

2020年6月30日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

## 透明化された三次元腫瘍の全容が細胞レベルで明らかに —新規癌イメージング DIIFCO 法を開発—

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室の田中伸之助教、大家基嗣教授とスウェーデンカロリンスカ研究所のパー・ウーレン教授らの研究グループは、3次元ライトシート顕微鏡（注1）と組織透明化法（注2）と組み合わせることで、立体的な腫瘍空間にひろがるタンパク/RNA発現の空間分布を1細胞レベルで解析可能にする、新規癌イメージング DIIFCO（Diagnosing In situ and Immuno-Fluorescence-labelled Cleared Onco-samples）法を開発しました。

従来の組織学的アプローチは、得られた腫瘍組織を薄く切片に（2次元化）し、タンパク及び遺伝子の発現解析を行っていました。これらの手法を用いた解析では、癌微小環境（注3）における詳細な3次元腫瘍情報は失われていました。DIIFCO法では、3次元ライトシート顕微鏡を用いることで、透明化処理を施した組織塊の表面から深部まで、1細胞レベルの高解像度で標的分子を検出し、立体像として可視化します。さらに、組織透明化処理に独自の免疫染色およびin situ ハイブリダイゼーション法（注4）を組み合わせ、タンパクとRNAの発現を同時に解析します。最新の顕微鏡と複数の組織処理技術を組み合わせることで、腫瘍の立体構造を保持したまま、腫瘍内に存在する数百～数千万細胞のタンパク/RNAの同時発現解析を1細胞毎に実現しました。

これまで詳しく分かっていなかった腫瘍脈管の立体構造・層構造・および細胞の維持環境である細胞ニッチなどが、本イメージング法によってタンパク/RNAレベルで可視化され、癌微小環境の詳細な画像が世界で初めて明らかになりました。この手法は病理診断後の保存組織にも利用可能であり、癌診断や治療法の選択等、将来的な臨床応用が期待されます。

本研究成果は、2020年6月29日（米国東部時間）に英国科学誌「Nature Biomedical Engineering」に掲載されました。

### 1. 研究の背景と概要

生体内で癌をとりまく癌微小環境は、癌の成長に不可欠な栄養供給を支える血管新生や、癌の転移・浸潤を促進する上皮間葉転換（注5）と深く関与しています。時空間に沿って変化する癌微小環境を正確に理解することは、癌根絶を試みる基礎研究者には喫緊の課題です。さらに、癌微小環境における遺伝子の発現情報は、癌治療に従事する臨床医にも治療予測を

可能とするバイオマーカーになり得ると考えられ、その画像化技術が開発されてきました。

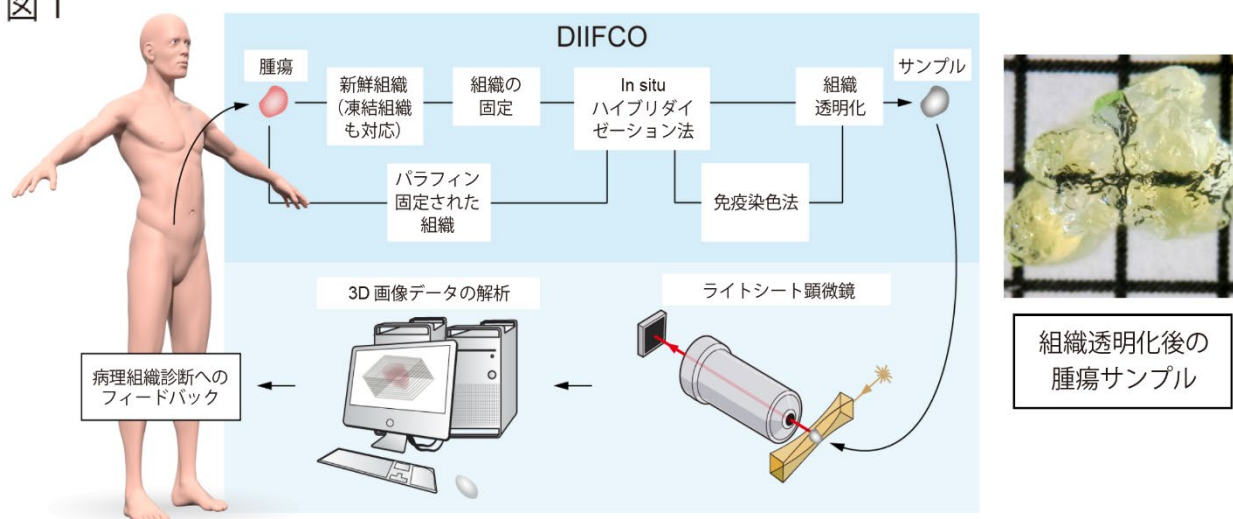
しかし、従来の分子イメージング技術は、撮影範囲・解像度が不十分である、組織断面の分子の分布を描画する 2 次元イメージングである、等の限界があり、腫瘍空間における分子の分布を立体的に、かつ高解像度で可視化し、忠実に癌微小環境を再現する新たな 3 次元イメージング法が求められていました。

また、癌微小環境の分子機構をより正確に理解するために、免疫組織染色によるタンパク質の局在解析に加えて、*in situ* ハイブリダイゼーション法による RNA の局在解析も重要になっています。タンパク質まで翻訳される遺伝子は、全遺伝子の 1.5% に満たず、多くの発現遺伝子は細胞内に RNA として存在し、癌微小環境の制御を行います。しかし、*in situ* ハイブリダイゼーション法を施行するためには、RNA を含むタンパク質を試薬で分解し、RNA を露出させる必要があります。この操作では、免疫組織染色と *in situ* ハイブリダイゼーション法の共存が難しいため、立体的な組織構造の維持が不可欠な 3 次元イメージング法を利用した 1 細胞レベルでの RNA とタンパク質の同時解析を実現した研究はこれまでありませんでした。

## 2. 研究の成果と意義・今後の展開

最新のライトシート顕微鏡と DIIFCO 法で可視化される腫瘍空間では、標的分子の発現レベルに応じる 3 次元マップが作成され、立体的な癌微小環境が明らかになります。今回、研究グループは、ライトシート顕微鏡に独自の免疫染色、*in situ* ハイブリダイゼーション法並びに組織透明化法を組み合わせ、標的分子のタンパク質および RNA を発現する細胞を同時に検出し、癌組織の立体的な空間上に描画する新規癌イメージング DIIFCO 法 (図 1) を考案しました。

図 1

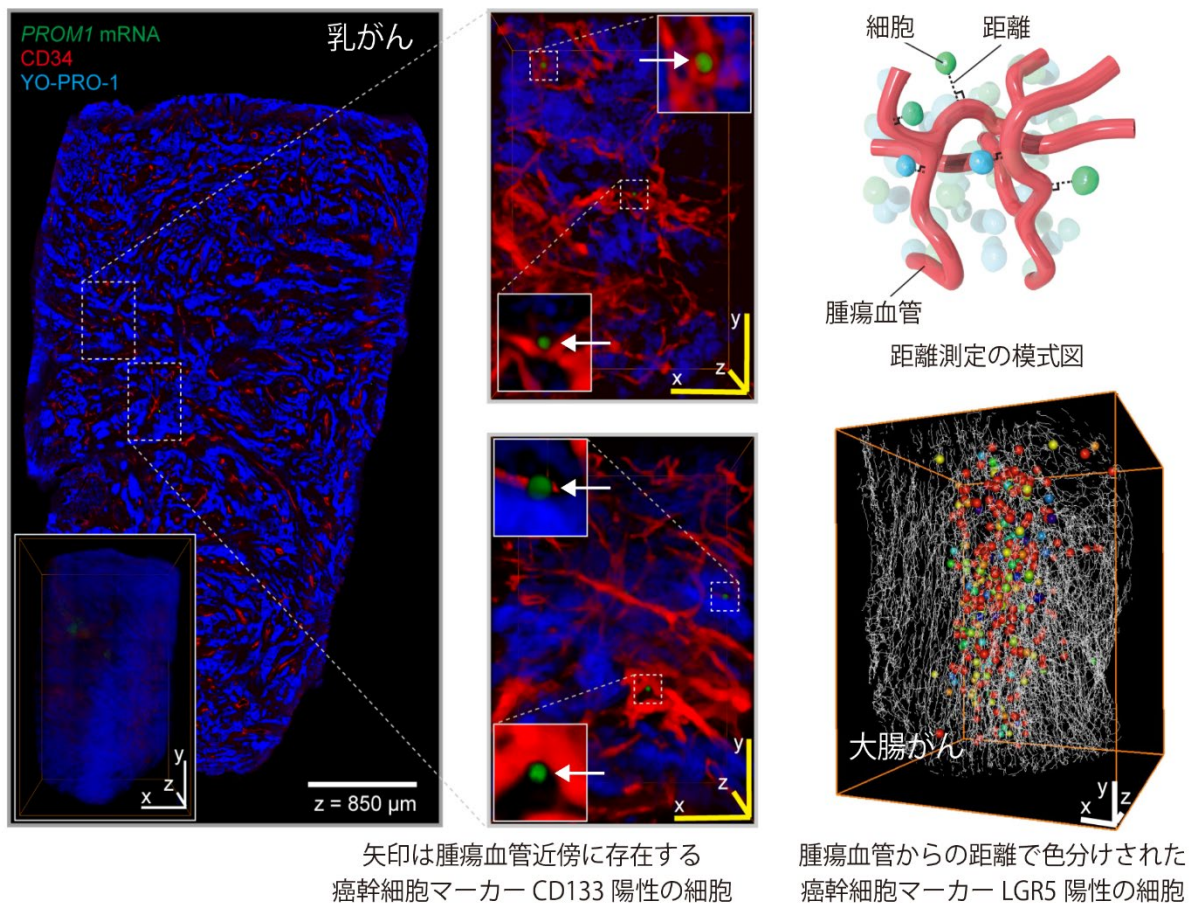


DIIFCO 法で採用される新しい *in situ* ハイブリダイゼーション法では、RNA の検出にタンパク質分解の必要性がなく、DIIFCO 法で透明化される腫瘍塊では、免疫組織染色と *in situ* ハイブリダイゼーション法を同時に施行することが可能となりました。

癌微小環境で免疫染色される腫瘍血管と標的分子の RNA を持つ数百～数千万の癌細胞との位置関係が 1 細胞毎に可視化され、不均一な脈管構造や上皮間葉転換の空間分布、さらに

は血管からの距離を含めた細胞ニッチの 3 次元構造も、ミクロなレベルで可視化されます。このため、腫瘍空間で癌幹細胞が自らを育む環境（癌幹細胞ニッチ）も世界で初めて明らかになりました（図 2）。

図 2



本研究により、腫瘍の立体構造が保持されたまま、高解像度な 1 細胞毎のタンパク/RNA 発現の同時解析が可能になりました。本手法では、ホルマリン・パラフィン固定された保存サンプルを利用することが出来ます。つまり、DIIFCO 法では病理診断後の組織やバイオバンクに存在する保存組織でも、1 細胞レベルの高解像度なタンパク/RNA の同時発現解析を行うことが可能です。保存サンプルを活用できる DIIFCO 法は、「ライトシート顕微鏡と組織透明化法の融合」を迅速化し、臨床現場への橋渡しを可能にする新規癌イメージングとして、将来の臨床応用が期待されます。

### 3. 特記事項

本研究は、JSPS 科研費 18H04906・18K19482・19H03792、公益財団法人武田科学振興財団、スカンジナビアニッポンササカワ財団、小林がん学術振興会の研究事業の支援によって行われました。また、慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室の田中伸之助教、大家基嗣教授とスウェーデンカロリンスカ研究所のパー・ウーレン教授らの研究グループを中心に、カロリンスカ大学病院、ヒューブレイト研究所（オランダ）、トゥルク大学（フィンランド）所属研究者との共同研究により実施されました。

#### 4. 論文

英文タイトル : DIIFCO: A Single-Cell 3D Imaging Method to Analyse RNA and Protein Expressions in Intact Tumour Biopsies

タイトル和訳 : 新規癌イメージング DIIFCO 法は腫瘍空間で広がるタンパク・RNA 発現を 1 細胞レベルで解析可能にする

著者名 : 田中伸之、金谷繁明、Dagmara Kaczynska, 福本桂資郎、Lauri Louhivuori, 水谷 知裕、Oded Kopper, Pauliina Kronqvist, Stephanie Robertson, Claes Lindh, Lorand Kis, Robin Pronk, 丹羽直也、松本一宏、大家基嗣、宮川絢子、Anna Falk, Johan Hartman, Cecilia Sahlgren, Hans Clevers, and Per Uhlén

掲載誌 : Nature Biomedical Engineering

DOI : 10.1038/s41551-020-0576-z

#### 【用語解説】

- (注 1) ライトシート顕微鏡 : 試料の側面からシート状の励起光を照射することで、光学断面像を得る蛍光顕微鏡である。深くまで照射できるシート状の励起光と光路を分けた検出レンズは 3 次元像を得るために適している。
- (注 2) 組織透明化法 : サンプルと溶媒の屈折率が一致することで組織が透明になる。本研究では、組織を脱水・脱脂処理することで組織中の屈折率を均一化した。
- (注 3) 癌微小環境 : 腫瘍内において癌細胞とそれを取り巻く間質により形成される小空間。間質内には免疫・炎症細胞の浸潤、線維芽細胞の増殖、血管新生等が認められ、治療耐性化の一因と考えられている。
- (注 4) *in situ* ハイブリダイゼーション法 : 細胞や組織中の DNA/RNA を検出する研究手法。免疫染色は主にタンパク検出を目的とするが、*in situ* ハイブリダイゼーションでは特異的なプローブを用いることで、DNA/RNA の検出を目的とする。
- (注 5) 上皮間葉転換 : 上皮細胞がその細胞極性を失い、間葉系様の細胞に形態変化する現象。発生・創傷治癒過程で多く認められるが、癌細胞においては転移・浸潤と深く関係する。

※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

泌尿器科学教室

助教 田中 伸之 (たなか のぶゆき)

TEL : 03-5363-3825 FAX : 03-3225-1985

E-mail: [urotanaka@keio.jp](mailto:urotanaka@keio.jp)

<http://www.keio-urology.jp>

#### 【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](mailto: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。