

平成22年 5月19日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791553
 研究課題名 (和文) 口腔癌における血管・リンパ管の新生誘導と脈管侵襲の3次元形態解析
 研究課題名 (英文) Three-dimensional quantification of blood/lymph vessel formation and invasion in oral cancers
 研究代表者
 島津 徳人 (YOSHIHITO SHIMAZU)
 日本歯科大学・生命歯学部・講師
 研究者番号：10297947

研究成果の概要 (和文)：

口腔癌の増殖・浸潤と予後判定の精度を高めることを長期課題として、交付期間においては、癌実質と血管/リンパ管を含む間質要素を特異抗体により免疫標識した上で、癌微小環境における構成要素の空間情報を保持した3次元組織立体構築法を確立した。再構築した組織空間では、癌実質・間質の境界形状、分断された癌巣の分布、血管・リンパ管の走行を可視化できるとともに、癌細胞の脈管侵襲の有無について定量解析できることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

The present study aimed at gaining 3D quantitative information about invasion front pattern, angiogenesis, and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. During the approved 2-year-period, the P.I. developed the experimental protocol and procedures of histology-based 3D reconstruction comprising multiple immunolabeling of cancer constituents (e.g., carcinoma cells and blood/lymph endothelial cells), alignment and superposition of digitized images, and computer-assisted color segmentation of labeled targets. The reconstructed 3D images allow us to inspect visually and quantitatively the complex architecture of cancer lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学・病態検査学

キーワード：口腔癌、脈管新生、脈管侵襲、免疫組織化学、3次元構築

1. 研究開始当初の背景

口腔領域に発症する悪性腫瘍の大部分は口腔粘膜上皮に由来する扁平上皮癌であ

り、疫学調査では高齢者に限らず若年者でも口腔癌の発症に至る症例が増えていることが指摘されている。口腔癌の病理組織診断に

においては、さまざまな組織染色を施した病理組織標本を光学顕微鏡で観察することにより、癌病変の広がりや予後判定が試みられている。これまでの研究成果のなかでは、口腔癌のうちで最も発症頻度の高い舌癌の臨床病理診断においては、癌の浸潤様式の組織所見に基づく Y-K 分類が所属リンパ節転移を含む予後判定に有用であると報告されている。ただし、組織標本に現れる癌病変の 2 次元観察のみにおいては、癌胞巣の連続性や周囲の血管、リンパ管への侵襲の有無を評価するのが困難な場合も多い。近年、病理診断分野には組織染色画像を高分解能でデジタル記録できるバーチャル・スライド装置が導入されており、多数枚数の連続組織画像を比較的短時間で記録・保存し、3 次元構築ソフトにより組織立体構築を遂行できる環境が整ってきた。同時に、ヒト癌病変の組織診断においては、多種多様な特異抗体による免疫組織化学の手法が確立されるなかで、自動免疫装置の併用により多数の組織標本の免疫標識も日常的に行われている。これらの癌病理診断の現状を踏まえて、新たな組織診断指標を探る目的で口腔癌の組織立体構築と 3 次元構造解析を到達目標に設定した。

2. 研究の目的

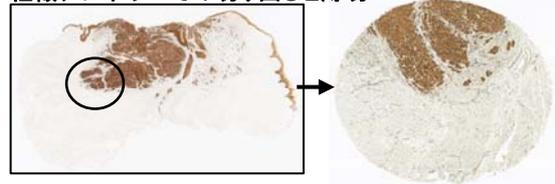
本研究の到達目標として、舌扁平上皮癌を対象として、癌細胞と脈管内皮細胞の免疫組織化学マーカーを併用した多重免疫標識法を確立するとともに、連続標識画像から標識細胞要素（癌細胞、血管・リンパ管内皮細胞）を色調分画したうえで空間情報を揃えて立体表示する組織立体構築法の確定を目指した。幸い、2 年間の交付期間においてバーチャル・スライド装置（NanoZoomer、浜松ホトニクス）が大学予算により購入されるなかで、個別抗体による免疫標識画像を高分解能でバーチャル記録することにより多段階の免

疫標識プロトコールに拡張することができた。このことにより、癌実質と間質との境界設定、複雑な走行を示す微細血管網とリンパ管網を分画することが可能となり、舌癌原発症例における浸潤能・転移能の判定根拠となりうる 3 次元空間での組織パラメータ（癌浸潤の広がり範囲、血管・リンパ管内皮細胞と癌細胞との近接度および脈管内浸潤の頻度）の定量解析法について確立することを目的とした。

3. 研究の方法

舌癌組織画像からの立体構築にあたっては、舌扁平上皮癌の最深達部の領域を組織アレイ法で円柱状（3mm 直径）に切り出し、回転式マイクロトームで連続切片（4 μm 厚さ、100 枚前後）を作製した。薄切片間の染色性の均一化や組織像の撮影時間を短縮化することを考慮して、ガラススライド上に薄切標本を 9 連続切片×3 列で配列した。癌胞巣・血管・リンパ管を分画した立体構築を実現するうえでは、上皮マーカーとしてサイトケラチンカクテル（AE1+AE3/34 β E12/MNF116）抗体、

組織アレイヤーでの切り出しと薄切



免疫標識・画像保存→免疫標識・画像保存



血管・リンパ管の分画

実質・間質・核の分画

立体画像間で空間座標を揃える

分画要素を統合して立体表示する

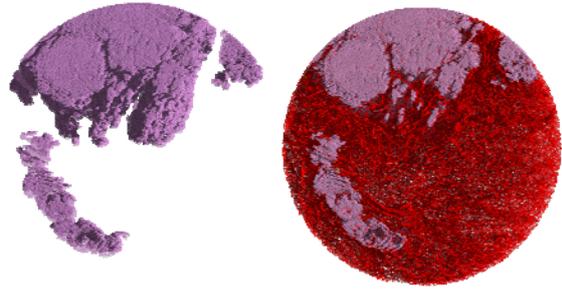
組織アレイ法による標的領域の切り出し、多重免疫標識とバーチャル画像記録に基づく立体構築過程。

リンパ管内皮細胞特異マーカには D2-40 抗体、血管内皮細胞特異マーカとして CD31 抗体を使用した免疫多重染色を実施し、抗体反応は ABC 法により異なる発色剤 (Vector SG と DAB) で識別した。連続薄切標本全域の染色画像については、NanoZoomer で対物×20 倍の分解能でデジタル記録した。この作業工程を繰り返すことにより、同じ組織標本に複数回の免疫標識→画像保存を実施できる。画像分解能は $0.92\mu\text{m}$ /ピクセルで、この画像分解能では単独の癌細胞の分離・計測が可能である。連続デジタル画像の積層・座標位置合わせ、組織要素の色調抽出、3 次元画像の観察と形態計測には RATOC TRI-SRF2 ソフトウェアを使用した。

4. 研究成果

多段階・多重免疫標識による癌実質と脈管網の立体構築：現在までに確立した舌癌の免疫標識の標準プロトコールでは、108 枚の連続薄切切片に CD31/D2-40 の二重免疫染色とサイトケラチンカクテル/Ki67 二重免疫標識を逐次実行することにより、癌実質とその周囲に発達した脈管網を立体構築できる。例示した癌組織領域 (3 mm 径、4 μm 厚×108 枚、3 mm^3 の組織空間) の立体構築像では、血管内皮、リンパ管内皮、癌細胞をそれぞれ色調分画して 3 次元表示している。この組織空間では 10^4 個オーダーの細胞が含まれているが、個々の細胞核を分画するとともに、Ki-67 陽性を示す分裂細胞の局在を俯瞰することもできた。今回の立体構築・3 次元構造解析では、画像積層処理と観察対象物の形状・色調抽出処理をすべて演算アルゴリズムに基づいて遂行しており、立体構築の精度と再現性の保証とともに、立体構築工程に要する労力・時間も大幅に短縮することが可能となった。3 次元空間に再現された癌実質と脈管網の各組織要素については、その容積・表面

積・数・長さ・3 次元座標位置に基づいた連結性と空間距離を計測することができる。



舌癌の浸潤先端での癌実質(左)と癌実質周囲の微小血管網(右)の組織立体構築像。

腫瘍血管・リンパ管の新生誘導と癌胞巣による脈管侵襲：

立体構築した組織空間には癌胞巣周囲に CD31 陽性の新生された血管が密度高く分布しており、癌胞巣を籠状に囲む微細な毛細血管網も再現できた。連続薄切片からの立体構築においては、画像の位置合わせ精度が課題となる。例示した癌胞巣周囲に発達した血管網から連続した単一の血管構造を抽出すると、太い血管から分枝した末梢血管網が連続して再構築できており、連続する血管の走行距離は 110mm に達することも計測できた。癌胞巣の血管・リンパ管への侵襲の有無を判定するうえで、3 次元空間座標で癌細胞マーカ、血管内皮マーカ、リンパ管内皮マーカがそれぞれ接する座標点を自動抽出できる。舌癌の複数症例についての立体構築画像での解析結果では、リンパ節転移の有無に関係なく癌胞巣は血管・リンパ管とは非常に多くの箇所 ($10^3\sim 10^4$ オーダー) で接触していることが確かめられた。さらに、癌胞巣と脈管の位置関係をモニター上で俯瞰することにより、血管・リンパ管との接触点が分散するのではなく、特定領域に集中する“ホットスポット”も発生していることも確かめられた。これらの“ホットスポット”領域をマウス操作により網羅的に拡大・精査することにより、癌胞巣がリンパ管壁を

突き破るように侵襲している箇所を検出することも容易であった。なお、これまでの検索例においては血管内腔へ浸潤した癌胞巣は検出されておらず、舌癌症例が早期にリンパ節転移を起こすことと関連する組織所見として注目している。

まとめ

本研究課題では、口腔癌の浸潤様式と予後判定の科学的根拠となる診断基準を確立することを到達目標として、口腔扁平上皮癌の症例から3次元空間での腫瘍宿主境界部を可視化するとともに、癌細胞と脈管内皮細胞の免疫組織化学マーカーを併用した多重免疫染色画像の立体構築に基づいて、癌胞巣周囲での血管・リンパ管網の空間分布を3次元形態解析した。免疫表現型の異なる組織要素の分画と連続画像の積層により、血管内皮、リンパ管内皮、粘膜上皮・癌胞巣を統合した3次元観察が可能であり、癌胞巣内部と周辺領域における微小脈管網の走行・密度・増殖活性を定量解析できた。3次元情報による癌の構造解析では、癌実質と脈管要素との空間配列に注目して、癌胞巣の脈管内侵襲の部位を半自動的に網羅的に特定できるとともに、脈管侵襲部位を任意の方位から診断できる。以上の成果に基づき、本研究課題で確立した組織立体構築法は口腔腫瘍の臨床病理診断に寄与できると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Shimazu Y, Kudo T, Yagishita H, Aoba, T. Three-dimensional visualization and quantification for the growth and invasion of oral squamous cell carcinoma、Japanese Dental science Review、査読有、46:17-25、2010

- ② 島津徳人、工藤朝雄、青葉孝昭：連続薄切病理標本から組織要素を分画して立体観察する、Medical Tech、査読無、37:1026-1027、2009

[学会発表] (計20件)

- ① 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、青葉孝昭、腫瘍微小環境の3次元構造解析：多形腺腫の組織多形と脈管間質、第54回日本唾液腺学会、平成21年12月5日、東京都文京区
- ② 島津徳人、工藤朝雄、田谷雄二、佐藤かおり、青葉孝昭、バーチャルスライドシステムの導入による広領域・高解像度の組織立体解析法の確立、第51回歯科基礎医学会、平成21年9月10日、新潟県新潟市
- ③ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、癌微小環境は舌癌胞巣の浸潤形態にどのように影響するか？、第51回歯科基礎医学会、平成21年9月10日、新潟県新潟市
- ④ 駒田幸穂、工藤朝雄、島津徳人、佐藤かおり、青葉孝昭、口腔粘膜の上皮・血管・リンパ管の部位特異的な構造特性に関する立体構造解析、第51回歯科基礎医学会、平成21年9月10日、新潟県新潟市
- ⑤ 島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における3次元組織形態解析(1)：癌胞巣と細胞異型、第6回日本病理学会カンファレンス、平成21年7月31日、茨城県つくば市
- ⑥ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における3次元組織形態解析(2)：脈管の新生と侵襲、第6回日本病理学会カンファレンス、平成21年7月31日、茨城県つくば市
- ⑦ 島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、青葉孝昭、唾液腺腫瘍の3次元形態解析：腫瘍

- 構成細胞の空間局在と胞巣構造、第 98 回日本病理学会、平成 21 年 5 月 3 日、京都府京都市
- ⑧ 柳下寿郎、工藤朝雄、島津徳人、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌にみられる局所浸潤様式の 3 次元形態解析、第 98 回日本病理学会、平成 21 年 5 月 3 日、京都府京都市
- ⑨ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における癌胞巣構造と脈管間質の 3 次元形態解析、第 98 回日本病理学会、平成 21 年 5 月 3 日、京都府京都市
- ⑩ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、青葉孝昭、唾液腺腫瘍の 3 次元構造解析：腫瘍構成細胞の表現型と増殖活性、第 53 回日本唾液腺学会、平成 20 年 12 月 6 日、東京都文京区
- ⑪ 佐藤かおり、島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、青葉孝昭、歯学部教育へのバーチャル・スライド導入と活用実績、第 21 回日本歯科医学会総会、平成 20 年 11 月 14、15 日、神奈川県横浜市
- ⑫ 島津徳人、工藤朝雄、東理頼亮、柳下寿郎、佐藤かおり、青葉孝昭、3 次元組織立体構築法による口腔病変の構造解析、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 25 日、東京都江東区
- ⑬ 佐藤かおり、島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、青葉孝昭、病理学教科へのバーチャル・スライド導入と活用実績、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 25 日、東京都江東区
- ⑭ 工藤朝雄、島津徳人、東理頼亮、柳下寿郎、青葉孝明、口腔腫瘍の 3 次元解析：腫瘍構造と増殖活性、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 23 日、東京都江東区
- ⑮ 水上彩、那須真奈、今井絵里、大徳知世、工藤朝雄、島津徳人、青葉孝昭口腔病変の 3 次元形態観察-病態解明と Web 教材化を目指して-、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 23 日、東京都江東区
- ⑯ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、青葉孝昭、唾液腺腫瘍における細胞表現型と空間局在の解析、第 19 回日本臨床口腔病理学会、平成 20 年 8 月 22 日、東京都、文京区
- ⑰ Kudo T, Shimazu Y, Yagishita H, taya Y, Sato K, Aoba T, Three-dimensional visualization and morphometry of oral squamous cell carcinoma, 86th IADR, 2008.7.4, Toronto, Canada
- ⑱ 柳下寿郎、工藤朝雄、島津徳人、青葉孝昭、口腔粘膜上皮内癌の免疫組織化学と 3 次元形態解析、第 97 回日本病理学会、平成 20 年 5 月 16 日、石川県金沢市
- ⑲ 柳下寿郎、工藤朝雄、島津徳人、青葉孝昭、3 次元組織立体構築法による口腔腫瘍構造解析、第 97 回日本病理学会、平成 20 年 5 月 16 日、石川県金沢市
- ⑳ 工藤朝雄、柳下寿郎、島津徳人、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における浸潤様式の 3 次元形態解析、第 97 回日本病理学会、平成 20 年 5 月 16 日、石川県金沢市

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 島津徳人 編集 (青葉孝昭 監修)、医歯薬出版、口腔病変立体構造アトラス-立体動画で組織構造と病変をみる-、2009、89 頁

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島津 徳人 (YOSHIHITO SHIMAZU)
 日本歯科大学・生命歯学部・講師
 研究者番号：10297947