200　三次元的病理組織所見に基づく新規生検法の確立	野島　聡

【目的】病理組織診断は、腫瘍性疾患の悪性度・分化度・転移の程度や、炎症性疾患/自己免疫性疾患の炎症・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、医療における最終診断と位置付けられている重要な診断技術である。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光学顕微鏡で観察することにより行われるが、その標本作製・染色方法の根幹については、19 世紀に HE 染色が開発されて以来大きな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。

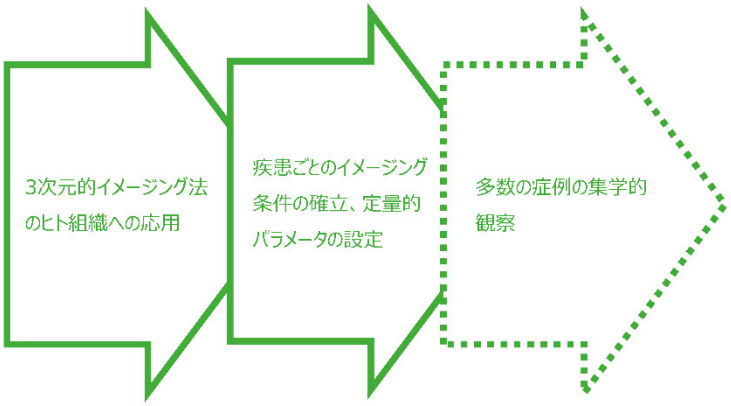
一方で、近年、基礎生命科学分野において蛍光顕微鏡を利用した最先端イメージング技術が目覚ましい発展を遂げている。特に、生体組織を透明化し、三次元的に観察する技術について次々と新しい試薬、光学的機器が開発されてきており、その代表である独立行政法人理化学研究所を中心に開発された生体透明化試薬および三次元イメージング技術である CUBIC は、マウス成体の臓器を透明化し 1 細胞解像度で観察する画期的な新技術であり、世界的にも大きな注目を集めている（Susaki EA、Ueda HR、et al. Cell. 2014 Apr ; Tainaka K、Ueda HR、et al. Cell. 2014 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 細胞解像度の三次元イメージとして取得することが可能となっている。

我々の研究プロジェクトは、基礎生命科学分野における最先端三次元イメージング技術である CUBIC をヒト病理組織診断に応用せんとする試みで、最先端イメージング技術と古典的病理形態学の融合を目指すものである。本研究では、主に特発性心筋症由来の心筋生検検体、大脳発生の神経膠腫組織検体の三次元的イメージング手法の開発に焦点をあて、これらの手法の標準化、新たな三次元的診断基準の開発を目指した。

【方法】心筋生検検体における心筋細胞の形態・走行、および大脳発生の神経膠腫組織検体における血管構造を三次元的にイメージングする手法について、CUBIC 試薬の種類や処理時間、蛍光プローブの種類や濃度といった様々な条件の検討、最適化を行った。

【結果】透明化試薬や蛍光プローブの条件設定を行うことにより、心筋細胞の走行や形態、大脳組織およびその腫瘍組織内における血管の走行や形態について、明瞭にイメージングを行う手法の開発に成功した。

三次元的病理組織診断法の確立にむけた各段階



200. 三次元的病理組織所見に基づく新規生検法の確立

野島　聡

大阪大学 医学部附属病院 病理診断科

Key words：診断病理，三次元イメージング，組織透明化

緒　言

病理組織診断は、腫瘍性疾患の悪性度・分化度・転移の有無や、炎症性疾患・自己免疫性疾患の炎症・線維化の程度といった病的所見を組織形態学的に診断する医療行為のことで、患者への治療方針決定の根幹に関わる重要な診断技術である。病理組織診断は、薄切した病変組織をヘマトキシリン・エオシン染色（HE 染色）で染色し作製したスライドガラスを、訓練を積んだ病理診断医が顕微鏡で観察することによって行われるが、その標本作製の基本的な手法には、19 世紀に HE 染色が開発されて以来、大きな改変は加えられていなかった。また、この古典的な方法には、肉眼で見て最も疑わしかった部位を通る断面だけを薄切し観察すること、平面上の 2 次元的な組織しか評価できないこと、といった技術的な限界もあった。そのため、病変組織を三次元的かつ包括的に評価できる、新たな病理組織診断手法が求められていた。

本研究では、2014 年に理化学研究所の研究グループにより開発された、主に基礎生物学領域における全脳・全臓器イメージングに用いられていた組織透明化／三次元的イメージング技術「CUBIC」を用いて、ヒト病理組織診断学を観察し、その臨床的な実用性を検討することを目的とした。本研究では、心筋生検検体、脳腫瘍検体を題材として取り上げ、これらにおける心筋細胞および血管の形態・走行の三次元的イメージング法の標準化を試みた。CUBIC 試薬の種類や処理時間、蛍光プローブの種類について、様々な条件を検討することにより、これらを明瞭にイメージングする手法を立ち上げることに成功した。今後は、これらを定量的パラメータにて評価する系の確立を継続するとともに、より多くの症例の検体を集学的に観察していく予定である。

方　法

1.　心筋生検検体の三次元的イメージング法の標準化

実験計画に従い、特発性心筋症由来の組織を確保し、これにCUBICを用いた三次元的イメージング手法を応用した。心筋組織に最適なイメージング条件を確立するため、以下に示す項目について様々な条件を設定し、いずれが心筋細胞の形態・走行をより正確に評価できるかについて検索した。それぞれの項目については、処理時間やプローブの濃度についても様々な条件を試し、いずれが至適かについて検討した。

・組織透明化試薬の種類：CUBIC-1、CUBIC-L、CUBIC-HL、CUBIC-2、CUBIC-R+

・蛍光プローブ：SYTO16、TOPRO-3、PI（Propidium Iodide）、Anilin blue、CFSE

2. 腫瘍組織内の血管構造の三次元的イメージング法の標準化

ヒト腫瘍病理組織についても、CUBIC を用いた三次元的イメージング手法の標準化を行った。本研究では、脳腫瘍としてもっとも代表的なものである神経膠腫を題材として取り上げた。高悪性度の神経膠腫においては、腫瘍随伴血管の不規則な構造が診断学的意義が高いことが、診断病理学において言われている。このことから、腫瘍組織内の血管を三次元的にイメージングすることを主目的に、手法の標準化を行った。このために、以下の項目について、いずれが腫瘍組織内の随伴血管の形態・走行をより正確に評価できるかについて検索した。それぞれの項目については、処理時間やプローブ／抗体の濃度についても様々な条件を試し、いずれが至適かについて検討した。

・組織透明化試薬の種類：CUBIC-1、CUBIC-L、CUBIC-HL、CUBIC-2、CUBIC-R+
・蛍光プローブ/抗体：UEA-1、WGA、Tomato-lectin、抗 CD34 抗体

結果および考察

1. 心筋生検検体の三次元的イメージング法の確立

検討した条件の中で、CUBIC-HL, CUBIC-R+を用いて透明化処理を行い、SYTO16 を用い染色した場合に最も、良好な心筋細胞のイメージングを達成できた（図 1）。

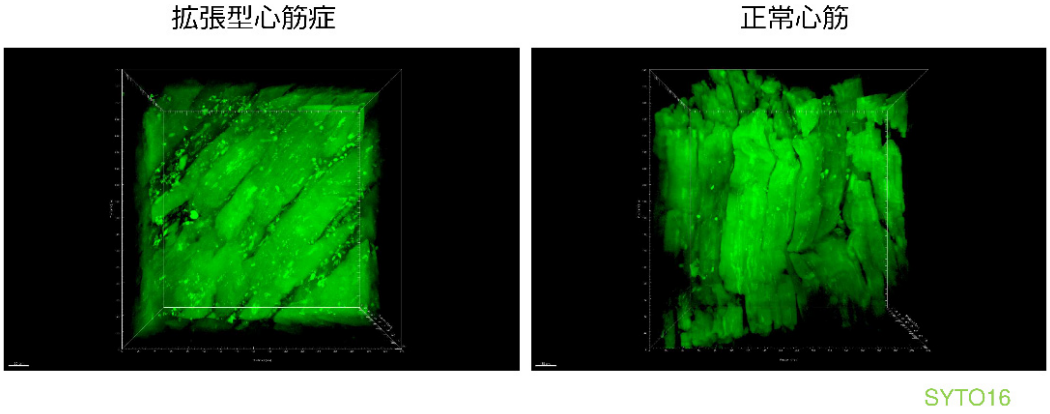


図 1. 心筋組織の三次元的イメージング
特発性心筋症うち代表的なものである、拡張型心筋症の組織、および陰性対照の正常心筋組織について、SYTO16 を用いて染色し、三次元的にイメージングしたもの。拡張型心筋症の心筋は心筋径が一定でなく、走行もやや錯綜していることが分かる。

2. 腫瘍組織内の血管構造の三次元的イメージング法の確立

検討した条件の中では、CUBIC-L、CUBIC-R+を用いて透明化処理を行い、Tomato-lectin を用い染色した場合に最も、良好な腫瘍随伴血管のイメージングを達成できた（図 2）。まず、ホルマリン固定後の正常の大脳組織を標本として用い、三次元イメージングの条件設定を行ったところ、Tomato-lectin を用いて染色した場合において、大脳内の血管の走行を明瞭にイメージングすることができた（図 2 上）。同様の手法を、神経膠腫のパラフィン包埋標本よりパンチアウトした組織に脱パラフィンを行った検体に応用したところ、腫瘍随伴血管の走行や分布の不整さについて、明瞭にイメージングすることができた（図 2 下）。

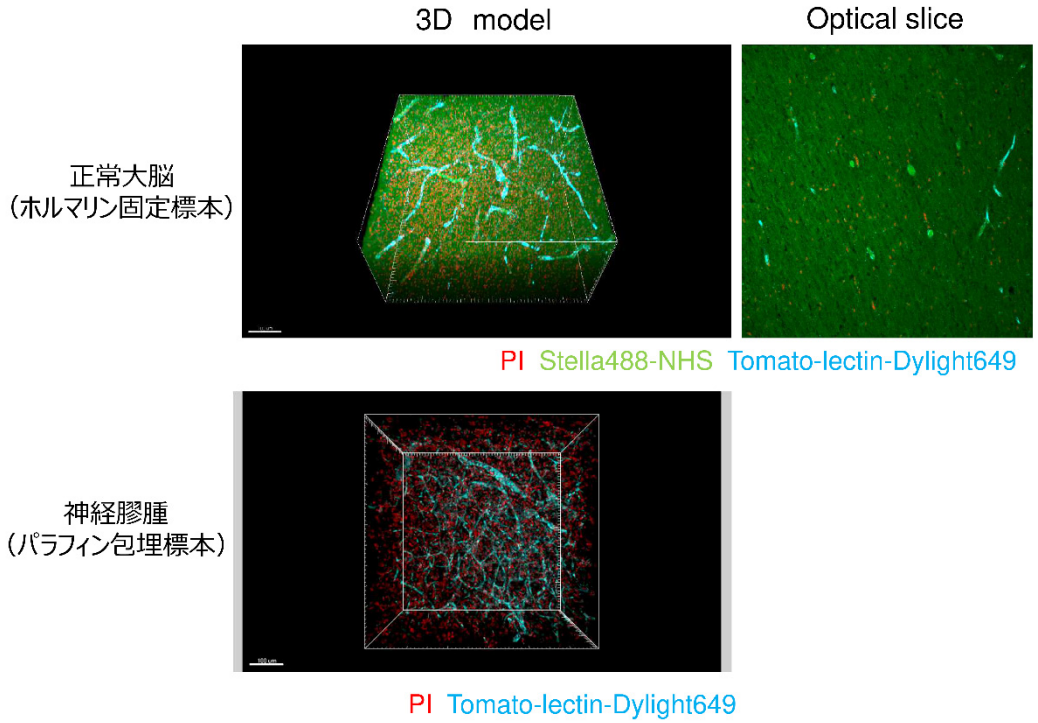


図 2. 正常大脳および脳腫瘍における血管の三次元的イメージング

正常大脳組織（ホルマリン固定後）および神経膠腫のパラフィン包埋ブロック由来組織について、CUBIC-L、CUBIC-R+による透明化に、Tomato-lectin による血管の染色を併用し、三次元的イメージングを行った。いずれの結果においても、血管の走行が明瞭に描出できている。腫瘍組織においては、血管の径や長さが不整であり、ところどころ途絶していることが分かる。

また上記以外にも、イメージング手技や臨床病理の知識を生かし、多数の研究グループ内外の技術的支援を行った［1～6］。

考　察

上記のごとく、透明化試薬や蛍光プローブの条件設定を行うことにより、心筋細胞の走行や形態、大脳組織およびその腫瘍組織内における血管の走行や形態について、明瞭にイメージングを行う手法の開発に成功した。心筋細胞の形態については、拡張型心筋症において心筋径が一定でなく、走行もやや錯綜していることが示せており、脳の血管のイメージングでは腫瘍の場合に血管の径や長さが不整であり、ところどころ途絶していることが示せている。

今後は、これらの定性的所見を数値化した定量的データとして示し、これを実際の臨床検体組織を用いて集学的に観察し、予後や治療抵抗性といった臨床的パラメータと比較検討する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科システムズ薬理学の上田泰己教授であり、本研究計画を遂行するにあたって多大なるご指導・ご支援をいただいた。ここに深謝の意を表する.

文 献

1) Kang S, Nakanishi Y, Kioi Y, Okuzaki D, Kimura T, Takamatsu H, Koyama S, Nojima S, Nishide M, Hayama Y, Kinehara Y, Kato Y, Nakatani T, Shimogori T, Takagi J, Toyofuku T, Kumanogoh A. Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization. Nat Immunol. 2018 Jun;19(6):561-570. doi: 10.1038/s41590-018-0108-0.

2) Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Cell Rep. 2018 Aug 21;24(8):2196-2210.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056.

3) Hayashi T, Fujita K, Nojima S, Hayashi Y, Nakano K, Ishizuya Y, Wang C, Yamamoto Y, Kinouchi T, Matsuzaki K, Jingushi K, Kato T, Kawashima A, Nagahara A, Ujike T, Uemura M, Pena MDCR, Gordetsky JB, Morii E, Tsujikawa K, Netto GJ, Nonomura N. High-Fat Diet-Induced Inflammation Accelerates Prostate Cancer Growth via IL6 Signaling. Clin Cancer Res. 2018 Sep 1;24(17):4309-4318. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0106.

4) Wada N, Nojima S, Tahara SI, Ohshima K, Kurashige M, Kawasaki K, Tone M, Kusumoto S, Ikeda JI, Morii E. Effect of glutamine on lymphoplasmacytic lymphoma, especially on the viewpoint of the differentiation into vulnerable subpopulation. Pathol Res Pract. 2018 Oct;214(10):1667-1674. doi: 10.1016/j.prp.2018.08.019.

5) Kajiwara C, Fumoto K, Kimura H, Nojima S, Asano K, Odagiri K, Yamasaki M, Hikita H, Takehara T, Doki Y, Morii E, Kikuchi A. p63-Dependent Dickkopf3 Expression Promotes Esophageal Cancer Cell Proliferation via CKAP4. Cancer Res. 2018 Nov 1;78(21):6107-6120. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1749.

6) Tahara S, Nojima S, Ohshima K, Hori Y, Kurashige M, Wada N, Motoyama Y, Okuzaki D, Ikeda JI, Morii E. Serum deprivation-response protein regulates aldehyde dehydrogenase 1 through integrin-linked kinase signaling in endometrioid carcinoma cells. Cancer Sci. 2019 Mar 25. doi: 10.1111/cas.14007. (in press)