

た。DA においては、6 例中 4 例で 1p の LOH が認められ、19q の LOH は 5 例で認められた。この FISH の結果について、現在マイクロサテライト解析を用いてさらに検討している。

### 3. Low grade glioma の放射線感受性について

Low grade glioma 28 例の放射線治療後の体積変化を検討した。その結果、腫瘍が 50%以上縮小する症例は 28 例中 15 例 (53%)であった。50%未満の縮小は 3 例 (10%)であった。5 例 (18%)では変化がなく、また 5 例 (18%)では 1 年以内に早期再発することがわかった。

#### D. 考察と結論

Low grade glioma において、特に OD/OA においては、LOH が全例に認められ、また MGMT プロモーター領域のメチル化も 85%の症例で認められ、化学療法に感受性があることが示唆された。DA についても、LOH や MGMT のプロモーター領域のメチル化の見られる症例が多数存在し、OD/OA 同様に化学療法に感受性があることが示唆さ

れた。

放射線治療により腫瘍が縮小する症例は、われわれの検討では腫瘍が縮小する症例が約 60%であることが判明した。最近 Grade 2 から Grade 3 への悪性転化は、残存腫瘍の体積に相関することが少しずつわかってきている。初期治療により腫瘍体積が減少することは、悪性転化の頻度を減らし、長期生存につながる可能性がある。

Low grade glioma は生存期間中央値 (MST) が 10 年と他の神経膠腫に比べて予後が長い、QOL 等がいつまで保たれるか判明していないことも多く、今後標準治療を確立する必要がある。

#### E. 今後の研究計画

Low grade glioma に対する放射線治療単独 (標準治療) と、テモゾロマイドによる化学療法単独による治療試験を実現するために、まず、テモゾロマイド単独により、腫瘍がどの程度縮小するのかを Primary endpoint する第二相試験を今後計画している。

神経膠腫における Podoplanin 発現の意義

分担研究者 西川亮 埼玉医科大学国際医療センター教授

研究要旨

神経膠腫において悪性度の進展に相関して podoplanin の発現の頻度と発現量が高くなっていることが示された。Podoplanin が悪性神経膠腫における悪性化機構に関わっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

Podoplanin は細胞膜貫通型 glycoprotein で, transforming activity を有し, 癌細胞の血小板凝集促進能, 浸潤や転移等に関わることが知られている。これまで脳腫瘍における発現や機能は検討されていない。我々は podoplanin が中枢神経胚細胞腫瘍, 特に germinoma に高発現していて, germinoma の新たな腫瘍マーカーおよび治療標的分子となる可能性を報告した。今回はヒト神経膠腫における podoplanin の発現を解析し, 悪性化や浸潤機構に関わる可能性について検討した。

B. 研究方法

抗ヒト podoplanin 抗体 (YM-1) を用いて 56 例の astrocytic tumor (diffuse astrocytoma [WHO Grade II]: 8 例, anaplastic astrocytoma [WHO Grade III]: 14 例, glioblastoma [WHO Grade IV]: 34 例) について免疫組織化学染色による発現解析を行った。同時に, 54 例の症例について (diffuse astrocytoma: 6, anaplastic astrocytoma: 14, glioblastoma: 34), 凍結組織を用いた real-time PCR と Western blot による podoplanin 発現解析を行った。

なお, 手術材料を用いて分子

生物学的解析を施行するに当たっては、包括的同意書（埼玉医科大学倫理審査委員会申請番号388，承認平成17年2月2日）によって患者本人の署名が得られた症例を対象とした。

### C. 研究結果

免疫組織化学染色では diffuse astrocytoma: 0%(0/8), anaplastic astrocytoma: 36%(5/14), glioblastoma: 53%(18/34)において podoplanin の発現を認めた。発現は細胞膜上にみられた。特に glioblastoma では壊死組織周囲や増殖血管周囲に高く発現する傾向を認めた(図1)。

Western blot においては anaplastic astrocytoma: 43%(6/14), glioblastoma: 65%(22/34)において podoplanin タンパクの高い発現を確認した(図2)。また、anaplastic astrocytoma に比較して glioblastoma において有意に podoplanin mRNA の発現が高い傾向を認めた(図3)。また、初発時既に播種が認められる glioblastoma において特に podoplanin mRNA 発現が高い傾

向にあった。

### D. 考察

Podoplanin は血管内皮に対してその elongation, migration, adhesion といった血管新生を促進する作用があることが知られている。癌細胞においてもその migration と invasion に関係していると報告されている。今回の解析においても glioblastoma において壊死組織周囲や増殖血管周囲に多核発現する傾向を認めた。従って悪性度の高い神経膠腫細胞から血管新生や浸潤を促す信号として発現され、腫瘍の増殖を促進する作用を果たしていることが推測された。

### E. 結論

Podoplanin は悪性神経膠腫において悪性度の進展に相関して発現の頻度と発現量が高くなっていることから、同腫瘍の悪性化と進展の機構に関わっている可能性が示唆された。

### F. 研究発表

三島一彦, 加藤幸成, 松谷雅生, 西川亮. グリオーマにおける

Podoplanin 発現の検討. 第 25  
回日本脳腫瘍病理学会,  
2007.4.19-20. 熊本

G. 知的財産権の出願・登録状  
況  
該当なし

図 1 神経膠腫における podoplanin の免疫組織化学染色

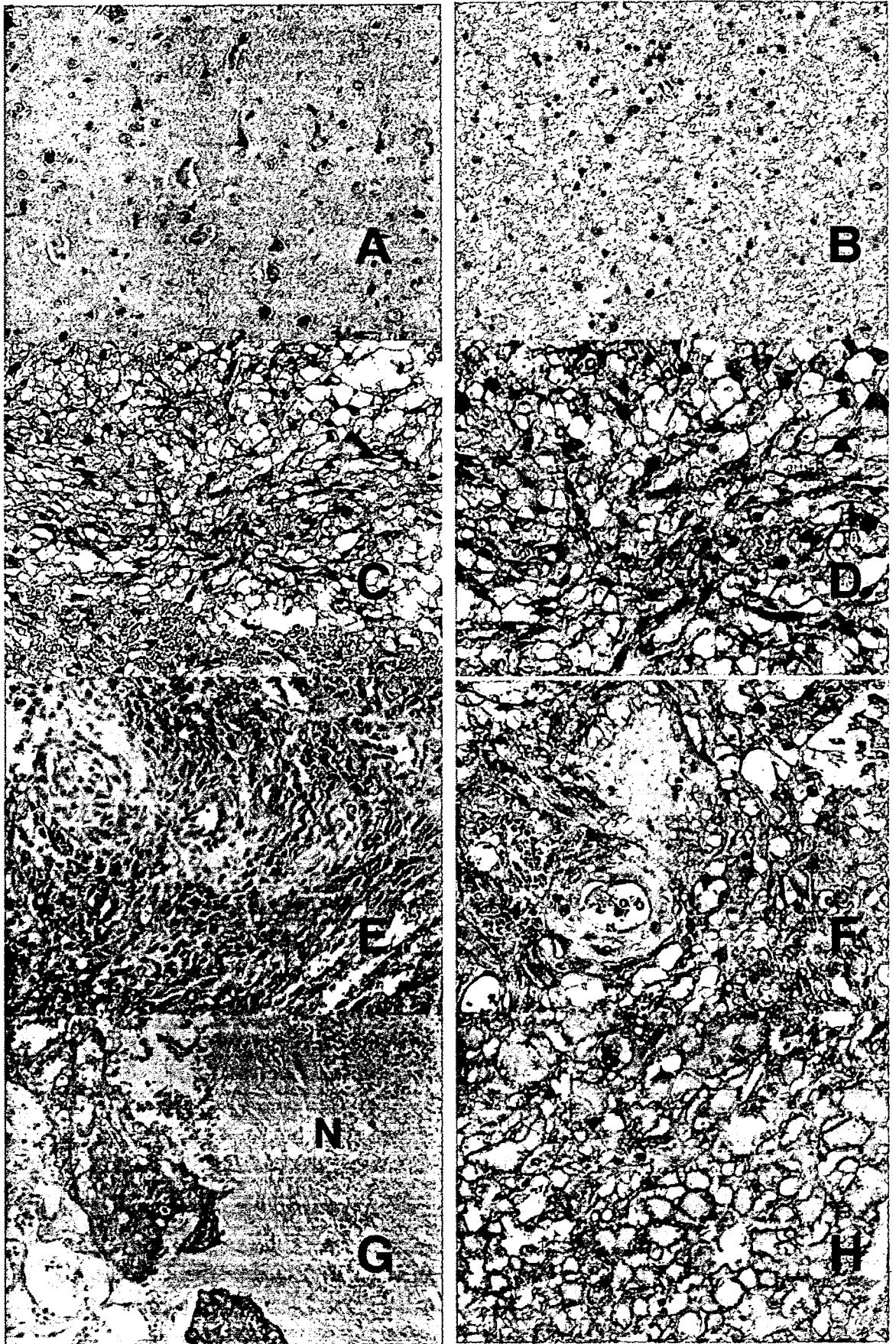
A:正常脳 x200, B:diffuse astrocytoma x200, C: anaplastic astrocytoma x200, D: anaplastic astrocytoma X400, E: glioblastoma における増殖血管周囲での発現 x200, F: glioblastoma における増殖血管周囲での発現 x400, G: glioblastoma における壊死組織(N)周囲の発現 x200, H: glioblastoma における多核巨細胞での強発現.

図 2 神経膠腫における podoplanin タンパクの発現(Western blot).

Diffuse astrocytoma ならびに正常脳においては発現を認めないが, glioblastoma では高頻度で発現を認め, anaplastic astrocytoma における発現頻度は中間である.

図 3 神経膠腫における podoplanin mRNA の発現. 悪性度の高い神経膠腫で高頻度に発現する傾向は蛋白レベルのみならず mRNA レベルでも同様である.

图 1



悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療の臨床応用に関する研究

分担研究者 浅井昭雄 関西医科大学脳神経外科教授

研究要旨

遺伝子治療における遺伝子銃をもちいた遺伝子導入法についてアデノウイルスベクターを対照として検討した結果、遺伝子銃による遺伝子導入効率は、*in vitro*、*in vivo*ともにアデノウイルスの半分程度であることが明らかになった。

A. 研究目的

固形癌に対してウイルスベクターを用いる方法では遺伝子導入効率に限界があり、また、合併症等の問題点も多々ある。そこでわれわれは、遺伝子銃を用いて遺伝子を標的癌細胞に導入することについて検討することを目的とした。

遺伝子銃は本来、細胞壁を有するため通常の方法では遺伝子導入が困難な植物細胞に物理的に遺伝子を導入する方法として開発されたもので、金製の微細粒子に遺伝子を付着させたものを高圧のヘリウムガスで噴射して細胞に撃ち込むものである。

近年、遺伝子治療への応用も踏まえて動物細胞にしかも *in vivo* の状態で撃ち込めるハンディタイプのもので開発されたがこれを実際の遺伝子治療に応用しようというものである。遺伝子治療は、固形癌の場合、手術で可及的に切除した後の補助療法という位置付けになる。遺伝子銃の場合、腫瘍残存部あるいは腫瘍浸潤部に対して直視下に遺伝子導入がおこなえるという利点があり、グリオブラストーマという脳内の比較的狭い領域の固形癌への遺伝子導入に最適であると考えられる。

## B. 研究方法

1. 遺伝子銃による *in vivo* 遺伝子導入に関する基礎データ集積：遺伝子銃を用いてラット生体脳に対して LacZ 発現ベクターを撃ち込み、噴射圧あるいは噴射量と、遺伝子導入効率、MOI、到達深度、拡散範囲、標的の精度、弾道上にある細胞の傷害の程度等との関係、撃ち込んだ遺伝子の残留時間等に関する基礎データを集積する。

2. グリオブラストーマ移植ラットに対する遺伝子治療（動物実験）：グリオブラストーマ細胞をラット大脳基底核部に定位的に移植して作成する担腫瘍ラットモデルに対して、遺伝子銃をもちいて、発現ベクターに組み込んだ HSVtk 等の自殺遺伝子、あるいはわれわれがこれまで基礎的研究を重ねてきた CPP32 等のアポトーシス誘導遺伝子を撃ち込み、抗腫瘍効果を判定する。

## C. 研究結果および考察

### ① 遺伝子銃による *ex vivo* 遺伝子導入の検討

F344 ラットの背部皮下に形成した直径約 2 cm の腫瘍を無

菌的に摘出し、滅菌ディッシュ上で遺伝子銃を用いて LacZ 発現ベクターを遺伝子導入し、再度、皮下にもどして生着させ、遺伝子導入の効率をアデノウイルスと比較検討した。遺伝子銃の発射圧は、100、200、400、600 psi とし、それぞれ 1 個の腫瘍に対し、偏りなく 20 発ずつ発射した。また、LacZ 発現アデノウイルスは直径約 2 cm ( $5 \times 10^8$  cells) の腫瘍に対して MOI (multiplicity of infection) 20、40、100 にて感染させた。それぞれの処理をした腫瘍を皮下に再移植して、さらに 7 日間生着発育させた。腫瘍を摘出して遺伝子導入効率を評価した。遺伝子銃では、100、200、400、600 psi と発射圧に応じて、遺伝子導入効率が最も高い部分で  $3 \pm 1.5\%$ 、 $5 \pm 3.5\%$ 、 $7 \pm 5.1\%$ 、 $9 \pm 5.5\%$ 、一方、アデノウイルスを感染させた腫瘍では、MOI 20、40、100 とウイルス濃度に応じて、遺伝子導入効率が、 $5.5 \pm 3.2\%$ 、 $7.8 \pm 4.3\%$ 、 $15.9 \pm 7.8\%$  であった。遺伝子銃の最大発射圧が 600 psi であり、アデノウイルスの最大 MOI は 400 ないし 600 程度

まで可能であることを考えると、遺伝子銃を用いるより、アデノウイルスを用いる方が遺伝子導入の効率がよいと考えられた。

② 遺伝子銃による皮下腫瘍組織への *in vivo* 遺伝子導入の検討  
皮下に移植生育させた腫瘍組織に対して *in vivo* で同様の検討を加えた。遺伝子銃を用いたものでは、100、200、400、600 psi と発射圧に応じて、遺伝子導入効率が最も高い部分で  $3.6 \pm 1.8\%$ 、 $5.9 \pm 4.1\%$ 、 $7.2 \pm 4.1\%$ 、 $9.5 \pm 6.5\%$ 、一方、アデノウイルスを感染させた腫瘍では、MOI 20、40、100 とウイルス濃度に応じて、遺伝子導入効率が、 $5.8 \pm 4.1\%$ 、 $7.5 \pm 4.1\%$ 、 $13.2 \pm 7.2\%$  と、極量を使用する場合にはアデノウイルスの方が導入効率が良好であった。

以上、遺伝子銃による遺伝子導入は、アデノウイルスによる方法に比して、導入効率が劣るという結果であったが、ウイルスより調製、取り扱いが簡易で、さらに、抗原性、毒性などウイルス固有の問題点を考慮に入れる必要がなく、腫瘍の免疫原性

を変える方法等、遺伝子導入効率の大小が *critical* ではないような遺伝子治療に有用であることが期待できると考えられる。

D. 研究発表  
なし。



分担研究報告書

脳腫瘍に発現する分子マーカーの形態変化を含めた

臨床病理学的意義との相関の研究

（がんの病理診断に関する研究）

分担研究者 中西幸浩 国立がんセンター研究所病理部

第一組織病理部室長

研究要旨

細胞接着機構を不活化させ、E-cadherinの発現を現弱させる働きのある新規分子Dysadherinのヒト髄膜腫における発現異常の臨床病理学的意義を検討した。髄膜腫切除検体を用いて、Dysadherin及びE-cadherinの発現異常を検索した。検索した髄膜腫61例中51例（84%）において腫瘍細胞の2割以上にDysadherinの発現が認められ、47例（77%）においてE-cadherinの発現低下が認められた。E-cadherinは、transitional type及びfibrous typeと比較してmeningothelial typeで有意により高頻度に発現していた。再発例では、Dysadherinの発現が高い傾向が見られた。以上より、Dysadherin及びE-cadherinは髄膜腫の形態形成に重要な働きをしていることが示唆される。

A. 研究目的

ヒト髄膜腫における

Dysadherin及びE-cadherin発現の臨床病理学的意義の検索。

B. 研究方法

手術により摘出された髄膜腫切除検体のホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いて、Dysadherin及びE-cadherinの

発現異常を検索し、臨床病理学的因子との比較検討を行った。

C. 研究成果

1. 腫瘍細胞におけるDysadherin発現が0-20%のもの(1+ group)が10例(16%)、21-50%のもの(2+ group)が25例(41%)、51-100%のもの(3+ group)が26例(43%)認められ

た。E-cadherin の発現が腫瘍細胞の 80%以下である発現低下を示した症例が 47 例 (77%) 認められた。

2. 10 例の再発例のうち 5 例 (50%) は、Dysadherin の発現が 2+ group であり、残りの 5 例 (50%) は 3+ group であった。統計的な有意差は得られなかったが、再発例では Dysadherin の発現が亢進している傾向が見られた。

3. E-cadherin の発現は、transitional type 及び fibrous type と比較して、meningothelial type で有意に高頻度であった ( $p=0.019$ )。

#### D. 考察と結論

1. Dysadherin 及び E-cadherin は髄膜腫の形態形成に重要な働きをしていることが示唆される。
2. Dysadherin の発現異常は髄膜腫の悪性度と関連している可能性がある。

#### E. 今後の研究計画

当院及び他施設の手術材料の多数検体を用いて、髄膜腫における Dysadherin 及び E-cadherin 発現の臨床病理学的意義を再評価する。

悪性脳腫瘍に関する統合化データベース解析のための、統計・情報学に基づいた新しい解析手法の開発に関する研究

分担研究者 高橋 広夫 中部大学 講師(専任)

### 研究要旨

悪性脳腫瘍に関して、個々の症例のリスク分類、治療効果を予測するTRIシステムを構築することを目的としている。このため、患者背景・網羅的な遺伝子発現などの統合化データベースを作成し、このデータを解析するための統計的・情報学に基づいた新しい解析手法が必要である。統合化データベースが完成するまでの間、他のデータベースを用いて新手法の開発を行った。

### A. 研究目的

本研究は、TRIシステムを構築するためのデータベース解析手法の開発を目的としている。そのため、悪性脳腫瘍に関する統合データベースが完成するまでの間、以下の検討を行った。

#### 1)がんのサブタイプの再分類法の開発

軟部腫瘍は、極めて稀ながんであり、なおかつ、種類が多様であるために、解析があまり進んでいない。多形型悪性線維性組織球腫(MFH: malignant fibrous

histiocytoma)は、軟部腫瘍の中でも、予後の悪いタイプの一つであり、MFHの詳細な研究が必要とされている。このためMFHの再分類法の検討を行った。(論文1)

#### 2)がん診断のための判別器構築法の開発

がんのテーラーメイド医療の為には、診断マーカー抽出法の開発と、診断モデル(判別器)が必要であるが、従来法では、遺伝子発現データを始めとした網羅的な生物情報の解析は困難である。そのため、新しい解析手法の開発が必要であ

り、新しい手法として PART-BFCS 法の開発を行った。(論文 2)

### 3) 効果的なマーカー遺伝子抽出法の開発

シンプルで使いやすいマーカー遺伝子抽出法を開発するために、我々が、以前開発した新しい遺伝子スクリーニング手法である PART 法の概念を従来の統計手法に導入した新しい手法 S2N' 法の開発を検討した。

(学会発表 1)

## B. 研究方法

1) 脱分化を起こした軟部腫瘍の様々なタイプの集合体が MFH であるという仮説を立て、MFH の再分類を行った。典型的な軟部腫瘍の dedifferentiated liposarcoma(DDLs), myxofibrosarcoma(MFS), leiomyosarcoma(LMS), malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST)、そして fibrosarcoma(FS)の 5 タイプから GeneChip を用いて得られた遺伝子発現パターンと、MFH の遺伝子発現パターンを解析に用いた。このデータを新たに開発したバイオインフォマティクス技術を用いて、21 症例の MFH を DDLs, MFS,

LMS, MPNST、そして FS の 5 つのタイプに類似しているか、もしくはどれにも似ていないかを解析した。

2) これまで我々は、新しい遺伝子スクリーニング手法である PART(projective adaptive resonance theory)法と、診断モデル構築と同時にバイオマーカーの抽出が可能な新しいモデリング手法である BFCS(boosted fuzzy classifier with the SWEEP operator method)法を開発し、従来法よりも優れていることを示した。本研究では、この二つの手法を組み合わせた PART-BFCS 法の開発を行い、機能を追加し、脳腫瘍(髄芽腫)や白血病のマイクロアレイデータに応用した。

3) 我々が、以前開発した優れた遺伝子スクリーニング手法である PART 法の概念を、従来法である S2N(t 検定に類似の手法)に導入することで、従来法よりも、効果的で、使いやすい手法である S2N' を開発した。この手法を白血病、脳腫瘍(髄芽腫)、リンパ腫、乳がんの遺伝子発現データに応用して効果を確かめた。評価方法としては、それぞれのデータセットをラ

ンダムに2分割し、1つ目のデータセットにおける  $p$  値が、2つ目のデータセットと同等な値を示すかどうか相関係数を計算することで調べた。効果的なスクリーニング方法では、1つ目と2つ目のデータセットで相関が高くなることが期待される。

(倫理面への配慮)

公に公開された、もしくは、倫理審査を経たデータのみ解析に用いている。

### C. 研究成果

1) ほとんどの MFH が、DDLs, MFS, LMS, MPNST、そして FS のいずれかに再分類することができ、さらに、この結果は、病理組織画像の傾向と一致した。

2) 新たに開発した PART-BFCS 法を、脳腫瘍(髄芽腫)のマイクロアレイデータに応用し、予後(生存 or 死亡)予測モデルを構築したところ、わずか 30 サンプルのデータから構築したモデルで、評価のためにとっておいた 14 サンプルのデータを 77% の正答率で予測できた。従来法と比べ、いずれの手法に対しても、本手法は、正答率が 10%~20% と大きく上回った。ま

た、本手法は高速、高信頼性、IF-THEN ルール抽出が可能といった多くの特徴を有し、脳腫瘍の予後解析において、CCND1 と USP4 など有用な既知バイオマーカーが自動抽出されており、今後の解析で、未知の遺伝子マーカーを発見できる可能性を示している。また、得られた IF-THEN ルールから生物学的な解釈が容易に行えることが示された。その他、白血病の遺伝発現データへの応用においても同様な効果が得られた。

### D. 考察

1) MFH が、様々なタイプの軟部腫瘍がより悪性化したものが MFH であることが分かり、また、本手法の有効性が確認できた。本手法が悪性脳腫瘍の統合データベースが構築された後、このデータベースに応用することで、今までの手法とは違った側面からの解析が可能になる事が期待される。

2) PART-BFCS 法は、従来法に比して、多くのメリットがあり、本手法を用いることで、適切な診断モデル構築や、マーカー遺伝子探索、がんのメカニズム解明に有効であることが期待される。

3) S2N'は、従来法を改良することで得られた優れた遺伝子スクリーニング手法であり、従来法よりも優れていることが分かった。本手法を現在構築中の統合化データベースの解析に用いることで、効果的なマーカー遺伝子を抽出できる可能性を示している。

#### E. 結論

1)~3)のように、がんのサブタイプの再分類法、がん診断のための判別器構築法、効果的なマーカー遺伝子抽出法を開発することが出来た。これらの手法を改良しつつ、完成した悪性脳腫瘍の統合化データベースに適用することで、今までの解析では分からなかった多くのことが解明できることが期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakayama R, Takahashi H et al., Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma., Mod. Pathol., 20(7), 749-759, 2007.
- 2) Takahashi H, Honda H et al., New cancer diagnosis modeling

using boosting and projective adaptive resonance theory with improved reliable index., Biochem. Eng. J., 33(2), 100-109, 2007

#### 2. 学会発表

- 1) Takahashi H, Honda H et al.: S2N': New gene filtering method for gene expression data, ECB2, (Cambridge) 2007.8
- 2) 高橋広夫 本多裕之等：射影適応共鳴理論とブースティングの組み合わせ手法 PART-BFCSを用いたがん組織の発現解析第59回日本生物工学会（広島）2007.9

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

「希少がん（悪性脳腫瘍）の個別適正化治療のための TRI (Translational Research Informatics)システムの構築」に関する研究

分担研究者 齋藤 彰 日本電気株式会社中央研究所比叡イノベーションセンター

研究要旨

悪性脳腫瘍の個別適性治療のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた統合解析を行う。本報告では、そのうちの病理標本画像のデジタル計測について報告する。

A. 研究目的

Glioblastoma において化学療法・放射線療法に奏効する症例はどのような症例なのか、長期生存する要因はなにか、また Glioblastoma は他のグレードの脳腫瘍に対しどこが異なるのかなどの解明のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた総合的解析を行う目的でプロジェクトが実施された。またこのプロセスで収集された脳腫瘍に関するデータは総合的なデータであり、今後様々な施設での解析における基準データとなることを念頭とし、データ整理を実施する目的である。この中でNEC側の分担は次の5点である。

- ① 遺伝子の発現解析を行い、前述の目的に対しアプローチを行うとともに、発現から見た染色体状態の推定も含めた解析を実施する。データ取得は国立がんセンター殿で行う。
- ② プロテオーム解析におけるデータ取得と解析作業を実施し、タンパクレベルからのアプローチを行う。
- ③ 病理画像データを解析し、病理画像を計測することにより組織レベルでの解析を行う
- ④ これらのバイオ情報および臨床情報・手術情報を格納するデータベースおよび症例管理システムの構築および基準データとしてのデータベースの構築を行う。
- ⑤ この上で総合的データマイニングおよび解析の支援を行う

⑤についてはすべてのデータ取得が完了後になるので本年度は実施できない。

すべてのデータは連結不能匿名データでの解析を行い、臨床情報およびそれを管理するシステムは国立がんセンター内医局に限定することで構築した。

本報告書では、筆者の分担研究部分である③遺病理画像の計測について、その研究状況を説明する。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院を中心に収集された脳腫瘍検体の病理標本および免疫染色標本について、主任研究者である成田先生の指示に従い、デジタル画像取得および画像における計測を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究の活動内容および計画について、インフォームドコンセントが取られているか、匿名化管理がされているか等のチェック項目とともに、国立がんセンターおよび日本電気株式会社それぞれの倫理審査委員会の稟議を経て、研究活動の承諾を得ている。

また、実際のデータの取り扱いおよび管理については、いわゆる三省倫理に則った匿名化担当者を置き、データの匿名化とその安全性を確保している。さらに、互いにデータや染色スライド等の預り証を交わし、保管と返却について厳重に管理している。

1. 症例について

非腫瘍細胞 5 症例(6 症例中 1 症例除外)、

Astrocytoma grade2 10 症例、grade3 18 症例、Oligodendroglioma grade2 8 症例、grade3 12 症例、Oligoastrocytoma grade2 14 症例、grade3 16 症例、Glioblastoma 71 症例、その他 13 症例の合計 168 症例(うち除外 1 症例)の遺伝子発現データが収集された。

## 2. 病理画像データ解析とその手法

### 2. 1. デジタル画像の取得

浜松ホトニクス社製のデジタルスライド画像読み取り装置NDPを使用し、HE染色・CD31/3/20/68およびMibの免疫染色画像を取得した。これらの画像はすべてDVDにて主任研究者である成田先生へ提供を行った。

### 2. 2. 画像解析対象

取得されたデジタル画像をもとに10倍を中心とし、細胞核の情報は40倍の画像で解析を行った。解析については自動細胞核抽出プログラム・免疫染色については発色剤であるDABの色素分析プログラムを構築し、自動にて全領域を対象とした計測と目視により、最も各症例の特徴を有した領域を数枚選択した上での画像計測を実施した。

### 2. 3. 画像解析項目

HE染色画像においては、10倍画像で2048X2048ピクセル単位のメッシュに画像を分割し、各画像単位に細胞核の個数を計測する。1ピクセルは $0.92\mu\text{m}$ に相当する。 $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ での平均細胞核数に変換し、各画像単位の平均・標準偏差などの統計数量と組織全体での平均・標準偏差などを算出する。各組織の辺縁でメッシュ内の組織占有率が低いところは誤差を拡大する可能性があるので25%以下のメッシュについては除外した場合の計測を実施した。40倍の画像を用い、細胞核の輪郭線を抽出し、細胞核面積と周囲長を算出する。これらの値から円形度を算出し、平均・分散・最大・中央値などの統計数量を算出した。免疫染色についてはCD31/03/20/68およびMibの抗体にて染色された細胞とされない細胞の個数を10倍の画像を使用して計測し、染色率を算出した。特にMibについては目視で最も染色率が高い領域を選定し、その領域についての計測も実施

した。

## C. 研究結果

### 1. HE染色画像

HE染色標本は診断にも使用される基本となる染色であり、主として細胞の密集度と細胞核の変形度を計測した。脳の正常領域あるいは悪性度の低い腫瘍の場合、 $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ の領域内の細胞数は50個以下で30個程度が中央値となる。これに対しGlioblastomaなどでは130-200個と細胞の密集度が測定された。これらの指標をカテゴリー化し、元の画像のメッシュ単位に分割して画像の25%以下の画像および血液の影響が強い領域などを除外して症例の平均細胞数とした。一般的にOligodendroglioma、OligoastrocytomaのOligo成分を含む症例は含まない症例に比べて細胞数の密集度が高いことが計測された。Glioblastomaにおいても明確なoligo成分を待つ細胞を観測することは困難であるが、細胞数の多い症例においてはoligo由来の細胞を確認することができる。一方細胞の大きさおよび円軽度については悪性度の低い症例についてはほぼ一定の領域に分布するがGlioblastomaになると分布は拡大し、疾患の名称の通りMultiformを示している。

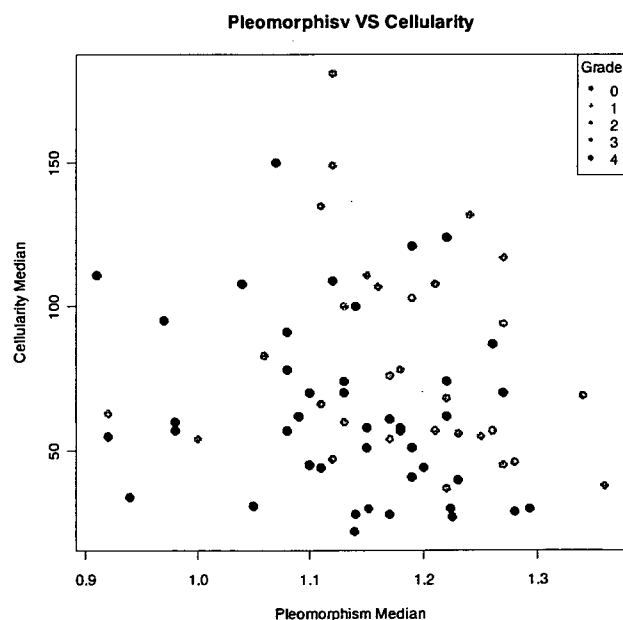


図1. 細胞数と変形度の分布

図1に示す通りにGlioblastomaでは細胞の密集度および変形度の分散が大きく、multiformであることを示すとともに、これらの指標および他の指標が



らさらに細分化された状態に分類可能であることを示唆している。

## 2. CD31 画像

CD31 は血管内皮細胞などを染色可能な抗体であり、これを使用して腫瘍内血管について計測した。血管は円筒形の形状であり、断面は円形になるが、水平方向に切断されていれば帯状に観測される。血管の面積はその切断方向にも依存するが、各症例無作為に作成されているとすれば血管量に相関する。このため面積と、画像上で独立して存在している血管の個数の両方を測定した。本来細胞数が多いためには栄養・酸素補給のため血管が多いことが重要であるが、必ずしも単純な相関は認められなかった。

## 3. CD03・20・68 画像

CD03はT細胞 CD20はB細胞 CD68はマクロファージを特異的に染色する抗体である。特に CD20 については染色状態が悪かったのかもとともT細胞の浸潤がないためかは今の時点では不明であるが染色において計測可能な状態ではない。これらの指標は腫瘍に対し免疫系の反応がどの程度かを示す値として今後使用していく。

## 4. Mib 画像

細胞分裂周期において Mib(10q25-qte, Ki67)は発現する。従って染色率は細胞個数と相関し、一方で細胞周期内にいる Active な細胞の個数を示す値になる。同じ症例でも部位によりその発現に差異があり、組織全体では臨床感覚よりも低値を示す結果となった。このため目視により高発現領域を 10 倍で画像を採取し、測定を実施した。

## 5. One-Cell detector の作成

Oligo 成分を示す細胞核の周辺に空白領域を持ちいわゆる“目玉焼き”状態の細胞、一定の核の大きさ以上の核の個数抽出、核小体を明瞭に示す核など特定の細胞の個数を計測することを目的に、ユーザが対象となる核を画像上で正例、計測対象外となる細胞を不例として指定していくことにより、機械学習の特徴量を抽出しながら機会学習を行い、次に与えられる画像に対して正例と判定されるシステムを構築した。今後このシステムを活用し、対象画像の

各種成分別な細胞の分類を試みる。

## D. 考察

病理標本画像および免疫染色によって示される組織像は、各細胞の活動の結果によって構成されたものである。いわば細胞核の遺伝子発現の結果として構成された組織像になっている。このため遺伝子発現解析から見れば病理組織画像から計測された結果は Phenotype になっているはずである。細胞の密集度が高いことは細胞周期が活発であることの結果であるため細胞周期関連の遺伝子発現と相関するはずである。また Mib の染色は Mib (10q25-qte, Ki67) の発現と相関するはずである。特に Mib1 は単一の遺伝子の発現とその結果生じた蛋白を抗体染色したものでいわば因果関係となっている。この両者について相関をみることは、一方の遺伝子発現解析のデータに対してその保障を与え、信頼性を示すものとして使用可能である。しかし細胞密度と細胞周期関連の遺伝子については、細胞周期は単一の遺伝子で制御されているものではなく、複雑なプロセスの中での結果となる。この中で腫瘍内の細胞周期はそれぞれの悪性度ごとに分類された組織ごとに同じなのか、またいかなるステージでそれを牽引している遺伝子はなにかといった探索をすることが可能となる。Glioblastoma のようにその多様性を示す疾患においては細胞周期の遺伝子発現と、その結果としての細胞密度の情報、さらには薬剤の応答性といった観点からどのように分類されるべきかといった解析に繋がる。この部分については、分担研究員の秋葉から報告を行う。

## E. 結論

病理画像および免疫染色画像から計測を行い、遺伝子発現解析に対して Phenotype としての情報を与えられるかといった観点から画像解析およびデータ収集を実施し、解析を行った。結果として遺伝子解析の結果を補足すること、そのデータの妥当性を与えることは単純な集計からも可能であることが示された。今度は逆に、遺伝子発現から見たグループ化の中で、外れ値を示す症例では、病理画像のなにが異なっているのかを探索することにより、今後症例

ごとに遺伝子発現解析をすることなく各症例の特徴を把握できるような指標をえることが可能となる。さらに今後は細胞核の高次構造からの特徴量を採取することで、よりマイクロな遺伝子発現情報に対し重要な Phenotype を与えることが可能である。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 社内技術報告書

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

「希少がん（悪性脳腫瘍）の個別適正化治療のための TRI (Translational Research Informatics) システムの構築」に関する研究

分担研究者 秋葉 幸範 日本電気株式会社バイオ IT センター

研究要旨

悪性脳腫瘍の個別適性治療のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた統合解析を行う。本報告では、そのうちの遺伝子発現データの解析について、群間比較によるマーカー候補遺伝子の同定や生存時間解析などを報告する。

A. 研究目的

悪性脳腫瘍組織の病理画像データから特徴量を計測し、それらと遺伝子発現とがどのように関連づけられるか、さらに予後との関連を探索する。とくに画像計測データが従来の病理検査結果や医師の観察結果の裏づけとなるかどうかに着目する。

B. 研究方法

主任研究者である国立がんセンター中央病院成田先生の指示により、下記の手順で病理画像データ収集・蓄積と遺伝子発現データとの関連性の解析を実施する。

- ① HE 染色、および、CD3、CD20、CD31、CD68、MIB-1 の免疫染色スライドをそれぞれ作成（国立がんセンター中央病院）。
- ② 上記スライドをスキャンし、病理画像データを取得(NEC)
- ③ 新たに開発した画像計測ソフトウェアを用いて病理画像から細胞数や特徴量等を自動計測しデータを集約(NEC)。
- ④ 病理画像の細胞数・特徴量等を表現型として、昨年度収集された遺伝子発現データとの関連性を探索(NEC)。

（倫理面への配慮）

本研究の活動内容および計画について、インフォームドコンセントが取られているか、匿名化管理が

されているか等のチェック項目とともに、国立がんセンターおよび日本電気株式会社それぞれの倫理審査委員会の稟議を経て、研究活動の承諾を得ている。

また、実際のデータの取り扱いおよび管理については、いわゆる三省倫理に則った匿名化担当者を置き、データの匿名化とその安全性を確保している。さらに、互いにデータや染色スライド等の預り証を交わし、保管と返却について厳重に管理している。

1. 症例について

非腫瘍細胞(NB) 3 症例、Gliosis 4 症例、PA 2 症例、DA 5 症例、AA 7 症例、OA 7 症例、AOA 8 症例、AO 1 症例、Glioblastoma 37 症例の合計 74 症例について下記の病理画像データが収集された。

(1) HE 染色

Cellularity および Pleomorphism 指標

(2) 免疫染色

CD31：組織全体の面積に対する血管面積の割合  
その他免疫染色：全細胞数に対する免疫染色細胞数割合

2. データ解析とその手法

2. 1. 群間比較

群間比較では、t 検定や SAM(Significant Analysis of Microarray)、さらに Pathway 解析として Ontology データを用いた sigPathway 解析を使用した。症例数や検出力、FDR(False Discovery Rate)

等を考慮し、それぞれの手法を適宜選択適用した。

SAMでは有意水準と許容するFDRを調整しながら統計量の上位遺伝子を抽出する。sigPathway解析は統計解析ソフトRの関数で、公開されているOntologyデータベースから得られた遺伝子セットを用い、遺伝子セット間の統計量NTkと症例群間の統計量NEkから総合的に有意なパスウェイを順位付けする。

## 2. 2. 多変量解析

病理画像計測データと遺伝子発現データとの関連性を探索するために主成分分析、因子分析等の多変量解析の適用を試みた。

## 2. 3. 共発現遺伝子の探索

発現データで相関解析を実施。

## C. 研究結果

### 1. Cellularity, Pleomorphism データ

説明変数として、腫瘍のグレード、Cellularity(単位面積あたりの細胞数)の中央値および最大値、Pleomorphism指標の中央値と最大値の5つを取り、因子分析を実施した。固有値1以上の因子はひとつだけであった。サンプルの病理分類と因子スコアの箱ひげ図を図1に示す。このとき、因子負荷量の絶対値が最も大きい変数はCellularityの最大値で値は0.88であった。

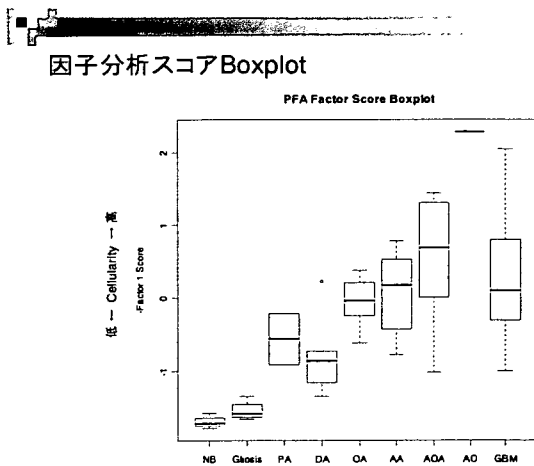


図1. 病理分類と因子スコア

### 2. MIB-1 免疫染色データ

MIB-1画像について、自動計測および成田先生手作業による染色細胞割合のデータと遺伝子発現デー

タとの関連性を探索した。

### (1) 遺伝子発現からみた画像計測データ

MIB-1(MKI67)発現データのクラスター分析による発現の高低による二群分けと、その二群間でのMIB-1染色割合を比較した。図2は症例対MKI67発現プローブシグナルのクラスター分析結果である。右側の高発現群29症例と左側の低発現群35症例に分かれた。二群間のパスウェイ解析(表1)とMIB-1染色画像の計測データ比較(図3)の結果を載せる。画像計測では成田先生による手作業計測が有意( $P=2.4e-10$ )となった。

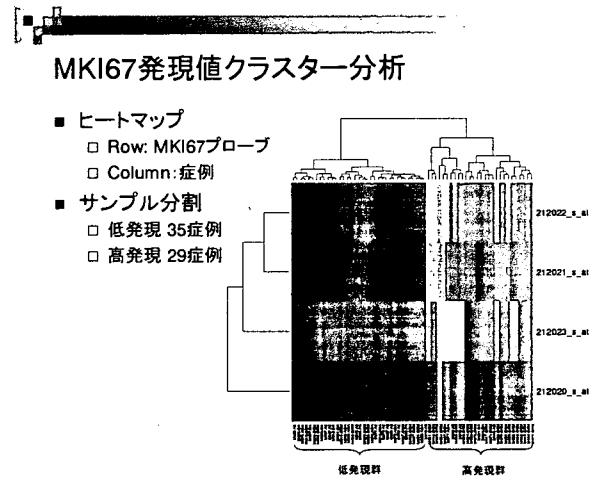


図2. MKI67発現クラスター分析

表1. sigPathway解析上位30パスウェイ

IndexG	Gene Set Category	Pathway	Set Size	Percent Up	NTk Stat	NTk q-value	NTk Rank	NEk* Stat	NEk* q-value	NEk* Rank	
1	1049	GO:0007067	mitosis	347	29	18.71	0	1	7.78	0	4
2	2981	GO:0000687	M phase of mitotic cell cycle	354	30	18.57	0	2	7.66	0	9
3	5090	GO:000279	M phase	445	31	18.06	0	3	7.32	0	13
4	526	GO:0005894	chromosome	483	30	14.83	0	7	7.52	0	9
5	3013	GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	28	18	11.65	0	19	8.43	0	2
6	6584	KEGG	Cell cycle	260	25	15.18	0	6	7.2	0	20
7	5614	GO:0000819	sister chromatid segregation	31	26	10.92	0	24	7.96	0	3
8	6596	humanpath	Cell Cycle	267	27	15.26	0	5	6.93	0	26
9	3170	GO:0051325	interphase	203	28	13.19	0	14	7.24	0	17
10	3173	GO:0051326	interphase of mitotic cell cycle	200	28	13.19	0	14	7.24	0	17
11	6470	KEGG	Pyrimidine metabolism	181	25	10.88	0	25	7.98	0	11
12	1057	GO:0007051	spindle organization and biogenesis	35	26	10.37	0	30	7.99	0	7
13	3318	GO:0051301	cell division	361	36	13.74	0	10	6.81	0	30
14	4647	GO:0006260	DNA replication	354	30	15.56	0	4	6.58	0	40
15	1086	GO:0007068	regulation of mitosis	97	25	10.61	0	27	7.21	0	18
16	2989	GO:0000686	G2/M transition of mitotic cell cycle	36	28	9.94	0	36	7.24	0	16
17	468	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	323	26	11.5	0	21	6.95	0	34
18	6169	BioCarta	Role of Ran in mitotic spindle	29	28	9.14	0	45	7.32	0	12
19	3027	GO:0000075	cell cycle checkpoint	82	23	11.64	0	20	6.45	0	47
20	4690	GO:0006281	DNA repair	406	30	13.85	0	9	6.24	0	59
21	6085	BioCarta	Spliceosomal Assembly	35	20	8.63	0	58	7.27	0	14
22	6163	BioCarta	AKAP95 role in mitosis and chromosome dynamics	23	17	8.81	0	54	7.2	0	19
23	2920	GO:0000067	DNA replication and chromosome cycle	24	12	8.47	0	65	7.39	0	10
24	3296	GO:016853	isomerase activity	245	31	8.87	0	52	6.95	0	23
25	6336	BioOyc	de novo biosynthesis of pyrimidine deoxyribonucleotides	28	14	8.49	0	62	7.26	0	15
26	3952	GO:000398	nuclear mRNA splicing, via spliceosome	312	28	13.29	0	12	6.06	0	79
27	4147	GO:0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	312	28	13.29	0	12	6.06	0	79
28	4152	GO:0000377	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	312	28	13.29	0	12	6.06	0	79
29	4888	GO:0009719	response to endogenous stimulus	484	34	13.23	0	13	6.07	0	78
30	877	GO:0006380	RNA splicing	371	29	14	0	8	6.01	0	87