

2021年8月3日

大阪府立大学

がん診断技術に革命を起こす！

## 高分子ゲルを用いたがん組織の迅速透明化と 3次元蛍光イメージング —高精度ながん病理診断への応用に期待—

大阪府立大学（学長：辰巳砂 昌弘）大学院 工学研究科 児島 千恵准教授、松本 章一教授および生命環境科学研究科 杉浦 喜久弥教授らの研究グループは、住友化学株式会社との共同研究によって、生体膜のリン脂質を模倣した双性イオン型の高分子（注1）ゲルをあらたに開発し、それを用いることにより、がん組織の透明化プロセスのスピードアップと生体組織の3次元蛍光イメージングに成功しました。この技術のがん診断に展開すれば、微小がんの見落としの防止や、がんの個別医療を実現するための精度の高いがん病理診断が可能になると期待されます。

**双性イオン構造の  
高分子ゲルの原料**

C=CC(=O)NCCCC[N+](C)(C)CCCC[S-](=O)(=O)

DAPS

CC(=O)OC(C)COP(=O)([O-])OCC[N+](C)(C)CC

MPC  
(生体膜を模倣)

**双性イオンのネットワーク**



タンパク質のネットワーク

双性イオン構造の高分子ゲルを用いて透明化すると、ゲル内に多数のイオンが存在することで浸透圧が上昇するため、組織の不透明化の要因である脂質を迅速に除去することができる。

**がん組織の透明化**



1週間

双性イオン型高分子ゲルを用いて、透明化が難しいとされているがん組織の透明化に成功

**MPCヒドロゲルで透明化した組織の  
3次元蛍光イメージング**



脳の血管ネットワーク    転移がんの検出

## <研究概要>

現在の病理診断では、生体組織から適当な部位を切り出した切片を用いてプレパラートを作製し、2次元的に顕微鏡観察することによって病理診断がなされています。しかし、生体組織を透明化できれば、組織丸ごと3次元的に観察することが可能になり、生検サンプルの一部ではなく、全体を多重染色し3次元的に診断することが可能です。近年、組織透明化技術が盛んに研究されていますが、がん組織は透明化が難しいとされています。研究グループでは、正と負のイオン性部位をあわせもつ双性イオン構造をもつ高分子ゲルが透明化プロセスの促進効果を示し、より速く、より透明ながん組織を得ることに成功しました。また、生体膜のリン脂質を模倣した双性イオン型の高分子ゲルを用いて透明化した脳組織およびがん組織の3次元蛍光イメージングに成功しました。この組織透明化手法および3次元蛍光イメージング技術をがん組織の病理診断に利用すれば、生検サンプルを丸ごと診断することが可能となり、微小がんの見落としを防止することができます。さらに、がん組織内のがん細胞の多様性や各種免疫細胞の分布なども多重染色により可視化することができ、個々の患者に適合した個別医療を実現するためのがん診断が可能になると期待されます。

## <研究背景>

がんは日本の死因の第一位であり、新たな治療・診断技術の開発が求められています。現在のがん病理診断では、採取した組織（生検サンプル）の一部をスライスした切片を用いてプレパラートを作製し、2次元的に顕微鏡観察されています。しかし、がんの部分を含む部位を切片に含めることができなければがんを検出することができないため、微小がんの偽陰性が懸念されます。また、がん組織のがん細胞は均一でなく、がん幹細胞や薬剤耐性細胞など性質の異なる多様ながん細胞が混在しているといわれており、さらに様々な免疫細胞も存在しています。したがって、個々のがん患者に適合したがんの個別医療を実現するためには、精度の高いがん診断が求められています。特に、免疫チェックポイント阻害薬（注2）（オプジーボなど）を用いたがんの免疫療法が注目されていますが、奏効率が低いため、事前に薬効を予測するための診断技術の開発が求められています。最近、免疫細胞の種類やがん細胞との位置関係が薬効と相関することが明らかになってきており、がん組織の3次元的な解析の重要性が増しています。

近年、生体組織をそのまま観察するための透明化技術が開発され、脳の神経ネットワークなどを3次元的に可視化できるようになってきました。この技術をがん診断に適用すれば、採取した生検サンプルを丸ごと3次元的に解析することができるため、微小がんの見落としの懸念を払拭することができるとともに、個別医療のための正確ながん診断が可能になると期待されます。しかし、がん組織では細胞が密集し結合組織が発達しているため、既存の技術では組織透明化が難しいとされていました。

## ＜研究内容＞

組織が不透明であるのは、組織内の成分の屈折率が異なること、光を散乱する脂質の集合体が存在しているためです。組織透明化手法の1つである CLARITY 法では、組織中のたんぱく質をポリアクリルアミドゲルに固定化した状態で、脂質を除去し、媒体を水からたんぱく質の屈折率と近い溶媒に置換することで透明化しています。児島准教授と松本教授の研究グループでは、これまでの研究で、負電荷をもつアニオン性的高分子ヒドロゲルを用いることで、組織透明化のプロセス時間を短縮できることを示してきました。本研究では、生体適合性を示し、かつ、正と負のイオン性部位をあわせもつ双性イオン型高分子ヒドロゲル（注3）を作製して、がん組織の透明化と3次元蛍光イメージングを行いました。カルボキシベタイン構造をもつ3-[(3-アクリルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパノエート (ADAP) およびスホベタイン構造をもつN,N'-ジメチル(アクリルアミドプロピル)アンモニウムプロパンサルホネート (DAPS) はアクリルアミド (AAm) の共重合体ゲルを用いることでがん組織の透明化の促進効果がみられたのに対して、生体膜にあるリン脂質でみられるホスホベタイン構造をもつ2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC (注4)) では単独重合ゲルを用いて透明化することで、高い透明度のがん組織が得られました。これは、双性イオンヒドロゲル内における浸透圧の向上によって透明化が促進したためであると考えられます。DAPS と AAm の共重合体ゲルは蛍光観察用オイルとの相溶性が悪く、3次元蛍光イメージングはうまくいきませんでした。MPC ゲルで透明化した脳組織では3次元血管ネットワークをきれいに可視化することができました。また、転移がんを含む肺組織を MPC ヒドロゲルで透明化し、がん組織を3次元的に観察することができました。以上より、生体膜にみられるリン脂質を模倣した MPC ヒドロゲルは生体組織透明化および3次元蛍光イメージングにおいて有用であることが示唆されました。

## ＜社会的意義、今後の予定＞

がん組織は透明化が難しいとされていましたが、研究グループが開発した手法によって、通常の臨床診断に用いるホルマリン固定したがん組織でも比較的短時間で透明化することができ、がん診断における3次元イメージングが可能になりました。これにより、生検サンプルを丸ごと診断することが可能となり、微小がんの見落としを防止することができます。また、同一組織内におけるがん細胞の多様性や各種免疫細胞の分布などを多重染色して観察・診断することができ、個々の患者に適合した個別医療を実現するためのがん診断が可能になると期待されます。特に、がん免疫療法で使用されているオプジーボなどの免疫チェックポイント阻害薬の薬効を事前に予測するための診断技術として有用であると考えられます。今後、がん組織内のキラーT細胞や制御性T細胞などの免疫細胞を3次元的に観察し、がん免疫療法の効果を正確に予測するための技術を提案したいと考えています。

## <発表雑誌>

本研究成果は、Wiley 社が刊行する高分子バイオ材料の専門誌である「Macromolecular Bioscience」に 2021 年 6 月 21 日付でオンライン版として先行公開されました。また同誌の表紙に選出されました。

### <雑誌名>

Macromolecular Bioscience

### <論文タイトル>

Application of Zwitterionic Polymer Hydrogels to Optical Tissue Clearing for 3D Fluorescence Imaging

### <著者>

Chie Kojima, Takayuki Koda, Tetsuro Nariai, Junji Ichihara, Kikuya Sugiura, Akikazu Matsumoto

### <DOI 番号>

DOI:10.1002/mabi.202100170

## <SDGs 達成への貢献>

大阪府立大学は研究・教育活動を通じて SDGs17 の目標への貢献および地球全体の持続可能な発展に貢献しています。

本研究は SDGs17 の目標のうち、「3：すべての人に健康と福祉を」、「9：産業と技術革新の基盤をつくろう」に貢献しています。



## <研究助成資金等>

本研究の一部は、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED）橋渡し研究戦略的推進プログラム/異分野融合型研究開発推進支援事業（橋渡し研究支援拠点、国立大学法人 大阪大学）からの支援を受けて行われました。

## <用語解説>

（注 1）双性イオン型の高分子：

側鎖に正電荷をもつカチオンと負電荷をもつアニオンをあわせもつ高分子。第四級アンモニウム基とカルボン酸塩、スルホン酸塩、リン酸塩をあわせもつカルボキシベタイン型、スルホベタイン型、ホスホベタイン型などがある。

（注 2）免疫チェックポイント阻害薬：

がん細胞は免疫系からの攻撃を回避し増殖するために免疫チェックポイント分子を利用し、免疫反応を抑制している。免疫チェックポイント分子を阻害する薬を投与することで、がん

免疫反応を再生し、自身の免疫細胞によってがん細胞を攻撃することができる。この薬は、がん組織内に免疫細胞を多く含む場合にのみ薬効を発現するため、事前の薬効の判定が重要である。

(注3) 高分子ヒドロゲル：

高分子間に架橋構造が形成された3次元的なネットワーク構造によって水中で不溶化した状態の高分子材料。モノマーと架橋剤を重合することによって作製される。

(注4) MPC：

生体膜に存在するリン脂質(ホスファチジルコリン)の親水基を模倣したホスホベタイン型の双性イオン構造をもつモノマー。これを重合することによって合成されるMPCポリマーは蛋白質や細胞の非特異的な吸着を抑制する防汚効果があり、様々な医用デバイスの表面処理などに広く用いられ、臨床応用されている。

### <参考 URL 等>

本学研究者による研究課題および本学研究者が参加する事業が、令和2年度日本医療研究開発機構(AMED)に3件採択(大阪府立大学Webサイト)

<https://www.osakafu-u.ac.jp/news/nws20200729/>

工学研究科物質・化学系専攻 応用化学分野 合成高分子化学研究グループ(松本章一研究室) Webサイト

<http://www.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka7/>

これまでの研究成果を記載した論文1

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352492819303903?via%3Dihub>

これまでの研究成果を記載した論文2

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.34322>

#### 【研究内容に関するお問合せ】

大阪府立大学大学院 工学研究科  
准教授 児島 千恵(こじま ちえ)  
TEL: 072-254-8190  
E-mail:  
kojima [at] chem.osakafu-u.ac.jp

#### 【ご取材に関するお問合せ】

大阪府立大学 広報課  
担当: 荒岸 奈緒子(あらぎし なおこ)  
TEL: 072-254-9103  
E-mail:  
opu-koho [at] ao.osakafu-u.ac.jp

[at] の部分を@と差し替えてください。