

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07265

研究課題名（和文）乳癌手術切除断端に対する生組織標本を用いた癌細胞の術中迅速診断の開発

研究課題名（英文）Intraoperative surgical margin assessment using human live tissue in breast conserving surgery

研究代表者

多根井 智紀（Tanei, Tomonori）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80771518

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）：我々は、乳癌細胞株や乳癌患者より採取された乳癌組織と正常乳腺組織に対してアクロレイン試薬とHoechstによる二重染色を行い、生組織片全体の染色像を弱倍率で蛍光顕微鏡にて撮影解析したところ、本試薬は正常乳腺組織に比して乳癌組織を濃度依存性に明確に濃染し、90%以上の感度・特異度で乳癌組織と正常乳腺組織を判別できた。また同組織を強倍率での観察したところ、二重染色によって細胞単位（癌細胞（浸潤癌、非浸潤癌）、正常乳腺上皮細胞等）での形態的な病理学的評価を行うことができた。我々は複数の論文にて研究成果を報告しており、簡易的で正確な本測定法は乳腺切除断端の術中迅速診断に応用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アジドプローブ法は癌の細胞質内に直接蛍光標識されるプローブであり、細胞レベルで形態を識別することが可能で病理像と類似した形態の可視化できる。本研究は、生組織標本、及びその捺印細胞を用いて形態的に細胞単位にまで癌細胞の遺残の有無や局在診断を詳細に確認できる画期的な測定方法である。また蛍光画像を機械学習を用いたAIの画像診断を行うことにより、簡易で短時間に細胞レベルでの病理像と類似した形態を可視化できる新しい測定方法を開発することができれば、温存手術の際、手術中に手術室内で切除断端組織における癌細胞の遺残の有無を確認することができ、非常に有用な手術中の診断ツールとなると考える。

研究成果の概要（英文）：Our Acrolein-probe method can rapidly discriminate between cancer and normal cells, requiring only staining of live tissues for 5 min. Moreover, it can visualize cancer morphology and provide localization in a way almost equivalent to frozen sectioning. It is not dependent on the timing of enzymatic reactions or enzyme expression by cancer cells since it focuses explicitly on the overexpression of endogenously generated acrolein in various cancer cells. The rapid in-cell cascade reactions selectively anchor the fluorescence label onto the cellular constituents in tumors. Our chemistry-based method has the potential to become a new highly selective margin management method for live tissues. It could be used as a discriminative, low-cost, and easy-to-perform method for cancer sensing during surgery.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 術中迅速診断 アクロレイン 生細胞 乳腺切除断端 乳房温存手術

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌は女性の中で最も罹患率の高い癌腫であり、現在、多くの早期乳癌患者に対して、乳房温存手術と術後の残存乳房放射線治療が施行されている。手術後の乳癌切除標本での病理組織診断において乳腺断端に癌細胞が存在した場合には、乳房内局所再発の割合が非常に高くなることが知られており、外科医は局所再発制御の為に、できる限り断端を陰性にするよう努力する必要がある。本邦では乳房温存手術の際、手術中に断端組織の迅速組織診断を用いて癌の遺残の有無を確認していることが多くの施設で行われ、断端陽性を確認した場合には乳腺追加切除を行い、最終的に乳腺断端を陰性に保つことが必要とされている。しかし、迅速組織診断では、手術中に乳腺組織を手術室より搬送し、病理部門にて標本を作製する煩雑な処理や病理医の診断を必要とする為、病理部門・病理医への時間と労力の負担を伴い、手術時間を延長させる要因になっている。

(2) 今回、我々は断端組織の生組織標本に対して、手術室内にて正確で短時間・簡便に術中迅速診断を行う測定方法が実現できれば、実臨床の多くの乳癌手術の際に活用できる測定方法となりうると考えた。現在のところ、乳腺生組織標本を用いた癌測定法の研究は報告されているが、良悪性の診断基準が定まっておらず、高価な機器で撮影に時間がかかるため実用化は難しく、探索的な研究が報告されているのみである。最近、ケミカルプローブを用いた生組織の癌診断に関する研究が複数報告されているが、それらは蛍光発現が時間依存性に増加する問題や、症例による再現性や高い蛍光バックグラウンドなどの課題があり、腫瘍組織のマクロサイズでの大まかな癌病巣については評価可能であるが、病理組織診断と同等程度の微小サイズの癌の検出や明確な癌の形態や局在を評価することは困難である。

(3) そこで我々は、簡易で短時間に細胞レベルでの病理像と類似した形態を可視化できる新しい測定方法を開発することができれば、温存手術の際、手術中に手術室内で切除断端組織における癌細胞の遺残の有無を確認することができ、非常に有用な手術中の診断ツールとして活用できると判断した。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、乳癌の乳房温存手術の際、乳腺断端の生組織標本に対して直接、試薬染色(アジドプローブ法:癌細胞質内にカスケード反応により直接蛍光標識されるプローブ)を施行し、得られた蛍光画像を用いて解析を行い、癌細胞の有無を正確で短時間・簡便に診断することのできる術中迅速診断法を開発することを目的としている。

(2) 我々がアジドプローブ法による二重蛍光染色とH&E染色の形態像を比較したところ、Hoechstとヘマトキシリン(核)染色、アジドプローブとエオジン(細胞質)染色が、それぞれに対応して乳癌(浸潤癌と非浸潤癌)の病理組織診断と類似した形態像として明確に画像化できることから、細胞単位での病理学的評価が可能かどうかを確認する。

(3) また、本測定法は、アジドプローブ法では生体の生組織標本に直接、乳腺切除断端の術中迅速診断に応用可能な測定診断と5分間、染色する(漬す)だけで反応させることができることから、乳癌における断端の術中迅速診断に実用可能かを確認する。

3. 研究の方法

(1) 我々は、乳癌手術における乳腺切除断端の術中迅速診断に対して、アジドプローブ法(生組織標本に対して直接、アジドプローブとHoechstによる二重染色を行い、蛍光顕微鏡にて測

定・診断)の臨床に応用可能な測定方法の確立を目指して、大阪大学医学部附属病院での乳癌手術を施行された切除標本における残余の原発巣の乳癌組織、周囲近傍の乳腺組織、正常乳腺組織を用いて、アジドプローブ法の診断に対する臨床研究を行っている。実際には、同意取得された乳癌患者の残余の乳腺切除組織片を利用し、それぞれ試薬に浸して染色した後、蛍光顕微鏡にて測定・診断を行っている。

(2) それらの組織片は、凍結標本切片による病理診断、パラフィンブロック切片による病理組織診断も行い、本測定法と術中迅速病理診断との判定結果の比較を行っている。そして最終的な病理組織診断と本測定法の一致率(正診率)や感度・特異度の測定を行う。

4. 研究成果

(1) 我々は癌細胞などの酸化ストレスの多い細胞で高発現するアクロレインに有機反応を起こして細胞に取り込まれるアジドプローブ試薬を使用し、細胞実験において正常細胞株に比して多種の癌細胞株が有意に濃染されることを確認している。アクロレインとは、喫煙や有機物の燃焼の際に発生する物質であり、不飽和アルデヒド分子の中で最もサイズが小さく、非常に反応性が高い分子であり、癌などの酸化ストレスを原因とする疾患においても、脂質やポリアミンの代謝産物としてアクロレインが過剰に発生している。共同研究機関である理化学研究所田中研究室は、蛍光基を持つアジド化合物(アジドプローブ)を細胞にふりかけることにより、生きている細胞が放出するアクロレインを直接的に観察(可視化)することに成功している。

(2) 我々は乳癌患者より採取された乳癌組織と正常乳腺組織に対して本試薬とHoechstによる二重染色を行い(アジドプローブ法)生組織片全体の染色像を弱倍率(20倍率)で蛍光顕微鏡にて撮影解析したところ(図1)、本試薬は正常乳腺組織に比して乳癌組織を濃度依存性に明確に濃染し、90%以上の感度・特異度で乳癌組織と正常乳腺組織を判別でき(図2)強倍率(200倍率)での観察にて二重染色によって細胞単位(癌細胞(浸潤癌、非浸潤癌)、正常乳腺上皮細胞等)での形態的な病理学的評価が可能であった(図3)。

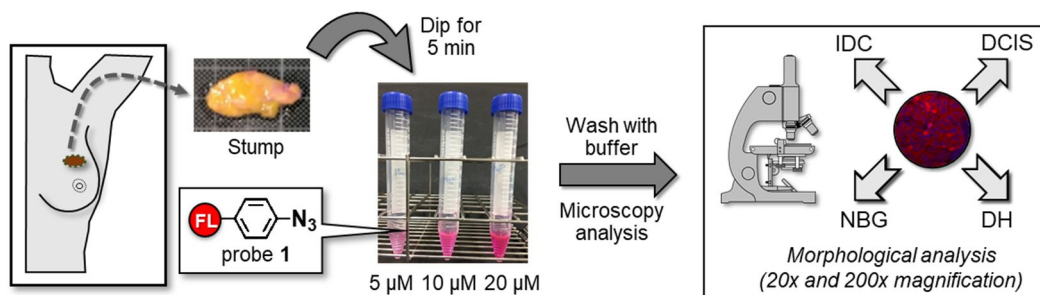


図1:本測定法のシェーマ(上図)。

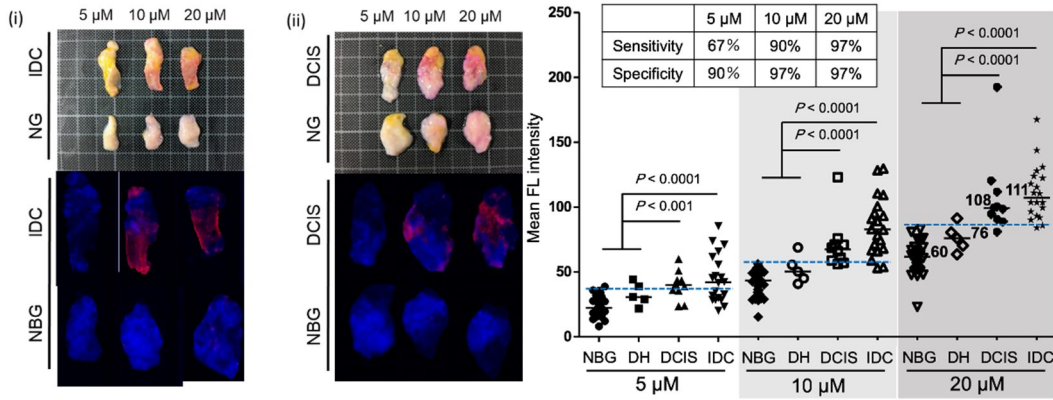


図 2 : 生組織標本肉眼写真と本試薬の全体撮影像 (左図)、全体撮影像の蛍光強度中央値 (浸潤癌 20 例、非浸潤癌 10 例、正常乳腺 30 例) (右図)

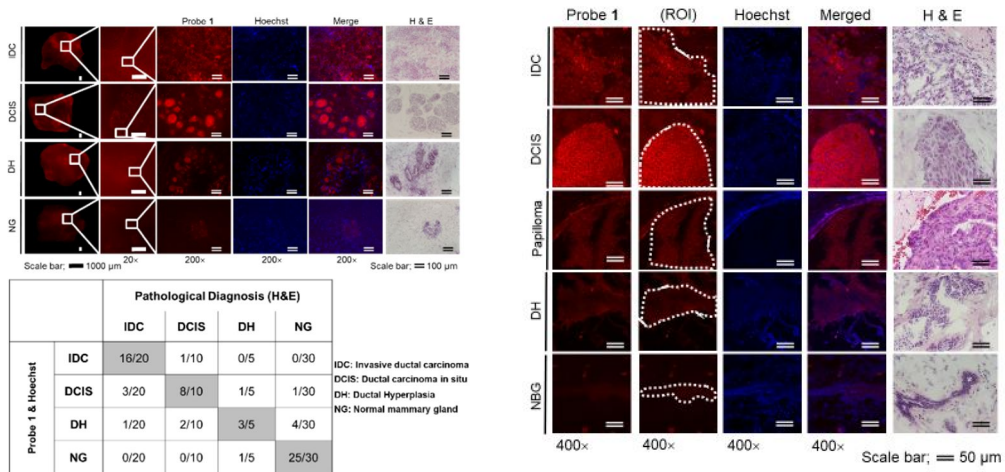


図 3: 生組織標本に対する強倍率 (左図: 200 倍率、右図: 400 倍率 (共焦点顕微鏡)) での本試薬の蛍光顕微鏡像と病理組織診断 (H & E 染色) との比較

(3) また、我々はアジドプローブ法が微小な乳癌病巣について診断可能であるか確認する為に、乳癌の乳房全摘術の標本を対象とし、腫瘍縁より 1~2cm 程度離れた所から (近傍) 乳腺組織片を採取して (乳房温存手術における切除断端のシミュレーション) を行っているところであり、アジドプローブ法は凍結病理組織診と同等の高い正診率を認めており、微小病変も診断することが可能であることを学会報告している。

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 3件）

1. 著者名 Pradipta AR, Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Noguchi S, Tanaka K.	4. 巻 10.1002
2. 論文標題 Emerging Technologies for Real Time Intraoperative Margin Assessment in Future Breast Conserving Surgery.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Science (Weinh)	6. 最初と最後の頁 201901519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Pradipta AR, Fujii M, Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Noguchi S, Tanaka K.	4. 巻 27(11)
2. 論文標題 Tetramethylrhodamine is an essential scaffold of azide probe in detecting cellular acrolein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2228-2234.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.04.026	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 Tanei Tomonori, Pradipta Ambara R., Morimoto Koji, Fujii Motoko, Arata Mayumi, Ito Akihiro, Yoshida Minoru, Saigitbatalova Elena, Kurbangalieva Almira, Ikeda Jun-ichiro, Morii Eiichi, Noguchi Shinzaburo, Tanaka Katsunori	4. 巻 6
2. 論文標題 Cascade Reaction in Human Live Tissue Allows Clinically Applicable Diagnosis of Breast Cancer Morphology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 1801479 ~ 1801479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomonori Tanei, Ambara R. Pradipta, Koji Morimoto, Motoko Fujii, Junichiro Ikeda, Eiichi Morii, Shinzaburo Noguchi and Katsunori Tanaka
2. 発表標題 "Click-to-Sense" Acrolein Probe Allows Highly Discriminative, Rapid, Low-Cost and Easy-to-Perform Diagnosis of Breast Cancer Morphology in Live Tissues
3. 学会等名 The 16th St. Gallen Breast Cancer Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多根井 智紀, Pradipta Ambara, 盛本 浩二, 藤井 素子, 三宅 智博, 直居 靖人, 加々良 尚文, 下田 雅史, 島津 研三, 金 昇晋, 池田純一郎, 森井英一, 田中 克典, 野口 眞三郎
2. 発表標題 生組織標本を用いた乳腺切除断端の術中迅速診断法の開発
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多根井 智紀, Pradipta Ambara, 盛本 浩二, 藤井 素子, 三宅 智博, 直居 靖人, 加々良 尚文, 下田 雅史, 島津 研三, 金 昇晋, 田中 克典, 野口眞三郎
2. 発表標題 生組織の標本・捺印細胞を用いた乳腺切除断端の術中迅速診断法の開発
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Tanei, Ambara R. Pradipta, Koji Morimoto, Motoko Fujii2, Junichiro Ikeda, Eiichi Morii, Shinzaburo Noguchi, and Katsunori Tanaka
2. 発表標題 "Click-to-Sense" Acrolein Probe Allows Highly Discriminative, Rapid, Low-Cost and Easy-to-Perform Diagnosis of Breast Cancer Morphology in Live Tissues
3. 学会等名 St.Gallen International Breast Cancer Conference (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	PRADIPTA AMBARA (PRADIPTA AMBARA) (90631648)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・基礎科学特別研究員 (82401)	

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