

Title	立体的な腫瘍内不均一性を可視化するイメージパイプラインの確立と薬剤感受性の予測
Sub Title	Establishment of new image pipeline to visualize three-dimensional intratumoral heterogeneity and prediction of drug sensitivity
Author	田中, 伸之(Tanaka, Nobuyuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、次世代イメージング「ライトシート顕微鏡・膨張顕微鏡法」が立体視する腫瘍内不均一性に基づく、腎がん分子標的治療の感受性予測モデルを、世界で初めて提唱したいと考えている。本年度は、この目標を達成する技術基盤として、まずライトシート顕微鏡を利用した新規3DイメージングパイプラインDIFCO (diagnosing in situ hybridized and immunolabeled fresh or fixed cleared organs) 法を考案した。具体的には、1)透明化された腫瘍塊において、1細胞レベルのRNA発現レベルを定量化し、立体的な腫瘍空間に存在する全ての細胞の層別化に成功し、2)標的細胞全てに、1細胞レベルで腫瘍血管との空間距離を付与する独自の計算アルゴリズムを構築し、3)癌幹細胞が生息する傍血管ニッチの不均一性を世界で初めて可視化した(Tanaka N (first & corresp), et al. Nat Biomed Eng 2019 in review)。本イメージングパイプラインはバイオアーカイブ化された保存組織 (パラフィン包埋・新鮮凍結腫瘍組織、組織アレイ切片、オルガノイド) にも適用が可能であり、将来的な臨床応用の可能性が示唆された(Tanaka N, et al. Best poster during the 34th Annual European Association of Urology congress in Barcelona)。 次に、臨床的な分子標的治療感受性の予測モデルを構築するために、特に免疫治療で重要となる間質内細胞の多様性や免疫応答を網羅する、多層的な解析が可能なヒト腎がんの組織ライブラリー構築した(倫理申請番号：20180098)。本ライブラリーは腫瘍中心や辺縁を病理学的に網羅しており、腫瘍内不均一性を解明する上で重要となる免疫細胞浸潤の解析を可能にする研究基盤になり得ると考える。最後に、膨張顕微鏡法の適用を見据えたイメージパイプラインの構築にも着手し、超高解像度で腫瘍内RNAの不均一性を可視化する第一段階として、ハイスループット・安価なIn situ hybridization法を確立した。 In this project, we will propose a novel prediction model for targeted therapy in human renal cancer with the high sensitivity/specificity. Based on the intratumoral heterogeneity, we will offer the next-generation imaging of "light sheet microscopy/expansion microscopy" in three-dimensional views. In this year, as a technical aspect to achieve this goal, we have developed a new 3D imaging pipeline DIFCO (diagnosing in situ hybridized and immunolabeled fresh or fixed organs) using a 3D light sheet microscopy. Indeed, we have successfully achieved 1) the quantification of single-cell RNA expression level in the cleared tumors, and stratifications of all of single cells distributed in three-dimensional tumor space; 2) developing a unique computational algorithm to give spatial distance from all of targeted cells to tumor blood vessels at single-cell level; and 3) visualizing the heterogeneous peri-vascular niche, for the first time, where cancer stem cells inhabit (Tanaka N (first & corresp), et al. Nat Biomed Eng 2019 in review). This imaging pipeline could also be applied to bio-archived tissue samples in the clinic, i.e., paraffin-embedded tumor tissues, fresh-frozen tumor tissues, tissue-array sections, and organoids, suggesting the possibility of future clinical applications (Tanaka N, et al. Best poster nomination during the 34th Annual European Association of Urology congress in Barcelona). Next, establishing a clinical predictive model for human immunotherapy in renal cancer needs to cover the intrastromal immune cell diversity and immune response distributed through entire tumors. Herein we have developed human renal cancer tissue library dataset to enable multi-layered analyses of tumor immune microenvironment (ethic permission number: 20180098). This library is pathologically covering the tumor centers as well as invasive margins, offering an outstanding research to analyze the immune cell infiltration. It is important in clarifying immune-based intratumoral heterogeneity. Finally, to develop an image pipeline using an expansion microscopy with ultra-high resolution, we have established visualizing the intratumoral RNA heterogeneity with high-throughput and inexpensive in situ hybridization method.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180333

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	助教(有期・医学部)	補助額	300 (A) 千円
	氏名	田中 伸之	氏名 (英語)	Nobuyuki Tanaka		

研究課題（日本語）

立体的な腫瘍内不均一性を可視化するイメージパイプラインの確立と薬剤感受性の予測

研究課題（英訳）

Establishment of new image pipeline to visualize three-dimensional intratumoral heterogeneity and prediction of drug sensitivity

1. 研究成果実績の概要

本研究では、次世代イメージング「ライトシート顕微鏡・膨張顕微鏡法」が立体視する腫瘍内不均一性に基づく、腎がん分子標的治療の感受性予測モデルを、世界で初めて提唱したいと考えている。本年度は、この目標を達成する技術基盤として、まずライトシート顕微鏡を利用した新規3Dイメージングパイプライン DIFCO (diagnosing in situ hybridized and immunolabeled fresh or fixed cleared organs) 法を考案した。具体的には、1)透明化された腫瘍塊において、1細胞レベルの RNA 発現レベルを定量化し、立体的な腫瘍空間に存在する全ての細胞の層別化に成功し、2)標的細胞全てに、1細胞レベルで腫瘍血管との空間距離を付与する独自の計算アルゴリズムを構築し、3)癌幹細胞が生息する傍血管ニッチの不均一性を世界で初めて可視化した(Tanaka N (first & corresp), et al. Nat Biomed Eng 2019 in review)。本イメージングパイプラインはバイオアーカイブ化された保存組織(パラフィン包埋・新鮮凍結腫瘍組織、組織アレイ切片、オルガノイド)にも適用が可能であり、将来的な臨床応用の可能性が示唆された(Tanaka N, et al. Best poster during the 34th Annual European Association of Urology congress in Barcelona)。

次に、臨床的な分子標的治療感受性の予測モデルを構築するために、特に免疫治療で重要となる間質内細胞の多様性や免疫応答を網羅する、多層的な解析が可能なヒト腎がんの組織ライブラリー構築した(倫理申請番号:20180098)。本ライブラリーは腫瘍中心や辺縁を病理学的に網羅しており、腫瘍内不均一性を解明する上で重要となる免疫細胞浸潤の解析を可能にする研究基盤になり得ると考える。最後に、膨張顕微鏡法の適用を見据えたイメージパイプラインの構築にも着手し、超高解像度で腫瘍内 RNA の不均一性を可視化する第一段階として、ハイスループット・安価な In situ hybridization 法を確立した。

2. 研究成果実績の概要（英訳）

In this project, we will propose a novel prediction model for targeted therapy in human renal cancer with the high sensitivity/specificity. Based on the intratumoral heterogeneity, we will offer the next-generation imaging of "light sheet microscopy/expansion microscopy" in three-dimensional views. In this year, as a technical aspect to achieve this goal, we have developed a new 3D imaging pipeline DIFCO (diagnosing in situ hybridized and immunolabeled fresh or fixed organs) using a 3D light sheet microscopy. Indeed, we have successfully achieved 1) the quantification of single-cell RNA expression level in the cleared tumors, and stratifications of all of single cells distributed in three-dimensional tumor space; 2) developing a unique computational algorithm to give spatial distance from all of targeted cells to tumor blood vessels at single-cell level; and 3) visualizing the heterogeneous peri-vascular niche, for the first time, where cancer stem cells inhabit (Tanaka N (first & corresp), et al. Nat Biomed Eng 2019 in review). This imaging pipeline could also be applied to bio-archived tissue samples in the clinic, i.e., paraffin-embedded tumor tissues, fresh-frozen tumor tissues, tissue-array sections, and organoids, suggesting the possibility of future clinical applications (Tanaka N, et al. Best poster nomination during the 34th Annual European Association of Urology congress in Barcelona).

Next, establishing a clinical predictive model for human immunotherapy in renal cancer needs to cover the intrastromal immune cell diversity and immune response distributed through entire tumors. Herein we have developed human renal cancer tissue library dataset to enable multi-layered analyses of tumor immune microenvironment (ethic permission number: 20180098). This library is pathologically covering the tumor centers as well as invasive margins, offering an outstanding research to analyze the immune cell infiltration. It is important in clarifying immune-based intratumoral heterogeneity. Finally, to develop an image pipeline using an expansion microscopy with ultra-high resolution, we have established visualizing the intratumoral RNA heterogeneity with high-throughput and inexpensive in situ hybridization method.

3. 本研究課題に関する発表

発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)
田中 伸之	Transcription and protein phenotyping with 3D pathology: Light-sheet microscopy overlooks cellular malignancy of intact tumour volumes	The 34th Annual European Association of Urology Congress	2019 年 3 月 17 日