

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700501

研究課題名(和文) ヒト癌組織の不均一性を考慮した信頼性の高いバイオマーカー測定システムの開発

研究課題名(英文) The development of reliable biomarker measurement systems considered for human cancer tissue heterogeneity.

研究代表者

永井 毅 (Nagai, Takeshi)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：60384989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：デジタル顕微鏡画像を用いたコンピューター画像解析により、癌組織の病理組織学的不均一性を数値化することが容易となり、定量性や再現性の高いバイオマーカー(以下BM)の測定結果が得られた。組織マイクロアレイを用いたBMの測定データは全載組織プレパラートを用いた測定データと比べて系統誤差を受けやすく、より小さな標本抽出ではBM間の相関の喪失が生じうる可能性が示唆された。Bland-Altman plotを組み合わせた仮想組織マイクロアレイは、BM発現解析におけるサンプリング法の違いによる系統誤差の検出に有用であり、ヒト癌組織の不均一性を考慮した信頼性の高いBMの測定に応用可能な技術であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Digital microscopy-assisted, computerized image analysis enabled us to easily quantify histopathological heterogeneity in human cancer tissues, leading to a high level of quantitative and reproducible capability for biomarker measurement results. Our study suggests that the measurement results for certain biomarkers obtained from tissue microarray-based samples can be susceptible to systematic bias, and the lack of correlation between biomarkers cannot be avoided as it is in whole mount tissue preparations. Virtual tissue microarray in combination with Bland-Altman plot analysis can be useful for identifying a systematic bias, and this will help to establish a better sampling strategy for reliable biomarker measurements considered for human cancer tissue heterogeneity.

研究分野：病理学

キーワード：仮想組織マイクロアレイ 病理診断学 Ki-67 index Apoptosis index digital microscopy Bland-Altman plot 分析 systematic bias ヒト癌組織の不均一性

## 1. 研究開始当初の背景

癌の早期診断や治療効果、転移・再発・生存率を予測するためのバイオマーカーの開発・発見が実験室ベースで相次いで行われている。しかし、これらのマーカーのうち、臨床的に有効性や有用性が実証され、実際の病理診断や診療でも応用可能とされるものは1割にも満たない。その理由は種々考えられるが、標本作成過程が標準化され、観察対象の質が担保されていることを前提とした場合、測定手段バイアスや観察者間変動といった測定誤差がバイオマーカーの臨床応用の際に大きな障害になっていると考えられる。

例えば、膀胱癌や乳癌、脳腫瘍などでは Ki-67 index は予後と関連し、Ki-67 index が高い腫瘍群では、低い腫瘍群よりも予後が悪いことが複数の研究グループによって報告されている。また、予後判定の目安としての Ki-67 index のカットオフ値も報告されている。しかし、これらの研究報告の多くは測定方法についての記載が十分ではない。また、全載組織切片の標本か組織マイクロアレイのような小さな標本かといったサンプリング方法の違いによる測定データの変動についてはほぼ全くといってよいほど論じられていない。

こうした背景から、癌組織におけるバイオマーカーの測定結果に関して、研究グループ間での再現性が現実には低いことが国内外を問わず問題になってきている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト癌組織標本における各種バイオマーカー発現の不均一性を調べ、一定の測定条件下で、サンプリング方法の違いが測定結果に及ぼす影響を検討し、臨床応用可能なバイオマーカー測定システムを考案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞癌手術例を対象として肝臓組織内に複数の関心領域(n=48)を設定し、術中に Shear Wave Elastography を施行して各関心領域の硬さを測定した。肝摘出後に各関心領域に一致する肝組織の病理組織標本作製し、デジタル顕微鏡画像を用いてコンピューター画像解析を併用し、肝組織の硬さを予測する病理組織学的因子を探索した。

(2) ヒト卵巣癌および子宮体癌を対象としてこれらの病理組織標本作製し、癌組織内における細胞増殖マーカー(Ki-67)やアポトーシスマーカー(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: TUNEL)、p53等のバイオマーカー発現の不均一性を調査した。

(3) ヒト膀胱原発尿路上皮癌(n=30)における Ki-67 index (KI)と Apoptosis index (AI) に関して、全載組織プレパラート(WMTP)から得られた測定結果と WMTP からサンプリングして作製された仮想組織マイクロアレイから得られた測定結果との間にどの程度の乖離があるかを、デジタル顕微鏡画像とコンピューター画像解析技術を利用して調べた。Ki-67 染色と TUNEL 染色の WMTP を用いて、直径 1mm と 0.6mm の小領域をランダムに抽出して仮想組織マイクロアレイを作製した。いずれの標本においても最も陽性細胞が集まる領域で腫瘍細胞 1000 個以上を観察して KI と AI を測定し、Bland-Altman plot と回帰分析、Kendall's tau で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 肝組織の硬さを予測する病理組織学的因子の解析では、デジタル顕微鏡画像を用いてコンピューター画像解析を施行

することによって、肝組織の硬さを予測する病理組織学的因子(膠原線維量、肝細胞核密度)の抽出が容易となり、関心領域毎に病理組織学的不均一性を数値化し可視化することが可能となり、定量性や再現性の高い解析結果が得られた。

- (2) ヒト卵巣癌および子宮体癌を対象とした各種バイオマーカーの発現率は、同一の腫瘍組織内においても部位によって高低差(不均一性)が認められた。卵巣癌の代表的な組織型である漿液性腺癌においては、一般的に用いられている最も発現の高い領域(hot spot)での評価を行うと、Ki-67 index は通常 90%を超え、症例間の差はほとんど認められなかった。しかし、同じ腫瘍の中でも最も発現の低い領域(cold spot)で評価を行うと、Ki-67 index に症例間に差が生じることが判明した。また、腹膜やリンパ節等の卵巣癌の転移先においても、その観察領域によってバイオマーカー発現に高低差が認められた。子宮体癌(漿液性腺癌)においても同様の結果が得られた。以上より、バイオマーカーの発現状態に不均一性がみられる場合には、測定方法やサンプリング方法のちょっとした違いによって測定結果に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。

- (3) ヒト膀胱原発尿路上皮癌を用いたバイオマーカー発現解析では、KI, AI いずれも同一の腫瘍の中であっても観察領域によって相当な不均一性が認められた。WMTP での測定と組織マイクロアレイの2つのサンプリング法による測定結果の差は概ね許容範囲内に収まった。しかしながら、KI の測定値に関して、WMTP と 1mm 径の組織マイクロアレイとの間には 18.1%の加算誤差が、WMTP と 0.6mm 径の

組織マイクロアレイとの間には 22.2%の加算誤差が認められた。また、AI の測定値に関して、WMTP と 1mm 径の組織マイクロアレイとの間には 5.5%の加算誤差が、WMTP と 0.6mm 径の組織マイクロアレイとの間には 6.3%の加算誤差が認められた。さらに AI に関して、1mm 径と 0.6mm 径の組織マイクロアレイいずれにおいても比例誤差が認められた。なお、WMTP、1mm 径の組織マイクロアレイいずれにおいても KI と AI との間には正の相関が認められたが、0.6mm 径の組織マイクロアレイにおいては KI と AI との間に相関は見られなかった。以上より、膀胱癌の KI と AI に関して、組織マイクロアレイを用いた測定データは WMTP を用いた測定データと比べて系統誤差を受けやすく、より小さな標本抽出ではバイオマーカー間の相関の喪失が生じうる可能性が示唆された。Bland-Altman plot を組み合わせた仮想組織マイクロアレイは、バイオマーカー発現解析におけるサンプリング法の違いによる系統誤差の検出に有用であり、ヒト癌組織の不均一性を考慮した信頼性の高いバイオマーカーの測定に応用可能な技術であると考えられた。

## 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 15 件)

- (1) Nishi H, Sasaki T, Nagamitsu Y, Terauchi F, Nagai T, Nagao T, Isaka K. Hypoxia inducible factor-1 mediates upregulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene transcription during hypoxia in cervical cancer cells.

- Oncol Rep. 2016;35(2):992-8. (査読有) doi: 10.3892/or.2015.4449.
- (2) Nagai T, Oshiro H, Sagawa Y, Sakamaki K, Terauchi F, Nagao T. Pathological Characterization of Ovarian Cancer Patients Who Underwent Debulking Surgery in Combination with Diaphragmatic Surgery: A Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(50):e2296. (査読有) doi:10.1097/MD.0000000000002296.
- (3) Hashimoto H, Kurata A, Fujita K, Shimada H, Nagai T, Horiguchi H, Kuroda M. Ovarian small cell carcinoma of pulmonary type appearing in ante mortem ascites: An autopsy case and review of the literature. *Human Pathology*. EHPC-00037; No of Pages 6. 2015. (査読有) doi: 10.1016/j.ehpc.2015.02.003.
- (4) Oshiro H, Fukumura H, Nagahama K, Sato I, Sugiura K, Iobe H, Okiyama E, Nagao T, Nagashima Y, Aoki I, Yamanaka S, Murakami A, Maegawa J, Chishima T, Ichikawa Y, Ishikawa Y, Nagai T, Nomura M, Ohashi K, Okudela K. Establishment of successively transplantable rabbit VX2 cancer cells that express enhanced green fluorescent protein. *Med Mol Morphol*. 2015;48(1):13-23. (査読有) doi: 10.1007/s00795-014-0071-2.
- (5) Sasaki T, Nishi H, Nagata C, Nagai T, Nagao T, Terauchi F, Isaka K. A retrospective study of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a prognostic factor in cancer of the uterine cervix. *Int J Clin Oncol*. 2014;19(6):1059-64. (査読有) doi: 10.1007/s10147-014-0664-8.
- (6) Honjo M, Moriyasu F, Sugimoto K, Oshiro H, Sakamaki K, Kasuya K, Nagai T, Tsuchida A, Imai Y. Relationship between the liver tissue shear modulus and histopathologic findings analyzed by intraoperative shear wave elastography and digital microscopically assisted morphometry in patients with hepatocellular carcinoma. *J Ultrasound Med*. 2014;33(1):61-71. (査読有) doi: 10.7863/ultra.33.1.61.
- (7) Higuchi K, Urano M, Takahashi RH, Oshiro H, Matsubayashi J, Nagai T, Obikane H, Shimojo H, Nagao T. Cytological features of mammary analogue secretory carcinoma of salivary gland: fine-needle aspiration of seven cases. *Diagn Cytopathol*. 2014 ;42(10):846-55. (査読有) doi: 10.1002/dc.23139.
- (8) Ueda S, Goto H, Usui Y, Nagai T, Nagao T. Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia occurring in bilateral eyelids. *BMC Ophthalmol*. 2013;13(1):38. (査読有) doi: 10.1186/1471-2415-13-38.
- (9) Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Kodaka Y, Hirata A, Sakurai T, Bai H, Imakawa K, Nishi H, Isaka K, Nagai T, Nagao T, Tachikawa E. Regulation of

decidualization in human endometrial stromal cells through exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac). Placenta.

2013;34(3):212-21. (査読有)

doi: 10.1016/j.placenta.2012.12.017.

- (10) Oshiro H, Odagaki Y, Iobe H, Ozu C, Takizawa I, Nagai T, Matsubayashi J, Inagaki A, Miyake S, Nagao T. Primary large cell neuroendocrine carcinoma of the ureter. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(4):729-36. (査読有)

- (11) Nagao T, Sato E, Inoue R, Oshiro H, H Takahashi R, Nagai T, Yoshida M, Suzuki F, Obikane H, Yamashina M, Matsubayashi J. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. *Acta Histochem Cytochem*. 2012;45(5):269-82. (査読有) doi: 10.1267/ahc.12019.

- (12) Usui Y, Wakabayashi Y, Okunuki Y, Kimura K, Tajima K, Matsuda R, Ueda S, Ma J, Nagai T, Mori H, Kezuka T, Nagao T, Goto H. Immune mediators in vitreous fluids from patients with vitreoretinal B-cell lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(9):5395-402. (査読有) doi: 10.1167/iovs.11-8719.

[学会発表](計 10 件)

- (1) 稲垣 敦史, 永井 毅, 三宅 真司, 渡部 顕章, 山口 真由実, 川内 ゆうか, 石原 里佳子, 大城 久, 松林 純, 佐川 泰一, 中村 直哉, 長尾 俊孝. 子宮頸部擦過塗抹標本上に出現した悪性リンパ

腫の 3 例. 第 54 回日本臨床細胞学会秋季大会. 2015 年 11 月 21 日-22 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

- (2) 永井 毅, 石川 貴久, 長尾 俊孝. 子宮や脊髄に多発した EB ウイルス関連平滑筋腫瘍の一例. *Japanese Society for the Advancement of Women's Imaging (JSAWI)*, 第 16 回シンポジウム, 2015 年 9 月 4 日-5 日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)

- (3) Hisashi Oshiro, Bogdan Czerniak, Kentaro Sakamaki, Koji Tsuta, Jolanta Bondaruk, Afsaneh Keyhani, Colin Dinney, Takeshi Nagai, Ashish Kamat. Comparison between Whole Mount Tissue Preparations and Virtual Tissue Microarray Samples for Measurement of Ki-67 and Apoptosis Indices in Human Bladder Cancers. The 2015 Annual Meetings of the American Urological Association, 2015 May 15-19 (New Orleans, USA)

- (4) 永井 毅, 吉田真希, 松林 純, 長尾 俊孝. 多彩な像を呈した卵巣癌肉腫の一例. 第 38 回日本婦人科病理学会学術集会・第 59 回日本病理学会関東支部総会学術集会 (共同開催), 2013 年 6 月 19 日, 昭和大学医学部 (東京都品川区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 毅 (Nagai, Takeshi)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号: 60384989

### (2) 研究協力者

大城 久 (Oshiro, Hisashi)

自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60381513