

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19482

研究課題名(和文)腫瘍内不均一性を可視化する次世代癌イメージングを用いた薬剤感受性の予測モデル構築

研究課題名(英文)Development of novel predictive model for drug susceptibility using next-generation cancer imaging that visualizes intratumoral heterogeneity

研究代表者

田中 伸之(Tanaka, Nobuyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60445244

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、次世代イメージング「ライトシート顕微鏡・膨張顕微鏡法」を利用し腫瘍内不均一性を立体視する。我々は、この技術基盤として新規3次元イメージングパイプライン:DIIFCO法を、実際の臨床組織で実装に移した。膨張顕微鏡法も、光学顕微鏡の回折限界を乗り越える最新の研究手法である。腎癌組織マイクロアレイを利用して、我々は組織膨張下にDIIFCO法でin situ hybridizationを行うプロトコール開発を進めた。膨張顕微鏡法とDIIFCO法を組み合わせることで、ナノレゾリューションでRNA局在がわかるようになった。また、不均一なlncRNA発現も、細胞内局在が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代イメージング「ライトシート顕微鏡・膨張顕微鏡法」は、ヒト癌研究への適用自体が革新的であり、国内外に類似研究は存在しない。3次元イメージングの普及に伴い、今後様々な臓器・細胞において遺伝子発現の空間分布や微小脈管の構造的意義が問われていくと考える。世界に先駆ける申請者の解析プラットフォームは、臨床に直結する橋渡し研究(トランスレーショナルリサーチ)であり、本研究が癌イメージング術の3次元化を促す分水嶺となり得る。確立されるイメージング法は、普遍的な社会への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文):In this study, we use next-generation cancer imaging "light-sheet microscopy/expansion microscopy" to stereoscopically visualize intratumoral inhomogeneity. We have implemented a new 3D imaging pipeline: DIIFCO method as the basis of this technology in actual clinical tissues. Expansion microscopy is also the latest research method to overcome the diffraction limit of optical microscopy. Utilizing a renal cell carcinoma tissue, we proceeded with the development of a protocol for in situ hybridization by the DIIFCO method under tissue swelling. By combining the expansion microscopy and DIIFCO method, RNA localization can be understood by nano-resolution. In addition, heterogeneous lncRNA expression was also revealed to be intracellularly localized in our methods.

研究分野：腫瘍学

キーワード：腎細胞癌 ライトシート顕微鏡 膨張顕微鏡法 分子標的治療 免疫治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

同一腫瘍内でも全ての癌細胞は異なったトランスクリプトームを持ち、治療中の癌微小環境では生存に最適なサブクローンが選択される (Vogelstein B, Science 2013)。この腫瘍内不均一性 (Intra-tumor Heterogeneity, ITH) のプロファイル解明は、癌根絶を試みる基礎研究者には喫緊な課題であり、癌治療に従事する臨床医にとっても、正確な治療予測を可能とするバイオマーカーに成り得る。腎がんの薬物療法は近年劇的に進歩し、分子標的薬が中心となった。腎がん治療における分子標的薬は血管新生阻害薬を主として、mTOR 阻害薬、免疫チェックポイント阻害薬 (免疫治療) に大別されるが、現状の問題は 1) 強い副作用に伴う患者 QOL の低下、2) 医療財源を切迫する高額な治療費が必至な点である。特に最新の免疫治療 (抗 PD-1 療法) の治療費は、1 人当たり年額数千万円に及ぶ。この免疫治療では未だ正確な薬剤効果を予測するバイオマーカーが不足しており、最適な治療・医療経済の観点から、重要な社会的関心と考える。

ライトシート顕微鏡は、免疫染色・透明化された組織塊を 1 細胞レベルで深部まで可視化する、革新的な研究手法である (Ahrens MB, Nat Methods 2013)。従来の免疫組織学的アプローチは、組織を切片 (2 次元) 化するため、腫瘍内に広がる ITH の空間分布・情報は失われる。ライトシート顕微鏡による立体的な ITH の可視化は、癌根絶の障壁である ITH プロファイルが薬物治療の感受性を予測するバイオマーカーとなり、既存の顕微鏡手法を凌駕する可能性がある (Tanaka N, Nature Biomed Eng 2017)。この点で、新規がんイメージングで腎がん免疫療法のバイオマーカー探索しようとする試みは、必然の発想と考える。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1) 新規イメージングプラットフォームから免疫応答関連遺伝子の腎がん ITH を正確に可視化する、(2) 解析結果から臨床的な免疫治療感受性の予測モデルを構築することを目的とした。多様な細胞が同時に混在する腫瘍組織において、高解像度な 3 次元画像をハイスループットで撮影できるライトシート顕微鏡は、最適な研究基盤と考える。一方、最新の顕微鏡を使用するには、撮影方法、イメージプロセッシング、データ解析等、様々な技術的障壁が存在する。しかし、申請者は同手法を用いた新規癌イメージング法: DIPC0 を世界に先駆けて提唱している (Tanaka N, Nat Biomed Eng 2017)。また本研究では、Boyden 等によって考案された最新の膨張顕微鏡法 (expansion microscopy) も適用する。膨張顕微鏡法は、ナノスケールであるが、組織を透明化後に立体視する点で、研究手法の類似性を示す。回折限界を超えるナノスケールで ITH が明確化されれば、臨床上のバイオマーカーとして意義深いと考える。

3 次元イメージングの普及に伴い、今後様々な臓器・細胞において遺伝子発現の空間分布や微小脈管の構造的意義が問われていくと思われる。我々が使用する次世代イメージング「ライトシート顕微鏡・膨張顕微鏡法」は、ヒト癌研究への適用自体が革新的であり、国内外に類似研究は存在しない。

## 3. 研究の方法

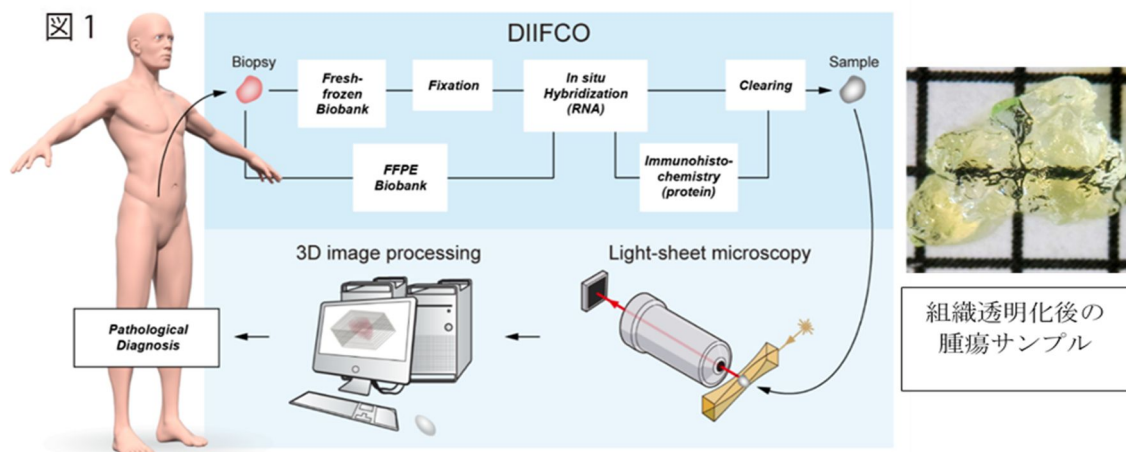
(1) ライトシート顕微鏡で立体視される ITH プロファイルを利用する免疫治療の感受性予測モデル: 最新のライトシート顕微鏡による立体視は、申請者が考案した同顕微鏡の新規イメージングプラットフォーム (ヒト FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) サンプルを利用した ITH プロファイルの可視化) で示すよう、全てがシングルセルレゾリューションで再現される (Tanaka N, Nature Biomed Eng 2017)。腎がん免疫治療における新規バイオマーカーとして、標的分子 (免疫応答関連遺伝子) の立体的な ITH を臨床的に意義付ける。腫瘍塊に広がる ITH、特に免疫

応答関連遺伝子 (PD-1/PD-L1 等) の発現レベルを 3 次元で可視化する。バイオバンクの組織保存は FFPE 法に加え、冷凍法 (<-80 ) も主流である。後者は RNA 保持能に優れ、3 次元イメージングへの適用は、1 細胞レベルの解像度で、不均一な癌トランスクリプトームの空間情報が得られると考える。腫瘍塊への *in situ* hybridization を可能とするイメージングプラットフォームで再現される立体的な癌トランスクリプトームも、薬剤感受性の予測モデル作成への利用を考えている。最新の顕微鏡を使用するには、撮影方法、イメージプロセッシング、データ解析等、様々な技術的障壁が存在するが、同手法を用いたこれまでの経験で、計画遂行は円滑と考える。

(2) 膨張顕微鏡法で可視化するナノスケールな細胞内 ITH と薬剤感受性の予測：膨張顕微鏡法は、組織をアクリル酸塩で膨張させ、光学顕微鏡の回折限界を乗り越える最新の研究手法である (Chen F, Science 2015)。膨張顕微鏡法は通常の光学顕微鏡で、超解像顕微鏡並みの 20nm レベルの物体識別を可能にし、細胞内小器官における立体構造やタンパク質の移動がナノスケールで可視化される。当教室が有する世界規模の腎がんデータベースで、実際に治療が行われた癌細胞及び間質内細胞 (免疫細胞) で起こるナノスケールな変化を、細胞内小器官レベルで解明する。超高解像度な細胞の立体視は、免疫応答関連遺伝子の細胞内発現を世界で初めて、ミトコンドリア・小胞体・ゴルジ体等の細胞内小器官レベルで明らかにする。標的分子の不均一な局在分布は、統計解析による免疫治療の感受性予測モデルの作成に利用される。当教室では膨張顕微鏡法の適用に備え、既に固形組織 (ヒト癌組織) を用いた組織膨張プロトコルの作成にも着手しており、計画遂行は円滑と考える。透明性・耐久性を維持した組織膨張は、ナノスケールイメージングの重要なステップである。

#### 4. 研究成果

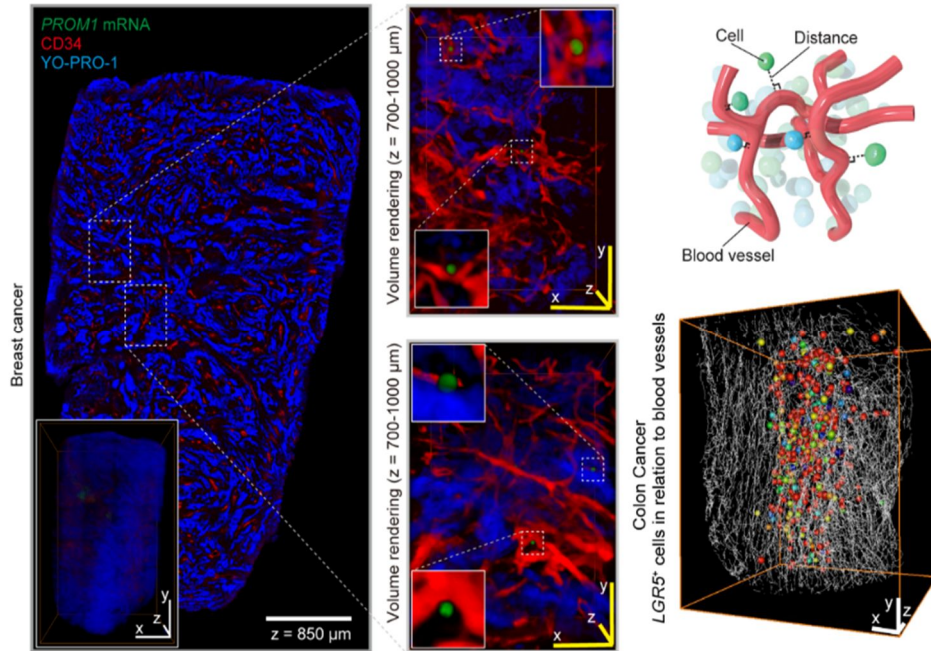
(1) まず本研究では、研究推進の技術基盤としてライトシート顕微鏡を利用した新規 3 次元イメージングパイプライン: DIIFCO (diagnosing *in situ* hybridized and immunolabeled fresh or fixed cleared organs) 法を考案・整備した (Tanaka N, Nat Biomed Eng 2020, 図 1)。



DIIFCO 法では、組織透明化法に独自の免疫染色・*in situ* ハイブリダイゼーション法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 細胞毎に実現した。*in situ* hybridization 法は、特異的な抗体が必要無く、また組織深部への浸透も容易で、3 次元イメージングにおける必要性は高い。一方、従来の *in situ* hybridization 法では、RNA を包むタンパクを試薬で分解し、RNA を露出させる必要がある。この操作は、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において、大きな障壁となっていた。DIIFCO 法によって、不均一な上皮間葉転換の空間分布や血管からの距離

を含めた細胞ニッチの3次元構造もマイクロなレベルで可視化され、微小環境における癌幹細胞ニッチ詳細を明らかにする新規癌イメージング(図2)として、臨床応用を視野に入れた将来の活用が期待さ

図2



れる成果となった (<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2020/6/30/28-70827>)

(2) 膨張顕微鏡法は、光学顕微鏡の回折限界を克服することが可能である。本研究は、腫瘍塊へ膨張顕微鏡法を適用するとともに、当教室が保有する腎がん組織マイクロアレイを利用して、組織膨張下に DIIFCO 法で *in situ hybridization* を行うプロトコル開発を進めた。In *in situ hybridization* 法は、RNA が可視化される。DIIFCO 法で採用される *in situ hybridization* は、*hybridization chain reaction* 法を採用しており、簡便なプローブ作成はハイスループットな RNA イメージングを可能にする。膨張顕微鏡法と DIIFCO 法を組み合わせることで、ナノレゾリューションで RNA 局在がわかるようになり、特に *in situ hybridization* 法に優位性のある lncRNA 解析は、本研究で初めて整備されたと考える。不均一な lncRNA 発現も、細胞内局在が明らかになり、細胞内で核外/核内/核小体内で定量的なカウントが可能となった。新規癌イメージングとして、臨床応用を視野に入れた将来の活用が期待される成果となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Niwa Naoya, Tanaka Nobuyuki, Hongo Hiroshi, Miyazaki Yasumasa, Takamatsu Kimiharu, Mizuno Ryuichi, Kikuchi Eiji, Mikami Shuji, Kosaka Takeo, Oya Mototsugu	4. 巻 99
2. 論文標題 TNFAIP2 expression induces epithelial-to-mesenchymal transition and confers platinum resistance in urothelial cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1702 ~ 1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0285-y.	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 Grahn Alexandra, Tanaka Nobuyuki, Uhlen Per, Brehmer Marianne	4. 巻 37
2. 論文標題 Volumetric imaging: a potential tool to stage upper tract urothelial carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 2297 ~ 2302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00345-019-02682-1.	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 Tanaka N, Kaczynska D, Kanatani S, Sahlgren C, Mitura P, Stepulak A, Miyakawa A, Wiklund P, Uhlen P.	4. 巻 118
2. 論文標題 Mapping of the three-dimensional lymphatic microvasculature in bladder tumours using light-sheet microscopy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 995-999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-018-0016-y.	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 Uhlen P, Tanaka N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Improved Pathological Examination of Tumors with 3D Light-Sheet Microscopy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Cancer	6. 最初と最後の頁 337-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trecan.2018.03.003.	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 Tanaka N, Katayama S, Reddy A, Nishimura K, Niwa N, Hongo H, Ogiwara K, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Mikami S, Miyakawa A, Arenas E, Kere J, Oya M, Uhlen P.	4. 巻 7
2. 論文標題 Single-cell RNA-seq analysis reveals the platinum resistance gene COX7B and the surrogate marker CD63.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6193-6204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1828.	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

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中 伸之、三上 修治、小坂 威雄、水野 隆一、大家 基嗣
2. 発表標題 3次元ライトシート顕微鏡による腫瘍内不均一性の可視化：スライドフリーな1細胞レベルのタンパク/RNA発現解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 伸之、三上 修治、榊田 司、武田 利和、松本 一宏、森田 伸也、小坂 威雄、浅沼 宏、水野 隆一、大家 基嗣
2. 発表標題 3次元ライトシート顕微鏡を用いた次世代泌尿器癌イメージング:腫瘍内不均一性の可視化
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中伸之、大家基嗣
2. 発表標題 がん微小環境の可視化：透明化技術を利用した次世代癌イメージング
3. 学会等名 第83回日本泌尿器科学会東部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka N, Kanatani S, Kaczynska D, Louhivuori L, Oya M, Miyakawa A, Uhlen P.
2. 発表標題 Transcription and protein phenotyping with 3D pathology: Light-sheet microscopy overlooks cellular malignancy of intact tumour volumes
3. 学会等名 The 34th Annual EAU Congress
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.keio-urology.jp/">http://www.keio-urology.jp/</a> 慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室 <a href="http://www.keio-urology.jp/">http://www.keio-urology.jp/</a>
--

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

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			
スウェーデン	Karolinska Institutet			