

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16557

研究課題名（和文）3次元血管構造に基づいた新規病理診断法の開発

研究課題名（英文）Development of 3D histopathological vascular imaging

研究代表者

野島 聡（Satoshi, Nojima）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40528791

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 300,000円

研究成果の概要（和文）：正常大脳組織および腫瘍組織の随伴血管のイメージングを行った。CUBIC-L, CUBIC-R+を用いて透明化処理を行い、Tomato-lectinを用いて染色することで、腫瘍随伴血管の走行や分布の不整さについて、明瞭にイメージングすることができた。また、特発性心筋症についても、CUBIC-HL, CUBIC-R+を用いて透明化処理を行い、SYTO16を用い染色することで、心筋細胞の走行について明瞭にイメージングできた。このイメージングにおいて、拡張型心筋症の心筋は心筋径が一定でなく、走行もやや錯綜していることが描出できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透明化試薬、蛍光プローブを用いることで、腫瘍内部を走行する血管構造を明瞭にイメージングする手法を確立することができた。今後これらの技術が標準化されることで、従来では難しかった診断が可能になることや、自動診断の発展に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We could perform imaging of vasculature in brain tumor using tissue-clearing method by CUBIC-L, CUBIC-R+ reagents and fluorescent dye-conjugated Tomato-lectin. We were also able to observe irregular arrangement of myocardial fibers in a tissue from a patient of dilated cardiomyopathy.

研究分野：実験病理、診断病理

キーワード：イメージング 組織透明化 3次元イメージング 人工知能 機械学習

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

病理組織診断は、腫瘍の悪性度・分化度・転移の程度や、病変の炎症・線維化の程度といった所見を組織形態学的に診断する医行為のことで、病理診断医という専門の医師がこれを行っている。病理組織診断の結果は患者の治療方針の決定に直接関わり、医療における最終診断と位置付けられている。病理組織診断は、固定後薄切した組織標本を HE 染色で染色し作製したスライドガラスを用いて行われるが、その標本作製方法・染色方法の根幹については、1870 年代に HE 染色が開発されて以来ほとんど改変が加えられておらず、新たな技術の導入が望まれている。

一方で、近年、基礎生命科学分野において蛍光顕微鏡を利用した最先端イメージング技術が目覚ましい発展を遂げている。特に、生体組織を透明化し、3 次元的に観察する技術について次々と新しい試薬、光学的機器が開発されてきており、その代表格である独立行政法人理化学研究所を中心に開発された生体透明化試薬および 3 次元イメージング技術である CUBIC は、マウス成体の臓器を透明化し 1 細胞解像度で観察する画期的な新技術であり、世界的にも大きな注目を集めている (Susaki EA, Ueda HR, et al. *Cell*. 2014 Apr; Tainaka K, Ueda HR, et al. *Cell*. 2014 Nov)。本技術により、マウスの臓器・全身丸ごとを透明化することがはじめて可能となり、透明化した臓器や個体サンプルを共焦点蛍光顕微鏡やライトシート蛍光顕微鏡で観察することにより、体内の解剖学的構造や遺伝子発現などの様子を、“1 細胞解像度”の 3 次元イメージとして取得することが可能となっている。全身の細胞の働きを高解像度かつ網羅的に観察するこの技術は、生物学だけでなく医学分野にも多大な貢献をもたらすことが期待されているが、実際の臨床検体、特に病理組織標本においてこれを実践レベルにまで応用した報告はまだほとんどなく、実際の臨床検査に応用されるためには、さらなる技術的検索がなされ、方法論が標準化されることが必要と考えられている。

## 2. 研究の目的

申請者の研究プロジェクトはこの最先端イメージング技術である CUBIC をヒト病理組織診断に応用せんとする試みで、最先端イメージング技術と古典的病理形態学の融合を目指すものである。ヒト病理組織を透明化の後、最新鋭の蛍光顕微鏡を用いて立体的・網羅的に観察、得られた 3 次元的病理組織学的所見を集積することにより、まったく新しい診断手法を確立し、最先端イメージング技術と古典的病理組織形態学的を融合させることを目的としている。

## 3. 研究の方法

研究開始前に、申請者は既に CUBIC を病理組織検体の 3 次元イメージングに応用、その有用性を検討し、ヒト組織を良好に透明化・3 次元的に撮影する実験条件を確立していた (Nojima S, et al. *Sci Rep*. 2017)。これらの検討から、3 次元でも病理組織学的診断が十分に可能な解像度にて細胞形態・組織構築が観察できることが証明されており、また、ホールマウント免疫染色やコンゴレッド染色のような特殊染色を併用し、

特定の分子・物質を染色する方法についても確立ができていた。さらに、これらの手法とレクチンによる染色を組み合わせ、ヒト組織内の血管の走行を明瞭にイメージングし、その3次元構築を評価する方法を予備的に見出していた。

これらの手法を応用し、本研究計画では、患者由来の腫瘍組織における血管の3次元構築を研究対象とした。透明化試薬について複数の種類のもの（CUBUC-1, CUIBC-2, CUBIC-L, CUBIC-R+, CUBIC-HL 等）を試し、蛍光プローブ（各種のレクチン等）や抗体についても条件検討を行った。明瞭なイメージングが行えた後に、3次元血管構造データを取得、IMARIS 画像解析ソフトウェアを用いて解析し、分岐の本数・複雑さ、蛇行の程度、血管径の不均一性といった所見について評価を行った。同様の手法を、他の疾患である特発性心筋症にも応用した。

また、上記のイメージングの将来的な応用を見越し、機械学習系の導入も行った。尿細胞診スライドガラスより細胞診画像を取得し、尿路上皮癌を含む画像あるいは含まない画像を収集、VGG-16 を基盤とする機械学習を用いて training/test を行い、悪性細胞のスクリーニング成績の評価を行った。これらの学習の際に、必要に応じ臨床情報の教師情報としての付与も行った。

#### 4 . 研究成果

研究計画に従い、正常大脳組織および腫瘍組織の随伴血管のイメージングを行った。組織検体として、神経膠腫（Glioblastoma, WHO grade IV）のパラフィンブロック包埋組織を脱パラフィンして用い、透明化試薬の種類や処理時間、蛍光プローブの種類や染色条件について最適化を行った。条件検討の結果、検討した条件の中では、CUBIC-L, CUBIC-R+を用いて透明化処理を行い、Tomato-lectin を用いて染色した場合に、最も良好に腫瘍随伴血管のイメージングできた。この条件のイメージングにおいて、腫瘍随伴血管の走行や分布の不整さについて、明瞭にイメージングすることができた。

また、別の題材疾患である特発性心筋症についてもイメージングを行った。その結果、CUBIC-HL, CUBIC-R+を用いて透明化処理を行い、SYT016 を用い染色した場合に最も、心筋細胞の走行について明瞭にイメージングできた。このイメージングにおいて、拡張型心筋症の心筋は心筋径が一定でなく、走行もやや錯綜していることが描出できた。

また、こういった3次元イメージング技術の将来的な臨床応用を想定して、機械学習を用いた診断系の確立を独立して行った。題材として尿細胞診検体における尿路上皮癌細胞のスクリーニングを用い、検体内における癌細胞を好成績でスクリーニングできる診断系を確立することに成功した。また、通常細胞診からは診断できないとされている、癌が浸潤癌か否か、高異型度癌かといった要素を診断する機械学習システムの確立も達成することができた（Nojima S, et al. *Cancer Cytopathol.* 2021, in press）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsumoto Shinji, Yamamichi Taku, Shinzawa Koei, Kasahara Yuuya, Nojima Satoshi, Kodama Takahiro, Obika Satoshi, Takehara Tetsuo, Morii Eiichi, Okuyama Hiroomi, Kikuchi Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 GREB1 induced by Wnt signaling promotes development of hepatoblastoma by suppressing TGF signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11533-x	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 Edahiro Ryuya, Shiroyama Takayuki, Hijiki Sachiko, Nojima Satoshi, Shirai Yuya, Koyama Shohei, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 140
2. 論文標題 Severe myocarditis with slight lymphocytic infiltration after nivolumab treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 116 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2019.12.004	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 Tsuda T, Nishide M, Maeda Y, Hayama Y, Koyama S, Nojima S, Takamatsu H, Okuzaki D, Morita T, Nakatani T, Kato Y, Nakanishi Y, Futami Y, Suga Y, Naito Y, Konaka H, Satoh S, Naito M, Izumi M, Obata S, Nakatani A, Shikina T, Takeda K, Hayama M, Inohara H, Kumanogoh A	4. 巻 145
2. 論文標題 Pathological and therapeutic implications of eosinophil-derived semaphorin 4D in eosinophilic chronic rhinosinusitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 843 ~ 854.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2019.12.893	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 Kenji Ohshima, Satoshi Nojima, Shinichiro Tahara, Masako Kurashige, Keisuke Kawasaki, Yumiko Hori, Moyu Taniguchi, Yutaka Umakoshi, Daisuke Okuzaki, Naoki Wada, Jun-ichiro Ikeda, Eiichiro Fukusaki, Eiichi Morii	4. 巻 2
2. 論文標題 Serine racemase enhances growth of colorectal cancer by producing pyruvate from serine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 81 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-019-0156-2.	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 Fukushima Kiyoharu, Satoh Takashi, Sugihara Fuminori, Sato Yuki, Okamoto Toru, Mitsui Yuichi, Yoshio Sachiyo, Li Songling, Nojima Satoshi, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Kida Hiroshi, Standley Daron M., Morii Eiichi, Kanto Tatsuya, Yanagita Motoko, Matsuura Yoshiharu, Nagasawa Takashi, Kumanogoh Atsushi, Akira Shizuo	4. 巻 52
2. 論文標題 Dysregulated Expression of the Nuclear Exosome Targeting Complex Component Rbm7 in Nonhematopoietic Cells Licenses the Development of Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 542 ~ 556.e13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2020.02.007	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 Kawashima Atsunari, Kanazawa Takayuki, Kidani Yujiro, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Tumour grade significantly correlates with total dysfunction of tumour tissue-infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63060-1	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 Kawasaki Keisuke, Nojima Satoshi, Hijiki Sachiko, Tahara Shinichiro, Ohshima Kenji, Matsui Takahiro, Hori Yumiko, Kurashige Masako, Umeda Daisuke, Kiyokawa Hiroki, Kido Kansuke, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi	4. 巻 111
2. 論文標題 FAM111B enhances proliferation of KRAS driven lung adenocarcinoma by degrading p16	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2635 ~ 2646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14483	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 Hayashi Yujiro, Fujita Kazutoshi, Nojima Satoshi, Tomiyama Eisuke, Matsushita Makoto, Koh Yoko, Nakano Kosuke, Wang Cong, Ishizuya Yu, Kato Taigo, Hatano Koji, Kawashima Atsunari, Ujike Takeshi, Uemura Motohide, Imamura Ryoichi, Morii Eiichi, Nonomura Norio	4. 巻 14
2. 論文標題 TERT C228T mutation in non malignant bladder urothelium is associated with intravesical recurrence for patients with non muscle invasive bladder cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 2375 ~ 2383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12746	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 Ohshima Kenji, Nojima Satoshi, Tahara Shinichiro, Kurashige Masako, Kawasaki Keisuke, Hori Yumiko, Taniguchi Moyu, Umakoshi Yutaka, Okuzaki Daisuke, Wada Naoki, Ikeda Jun-ichiro, Fukusaki Eiichiro, Morii Eiichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Serine racemase enhances growth of colorectal cancer by producing pyruvate from serine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 81 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-019-0156-2	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 Tone Mitsuyo, Tahara Shinichiro, Nojima Satoshi, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi	4. 巻 111
2. 論文標題 HTR3A is correlated with unfavorable histology and promotes proliferation through ERK phosphorylation in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3953 ~ 3961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14592	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 Luo Wenjuan, Tahara Shinichiro, Kawasaki Keisuke, Kobayashi Ayaka, Nojima Satoshi, Morii Eiichi	4. 巻 21
2. 論文標題 The expression of trefoil factor 3 is related to histologic subtypes and invasiveness in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12325	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 Motooka Kei, Morishita Koichi, Ito Nami, Shinzaki Shinichiro, Tashiro Taku, Nojima Satoshi, Shimizu Kayoko, Date Mutsuhiro, Sakata Natsumi, Yamada Momoko, Takamatsu Shinji, Kamada Yoshihiro, Iijima Hideki, Mizushima Tsunekazu, Morii Eiichi, Takehara Tetsuo, Miyoshi Eiji	4. 巻 27
2. 論文標題 Detection of fucosylated haptoglobin using the 10-7G antibody as a biomarker for evaluating endoscopic remission in ulcerative colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 162 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v27.i2.162	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 Ito Nami, Yamada Momoko, Morishita Koichi, Nojima Satoshi, Motooka Kei, Sakata Natsumi, Asuka Tatsuya, Otsu Ryoji, Takamatsu Shinji, Kamada Yoshihiro, Mori Soichiro, Akita Hirofumi, Eguchi Hidetoshi, Morii Eiichi, Miyoshi Eiji	4. 巻 38
2. 論文標題 Identification of fucosylated haptoglobin producing cells in pancreatic cancer tissue and its molecular mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 45 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-020-09970-8	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 Kusumoto Shinya, Kurashige Masako, Ohshima Kenji, Tahara Shinichiro, Matsui Takahiro, Nojima Satoshi, Hattori Satoshi, Morii Eiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 An immature inhibin expressing subpopulation of ovarian clear cell carcinoma cells is related to an unfavorable prognosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1485 ~ 1500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3801	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 Koba Taro, Takeda Yoshito, Narumi Ryohei, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 Proteomics of serum extracellular vesicles identifies a novel COPD biomarker, fibulin-3 from elastic fibres	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 00658 ~ 2020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/23120541.00658-2020	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 Satoshi Nojima, Kei Terayama, Saeko Shimoura, Sachiko Hijiki, Norio Nonomura, Eiichi Morii, Yasushi Okuno, Kazutoshi Fujita	4. 巻 in press
2. 論文標題 A deep learning system to diagnose the malignant potential of urothelial carcinoma cells in cytology specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Cytopathology	6. 最初と最後の頁 in press
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野島聡
2. 発表標題 病理組織標本の透明化と3次元イメージング
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会 シンポジウム4
4. 発表年 2020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
---------	---------