

生体イメージング技術を用いた乳がんの進展機序の解明

大阪大学大学院医学系研究科 病態病理学

松井 崇浩

1. 諸言

乳がんは、日本国内だけで毎年9万人以上が新たに発症する主要ながんの1つで、現役世代の若年女性にも罹患者が多い。早期病変は根治が十分に期待できるものの、進行病変の場合、5年生存率は60%以下である。若年層の死因となることも多く、克服すべき代表的な難病といえる。乳がんを含めて、悪性腫瘍（がん）を難治にしている主因は、浸潤や転移といった腫瘍細胞の“動き”にある。がんは、遺伝子変異により生じた早期の微小な病変から、上述したような“動き”の性質を獲得して進展し、顕在化した進行性病変や遠隔転移へダイナミックに進行する。すなわち、腫瘍細胞の動きに関わる情報は、腫瘍が発症して間もない早期状態から進行病変へ転じる過程を、詳細かつ鋭敏に反映していると考えられる。しかし、がん診断の根幹をなす病理診断では、切り取った組織標本を観察するため、動きの情報を組織標本から取得するのは困難である。

近年、動物や組織を生かしたまま、細胞の動態を観察する生体イメージング技術が長足の進歩を遂げている。申請者はこれまで生体イメージング技術の1つである多光子励起イメージング技術を用いて、ホルマリン固定や薄切、染色など従来の工程をまったく行わずに、近赤外光で生きた組織の深部まで可視化する観察法を報告してきた^{1,2)}。この観察法では、生体内の組織を切り取ることなく可視化し、1細胞単位の高解像度で定量的な情報を得ることが可能である。そこで本研究では、この生体イメージング技術で乳がん組織の解析を行い、細胞が生きている未固定の fresh な組織から未染色のまま3次元的に腫瘍細胞を可視化する観察系の構築を行う。本観察系によって、生体組織内での腫瘍細胞の動きを観察することが原理的に可能となる。最終的には、ヒト組織を対象として fresh な組織の迅速な組織診断系を確立するとともに、ヒト組織のリアルタイム観察によって得られる腫瘍細胞の動きの観点から、がんの悪性化メカニズムを理解し、腫瘍の進行を早期に検出して根治の鍵となりうる、がん進展の責任因子を抽出することを目標とする。

2. 方法

マウスを用いて乳腺組織の多光子励起イメージングを行い、特に乳管を構成する乳管上皮

や周囲の脂肪細胞から検出できる自家蛍光について、350 nm から 650 nm 程度の範囲で、10 nm 毎に蛍光強度や性状を測定する。細胞以外の線維性間質や血管についても、同様に自家蛍光を測定し、乳腺組織を詳細に可視化するために利用可能な、自家蛍光の分布と波長域を決定する。ここで得られた自家蛍光の情報を基にして、ヒト臨床検体サンプルを多光子励起イメージングで解析する。ヒト組織は手術治療で得られる残余検体から同意を得たうえで取得する。哺乳類であるマウスの乳腺組織は形態的にヒト組織と類似しており、上述の手法で得られたマウスでの光学データを基に、fresh なヒト乳腺組織を多光子励起イメージングで観察する手順を確立する。複数の自家蛍光物質や非線型光学現象を検出し、fresh なヒト乳腺組織を無染色で可視化する。そして正常乳腺組織、非浸潤性乳管癌、浸潤性乳管癌など、複数の疾患の蛍光画像を集積する。残余検体は、イメージング終了後にホルマリンによる固定処理を行って通常の組織染色標本を作製し、通常の病理組織診断を行って、おのおのの蛍光画像と正解ラベルを紐づける。上記の手順で得られた各疾患の蛍光画像と正解ラベルを用いて、学習データとテストデータに分けて、deep learning による蛍光画像の自動分類システムを構築する。適合率 precision と再現率 recall を算出して、乳がんの早期診断や疾患層別化への応用を念頭において、構築した自動分類システムの有用性を検証する。構築した画像分類アルゴリズムの分類結果に基づいて、定量的な画像分類の観点から、乳がんの進展機序の解明を試みる端緒とする。

3.結果

乳腺組織に対し励起光の波長を 780 nm に設定して、自家蛍光のスペクトルを測定したところ、乳管上皮と周囲の脂肪細胞では、ほぼ同一のピークがみられる自家蛍光を発出していた。また、周囲の線維性間質からは第二高調波発生と考えられる 390 nm の急峻な蛍光スペクトルが検出された。さらに、周囲に散在する炎症細胞からは、上述した上皮細胞や脂肪細胞と異なる自家蛍光が発出されていることがわかった。また、乳管周囲にも上皮細胞や脂肪細胞と異なるやや波長域の長い自家蛍光の検出が確認できた。これらの結果に基づいて、ヒト乳腺組織を用いた多光子励起イメージングを行った。上述の自家蛍光スペクトルの結果から、390 nm 付近、480 nm 付近、630 nm 付近の 3 つの蛍光シグナルを画像化し、それぞれ青色、緑色、赤色の画像として描出し、この 3 枚の画像を重ね合わせて可視化した。この手順により、正常乳腺組織やその周囲の脂肪組織、さらに非浸潤性乳管癌や浸潤癌といった乳がん病変を、多光子励起現象に基づく自家蛍光のみを用いて可視化する手順を構築することができた (図 1)。

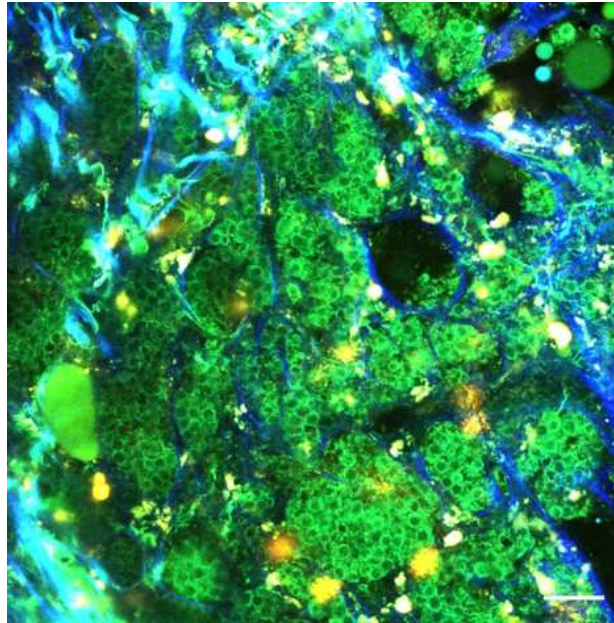


図1 乳がん組織の多光子励起イメージング画像

次に、上述の手順で得られた蛍光画像を自動分類する deep learning のアルゴリズムを構築した。総計約 150,000 枚を含む独立したテストデータを用いた解析では、1 辺が 64 μm 単位の観察単位で、イメージング画像内の乳がん細胞の有無を高確率で検出でき、さらに $\text{AUC}=0.989$ という非常に良好な分類成績で、イメージング画像におけるがん細胞の有無を分類することが可能であった (図 2)。上記の一連の結果から、ヒト生体組織を対象として、細胞が生きている未固定の fresh な組織から、未染色のまま 3 次元的に腫瘍細胞を可

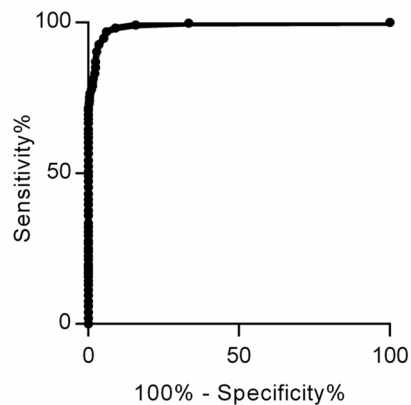


図1 deep learning による乳がん組織イメージング画像の検出精度

視化できる観察系の構築を行うことに成功した。

4.考察

今回の研究によって、ヒトの生体組織内における腫瘍細胞の動きを観察することを原理的に可能とするような、極めて画期的な観察系を確立できた。この観察系を用いてヒト乳がん組織のイメージングを行うことで、ヒトの生体内に存在している腫瘍細胞の動きの観点から、浸潤などがんの悪性化メカニズムを理解し、腫瘍の進行を早期に検出して根治の鍵となりうる、がん進展の責任因子を抽出することが可能となる。またこの観察系は、画像データの取得と deep learning による画像分類も即時的に行えることから、迅速な組織診断も可能とする技術であると考えられ、この観点からも今後研究を継続していきたい。

5.結語

今回、大阪難病研究財団の助成をいただき、本研究を通して、罹患者数の多い難病である乳がんの病態把握に迫ることができた。本助成に対して心から感謝申し上げます。本研究を通して得られた知見を活かすためにも、引き続き診療と研究に向き合っていく所存である。また、共同研究者として本研究の遂行に数多のご指導を頂いた石井優博士(大阪大学教授)にも、この場を借りて深謝申し上げます。

6.文献

1) Matsui T, Tamoto R, Iwasa A, Mimura M, Taniguchi S, Hasegawa T, et al. Nonlinear Optics with Near-Infrared Excitation Enable Real-Time Quantitative Diagnosis of Human Cervical Cancers. *Cancer Res.* 2020;80(17):3745-3754.

2) Matsui T, Mizuno H, Sudo T, Kikuta J, Haraguchi N, Ikeda JI, et al. Non-labeling multiphoton excitation microscopy as a novel diagnostic tool for discriminating normal tissue and colorectal cancer lesions. *Sci Rep.* 2017;7(1):6959.

7.成果発表

雑誌論文

・ Matsui T, Iwasa A, Mimura M, Taniguchi S, Sudo T, Uchida Y, et al. Label-free multiphoton excitation imaging as a promising diagnostic tool for breast cancer. *Cancer Sci.* 2022;113(8):2916-2925.