

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07445

研究課題名(和文) 瑞々しさが保たれたナノスーツ法電顕観察によるHE病理標本上腫瘍形態特性の新規同定

研究課題名(英文) Identification of novel tumor morphological features on HE-stained slides by electron microscopy observation using the NanoSuit method

研究代表者

新村 和也 (Shinmura, Kazuya)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40321880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナノスーツ法を用いて唾液腺腫瘍、肺腫瘍における一次繊毛の電子顕微鏡像を取得することに世界で初めて成功した。両腫瘍とも、一次繊毛は特定の病理組織型のみで高頻度に認められた。また、一次繊毛陽性腫瘍には様々な特徴(一次繊毛が正常部より長い、転移先での一次繊毛の保持、SHHシグナル経路の活性化など)が認められた。さらに一次繊毛形成率は、それぞれ、TTBK2、HYLS1の発現と関連することも示された。以上の結果は両腫瘍の腫瘍化と一次繊毛との間の重要なリンクを示唆するものと考えられた。また、他にも腫瘍の病理組織学的観察・鑑別におけるナノスーツ・電子顕微鏡法の有用性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺腫瘍、肺腫瘍の特定の組織型では一次繊毛が生えているという事実をナノスーツ・電子顕微鏡法で世界で初めて示し、その様々な特徴を明らかにした。将来的にこれを標的とした治療法の確立につながる可能性を秘めている。特に、唾液腺の腺様嚢胞癌や小細胞肺癌といった悪性度の高い癌で新たな形態学的・分子生物学的特徴を見出した意義は大きいと考えられる。また、ナノスーツ・電子顕微鏡法が、ヒト腫瘍の新規形質の同定や、鑑別診断に有用であることを、他にもいくつかの点から示すことができたので、本法の更なる活用が期待される。FFPE由来の病理標本も利用できるため、病理診断と対応させて電顕観察できる点が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia (PC) were detected in salivary gland tumor and lung tumor by electron microscopic analysis using the NanoSuit method for the first time. PC were observed in only restricted histopathological subtypes in both tumors (such as adenoid cystic carcinoma of salivary gland and small cell lung carcinoma). PC-positive tumors showed various characteristics, including the PC length, PC status in metastatic site, and the activation of SHH signaling pathway. Furthermore, PC formation in salivary gland tumor and lung tumor was shown to be associated with the expression of TTBK2 and HYLS1, respectively. These results suggested an important link between tumorigenesis of both tumors and PC formation. Usefulness of electron microscopic analysis using the NanoSuit method was also shown in the pathological diagnosis of tumors.

研究分野：実験病理学

キーワード：NanoSuit method electron microscopy primary cilia lung cancer salivary gland tumor

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の超微細構造観察は、従来そして現在も電子顕微鏡（電顕）を用いるのが一般的である。この従来法では、例えば走査型電子顕微鏡(SEM)観察には、化学固定、限界点乾燥、イオンスパッタリング蒸着等が行われ、これにより、組織、細胞の有する瑞々しさがある程度損なわれた状態での観察となっていた。また、四酸化オスミウム等の使用は安全面での危惧もあった。さらにはルーチンの病理検査での通常光学顕微鏡（光顕）観察の途中から電顕観察に進むことはできなかった。このため、通常病理診断において電顕はあまり利用されていないのが現状である。ところが、浜松医科大学では最近、従来は不可能であった昆虫等を生きたまま電顕観察することを可能にするナノスーツ法（ナノスケールのスーツの様なものを観察対象表面にコートする事を核とした手法）が開発され、ナノスーツ開発研究部ができその研究施設である医工連携拠点棟（iMEC 棟）が完成したばかりである。また、ナノスーツ法をホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）病理組織切片の HE 染色標本での観察に応用し、光顕観察から速やかに電顕観察に移行できる方法が開発されたばかりでもある。このナノスーツ法では、従来法に比べ試料の瑞々しさが保たれている程度が高く、また、通常病理診断標本を直接同一面観察できるという flexibility 故に、従来は観察しえなかった腫瘍の形態学的特性が見えてくる可能性が非常に高いと言える。そこで、これまでの技術的な問題等により未だ見つけられていなかった HE 標本上での「腫瘍の電顕レベルでの形態学的特性」とは何か、というのを本研究の問いとし、今後の医学・医療の発展に役立ていきたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的はナノスーツ法を HE 病理標本に応用する新技術を用いて今後の医学・医療の発展に役立つ腫瘍の電顕レベルでの形態学的特性を新たに見出すことである。そして、それは以下に示す3つの柱(1)～(3)を立てて行う。(1)非腫瘍 vs 腫瘍、各種腫瘍間での細胞表面・細胞内超微細構造の検討、(2)一次繊毛の観点からの検討、(3)DNA 修復の観点からの検討。ナノスーツ法の FFPE 病理組織標本での利用は浜松医科大学で手法が確立されたばかりの独自手法である。電顕解析はこれまででやり尽くされたという印象を持っている病理医もいるのかもしれないが、決してそんなことはない。その証拠に、申請者はナノスーツ研究で申請時時点で既に新規の「腫瘍の形態学的特性」を見つけている。むしろ新しい技術であるナノスーツ法での FFPE 病理組織標本の電顕観察により、やればやっただけの成果が出ると信じている。

3. 研究の方法

(1)非腫瘍 vs 腫瘍、各種腫瘍間での細胞表面・細胞内超微細構造の検討

ナノスーツ法を FFPE 病理組織標本（通常の病理診断に使用する HE 標本）に適用した方法は、走査電子顕微鏡(SEM)等による細胞表面微細構造の観察が主体となる。病理診断中に気になったものを確定診断につなげるためにカバーガラスをはずして、ナノスーツ処理をして、電顕観察を行うことが可能であり、終了後 HE 再染色により通常の標本と同様に保存可能である。エネルギー分散型 X 線分光器(EDS)による元素分析と組み合わせることも可能である。病理診断用 HE 標本で見られる全てのものが、この新しいナノスーツ法での観察の対象になるわけであり、特に瑞々しさが従来の方法より格段に違うため、かつ同一面が観察できるため多くの新しい知見が予想されるわけであるが、申請者は、非腫瘍 vs 腫瘍、各種腫瘍間で、細胞間の形態学的差異を見つけないかと考えている。この際、当講座で自作・保有の各種癌の多数の組織アレイブロックを有効利用する。

(2)一次繊毛の観点からの検討

母中心小体は、基底小体として一次繊毛（細胞に一本のみ生じる不動性の膜突起）の基部に存在しその形成に重要な役割を果たす。癌においては膀胱癌など一次繊毛が消失して増殖が盛んになっている癌が多いが、一方、一部の腫瘍（基底細胞癌など）ではびまん性に一次繊毛を有し、これがむしろヘッジホッグ(HH)経路を活性化させ細胞増殖に傾くことが知られている。また、この HH 経路を標的とする薬剤の開発が進んでいる。このため、腫瘍が一次繊毛を有するか否かは薬剤による抗腫瘍戦略を考えた時に重要な因子といえるが、未だ一次繊毛の有無が検討されていない腫瘍が多い。そこで、ARL13B やアセチル化 チュブリンという一次繊毛マーカーに対する抗体を使用した免疫組織化学と、ナノスーツ法電顕観察により一次繊毛をびまん性に有する腫瘍の種類を確定させる。同時に一次繊毛の構造自体も正常 vs 腫瘍細胞、腫瘍細胞間で違いがあるのかどうか、検討する。さらに、HH 経路分子である SMO, GLI 等の蛋白質の発現を調べ、HH 経路が活性化しているのかどうか検討する。また、該当細胞株での HH 経路阻害剤感受性についても検討する。さらに、腫瘍における一次繊毛形成に深く関わる分子を発現データを利用し、探索し、細胞株のレベルでその関与機構を検討する。

4. 研究成果

主な研究成果として、次の(1)-(5)を挙げる。

(1) ナノスーツ法を用いて唾液腺腫瘍における一次繊毛の電子顕微鏡像を取得することに世界で初めて成功した。8種類の病理組織型で構成される計100例の唾液腺腫瘍に対して、繊毛マーカー抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果、多形腺腫、基底細胞腺腫、腺様嚢胞癌、基底細胞腺癌では、解析した全ての症例で一次繊毛(+)であり、また、ワルチン腫瘍、唾液腺導管癌、粘表皮癌、腺房細胞癌では全ての症例で一次繊毛(-)であることが示された。この一次繊毛の有無の病理組織型区分は、筋上皮・基底細胞への分化の成分を含むか否かに対応した。さらに、浜松医科大学で近年開発されたナノスーツ法を用いて免疫染色標本を電界放出型走査電子顕微鏡観察することにより、細胞から突き出る一次繊毛の立体構造写真を得ることに成功した。また、ナノスーツ・correlative light electron microscopy (CLEM)法にて、免疫染色標本上の一次繊毛と同一部位に立体的な一次繊毛像を得た。この唾液腺腫瘍における一次繊毛は、正常組織における一次繊毛と比べ、長さが有意に長い、腫瘍内における生え方に4種の病理組織型間で違いがある、他臓器への直接浸潤、局所再発、遠隔転移を示した癌において一次繊毛が保持されている、という特徴を示した。また、興味深いことに、一次繊毛陽性唾液腺腫瘍では、ソニックヘッジホッグ(Shh)シグナル経路が活性化していた。最後に、初期繊毛形成に関わる遺伝子の内、一次繊毛状態と対応する発現状況を示すものをスクリーニングし、TTBK2という候補遺伝子を見つけた。このTTBK2は、一次繊毛陰性腫瘍に比べ陽性腫瘍で有意に蛋白質発現が高く、また、細胞株の実験ではTTBK2が一次繊毛形成率を上昇させることが示された。以上の結果は唾液腺の腫瘍化と一次繊毛との間の重要なリンクを示唆するものと考えられた。

(2) ナノスーツ法を用いて肺腫瘍における一次繊毛の電子顕微鏡像を取得し、その頻度を明らかにすることに世界で初めて成功した。肺の悪性腫瘍である腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌に対して、繊毛マーカーであるARL13Bに対する抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果、腺癌、扁平上皮癌に比べて、小細胞癌において高頻度で一次繊毛が存在することが明らかになった。確証を深めるため、異なる抗ARL13B抗体を用いた免疫組織化学を行うと同様な結果を示した。また、免疫蛍光染色を行うと、肺腫瘍における抗ARL13B抗体免疫蛍光陽性像は、別の繊毛マーカーであるアセチル化チュブリンに対する抗体での免疫蛍光陽性像と共在した。さらに、浜松医科大学で近年開発されたナノスーツ法を用いて、抗ARL13B抗体を用いた免疫染色標本を塩化金染色した後、電界放出型走査電子顕微鏡で観察した。このBSEモードで抗ARL13B抗体陽性部位が明らかになり、その部位をSEモードで観察することにより、一次繊毛の立体構造写真を得ることに成功した。以上のことから肺悪性腫瘍における一次繊毛の存在はより確実なものであると判断された。この肺悪性腫瘍における一次繊毛は、正常組織における一次繊毛と比べ、長さが有意に長いという性質を示し、また、肺小細胞癌で観察すると、Ki67陽性増殖細胞に一次繊毛が存在することも示された。さらには、リンパ節等への転移箇所において一次繊毛形質が保持されていることも示された。一次繊毛陽性肺癌では、Shhシグナル経路が活性化していることも示された。また、一次繊毛が高頻度に見られる小細胞肺癌は神経内分泌分化を示す悪性腫瘍であるので、対比的に、悪性度の度合いがより低い肺神経内分泌腫瘍であるカルチノイドでも一次繊毛状態を調べたところ、10%にしか一次繊毛は見られなかった。そこで、この差異を利用し、初期繊毛形成に関わる遺伝子の内、肺カルチノイドや肺正常部に比べ小細胞肺癌でmRNA高発現を示し、かつ、一次繊毛陰性である3種の固形癌ではmRNA高発現を示さないものをスクリーニングし、HYLS1という候補遺伝子が得られた。肺腫瘍で免疫組織化学的解析を行うと、蛋白質レベルでもこのHYLS1は肺カルチノイドや肺正常部に比べ小細胞肺癌で発現レベルが高いことが示された。最後に小細胞肺癌細胞株SBC-3を用い、HYLS1のsiRNAノックダウンを行うと、一次繊毛の陽性率や長さの減少が見られた。さらにsiRNA抵抗性のHYLS1発現誘導株を作り、HYLS1 siRNA処理すると、対照株と比べ一次繊毛の陽性率や長さの増加が示された。以上のデータは、HYLS1がヒト肺癌の一次繊毛制御に関わることを示唆するものと考えられた。

(3) 口腔内領域腫瘍における一次繊毛状態についても検討し、口腔内領域腫瘍において組織型によりその生えている頻度に大きな違いがあることを見出し、また、種々の特徴を示すことを明らかにした。

(4) 胸部悪性疾患の病理組織学的鑑別に特定の免疫染色陽性部位をナノスーツ・電顕観察することが有用であることを明らかにした。

(5) 消化管粘膜に蓄積したリン酸ランタンをナノスーツ・CLEM法により観察しエネルギー分散型X線分光器(EDS)元素分析を行い、HE標本上の茶色蓄積物がリン酸ランタンであることを確定させる手法の解析症例数を増やし、知見を集積させた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ooishi M, Yamada S, Itoh T, Meguro S, Yagi H, Kosugi I, Iwashita T, Shinmura K, Misawa K, Hariyama T, Kawasaki H	4. 巻 11
2. 論文標題 Diagnosis of Ion-Exchange Resin Depositions in Paraffin Sections Using Corrective Light and Electron Microscopy-NanoSuit Method.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics (Basel)	6. 最初と最後の頁 1193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11071193	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Shinmura K, Kusafuka K, Kawasaki H, Kato H, Hariyama T, Tsuchiya K, Kawanishi Y, Funai K, Misawa K, Mineta H, Sugimura H	4. 巻 254
2. 論文標題 Identification and characterization of primary cilia-positive salivary gland tumours exhibiting basaloid/myoepithelial differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 519-530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5688	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 Shinmura K, Kato H, Kawasaki H, Hariyama T, Yoshimura K, Tsuchiya K, Watanabe H, Ohta I, Asahina E, Sumiyoshi F, Hamada K, Kawanishi Y, Kawase A, Funai K, Sugimura H	4. 巻 103
2. 論文標題 Primary cilia are frequently present in small cell lung carcinomas, but not in non-small cell lung carcinomas or lung carcinoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 100007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.labinv.2022.100007	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 -

〔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 新村和也、草深公秀、河崎秀陽、加藤寿美、針山孝彦、土屋一夫、川西祐一、船井和仁、三澤清、峯田周幸、梶村春彦	
2. 発表標題 基底/筋上皮細胞分化を伴う唾液腺腫瘍におけるprimary ciliaの同定と機能	
3. 学会等名 第67回日本病理学会秋期特別総会	
4. 発表年 2021年	

1．発表者名 丸山保彦、新村和也、河崎秀陽、安田和世、松田昌範、鈴木誠、新井一守
2．発表標題 ナノスーツ技術を応用した光-電子相関顕微鏡(NanoSuit-CLEM)元素分析によるリン酸ランタン沈着の病理診断
3．学会等名 第18回日本消化管学会総会学術集会
4．発表年 2022年

1．発表者名 新村和也、加藤寿美、河崎秀陽、針山孝彦、吉村公雄、渡邊裕文、太田勲、川瀬晃和、船井和仁、梶村春彦
2．発表標題 肺腫瘍における一次繊毛の検討：小細胞肺癌における一次繊毛の高頻度同定とその機能について
3．学会等名 第112回日本病理学会総会
4．発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------