

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12604

研究課題名（和文）機械学習を用いた新たな微小腫瘍自家蛍光イメージング法の開発

研究課題名（英文）Exploring non-labelling imaging tissue methods using machine learning

研究代表者

原田 義規（Harada, Yoshinori）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：10381956

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）：微小腫瘍の発生母地組織において、明らかな組織形態学的特徴が現れる前の状態で病態間の化学環境の変化を鋭敏に検出可能なラベルフリー分子イメージング技術の開発を行った。生体組織からマイクロメートルオーダーの高次元スペクトル画像を取得し、情報科学的手法などを用いて解析を行った。本研究で示されたラベルフリー分子イメージング技術は病態進行に伴う代謝関連分子の違いを画像化している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、高次元のスペクトルデータの根底にある構造をより少ない次元で可視化することができる次元削減を用いて、病理組織のスペクトル画像を解析した。本手法を用いると、明らかな組織形態学的特徴が現れる前の状態で病態間のスペクトル変化を鋭敏に検出可能であることを示した。この知見は、ラベルフリーイメージング法が病理組織学者・医学者にとって有用なツールであることを示すもので、ヒトへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed a label-free molecular imaging technique that can sensitively detect changes in the chemical environment between pathological states in the tissue of a microtumor's natal region before the appearance of obvious morphological features. We obtained micrometer-order high-dimensional spectral images from biological tissues and analyzed them using informatics and other techniques. This study's label-free molecular imaging technique images differences in metabolism-related molecules associated with pathological progression.

研究分野：実験病理学

キーワード：ラベルフリー 光イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化器組織は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) など代謝に関連する生体分子を含む。研究代表者は、自家蛍光物質に着目し大腸腫瘍を描出可能な2波長励起ラベルフリーイメージング法を開発した (Imaizumi et al. Gastrointest Endosc 2012, Miyawaki et al. Acta Histochem Cytochem 2014)。同法は、大腸粘膜上皮細胞に豊富に含まれる還元型 NADH を背景蛍光から分離して検出し、粘膜上皮の腫瘍化を選択的に描出できる手法である。本研究では、情報科学的手法を用いて自家蛍光イメージングを含むラベルフリーイメージング法の基礎技術を開発することを目指した。

2. 研究の目的

(1) 消化器組織には、ラベルフリーイメージング可能な自家蛍光物質等の様々な生体分子が含まれる。本研究では、情報科学的手法を用いて新たなラベルフリーイメージング法の基礎技術の開発を行った。研究課題の進捗状況を鑑み、2021年度より研究推進方策を見直し、自家蛍光、ラマン光を同時に取得可能な高感度分光イメージングシステムを用いて、消化器疾患組織 (特に、肝細胞癌の発生源となる非アルコール性脂肪性肝疾患組織) の解析を中心に行った。

3. 研究の方法

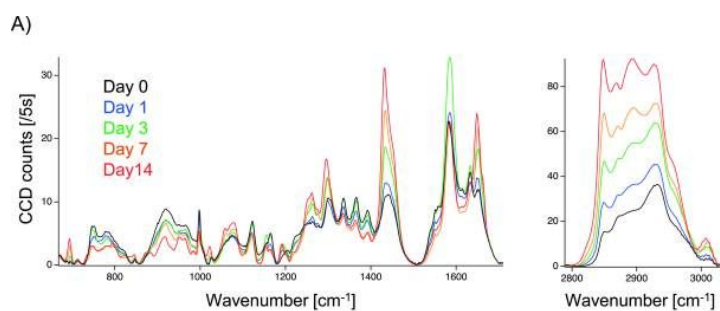
(1) 高脂肪高コレステロール食 (HFHC) を 0、1、3、7、14 日間給餌したラットのホルマリン固定肝組織に対して、ラマン・自家蛍光分析と病理組織解析 (ヘマトキシリン・エオジン、オイルレッド O 染色) を施行した。ホルマリン固定していない新鮮な肝組織のラマン分析では、HFHC 給餌期間が 0、1 日のラットから切除した肝組織を使用した。20 倍対物レンズでライン状に集光したレーザー光 (532 nm 励起) を検体に照射し、発生したラマン光と自家蛍光を冷却 CCD カメラにて分光計測した。

(2) 標準食 (SD)、高脂肪食 (HFD)、HFHC を 2、4、8、16 週間給餌したラットの新鮮肝組織断面のラマンマッピング画像 (5 μ m 毎) を得た (20 倍対物レンズで検体に点状に集光し、発生するラマン光と自家蛍光を測定)。各肝組織の病理組織解析と、高次元のスペクトルデータから構造をより少ない次元で可視化する次元削減手法 (等尺性マッピング、Isomap) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1-1) 非アルコール性脂肪性肝疾患の超早期状態における病理組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン染色像では HFHC 給餌 0、1 日目に脂肪化は明らかではなく、3 日目に明るい細胞質を有する肝細胞を認め、7、14 日目に肝細胞に大滴性、小滴性の脂肪滴がみられた。



オイルレッド O 染色では 1~14 日目の肝細胞に脂肪滴がみられ、7、14 日目には脂肪滴数・面積が増えた。

(1-2) 固定肝臓組織薄切切片のラマンスペクトルとラマン画像

肝臓組織の平均ラマンスペクトルには図 1A のように多くのラマンバンドを認めた。うち、697、1680、2854 cm^{-1} のバンドはコレステロール、タンパク、脂質からのシグナルと考えられた。コレステロールと脂質のバンドは HFHC 給餌期間が長くなると増加した。給餌 0 日のラット肝臓洞壁からはレチノールから発生する 3 つのバンド (1155、1192、1588 cm^{-1}) を認めた (図 1B)。

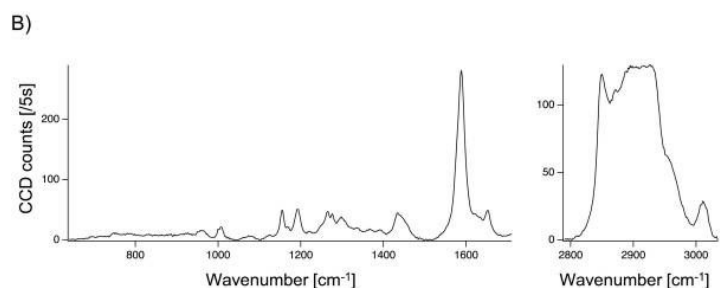


図 1 非アルコール性脂肪性肝疾患の初期段階におけるホルマリン固定薄切肝組織のラマンスペクトル。(A) 高脂肪高コレステロール食を 0~14 日間摂取させた後の薄切肝組織の平均ラマンスペクトル。(B) 高脂肪高コレステロール食給餌後 0 日目の類洞壁のラマンスペクトル (引用文献)。

ホルマリンによる化学固定検体では一細胞レベルの空間分解能でラマンイメージを構築できた。ヘマトキシリン・エオジン染色では HFHC 給餌 3 日目まで脂肪化を検出できなかったが、ラマンイメージでは HFHC 給餌 1 日目で脂肪化の描出が可能だった (図

2A) さらに、星細胞が有するレチノール含有脂肪滴を示すラマンシグナル (1588cm^{-1}) は肝細胞索に沿って存在していた。HFHC 給餌日数が多くなるにつれて、肝脂肪化面積の増加と肝星細胞のレチノール含有脂肪滴面積の減少を認めた (図 2B)。自家蛍光に関する有意な所見を抽出できなかったため、以後ラマン解析を中心に検討した。

A)

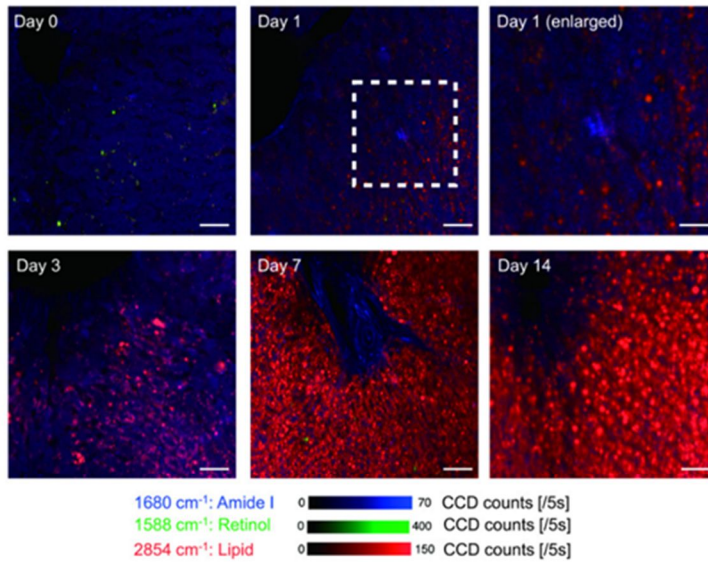
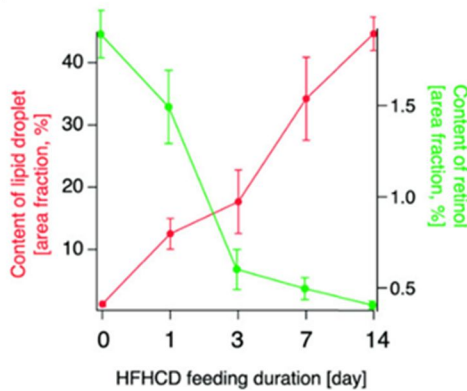


図 2 非アルコール性脂肪性肝疾の初期段階におけるホルマリン固定薄切肝組織のラマン顕微鏡画像。(A) HFHC 摂取 0、1、3、7、14 日後のラマンスペクトル画像。アミド I (青) レチノール (緑) 脂質 (赤) の合成ラマン画像を表示。バー = $50\ \mu\text{m}$ (0、1、3、7、14 日目) および $25\ \mu\text{m}$ (1 日目の拡大)。(B) HFHC 摂取後の肝臓における脂質およびレチノール含有量の領域の経時的変化。データは、それぞれの $2,854\ \text{cm}^{-1}$ および $1,588\ \text{cm}^{-1}$ のラマン信号で再構成された二値化空間分布上の脂質およびレチノールの面積分率の平均と標準偏差として示されている (引用文献)。

B)



(1-3) 新鮮肝組織のラマン画像

新鮮肝組織の被膜上からラマン画像を取得したところ、高脂肪高コレステロール食給餌 1 日目で既に 2854cm^{-1} のピーク強度が高く、脂肪化を検知可能であった (図 3)。

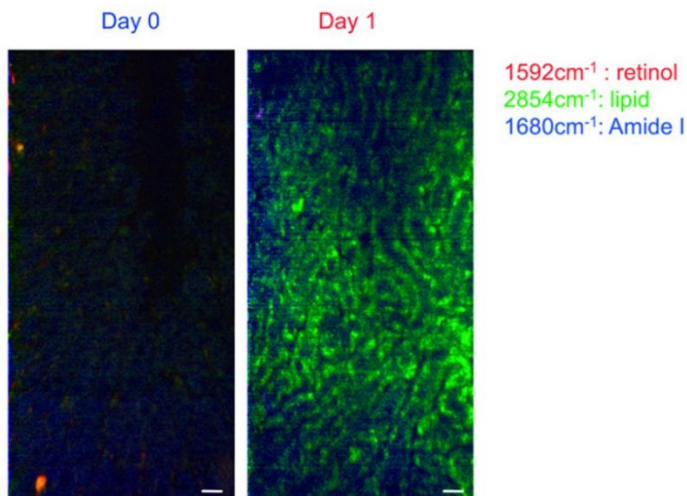


図 3 非アルコール性脂肪性肝疾患の初期段階にある新鮮肝臓検体の表面からの ex vivo ラマン画像。HFHC 摂取後 0 日目と 1 日目に取得されたアミド I ($1,680\ \text{cm}^{-1}$) レチノール ($1,592\ \text{cm}^{-1}$) 脂質 ($2,854\ \text{cm}^{-1}$) のラマンスペクトル画像。アミド I (青) レチノール (赤) 脂質 (緑) の合成画像が表示されている。Bar = $20\ \mu\text{m}$ (引用文献)

(2) 高次元のスペクトルデータの根底にある構造を、より少ない次元で可視化することができる次元削減 (Isomap) を用いてラマン画像を解析した。Isomap 空間で異なる食事負荷による肝組織内化学環境の時間的進行を調べた (異なる週の肝臓組織が異なるラットから採取されたため、時間は「統計的時間」であり、物理的時間ではない)。図 4 では、Isomap 空間での各食事給餌群の 2 次元確率分布を示している。図 4 の 1、2、3、4 行目のパネルには、それぞれ 2、4、8、16 週の給餌期間の分布が含まれており、各行の左、中央、右のパネルにはそれぞれ SD、HFD、HFHC を給餌した各ラット肝臓の病理組織学的診断結果 (Normal、NAFL: 単純性脂肪肝、NASH: 非アルコール性脂肪肝) が表示されている。SD 給餌群と、Normal な組織像を呈する HFD 給餌群は異なる領域に位置しており、これは Normal/HFD 給餌群に有意な形態学的差異がないにもかかわらず、Normal 組織像を呈する SD 給餌群と HFD 給餌群間で化学的環境が異なることを示唆している。HFHC 給餌群は、SD 給餌群から明確に分離されており、2 週間から 4 週間の小さな水平方向のシフト後には比較的局所的に集まっている。4 週間以上 HFHC を給餌した NAFL 組織と NASH 組織は、ほぼ同じ領域に位置していた。これは、空間のその領域への移行後、NAFL を示す肝組織は NASH に移行する前にしばらくその化学的特性を維持することを示唆していた。HFD 給餌群の場合、SD 給餌群および HFHC 給餌群と比較して、時間の経過とともに分散が大きくなっていった。NAFL/HFD 群と Normal/HFD 群は分離していないが、NASH 群から十分に分離されたままであった。なお、HFHC16 週間給餌モデル (NASH モデル) において、微小腫瘍の有無について組織学的検索を行ったが、微小腫瘍の発生はみられなかった。

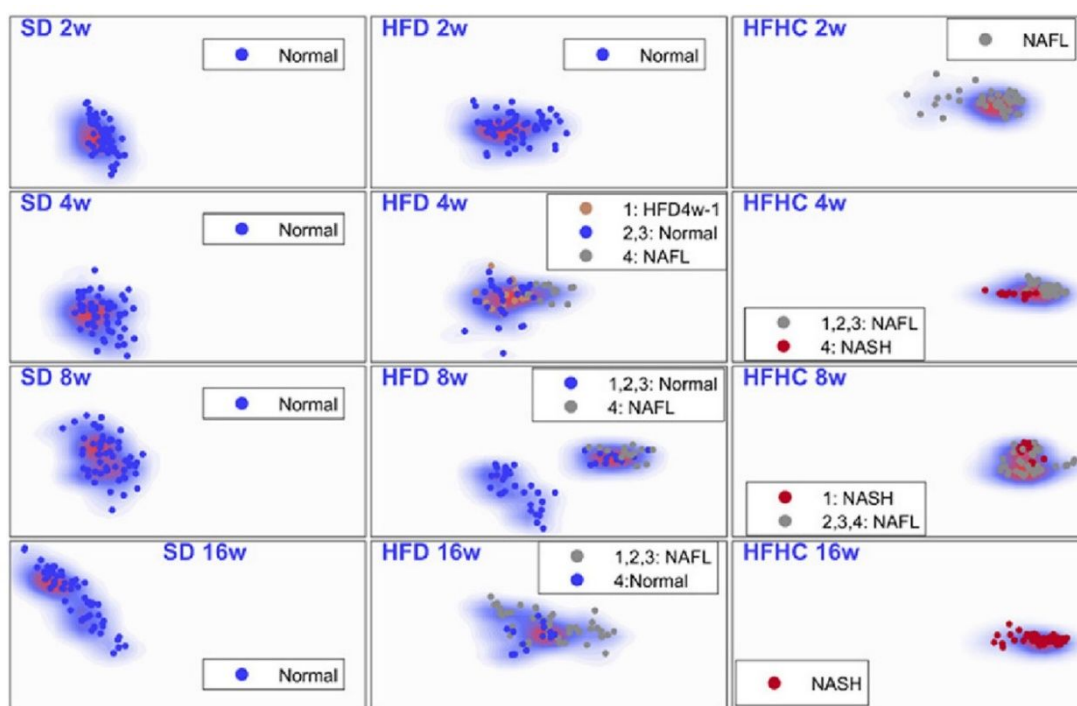


図 4 食事に依存する 2 次元ラマンスペクトル特徴空間における病理学的状態の「時間」伝播を、等高線図に重ねて表示。(引用文献)

(3) 本手法を用いると、明らかな組織形態学的特徴が現れる前の状態で病態間のスペクトル変化を鋭敏に検出可能であることを示した。この知見は、ラベルフリーイメージングが病理組織学者・医学者にとって有用なツールであることを示すものである。研究期間全体を通じて、生体組織からのマイクロメーターオーダーの高次元スペクトル画像を取得し、情報科学的手法などの手法を用いて解析を行った。研究計画の見直しを行い、標準的な組織病理学的手段では観察が困難な生体分子のラベルフリー組織判別が可能となった。本研究で示されたラベルフリー分子イメージング技術は病態進行に伴う代謝関連分子の違いを画像化しており、微小腫瘍の検出などヒトへの応用も見込まれ、その応用性は高いと考えられる。

< 引用文献 >

Masashi Takemura, Kentaro Mochizuki, Yoshinori Harada, Akira Okajima, Michiyo Hayakawa, Ping Dai, Yoshito Itoh, Hideo Tanaka. "Label-free Assessment of the Nascent State of Rat Non-alcoholic Fatty Liver Disease Using Spontaneous Raman Microscopy." Acta Histochem Cytochem. 2022;55(2):57-66.

Khalifa Mohammad Helal, Harsono Cahyadi, J Nicholas Taylor, Akira Okajima, Koji Tabata, Yasuaki Kumamoto, Kentaro Mochizuki, Yoshito Itoh, Tetsuro Takamatsu, Hideo

Tanaka, Katsumasa Fujita, Tamiki Komatsuzaki, Yoshinori Harada. "Raman imaging of rat nonalcoholic fatty liver tissues reveals distinct biomolecular states." *FEBS Lett.* 2023;597(11):1517-1527.

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masashi Takemura, Kentaro Mochizuki, Yoshinori Harada, Akira Okajima, Michiyo Hayakawa, Ping Dai, Yoshito Itoh, Hideo Tanaka	4. 巻 55
2. 論文標題 Label-free Assessment of the Nascent State of Rat Non-alcoholic Fatty Liver Disease Using Spontaneous Raman Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 57-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.22-00013	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 Yoshinori Harada, Yasutoshi Murayama, Tetsuro Takamatsu, Eigo Otsuji, Hideo Tanaka	4. 巻 23
2. 論文標題 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence Imaging for Tumor Detection: Recent Advances and Challenges	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 6478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23126478	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 Khalifa Mohammad Helal, Harsono Cahyadi, J Nicholas Taylor, Akira Okajima, Koji Tabata, Yasuaki Kumamoto, Kentaro Mochizuki, Yoshito Itoh, Tetsuro Takamatsu, Hideo Tanaka, Katsumasa Fujita, Tamiki Komatsuzaki, Yoshinori Harada	4. 巻 -
2. 論文標題 Raman imaging of rat nonalcoholic fatty liver tissues reveals distinct biomolecular states	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Lett	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14600	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 Masatomo Beika, Yoshinori Harada, Takeo Minamikawa, Yoshihisa Yamaoka, Noriaki Koizumi, Yasutoshi Murayama, Hirotaka Konishi, Atsushi Shiozaki, Hitoshi Fujiwara, Eigo Otsuji, Tetsuro Takamatsu, Hideo Tanaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Accumulation of Uroporphyrin I in Necrotic Tissues of Squamous Cell Carcinoma after Administration of 5-Aminolevulinic Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 10121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221810121	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 原田義規、望月健太郎、田中秀央	4. 巻 69
2. 論文標題 ラマン分光で病気を見る	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分光研究	6. 最初と最後の頁 213-221
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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原田 義規、望月健太郎、田中 秀央
2. 発表標題 ラマン分光による組織細胞化学的解析
3. 学会等名 第63回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田義規、早川路代、中尾龍太、望月健太郎、田中秀央
2. 発表標題 ラマン顕微分光による生体組織解析
3. 学会等名 第12回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田義規、中尾龍太、望月健太郎、田中秀央
2. 発表標題 光学顕微鏡の原理と観察法
3. 学会等名 第45回組織細胞化学講習会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 原田義規、中尾龍太、望月健太郎、田中秀央	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中西印刷	5. 総ページ数 250
3. 書名 "光学顕微鏡の原理と観察法" 組織細胞化学2020	

〔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	望月 健太郎 (Mochizuki Kentaro) (50868768)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

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