腫瘍構造を深く知ることで前進するがん診断と治療

アンドルー・クォン

新しいレーザアブレーションとマスサイトメトリーの融合により、個々の細胞の表現型を空間的に分解できるようになり、がん診断と治療の新たな進展が期待されている。

顕微鏡による細胞型の評価とゲノムまたはプロテオーム解析、すなわち、がん細胞の機能に関する詳細な情報をもたらす近年の技術革新により、がん診断と治療の向上が可能となっている。しかし、悪性細胞の遺伝的プロファイルが腫瘍成長の主要因である一方で、他にも多くの要因が同様に重要であることが、多くのエビデンスによって明らかになっている。その要因には、腫瘍構造や腫瘍細胞間の相互作用、間質、細胞外マトリクス、免疫細胞などがある。

最近まで、これら複雑な相互作用を空間的な方法で包括的に調べることができず、がん診断や予後、治療において腫瘍構造が果たす役割を完全に解明するには限界があった。個々の細胞の表現型を空間的に分解するパワフルなツールであるイメージングマスサイトメトリー（Imaging Mass Cytometry：IMC）は、がん診断と治療を前進させる次の革命をもたらす可能性を秘めている[1]。

IMCは、米フリューダイム社（Fluidigm）が商標登録しているもので、マスサイトメータとして使用するために新しいレーザアブレーション装置を採用している（**図1**）[2]。組織または固定した細胞サンプルを金属タグ付きの抗体パネルで染色し、213nmで動作するパルスレーザを用いてアブレーションチャンバ内で走査し、直径1μmのスポットサイズに焦点を当てる。

そして、マスサイトメトリーは各スポットから気化した組織を分析する。気化した各サンプルに存在する金属タグを計測し、サンプル内の各スポットの位置に対してインデックスを作成す

a)　b)

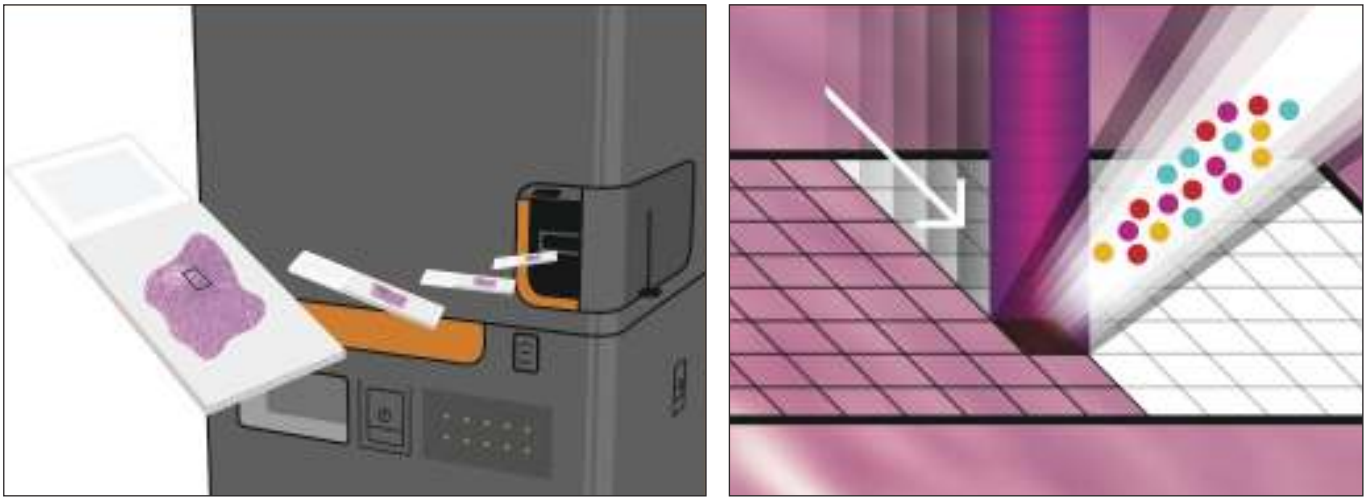

図1　イメージングマスサイトメトリー（IMC）は、ユーザーが抗体染色した標本を用意してスライドをHyperion Imaging Systemに挿入し、システムコントロールを用いて画像化する対象領域を選択するところから始まる（a）。システムのパルスレーザは213nmで動作し、正確なイメージングを可能にする。ビームは直径1μmで集光され、金属タグ付きの抗体で染色したタンパク質をサンプリングし、これらのタグを管理して誘導結合飛行時間（ToF）技術で解析する。選択された領域でレーザが1平方マイクロメートルの各ピクセルをサンプリングするため、1回の走査で済む（b）。

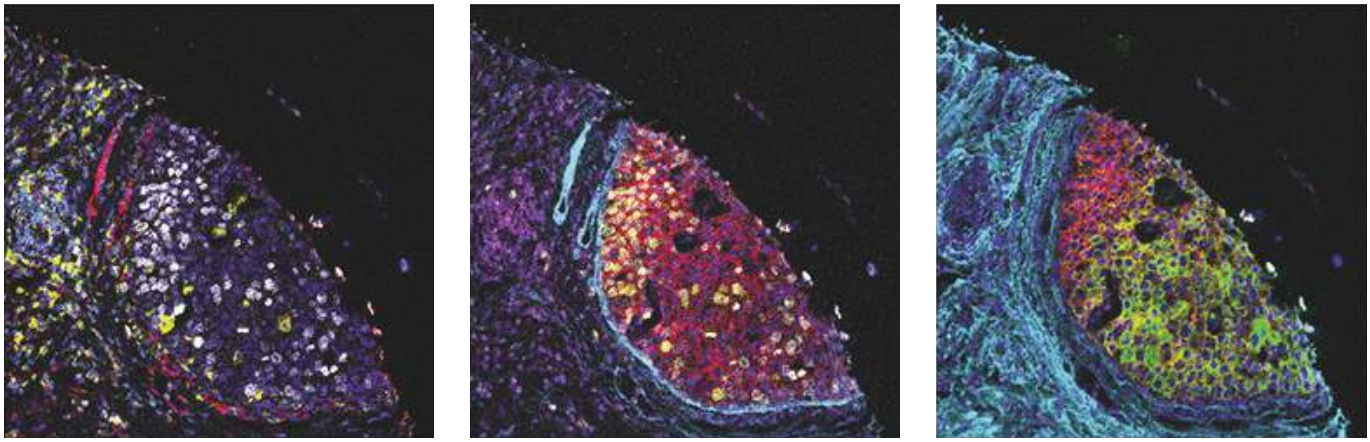

図2　多重評価により、免疫細胞とがん細胞の関係を可視化する性能を加速できる。18プレックスのMaxpar Human Immuno-Oncology IMCパネルキットで染色した直径1μmの乳がん組織に対してレーザ走査を1回行うことで、免疫集団と組織構造が強調される。各画像では、同じ走査で異なるバイオマーカーを選択し、表示している。(a)ビメンチン(赤)、CD45(シアン)、CD68(黄)、DNA2(青)。(b)aSMA(シアン)、CD45(マゼンダ)、E-カドヘリン(赤)、K1-67(黄)、DNA2(青)。(c)汎ケラチン(ライム)、E-カドヘリン(赤)、コラーゲン1(シアン)、DNA2(青)。

る。スポットを単位として基盤の中でサンプルを連続的に移動させることで、組織上のタンパク質の分布を描いたサンプルのマップを作成する。マップは、空間的な情報も持つ単一細胞のタンパク質分析に使用できる[3]。

IMCの実力は、同時に解析できるタグの数に応じて大きくなる。現在、安定した金属同位体ラベル、またはタグは37種類あり、最大37ターゲットを同時に測定できる。これらのタグから得られるデータは、機能的バイオマーカー分析や、IMCイメージをさらに適応させてセグメント化するDNAインターカレータのような他の「ナビゲーション補助」と統合できる。こうして、デジタル病理学や多重シングルセル解析と融合して、新たな診断、予後、治療クラスを特定できるかもしれない[3]。

先進的な性能に向けた空間的解析

標的療法は、特定のがん種では大きな恩恵をもたらしている。しかし、これらの恩恵が限られる場合もある。腫瘍や周囲の微小環境内の細胞非均一性が高いため、治療ターゲットの細胞がなかったり、治療が目的の細胞に到達できなかったりする。こうしたことから、腫瘍に存在する少数の細胞の組織学的特徴や分子プロファイルに基づくのではなく、腫瘍の構造解析に基づいた固形腫瘍の診断、分類、治療に対する新たなアプローチをIMCが可能にすると見込まれている。最近発表された2つの論文では、細胞の表現型においてゲノム変化が果たす役割の理解を深め、乳がんにおける患者特異的な診断をさらにもたらすために、IMCがどう利用されるかについて述べている。

2020年1月に『Nature』誌に掲載された論文[4]では、乳がんで異なる臨床アウトカムに関連する新規サブグループを同定する方法が示されている(**図2**)。この研究では、IMCを用いて35のバイオマーカーを同時に定量化し、352人の患者から乳房腫瘍の高次元病理画像が720枚作成された。単一細胞に分類して381枚の画像の中から85万8668個の細胞が同定され、各細胞に対してマーカー遺伝子の発現と空間的特徴が定量化された。これらのマーカーと特徴を解析すると、59の腫瘍細胞の表現型が同定され、そのいくつかは特定の患者固有のものであった。さらなる解析により、14の腫瘍細胞メタクラスターと18のシングルセル病理(Single-Cell Pathology：SCP)サブグループが同定された。驚くべきことに、乳がんの分類で用いられる古典的な臨床サブタイプと18のSCPは明確に一致しなかった。

この研究で評価された腫瘍を持つ患者281人の長期生存率データとSCPを比較すると、個々のサブグループと臨床アウトカムは異なることがわかった。例えば、あるSCP(SCP11)は、臨床的に同定されたホルモン受容体陰性でHER2陽性の腫瘍タイプを重複するものの、完全には一致しなかった。ホルモン受容体陰性・HER2陽性の臨床サブタイプの患者の予後は一般的に不良だが、SCP11カテゴリーの患者は臨床サブタイプや他のSCPグループよりも予後は有意に良好だった。同様に、

乳がんのトリプルネガティブの臨床サブタイプは5つの異なるSCPから構成されており、そのうち4つはこのサブタイプと関連して予後不良だったが、残りの1つのSCPに分類される患者たちは死亡しなかった。

これらの知見は、現在の臨床サブタイプ戦略は予後予測の限界を強調している。また、IMCが生成する多細胞の空間的情報を、乳がんの分類や、将来的には治療に向けた新しいアプローチの基礎として用いる可能性を強く示している。細胞の不均一性を考慮して、治療戦略をより洗練させれば、乳がん患者のアウトカムを改善できるかもしれない。

2020年2月に『Nature Cancer』誌に掲載された論文[5]では、ゲノム変化(変異やコピー数異常)による個々の細胞の表現型と空間の相関についてシステマティック解析がなされた。この解析が示すことは、乳房腫瘍の生態系の構成と構造の両方においてゲノムが果たす役割だ。こうした知見は、ゲノム変化が細胞の表現型にどのような影響を与えるかについて、我々の理解を深めるものである。

この研究では、IMCとマルチプラットフォームのゲノミクスを組み合わせ、483の乳房腫瘍サンプルにおいて37のタンパク質レベルを定量化し、乳がんの表現型とゲノムの全体図を定義した。この研究で評価された483の腫瘍は、以前に大規模なゲノム評価を受けていた。単一細胞におけるIMC発現データのクラスタリング解析により、腫瘍細胞、間質細胞、及び免疫細胞について、大きく分けて3つの表現型カテゴリーが同定され、ほとんどの細胞は上皮細胞であった。割り当てられた細胞の表現型の検証は、各腫瘍内における細胞表現型の割合と、全遺伝子発現プロファイルとの相関によってなされた。

さらなる解析が明らかにしたのは、間質細胞では他の細胞表現型を比較して、RNAサイレンシングや遺伝子発現の転写後制御に関わるmicroRNA(miRNA)が、遺伝子制御においてより重要な役割を果たしていることだった。この研究ではさらに、腫瘍サブタイプの表現型構成に予想外の違いが見られ、異なるがんサブタイプでは間質細胞の密集パターンが異なることもわかった。異なるゲノムの腫瘍サブタイプでは、細胞間相互作用も異なっていた。まとめると、これらの解析で示されたことは、細胞の構成と細胞間相互作用のパターンは、乳がんのゲノムサブタイプによって大きく異なるということだ。特筆すべきは、特定の細胞表現型は臨床アウトカムと相関したことも、この研究から明らかにされたことである。IMCベースの解析を行うことで、患者を層別化して新たな治療ターゲットを特定する、新たなアプローチを開発する可能性をさらに支持するものだ。

進歩に向けたプラットフォーム

我々ががんを理解、診断、治療する能力は常に、観察可能であることと関係する。悪性状態の古典的な説明は、約2000年前に視覚的な観察に基づいて造語された。がん(cancer)とは、ラテン語でカニを意味するものであり、腫瘍の塊と突起の外観を表していた。腫瘍学(oncology)とは、ギリシャ語で塊(onkos)という言葉に由来し、腫瘍そのものを表した。その後の1000年間は、がんに対する理解と分類の多くは肉眼または顕微鏡に基づいており、がんは主に解剖学的な位置と総合的な病理をもとに分類された。

分子生物学の出現は、がんの診断や治療方法を変えただけにとどまらない。腫瘍における遺伝子変異や重要なタンパク質の発現変化などの分子プロファイルに基づいてがん種を評価できる、強力で新たなツールを可能にした。例えば、乳がんと前立腺がんは、解剖学的構造としては異なる位置と機能で生じる。しかし、分子・遺伝子解析によって明らかになったのは、これらの組織で生じる腫瘍には生物学的に非常に高い類似性があり、同様の治療アプローチで恩恵を得られるかもしれないということである。同じタイプの腫瘍でも、分子的なサブタイプ分類に基づく個別化治療計画により、異なる治療アプローチが有効かもしれない。

IMCは、我々ががんを見る方法における進化の次のステップである。腫瘍の複雑な微小環境で個々の細胞がどう相互作用をしているのかを初めて見ることができる。ここに記載した論文が示すように、次の腫瘍学の革命に向けた強力な原動力がIMCなのである。

参考文献

(1) C. Giesen et al., Nat. Methods, 11, 4, 417-422 (2014).
(2) R. N. Straus et al., J. Anal. At. Spectrom., 32, 1044-1051 (2017).
(3) Q. Chang et al., Cytom. Part A, 91A, 160-169 (2017).
(4) H. W. Jackson et al., Nature, 578, 615-620 (2020).
(5) H. R. Ali et al., Nat. Cancer, 1, 163-175 (2020).
(6) G. P. Risbridger, I. D. Davis, S. N. Birrell, and W. D. Tillewy, Nat. Rev. Cancer, 10, 3, 205-212 (2010).
(7) M. P. Singh, S. Rai, A. Pandey, N. K. Singh, and S. Srivastava, Genes & Diseases (2019); https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.013.

著者紹介

アンドルー・クォン博士はフリューダイム社の最高科学責任者。
e-mail: andrew.quong@fluidigm.com　www.fluidigm.com

LFWJ