

“光組織診断”を利用した乳がん組織の解析と病理診断への展開

Breast cancer analysis based on optical imaging and application to histopathological diagnosis.

大阪大学大学院医学系研究科 病態病理学・病理診断科 准教授 松井 崇浩

要 約

Reproductive ageの女性にとって、悪性新生物（がん）は若年死の原因となるだけでなく、美容面を含めた生活の質、そしてライフプランにも大きな影響を及ぼす重大な疾病である。特に乳がんは婦人科領域のがんと共に罹患率が高く、若年での発症も多い。さらには美容面や罹患後の生活への影響を考慮しながら治療すべき疾病でもある。そのため手術治療では、根治性と治療後の機能維持との両立を目指した縮小手術が多く行われており、その切除範囲の決定には迅速組織診断が重要な役割を果たす。しかしこの乳房温存術は迅速診断の再現性や不一致がときに問題となる。そこで本研究では、著者がこれまで子宮頸がんなどで開発してきた“光組織診断”を応用し、人工知能（Artificial intelligence; AI）による蛍光画像の定量的な解析を併用することで、reproductive ageの女性に好発するもう1つの重要な疾患である乳がんの術中迅速組織診断における新規イメージング技術の有用性を検証した。励起光波長と蛍光検出フィルタの調整により、freshなヒト乳腺組織を3色の蛍光画像で描出し、この3枚の画像を重ね合わせた蛍光画像で可視化する手順を確立した。次に、この蛍光画像を用いてdeep learningのアルゴリズムを構築し、イメージング画像におけるがん細胞の有無を高精度に分類することが可能となる分類系の構築を行うことができた。一連の研究成果は、ヒト乳腺組織を蛍光現象によって「切り取らずに」「その場で」可視化でき、これをAIで解析することで、がん細胞を迅速・高精度に検出できることを示すものである。今後、本研究成果を発展させることで、根治性と治療後の機能維持とを高いレベルで両立でき、reproductive ageの女性に最も適した乳がん治療を展開できるような、社会の実現が可能となると考えられる。

緒 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悪性腫瘍（がん）の1つで、いわゆる現役世代・Reproductive ageの女性にも多くの罹患者がみられる。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%以下とされている。若年女性の死因となることも多く、まさに世界が一体となって克服すべき疾患といえる。一方で、対象患者の大多数が女性である点からは、根治性のみならず、美容面や罹患後の生活への影響を考慮しながら治療すべき疾病でもある。そのため手術治療では、根治性と治療後の機能維持との両立を目指した縮小手術が多く行われており、その切除範囲の決定には迅速組織診断が重要な役割を果たす。しかしこの乳房温存術は迅速診断の再現性や不一致がとき

に問題となる。また、より根本的な問題に立ち返ってみると、乳がんを含めて、がんを難治たらしめている主因は、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、上述のような「動き」の性質を獲得して病変を増大させる。そして顕在化した進行性病変や遠隔転移へと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の状態から、進行病変へと転じる過程を、詳細かつ鋭敏に反映していると考えられる。しかし、がん診断において最終診断の役割を担っている病理診断では、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、染色など組織切片作製の従来の工程を全まったく行わずに、近赤外光で生きた組織の深部まで可視化する観察法の開発に取り組んできた。そしてこれまでに大腸がんやreproductive ageの女性に多く発症する子宮頸がんを対象として、生体イメージング技術の応用による新しい“光組織診断”の技術を確立し、その科学的な有用性を報告してきた^{1,2}。この観察法では、組織の切離や薄切、染色を行わずに、近赤外線を照射するだけでfreshな組織を立体的に可視化することができる。つまり、近赤外光と可視化装置があれば、手術部位を含めたヒト組織のリアルタイム観察が原理的に可能と考えられる。また、この観察法では組織を切り取らないため、生体内での細胞の動態も観察できるはずである。そこで本研究では、上述の観察法を、reproductive ageの女性に好発するもう1つの重要疾患である乳がんの領域へ応用し、その科学的な有用性を検証する。本研究を通じて、高精度で定量的な診断を迅速に行える新規技術の基盤的研究を行い、これにより、根治性と治療後の機能維持とを高いレベルで両立でき、reproductive ageの女性に最も適した乳がん治療を展開できる社会の実現を目的とする。

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、350nmから650nm程度の範囲で、10nm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作製し、通常の病理組織診断を行って、各々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。なお本研究は、参加研究機関の各倫理委員会にて審議され実施が許可された研究計画である。

結果

励起光の波長を780nmに設定して、乳腺組織に発生する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390nmの急峻な蛍光スペクトルが検出された。一方で、周囲に分布している炎症細胞からは、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判明した。さらに、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。上述した自家蛍光スペクトルの結果から、390nm付近、480nm付近、630nm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:文献3より改変)。

次に、上述したイメージング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。総計およそ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 μ m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

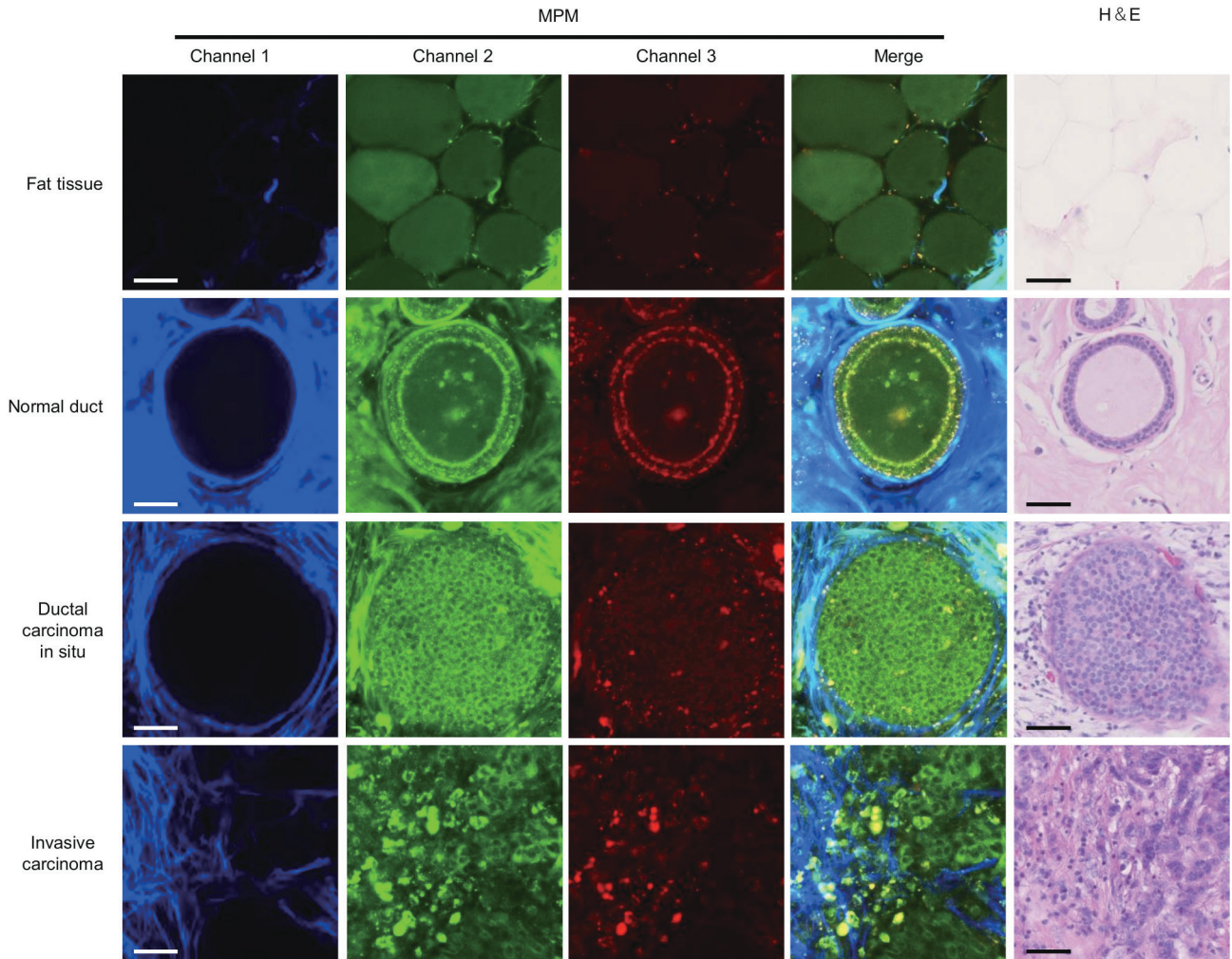


図1

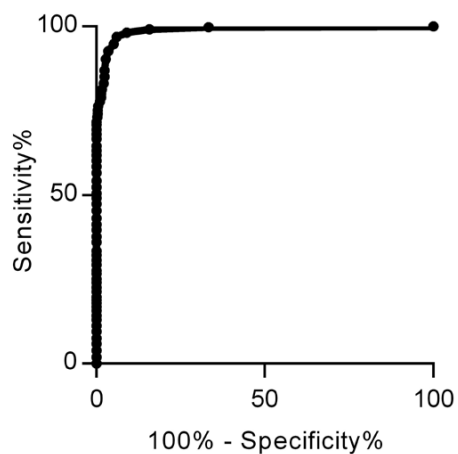


図2

を検出できるかどうか検討した。構築した分類系では、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:文献3より改変)。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視化できる観察系の構築を行うことに成功した³。

考察

本研究によって、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できると考えられる。この観点から今後も研究を継続していきたい。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る。この観察系によって、乳がんの手術治療で行わ

れている部分切除術において、患者さんの身体に存在する“真の”切除断端での腫瘍の遺残を評価することも可能になると考えている。

謝 辞

今回の助成に基づいた本研究を通して、乳がんの新たな組織観察法を開発でき、乳がんの病態評価に貢献することができた。本助成に対して心から感謝申し上げたい。また本研究では多方面から多大なるお力添えを頂いた。まず共同研究者の大阪大学・石井優先生から多くのご指導を頂いた。また、公益財団法人がん研究会有明病院の大野真司先生、堀井理絵先生、森園英智先生には、共同臨床研究の立ち上げから臨床サンプルの提供に至るまで多大なるご協力を頂いた。画像解析に関しては、株式会社ニコン

の清田泰次郎様、三村正文様、岩佐昭生様からのご協力で遂行することができた。ご尽力を賜った皆様にこの場を借りて深謝申し上げる。本研究を通して得られた知見を活かしていくためにも、引き続き診療と研究に向き合っていく所存である。

参考文献

1. Matsui T, Tamoto R, Iwasa A 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 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.
3. Matsui T, Iwasa A, Mimura M et al. Label-free multiphoton excitation imaging as a promising diagnostic tool for breast cancer. *Cancer Sci.* 2022;113(8):2916-2925.

Abstract

For women of reproductive age, malignant neoplasm is not only a cause of young death, but also a serious disease that greatly affects quality of life, including cosmetic and life plans. In particular, breast cancer has a high prevalence rate as well as gynecological cancers, and it often occurs in young women. Furthermore, it is also a disease that should be treated while taking into consideration the cosmetic and the impact on life after the disease. Therefore, reduction surgery is often performed with the aim of achieving both curability and functional maintenance after operation. Rapid histopathological diagnosis plays an important role in determining the resection range. However, the reproducibility and inconsistency of rapid diagnosis sometimes pose problems with breast-conserving surgery. In this study, by applying the “optical histology” that the author has developed so far, and by combining quantitative analysis of fluorescence images by artificial intelligence, we verified the usefulness of our novel imaging technique for intraoperative rapid histological diagnosis of breast cancer. A series of our research showed that it was possible to get fluorescent images of human breast tissue without tissue removal. In addition, it was also possible to detect cancer cells with high accuracy through the analysis with artificial intelligence. We think our results help the realization of the society that can achieve high level of both curability and functional maintenance after treatment.