

(様式4)

学位論文の内容の要旨

小林 さやか 印

(学位論文のタイトル)

Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma

(肺腺癌におけるエメリン発現による核形状の画像解析および核溝、核内細胞質封入体との関連性)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

【序論】

核の大きさや形状を捉えることは癌を診断する上で重要な役割を果たしているが、現在はヘマトキシリン染色による評価で、診断者の主観がある程度入った評価である。これらの問題を解決するため、近年では一定のピントと光量で組織標本の画像取り込みが可能なWhole slide imaging (WSI)と画像解析を組み合わせた方法が試みられている。他方、現在まで画像解析に使用する標本はヘマトキシリン染色された試料が広く用いられているが、近年フォイルゲン染色による核の画像解析を行うと定量性よくDNA量を測定でき、ヘマトキシリン染色と比較しシグナル/ノイズ比も良いことが報告されている。また内側核膜に存在する蛋白であるエメリン免疫染色を甲状腺癌例に施すとヘマトキシリン染色と比較し核膜の形状を明瞭に捉えることができると報告されている。

以上より今回我々は、フォイルゲン染色およびエメリン免疫染色とWSI及び画像解析を組み合わせることで、人的には安定した評価の困難な微細な核形状の変化について肺腺癌切除例106例を対象に検討を行ったので報告する。

【方法】

- ① 症例：群馬大学医学部附属病院で手術された肺腺癌切除組織106例について解析した。研究内容は事前に医学部臨床研究倫理審査委員会の審査を経るとともに、情報公開文書を大学のホームページに掲載し対象者に周知するとともに、参加撤回の自由を保障した。
- ② フォイルゲン染色：加水処理後の薄切標本を5N塩酸水溶液で室温40分間処理してプリン残基を取り除いた後、直ちにコールドシッフ試薬で呈色反応を行い、その後亜硫酸水で反応を止めた。
- ③ 免疫染色：100mM Tris-EDTA 緩衝液 (pH 9.0) 97°C 30分による抗原賦活化後、マウス抗ヒトエメリンモノクローナル抗体、西洋わさびペロキシダーゼ標識高分子ポリ加ヤギ抗マウスIgG抗体を順次反応させ、DABで発色させた。
- ④ 画像取り込みと解析：TOCOバーチャルスライドスキャナで画像取り込み後、フォイ

ルゲン染色標本はHistoQuant (3DHistech社)、エメリン免疫染色はe-Nucle (E-path社)にて解析した。

【結果】

- ① フォイルゲン染色：1) 核面積平均と染色強度平均の間には相関は認められなかった ($R=0.00579$) が、核面積平均と核周長平均の間に強い相関がみられた ($R=0.8973$)。
- ② エメリン免疫染色：1) 核周長とエメリン免疫染色で陽性を示した部分の長さ (ENML) を同時に同一核上で計測し検討した結果、核面積平均と核周長平均の相関以外にも核面積平均とENML平均、核周長平均とENML平均の間で強い相関が認められ、平均値の比較では細かな差の検討はできないことが分かった。2) そこで、核周長とENMLの差を計算し、この差が負になる核を「高度異型核群」として解析して、核の溝 (NGs) や核内細胞質封入体 (ICI) の症例における存在の有無と比較してみたところ、高度異型核の頻度が上がるにつれ、高頻度にNGsおよびICIが認められる症例が多くなることが明らかとなり、核の大きさと高度異型核の出現頻度との間にも相関が認められた ($R=0.7759$)。
- ③ エメリン低発現群の検討：エメリンが低発現であるため核形状解析が不能であった38例をエメリン低発現群として、正常発現群との間に核の形状の差異があるかどうかフォイルゲン染色標本について検討したところ、エメリン低発現群は発現群と比較して核が大型で ($p=0.0264$)、核周長は延長し ($p=0.0091$)、核の真円度は低く楕円形 ($p=0.0486$) であった。

【考察】

本研究により、肺腺癌における核形状の変化を WSI と画像解析を組合わせて捉えることで、ヒトの目による評価では一定しないデータを再現性良く得ることが示された。特にエメリン免疫染色標本を用いた画像解析には、HE 染色や光学顕微鏡により行われてきた現在までの報告よりも NGs や ICI を高頻度に検出しており、HE 染色標本では発見できていなかった NGs や ICI を検出できることが示唆された。また、ヒトの目では NGs や ICI の存在の有無として核の形状の変化を捉えることができるが、画像解析では高度異型核の頻度を求めることで核の形状の強い歪みの評価が可能であることが分かった。

さらには今回の検討によって、癌症例においてエメリン発現が低下している群があることが分かり、エメリン低発現は ES 細胞などを用いた試験管上でのデータでは核の大型化や歪みに関与することが知られていたが、今回我々はヒトの臨床例において核の大型化や歪みにエメリンの低発現が癌において関与していることを初めて報告した。

これらの知見は今後病理組織学的な研究を進めるうえで、WSIや画像解析を用いた半定量的な解析手法を用いることの有用性を示しており意義深い。