

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06903

研究課題名(和文)3次元病理診断を可能とする新規染色技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel staining method to enable 3D pathological diagnosis.

研究代表者

野島 聡 (Nojima, Satoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40528791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酸化剤HIO₄水溶液とFAM hydrazideを組み合わせ、PAS染色におけるSchiff試薬に互換となる新たな蛍光染色法PAFhy stainを開発した。この染色法と組織透明化/3次元イメージング技術であるCUBICと組み合わせることで、新たな3次元イメージング法を開発した。この手法により大腸陰窩構造の3次元構造の評価が正確かつ詳細に行えるようになり、陰窩炎・陰窩膿瘍における炎症の様式を詳細に観察できた。更に、本法を用いて定量評価した陰窩のねじれの構造の程度を指標に、これまでの2次元診断では不可能であった炎症性腸疾患の正確な鑑別が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たに開発されたPAFhy stain法は、3次元病理組織学における特殊染色に位置する有用な手法であり、基礎病理学・臨床病理学の新たな基盤的技術となりえるものである。これらがより標準化され他の技術と組み合わせられることで新たなプラットフォームが確立できる可能性があり、これを元に疾患に根差した多くの病理学的研究、臨床的研究が蓄積されることで、新たな診断基準・臨床予測法の確立、新規治療法の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although the utility of tissue clearing and three-dimensional imaging techniques in clinical histopathology has been established, further methodological developments are required for their use in clinical practice. We developed a novel periodic acid-FAM hydrazide staining method (PAFhy stain), which is based on a principle similar to the classical PAS stain. This method could be applied to 3D imaging with a tissue-clearing technique; it enabled clear and detailed imaging of the 3D architecture of crypts in human colorectal mucosae. The 3D imaging also revealed the 3D distributions of neutrophils in cryptitis and crypt abscesses in ulcerative colitis tissues. Quantitative analysis of crypts based on 3D morphological changes enabled differential diagnosis among ulcerative colitis, Crohn's disease, and non-inflammatory bowel disease colitis. Therefore, PAFhy staining and the 3D imaging with it are promising approaches for next-generation experimental and clinical histopathology.

研究分野：病理学

キーワード：3次元イメージング 組織透明化 臨床病理診断 炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎

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。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

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少なく、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

本研究は、最先端イメージング技術 CUBIC をヒト病理組織診断に実践的に応用することを目的に行われた。特に、臨床病理診断における PAS 染色やレクチン染色といった所謂“特殊染色”に該当するような新たな蛍光染色法を開発し、現在の 2 次元の評価では難しいような診断を可能とする新規イメージング系を確立することをその主軸に置き行った。申請者は申請の段階において、FAM hydrazide という蛍光プローブと酸化剤を組み合わせることで、PAS 染色と互換となる染色動態を示す新たな蛍光染色法を既に開発していた。この手法を応用し、炎症性腸疾患に対する新規診断法を確立することを本研究計画の主な目的として行った。

3. 研究の方法

炎症性腸疾患のひとつである潰瘍性大腸炎においては、陰窩構造の湾曲の程度が診断価値の高い所見のひとつとされるが、病変が初期の段階には、薄切された 2 次元のスライドガラスにおける組織像からは診断が難しいことが少なくない。申請者の開発したイメージング法においては、陰窩の構造・走行が明瞭に描出できることが予想されたため、これを潰瘍性大腸炎の早期診断/確定診断に応用した。具体的には、潰瘍性大腸炎および対照となる Crohn 病、非自己免疫性大腸炎組織を生検検体相当の大きさに切り出し、これを 2 分割、一方は 3 次元イメージングを行い、陰窩の湾曲、拡張の度合い等を数値化することを試みた。もう一方については、標準的な方法で HE 染色のスライドガラスを作製し、申請者を含む複数の病理診断医がこれを診断した。3 次元画像から取得した定量データに閾値を設けることで定量的に診断を行う系を設定し、病理診断医が従来の方針にて診断できないあるいは診断の難しい組織において、厳密に潰瘍性大腸炎か否かの診断ができるようになるか否かについて検討した。

4. 研究成果

(1) 染色法/イメージング法の確立

申請者は申請時の段階において、ヒト大腸粘膜の薄切凍結切片を用いた蛍光プローブを用い、FAM hydrazide という蛍光プローブと酸化剤である HIO₄ 水溶液による処理を用いることで、PAS 染色と同様の染色性を持つ蛍光染色が可能であることを既に見出していた。PAS 染色においては、酸化剤である HIO₄ 水溶液により多糖類などに含まれる α - グリコル基がアルデヒド基となり、Schiff 試薬は NH₂ を介してアルデヒド基に結合する。FAM hydrazide も同様にアルデヒド基に結合することで染色性を呈しているものと考えられた。この FAM hydrazide を用いた方法を Periodic Acid- FAM hydrazide (PAFhy) stain と命名した。

次に、PAFhy stain と組織透明化/3 次元イメージング法である CUBIC を組み合わせ、3 次元特殊染色イメージング法を開発した。約 4mm 大四方に切除したホルマリン固定後ヒト大腸粘膜組織を用いて、PAFhy stain が 3 次元イメージング法に応用可能であるかについて検討した。PAFhy stain は CUBIC によるホールマウント染色に応用可能であり、大腸粘膜の陰窩

における杯細胞、基底膜、好中球が明瞭に染色され、これにより陰窩の立体的構造をきわめて明瞭にイメージングすることが可能であった (図1)。

(2) 病理組織検体の3次元イメージング

次に、陰窩の構造が診断において重要となる、炎症性腸疾患の病理組織検体を用い、イメージングを行った (図2)。代表的な炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎の組織を PAFhy stain にて染色し、この3次元のイメージングを行った。高度の炎症細胞浸潤を伴う例において、陰窩炎の所見、すなわち陰窩内に浸潤する好中球と、炎症により杯細胞の粘液が減少している所見 (Goblet cell depletion) が明瞭にイメージングされた。次に、潰瘍性大腸炎に特徴的な、陰窩膿瘍の所見に着目した。同じ症例において陰窩膿瘍の所見が確認され、この所見において、底部に微小膿瘍が形成され、これらの膿瘍は陰窩斜め下方より浸潤した好中球により形成され、陰窩管腔を伝って上方にも好中球が分布していることが分かった。

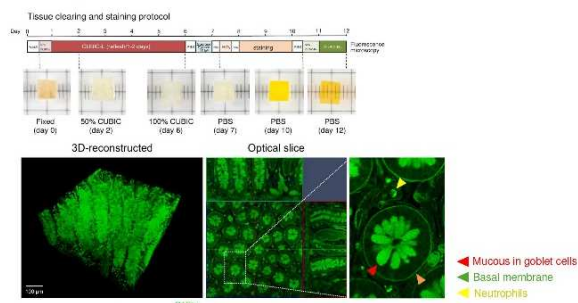
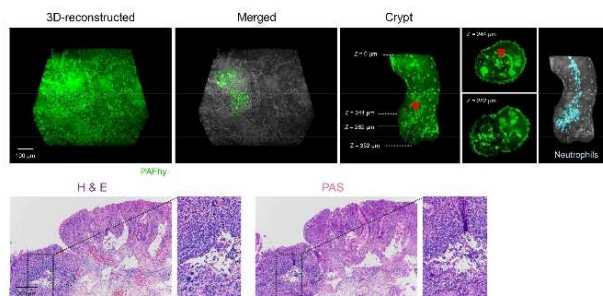


図1. PAFhy stainingを用いた大腸粘膜組織のイメージング



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nojima Satoshi, Kadoi Tokimu, Suzuki Ayana, Kato Chiharu, Ishida Shoichi, Kido Kansuke, Fujita Kazutoshi, Okuno Yasushi, Hirokawa Mitsuyoshi, Terayama Kei, Morii Eiichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Deep Learning-Based Differential Diagnosis of Follicular Thyroid Tumors Using Histopathological Images	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 100296 ~ 100296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.modpat.2023.100296	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 Kido Kansuke, Nojima Satoshi, Motooka Daisuke, Nomura Yusuke, Kohara Masaharu, Sato Kazuaki, Ohshima Kenji, Tahara Shinichiro, Kurashige Masako, Umeda Daisuke, Takashima Tsuyoshi, Kiyokawa Hiroki, Ukon Koto, Matsui Takahiro, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi	4. 巻 260
2. 論文標題 Ovarian high grade serous carcinoma cells with low SMARCA4 expression and high SMARCA2 expression contribute to platinum resistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6064	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 Nojima Satoshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Class IV semaphorins in disease pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 471 ~ 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13270	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 Naito Maiko, Nakanishi Yoshimitsu, Motomura Yasutaka, Takamatsu Hyota, Koyama Shohei, Nishide Masayuki, Naito Yujiro, Izumi Mayuko, Mizuno Yumiko, Yamaguchi Yuta, Nojima Satoshi, Okuzaki Daisuke, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 5
2. 論文標題 Semaphorin 6D-expressing mesenchymal cells regulate IL-10 production by ILC2s in the lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 1486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202201486	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 Nojima Satoshi, Ishida Shoichi, Terayama Kei, Matsumoto Katsuhiko, Matsui Takahiro, Tahara Shinichiro, Ohshima Kenji, Kiyokawa Hiroki, Kido Kansuke, Ukon Koto, Yoshida Shota Y., Mitani Tomoki T., Doki Yuichiro, Mizushima Tsunekazu, Okuno Yasushi, Susaki Etsuo A., Ueda Hiroki R., Morii Eiichi	4. 巻 14
2. 論文標題 A Novel Three-Dimensional Imaging System Based on Polysaccharide Staining for Accurate Histopathological Diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 905 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.07.001	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 Ohshima Kenji, Oi Ryo, Nojima Satoshi, Morii Eiichi	4. 巻 256
2. 論文標題 Mitochondria govern histone acetylation in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5818	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, Oi Ryo, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Shinohara Masakazu, Nojima Satoshi, Morii Eiichi	4. 巻 125
2. 論文標題 Mitochondrial matrix protein C14orf159 attenuates colorectal cancer metastasis by suppressing Wnt/ -catenin signalling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1699 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01582-9	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 Tahara Shinichiro, Nojima Satoshi, Ohshima Kenji, Hori Yumiko, Sato Kazuaki, Kurashige Masako, Matsui Takahiro, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotinamide N methyltransferase is related to MELF pattern invasion in endometrioid carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 8630 ~ 8640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4359	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 Nojima Satoshi, Terayama Kei, Shimoura Saeko, Hijiki Sachiko, Nonomura Norio, Morii Eiichi, Okuno Yasushi, Fujita Kazutoshi	4. 巻 129
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 984 ~ 995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncy.22443	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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野島聡
2. 発表標題 組織病理学に寄与する先端イメージング技術
3. 学会等名 第112回 日本病理学会総会・特別企画：病理専門医が得られる研究マインド (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野島聡
2. 発表標題 組織透明化による3次元イメージング技術を用いた空間的解析
3. 学会等名 第113回 日本病理学会総会・日欧 空間トランスクリプトーム解析 (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 組織又は細胞中のグリコール基を含む物質を特異的に染色する蛍光染色方法	発明者 野島聡 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、GCP21188	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 組織又は細胞中のグリコール基を含む物質を特異的に染色する蛍光染色方法 (仮)	発明者 野島聡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、GCP21188	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------