を抽出することができる、自動診断支援システムへの展開の可能性が開かれました。

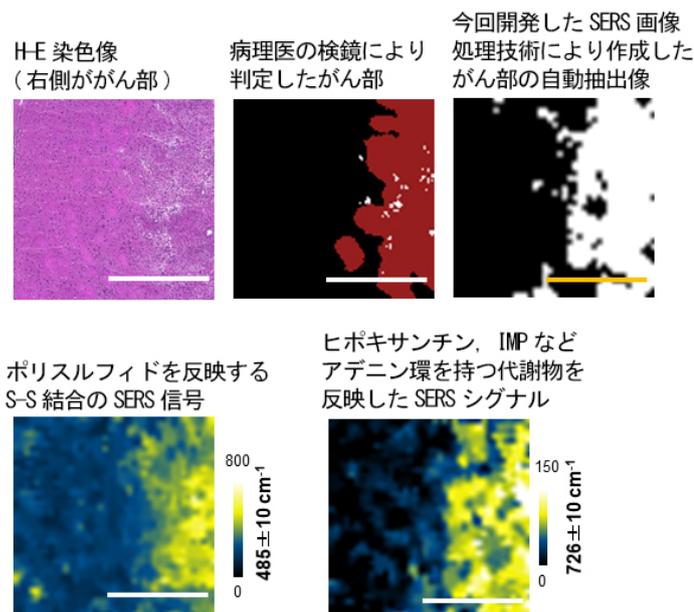


図3 マウス神経膠芽腫(グリオブラストーマ)モデルにおける SERS imaging とがん部自動抽出。病理医がヘマトキシリン・エオジン染色像(H-E 上段左)で検鏡して得られた「教師データ」で抽出したがん部(上段中央)の画像情報に基づき、がん部、非がん部に特異的な SERS シグナルを統計的に抽出し、がん部の自動抽出を行った(上段右)。がん部に顕著に認められる代謝物として活性硫黄種であるポリスルフィドとヒポキサンチン、イノシン 1 リン酸 (IMP) などに含まれるアデニン環含有代謝物が同定された。ポリスルフィドは強力なレーザーを用いる質量分析では分解するため検出できなかった。バーは上段が 2mm, 下段が 0.5mm。

3. 研究の意義・今後の展開

SERS imaging 技術は生体を構成する低分子化合物の全体像を捉えることのできる新しいメタボロミクス解析技術であり、生化学的なアプローチによる補助診断技術となる可能性があります。また、多数の検体を短時間かつ簡便に解析できるこの技術のがんの質的診断に応用することで、がんの術中迅速診断の自動化や境界領域の病変に対する補助診断として活用できる可能性があります。さらに本技術は、がんの代謝プロファイリングデータに基づく化学療法や放射線療法などの治療法の最適化にも資する可能性があり、今後の展開が期待されます。

4. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (ERATO) 末松ガスバイオロジープロジェクト (2009~2014、研究総括 末松誠：当時) および、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) 「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」研究開発領域 (研究開発総括：清水孝雄)^(注1) における研究開発課題「代謝システム制御分子の系統的探索による治療戦略創出と創薬展開」(研究開発代表者 加部泰明) により実施されました。

(注1) 本研究開発領域は、2015年4月の日本医療研究開発機構の発足に伴い、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) より移管されたものです。慶應義塾大学の末松誠客員教授は、AMED-CREST の研究費を受給していません。

5. 論文

英文タイトル : Gold-nanoparticle surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival

タイトル和訳 : 金ナノ粒子を利用した表面増強ラマンイメージングにより明らかにされた抗酸化物質ヒポタウリンを介したがんの生存戦略

著者名 : 塩田芽実、納谷昌之、山本雄広、菱木貴子、谷武晴、高橋裕之、久保亜紀子、小池大輔、伊藤真衣、大村光代、加部泰明、杉浦悠毅、平岡伸介、森川隆之、田久保圭誉、推名健太郎、長島秀明、オルテア サンペトリアン、永野修、佐谷秀行、山添昇吾、渡邊裕之、末松誠

掲載誌 : Nature Communications オンライン速報版

【用語解説】

- (注 1) ラマン散乱光 : インドの物理学者であるラマンにより発見された。光が物質に入射した際に入射光と異なる波長をもつ微弱な散乱光。
- (注 2) グルタチオン : 3つのアミノ酸からなる結合体。還元型と酸化型があり、還元型が多いとがん細胞が死にくくなる。
- (注 3) システイン : がん細胞は細胞外にあるシスチンを細胞表面にある CD44 という接着分子と複合体を形成することにより安定化する。システインは容易に酸化され、ジスルフィド結合を形成してシスチンとなる。シスチンの結合が加水分解すると 2 分子のシステインとなる。
- (注 4) ヒポタウリン : タウリンの生合成における中間体。がん細胞の酸化ストレスを軽減する役目の一端を担い、がん細胞の生存に必要な物質。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部医化学教室 専任講師
加部 泰明 (かべ やすあき)
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地
TEL : 03-5363-3752 FAX : 03-5363-3466
E-mail: ykabe@z3.keio.jp
<http://www.jst.go.jp/erato/suematsu/>

【AMED 事業に関するお問い合わせ先】

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
(AMED) 基盤研究事業部 研究企画課
〒100-0004
東京都千代田区大手町一丁目 7 番 1 号
TEL : 03-6870-2224 FAX : 03-6870-2246
E-mail : kenkyuk-ask@amed.go.jp
<http://www.amed.go.jp/>

【JST 事業に関するお問い合わせ先】

内田 信裕 (うちだ のぶひろ)
科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部
〒102-0076
東京都千代田区五番町 7 K's 五番町
TEL : 03-3512-3528 FAX : 03-3222-2068
E-mail : eratowww@jst.go.jp

【富士フイルム事業に関するお問い合わせ先】

富士フイルム株式会社
コーポレートコミュニケーション部
〒107-0052
東京都港区赤坂 9-7-3
TEL : 03-6271-2000 FAX : 03-6271-1171
E-mail : koho.fujifilm@fujifilm.com

【本リリースの発信元】

慶應義塾大学
信濃町キャンパス総務課 : 鈴木・山崎
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
TEL:03-5363-3611 FAX:03-5363-3612
E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp
<http://www.med.keio.ac.jp/>
※本リリースのカラー版をご希望の方は
上記までご連絡ください。

科学技術振興機構 広報課
〒102-8666 東京都千代田区四番町 5 番
地 3
TEL:03-5214-8404 FAX:03-5214-8432
E-mail: jstkoho@jst.go.jp
<http://www.jst.go.jp/>