

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15080

研究課題名（和文）腫瘍細胞浸潤の「動き」に立脚したがん進展メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of cancer progression mechanism based on the movement of tumor cells infiltration

研究代表者

松井 崇浩（Matsui, Takahiro）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50747037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍の進行の過程で、腫瘍細胞の動態に関する特性は極めて重要な因子であると以前から認識されてきたが、細胞の動態に関わる情報を従来の組織標本から取得するのは困難であった。本研究では、生体イメージング技術を用いてモデル動物を観察し、腫瘍の増大・進行過程における腫瘍細胞の動態を可視化した。そして腫瘍の進行を早期に検出でき、臨床医学でのがん組織診断に応用できるような因子の抽出を行った。さらに、確立した評価系がヒト組織でも実際に適用できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍（がん）の早期発見は現在の本邦の医療状況では最重要課題といえる課題であり、本研究で見出された成果の社会的意義は極めて大きい。また、病理学に立脚した基礎研究成果と光学イメージング技術との融合が、非常に大きな意義があることを示すものでもある。さらに現時点では国際的にも同様の報告例は未だなく、独自性の高い内容で学術的にも大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：Although it has long been recognized that the characteristics of tumor cell dynamics are extremely important factors in the progression of malignant tumors, it has been difficult to obtain information on cell dynamics from conventional tissue specimens. In this study, we observed model animals using intravital imaging technology and visualized the dynamics of tumor cells during tumor growth and progression. As a result, we extracted the factors that can detect the tumor progression at an early stage and can be applied to the cancer tissue diagnosis in clinical medicine. Moreover, we found that the established evaluation system can be actually applied to human tissue samples.

研究分野：人体病理学

キーワード：生体イメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、遺伝子変異によって生じた良性腫瘍や前がん病変のような微小な病変から、遺伝子変異の蓄積や他の細胞との相互作用などによって進展し、進行性の病変に至るまで、形状やふるまいを変化させてダイナミックに進行していく。この進行の過程を詳細に理解するうえで、腫瘍細胞の動態に関する特性は極めて重要な因子であると認識されてきた。しかし臨床医学の病理診断の領域や実験医学のほとんどの領域で使用されている組織標本は、ある一時点のがん組織を切離して細胞の状態を固定したものを観察している。そのため、腫瘍細胞の動態に関わる詳細な情報をこの固定した組織標本から取得するのは困難であった。

本研究者はこれまで、動物や組織を生かしたまま細胞の動態を観察する生体イメージング技術を駆使して、迅速かつ客観的な悪性腫瘍の診断方法を開発し報告してきた(Matsui et al., Sci Rep 2017)。そして生体イメージング技術を用いて腫瘍細胞の動態に関わる情報を取得することで、腫瘍細胞の解析や臨床医学におけるがん診断に新たな知見が得られることを見出してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体イメージング技術の1つである多光子励起イメージング技術を用いて担がん状態のモデル動物を観察し、腫瘍の発生時から疾患の増大・進行過程における腫瘍細胞の動態を可視化する。そして腫瘍細胞の動態に関わる情報から腫瘍の進行メカニズムを理解し、腫瘍の進行を早期に検出でき、臨床医学でのがん組織診断に応用できるような因子を抽出することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 自然発がんマウスを用いた経時的な生体多光子励起イメージング系の確立

乳腺上皮細胞で特異的に発現するプロモーターの mouse mammary tumor virus promoter の制御下に受容体型 tyrosine kinase の erbB-2(HER2)と蛍光タンパク質を発現する自然発がんマウスを作製した。この蛍光標識マウスの成長後に多光子励起イメージング技術を用いた観察を行い、経時的・連続的な観察を可能とするイメージング系の最適条件を決定した。

#### (2) 生体イメージングによる腫瘍細胞浸潤の可視化・浸潤能の評価

上記手順で確立した生体イメージング系を用いて、自然発がんマウスの生体イメージングを連続的に行った。組織像との対比としてイメージング終了後にマウスから組織を摘出し、従来の病理組織標本を作製した。病理組織標本は、HE染色のほか collagen type 1分子を検出する免疫組織化学染色や、弾性線維と膠原線維を検出する Elastica van Gieson 染色を使用した。このイメージングデータと病理組織標本との対比により、腫瘍細胞の浸潤能の可視化と浸潤に伴う組織変化の定量化、統計学的評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 自然発がんマウスを用いた経時的な生体多光子励起イメージング系の確立

腫瘍細胞の動態を可視化するための生体イメージングを確立すべく様々な技術開発を行い、生きたままの状態のマウスの腫瘍組織とその周辺をリアルタイムで可視化するライブイメージング系を確立した。具体的には、血管は isolectin により細胞核は Hoechst33342 によりそれぞれ描出し、また腫瘍細胞周囲の膠原線維を非線形光学現象により可視化できる観察系を確立することができた。さらに本観察系を用いて、上述の方法で確立したモデル動物の組織を経時的・連続的に観察することができた。

#### (2) 生体イメージングによる腫瘍細胞浸潤の可視化・浸潤能の評価

上述した観察系を用いて、浸潤能を獲得した腫瘍細胞とそれ以前の腫瘍細胞との生体イメージングを行った。その結果、腫瘍細胞の浸潤に伴って、浸潤開始のごく早期から細胞周囲に膠原線維の増生が認められることが分かった。増生する膠原線維の性状を免疫化学的に解析したところ、最初に想定していた、基底膜の主要な構成蛋白で非線維性コラーゲンでもある collagen typ4 分子については、増生はそれほど目立たず、一方で線維性コラーゲンの主要な分子である collagen type 1 分子の増生が主に認められることが分かった。そこで、さらにこの当該分子の増生を定量的に評価する方法を検討した結果、非線形光学現象の描出によって達成できることを見出した。一方で弾性線維については、腫瘍細胞の浸潤により増生する場合が一部に観察されたものの、これを生体イメージング系で定量的に評価する方法は、本研究期間内に確立できなかった。ただ、定性的な観察として、弾性線維自体は通常の観察で可視化可能な程度の自家蛍光を発生させる傾向があることは確認できた。また腫瘍細胞の核を Hoechst 33342 で染色することにより、腫瘍細胞の浸潤に先立って細胞核の形状が変化し、特に真円度が低下することが分かった。この真円度は、イメージング画像から周長値と等面積円の円周値とで算出した場合、定量的な評価値として使用できることが分かった。

さらにこの評価系がヒト組織にも適用できるかどうかを解析するため、臨床研究計画を作成

したのち、手術残余検体から得られるヒト腫瘍組織及び対応する正常組織を用いて、同様の観察系によるイメージングを行った。その結果、浸潤能を有した腫瘍細胞が観察できる組織では、上述した collagen type 1 分子の増生がみられ、またヘマトキシリンを用いた核染色との対比で、核の真円度が浸潤能を有した腫瘍細胞で有意に低下していることが分かった。さらにこれらの所見は、非線形光学現象の描出によりヒト腫瘍組織でも可視化できることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>Matsui Takahiro, Maeda Tetsuo, Kusakabe Shinsuke, Arita Hideyuki, Yagita Kenji, Morii Eiichi, Kanakura Yuzuru  | 4. 巻<br>13       |
| 2. 論文標題<br>A case report of granulomatous amoebic encephalitis by Group 1 Acanthamoeba genotype T18 diagnosed by the combination of morphological examination and genetic analysis | 5. 発行年<br>2018年  |
| 3. 雑誌名<br>Diagnostic Pathology   | 6. 最初と最後の頁<br>27 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13000-018-0706-z   | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, Ebina K, Hirao M, Okuzaki D, Yoshida Y, Hirao A, Kalinichenko VV, Yamaoka K, Takeuchi T, Ishii M | 4. 巻<br>20              |
| 2. 論文標題<br>Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1.   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Nat Immunol.  | 6. 最初と最後の頁<br>1631-1643 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41590-019-0526-7  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松井崇浩, 森正樹, 森井英一, 石井優                             |
| 2. 発表標題<br>“切らない組織診断” - 2光子励起イメージング技術を用いた低侵襲・迅速・定量的がん診断法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第107回日本病理学会総会                                    |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松井崇浩, 金倉謙, 森井英一                      |
| 2. 発表標題<br>造血器腫瘍に対する同種骨髄移植後に発症した胸膜実質性線維弾性症の一部検例 |
| 3. 学会等名<br>第64回日本病理学会秋期特別総会                     |
| 4. 発表年<br>2018年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松井崇浩, 八木田健司, 森井英一            |
| 2. 発表標題<br>肉芽腫性アモeba性脳炎の剖検例における分子病理学的検討 |
| 3. 学会等名<br>第65回日本病理学会秋期特別総会             |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|