

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792022

研究課題名（和文） 舌癌の浸潤・転移を制御する癌微小環境の3次元構造解析

研究課題名（英文） Three-dimensional quantification of tumor microenvironment in tongue squamous cell carcinoma

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）：

口腔癌のうち最も好発する舌扁平上皮癌の予後予測に繋がる病理診断指標を確立することを長期課題として、多重免疫標識を施した連続薄切標本から舌癌深達部の癌実質と間質を分画した立体構築を実行した。再構築した腫瘍微小環境において、間質中に分散する微小浸潤胞巣、癌細胞による血管・リンパ管侵襲の発生部位、腫瘍細胞と接触する筋線維芽細胞（CAF）およびマクロファージ（TAM）の出現部位を検出することにより、舌癌の浸潤能と転移機序に関わる形態計測データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

The present study aimed at gaining 3D quantitative information about carcinoma invasion pattern, vascular network and accumulating fibroblasts/macrophages in the microenvironment of tongue squamous cell carcinoma (SCC). During the approved 2-year period, 3D reconstruction was achieved using 100 serial histological sections that were prepared from 30 cases of SCC. Phenotypes and architecture of carcinoma parenchyma and stroma were characterized by stepwise immunohistochemistry in combination with antibodies (cytokeratin, Ki-67, CD31, CD105, CD34, CD68, αSMA, S100A4). The resulting 3D constructs provided spatial resolution enough to grasp individual cells, aberrant divergence and tortuosity of tumor vessels, carcinoma vascular invasion and stromal cells. Our experience proved that 3D reconstruction offers an essential tool to validate the spatial association of cancer cells, vascular endothelial cells, myofibroblasts (CAF) and macrophages (TAM).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：歯学、病理学、舌癌、癌浸潤、転移、癌微小環境、組織立体構築、3次元形態計測

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の大部分は口腔粘膜上皮に由来する扁平上皮癌であり、舌側縁部が好発部位となり、早期に所属リンパ節に転移しやすく予後も悪い。癌の浸潤・転移には、癌細胞における遺伝子変異の多段階的な蓄積に加えて、癌胞巣を囲む間質要素との相互作用が重要な役割を果たしていることが注目されている。腫瘍間質を構成する細胞集団として、脈管内皮細胞、血管周皮細胞、筋線維芽細胞、炎症細胞、骨髄由来細胞などを含んでいる。複雑な脈管網と多種の構成細胞を含む癌微小環境を理解するうえで、高分解能の組織画像を用いた組織立体構築に基づく3次元病理診断が必要となる。研究代表者は平成20～21年度若手研究B「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」の交付期間において、組織アレイ法による連続薄切標本の作製と特異抗体による免疫多重染色を開発するとともに、マニュアル操作を排除した組織立体構築システムを確立してきた。本研究では、これまでの立体構築法に高画質デジタル情報を取り入れて、腫瘍微小環境空間での微細な脈管走行や腫瘍実質・間質の全構成細胞を分画することにより、舌癌浸潤先端部における癌微小環境を網羅的に解析することを到達目標とした。

## 2. 研究の目的

本申請期間においては、舌癌の多数症例を対象として浸潤先端部における腫瘍実質・脈管網・間質細胞を分画した組織立体構築と3次元形態計測を実行することを目的とした。3次元形態学では、通常の病理組織診断では確認できない腫瘍微小環境の構造学的特徴と構成要素間の空間位置情報を捉えることができる。本研究課題では、癌胞巣の連結性と間質中に分離した微小浸潤胞巣の分別、癌胞巣内部と周辺領域での脈管網の分布、癌微小

胞巣による脈管内浸潤の発生頻度と好発部位、癌細胞と筋線維芽細胞（CAF: cancer-associated fibroblasts）やマクロファージ（TAM: tumor-associated macrophages）との共局在に注目した。特に、脈管内侵襲やCAFあるいはTAMの同定には、異なる免疫表現型を持つ細胞間での空間位置情報に基づく3次元解析が必要となる。これらの解析を短時間で実行できる演算アルゴリズムについても確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

舌扁平上皮癌の最深達部の領域を組織アレイヤーで3mm直径の円筒形に切り出し、自動切片送り機能を有した自動回転式ミクロトームを用いて連続薄切標本（4μm厚、約100枚）を作製した。次にリボン状に連続して薄切されてくる連続薄切切片をスライドグラスに方位を揃えて配列（9連続標本×3列）した。この一連の薄切操作により、継続する免疫染色操作とバーチャル画像のデジタル記録を短時間に効率的に遂行できる。腫瘍実質細胞、脈管間質細胞、炎症細胞・免疫担当細胞などの多種・多様な細胞集団を分画した組織立体構築を実現するうえで、上皮マーカー（AE1+AE3/34βE12/MNF116）、細胞増殖活性（Ki-67）、血管内皮細胞マーカー（CD31、CD34、CD105）、リンパ管内皮細胞マーカー（D2-40、Podoplanin）、マクロファージマーカー（CD45、CD63）、筋線維芽細胞マーカー（αSMA、S100A4、Vimentin）に対する特異抗体を使用した免疫多重染色を実施した。癌細胞による脈管新生を捉える目的では、CD31/D2-40の免疫二重標識により血管網・リンパ管網を分画した。また、腫瘍血管新生における管腔形成や壁構造の成熟度は多様であり、癌の生物学的特性を理解するうえで重要な要因となっている。血管構造の立体解析には、CD31、CD34、CD105

を示す血管内皮細胞と血管内皮に接する  $\alpha$  SMA 陽性の周皮・壁細胞を分画した上で、胞巣内部に入り込む血管網の組織内分布を3次元定量解析した。なお、腫瘍微小環境の全構成細胞に相当する細胞核を標識する目的でヘマトキシリン染色による核質標識も実施した。抗体反応についてはABC法により異なる発色剤 (DAB 茶色 ; Vector SG 濃青色) で識別した。連続組織薄切標本全域の染色像については、バーチャルスライド装置 (対物 $\times$ 20) で記録した。立体構築にはRATOC TRI-SRF2 ソフトとVG Studio Max を使用して、連続画像間の位置合わせ、RGB 色調による組織要素の分画、分画要素の3次元観察・解析を実行した。

舌扁平上皮癌の最深達部の領域を組織アレイヤーで3mm直径の円筒形に切り出し、自動切片送り機能を有した自動回転式マイクロームを用いて連続薄切標本 ( $4\mu\text{m}$ 厚、約100枚) を作製した。次にリボン状に連続して薄切されてくる連続薄切切片をスライドグラスに方位を揃えて配列 (9連続標本 $\times$ 3列) した。この操作により、後述する免疫染色操作とバーチャル画像のデジタル記録を短時間に効率的に遂行できる。腫瘍実質細胞、脈管間質細胞、炎症細胞・免疫担当細胞などの多種・多様な細胞集団を分画した組織立体構築を実現するうえでは、上皮マーカー (AE1+AE3/34  $\beta$  E12/MNF116) 抗体、細胞増殖活性 (Ki-67)、血管内皮細胞マーカー (CD31、CD34、CD105)、リンパ管内皮細胞マーカー (D2-40、Podoplanin)、マクロファージマーカー (CD45、CD63)、筋線維芽細胞マーカー ( $\alpha$  SMA、S100A4、Vimentin) に対する特異抗体を使用した免疫多重染色を実施した。なお、腫瘍微小環境の全構成細胞に相当する細胞核を標識する目的でヘマトキシリン染色による核質標識も実施した。抗体反応について

はABC法により異なる発色剤 (DAB 茶色 ; Vector SG 濃青色) で識別した。連続組織薄切標本全域の染色画像の染色像については、バーチャルスライド装置 (対物 $\times$ 20) で記録した。立体構築にはRATOC TRI-SRF2 ソフトとVG Studio Max を使用しており、連続する画像間の位置合わせ、RGB 色調による組織要素の分画、分画要素の3次元観察・解析を実行した。

#### 4. 研究成果

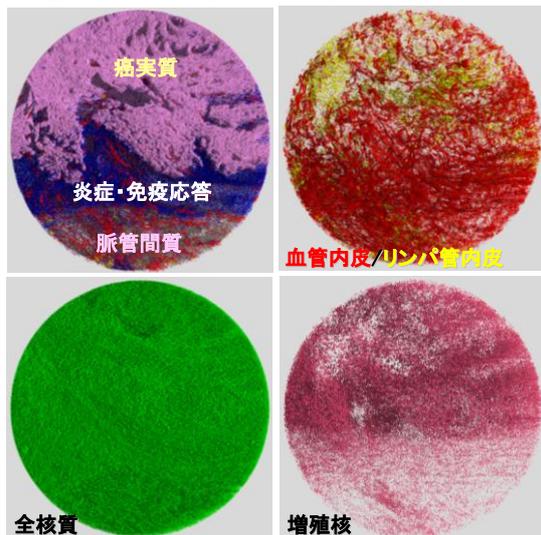
##### (1) バーチャルスライドを導入した組織立体構築法

今回用いたバーチャルスライド画像の解像度 ( $5120\times 4096$  ピクセル、 $0.92\mu\text{m}/$ ピクセル) であり、この画像分解能では間質内に浸潤する単独の癌細胞とその核質の分離・計測が可能であった。観察領域を3mm直径とした場合に、立体構築に使用する1枚のバーチャル画像は60MB程度に達するが、32GBメモリー容量のコンピュータでは、バーチャル画像100枚を積層する立体構築も比較的短時間で処理できた。バーチャルスライドを導入する大きな利点としては、高分解能の画像情報を迅速に記録できることに加えて、同じ組織標本に複数回の免疫標識→画像保存を繰り返し施すことができる。この機能は多種類の細胞・組織要素が共存している生物試料の構造解析には不可欠と言える。

##### (2) 免疫表現型に基づいた細胞の分画と空間局在

研究期間内に確立したヘマトキシリン核染色と細胞形質の免疫標識 (サイトケラチン、Ki-67、CD 抗原、細胞骨格など) とのデジタル画像を統合した画像処理プロトコールにおいては、立体構築された癌組織領域 (3mm直径、 $4\mu\text{m}\times 108$ 枚、 $3\text{mm}^3$ の組織空間) に含まれる全構成細胞に相当する  $1\sim 3\times 10^5/\text{mm}^3$  の細胞核を分画することができており、構成細胞単位での増殖活性の判別、腫瘍間質に分散する単核細胞と脈管壁に組み込まれた内皮

細胞との分画、マクロファージ・内皮細胞・腫瘍細胞が互いに隣接する箇所を可視化したうえで定量化が可能となった。今回の腫瘍微小環境の立体観察においては、最大で8種類の特異抗体による免疫標識を個々の組織標本に適応できることを経験しており、腫瘍微小環境の多構成要素の解析に向けて応用範囲は広いと考えている。

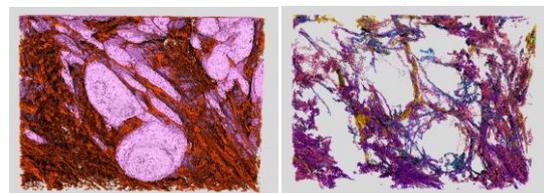


#### 舌癌の浸潤先端部での組織立体構築

(3) 舌癌浸潤先端部での微小浸潤胞巣の空間局在：腫瘍実質のラベリングにはサイトケラチン/Ki-67 二重免疫染色を施し、デジタル保存したバーチャル画像上で実質・間質領域を分画した。実質・間質の境界領域の3次元解析では、腫瘍母集団から分離した個々の癌細胞集団を分画したうえで、分離胞巣を構成する癌細胞数と増殖活性、および母集団の境界面からの最近接距離を計測した。実質・間質境界面から 100  $\mu$  m 範囲の空間内に配置する 1,000 個超の癌微小浸潤胞巣の解析結果では、単独の癌細胞から数百個の癌細胞集団が混在しており、境界面からの最近接距離に依存した細胞集団サイズの偏りはみられなかった。今回の結果から、上皮形質を保った癌細胞の浸潤様式として Individual migration と collective migration が共存しており、母集団から分離後に癌微小細胞集団サイズ

の増加をともなうことが示唆された。

(4) 癌微小環境における血管・リンパ管新生と脈管内皮細胞の表現型の多様性：舌癌の浸潤先端部における血管内皮細胞 (CD31、CD34、CD105)、リンパ管内皮細胞 (D2-40)、血管周細胞・平滑筋 ( $\alpha$  SMA)、上皮形質 (サイトケラチン) および増殖活性 (Ki-67) を解析対象としてこれらの免疫標識情報から免疫表現型に基づいて分子・細胞要素を分画した。構築された立体空間内では、血管走行とリンパ管走行を分画したうえで脈管分岐構造を追跡できるとともに、異なる免疫表現型を示す個々の脈管内皮細胞の局在を可視化できた。脈管内皮表現型の多様性に関しては、腫瘍周辺の血管壁では CD31/CD34 単独あるいは二重陽性の血管内皮細胞が主体をなすのに対して、胞巣内に新生された微小血管壁では CD105 単独陽性内皮細胞の比率が高まることと、新生リンパ管壁では D2-40 単独陽性に加えて CD31/CD34 陽性の内皮細胞も介在することが確かめられた。



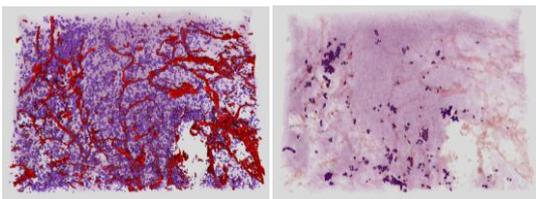
浸潤先端部での癌実質・癌実質周囲の血管網(左)と血管内皮細胞の免疫表現型の多様性(右)  
(CD31, CD34, CD105, CD31/CD34, CD31/CD105, CD34/CD105, CD31/CD34/CD105,  $\alpha$ SMA)

(5) 癌胞巣によるリンパ管侵襲の多様性：舌癌のリンパ行性転移機序を明らかにする目的では、免疫多重標識 (D2-40、CD31、サイトケラチン、Ki-67 および間質マーカー) に基づき、癌実質・脈管間質を立体構築した。構築した分画要素の空間情報から、脈管容積と間質内密度、癌実質と脈管内皮との接触箇所と接触面積を計測するとともに、脈管内への癌細胞の侵襲の有無をモニター上で検出した。癌胞巣のリンパ管侵襲様式としては、癌

胞巣先端部が疎なリンパ管内皮細胞壁を突き破るように管腔内に侵襲している場合が多く、拡張したリンパ管リンパ管を閉塞する細胞集団の多くはCK陰性/S100A4陽性を示した。ただし、リンパ節への転移がみとめられた症例では、CK陽性の癌細胞によるリンパ管閉塞が検出された。

#### (6) 要素間の空間近接度のスクリーニング：

分画された多組織要素においては、個別組織要素の空間位置情報を加えた解析（標的組織要素をボクセル単位で膨張・縮小処理）することで、隣接する組織要素間での連続・不連続を検証することができた。このバーチャル空間での腫瘍構造のミクロ解剖法については癌胞巣の連続性の検証、内皮細胞/癌細胞の接触と脈管内侵襲の有無の判別に応用できた。このアルゴリズムには、血管内皮マーカーに陽性を示す血管網構造には帰属しない単核細胞を単離することもでき、血管壁由来の線維芽細胞様細胞（CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>）やS100A4と $\alpha$ SMAに二重陽性を示す筋線維芽細胞（CAF）を分画するができた。なかでも、TAMの検出として癌細胞・血管内皮細胞・マクロファージ近接する微小空間を同定することができた。



癌実質周囲の血管網・浸潤マクロファージ(左)とTAM(癌細胞・血管内皮細胞・マクロファージの共存箇所)の空間局在(右)

#### まとめ

本研究課題では、舌癌原発病巣における浸潤様式の分類と予後予測に繋がる病理診断指標を明らかにすることを目指して、3次元空間での癌実質と脈管網を可視化するとともに、腫瘍微小環境を構成する筋線維芽細胞、

周皮細胞、炎症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、癌細胞・内皮細胞・マクロファージ・線維芽細胞の空間配置を3次元形態解析した。再構築された組織空間では、免疫標識物質の形状と位置情報に基づき、間質中に分散する微小浸潤胞巣、腫瘍細胞と脈管内皮との接触と脈管内侵襲の発生日部位、腫瘍細胞と筋線維芽細胞との接触（CAF）、マクロファージと腫瘍細胞あるいは脈管内皮細胞との接触（TAM）などを検出できた。近年、自動薄切装置、自動免疫装置、バーチャルスライドが導入されるなかで、連続薄切標本を用いた組織立体構築を研究・診断に導入するうえでの障壁は低くなっている。我々は、自動演算処理による3次元構築と形態解析法の可能性を追求する中で、NIHのWebサイトから無償でダウンロードできるImage-Jと市販の立体構築ソフトを併用した演算プロトコールも開発してきた。特にImage-Jについては、演算処理に際してのパネル操作が容易であり、比較的簡単に短時間で高詳細の立体構築を実行することが可能であり、メモリーの効率的使用により100枚前後の連続組織画像を用いた簡便な組織立体構築に適している。我々は現在、必要最小限のプラグイン機能を組み合わせたImage-Jによる組織立体構築プロトコールを公開している。

#### 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3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, 田谷雄二, 佐藤かおり, 青葉孝昭. 舌がん病変の連続薄切・多重免疫標識による組織立体構築と3次元構造解析. 3次元画像コンファレンス 2010 講演論文集, 査読無, 18: 161-164, 2010.
- ③ 島津徳人, 工藤朝雄, 田谷雄二, 青葉孝昭. 連続薄切・多重免疫標識による腫瘍病変の3次元組織立体構築と構造解析. Medical Imaging Technology, 査読有 28: 252-255, 2010.

[学会発表] (計 34 件)

- ① 島津徳人, 田谷雄二, 藤田和也, 添野雄一, 佐藤かおり, 青葉孝昭: 腫瘍微小環境における新生血管・リンパ管構造と脈管内皮表現型の多様性の3次元病理解析, 第52回日本脈管学会, 平成23年10月20日, 岐阜県岐阜市.
- ② Aoba T, Shimazu Y, Sato K, Kudo T: Mosaic endothelial cell architecture of tumor vascular vessels and immunophenotypic heterogeneity of progenitor cells, 第70回癌学会, 平成23年10月4日, 愛知県名古屋市.
- ③ Soeno Y, Shimazu Y, Sato K, Nango N, Aoba T: Tumor lymphangiogenesis and discrete types of carcinoma lymphatic invasion in the microenvironment, 7 第70回癌学会, 平成23年10月4日, 愛知県名古屋市.
- ④ Shimazu Y, Kudo T, Sato K, Aoba T: Initiation and dissemination of single-cell and collateral microinvasion of carcinoma cells: 3D comprehensive analysis, 第70回癌学会, 平成23年10月3日, 愛知県名古屋市.
- ⑤ 島津徳人, 工藤朝雄, 青葉孝昭: 3D 構築からみた口腔癌の浸潤, 第100回日本病理学会, 2011年5月1日, 神奈川県横浜市.
- ⑥ 島津徳人, 工藤朝雄, 辺見卓男, 田谷雄二, 佐藤かおり, 藤田和也, 添野雄一, 柳下寿郎, 青葉孝昭: 癌微小環境の広域・高分解能の3D観察と組織立体構築プロトコール, 第100回日本病理学会, 平成23年4月30日, 神奈川県横浜市.
- ⑦ 南郷修史, 島津徳人, 工藤朝雄: バーチャルスライド (VS) 画像による腫瘍血管の3次元再構築と形態解析, 第100回日本病理学会, 2011年4月28日, 神奈川県横浜市.
- ⑧ Shimazu Y, Kudo T, Taya Y, Soeno Y, Fujita K, Sato K, Yagishita H, Aoba T: Three-dimensional reconstruction of tumor architecture and blood/lymph vessels in combination of virtual microscopy and multi-immunolabelings of serial histological sections, International Academy of Pathology, 平成22年10月 日, ブラジル・サンパウロ.
- ⑨ 島津徳人, 工藤朝雄, 柳下寿郎, 青葉孝昭: 高分解能バーチャル画像を用いた腫瘍血管・リンパ管の組織立体構築, 第99回日本病理学会, 平成22年4月28日, 東京都新宿区.

[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