

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6654634号
(P6654634)

(45) 発行日 令和2年2月26日 (2020.2.26)

(24) 登録日 令和2年2月3日 (2020.2.3)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 Y

GO 1 N 33/48 (2006.01)

GO 1 N 33/48 M

GO 1 N 33/483 (2006.01)

GO 1 N 33/48 P

GO 6 T 7/00 (2017.01)

GO 1 N 33/483 C

GO 1 N 21/27 (2006.01)

GO 6 T 7/00 6 3 0

請求項の数 15 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-528449 (P2017-528449)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月3日 (2015.12.3)
 (65) 公表番号 特表2018-509591 (P2018-509591A)
 (43) 公表日 平成30年4月5日 (2018.4.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/078532
 (87) 国際公開番号 W02016/087589
 (87) 国際公開日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 審査請求日 平成30年11月12日 (2018.11.12)
 (31) 優先権主張番号 62/086,840
 (32) 優先日 平成26年12月3日 (2014.12.3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 507179346
 ベンタナ メディカル システムズ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国アリゾナ州85755, トゥーソン, イースト・イノベーション・パーク・ドライブ 1910
 (73) 特許権者 508136375
 オレゴン ヘルス アンド サイエンス ユニバーシティ
 アメリカ合衆国オレゴン州97239, ポートランド, サウスウエスト・バンクローフ・ストリート 690
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不均一なバイオマーカー分布を定量的に分析するための方法、システム及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検出可能マーカーで標識された1つ又は複数の被分析物を含む、細胞試料における不均一性を特徴付ける方法であって、様々な発現パターンの複数のクラスタを含むクラスタマップを作成するために、前記細胞試料の画像から得られるデータセットに対してクラスタ分析を適用するようプログラムされたコンピュータプロセッサを含むコンピュータ装置上で前記細胞試料の画像 (100) を分析するステップを含み、前記細胞試料が、生体組織試料を含み、

(a) 前記データセットは前記細胞試料の画像の少なくとも一部について1つの画像スタック (102) を含み、前記画像スタックはx軸、y軸及びz軸を含み、前記x軸及び前記y軸は画像の部分内の空間座標を表し、前記z軸は2つ又はそれより多いn個の層 (L1、L2、L3...、Ln) を含み、前記z軸の各層は単一の検出可能マーカーについての複数のx、y座標での強度データを含み、

(b) 前記クラスタ分析は、非監視型、ノンパラメトリック、及び、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムを画像スタックに適用するステップを含み、前記クラスタ化アルゴリズムは少なくともn+2次元の空間において前記データセットによって定義されるポイント (P_i, P_j) をクラスタ化し、前記空間で各ポイントはx、y座標及び画像スタック内の各々のx、y座標におけるn個の層からのn個の強度データ値によって与えられることにより、前記複数のクラスタを生成し、

(c) 出力データ (114、116) の出力は前記クラスタ分析の結果を表し、前記デー

10

20

タは前記細胞試料における不均一性を示すものであり、

前記画像が多重スペクトル画像であり、前記多重スペクトル画像のアンミキシングによって前記 n 個の層が得られる方法。

【請求項 2】

前記多重スペクトル画像 (1 0 0) 及び / 又は 1 つ又は複数の単一チャネル画像 (1 0 4、1 0 6、1 0 8、1 1 0、1 1 2) を表示することによってデータの前記出力が実施され、単一チャネル画像が、前記多重チャネル画像及び / 又は少なくとも 1 つの単一チャネル画像内のクラスタの境界設定 (1 1 4、1 1 6) を可視化することによって、 n 個の層のうち 1 つの表示により与えられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記データセット内でクラスタ毎の比例的区域を表示するクラスタヒストグラムを生成するステップをさらに含み、前記クラスタヒストグラムがステップ c で出力されるデータである請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記画像スタックをローパスフィルタ処理するために $n + 2$ 次元の空間のポイントをビンニングし、 x y 分解能を低減してビンニングされた画像スタックを提供するステップをさらに含み、ステップ b での前記クラスタ分析が前記ビンニングされた画像スタック上で実施される請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

細胞試料の少なくとも 1 つの対象区域 (A O I) 内の少なくとも 1 つの視野 (F O V) に画像の一部が該当する請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記出力データが前記クラスタ分析の結果におけるクラスタ数を示すデータを含む請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記密度ベースのクラスタ化アルゴリズムが平均シフトクラスタ化アルゴリズムであり、前記平均シフトクラスタ化アルゴリズムへの入力が画像スタックであり、前記平均シフトアルゴリズムの出力が x 、 y アレイであり、 x 座標軸及び y 座標軸が、入力された画像スタックの空間座標軸であり、各 x 、 y 座標での値が、各々の x 、 y 座標が属するクラスタ番号を示す標識である請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

細胞試料の画像が医師による注釈付け向けにデジタル表示され得る解剖学的組織の屈折率コントラスト画像であり、解剖学的組織に基づいて A O I が選定される請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記データセットが、
 (a 1) 前記画像内の複数の A O I 各々について F O V サンプリング格子を計算するステップと、
 (a 2) 各 F O V 内の単一又は複数の z 面にて多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータを自動的に収集するステップであって、前記 z 面が、組織深度を含むものと、
 (a 3) 検出可能マーカーシグナルを多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータからコンピュータ処理によりセグメント化するステップと、
 (a 4) 前記クラスタ分析において 1 つのグループとして比較されることになる F O V を選択してデータセット構造に入れ込むステップと、
 (a 5) 形態学的特徴の自動セグメント化を前記データセット内の各 F O V の各検出可能マーカーシグナルに適用するステップと、
 を含む方法によって得られる請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

(a 4 a) 1 つのグループとしての比較対象として選択される前記 F O V が同一組織切

10

20

30

40

50

片中の別々の腫瘍病巣に相当するか、又は

(a 4 b) 前記 F O V が同一患者から採取された別の生検材料と比較するために同一患者から採取された生検材料に基づいてグループ化されるか、又は

(a 4 c) F O V が腫瘍部位に基づいてグループ化されるか、又は

(a 4 d) F O V が患者に基づいて別の患者と比較するためにグループ化されるか、又は

(a 4 e) F O V が腫瘍遺伝子型に基づいてグループ化される、

請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記形態学的特徴のセグメント化がサイズの制約に基づく請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 2】

腫瘍中におけるシグナル伝達経路の生理学的状態に応じて前記腫瘍を特徴付ける方法であって、請求項 9 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法に従って前記腫瘍の試料の画像を分析するステップを含み、

複数の被分析物が前記検出可能マーカーで標識され、

前記検出可能マーカーで標識される前記被分析物のうち少なくとも 1 つがリン酸化シグナル伝達タンパク質であり、

前記画像の各 F O V 内の単一又は複数の z 面にて、ハイパースペクトル又は多重スペクトルのデータが収集される、方法。

【請求項 1 3】

細胞試料における不均一性を自動的に識別するシステムであって、

(a) 分析用画像処理分析システムを含み、前記分析用画像処理分析システムは、プロセッサと、

前記プロセッサに結合され、前記プロセッサによって実行されたとき請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法を含む操作を前記プロセッサに実施させるコンピュータ実行可能な命令を記憶するメモリと、を含む、システム。

【請求項 1 4】

(b) 前記細胞試料のデジタル化画像並びに前記細胞試料からの多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータを捕捉するよう、また前記デジタル化画像を分析用画像処理分析システムへ伝達するように適合された、分析用画像処理ハードウェアシステム、をさらに含む請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 1 5】

請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の方法を含む操作を実施するためにプロセッサによって実行されるコンピュータ実行可能な命令が記憶された非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

2 0 1 4 年 1 2 月 3 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 0 8 6 , 8 4 0 号の利益が本出願により主張され、同仮特許出願の内容は参照により本明細書に組み込まれている。

【0 0 0 2】

本開示は画像の取得及び分析の自動化、特に顕微鏡による疾患評価に適用された画像の取得及び分析の自動化の分野に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

組織評価に従来利用可能な技術により、遺伝子又はタンパク質の発現 (e x p r e s s i o n) / 活性化 (a c t i v a t i o n) を示す単一のバイオマーカーだけを分離した

10

20

30

40

50

形で、日常的に評価できるようになった。これらの有益な単一のバイオマーカーでは、全体像が分かるわけではないことがはっきりしてきた。タンパク質の発現及び活性化に関するシーケンシング技術及び生化学的測定においては均質化された組織試料に焦点を当てており、そのような場合、発現パターン又は遺伝子変化の空間的背景が失われてしまう。生化学的アッセイ及びシーケンシング技術を通じて得られる情報は有用であるが、依然、情報の内容に重大な格差が残っており、また多数の細胞からのタンパク質含有量を平均化する結果、1つの腫瘍内での細胞の発現及び活性化のパターンに関する理解も不完全なままである。

【0004】

最近の研究により現在、従来のアッセイ技術では見逃されてしまう重要な情報の存在が示唆される。そうした状況の一例は、1つの腫瘍における複数の遺伝子の再配列又は異常の存在と、同じ細胞内で異なる再配列が発生するとそれらが協同的効果を及ぼすという可能性の認識である (Zong et al., 2009, Goldstein et al., 2010)。腫瘍間及び腫瘍内での遺伝的不均一性 (heterogeneity) が報告されており、そうした不均一性は治療の失敗や治療時における薬物耐性に寄与すると考えられている (Gerlinger et al., 2012, Marusyk et al., 2012)。したがって、1つの腫瘍が遺伝子の再配列又は欠失を複数有することだけでなく、これらが同一細胞内で発生するか、別々の細胞で発生するか、又は様々な状況で複合的に発生するかということも認識することが重要である (Svensson, et al., 2011)。表現型 (phenotypic) 不均一性及びタンパク質発現特性も、腫瘍組織中のバイオマーカーを評価する際に重要な検討事項であることが示されている (Yap et al., 2012, Marusyk et al., 2012)。表現型不均一性は遺伝的又は後成的な原因から生じる可能性があり、また薬物耐性や、がん増殖の再発に寄与すると考えられている。

【0005】

したがって、組織中の多様なバイオマーカーを特徴付ける能力があり、組織内及び組織間における前記バイオマーカーの存在及びレベルの不均一性の測定が可能であれば、様々な疾患状態を理解及び特徴付ける上で重要な情報の提供に繋がる。加えて、組織中で主要なバイオマーカーの分布が異なる領域を識別及び測定することが可能であれば、標的療法及び併用療法の開発に参考となる重要情報をもたらす得る。

【0006】

他の研究者が、様々なクラスタ化 (clustering) 方法及び選択的多重化 (multiplexing) 方式を使用して、発現不均一性の分析を試みてきた (Gerdies et al., 2013, Qian, et al., 2010)。階層型クラスタ化アプローチでは、有意な想定を立てる必要がある。階層型クラスタ化アルゴリズムの場合、新規クラスタを形成するために境界線を引く位置を決定付ける点間の距離を知ることが、1つの主要なパラメータである。あるいは、一部の階層型アルゴリズム (Ward方式 (Ward 1963) など) ではクラスタ数をパラメータとして入力する必要がある。しかし、カットオフ閾値 (距離) 及び予想されるクラスタ数はいずれも、不詳であることが多いパラメータである。加えて、一部のアルゴリズムでは均等なクラスタのサイズ (例えばk平均)、異なるクラスタの構成要素である点間の距離 (階層型クラスタ化) に関する想定、又は見つかりと予想されるクラスタ数 (階層型クラスタ化、k平均) に関する想定を強制する。幅広く使用されているが、階層型方法は、非連続的尺度 (例えば+、++、+++、++++) を基準に測定される変数により良く適する。こうした理由から、階層型クラスタ化アルゴリズムは、発現不均一性分析の要件に対して理想的ではない。選択的な密度ベースのツール、例えばFLOCK (Qian, et al., 2010) は、密度及び密度カットオフ閾値の計算に使用される過剰領域 (hyper-region) のサイズを表すパラメータを推定し、これらをアルゴリズムに入力してクラスタ判定を可能にしなければならない、という制約がある。

【0007】

最近ではSPADE (Qiu et al. 2012、Giesen et al. 2014) 及びviSNE (El-ad et al. 2013) などのツールが、高次元、多重パラメータの発現パターンを有する細胞から成る複数クラスタ間の階層的関係のマッピングに使用されている。そうしたツールでは発現パターン間での類似性関係のマッピングが重視され、この意味で、多重パラメータの発現不均一性の性質を知るための、別々の補完的な手掛かりをもたらす。SPADE 及びviSNEなどのツールは血球計算の文脈で開発されたものであり、高次元空間での細胞集団間の関係をマッピングして、組織中での発現パターンの空間的位置の文脈に該当しない細胞集団を可視化及び分類することを、より重視する。この意味で、SPADE 及びviSNEはクラスタ化ツールというよりも、マッピングツールに相当する。

10

【0008】

我々は今のところ、細胞及び組織の試料における元来の空間的文脈の範囲内で生体分子の発現、局在化及び/又は活性化が不均一なクラスタを十分に識別するシステム又は方法を全く知らない。

【0009】

1つの組織標本を収めた1つの多重スライドにおいて、別々の核及び組織構造が特異的なバイオマーカー専用染色剤で同時に染色され、これらの染色剤は発色性色素又は蛍光色素のいずれであってもよく、各々がスペクトルの形状及び拡散に関して特徴的なスペクトル特性を有する。様々なバイオマーカーのスペクトル特性は、広スペクトル帯域又は狭スペクトル帯域のいずれであってもよく、スペクトルが重複していてもよい。標本、例えば腫瘍学標本を何らかの組み合わせの色素で染色させたものを含有するスライドが、多重スペクトル (multi-spectral) 画像処理システムを使用して画像処理される。各チャンネル画像が1つのスペクトル帯に相当する。したがって、この画像処理システムによって生成される多重スペクトル画像スタックは、基礎を成す構成要素のバイオマーカー発現の混合物であり、場合によっては共同在化され得る。最近では、対象のバイオマーカー向けの免疫蛍光染色において、非常に強く安定した蛍光性を有するので、量子ドット (quantum dot) が幅広く使用されている。

20

【0010】

バイオマーカー向けの個別の成分染色剤、及びそれらが混合物中に出現する割合を特定することは根本的課題であり、これはスペクトルアンミキシング (spectral unmixing) 操作を使用して解決される。スペクトルアンミキシングでは多重スペクトル画像の各ピクセルを、成分スペクトルのエンドメンバー又は構成要素の集合体、及び多重スペクトル画像における各々の強度寄与割合へと分解する。スペクトルアンミキシング方法の一例は、蛍光顕微鏡法及び明視野顕微鏡法の双方で一般的に使用される非負線形最小二乗操作である。WO2015/101507 (PCT/EP2014/078392) 及びWO2015/124772 (PCT/EP2015/053745) は多重チャンネル画像 (多重スペクトル画像ともいう) のアンミキシングを行うための様々なアンミキシング方法を開示しており、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0011】

不均一なバイオマーカー分布を定量的に分析するための方法、システム及び装置を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本明細書では、検出可能マーカーで標識された少なくとも1つの被分析物を含む細胞試料における不均一性を検出及び説明する方法を提供し、前記方法は、様々な発現パターンの複数のクラスタを含むクラスタマップを作成するために、細胞試料の画像から得られるデータセットに対してクラスタ分析を適用するようプログラムされたコンピュータプロセッサを含むコンピュータ装置上で細胞試料の画像を分析するステップを含み、

50

(a) データセットは細胞試料における1つ又は複数の対象領域(AOI)内の複数の視野(FOV)各々について1つずつの画像スタックを含み、この画像スタックはx軸、y軸及びz軸を含み、x軸及びy軸は視野内の空間座標を表し、z軸は1つ又は複数の層を含み、z軸の各層は単一の検出可能マーカーについての複数のx、y座標での強度データを含み、

(b) クラスタ分析は、非監視型、ノンパラメトリック、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムを画像スタックに適用するステップを含み、このクラスタ化アルゴリズムはx、y座標を、複数のz軸層にまたがる検出可能マーカー強度の比率が同等である他のx、y座標と一緒にグループ化することにより、同等の発現パターンを有する複数のクラスタ群を生成する。

10

【0013】

本明細書において理解される「細胞試料」は、解剖病理学向けにヒト又は動物の身体から取得される外科的標本など、任意の生体組織試料である。細胞試料は前立腺組織試料、乳房組織試料、結腸組織試料、あるいは別の臓器又は身体領域から取得される組織試料であってもよい。

【0014】

本明細書において理解される「多重スペクトル」又は「多重チャネル」のピクセルは、異なる核構造及び組織構造が特定の色素で同時に染色される生体細胞試料から取得されるデジタル画像に含まれる1つのピクセルを包含する。

【0015】

本明細書において理解される「多重チャネル画像」又は「多重スペクトル」画像は、多重スペクトル又は多重チャネルのピクセルから成る1つの画像を包含する。単一チャネル画像は多重チャネル画像のチャネル毎に、アンミキシング方法によって取得される。

20

【0016】

一実施形態において、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムは平均シフトクラスタ化アルゴリズムである。

別の一実施形態において、前述の方法のデータセットは

(a1) 画像内の複数のAOI各々についてFOVサンプリング格子(任意選択でAOI全体にまたがり規則的な間隔で配置される複数のFOVを含む)を計算するステップと、

(a2) 各FOV内の単一又は複数のz面に多重スペクトルデータ及び/又はハイパースペクトル(hyper-spectral)データを自動的に収集するステップ(任意選択でメタデータ属性を有するネスト化データ構造又はデータベースに自動記憶させてもよく、前記メタデータ属性は患者、アッセイ、生検、切片、AOI位置及び/又はFOV位置を含む)と、

30

(a3) 検出可能マーカーシグナルを多重スペクトルデータ及び/又はハイパースペクトルデータからコンピュータ処理によりセグメント化するステップと、

(a4) クラスタ分析において1つのグループとして比較されることになるFOVを選択してデータセット構造に入れ込むステップ

(ただし任意選択で

(a4a) 1つのグループとしての比較対象として選択されるFOVは同一組織切片中の別々の腫瘍病巣に相当するか、又は

40

(a4b) FOVは同一患者から採取された別の生検材料と比較するために同一患者から採取された生検材料に基づいてグループ化されるか、又は

(a4c) FOVは腫瘍部位に基づいてグループ化されるか、又は

(a4d) FOVは患者に基づいて別の患者と比較するためにグループ化されるか、又は

(a4e) FOVは腫瘍遺伝子型に基づいてグループ化される)と、

(a5) 形態学的特徴の自動セグメント化をデータセット内の各FOVの各検出可能マーカーシグナルに適用するステップ(前記特徴のセグメント化は任意選択でサイズの制約、強度の制約、又はサイズの制約と強度の制約との組み合わせに基づく)と

を含む方法によって取得される。

50

【0017】

別の実施形態において、前述の方法の前記データセットを取得する方法は、
(a6) 1つ又は複数のF O Vにおいて、クラスタ分析に含めるか、又はクラスタ分析から除外する領域を手作業で指定するステップ
をさらに含む。

【0018】

別の一実施形態において、前述の方法の検出可能マーカーは、共局在化され、定量可能な場合、スペクトル又は他の物理的特徴に基づいて他のマーカー及び組織から分離され得るシグナルを生成する。一実施形態において、検出可能マーカーは抗体又は抗体の抗原結合フラグメントに付加される。模範的な一実施形態において、検出可能標識は少なくとも1つのリン酸化タンパク質に対して特異的に結合する少なくとも1つの抗体に付加される(例えばPI-3キナーゼシグナル伝達経路(signal transduction pathway)又はMAPキナーゼシグナル伝達経路のメンバー)。さらなる一実施形態において、抗ホスホ抗体で標識される細胞試料は、二温度固定法を使用して固定された組織である。

10

【0019】

また本明細書では、腫瘍中におけるシグナル伝達経路の生理学的状態に応じて腫瘍を特徴付ける方法も提供し、該方法は前述の方法に従って腫瘍試料の画像を分析するステップを含み、

- ・複数の被分析物が検出可能マーカーで標識され、
- ・検出可能マーカーで標識される被分析物のうち少なくとも1つはリン酸化シグナル伝達タンパク質であり、
- ・画像の各F O V内の単一又は複数のz面にて、ハイパースペクトル又は多重スペクトルのデータが収集される。

20

【0020】

また本明細書では、細胞試料における不均一性を自動的に識別するシステムも提供し、該システムは

- (a) 分析用画像処理分析システムであって、
プロセッサと、

プロセッサに結合され、プロセッサによって実行されたとき前述の方法のいずれかを含む操作をプロセッサに実施させるコンピュータ実行可能な命令を記憶するメモリとを含む分析用画像処理分析システムと、任意選択で

30

(b) 細胞試料のデジタル化画像並びに細胞試料からの多重スペクトルデータ及び/又はハイパースペクトルデータを捕捉するよう、またデジタル化画像を分析用画像処理分析システムへ伝達するように適合された、分析用画像処理ハードウェアシステムと、任意選択で

- (c) リレーショナルデータベースとを含む。

【0021】

模範的な一実施形態において、前述のシステムは、対象の1つ又は複数の被分析物が検出可能標識で標識される細胞試料を含有するスライドをさらに含み得る。さらなる一実施形態において、細胞試料は二温度固定法を使用して保存済みのホルマリン固定パラフィン包埋組織試料であり、前記検出可能標識は少なくとも1つのリン酸化タンパク質に特異的に結合する少なくとも1つの抗体に付加される。

40

【0022】

また本明細書では、前述の方法のいずれかを含む操作を実施するためにプロセッサによって実行されるコンピュータ実行可能な命令を記憶するための、非一時的なコンピュータ可読記憶媒体も提供する。

【0023】

本特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1枚の図面を含む。本特許

50

又は特許出願のカラー図面付き刊行物の写しは、要請があれば、必要な手数料が支払われ次第、当社から提供される。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】解剖学的組織のデジタル化、可視化及び注釈付けのための基本ワークフロー（1、2、3）、続いて注釈付き視野におけるスペクトルデータセットの収集（4）、続いて多重化マーカーレベルのコンピュータ定量分析（4）を示す図である。

【図2】不均一性分析のための模範的ワークフローにおける主要なステップを示す図である。

【図3】PI3K/AKT/mTOR及びRas/MAPKの経路を示す図である。円で囲まれたタンパク質は、実施例に記載の模範的研究向けに選定された標的を意味する。

【図4】視野上方の体系的サンプリングを示す図である（模擬明視野内に表示されるスキャン済みの解剖学的画像の上方に重ね合わされた矩形で表示される、スペクトル画像処理を使用して取得されることになる領域）。

【図5】注釈付き視野上方でのスペクトル取得の概念を示す図である。

【図6】自動化された多重モードスペクトルデータ取得をリレーショナルデータベース及び可視化ソフトウェア及び分析ソフトウェアと組み合わせた模範的システムを示す図である。

【図7】強度範囲、サイズ及び形状の制約に基づいて、構造を分析から除外することを可能にする、模範的な自動特徴選定を示す図である。

【図8】特徴をセグメント化するためのパラメータを設定する、模範的な自動マスク設定ダイアログインターフェースを示す図である。

【図9】FOVの注釈付け及び編集を手動で行うための模範的ツールを示す図である。

【図10】データセットのローディング、多重被分析物発現クラスタの判定、及び出力の表示を行うための模範的ワークフローを示すフローチャートである。

【図11】不均一な発現を定量するためのクラスタ分析を示す図である。1）注釈付き領域内でのスペクトルデータの自動取得向けに、解剖学的視野にデジタル処理によって注釈が付けられる。対象区域内の視野毎に取得されたデータがアンミキシングされ、z次元を介して投影されることにより、被分析物毎の被分析物強度を表す一連の2D画像が生成される。2）各視野内の各被分析物の2D画像が他のすべての視野からの2D画像に付加されることにより、データセット全体にまたがる画像が作成され、各被分析物がz軸に付加されることにより、データセット全体にわたる被分析物毎の被分析物分布を表す3D画像が生成される。3）密度ベースのクラスタ化アルゴリズムが、直前のステップで作成された3Dデータセットに適用される。クラスタ化アルゴリズムは3Dデータセットのx, y座標に応じて新規画像を作成し、各ピクセルを、すべてのマーカーにわたりメンバーが同等の発現パターンを有する1つのクラスタへとグループ化する。作成された各クラスタは、複数のマーカーについて他と異なる発現パターンを有する。4）解剖学的組織において各クラスタに属する領域を表示するよう、クラスタマップが色分けされる。5）各マーカーの強度値が各クラスタに属する領域から収集され、これらの強度値は後でプロット化するか、スプレッドシートにエクスポートすることができる。各クラスタのバイオマーカープロットを隣り合わせに配置すると、カラーマップ上で対象のバイオマーカーについて発現が高い区域又は低い区域を判定しやすくなる。6）データセット内でクラスタ毎の比例的区域を表示する、クラスタヒストグラムが生成される。これにより、区域において支配的な発現パターン、及び細胞集団全体に占める割合が比較的少ない発現パターンを簡単に判定しやすくなる。

【図12】MAPキナーゼ及びPI-3キナーゼの経路を示す図である。

【図13】PI-3キナーゼの経路及び関連するキナーゼ阻害剤を示す図である。

【図14】（a）参照免疫プロットに対するハプテン化ホスホ抗体QDプローブの染色挙動の比較、（b）免疫蛍光により評価された個別のプローブIHC別の比較、及び（c）スペクトル画像処理により評価された6つのハプテン化ホスホ抗体QDプローブの多重化

10

20

30

40

50

混合物としての比較を示す図である。細胞モデルは、A T P競合性A K Tキナーゼ阻害剤（G S K 6 9 0 6 9 3）を使用して、未処理（U T）条件及び薬物処理条件（D T）でF F P E調製されたS K B R 3細胞であった。a）非結合型一次抗体を使用した免疫プロットは、未処理及び薬物処理（24時間）後のS K B R 3細胞中の各タンパク質種について、平均的なホスホシグナル伝達レベルを示した。チューブリンはタンパク質負荷の対照として示されている。b）U T条件及びD T条件で単一のハプテン抗体Q Dにより標識されたS K B R 3細胞中の各ホスホタンパク質種におけるホスホシグナル伝達活性の免疫蛍光画像の例である。c）U T条件及びD T条件ですべてのハプテン抗体Q Dプロープの複合染色により標識されたS K B R 3細胞中の各ホスホタンパク質種におけるホスホシグナル伝達活性の、スペクトルアンミキシング後の画像の例である。d）単一標識及び多重化標識のいずれについても、個々の細胞におけるホスホシグナル伝達強度が不均一であることに注目されたい。c）に記載のスペクトルデータに相当するボックスプロットは、複数のR O Iからの数百個の細胞を対象に平均化されたホスホマーカー（p h o s p h o m a r k e r）強度の定量的情報を提供する。ボックスプロットは、セグメント化された細胞についてテューキーウィスカが付記されている（n = 5つのR O I、171 ~ 414のセグメント化された特徴/条件）。アスタリスクは有意に異なる条件（p > 0.0001）を表し、n sは有意性がないことを表す。

10

【図15】未処理（U T）及びp A K T阻害剤（G S K 6 9 0 6 9 3）薬物処理後（D T）のS K B R 3細胞のF F P EスライドにおけるD A B I H CによるP I 3 Kマーカー活性染色により検証された抗体プロープ特異性を示す図である。（a）一次抗体を使用し

20

【図16】ホスホ抗体染色条件を最適化するため、F F P E調製されたモデルシステムが使用された：p T E N欠損が生じ、過活動のP I 3 Kシグナル伝達を有するL n C a p細胞株（M c M e n a m i n 1999、C a n c e r R e s）及びF F P E調製されたC a l u - 3異種移植片。L n C a p細胞及びC a l u - 3異種移植片はそれぞれ、P I 3 Kシグナル伝達を阻害するL Y 2 9 4 0 0 2及びホスファターゼが存在しない状態及び存在する状態で処理された。L n C a p細胞株（左図）に対するホスホ抗体を使用し

30

【図17AB】M T I Pのリン酸官能的プロファイリング及び再現性を示す図である。a）スペクトル画像処理向けのR O Iが、相当するH & Eスライド（左上）により、病理学者が注釈を付けた乳房腫瘍中で無作為に取得される。左下の画像は、1つのR O Iからの6枚のアンミキシングされたホスホマーカー画像のオーバーレイを示す。R O Iの6つのホスホタンパク質チャンネルに相当する、アンミキシングされた画像が右側に示されている。スケールバーは50 μmである。b）1つのR O IからのH & E画像（左）、及びアンミキシングされた画像の3つのホスホマーカー（H & E画像の右）は、腫瘍中の上皮領域及び間質領域における特徴的なホスホ発現（p h o s p h o e x p r e s s i o n）パターンを表示する形で示されている。c）ボックスプロット（左）は、ホスホプロープ（p h o s p h o p r o b e）標識が対照よりも高いP I 3 Kシグナル伝達レベルを示すことを示す。5 - C A、n = 8つのR O Iである。Cは一次抗体が存在しない状態で染色された対照標本である。ボックスプロット（右）は、腫瘍（T）区域と非腫瘍隣接（T A）区域を対比するとP I 3 Kシグナル伝達が区別され得る一方、非腫瘍隣接区域はP I 3 Kシグナル伝達の類似性を示す可能性があることを示し、これは形態学的構造を伴うホスホプロファイリング（p h o s p h o p r o f i l i n g）情報の価値を示唆するものである

40

50

。ペア間の有意な差はアスタリスクで表示される ($p > 0.0001$)。ns は有意でないことを意味する。d) 乳房腫瘍標本において実証された多重スペクトル PP-QD アッセイの再現性。連続的に切除された患者の腫瘍中での PP 活性が測定され、1 日当たり 3 通りのスライドに FFPE 標本が作成され、3 日連続で反復された。画像処理された ROI の数はスライド 1 枚につき 7 つであった。左の棒グラフは 3 日連続で測定されたホスホマーカース強度の正規化平均値を示す ($n = 1$ 日当たりスライド 3 枚、スライド 1 枚当たり 7 つの ROI)。各ホスホマーカースの強度は、3 日間にわたる該マーカースの最高平均強度値に対して正規化された。右の棒グラフは 9 枚の連続スライド (1 日当たりスライド 3 枚、スライド 1 枚当たり 7 つの ROI) から測定されたホスホマーカースの絶対平均強度及び正規化平均強度の CV % を示す。各 ROI の平均強度は、各スライドにおける 6 つのホスホマーカースすべての合計強度に対して正規化された。

10

【図 17CD】MTIP のリン酸官能的プロファイリング及び再現性を示す図である。a) スペクトル画像処理向けの ROI が、相当する H & E スライド (左上) により、病理学者が注釈を付けた乳房腫瘍中で無作為に取得される。左下の画像は、1 つの ROI からの 6 枚のアンミキシングされたホスホマーカース画像のオーバーレイを示す。ROI の 6 つのホスホタンパク質チャンネルに相当する、アンミキシングされた画像が右側に示されている。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ である。b) 1 つの ROI からの H & E 画像 (左)、及びアンミキシングされた画像の 3 つのホスホマーカース (H & E 画像の右) は、腫瘍中の上皮領域及び間質領域における特徴的なホスホ発現 (phosphoexpression) パターンを表示する形で示されている。c) ボックスプロット (左) は、ホスホプローブ (phosphoprobe) 標識が対照よりも高い PI3K シグナル伝達レベルを示すことを示す。5-CA、 $n = 8$ つの ROI である。C は一次抗体が存在しない状態で染色された対照標本である。ボックスプロット (右) は、腫瘍 (T) 区域と非腫瘍隣接 (TA) 区域を対比すると PI3K シグナル伝達が区別され得る一方、非腫瘍隣接区域は PI3K シグナル伝達の類似性を示す可能性があることを示し、これは形態学的構造を伴うホスホプロファイリング (phosphoprofiling) 情報の価値を示唆するものである。ペア間の有意な差はアスタリスクで表示される ($p > 0.0001$)。ns は有意でないことを意味する。d) 乳房腫瘍標本において実証された多重スペクトル PP-QD アッセイの再現性。連続的に切除された患者の腫瘍中での PP 活性が測定され、1 日当たり 3 通りのスライドに FFPE 標本が作成され、3 日連続で反復された。画像処理された ROI の数はスライド 1 枚につき 7 つであった。左の棒グラフは 3 日連続で測定されたホスホマーカース強度の正規化平均値を示す ($n = 1$ 日当たりスライド 3 枚、スライド 1 枚当たり 7 つの ROI)。各ホスホマーカースの強度は、3 日間にわたる該マーカースの最高平均強度値に対して正規化された。右の棒グラフは 9 枚の連続スライド (1 日当たりスライド 3 枚、スライド 1 枚当たり 7 つの ROI) から測定されたホスホマーカースの絶対平均強度及び正規化平均強度の CV % を示す。各 ROI の平均強度は、各スライドにおける 6 つのホスホマーカースすべての合計強度に対して正規化された。

20

30

【図 18A】MTIP は、ホスホマーカースの種類及び乳房腫瘍組織毎に、多様な範囲のシグナル伝達レベルを示す。a) 5 つの患者腫瘍からの代表的な腫瘍領域におけるホスホマーカース発現を示す例である。画像は強度比較のため、同等に処理された。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ である。b) ボックスプロットは、Induvimed の患者 5 名における 6 つのホスホマーカースの平均強度を示す。ウィスカーは 1 ~ 99 パーセンタイルである。1 つの腫瘍につき $n = 8$ つの ROI である。C は一次抗体が存在しない状態で染色された対照標本である。c) 評価された乳房腫瘍の突然変異及び機能の特徴。Eq は曖昧を意味し、不確実な診断を表す。

40

【図 18B】MTIP は、ホスホマーカースの種類及び乳房腫瘍組織毎に、多様な範囲のシグナル伝達レベルを示す。a) 5 つの患者腫瘍からの代表的な腫瘍領域におけるホスホマーカース発現を示す例である。画像は強度比較のため、同等に処理された。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ である。b) ボックスプロットは、Induvimed の患者 5 名における 6 つのホスホマーカースの平均強度を示す。ウィスカーは 1 ~ 99 パーセンタイルである。1 つ

50

の腫瘍につき $n = 8$ つの R O I である。C は一次抗体が存在しない状態で染色された対照標本である。c) 評価された乳房腫瘍の突然変異及び機能の特徴。E q は曖昧を意味し、不確実な診断を表す。

【図 1 8 C】M T I P は、ホスホマーカの種類及び乳房腫瘍組織毎に、多様な範囲のシグナル伝達レベルを示す。a) 5 つの患者腫瘍からの代表的な腫瘍領域におけるホスホマーカ発現を示す例である。画像は強度比較のため、同等に処理された。スケールバーは $50 \mu m$ である。b) ボックスプロットは、I n d u v i m e d の患者 5 名における 6 つのホスホマーカの平均強度を示す。ウィスカーは $1 \sim 99$ パーセンタイルである。1 つの腫瘍につき $n = 8$ つの R O I である。C は一次抗体が存在しない状態で染色された対照標本である。c) 評価された乳房腫瘍の突然変異及び機能の特徴。E q は曖昧を意味し、不確実な診断を表す。

10

【図 1 9 A B】M T I P は、乳房腫瘍中における P I 3 K ネットワークシグナル伝達の不均一な空間分布を明らかにする。a) p A K T 4 7 3 チャンネルの代表的な H & E 画像及び相当するスペクトルデータは、パネル b において黒色で概要が示されているクラスタマップの形態学的文脈を示す。b) クラスタマップは固有のホスホ発現パターンを示し、これらは色分けされている。患者 1 名当たり 8 つの R O I のホスホマーカ強度に平均シフトクラスタ分析アルゴリズムを適用することにより、クラスタマップが生成された (4 つの代表的な R O I が示されている)。a 及び b におけるスケールバーは $80 \mu m$ である。c) クラスタプロットは、各クラスタにおける 6 つのホスホマーカ強度の定量的測定結果を示す。患者毎に 3 つの代表的なクラスタプロットが示されている。各ホスホマーカが占有する組織の面積は、クラスタ 2 - C 1、2 - C 2、2 - C 6 ではそれぞれ 85.1% 、 4.09% 、 10.66% であり、クラスタ 3 - C 1、3 - C 2、3 - C 5 ではそれぞれ 26.6% 、 54.6% 、 1.43% であり、クラスタ 4 - C 1、4 - C 2、4 - C 5 ではそれぞれ 93.9% 、 3.89% 、 1.43% であり、クラスタ 5 - C 1、5 - C 2、5 C 3 ではそれぞれ 96.6% 、 3% 、 0.36% である。d) 系統樹は 5 つの乳房腫瘍例 (図 4 a) におけるネットワークシグナル伝達クラスタの階層型分布を示し、遺伝子型が同等であるクラスタのグループ化が散在性であることが分かる。面積が最大クラスタの 1% 未満であるクラスタは、系統樹分析に含まれない。各クラスタ名は腫瘍識別番号で表され、これに C 1、C 2、C 3、といった形でクラスタ番号が続く。W T は野生型、C は対照を表し、対照は一次抗体が存在しない状態で染色された F F P E 標本である。P I 3 K 3 C A 及び A K T 1 の突然変異が生じたクラスタ、並びに W T 及び C が色分けされている。

20

30

【図 1 9 C】M T I P は、乳房腫瘍中における P I 3 K ネットワークシグナル伝達の不均一な空間分布を明らかにする。a) p A K T 4 7 3 チャンネルの代表的な H & E 画像及び相当するスペクトルデータは、パネル b において黒色で概要が示されているクラスタマップの形態学的文脈を示す。b) クラスタマップは固有のホスホ発現パターンを示し、これらは色分けされている。患者 1 名当たり 8 つの R O I のホスホマーカ強度に平均シフトクラスタ分析アルゴリズムを適用することにより、クラスタマップが生成された (4 つの代表的な R O I が示されている)。a 及び b におけるスケールバーは $80 \mu m$ である。c) クラスタプロットは、各クラスタにおける 6 つのホスホマーカ強度の定量的測定結果を示す。患者毎に 3 つの代表的なクラスタプロットが示されている。各ホスホマーカが占有する組織の面積は、クラスタ 2 - C 1、2 - C 2、2 - C 6 ではそれぞれ 85.1% 、 4.09% 、 10.66% であり、クラスタ 3 - C 1、3 - C 2、3 - C 5 ではそれぞれ 26.6% 、 54.6% 、 1.43% であり、クラスタ 4 - C 1、4 - C 2、4 - C 5 ではそれぞれ 93.9% 、 3.89% 、 1.43% であり、クラスタ 5 - C 1、5 - C 2、5 C 3 ではそれぞれ 96.6% 、 3% 、 0.36% である。d) 系統樹は 5 つの乳房腫瘍例 (図 4 a) におけるネットワークシグナル伝達クラスタの階層型分布を示し、遺伝子型が同等であるクラスタのグループ化が散在性であることが分かる。面積が最大クラスタの 1% 未満であるクラスタは、系統樹分析に含まれない。各クラスタ名は腫瘍識別番号で表され、これに C 1、C 2、C 3、といった形でクラスタ番号が続く。W T は野生型、C は

40

50

対照を表し、対照は一次抗体が存在しない状態で染色された F F P E 標本である。P I K 3 C A 及び A K T 1 の突然変異が生じたクラスタ、並びに W T 及び C が色分けされている。

【図 19 D】M T I P は、乳房腫瘍中における P I 3 K ネットワークシグナル伝達の不均一な空間分布を明らかにする。a) p A K T 4 7 3 チャネルの代表的な H & E 画像及び相当するスペクトルデータは、パネル b) において黒色で概要が示されているクラスタマップの形態学的文脈を示す。b) クラスタマップは固有のホスホ発現パターンを示し、これらは色分けされている。患者 1 名当たり 8 つの R O I のホスホマーカース強度に平均シフトクラスタ分析アルゴリズムを適用することにより、クラスタマップが生成された (4 つの代表的な R O I が示されている)。a 及び b) におけるスケールバーは 80 μ m である。c) クラスタブロットは、各クラスタにおける 6 つのホスホマーカース強度の定量的測定結果を示す。患者毎に 3 つの代表的なクラスタブロットが示されている。各ホスホマーカースが占有する組織の面積は、クラスタ 2 - C 1、2 - C 2、2 - C 6 ではそれぞれ 85.1%、4.09%、10.66% であり、クラスタ 3 - C 1、3 - C 2、3 - C 5 ではそれぞれ 26.6%、54.6%、1.43% であり、クラスタ 4 - C 1、4 - C 2、4 - C 5 ではそれぞれ 93.9%、3.89%、1.43% であり、クラスタ 5 - C 1、5 - C 2、5 C 3 ではそれぞれ 96.6%、3%、0.36% である。d) 系統樹は 5 つの乳房腫瘍例 (図 4 a) におけるネットワークシグナル伝達クラスタの階層型分布を示し、遺伝子型が同等であるクラスタのグループ化が散在性であることが分かる。面積が最大クラスタの 1% 未満であるクラスタは、系統樹分析に含まれない。各クラスタ名は腫瘍識別番号で表され、これに C 1、C 2、C 3、といった形でクラスタ番号が続く。W T は野生型、C は対照を表し、対照は一次抗体が存在しない状態で染色された F F P E 標本である。P I K 3 C A 及び A K T 1 の突然変異が生じたクラスタ、並びに W T 及び C が色分けされている。

【図 20 A B C】ネットワークシグナル伝達の定量的分析により、腫瘍突然変異によってグループ化されないホスホタンパク質発現の不均一性が明らかとなる。a) スペクトル画像処理に使用される腫瘍部位の連続切片からの H & E 画像。H & E 切片はスペクトル画像切片から 4 ~ 16 μ m 離れている。b) スペクトル画像は、5 つの個別のホスホマーカース層のオーバーレイを示す。スペクトル画像は、左図における H & E 画像と一致する位置にある。c) クラスタマップは固有のホスホ発現パターンを示し、これらは色分けされている。間質含有率が高いクラスタは接尾辞「S」を有し、上皮含有率が高いクラスタは接尾辞 E を有する。患者 1 名当たり 4 つの R O I のホスホマーカース強度に平均シフトクラスタ分析アルゴリズムを適用することにより、クラスタマップが生成された。a、b、c 及び d) におけるスケールバーは 80 μ m である。d) クラスタブロットは、5 つのホスホマーカース強度の定量的測定結果を示す。患者毎に 4 つの代表的な主要クラスタブロットが示されている。各ホスホマーカースが占有する組織の面積は、クラスタ 379 - C 1、C 2、C 3、C 6 では 60.1%、32.9%、6.15%、0.15% であり、クラスタ 307 - C 1、C 2、C 3、C 4 では 89.1%、9.7%、0.76%、0.47% であり、クラスタ 384 - C 1、C 2、C 3、C 4 では 44.8%、49.9%、4.92% である。

【図 20 D】ネットワークシグナル伝達の定量的分析により、腫瘍突然変異によってグループ化されないホスホタンパク質発現の不均一性が明らかとなる。a) スペクトル画像処理に使用される腫瘍部位の連続切片からの H & E 画像。H & E 切片はスペクトル画像切片から 4 ~ 16 μ m 離れている。b) スペクトル画像は、5 つの個別のホスホマーカース層のオーバーレイを示す。スペクトル画像は、左図における H & E 画像と一致する位置にある。c) クラスタマップは固有のホスホ発現パターンを示し、これらは色分けされている。間質含有率が高いクラスタは接尾辞「S」を有し、上皮含有率が高いクラスタは接尾辞 E を有する。患者 1 名当たり 4 つの R O I のホスホマーカース強度に平均シフトクラスタ分析アルゴリズムを適用することにより、クラスタマップが生成された。a、b、c 及び d) におけるスケールバーは 80 μ m である。d) クラスタブロットは、5 つのホスホマーカース

強度の定量的測定結果を示す。患者毎に4つの代表的な主要クラスタブロットが示されている。各ホスホマーカが占有する組織の面積は、クラスタ379-C1、C2、C3、C6では60.1%、32.9%、6.15%、0.15%であり、クラスタ307-C1、C2、C3、C4では89.1%、9.7%、0.76%、0.47%であり、クラスタ384-C1、C2、C3、C4では44.8%、49.9%、4.92%である。

【図20E】ネットワークシグナル伝達の定量的分析により、腫瘍突然変異によってグルーピング化されないホスホタンパク質発現の不均一性が明らかとなる。a)スペクトル画像処理に使用される腫瘍部位の連続切片からのH&E画像。H&E切片はスペクトル画像切片から4~16μm離れている。b)スペクトル画像は、5つの個別のホスホマーカ層のオーバーレイを示す。スペクトル画像は、左図におけるH&E画像と一致する位置にある。c)クラスタマップは固有のホスホ発現パターンを示し、これらは色分けされている。間質含有率が高いクラスタは接尾辞「S」を有し、上皮含有率が高いクラスタは接尾辞Eを有する。患者1名当たり4つのROIのホスホマーカ強度に平均シフトクラスタ分析アルゴリズムを適用することにより、クラスタマップが生成された。a、b、c及びdにおけるスケールバーは80μmである。d)クラスタブロットは、5つのホスホマーカ強度の定量的測定結果を示す。患者毎に4つの代表的な主要クラスタブロットが示されている。各ホスホマーカが占有する組織の面積は、クラスタ379-C1、C2、C3、C6では60.1%、32.9%、6.15%、0.15%であり、クラスタ307-C1、C2、C3、C4では89.1%、9.7%、0.76%、0.47%であり、クラスタ384-C1、C2、C3、C4では44.8%、49.9%、4.92%である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

I. 略語及び定義

本開示の様々な実施例を再検討しやすくするため、略語及び特定の用語について以下の説明を記載する。

【0026】

CISH：発色性インサイチュハイブリダイゼーション

CRC：結腸直腸がん

FFPE組織：ホルマリン固定パラフィン包埋組織

FISH：蛍光性インサイチュハイブリダイゼーション

H&E：ヘマトキシリン及びエオシン染色

IHC：免疫組織化学

ISH：インサイチュハイブリダイゼーション

NBF：中性緩衝ホルマリン溶液

NSCLC：非小細胞肺癌

PI3K：ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ。ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸3-キナーゼ、ホスファチジルイノシタイド3-キナーゼ、PI3-キナーゼ、PI(3)K、及びPI-3Kともいう。

【0027】

TNBC：トリプルネガティブ乳がん

被分析物：試料中において特異的に検出されることになる分子又は分子群。

被分析物結合体：被分析物に対して特異的に結合する能力を有するもの。被分析物結合体の例として以下が挙げられる：標的抗原に結合する抗体及び抗体フラグメント（一本鎖抗体を含む）；MHC：抗原複合体に結合するt細胞受容体（一本鎖受容体を含む）；MHC：ペプチドマルチマー（特定のT細胞受容体に結合する）；特定の核酸又はペプチド標的に結合するアプタマー；特定の核酸、ペプチド、及び他の分子に結合する亜鉛フィンガー；受容体リガンドに結合する受容体複合体（一本鎖受容体及びキメラ受容体を含む）；受容体複合体に結合する受容体リガンド、並びに特定の核酸に対してハイブリダイゼーションを起こす核酸プローブ。

【0028】

抗体：本明細書における用語「抗体」は最も広義に使用され、様々な抗体構造を包含し、例としてモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（二重特異性抗体など）、及び抗体フラグメントが、望ましい抗原結合活性を示す範囲で挙げられるが、これらに限定されない。

【0029】

抗体フラグメント：無傷の抗体においてその無傷の抗体に抗原を結合させる部分を含む、無傷の抗体以外の分子。抗体フラグメントの例としてFv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；二重特異性抗体；線形抗体；一本鎖抗体分子（scFvなど）；及び抗体フラグメントから形成される多特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0030】

抗ホスホ抗体：リン酸化されたタンパク質又はアミノ酸残基に結合するが、同じタンパク質又はアミノ酸残基の非リン酸化バージョンには結合しない抗体又は抗体フラグメント。抗ホスホ抗体の例として

- ・特定のリン酸化アミノ酸残基について特異的な抗体、例えばリン酸化ヒスチジン（抗ホスホHis）、リン酸化セリン（抗ホスホSer）、リン酸化トレオニン（抗ホスホThr）、及びリン酸化チロシン（抗ホスホTyr）、並びに
- ・リン酸化アミノ酸を含有する特定の抗原について特異的な抗体、例えばセリン473においてリン酸化されたAkt（抗ホスホAkt（Ser473））；PI3

が挙げられる。

20

【0031】

抗原：抗体分子又はT細胞受容体など、特定の体性免疫又は細胞性免疫の産物によって特異的に結合され得る化合物、組成物又は物質。抗原は例えばハプテン、単純中間代謝物、糖類（オリゴ糖など）、脂質、及びホルモンを含む任意の種類の分子のほか、複合糖質類（多糖類など）、リン脂質、核酸及びタンパク質など、巨大分子であってもよい。一般的な分類の抗原の例としてウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原生動物及び他の寄生性抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患、アレルギー及び移植片拒絶に関係する抗原、毒素並びに他の雑多な抗原が挙げられるが、これらに限定されない。一実施例において、抗原はPGAなど、パチルス抗原である。

【0032】

ペプチド：用語「ペプチド」は、オリゴペプチド及びポリペプチドを含め、アミド結合によって一体的に結合された複数のアミノ酸の任意の配列を包含する意味で使用される。アミノ酸がアルファアミノ酸である場合、L光学異性体又はD光学異性体のいずれかを使用することができる。

30

【0033】

オリゴペプチド：長さが2～20個のアミノ酸のペプチド。

ポリペプチド：長さが20個のアミノ酸より長いペプチド。本明細書において使用される用語「ポリペプチド」又は「タンパク質」は、任意のアミノ酸配列を包含し、糖タンパク質など修飾後配列を含む意味で使用される。

【0034】

翻訳後修飾：翻訳後のタンパク質における化学的修飾。これはタンパク質の生合成における後段階の1つであり、したがって多数のタンパク質について遺伝子発現に相当する。アミノ酸の翻訳後修飾は、タンパク質を他の生化学的官能基（酢酸塩、リン酸塩、様々な脂質及び炭水化物など）に結合させて、アミノ酸の化学的性質を変化させる（例えばシトルリン化）か、又は構造変化を引き起こす（例えばジスルフィド架橋の形成）ことにより、タンパク質の機能範囲を拡大する。酵素も、タンパク質のアミノ末端からアミノ酸を除去するか、又は途中でペプチド鎖を切断し得る。例えば、ペプチドホルモンであるインスリンはジスルフィド結合の形成後に2回切断され、プロペプチドが鎖の中間から除去される結果、タンパク質はジスルフィド結合によって接続された2つのポリペプチド鎖で構成される。また、最も早い発生期のポリペプチドはアミノ酸メチオニンから始まるが、これ

40

50

は mRNA 上の「開始」コドンがこのアミノ酸もコードするからである。このアミノ酸は通常、翻訳後修飾過程で除去される。他の修飾、例えばリン酸化は、酵素の活性化又は不活性化など、タンパク質の挙動を制御する一般的なメカニズムの一部である。

【0035】

試料：ゲノム DNA、RNA (mRNA を含む)、タンパク質、又はこれらの組み合わせを含有する、対象者から取得される生体標本。例として末梢血、尿、唾液、組織生検、外科的標本、羊水穿刺試料及び剖検材料が挙げられるが、これらに限定されない。

【0036】

特異的結合：特異的結合は、ある実体が試料中の 1 つの分子に対し、他の分子への結合を実質的に排除する範囲で結合する場合に発生する。例えば、ある実体は試料中の他の分子についての結合定数と比べ、少なくとも 10^3 M^{-1} 、 10^4 M^{-1} 又は 10^5 M^{-1} 大きい結合定数を有する場合、任意の分子に対して特異的に結合すると捉えることができる。

10

【0037】

二温度固定法：本明細書において使用される用語「二温度固定法」は、まず組織試料を低温のアルデヒドベースの固定剤中に、組織試料を実質的に固定しなくても固定剤を組織全体にわたり十分に拡散させることができる期間にわたり浸漬させた後、高温のアルデヒドベースの固定剤中に、アルデヒドが組織試料を十分に固定させることができる期間にわたり浸漬させる、アルデヒドベースの固定剤を使用する固定手順を指す。

【0038】

20

ピクセル：2次元格子パターン内で、該当する座標での試料のシグナル強度を表す数値に関連付けられる、規則的な間隔の座標。

II. はじめに

腫瘍組織中の多様なバイオマーカーを特徴付け、腫瘍組織内及び腫瘍組織間における前記バイオマーカーの存在及びレベルの不均一性を測定することが可能であれば、患者の疾患状態に対して利用可能な標的療法を適切に選択するための重要な情報の提供に繋がる。適切な併用療法の開発及び選定は、再発防止においてさらに重要な要因となり得、組織中で主要なバイオマーカーの分布が異なる区域を識別及び測定することが可能であれば、併用療法を判定する上で重要な情報の提供に繋がる。

【0039】

30

図1に記載のとおり、基本的なワークフローの基礎は細胞試料のデジタル化、可視化及び注釈付けにあり、続いて注釈付き視野におけるスペクトルデータセットの収集、続いてマーカーレベルのコンピュータ定量分析である。組織試料に適用可能な模範的ワークフローが図2に記載されている。本開示は、バイオマーカーの表現型不均一性に関する重要な情報を得るための定量的多重化プラットフォームを拡大する、定量的顕微鏡法向けにデータを取得及び分析する新規の方法に関する。我々は、臨床試料はもとより、細胞下部及び組織配列においても、広い解剖学的区域にわたるバイオマーカーレベル及び不均一性の測定を可能にするワークフローを実現すべく、新規の方法と計器とを組み合わせた。

【0040】

III. 試料

40

本方法及びシステムを使用できるようになる前に、対象の被分析物について検出可能に標識される試料を生成しなければならない。原則として、本方法及びシステムは、標識及び画像処理され得るどのような種類の細胞試料でも使用することができる。

【0041】

模範的試料の例として、組織切片（ホルマリン固定パラフィン包埋組織試料又は凍結保存組織ブロックから生成されたものなど）、細胞塗抹標本（頸管スミアなど）、及び細胞懸濁物（CYTOSPIN遠心分離器などを使用してスライドに固定させたものなど）が挙げられる。

【0042】

試料は全体的に、評価対象となる分子の詳細を保全する形で処理されるべきである。し

50

たがって、例えば複数のバイオマーカーのうち少なくとも1つを免疫組織化学によって測定する場合、検出されることになる被分析物の抗原性を排除する固定剤及び固定手順を避けるべきである。例えば、検出されることになる被分析物のうち1つが翻訳後修飾されたタンパク質（リン酸化タンパク質など）である場合、翻訳後修飾のパターンに加えられる変化が最小限で済むように試料を処理すべきである。翻訳後修飾に対するそうした変化を最小化又は排除するための模範的な処理方法が、例えば米国特許出願公開第2012-0214195A1号、WO2008-073187A2、WO2008-073187A2、及びLawson et al. において開示されている。

【0043】

特定の一実施形態において、試料はリン酸化タンパク質を含有するか、又は含有すると見られ、試料はアルデヒドベースの固定剤（ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、グリオキサル、及びアクロレインなど）中に二温度固定法を使用して固定される。

【0044】

二温度固定法における第1のステップは、試料の横断面の実質的に全体にわたる組成物の実質的に完全な拡散を可能にする上で効果的な条件下にて、組織試料を高濃度のアルデヒドベースの固定剤に浸漬することである。第1のステップにおける有効温度範囲は-20℃超から少なくとも15℃の範囲、好ましくは0℃超からより高い温度、より典型的には約10℃の範囲、さらにより典型的には約1℃から約7℃の範囲である。実際の実施形態の場合、温度は典型的に約4℃であった。第1の処理ステップに要する期間は約15分間から約4時間までの範囲、最も典型的には15分超から約3時間の範囲で、良好な結果は典型的に約1.5時間から約2時間にわたり固定剤組成拡散ステップを実施することによって得られる。拡散時間を4時間以上にまで延長しても、有益な効果は全体的にほとんどなかったが、低温のホルマリン中に組織を残しておく時間を延長（例えば最長14日間）しても全体的に処理に対して有害な影響はない。特に厚い組織、又は翻訳後修飾の損失に対して特に敏感な試料の場合、第1のステップでアルデヒド濃度を上げると、試料中への拡散率が上昇し得る。したがって、例えば、二温度固定法の第1のステップでは少なくとも10%のホルマリンから約50%のホルマリンを使用する。

【0045】

二温度固定法における第2のステップでは組織を高温のアルデヒドベースの固定剤溶液中に、組織の形態又は組織に含有される被分析物の抗原性を損なうことなく架橋が可能な限り迅速に発生することが十分に可能な期間にわたり浸漬させる。第2のステップに付随する温度は典型的に周囲温度より高く、例えば約22℃より高い。実際の実施形態の場合、温度は典型的に周囲より高い温度から少なくとも55℃までの範囲、より典型的には約35℃から約45℃の範囲であるが、この温度範囲は比較的迅速な組織架橋を十分に可能にする架橋反応速度を上げるからである。しかし、温度が約50℃を超えると、試料は概して劣化し始め、続いて起こる一定の組織学的反応に有害な影響を及ぼし得る。したがって、インサイチュハイブリダイゼーション、IHC及び/又はH&Eなど後続の画像処理ステップが効果的に進行できるよう、より高い温度及び期間が選択される。第2の処理ステップに要する期間は15分超から少なくとも約5時間までの範囲、より典型的には少なくとも約1時間から約4時間の範囲、より典型的には約2時間から約3時間の範囲である。一部の実施形態において、第2の処理ステップは45℃で1.5時間にわたり実施される。

【0046】

二温度固定法についてより詳しくは、米国特許出願公開第2012-0214195A1号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

しかし、本方法及びシステムは、免疫組織化学、インサイチュハイブリダイゼーション、及び形態学向けの染色/標識（H&E染色など）方法を含め、細胞中で対象の被分析物を標識する方法に対して敏感な如何なる試料にも適合するということが重視されるべきである。

【0047】

試料は、対象の被分析物を検出し、好ましくは定量できるよう、可視化され得る。如何なる試料標識方法又はコントラスト生成方法でも使用することができ、例として免疫組織化学的方法、インサイチュハイブリダイゼーション方法（FISH及びCISHなど）、遺伝的に符号化されたレポーター（GFP、YFP、CFPなど）、又は構成的に蛍光性の成分などが挙げられる。

【0048】

一実施形態において、対象の被分析物に対する被分析物結合体の特異的結合を十分に可能にする条件下で試料を被分析物結合体と接触させることによって、試料が標識される。被分析物結合体は検出可能標識で標識され、標識は被分析物結合体に直接（例えば共有付加により）付加され得るか、又は被分析物結合体について特異的である検出可能に標識された第2の実体に試料を接触させることによって適用され得る。好ましくは、検出可能標識は、測定されるシグナルの量と1つのピクセル内に存在する造影剤の量との間に一貫した関係が存在するという意味で、共局在化され、定量可能な場合、スペクトル又は他の物理的特徴に基づいて他のマーカー及び組織から分離可能である。標識のダイナミックレンジは、マーカーレベルの小さい変化を分解する上で重要な要因となり得る。標識のダイナミックレンジは、試料における標的分子レベルの変化を反映する形で確実に判定され得る強度の最小の増加又は減少を表し、ダイナミックレンジは標識システム及び画像処理システムの複合的ノイズによって制限される性能指数である。ダイナミックレンジが小さい場合、確実に測定可能な最小の数量と確実に測定可能な最大の数量との間の差も小さい。したがって、マーカーレベルの比較的小さい変化の識別が困難又は不可能となる。高いダイナミックレンジは、測定可能な最大値と測定可能な最小値との間に大きな差があることを意味する。したがって、小さい変化は、最も明るい値と比べ、確実に測定することができる。比較的高いダイナミックレンジを有する検出可能標識を使用することが好ましい。これらのパラメータを満たす模範的な検出可能標識の例として、半導体ナノ結晶（量子ドット）；FITC、TRITC、CY3、CY3.5、Texas Red、CY5、Fluorescein、ポリマー系色素（例えばUS8,354,239において開示されているものなど有機蛍光マーカー；発色団；吸光性染色剤；及びルシフェリンなど化学発光マーカーが挙げられる。

【0049】

模範的な一実施形態において、被分析物について特異的な一次抗体が1つ又は複数の特異的なハプテンを含む標識方式が使用される。その場合、特定のハプテンについて特異的な検出可能に標識された二次抗体を使用して、一次抗体を検出可能に標識することができる。多種多様なハプテン-二次抗体のペアが存在することにより、伝統的な一次-二次抗体のペアリングよりも広範な、被分析物及び検出可能シグナルの多重化が可能となる。さらに、各一次抗体に複数のハプテンコピーを付加することができることから、伝統的な一次-二次抗体のペアリングと比べ、シグナル増幅を大幅に拡充することができる。模範的なハプテン-抗体の組み合わせは、例えば米国特許第7,695,929号、米国特許第8,618,265号、及びWO2008-063378において開示されており、各々の内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0050】

本方法及びシステムの特定の応用例は、キナーゼカスケードなど、シグナル伝達経路の活性化における不均一性の評価での応用である。したがって、一実施形態において、試料は複数の被分析物結合体で標識され、1つ又は複数の被分析物結合体は抗ホスホ抗体又はその抗体フラグメントなど、リン酸化タンパク質に対して特異的に結合する。

【0051】

一実施形態において、抗ホスホ抗体は抗ホスホHis、抗ホスホSer、抗ホスホThr、又は抗ホスホTyrrである。この実施形態は、総体的なリン酸化レベルの判定に特に有用である。別の一実施形態において、抗ホスホ抗体は特定のリン酸化タンパク質について特異的である。この実施形態は、任意のキナーゼカスケード経路又はそのような経路群における不均一性の判定に特に有用である。例えば、抗ホスホ抗体はPI3K/AKT/

10

20

30

40

50

mTORの経路又はRas/MAPKの経路に関係するリン酸化標的について特異的であってもよい。これらの経路が図3、12及び13に図示されている。一実施形態において、抗ホスホ抗体に関連する検出可能標識は半導体蛍光ナノ粒子（量子ドットなど）であり、そのシグナルはハイパースペクトル画像処理によって検出される。半導体蛍光ナノ粒子は強く安定した高輝度発光強度を示し、これを利用して、伝統的なICアッセイにおける蛍光色素及び光ベース色素の制限を克服することができる（Watson et al. 2003; Bruchez et al. 2005; Michalek, X, et al. 2005）。半導体蛍光ナノ粒子は既に伝統的アッセイに勝っており、すなわち1) 半導体蛍光ナノ粒子は感度を拡充し、単一及び少数のタンパク質分子を検出する能力があり、2) 半導体蛍光ナノ粒子の高輝度及び離散的発光を使用して、組織中のタンパク質レベルをより正確に定量することができ、3) 複数の着色半導体蛍光ナノ粒子を使用して、細胞及び組織中における複数のタンパク質群を同時に識別することができる（Fichtner et al. 2010; Scholl et al. 2009; Sundara Rajan et al. 2006）。

【0052】

IV. 画像の取得及び注釈付け

本方法及びシステムは、対象の各被分析物の識別情報、位置及び強度に関するデータを含む標識組織の画像に適用される。したがって、細胞試料の形態学的特徴を含むデジタル画像が捕捉され、任意選択で対象区域（AOI）について注釈付けされ、次いで対象の各被分析物に関連する各検出可能標識の識別情報、位置及び強度に関する多重スペクトルデータ及び/又はハイパースペクトルデータがAOIから捕捉される。この分析のための基本的ワークフローの一例

A. 画像取得

形態学的画像をまず捕捉し、次いで注釈を付け、不均一性を評価されることになる1つ又は複数の対象区域（AOI）を識別する。

【0053】

有用な形態学的画像の一種は、屈折率コントラスト画像である。組織の屈折率を使用して解剖学的組織を十分な分解能で表示させることにより、分析用画像処理方法を使用して問い合わせることになる解剖学的目標物及び対象区域を識別することができる。解剖学的組織の概要は、任意の倍率で捕捉された多数の視野をタイル表示させることによって提供され、これにより、さらなる問い合わせのためのAOIの選定が可能となる。組織の屈折特性及び散乱特性に基づいて、伝送される照明及びコントラストを使用することにより、エオシン染色に似た画像を表示させることができ、これを任意選択で実際のH&E染色された連続切片と比較して、病理学を確認することができる。近IR域で伝送される照明の使用により、組織、対比染色剤又はレポーターに対する光傷害の最小化が確保される一方、十分に明るい照明により、スキャン画像を効率的に生成するための迅速な露出も可能となる。

【0054】

屈折コントラストの使用に代わる手段は、組織構造を強調するための組織自己蛍光又は蛍光染色剤の使用と、蛍光組織切片と併せて登録済みの連続切片画像上でのAOIの指定である。一部の例において、技術者はアイピースを介して直接、蛍光組織切片上で解剖学的目標物を簡単に見つけ、明視野を装備した別の顕微鏡で観察されるH&E連続切片上で形態学を確認することができる。

【0055】

B. 画像の注釈付け

1. 対象区域の注釈付け

形態学的画像は一旦収集された後、熟練の使用者（医師又は病理学者など）により、さらなる問い合わせのための1つ又は複数のAOIを選定するために注釈が付けられる。AOIの境界はコンピュータにより、ステージ座標へと変換される。一実施形態において、AOIは画像全体に相当し得るか、又は画像の一部、例えば画像の中で一定の形態学的特

徴を有する部分に限定され得る。画像の注釈付けに様々な基準を使用することができ、例えば、腺など解剖学的構造の認識又は上皮など細胞種別の認識を目的とする医学的訓練に基づいて注釈付けを行うか、あるいは腫瘍と基質との対比における差別化に基づいて区別を行うことができる。注釈付けは、セグメント化された細胞のテクスチャ特徴、形態学的特性の機械認識、観察中の線切片に登録された連続切片からのデータ、又はこれらの方法の組み合わせを使用して自動化することができる。一実施形態において、1つ又は複数のA O Iは解剖学的組織に基づいて選定される。

【0056】

一実施形態において、特殊ビューアーを使用して、組織の形態学的画像に注釈を付ける。模範的なソフトウェアでは、屈折コントラストを使用して組織切片を画像処理し、暗視野画像として白黒で表示させるか、又は伝送照明下で観察するとエオシンに似た外観の色コントラストを提供する色検索表を使用して表示させることができる。このソフトウェアは、関連する形態学の認識を可能にする十分な詳細度で解剖学的特徴を可視化できるよう、組織切片のズーム及びパンが可能である。一部の例において、明視野で取得された染色連続切片の画像と併せて概要スキャンに登録するか、又は解剖学的組織と組み合わされた核対比染色の2色画像を提供するD A P Iチャンネル及び屈折コントラストチャンネルなど、複数の色チャンネルにおいて概要スキャンを取得することができる。ソフトウェアのユーザーインターフェースは、多重化マーカー向けにより高い分解能で画像処理されることになるA O Iを技術者が画定することを可能にする描画ツールを提供する。ソフトウェアは、画像及びA O Iを再ロードして編集することができるよう、これらのA O Iをファイルとして画像と一緒に記憶する手段を提供し、また画像の座標系からのA O Iの座標を実際のスライドが配置されるステージの座標系に変換する手段も提供する。ソフトウェアは、連続切片上で同種の特徴を手動又は自動で認識することによって1つの切片からのA O Iファイルを異なる連続切片に登録できるよう、組織画像上で基準を指定する手段も提供する。

【0057】

2. 視野の注釈付け

A O Iを複数のF O Vに細分化して、F O Vサンプリング格子を生成する。F O Vサンプリング格子は、画像内で相互に比較可能な一連の代表的領域を設けるよう生成される。したがって、A O I内で分析対象となる関連領域の代表的サンプルを捕捉する形で、F O VはA O I全体にわたり分布すべきである。

【0058】

これを完遂し得る手段の1つは、A O I全体にわたり偏りのない構造化されたサンプリングを提供するよう、規則的な間隔で配置された複数のF O Vから成る格子を自動又は手動で生成することである。計器操作者は、F O VがA O Iの100%、又はより低い割合（例えば75%のカバレッジ、50%超のカバレッジ、25%のカバレッジ）をカバーするよう、カバレッジの度合いを選択することができる。これは図4で図示されている。取得時間、分析時間及びコンピュータメモリ要件を低減しつつ、バイオマーカーのレベル及び空間分布の忠実な表現を導出するため、体系的無作為サンプリングの原則を使用して、広い領域を取得することができる。低めのカバレッジを指定可能であることの利点は、プロセスの結果としてデータセットがより小規模となり、データセットをより迅速に取得することである。また、F O Vからのみスペクトルデータを取得する場合、照明に対する組織の露出面積が小さくなることから、既に画像処理済みの区域間に散在する区域の再画像処理が可能となる。これはレポーターの光退色が問題である場合に特に有益である。A O I全体を正確に表現するために十分なカバレッジ率を選定すべきである。

【0059】

これを完遂し得るもう1つの手段は、A O I内で特異的な一連の形態学的特徴を有する各領域にF O Vを割り当てることである。例えば、F O Vを有核細胞のみ、腫瘍組織内の管状領域のみ、組織試料中の腫瘍性領域のみ、などに一致する形で選定することができる。特定の形態学的特徴に一致するF O Vは熟練の使用者により手作業で選定され得るか、又はParimi et al. 及びNguyen et al. において開示されてい

るような自動化された形態学的分析に基づいて選定され得る。

【0060】

F O V サンプリング格子は自動生成される場合であっても、使用者の要望に応じて F O V を追加又は削除する形で手動で監査することができ、これはスペクトルデータ取得の前でも後でも行うことができる。

【0061】

一般的に、F O V と一緒に A O I を選定し、組織領域のサンプリングを行うことが有利であり、これにより処理及び記憶するデータの総量が減り、コンピュータ処理経費が減り、A O I 全体にわたる発現分布をモデル化するためのデータが十分に得られる。

【0062】

一実施形態において、形態学的画像及びスペクトルデータの双方を、注釈付けの前に画像全体について補足することができる。あるいは、各 A O I からのみ、スペクトルデータを収集してもよい。さらに別の選択肢として、各 A O I 内の 1 つ又は複数の視野 (F O V) からのみ、スペクトルデータを収集してもよい。

【0063】

V . データセットの生成

A O I 内の F O V 毎に複数の画像スタックを含むデータセットに、F O V からのデータを整理して入れ込む。

【0064】

A . スペクトルデータの収集

A O I 内で F O V が選定されると、多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータが各 F O V から収集される。このデータは新たに (すなわち F O V 選定後にスペクトルデータを収集することにより) 収集されるか、又は収集済みのスペクトルデータセットから F O V 選定後に抽出され得る。次いで検出可能マーカースIGNAL が、収集された多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータからコンピュータ処理によりセグメント化される。

【0065】

スペクトル画像同様、空間の 2 つの次元でスペクトルデータを取得するための一般的戦略が 3 通りある。第 1 の戦略は、例えば C C D カメラ又は C M O S カメラなどアレイ検出器など、検出器によって画像処理されることになるスペクトルの限定的帯域をフィルタ処理することである。カメラはこのスペクトルの限定的帯域内で生成された画像を収集し、次いでフィルタ帯域がスペクトルの隣接領域へと変更され、このプロセスが繰り返される。このプロセスは、所望のスペクトル範囲を表す画像の生成が完了するまで続く。これらの画像は空間の 2 つの次元と併せて 1 つのスタックに統合され、第 3 の次元がスペクトル次元である。第 2 の戦略は、標本から戻ってくる光の経路内の分散素子が基軸である。分散素子、例えばプリズム又はグレーチングが光のスペクトル成分を空間的に分離する。通過して検出器に至る光の特定の帯域を選定するために開口部が使用されるか、又は代替的に、後で C C D など 2 次元検出器の第 2 次元にわたり分散されることになる画像区域の薄いスライスを選定するために開口部が使用され得る。各画像の取得後に標本又は開口部を動かして、2 次元区域を表す画像のスタックを、第 3 のスペクトル次元と併せて徐々に構築することができる。スペクトル画像を取得するための第 3 の方法は、試料から検出器に至る光路内でサニャック干渉計又はマイケルソン干渉計を使用することである。任意の経路長で干渉計向けに取得される画像は事実上、2 次元インターフェログラムである。多数のインターフェログラムが様々な経路長で個別に取得され、これらは 3 次元配列へと統合された後、フーリエ変換される結果、空間の 2 次元と併せて画像スタックが生成され、強度値は第 3 次元における波長の関数としてマッピングされる。模範的なスペクトル画像捕捉方法については G a r i n i e t a l . 2 0 0 6 で論じられている。

【0066】

用語「ハイパースペクトル」及び「多重スペクトル」は重複する部分があり、取得によって達成されるスペクトル分解能の度合いによって区別される。原則として、用語「ハイ

10

20

30

40

50

パースペクトル」は可視範囲にわたり少なくとも20nmの分解能で連続的なスペクトルサンプリングを生成する様式を指す。多重スペクトル捕捉は、可視範囲にわたり不連続な2つから4つ程度のスペクトル帯の捕捉を指すと考えられる。

【0067】

一実施形態において、多重スペクトルデータ及び/又はハイパースペクトルデータは単一の組織深度又は複数の組織深度で収集される。複数の組織深度でデータを捕捉すると、組織の厚さを通過する捕捉と、軸方向の色収差(標本中の様々な深度で色が集束することになること)の軽減が確保される。あるいは、色収差を補正するために標本中の複数の深度での同時捕捉を可能にする、多焦点捕捉装置を採用してもよい(Garsha et al., 2011)。

10

【0068】

図5は、特定のFOVにわたりスペクトルデータを取得する一例を示す図である。AOIをカバーするFOVサンプリング格子の座標はデジタル注釈付けから判定され、これらの座標におけるスペクトルデータキューブの取得を自動化するために使用される。任意のFOVで複数の面から取得されたスペクトルデータは、シグナル層のスペクトルアンミキシング向けの入力を提供する3Dデータセットを提供する形で投影される。

【0069】

スペクトルデータの取得後、被分析物チャンネルがアンミキシングされる(デコンボリューション処理される)ことにより、標準化された照明条件及び露出条件下で捕捉されたときに各マーカーの染色強度を表す純粋な被分析物チャンネル画像が提供される。これを行うための模範的方法がLett et al., 2008、Garini et al., 2006、Garsha et al., 2013において開示されており、各々の内容が参照により本明細書に組み込まれる。対象の染色剤各々からシグナルを分離するプロセスは、未処理データの取得後、未処理データの記憶の前又は後、随時発生し得る。

20

【0070】

AOI内の各FOVは、AOIについて視野がさらなる分析向けにグループ化されるような形で(例えば画像データベース、又は専用ディレクトリ構造に)収集及び記憶される。理想的には、データを整理すると単一のAOIからの視野間の比較、共通の組織切片のAOI間の比較、ある組織切片からの全部又は一部のAOIと別の組織切片からの全部又は一部のAOIとの比較及びその他、研究者にとって有用な情報を提供し得る置換のため、視野のグループ化が可能となる。一実施形態において、前記多重スペクトルデータ及び/又は前記ハイパースペクトルデータは、患者、アッセイ、生検、切片、AOI位置及び/又はFOV位置に対するメタデータ特性と併せて、ネスト化されたデータ構造又はデータベースに自動記憶される。

30

【0071】

B. データセットの作成

次のステップは、データセットに含まれることになる個別のFOV又はAOI全体の選定である。本明細書において用語「データセット」は、異なる「データセット」との比較を目的にグループ化される、取得された複数の視野から成る1つの群を表す意味で使用される。これは1つの腫瘍区域からの視野を同一組織の正常区域からの視野と比較するか、又は1つの腫瘍からの複数の視野から成る1つの群を同じ患者からの異なる腫瘍からの複数の視野から成る1つの群と比較するか、又はある患者からの腫瘍からの複数の視野から成る1つの群を異なる患者からの腫瘍からの複数の視野から成る1つの群と比較するためのグループ化が関係し得る。別の例として、マイクロアレイのコア毎に取得された視野を相互に比較するためのグループ化、あるいは複製コアからの視野を複製コアから成る他の「データセット」と比較するためのグループ化が挙げられる。データ分析向けに視野をこのように柔軟にグループ化すると、マーカー発現の比較を腫瘍間、腫瘍内、患者間、患者内、処置群に応じた複数の患者、マイクロアレイのコア間、といった様々なレベルで行うことができる。

40

【0072】

50

取得された複数の視野のセットをこのようにグループ化することを可能にするには、取得データの整理が必要であり、これはO M E R Oサーバーなどリレーショナルデータベースによって円滑化され得る（A l l a n e t a l . , 2 0 1 2）。リレーショナルデータベースを使用すると、取得データを様々な形でグループ化して、腫瘍内、腫瘍間又は患者間での発現パターンの比較分析が可能となる。画像データベース技術へのインターフェース接続により、将来の開発に向けた拡張性、並びに多重モード画像データ、データマイニング、メタデータ、及び他の分析方法からのデータ向けの集中型リポジトリが可能となる。理想的には、データベース技術はn次元画像データ及び関連するメタデータ（画像座標、計器パラメータ、z面、各層の波長チャンネル、光学的構成設定、露出時間、照明レベル及びその他、F O Vなど関連する注釈付け）を含め、不均一なデータを記憶する能力を有する。データベースのデータモデルも、A O I、腫瘍、切片、患者など、比較のためのメタデータパラメータに基づくデータのリンク付けのグループ化を可能にするはずである。データベース及び関連するアクセス可能性層は、コンピュータネットワーク経由での大型データセットへの分散型アクセス、及び取得物からの大型画像データの効率的なアップロードを可能にするはずである。これら及びその他、n次元画像のデータベース化に望ましい特徴についてはA l l e n e t a l . (2 0 1 2)で論じられている。

【 0 0 7 3 】

図6は、自動化された多重モードスペクトルデータ取得をリレーショナルデータベース及び可視化ソフトウェア及び分析ソフトウェアと組み合わせた模範的实施形態を示す図である。遠隔データベースは高帯域ネットワーク経由で接続され、V A I Sソフトウェアはデータベースに遠隔アクセスし得るクライアントの役割を果たすことができる。このように、V A I S A n a l y s i sソフトウェアは、実験向けに取得済みの特定のデータセットをアップロード又は読み出すことができる。V A I Sソフトウェアは、実際のアップロードされた画像データに対する様々な関連メタデータパラメータのリンク付けを可能にするプロトコルを使用して、データベースと通信するよう構成設定される。そのようなメタデータパラメータの例として、特定のプロジェクト及び実験者の識別情報、並びに機密データへのアクセス制限に使用されるパスワード保護された認証情報が挙げられる。集中型リポジトリの使用により、大型で複雑なデータセットを効率的に記憶し、これに物理的所在地の異なる複数の研究者が遠隔アクセスすることができる。データベースインターフェースは、複数の波長、複数のz面、複数のF O V、複数のA O I、複数の組織切片、複数の生検、複数の患者など、多数の次元及びメタデータタグから成る非従来型のネスト化データの整理の複雑さをカプセル化する。これに対し、データはシーケンシング又は質量分析など直交研究からの関連データであってもよいが、そのようなデータを従来型のファイル形式及びディレクトリ構造を使用して整理しておくことは非効率的で厄介な作業となり得る。

【 0 0 7 4 】

さほど望ましくはないが、視野を柔軟にグループ化する能力は、強固なディレクトリ構造、並びに分析に含まれることになるファイル及び被分析物のリストを作成する専用ソフトウェアブラウザを手段として達成することもできる。実施例のV A I S A n a l y s i sソフトウェアは、データベースクライアント能力と、ディレクトリ構造に基づいてデータを整理する能力の双方を提供する。ディレクトリ構造に基づいてデータを整理する場合、ブラウザインターフェースは、共通グループ化されるファイル種別（例えばt i f f画像、又はテキスト画像層）を認識しなければならない。我々の実施例は、取得ディレクトリをブラウズし、データセットへの包含対象となるF O Vディレクトリ又は個別の画像ファイルを選定する能力を提供する。F O Vのセットは、統合されることになる様々な取得ディレクトリから選定することができる、関連するアンミキシングされた被分析物層は画像データディレクトリ内で認識され、またチェックボックスに基づいて、1つのデータセットにグループ化された任意のF O Vのセットについて見つかった被分析物層画像のリストに含まれ得る（又は含まれない）。ソフトウェアインターフェースはそれ自体、データセットを表す一連のリストを作成し、このリストには被分析物層別にグループ化された

、データセット内の各画像ファイルへのパスとしての関連情報が含まれる。これらのリストを使用して個別のファイルを開き、それら进行处理及び分析向けの単一のデータ構造へとメモリ内で統合することができる。

【 0 0 7 5 】

C . 特徴のセグメント化

データセット内のフィールド毎にアンミキシングされた染色剤チャンネルをさらに、任意選択で自動的にセグメント化して、形態学的特性（サイズ、形状）又は光度特性（シグナル強度範囲）に基づいて対象の特徴を選択することができる。特徴の自動選定により、強度範囲、サイズ及び形状の制約に基づいて構造を分析から除外することが可能となる。これは背景の染色及びノイズが分析に及ぼす影響を最小限に抑える上で役立つ。これらのセグメント化はデータセットの一部として持続し、また専用ビューア内でデータセットを開き、セグメント化パラメータを変更することにより、再セグメント化及び上書きすることができる。

【 0 0 7 6 】

図 7 は、一定の特徴が自動特徴選定に基づいて既に除外された、模範的画像を示す図である。特徴を識別及び選別するため、V A I S ソフトウェアはまず、構成設定として提供された指定の強度範囲内に該当するピクセルを識別する。次のステップで、ソフトウェアは強度ウィンドウ内の各ピクセルが強度ウィンドウ内の他のピクセルと接触しているか否かを識別する。あるピクセルが他のピクセルと接触している場合、これらのピクセルは複数のピクセル座標から成る 1 つのオブジェクトにグループ化される。オブジェクトの境界は、指定の強度ウィンドウの範囲外にピクセルが該当する点によって定義される。次に、ソフトウェアは各オブジェクト内のピクセル数を確認してピクセル区域を判定し、このピクセル区域を、設定において指定された区域サイズに対する限度と比較する。指定されたサイズ範囲よりも大きいオブジェクト又は小さいオブジェクトが識別され、これらはさらなる分析に含まれることになるオブジェクトのリストから除外される。これはサイズ及び強度の制約に基づく単純な例であるが、真円度又は長さなど形態学的制約が選定プロセスの一部として含まれることもあり得る。この種のセグメント化は、核など関連する解剖学的特徴、又は異なる細胞腫別の選定を自動化するための基礎を形成する。

【 0 0 7 7 】

図 8 は、特徴セグメント化パラメータを設定するための模範的ユーザーインターフェースを示す図である。この例では自動特徴選定のオン又はオフを切り替えるチェックボックス、また選択されたオブジェクト（緑色）及び除外されたオブジェクト（赤色）の概要が可視色で分かるチェックボックスもある。強度範囲を選定する場合、使用者は指定された上限よりも明るいピクセルを除外するアプローチか、又は指定された限度よりも明るいすべてのピクセル値を単純にリセットして限度値にするアプローチを選ぶことができる。使用される強度限度は可視化設定によって定義するか、又は標準化された強度閾値の使用によって限度を表示と異なるよう設定することができる。流域セグメント化を可能にする機能も用意されている。流域セグメント化は、接触している複数の構造を分離すると考えられるオブジェクトの細分化に使用され得る。例えば、複数の細胞が近接してパックされている場合、境界付近で目に見える強度変化が発生し得るが、細胞は接触していることから、単一のオブジェクトと見なされることになる。流域セグメント化は、複数の細胞をもっともらしい別々のオブジェクトに分割するために使用されるアルゴリズムである。インターフェースには、下流分析に含まれることになる特徴について、サイズ範囲の限度を設定する機能が用意されている。最後に、強度ウィンドウ内でピクセルが他のピクセルと接触しているか否かを判定するためのパラメータがある。4 箇所接続状態判定は単に、試験対象ピクセルの四方のいずれかが他の明るいピクセルと接触しているかどうかをチェックするのみである。8 箇所接続状態判定も同じく、試験対象ピクセルの角が他の明るいピクセルと接触しているかどうかをチェックする。

【 0 0 7 8 】

セグメント化された特徴は技術者によってさらに、分析対象となる特徴に目印を付ける

注釈付けツール付きの専用ビューアーを使用して編集することができる。例えば、技術者は視野内の腺区域内の細胞のみ含め、間質細胞は含めないことを希望し得る。あるいは、技術者は分析から除外されることになる区域を指定し得る。一例として、技術者は壊死区域を如何なる下流分析からも除外するよう指定することを希望し得る。その後、これらの注釈付け及びセグメント化はデータセットの一部として持続し、また他の技術者が適切な許可を得て専用ビューアーを使用してデータセットを開き、編集することができる。この実施化において使用されるV A I S A n a l y s i sソフトウェアは、この種の可視化及び注釈付けの能力を多重データ向けに提供するソフトウェアの一例である。

【0079】

図9は、セグメント化された特徴を手動で編集するための模範的ツールを示す図である。このツールは、ビューアー内の画像に領域を直接描画する能力を提供する。プール型(「and」、「or」、「not」)の選択により、描画された領域は、分析に明示的に含まれることになる区域、又は分析に明示的に含まれない区域を指定し得る。例えば「And」型のF O Vには、描画されたF O Vの内部にある区域及び既に包含対象として自動的にセグメント化された内部区域がすべて含まれることになる。言い換えれば、自動特徴選定に含まれないほど小さい特徴はやはり、分析から除外されることになる。「Not」型のF O Vは、指定されたF O V内の如何なる特徴も下流分析から除外することになる。「OR」型のF O Vには、指定されたF O V内の区域全体のほか、既に自動選定された区域のうちF O V外の区域も含まれることになり、この意味で、これは領域を分析対象として含めるための、自動セグメント化に優先するメカニズムである。F O Vは作成後、対象のF O Vを選定するドロップダウンリストの使用、続いてF O Vの頂点の編集又はリストからのF O Vの削除によって、削除又は編集することができる。F O Vを手動で指定することにより、技術者は対象区域内の自動特徴セグメント化を無効にして、関連する解剖学的領域を分析に含めるか、又は分析から除外することができる。F O Vは作成後でも編集又は削除することができる。状況に応じて異なる種類(「And」、「OR」、「NOT」)のF O Vを追加することができ、また異なる種類のF O Vをネスト化することができる。F O Vは「データセット」の説明における持続的要素となる。様々な分析要件について、後続の編集セッションにおいてデータセットを開き、F O Vの再検討及び編集を行うことができる。

【0080】

V I . クラスタ分析

細胞又は組織の試料中における不均一性を判定するため、任意選択でセグメント化されるデータセットにクラスタ分析が適用される。前述のデータセットオブジェクトは、分析に含まれる視野、分析に含まれる被分析物、及び各視野のうち含まれる区域(セグメント化された特徴及び注釈付け)に関する情報を包含する。

【0081】

図10は、クラスタ化分析を実施するための模範的ワークフローを示す図である。

分析向けデータセットは不均一性分析インターフェースにロードされ、F O V毎の各被分析物が画像「スタック」(3Dアレイ)にロードされる結果、x軸及びy軸が空間座標を表し、z軸は1つ又は複数の層を包含し、各層は別々の被分析物マップを表す。模範的な分析が図11で図示されている。使用者により設定されるパラメータは、z軸の層内のピクセルが中央値フィルタ処理されて任意の足跡区域にわたりシグナルを均一化するか、又は任意の足跡区域にわたりシグナルが平均化されるかを制御する。これらのパラメータは、クラスタアルゴリズムに入力される各「ピクセル」又は単位区域のサイズを決定付ける。例えば、細胞のサイズに合わせた領域が複数のグループへとクラスタ化されるよう、細胞のサイズとおおよそ同等の足跡にわたり、シグナルを均一化することが望ましい場合がある。各F O V画像スタックは、x軸又はy軸いずれかの端部に位置する従前の画像スタックに付加される結果、視野はタイル化され、A O I全体を表す大型のx, y, z画像となる。各被分析物の視野がロードされるにつれ、包含対象として既に選定済みのF O Vはそのまま残され、他の区域はゼロの値に設定される。

【0082】

非監視型、ノンパラメトリックのクラスタ化アルゴリズムが画像スタックに適用されることにより、発現パターンが同等である区域が「クラスタ」へとグループ化される。好ましくは、かなり大型のデータへのスケールアップが可能で、想定を最小限に抑えることができ、入力パラメータがなるべく少ないクラスタ化アルゴリズムが使用される。加えて、1から多数の被分析物までスケールアップ可能と予想され、連続的スケールの範囲に及ぶ単一又は複数の被分析物強度値を使用し、被分析物毎に値の分布形状が異なり得る、発現パターンを見出すクラスタ化アルゴリズムを有することが好ましい。

【0083】

一実施形態において、クラスタ化アルゴリズムはDBSCAN (Ester et al. 1996、参照により本明細書に組み込まれる)、親和性伝播 (Affinity Propagation) (Frey & Dueck, 2007、参照により本明細書に組み込まれる)、及び平均シフト (Mean-Shift) (Comaniciu & Meer, 2002 及び <http://efavdb.com/mean-shift/>、参照により本明細書に組み込まれる) から成る群から選択される。

【0084】

一実施形態において、多重マーカー発現の類似性についてのカットオフが、分布のカットオフを表すパラメータ (「帯域幅」という) を通じて指定される。帯域幅は結果におけるクラスタ数に影響を及ぼす。一実施形態において、使用する帯域幅を判定するために帯域幅推定器関数が適用され、帯域幅推定器関数が取る入力、サンプリング対象となるピクセルの数と、分位パラメータである。帯域幅推定器は画像から複数の領域のサンプリングを行い、サンプル及び分位 (0 から 1 の範囲で、0.5 はサンプル値間の一対差の中央値である) から帯域幅を判定する。これにより、クラスタのメンバー間において、より高い類似性を強制するか、又は比較的低い類似性を許容するよう、クラスタ化アルゴリズムを調整できるようになるが、「高い」及び「低い」類似性の閾値はサンプル自体から判定される。分位点を高めに設定すると、クラスタのメンバーについてより高い類似性を強制し、これは概してクラスタが増える結果となり、各クラスタにおいて類似性がより高いメンバーが少なくなる。

【0085】

クラスタ化アルゴリズムへの入力は、タイル化されたデータセット画像スタックであり、出力は x, y アレイであるが、x 座標及び y 座標は入力されたタイル化画像スタックの空間座標を表し、各 x y 位置での値は任意のピクセルが属するクラスタを示す標識である (クラスタ出力アレイ)。したがって、例えばクラスタ出力アレイにおいて、アルゴリズムによってセグメント化されたクラスタの数に応じて、値が「1」のピクセルはクラスタ 1 番に属し、値が「2」のピクセルはクラスタ 2 番に属する、といった形になる。

【0086】

クラスタ化アルゴリズムのクラスタ出力アレイは、各クラスタによって占有される区域の相対割合に関するヒストグラムの生成により、さらに詳しく分析することができる。ヒストグラムは、各クラスタに属するピクセル数を数え、x y タイル化アレイ内の総ピクセル数で割ることによって判定される。これにより、データセット内の区域全体に占める割合が分かり、これを棒グラフ化することにより、どのクラスタが最大かを示すことができる。

【0087】

クラスタマップは、クラスタ出力アレイ内の各クラスタに色を割り当て、コンピュータ画面に表示させることによって作成することもできる。このように、クラスタ「0」に付随するピクセルを白い区域として表示させ、クラスタ「1」に付随するピクセルは赤色、クラスタ「2」に付随するピクセルは黄色、といった形で表示させることができる。クラスタマップ、及び被分析物画像の配色オーバーレイを、専用画像ビューアの交互のウィンドウに配置して、様々なクラスタの空間領域を様々なマーカーの相対的発現レベルと比較することができる。クラスタマップは、解剖学的文脈で多重化されたバイオマーカーにつ

いて、発現又は活性化のパターンが同等の区域及び異なる区域を効果的に識別する。このように、発現又は活性化が異なる区域間の関係を容易に可視化することができる。

【 0 0 8 8 】

加えて、クラスタ出力アレイを使用して、タイル化された入力画像スタック上の区域をセグメント化し、クラスタ区域内の「ピクセル」（単位区域）毎に各被分析物の値を測定することができる。このように、任意のバイオマーカーにおける強度値（発現レベル又は活性化に比例する）の分布を、クラスタ単位で被分析物毎にボックスプロット（図 1 1）を使用してプロット化するか、あるいは各被分析物を表す列と、各ピクセル又は単位区域を表す行で構成されるスプレッドシートに記憶することができる。この能力により、発現に関する個別のクラスタにおけるバイオマーカーレベルの報告が可能となり、異なるクラスタ間での発現レベルの比較が容易になる。

10

【 0 0 8 9 】

V I I . シグナル伝達経路分析への適用

細胞は受容体を経て膜で化学シグナル及び環境シグナルを受容し、これらのシグナルはタンパク質リン酸化カスケードを経て中継される。このシグナル伝達は、刺激に対する応答として細胞挙動を変化させる形で遺伝機構を制御する。各経路は様々な生物学的結末に影響を及ぼし得る。これらのシグナル伝達経路の異常調節は、外部刺激がそれ以上必要でなくなる原因となり得、病理学的異常やがんの発達を引き起こし得る。したがって、腫瘍形成に関わるシグナル伝達経路を対象とする多数の標的化治療が開発され、臨床試験を経てきた（表 1 及び 2）。

20

【 0 0 9 0 】

【表 1】

P I 3 K阻害剤		M E K阻害剤	
薬剤	標的	薬剤	標的
BKM120	クラス I PI3K	トラメチニブ (GSK1120212)	MEK1/2
GS 1101	アイソフォーム特異的 (PI3K δ)	セルメチニブ (AZD6244)	MEK1/2
BAY 80 6946	クラス I PI3K	GDC 0973 (XL518)	MEK1/2
BEZ235	PI3K/mTORC1/2	BAY 86 9766	MEK1/2
GDC 0941	クラス I PI3K	ビマセルチブ (AS703026 / MSC1936369B)	MEK1/2
PF 04691502	PI3K/mTORC1/2	PD325901	MEK1/2
PF 05212384	PI3K/mTORC1/2	CI 1040	MEK1/2
PX 866	クラス I PI3K		
BYL719	アイソフォーム特異的 (PI3K α)		
GDC 0980	PI3K/mTORC1/2		
SAR245408 (XL147)	クラス I PI3K		
SAR245409 (XL765)	PI3K/mTORC1/2		
GSK2126458	PI3K/mTORC1/2		

30

40

表 1

【 0 0 9 1 】

【表 2】

試行	P I 3 K阻害剤	M E K阻害剤	患者集団
NCT01363232	BKM120	MEK162	進行性固形がん (TNBC、膵臓がん、CRC、悪性黒色腫、NSCLC及びその他、KRAS、BRAF及びNRAS突然変異を伴うがんを含む)
NCT01337765	BEZ235	MEK162	進行性固形がん (TNBC、膵臓がん、CRC、悪性黒色腫、NSCLC及びその他、KRAS、BRAF及びNRAS突然変異を伴うがんを含む)
NCT01390818	SAR245409	ピマセルチブ (MSC1936369B)	進行性固形がん (以下のいずれかを含む： (1) PTEN、BRAF、KRAS、NRAS、PI3KCA、ErbB1、ErbB2、MET、RET、cKIT、GNAQ、GNA11のうち1つ又は複数に変化していると診断されたがん、あるいは(2) 膵臓がん、甲状腺がん、結腸直腸がん、非小細胞肺癌がん、子宮内膜がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、又は黒色腫のいずれか)
NCT01347866	PF04691502 or PF05212384	PD0325901	KRAS又はBRAFの突然変異を実証する進行性がん及びKRAS突然変異の証拠があり、従前の全身治療計画が1つだけの、進行性CRC患者
NCT01155453	BKM120	トラメチニブ (GSK1120212)	進行性固形がん (RAS又はBRAFの突然変異による進行性NSCLC、卵巣がん、又は膵臓がんから成る拡張治療群を含む)
NCT01392521	BAY80 6946	BAY86 9766	進行性固形がん
NCT01449058	BYL719	MEK162	進行性CRC、食道がん、膵臓がん、NSCLC
			あるいはその他、RAS又はBRAFの突然変異が実証されている進行性固形がん
NCT00996892	GDC 0941	GDC0973	進行性固形がん
NCT01248858	GSK2126458	トラメチニブ (GSK1120212)	進行性固形がん

表 2

【 0 0 9 2 】

本明細書において開示される画像分析技法を使用して細胞試料 (腫瘍試料、細胞株、及び細胞塗抹標本など) を分析すると、クラスタとしてセグメント化される区域は一部のマーカーについて発現、リン酸化、又は活性化のレベルが顕著に異なる場合があり、これは本ツールが開発される以前は容易に定量又は伝達することができなかった。したがって、固体腫瘍組織及び細胞調製物におけるタンパク質の活性化又は修飾 (リン酸化などによる) 及び / 又は転写因子発現、局在化及び / 又は転座に関する多重化プローピングによって示されるとおり、不均一なパターンを分析することができる。この新規の能力は、次世代のコンパニオン診断の継続的開発、新たな治療剤の活性のメカニズムの理解、及び予後アッセイの開発に有用である。

【 0 0 9 3 】

一実施形態において、腫瘍中におけるシグナル伝達経路の活性化状態に応じて腫瘍を特徴付ける方法が開示され、該方法は本明細書において開示される細胞試料中での不均一性を検出及び記述する方法のうちいずれかに従って腫瘍試料の画像を分析するステップを含み、シグナル伝達経路に関連する複数の被分析物が検出可能マーカーで標識される。マーカーのうち少なくとも1つ (好ましくは複数のマーカー) は、シグナル伝達経路に関連する被分析物の特定の生理学的状態について特異的である被分析物結合体で標識される。したがって、例えば、抗ホスホ抗体を使用して、シグナル伝達経路に関係するリン酸化された形態のタンパク質を特異的に標識することができる。一部の実施形態において、リン酸化はタンパク質の活性化を意味する (S6リボソームタンパク質のリン酸化など)。他の例では、リン酸化はタンパク質の不活性化を意味する (C末端Srcキナーゼ (Csk) によるSrcチロシンキナーゼのリン酸化、又はAktによるグリコーゲン生成酵素キナーゼ3 (GSK-3) のリン酸化など)。さらなる模範的な一実施形態において、標識は

半導体蛍光ナノ粒子（量子ドットなど）であり、そこからのシグナルがハイパースペクトル検出を使用して検出される。

【 0 0 9 4 】

V I I I . 実施例

本明細書に記載の画像分析方法及びシステムを例示するため、6つの抗ホスホ抗体 - 量子ドット共役対が一団として多重化向けに開発した。これらはP I 3 Kシグナル伝達経路における5つのエフェクター成分（p A K T 4 7 3、p A K T 3 0 8、p P R A S 4 0、p S 6、p e I F 4 G）、及びP I 3 Kシグナル伝達とのクロストークに関係する経路であるM A P Kシグナル伝達経路における1つの出力エフェクター成分（p E R K）から成る。

【 0 0 9 5 】

A . 抗体及びバイオコンジュゲーション

表3は、本研究で使用したすべての一次抗体のリストである。一次抗体はすべて、C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g i e s（マサチューセッツ州ダンバーズ）から、B S Aアジド不使用製剤として購入した。

【 0 0 9 6 】

【表3】

マーカー/ 抗体	宿主種/ クローン	説明	ベンダー	分類番号
AKT pSer 473	ウサギ・モノクローナル	ヒトAKTのS e r r 4 7 3を 包囲する残基に相当する合成ホスホペプチド	Cell Signaling technology	4060
AKT pThr 308	ウサギ・モノクローナル	ヒトAKTのT h r 3 0 8を 包囲する残基に相当する合成ホスホペプチド	Cell signaling technology	4056S
pPRAS40	ウサギ・モノクローナル Clone C77D7	ヒトPRAS40のT h r 2 4 6を 包囲する残基に相当する合成ホスホペプチド	Cell signaling technology	2997
pS6	ウサギ・モノクローナル	ヒトリボソームタンパク質S6の S e r 2 3 5及びS e r 2 3 6を 包囲する残基に相当する合成ホスホペプチド	Cell signaling technology	4858
pEIF4G	ウサギ・ポリクローナル	ヒトe I F 4 GのS e r 1 1 0 8を 包囲する残基に相当する合成ホスホペプチド	Cell signaling technology	2441
pERK1/2	ウサギ・モノクローナル	p 4 4 / 4 2 M A Pキナーゼのシーケンスに 相当する合成ホスホペプチド	Cell signaling technology	4376

表3 評価されたチロシンキナーゼ経路標的及び関連する抗体のリスト

【 0 0 9 7 】

W O 2 0 0 8 - 0 6 3 3 7 8 A 2に記載のとおり、一次抗体のハプテンバイオコンジュゲートを開発し、活用した。抗ハプテン特異的な二次マウス・モノクローナル抗体は、V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c .（アリゾナ州トゥーソン）で開発された。量子ドットはT h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c（オレゴン州ユージーン）から購入した。抗ハプテン特異的なマウス・モノクローナル抗体 - 量子ドットコンジュゲートを、標準のバイオコンジュゲーション方法（G r e g T . H e r m a n s o n、B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s（バイオコンジュゲーション技法）、第2版、2008）を使用して製造し、記載のとおり使用した（米国特許第2008-0212866号）。特異的バイオコンジュゲート及び関連する量子ドット標識抗ハプテン抗体が下記の表4に列記されている。

【 0 0 9 8 】

【 表 4 】

一次抗体	一次抗体にバイオ コンジュゲートされたハプテン	関連する抗ハプテン：量子ドットコンジュゲート
Phospho-AKT Ser473	DIG	Anti-DIG:QUANTUM DOT565
Phospho-AKT Thr308	DNP	Anti-DNP:QUANTUM DOT655
Phospho-PRAS40 Thr246	NP	Anti-NP:QUANTUM DOT605
Phospho-S6 Ser235/236	BF	Anti-BF:QUANTUM DOT525
Phospho-eIF4G Ser1108	TS	Anti-TS:QUANTUM DOT585
Phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204	NCA	Anti-TS:QUANTUM DOT705

表4 一次抗体-ハプテンコンジュゲート及び関連する抗ハプテン-量子ドットコンジュゲート

【 0 0 9 9 】

以下の乳房マーカーをVentana Medical Systems, Inc. から購入し、製造者の推奨に従って使用した：CONFIRM抗エストロゲン受容体(ER)(SP1)(Cat#790-4324)、CONFIRM抗プロゲステロン受容体(PR)(1E2)(Cat#790-2223)、PATHWAY抗HER-2/neu(4B5)(Cat#790-2991)、CONFIRM抗Ki-67(30-9)(Cat#790-4286)及びINFORM HER2二重ISH DNAプローブカクテルアッセイ(VMSI Cat#780-4422)。PTEN D4.3をCell Signaling Technologies(マサチューセッツ州ダンバーズ)から購入した。

【 0 1 0 0 】

B. 細胞モデル及び腫瘍組織標本

乳がん細胞株モデルSKBR3及び前立腺癌細胞株モデルLNCaPを10%のFBSを補充したMcCoyの5A培地中で培養した。SKBR3細胞は、ATP競合性pan-AKTキナーゼ阻害剤GSK690693を低ナノモル濃度(250nM)で使用して24時間にわたり、抗体検証研究用に処理した。薬物処理後、切片化及びスライド調製のために、細胞を低温のIX PBSを使用して洗浄し、低温の10%中性緩衝ホルマリン中に固定し、パラフィン中に包埋した。

【 0 1 0 1 】

未処理の、又はPI3K阻害剤LY294002(SignalSlide(登録商標)Phospho-Akt(Ser473)IHC Controls; Cat#8101)で処理したパラフィン包埋LNCaP細胞のスライド調製物を、Cell Signaling Technologies(マサチューセッツ州ダンバーズ)から購入した。腫瘍標本はあらかじめ、Indivumed GmbH(ドイツ、ハンブルク(表5))又はOHSU Knight Diagnostic Laboratories(KDL)により調達されていた。

【 0 1 0 2 】

【表 5】

腫瘍標本	診断	腫瘍サイズ	虚血時間 (分)
1-CA	適度に区別された 腺管癌	4.5	16
2-CA	適度に区別された 腺管癌	2.5	13
3-CA	区別が不十分な腺管癌	2.7	15
4-CA	区別が不十分な腺管癌	3.3	10
5-CA	区別が不十分な腺管癌	3.5	6

表5 Indivumedがあらかじめ調達しておいた乳がん標本

【0103】

Indivumedの標本向けの低温虚血時間は16分以下であった。浸潤性腺管癌 (IDC) を生じたFFPE乳房腫瘍標本を遡及的に、OHSU Pathologyから調達した。Calu-3異種移植片を、Ventana Medical Systems, Inc. (アリゾナ州トゥーソン) にて調達した。Indivumed及びCalu-3の異種移植片標本をすべて、Chafin et al. 2013 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載の急速二温度固定法を使用して固定し、パラフィン中に包埋した。乳房腫瘍IDC試料をホルマリン中で固定、処理し、標準の臨床慣行を使用してパラフィン包埋した。1~2mmのコアリング装置を使用してパラフィンプロックの対象区域を穿孔し、再び包埋した。FFPE標本をすべて、スライド調製向けに厚さ4μmの連続切片として切断し、24~48μmの間隔の範囲内の1つの連続切片を、標準手順に従ってヘマトキシン・エオシン (H&E) で染色した。Calu-3異種移植片スライド (Fogh et al., 1977) をホスファターゼ緩衝液のみ、又はホスファターゼ (New England Bio Labs (マサチューセッツ州イプスウィッチ)) を添加して処理し、一次抗体のホスホ・エピトープ特異性の評価に使用した。

【0104】

C. 免疫プロット

SKBR3細胞からのタンパク質試料は、等容積のLaemmli試料緩衝液 (BioRad (カリフォルニア州ハーキュリーズ)) に0.5Mのジチオトレイトールを添加した100の溶液に細胞溶解物を5分間浸漬して変性させることによって調製した。SDS-PAGEによりタンパク質を分離し、ポリビニリデンジフルオリド膜へ移し、一次抗体でプロット処理し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ共役二次抗体を使用して検出した。ECL (Thermo Scientific) を使用して、タンパク質バンドを検出した。

【0105】

D. 細胞及び腫瘍試料の免疫標識

Benchmark XT自動染色装置 (Ventana Medical Systems (アリゾナ州トゥーソン)) を使用して一次ホスホ抗体染色を行い場合の最適なアッセイ条件を判定するため、FFPE標本のLnCaP、SKBR3及びCalu-3異種移植片に対して、DABベースの検出を使用する明視野IHCを実施した。ULTRA

V I E W U N I V E R S A L D A B 検出キット (V M S I C a t # 7 6 0 - 5 0 0) を使用した。必要な場合、O M N I M A P D A B 抗 R b 検出キット (V M S I C a t # 7 6 0 - 1 4 9) の O M N I M A P 抗 R b H R P 成分、又は抗ハプテン特異的 H R P 二次抗体コンジュゲートを、U L T R A V I E W D A B M u l t i m e r の代わりに使用した (例えば各々、非共役一次抗体又は抗ハプテン共役一次抗体を評価するため)。すべての H R P コンジュゲートを、3 7 にて 8 分間培養した。

【 0 1 0 6 】

F F P E 細胞及び腫瘍の標本におけるハプテン - 抗ハプテンの化学反応によるリンタンパク質染色を評価するため、B e n c h m a r k X T 自動染色装置 (V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s (アリゾナ州トゥーソン)) 上で S K B R 3 細胞及び腫瘍組織の F F P E 標本に対し、蛍光スペクトル画像処理向けの免疫染色を実施した。すべての F F P E 標本 (細胞モデル、異種移植片又は腫瘍組織) について、E Z P R E P 緩衝液 (V M S I C a t # 9 5 0 - 1 0 2) 中で自動パラフィン除去を施し、抗体培養前に 9 0 分間、C C 1 緩衝液 (V M S I C a t # 9 5 0 - 1 2 4) による細胞状態調節を行った。F F P E 標本を、単一の一次抗体又はハプテン共役一次抗体混合物 (p S 6 : B F 、 p A K T S 4 7 3 : D I G 、 p e I F 4 G : T S 、 p P R A S 4 0 : N P 、 p E R K 1 / 2 : N C A 、 p A K T T 3 0 8 : D N P 、それぞれ 5 、 1 5 、 2 0 、 2 0 、 3 0 、 1 2 . 5 μ g / m L) を使用して 3 7 にて 3 2 分間培養した。一次抗体培養ステップに続いて、試料を二次抗ハプテン抗体 Q D コンジュゲートの適切な組み合わせ (抗 B F : Q D 5 2 5 、抗 D I G : Q D 5 6 5 、抗 T S : Q D 5 8 5 、抗 N P : Q D 6 0 5 1 、抗 N C A : Q D 6 2 5 、抗 D N P : Q D 6 5 5 、それぞれ濃度は 4 0 、 5 0 、 5 0 、 7 0 、 4 0 、 3 0 n M) により、3 7 にて 3 2 分間培養した。抗体での自動染色に続いて、試料をエタノール系溶液中、次いでキシレン中で脱水し、C y t o s e a l 6 0 (T h e r m o S c i e n t i f i c) を使用して装着した。

【 0 1 0 7 】

E . 病理学者による腫瘍領域のスコアリング及び識別

患者からの腫瘍標本を、乳がんの機能的マーカーである E R 、 P R 、 H e r 2 、 K i - 6 7 、 P T E N については I H C により、I N D I V U M E D の腫瘍標本については H e r 2 D u a l I S H により、O H S U - I D C の標本については E R 、 P R 、 H e r 2 により染色した。機能的マーカーを V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c . から購入し、製造者の推奨に従って使用した。乳がんマーカーの I H C 染色のスコアリングは、委員会公認の病理学者により、標準慣行に従って行われた (W o l f f 2 0 0 7 、 H a m m o n d 、 2 0 1 0) 。委員会公認の病理学者は、H & E 染色された連続切片上の腫瘍領域を 2 4 ~ 4 8 m m 間隔で識別した。

【 0 1 0 8 】

F . 腫瘍標本の突然変異分析

腫瘍試料を、関連する遺伝子突然変異についてスクリーニングした。病理学者は、D N A 抽出向けに隔離された未染色の F F P E 切片から、腫瘍領域を識別した。F F P E 組織から導出された 2 0 n g の D N A を、突然変異分析向けの P C R によって、がんにおいて役割を果たすことが既知の 3 7 の遺伝子のコーディングエクソンをカバーするパネルを使用して増幅した。標的単位複製配列ライブラリを生成するため、特別製の I o n A M P L I S E Q (I o n T o r r e n t) 固体腫瘍パネル (B e a d l i n g 2 0 1 3) を使用した。単位複製配列ライブラリの調製及びシーケンシングについて詳しくは、S u p p l e m e n t a r y M e t h o d s : P r e p a r a t i o n o f a m p l i c o n l i b r a r i e s (補完的方法 : 単位複製配列ライブラリの調製) に説明されている。O H S U I D C の試料について、既に記述されているとおり (A n g 2 0 1 4) 、5 3 の遺伝子における 6 4 3 の点突然変異を包含する多重化 P C R 質量分析法ベースの技法を使用して、突然変異スクリーニングを実施した。シーケンシングによって検出された遺伝子突然変異が表 6 に列記されている。

【 0 1 0 9 】

【表 6】

標本	ゲノムプロファイル			乳房マーカー IHC / I SH 評価						
	ゲノム突然変異	エクソン	遺伝子型	ER (%陽性)	PR (%陽性)	HER2 (臨床) IHC	HER2 (臨床) ISH	Ki67 (40x) - ホットスポット	PTEN	注記
1-CA	PIK3CA	9	E545K	100	1	2+	増幅なし	8%	2+100%において	
2-CA	試験したものすべて		WT	100	100	1+	失敗	15	2+100%において	
3-CA	AKT1		E17K	100	100	0	増幅なし	80	2+100%において	
4-CA	試験したものすべて		WT	0	0	0	増幅なし	95	0 100%において	広範囲の梗塞 / TNBC
5-CA	PIK3CA TP53	20 7	H1047R R248W	0	0	3+	増幅あり	100	0 80%において ; 0-1 20%において	特に壊死区域周囲に PTEN 染色が存在

表 6 Indivumed の標本における PIK3CA ゲノム / 拡張乳房 IHC バイオマーカー プロファイル

【 0 1 1 0 】

G . 画像分析

画像処理戦略では、絶対照明レベルの変動が 1 % 未満の条件でサンプル面での照明流速量を反復可能な、閉ループ安定化金属ハロゲン化物アーク光源 (Exfo Exacte (Lumen Dynamics、カナダ、オンタリオ州、部品番号 P010-00201R)) を使用した。照明レベルは 1 % の増分での線形方式でも調節可能である。照明源は、屈折力測定システム (X-Cite Optical Power Meter and Sensor (Lumen Dynamics、カナダ、オンタリオ州、部品番号 P010-00245R)) を使用して、サンプル面での出力を絶対単位に対して校正するメカニズムを提供する。この校正装置を使用して、正確に 100mw の励起照明がデータ取得の都度、画像処理用の光学トレイン及びフィルタを介してサンプル面に到達することを確保するよう、光源内のマイクロプロセッサを校正した。

【 0 1 1 1 】

染色強度の変動がレポート分子濃度の変動に起因するものであることを確保するよう、我々は画像処理の視野が均等に照らされる状態を確保した。光源を顕微鏡に結合する前に、光源を均一化する役割を果たす液体光ガイドを介して、Exfo Exacte 光源を顕微鏡に結合する。結合後、視野照明は入射光励起向けに従来型のケーラー方式でセットアップされる。この構成設定は、スペクトル画像処理装置によって捕捉される領域にわたり、均等な視野照明を生み出すことが確認された。

【 0 1 1 2 】

画像処理システムは、Zeiss AxioImager M2 (Zeiss (ニューヨーク州ソーウッド、部品番号 4300049902)) スタンドに Zeiss - Marzhauser 自動ステージ (部品番号 4320249903) 及び自動 z 軸を装備したものが基軸であった。フィルタタレット (部品番号 424907)、カメラポート (部品番号 425504)、及び対物タレット (部品番号 424505) 及びチューブレズタレット (部品番号 4253029901)、これらはすべて、カスタムソフトウェア (VAIS Acquire) を通じた自動取得の実現に使用された自動化インターフェースを提供した。

【 0 1 1 3 】

解剖学的組織のプリスキャン画像処理向けに、高帯域伝送型照明を干渉フィルタ (Omega Optical (バーモント州バーリントン、部品番号 710DF20)) を介してフィルタ処理することにより、円周斜方暗視野照明戦略において、710nmの波長の照明が得られた。

【0114】

組織区域のプリスキャンを、EC Plan-Neofluar 10x/0.30NA対物レンズ (Zeiss (ニューヨーク州ソーヌウッド、部品番号 4203409901)) を使用して収集した。0.5倍のcマウントアダプタを、解剖学的プリスキャン画像処理向けのカメラポート設定で使用した (Zeiss (ニューヨーク州ソーヌウッド、部品番号 426112))。0.5倍のcマウントアダプタは、蛍光核対比染色剤を暗視野組織画像と組み合わせて使用する結果、2色の組織スキャン画像を迅速に収集し、2色のヘマトキシリン・エオシン (H&E) 画像と似た形で表示できるよう構成設定された、画像処理用ビーム分割装置 (Photometries Dual-View 2、Photometries (アリゾナ州トゥーソン)) の使用を可能にするための準備であった。この研究の場合、屈折率 (暗視野) 成分しか使用しなくても、H&E染色された連続切片で確認可能な組織病理学領域を認識する上で十分であると見なされた。組織区域のプリスキャンは、6.5ミクロンのピクセルを有するSony製ICX285マイクロレンズ付きチップをベースとするPhotometries CoolSNAP ES2という12ビットのモノクロームCCDカメラ (Photometries (アリゾナ州トゥーソン)) 上で捕捉され、閉ループは0 まで冷却可能であった。

【0115】

解剖学的組織の屈折率コントラスト画像を、医師による注釈付け向けにデジタル表示できるように生成した。多重化画像処理向けの腫瘍区域の選定を可能にするため、710nmの波長を中心とする20nmの帯域幅で伝送される暗視野照明を使用して、組織領域を画像処理した。この方法は、解剖学的組織全体を、周囲の包埋剤からの組織のわずかな屈折率差に基づいて対比することを可能にするが、蛍光体又は組織の自己蛍光に対する光傷害のリスクをもたらすわけではない。したがって、広い区域の迅速な取得向けに、高い照明レベルを使用し、露出時間を短く抑えることができる。

【0116】

多重化染色組織の屈折画像をデジタルビューア内で観察することにより、技術者は、バイオマーカーの検出及び定量するための高分解能でのスペクトル画像処理を使用して取得されることになる対象区域 (AOI) の所在特定及び注釈付けを行うことができた。これにより、屈折率画像を、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した同じ組織の連続切片と比較して、解剖学的病理学区域を確認することができた。

【0117】

スペクトル画像処理に使用したカメラは、6.5ミクロンピクセルのSony製ICX285モノクロームチップを非冷却実装することが基軸であった。スペクトル画像処理に使用したセンサーの評価及び特徴付けを行った結果、直線から1%未満の偏差で4096階調レベルにまでデジタル化された62dBのダイナミックレンジが得られた。干渉計捕捉向けの露出時間は約10msであったため、暗電流がノイズに及ぼす影響は、読み取りノイズと比べ、無視してよい程度であった。

【0118】

スペクトル蛍光画像処理用の励起/発光フィルタは以下のとおりであった: 380nmの中心波長及び50nmの励起用帯域幅 (Omega Optical (バーモント州バーリントン、部品番号 QMAX/EX355-405/25)); dichFOVcビーム分割装置 (反射帯域 410nm以下) (Omega Optical (バーモント州バーリントン、部品番号 XF2004/25.7*36)); 及び420nmでの深層遮断遷移機能付きロングパスフィルタ (Omega Optical (バーモント州バーリントン、部品番号 3001372))。

【0119】

10

20

30

40

50

蛍光スペクトル画像はすべて、Plan-Apochromat 20x/0.8 NA M27対物レンズ(Zeiss(ニューヨーク州ソーウッド、部品番号4206509901))を使用して捕捉された。スペクトル画像取得向けに、第2のカメラポート上で1倍のcマウントを使用した。色収差の影響を軽減するため、視野の深度が重複する3通りの位置でのzスタッキングを使用した。この慣行は、実用的条件下において検出スペクトルにまたがるレポーターの合焦画像の捕捉を可能にすると判定された。

【0120】

スペクトルデータ取得においては、文献(Malik, et al., 1996, Garini, et al., 2006)に記載の手順に従って、cマウント出力に結合したサニャック干渉計(Applied Spectral Imaging(イスラエル、ミグダル・ハエマク))を使用した。一連の経路長でインターフェログラムをデジタル化するため、スペクトル画像処理装置に一体化されたCCDカメラに、干渉計出力を結合する。

10

【0121】

未処理のスペクトルキューブに符号化された基準波長参照を提供するため、488ノッチフィルタ(Semrock, Inc.(ニューヨーク州ロチェスター))を、対象物と干渉計との間の無限遠空間内の検出経路に配置した。組織の自己蛍光は、スペクトルの青色範囲をカバーする広いピークを有し、このノッチフィルタは狭い局所最小値を、原データの組織自己蛍光成分へと符号化する。次いでこの局所最小値のスペクトルの特徴を分析ソフトウェア内で検出し、これを使用して、分析時にアンミキシングされることになる様々な発光成分について、参照スペクトルの配列を校正する。この符号化された校正の結果、干渉計の光学系における温度依存製の変動に起因する原データでの波長マッピングの如何なる小さい変化も軽減して、アンミキシングの精度が失われる潜在性を最小限に抑えることが確保された。

20

【0122】

プリスキャン及びスペクトルの自動取得ワークフローの構成設定及び調整のため、システムの自動化及び取得を行うカスタムソフトウェアを、Pythonで開発した(「Venetana Analytical Imaging System」(VAIS) ACQUIRE)。この取得ソフトウェアはPythonインターフェースを、顕微鏡、光源及びプリスキャンカメラ制御向けの低レベル計器制御ライブラリに活用した。ソフトウェアGUIのおかげで、関連する解剖学的病理学区域の双方型選定、対象の腫瘍区域にわたり構造化されたサンプリング密度の選定(50%)、z面の選定(1 μ m間隔の3つの面)が可能となった結果、同一の計器構成設定での取得の効率的な反復が可能となるよう、データを記憶及び再ロードすることができる。取得インターフェースは、複数のz面でのスペクトル取得など、複雑な取得方式の定義を可能にし、広い腫瘍区域のサンプリングを行う一連の領域にわたり繰り返すことができる。

30

【0123】

干渉計の基本的な制御及び低レベル構成設定は、ASIS Spectral Imagingというアプリケーション(Applied Spectral Imaging(イスラエル、ミグダル・ハエマク))を通じて実現した。高レベルの自動化は、ASISアプリケーションを間接的に経由してスペクトル画像処理装置を制御する、我々のカスタムインターフェースを通じて実現した。

40

【0124】

約100通りの波長で空間の2次元を表すスペクトル画像キューブへとインターフェログラムをフーリエ変換した後、400nmから800nmの間の波長の可視範囲にわたり、約100のサンプル点で波長画像を生成するよう、干渉計の設定を最適化した。

【0125】

蛍光スペクトル取得の場合、露出時間を、インターフェログラムの取得向けに1フレーム当たり8msに標準化し、この時間は、実験時に遭遇する最も明るい蛍光試料についてCCDウェル容量の4分の3以内のシグナルを提供するよう選定された。

50

【0126】

多次元の原データの専用処理と、測定、可視化、プロット化及びスプレッドシートのエクスポート向けの関連する特徴の抽出を可能にするため、カスタム分析ソフトウェア(「Ventana Analytical Imaging System」(VAIS) ANALYSIS)をPythonで開発した。重複する被分析物シグナルのアンミキシングを、蛍光シグナルの分解に一般的に使用される非拘束最小二乗適合法(Garini et al. 2006)を使用して実施した。

【0127】

データを(32倍に)拡大して収集し、格子内の各視野座標における高分解能のスペクトルデータを捕捉した。組織の厚さを通る捕捉と、軸方向の色収差(標本中の様々な深度で色が集束するようになること)の軽減を確保するため、z軸を通る複数のz位置で、各視野のデータを収集した。

10

【0128】

1つのAOI内の複数の個別の視野を収集し、ディレクトリ構造に記憶することにより、AOIの視野をさらなる分析向けにVAIS ANALYSISソフトウェアを使用してグループ化することができた。データ整理及びデータセット作成のインターフェースにより、視野を比較向けにグループ化することができた。

【0129】

標準化された条件下で捕捉されるとおりの各マーカーについて染色強度を表す、純粋な被分析物チャンネル画像を提供するため、多重化マーカーデータの取得後、ガラス、組織自己蛍光、及び各レポーター量子ドット(525、565、585、605、625、655)に対して参照スペクトルに照らして線形最小二乗アンミキシングを通じて被分析物チャンネルのアンミキシングを行った。アンミキシングアルゴリズムは、画像処理システムを通じて伝送及び反射される光の複数の帯域を混合する実験と、結果的な制御データに基づくアンミキシング操作の実施を通じて、正確な結果を生み出すと判定された。アンミキシングの実施はさらに、組織中の様々な細胞区画を標的とする複数のマーカーを確実にセグメント化するという点が注目された。このように、スペクトルアンミキシングの正確性を、結果的なアンミキシング後の被分析物画像におけるシグナルの空間的局在化の検査を通じて評価することができた。

20

【0130】

データセット内のフィールド毎にアンミキシングされた染色剤チャンネルをさらにセグメント化して、形態学的特性(サイズ)及び光度特性(シグナル強度範囲)に基づいて対象の特徴を選択した。これらのセグメント化はデータセット対象物の一部として持続し、またVAISビューアー内でデータセットを開き、セグメント化パラメータを変更した後、データセットを新たな名前で記憶することにより、再セグメント化することができる。

30

【0131】

自動的にセグメント化された特徴は技術者によってさらに、分析対象となる特徴に目印を付ける注釈付けツール付きのVAISビューアーを使用して検査及び編集された。このように、分析に含まれる区域又は分析から除外される区域を指定する実験が可能となった。一例として、研究者は壊死区域を如何なる下流分析からも除外するよう指定すると予想される。その後、これらの注釈付けは「データセット」の一部として持続し、また他の技術者が適切な許可を得て専用ビューアーを使用してデータセットを開き、編集することができる。

40

【0132】

データセットが不均一性分析インターフェースにロードされ、視野毎の各被分析物が画像「スタック」(3Dアレイ)にロードされる結果、x軸及びy軸が空間座標を表し、z軸の各層は別々の被分析物マップを表す。各視野の画像スタックは、x軸又はy軸いずれかの端部に位置する従前の画像スタックに付加される結果、視野はタイル化され、腫瘍区域を表す大型のx, y, z画像となる。各被分析物の視野がロードされるにつれ、各視野において包含対象として既に注釈付けされた区域はそのまま残され、他の区域はゼロの値

50

に設定された。

【0133】

パラメータは標準化され、ロードされた層内のピクセルが中央値フィルタ処理されて任意の足跡区域にわたりシグナルを均一化するか、又は任意の足跡区域にわたりシグナルが平均化されるかを制御する。この研究の場合、画像分解能は 8×8 ピクセルの足跡にわたり平均化するよう75%にまで低減され、中央値フィルタが半径2ピクセルの条件で適用された。これらのパラメータは、クラスタアルゴリズムに入力される各「スーパーピクセル」又は単位区域のサイズを決定付け、またノイズに起因する局所的なシグナル変動の影響を低減する役割を果たした。

【0134】

次は、発現パターンが同等である区域の「クラスタ」へのグループ化であった。細胞の発現及び活性化の不均一性分析向けに、我々は、 n 次元空間内で形成される、より高密度の「ポイントクラウド」の発見に繋がるアルゴリズムを選定し、各点は我々の被分析物について測定された6つの強度値によって形成されるベクトルを表す。平均シフト (Comaniciu & Meier, 2002) と呼ばれる、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムを実装した。平均シフトアルゴリズムを、我々の多重データセットにおける様々な発現パターンをセグメント化するために適応させた。多重マーカー発現の類似性についてのカットオフが、分布のカットオフを表すパラメータ (帯域幅) を通じて指定された。使用する帯域幅を判定するために帯域幅推定器関数 (Comaniciu & Meier, 2001、http://scikit-learn.org/stable/modules/generated/sklearn.cluster.estimate_bandwidth.html 及び https://github.com/scikit-learn/scikit-learn/blob/c957249/sklearn/cluster/mean_shift.py#L31) を使用した。帯域幅推定器が取る入力、サンプリング対象となるピクセルの数と、分位パラメータである。帯域幅推定器は画像から多数の領域のサンプリングを行い (この例では500個)、サンプル及び分位 (我々は0.75の分位を使用し、0.5はサンプル値間の対差の中央値である) から帯域幅を判定する。

【0135】

平均シフトクラスタ化アルゴリズムへの入力は、タイル化されたデータセット画像スタックであり、出力は x, y アレイであるが、 x 座標及び y 座標は入力されたタイル化画像スタックの空間座標を表し、各 x, y 位置での値は任意のピクセルが属するクラスタ番号を示す標識である。したがって、出力アレイにおいて、アルゴリズムによってセグメント化されたクラスタの数に応じて、値が「1」のピクセルはクラスタ1番に属し、値が「2」のピクセルはクラスタ2番に属する、といった形になる。

【0136】

「クラスタマップ」を、クラスタ出力アレイ内の各番号に色を割り当て、コンピュータ画面に表示させることによって作成した。このように、クラスタ「0」は白い区域として、クラスタ「1」に付随するピクセルは赤色、クラスタ「2」に付随するピクセルは黄色、といった形で表示され得る。クラスタマップ、及び被分析物画像の配色オーバーレイを、データ収集向けの光学的構成設定に従って専用画像ビューアの交互のウィンドウに配置して、様々なクラスタの空間領域を様々なマーカーの相対的発現レベルと比較することができる。クラスタマップは、解剖学的文脈で多重化されたバイオマーカーについて、発現又は活性化のパターンが同等の区域及び異なる区域を効果的に識別する。このように、発現又は活性化が異なる区域間の関係が容易に可視化される。

【0137】

クラスタ分析出力アレイを使用して、タイル化された入力画像スタック上の区域をセグメント化し、クラスタ区域内の「ピクセル」 (単位区域) 毎に各被分析物の値を測定した。このように、任意のバイオマーカーにおける強度値 (発現レベル又は活性化を反映する) の分布を、クラスタ単位の形での被分析物毎のボックスプロット、及び各ピクセル又は

10

20

30

40

50

単位区域を表す行を使用してプロット化した。

【0138】

H. バイオマーカー強度分析

染色された細胞及び腫瘍組織の試料におけるすべてのPI3K経路タンパク質のリン酸化レベルを、マーカー毎の染色強度寄与を表す、アンミキシングされたチャネルの強度を基に定量した。各画像の視野について、閾値ピクセルから平均強度を計算した（視野内の最も高輝度のシグナルの1%未満のピクセル値を除外して、関連性のないピクセル寄与を未染色区域から排除し、また最大強度の95パーセントを超えるピクセルを95パーセントの強度レベルに固定して、平均に対するホットピクセルからの疑似寄与を排除した）。各患者のホスホマーカーの総体的平均強度を、無作為に選択された複数の画像視野の複合平均を基に計算した。

10

【0139】

I. シグナル伝達経路の表現型クラスタ分析

平均シフトアルゴリズムは、機械視覚での対象物追跡及びカラー画像での対象物のセグメント化に、より全般的に応用される最頻値探索型アルゴリズムである。ここでは我々は、6つのマーカー間における発現パターンの類似性に基づいて区域をセグメント化するために、このアルゴリズムを使用した。このアルゴリズムを使用すると、ベクトル空間において発現パターンが同等のグループをセグメント化することができ、また不規則な形状の分布に寛容である。また、このアルゴリズムは、「異なる」クラスタがどのような状態でなければならないかについて離散的なカットオフポイントを想定する必要、又は想定上のクラスタ数をデータに強制する必要なく、機能する。

20

【0140】

Scikit-learnプロジェクト(Pedregosa et al., 2011)からのオブジェクトを使用してVAIS Analysisに実装された平均シフトクラスタ分析により、多重視野画像スタックを入力として扱うための補助コードと併せて、リンタンパク質マーカーの様々なクラスタ化パターンを特定した。平均シフトアルゴリズムへの入力は一連のベクトルであり、各ベクトルは、区域又は「スーパーピクセル」の標準化された格子単位について平均化された6つのマーカー値で構成される。スーパーピクセルは、単一のピクセルから多数のピクセルをカバーする区域へとサイズを調整することができ、また処理されるデータセット全体を含む視野にまたがって隣接する形でタイル化される。平均シフトアルゴリズムの帯域幅パラメータを、帯域幅推定器を使用して、分位の入力パラメータを0.75、サンプルサイズを500として推定した。もたらされた可視化の結果、単一の2次元画像としてタイル化された各視野の、色分けされたスーパーピクセルマップが表示された。区域全体において各クラスタが占有する相対的割合を示す、色分けされたヒストグラムが生成されるほか、クラスタ毎の各マーカーについて、スーパーピクセル値の分布も生成される。

30

【0141】

J. ネットワークシグナル伝達クラスタの階層型系統樹分析

生成されたホスホマーカー発現表現型間における類似性をランク付けするため、ユークリッド距離メトリックを採用する、ノンパラメトリックの階層型分析を使用した(Hastie, T. et al. The elements of statistical learning, 2 (統計学習の要素 2), Springer, 2009)。各表現型間でのベクトル差の計算により、ホスホマーカー発現表現型のあらゆる組み合わせ同士の距離を算出した。標準の凝集型、ボトムアップ、階層型の分析を使用して、最小ユークリッド距離によってネットワークシグナル伝達クラスタをランク付け及びグループ化し、系統樹形式でプロット化した。

40

【0142】

K. 結果

1. 多重化組織画像処理プラットフォーム(MTIP)機能の特徴付け

PI3Kシグナル伝達経路における5つのエフェクター成分(pAKT473、pAK

50

T308、pPRAS40、pS6、peIF4G)、並びにPI3Kシグナル伝達(ref)とのクロストークに関係する経路であるMAPKシグナル伝達経路における1つの出力エフェクター成分(pERK)から成る、6つの抗ホスホ抗体-QD共役対を一団として多重化向けに生成した(表4)。6つのハブテン化抗ホスホマーカー抗体すべての混合物を組織と一緒に培養し、続いて6つの抗ハブテン二次抗体-QDコンジュゲートの混合物と一緒に培養した(図14)。

【0143】

選択された抗体の特異性について、FFPE細胞及び異種移植片モデルシステムを使用する一連のIHC実験を使用して試験した(図14、15及び16)。抗ホスホマーカーハブテン共役型の一次機能性及び抗ハブテンモノクローナル二次機能性について、PI3K経路活性化に関する十分に確立された乳がんモデルであるSKBR3細胞株を使用して試験した(Englemen PNAS参照)。SKBR3細胞は未処理、又はAKT小分子阻害剤GSK690693で処理された。2つの細胞集団をFFPEブロックとして調製し、抗ホスホマーカー一次抗体を使用して染色し、続いて抗ハブテン二次抗体をHRPに共役させたもので染色して、DAB経路での対比を可能にした。これにより、ハブテン-抗ハブテン標識方式を検証することができた(図14; DABの染色パターンは、並行して実施された一次抗種二次染色(primary-anti-species secondary staining)と整合的であった)。

【0144】

LY294002で処理されたLnCap細胞に対する、単一の非結合型一次抗体を使用するのDAB IHCは、すべてのマーカーについて、広範な発現損失を実証した(図15: LnCap)。LY294002での処理後におけるPI3Kマーカー発現の予想された損失は、非結合型一次抗体の特異性を立証するものである。これらの一次抗体におけるホスホ特異性は後に、ホスファターゼ処理されたCalu-3異種移植片組織を使用して立証され、その際、すべてのホスホマーカー抗体について、ホスファターゼ処理された組織での染色が大幅に低減された(図15: Calu-3)。量子ドット共役型抗ハブテン抗体の機能性を、上記にて概説のSKBR3ブロックに対する免疫蛍光(IF)染色によって評価した。まず、一度に1つのホスホマーカーを使用してIF染色を実施し、続いてハイパースペクトル画像処理を行って、ホスホマーカーシグナルを自己蛍光背景シグナルから分離した(図14a)。このプロセスの結果、DAB染色からの結果と整合的な染色強度パターンが明らかとなった。これにより、我々の量子ドット共役型抗ハブテン二次試薬について予想された機能性が確認された。

【0145】

次いで複合型マーカーを使用して多重化実験を実施し、続いてハイパースペクトル画像処理を行って、マーカー毎のシグナル寄与を分離した(図14b)。付加的な比較向けに、SKBR3細胞溶解物に対し、6つのホスホ抗体すべてでの免疫プロットを行った(図14c)。結果は、マーカー毎のスペクトルアンミキシングされた画像のパターン及び発現が、2つの細胞集団におけるIF及び免疫プロットの結果と比べた場合に整合的であることを示すものである(図14d)。AKTマーカーはいずれも、予想された相対的な発現増加を示し、続いてGSK690693薬物処理が施された(Rhodes 2008)。pPRAS40、pERK、及びpS6は薬物処理後に発現低下を示したが、peIF4Gは発現の有意な変化を全く示さなかった。薬物処理後にMTIPを使用して検出されたホスホマーカー発現変化の、IF及び免疫プロット染色において観察された変化との類似性は、多重化アッセイの文脈で使用する共役型抗体の特異性及び機能性を立証するものである。

【0146】

2. MTIPによるタンパク質のプロファイリング及び再現性

MTIPの性能について、FFPE乳がん患者腫瘍試料を、患者5の標的シーケンシング(表5及び表6)を介して確認されたPIK3Caにおける既知のH1047R突然変異で染色することによって試験した(図17a)。図17aの各パネルに、病理学者が

10

20

30

40

50

目印を付けた腫瘍領域にまたがって無作為に選定されたF O Vにわたり平均化された6つのホスホマーカーすべての染色パターンが記載されている。同じF O Vからのホスホマーカーのスペクトルアンミキシングされた画像は腫瘍領域内での不均一な染色パターンを示し、これはマーカー毎に予想された生物学的発現パターンを反映するものである。これらのデータは、発現における幅広いダイナミックレンジにわたり多重化されたホスホマーカーシグナル伝達を、無傷のF F P E 固体腫瘍組織において細胞より小さい空間分解能で検出するM T I Pの能力を実証するものである。

【 0 1 4 7 】

M T I P 性能の再現性は、患者5の試料を使用して立証された(図17D)。アッセイを3日連続で3回ずつ繰り返し(n = 合計9回)、各マーカーの発現レベルを、隣接する連続切片中の均一なR O Iにおいて画像処理された組織区域にわたる平均値として測定した。M T I Pは、各ホスホマーカー毎に80%という狭いマージンの範囲内で変動する染色レベル測定結果を提供する。すべてのマーカー間における変動係数は8パーセントから13.8パーセントの範囲で変動し(図17Dの左図の白いバー)、これは試験所で開発された生化学試験向けの全米病理学会(C A P)のガイドラインと整合的な、アッセイプラットフォームにおける再現性レベルを意味する。

【 0 1 4 8 】

3. M T I Pによる、P I 3 K経路突然変異を生じた乳房腫瘍でのタンパク質プロファイリング

M T I Pを使用しての定量的ホスホ発現プロファイリングを、標的シーケンシングを通じて判定されたとおり、P I 3 K経路によく見られるゲノム異常を表す乳がんコホートにおいて実施した。これらの試料からの連続切片も同じく、E R、P R、K i 6 7、H e r 2及びP T E Nを含む乳がんマーカーを使用してI H Cを介して染色し、これをゲノム状態だけから明らかになるとは限らないP I 3 K活性化に対する他の寄与因子に関する理解を向上すべく、病理学者にスコアリングしてもらった(表6)。M T I Pは、個々の腫瘍が複雑なP I 3 K経路のホスホ発現パターンを有することを明らかにした(個別のR O Iは図18a、平均R O Iは図18b)。第2に、M T I Pは、患者間における有意な、ホスホ発現の不均一性を明らかにした。M T I Pは、P I 3 K経路のホスホ活性化が必ずしもP I K 3 c aの突然変異状態だけから予測できるわけではないことを明らかにした(図18c)。例えば、患者1はP I K 3 C aにE 5 4 5 K突然変異を抱えていたが、高レベルのP I 3 K経路活性化を示したわけではない。この標本は、低いP I 3 K活性化を補助するP T E N+でもあった。あるいは、患者5の標本はP I K 3 c aにH 1 0 4 7 R突然変異を維持していたほか、高いH e r 2発現及びP T E N陰性も示し(図18c)、これは付加的なインプットがP I 3 K経路活性化に関わることを示唆する。これらのデータは、M T I Pを使用しての多重化ホスホ発現プロファイリングが、腫瘍形成に関する、より包括的な分析を生成する上で、伝統的なI H Cバイオマーカー評価及び遺伝子型情報を補完し得ることを意味する。

【 0 1 4 9 】

4. M T I Pによる、乳房腫瘍におけるタンパク質不均一性のマッピング

コンピュータ処理によるパターン認識を使用して、発現パターンが同等の区域を表現型群又は「発現クラスタ」へとセグメント化した。平均シフトクラスタ分析を使用して、固有のリン酸化パターンを識別した(図11)。表現型を、6つのマーカーにまたがって相対的なリンタンパク質発現のパターンが似ている腫瘍の領域として定義し、各クラスタに属する2次元の腫瘍区域を色分けして、捕捉された腫瘍視野内に存在する、認識された表現型を表すようにした(n = 8)(図19a)。各表現型クラスタを、腫瘍の空間的広がりにもまたがって色分けし(図19b)、(面積が)最も大きい3つの表現型クラスタ内のホスホマーカー毎に測定されて発現レベルの分布をプロット化した(図19c)。表現型の階層型クラスタ化がヒートマップに示され、系統樹形式でランク付けされている(図19d)。4つの腫瘍例について色分けされた表現型マップを検証すると、いくつかの所感に繋がる。まず、複数の固有のP I 3 K経路リン酸化表現型が、複数の個別の腫瘍にまた

がって不均一な空間分布で存在する。各患者は、同じ腫瘍組織内に、特徴的なシグナル伝達経路リン酸化表現型を複数有する。患者3は対象のすべての領域で認識される同じ表現型を有する一方、患者4は捕捉された領域のサブセットに固有の表現型をいくつか有する。腫瘍内及び腫瘍間において、pERK及びpAKT308の比率の顕著な変動性が明らかであり、またpAKT473、pRAS40、pS6のパターンは患者間で有意な差があると見られる。階層型分析の結果、予想されたPI3K経路リン酸化表現型は、マーカー毎のホスホ発現プロファイリングによって表されるような、認識された遺伝子型（野生型、AKT1又はPIK3CA突然変異）との相関関係はあまりないことが分かった（図18b及び図18c及び図19c）。すべての腫瘍において、間質組織は、6つのPI3Kネットワーク成分すべてにおける低めのホスホ活性化レベルによって、上皮組織からセグメント化される（灰色のクラスター、図19a、図19b、図19c）。注目すると興味深いのは、小さい細胞集団に限り出現した表現型の存在である（図19b、5-CA3、3-CA1、及び2-CA1）。そうしたデータは、これらの特定の異常な上皮のサブタイプについて、さらなる特徴付けが必要であることを意味する。したがって、MTIPクラスタ分析は異なるホスホ活性化表現型に関する定量的データを提供し、この情報は、組織材料を均一化する、又はより広い区域にわたり平均化する、直交的方法では失われてしまう。

【0150】

同一のPI3K経路突然変異を生じた標本の不均一性をさらに理解するため、ホスホシグナル伝達ネットワークの不均一性を、PIK3Ca WT又はPIK3Ca E545K（PI3K経路シグナル伝達を活性化することが既に示されている（Zardavas et al. 2014））のいずれかに該当する浸潤性腺管癌（IDC）の領域が十分に定義されている乳房病変標本において評価した（図20）。クラスタ分析からの結果を、従前の患者コホートに関して、ゲノム状態と比較した（図20c～図20e）。希な表現型の小さいクラスターが、より大きい、異なる表現型を含有する領域内に存在していた（図20a及び図20b、図19a及び図19b）。異なる表現型の分布は患者によって差があった一方、表現型の大多数は、比例的に規模が大きくなるpERK+pAKT T308の特性から成り、pAKT308のシグナルレベルはすべてのクラスターにおいてpERKのレベルより高かった（図20d）。階層型分析では、図19での分析と似た、間質組織領域の表現型グループ化を示した一方、これらの腫瘍は、対応する遺伝子型を有するホスホ表現型（野生型又はE545K突然変異）の間における明確な関係を示さなかった。

【0151】

これらの実施例において、遺伝子型情報だけでは、リンタンパク質活性化レベルを予測するには不十分と見られる。これらの結果は、既存のゲノム情報及びIHCバイオマーカー情報を補完するホスホプロテオーム情報をMTIPが提供する潜在性を強調するものである。

【0152】

図21は、本発明の画像処理方法の一実施例を示す図である。多重スペクトル画像100がx-y面に提供される。多重スペクトル画像100は、画像スタック102を提供するよう、アンミキシング操作によってアンミキシングされる。

【0153】

本明細書において検討される実施例では、多重スペクトル画像100のチャンネル数nが5であることから、アンミキシング操作により、n=5の層、L1、L2、L3、L4、L5が多数提供され、各層をそれぞれ単一チャンネル画像として表示させることができる。したがって、本明細書において検討される実施例では、画像スタック102はn=5の単一チャンネル画像104、106、108、110及び112を多数含む。アンミキシング操作から生成される画像スタック102はn+2次元の空間を創出し、この空間で各ポイント P_i がx-y面での空間座標、すなわち x_i 、 y_i 、及び位置 x_i 、 y_i におけるn個の単一チャンネル画像での各々の強度値によって与えられる。例えば、ポイント P_i につ

いての $L1$ 面上での強度値、及び結果的なポイント P_i の $n+2$ 次元空間における第3の座標の値は $I_i(L1)$ 、すなわち位置 x_i, y_i における層 $L1$ 上での強度値である。同様に、ポイント P_i のさらなる座標値は $I_i(L2)$ 、 $I_i(L3)$ 、 $I_i(L4)$ 、及び $I_i(L5)$ によって与えられる。言い換えれば、

ポイント $P_i = (x_i, y_i, I_i(L2), I_i(L3), I_i(L4), I_i(L5))$ である。

【0154】

次いで、非監視型、ノンパラメトリック、密度ベースのクラスタ化アルゴリズム、例えば平均シフトクラスタ化アルゴリズムを適用する画像スタック102により、 $n+2$ 次元の空間内のポイントをクラスタ化するための、クラスタ化操作を実施する。本明細書において検討される実施例では、これにより多数のクラスタが提供され、それらのうち2つが例示目的で図21に記載されており、すなわちクラスタC1及びC2である。クラスタ化アルゴリズムによって識別済みのクラスタは各々、 $n+2$ 次元の空間において比較的近接する画像スタック102のポイントを多数含有し、適切な距離尺度、例えばユークリッド距離尺度を適用して、 $n+2$ 次元の空間における2つのポイント P_i と P_j との間の距離を測定する。

【0155】

例えば、多重スペクトル画像100の取得元である細胞試料の不均一性は、クラスタ化アルゴリズムによって識別される異なるクラスタの数で表すことができる。クラスタ化の結果は、使用者が単一チャネル画像104～112のうち1つ、例えば表示装置117に表示される単一チャネル画像108を選択したことの入力などによって、可視化することができる。 $x-y$ 面におけるクラスタC1及びC2の境界設定114、116は、クラスタC1及びC2を $x-y$ 空間に投影することにより、単一チャネル画像108上のオーバーレイとして表示される。 $x-y$ 空間における結果的な境界設定は、例えばクラスタC1の境界設定114及びクラスタC2の境界設定116として、表示装置117に表示される。

【0156】

さらなる一実施形態によれば、使用者は単一チャネル画像104～112から複数の画像を選択することにより、これら複数の単一チャネル画像を表示装置に同時に表示させることができる。境界設定114及び116は、表示される単一チャネル画像の一部又は全部に表示され得る。

【0157】

本発明の実施形態は、ヒトの目にはっきり見えないクラスタがヒトの想像から隠される $n+2$ 次元の空間へと拡大するにつれ、 $n+2$ 次元の空間でのクラスタ化及びその後における $x-y$ 面でのクラスタ画像処理によって明らかになってくることから、特に有利である。言い換えれば、本発明の実施形態は、細胞試料における不均一性に関する極めて重要な情報を提供する画像スタックの複数の層にまたがって形成される画像スタック102でのクラスタの存在の検出を可能にする。そのようなクラスタの検出、例えばクラスタ数及び/又はクラスタの位置の検出は、疾患の状態に関する結論、特に薬物投与の是非に関する結論を引き出す根拠となる、重要な情報を示すものである。例えば、クラスタ数が閾値に満たず、低い度合いの不均一性を示す場合、これは化学療法を施す必要がないことを示唆し得る。さらに、クラスタの位置の検出及び画像処理は、手術計画のための重要な情報源となり得る。

【0158】

本発明の一実施形態によれば、画像スタック102に含まれるポイントは、これらのポイントのビンニングによってローパスフィルタ処理される。例えば、これは $x-y$ 面内で動かされる 2×2 の正方形など、 $p \times p$ の正方形を使用して実装され得る。 $p \times p$ の正方形の各位置において、その正方形内のポイントの平均強度値は次元毎に計算され、各次元の単一平均強度値は正方形のその位置について出力され、その後、正方形は次のタイルへと動かされる。画像スタック102の全体をこのように処理すると、ポイントの数が $p \times p$

分の1に経る結果となる。ポイント数が減ると、クラスタ化アルゴリズムに必要な実行時間が短縮され、またノイズを除去するローパスフィルタ処理により、クラスタ化の安定性が高まる。クラスタ化の結果、すなわち境界設定114及び116は、次いで最大分解能の画像、例えば図21に記載の単一チャンネル画像108に重ね合わされる。

【0159】

5. 論考

MTIP技術は、がん細胞モデル及び臨床乳がん組織における多重化リンタンパク質発現を捕捉及び測定することができる。我々は、乳がん標本における表現型の識別及びシグナル伝達経路の不均一性の定量を、強固な機械学習パターン認識アルゴリズムを使用して行うための、実用的アプローチを提示する。我々は、特徴付けられた腫瘍試料における細胞表現型に関連する情報を提供するMTIP技術の能力を実証し、この情報は、直交的アプローチによって現在のバイオマーカーを使用してアクセスすることが不可能であるため、既存のバイオマーカー及びゲノムの情報を補うものである。

【0160】

PI3K経路は、PIK3Caにおけるゲノム突然変異（すべての乳がん8～10の約30%に認められる）、PTEN発現損失（例えばPTEN欠損又は後成的サイレンシングを介した損失）及び受容体チロシンキナーゼ（RTK）増幅（例えばHer2過剰発現）を含む、様々なメカニズムを経て活性化され得る。PI3K経路の異常なリン酸化状態は、PI3K経路活性化の結果であり、PI3K経路変更の根本原因は無関係である。我々の実験は、PI3K経路活性化が多様なインプットに由来し得、これは罹患した組織におけるホスホ活性化表現型の予測を遺伝子型決定の使用だけで容易に行えるものではないことを意味する、という事実を強調するものであり、したがってMTIPを使用してPI3K経路マーカーのリン酸化状態を評価すれば、既存の診断ツールを補うことができる。

【0161】

不均一性分析及び表現型クラスタ化を通じ、上記は、従来型の生化学分析を使用すると失われてしまうと予想される、小さいながらも潜在的に重要な表現型群を解決する能力を実証するものである。結果は、表現型の不均一性を背景とするネットワークシグナル伝達経路活性化のプロテオーム定量におけるMTIPの性能及び関連性を強調するものである。MTIP分析から導き出されるホスホ発現プロファイルは、ゲノム情報及び他のバイオマーカー情報と相互に関連付けるか、又は比較することができる。PI3Kシグナル伝達の文脈において、PI3K経路を標的とする様々な単一の薬剤の開発が進められており、また様々な臨床開発段階にある（Hassan et al. 2013; Fruman and Rommel Nat. Rev. Drug Discov. 2014）。上記の結果は、PI3K経路活性化の阻害に向けた個別治療の決定に影響を及ぼし得る患者特異的なホスホ発現特性を、MTIPが識別し得ることを意味する。しかし、成功する標的療法の将来は、様々な組み合わせでの経路特異的な阻害剤の使用が頼りとなり得る（All-Lazikani Nature Biotech 2012; Bozik et al. 2013）。多重経路ホスホ発現プロファイル（例えば本書に記載のPI3K及びMAPK）を背景に、MTIPは、患者単位の併用療法の使用に文脈を持たせ得る、ホスホプロテオームデータを提供し得る。

本願発明の実施形態は、例えば、以下の各発明を含むが、これに限定されない。

[発明1]

検出可能マーカーで標識された1つ又は複数の被分析物を含む、細胞試料における不均一性を特徴付ける方法であって、様々な発現パターンの複数のクラスタを含むクラスタマップを作成するために、前記細胞試料の画像から得られるデータセットに対してクラスタ分析を適用するようプログラムされたコンピュータプロセッサを含むコンピュータ装置上で前記細胞試料の画像を分析するステップを含み、

(a) 前記データセットは前記細胞試料の画像の少なくとも一部について1つの画像スタックを含み、前記画像スタックはx軸、y軸及びz軸を含み、前記x軸及び前記y軸は画像の部分内の空間座標を表し、前記z軸はいくつかのn個の層を含み、前記z軸の各層は

10

20

30

40

50

単一の検出可能マーカーについての複数の x, y 座標での強度データを含み、
 (b) 前記クラスタ分析は、非監視型、ノンパラメトリック、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムを画像スタックに適用するステップを含み、前記クラスタ化アルゴリズムは少なくとも $n + 2$ 次元の空間において前記データセットによって定義されるポイント (P_i, P_j) をクラスタ化し、前記空間で各ポイントは x, y 座標及び画像スタック内の各々の x, y 座標における n 個の層からの n 個の強度データ値によって与えられることにより、前記複数のクラスタを生成し、
 (c) 出力データの出力は前記クラスタ分析の結果を表し、前記データは前記細胞試料における不均一性を示すものである
 方法。

10

[発明 2]

前記画像が多重チャネル画像であり、前記多重チャネル画像のアンミキシングによって前記 n 個の層が得られる発明 1 に記載の方法。

[発明 3]

前記多重チャネル画像及び / 又は 1 つ又は複数の単一チャネル画像を表示することによってデータの出力が実施され、単一チャネル画像が、前記多重チャネル画像及び / 又は少なくとも 1 つの単一チャネル画像内のクラスタの境界設定を可視化することによって、 n 個の層のうち 1 つの表示により与えられる発明 1 又は 2 に記載の方法。

[発明 4]

前記データセット内でクラスタ毎の比例的区域を表示するクラスタヒストグラムを生成するステップをさらに含み、前記クラスタヒストグラムがステップ c で出力されるデータである発明 1、2 又は 3 に記載の方法。

20

[発明 5]

前記画像スタックをローパスフィルタ処理しビニングされた画像スタックを提供するための x, y 分解能を低減するために $n + 2$ 次元の空間のポイントをビニングするステップをさらに含み、ステップ b での前記クラスタ分析が前記ビニングされた画像スタック上で実施される前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 6]

細胞試料の少なくとも 1 つの対象区域 (AOI) 内の少なくとも 1 つの視野 (FOV) に画像の一部が該当する前記発明のいずれか一項に記載の方法。

30

[発明 7]

前記出力データが前記クラスタ分析の結果におけるクラスタ数を示すデータを含む前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 8]

前記密度ベースのクラスタ化アルゴリズムが平均シフトクラスタ化アルゴリズムであり、前記平均シフトクラスタ化アルゴリズムへの入力が画像スタックであり、前記平均シフトアルゴリズムの出力が x, y アレイであり、 x 座標及び y 座標が入力された画像スタックの空間座標であり、各 x, y 座標での値が任意の x, y 座標が属するクラスタ番号を示す標識である前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 9]

40

組織試料の画像が医師による注釈付け向けにデジタル表示され得る解剖学的組織の屈折率コントラスト画像であり、解剖学的組織に基づいて AOI が選定される前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 10]

前記データセットが、
 (a1) 前記画像内の複数の AOI 各々について FOV サンプリング格子を計算するステップと、
 (a2) 各 FOV 内の単一又は複数の z 面にて多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータを自動的に収集するステップと、
 (a3) 検出可能マーカーシグナルを多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトル

50

ルデータからコンピュータ処理によりセグメント化するステップと、
(a4) 前記クラスタ分析において1つのグループとして比較されることになるF O Vを選択してデータセット構造に入れ込むステップと、
(a5) 形態学的特徴の自動セグメント化を前記データセット内の各F O Vの各検出可能マーカーシグナルに適用するステップと
を含む方法によって得られる前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 1 1]

前記F O Vサンプリング格子がA O Iにまたがり規則的な間隔で配置された複数のF O Vを含む発明 1 0に記載の方法。

[発明 1 2]

各F O Vのz面からの前記多重スペクトルデータ及び/又は前記ハイパースペクトルデータが、患者、アッセイ、生検、切片、A O I位置及び/又はF O V位置に対するメタデータ特性と併せて、ネスト化されたデータ構造又はデータベースに自動記憶される発明 1 0に記載の方法。

[発明 1 3]

(a4a) 1つのグループとしての比較対象として選択される前記F O Vが同一組織切片中の別々の腫瘍病巣に相当するか、又は
(a4b) 前記F O Vが同一患者から採取された別の生検材料と比較するために同一患者から採取された生検材料に基づいてグループ化されるか、又は
(a4c) F O Vが腫瘍部位に基づいてグループ化されるか、又は
(a4d) F O Vが患者に基づいて別の患者と比較するためにグループ化されるか、又は
(a4e) F O Vが腫瘍遺伝子型に基づいてグループ化される
発明 1 0に記載の方法。

[発明 1 4]

特徴のセグメント化がサイズの制約、強度の制約、又はサイズの制約と強度の制約との組み合わせに基づく発明 1 0に記載の方法。

[発明 1 5]

前記データセットを取得する方法が、
(a6) 1つ又は複数のF O Vにおいて、前記クラスタ分析に含めるか、又は前記クラスタ分析から除外する領域を手作業で指定するステップ
をさらに含む発明 1 0から14のいずれか一項に記載の方法。

[発明 1 6]

前記検出可能マーカーが、共局在化され、定量可能な場合、スペクトル又は他の物理的特徴に基づいて他のマーカー及び組織から分離されるシグナルを生成する前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 1 7]

前記検出可能マーカーが抗体に付加される発明 1 6に記載の方法。

[発明 1 8]

前記検出可能標識が少なくとも1つのリン酸化タンパク質に対して特異的に結合する少なくとも1つの抗体に付加される前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 1 9]

前記少なくとも1つのリン酸化タンパク質がP I - 3キナーゼシグナル伝達経路又はMAPキナーゼシグナル伝達経路のメンバーである前記発明のいずれか一項に記載の方法。

[発明 2 0]

前記少なくとも1つのリン酸化タンパク質がA K T、P R A S 4 0、S 6、E I F 4 G及びE R K 1 / 2から成る群から選択される発明 1 9に記載の方法。

[発明 2 1]

前記組織が二温度固定法を使用して固定された発明 1 8から20のいずれか一項に記載の方法。

[発明 2 2]

腫瘍中におけるシグナル伝達経路の生理学的状態に応じて前記腫瘍を特徴付ける方法であって、前記発明のいずれか一項に記載の方法に従って前記腫瘍の試料の画像を分析するステップを含み、

複数の被分析物が前記検出可能マーカーで標識され、

前記検出可能マーカーで標識される前記被分析物のうち少なくとも1つがリン酸化シグナル伝達タンパク質であり、

前記画像の各F O V内の単一又は複数のz面にて、ハイパースペクトル又は多重スペクトルのデータが収集される

方法。

[発明 2 3]

細胞試料における不均一性を自動的に識別するシステムであって、

(a) 分析用画像処理分析システムを含み、前記分析用画像処理分析システムは、プロセッサと、

前記プロセッサに結合され、前記プロセッサによって実行されたとき前記発明のいずれか一項に記載の方法を含む操作を前記プロセッサに実施させるコンピュータ実行可能な命令を記憶するメモリと

を含む、システム。

[発明 2 4]

(b) 前記細胞試料のデジタル化画像並びに前記細胞試料からの多重スペクトルデータ及び/又はハイパースペクトルデータを捕捉するよう、また前記デジタル化画像を分析用画像処理分析システムへ伝達するように適合された、分析用画像処理ハードウェアシステム

をさらに含む発明 2 3 に記載のシステム。

[発明 2 5]

対象の1つ又は複数の被分析物が検出可能標識で標識される細胞試料を含有するスライドをさらに含む発明 2 4 に記載のシステム。

[発明 2 6]

前記細胞試料が二温度固定法を使用して保存済みのホルマリン固定パラフィン包埋組織試料であり、前記検出可能標識が少なくとも1つのリン酸化タンパク質に特異的に結合する少なくとも1つの抗体に付加される発明 2 5 に記載のシステム。

[発明 2 7]

前記少なくとも1つのリン酸化タンパク質がP I - 3 キナーゼシグナル伝達経路又はM A P キナーゼシグナル伝達経路のメンバーである発明 2 6 に記載のシステム。

[発明 2 8]

前記少なくとも1つのリン酸化タンパク質がA K T、A K T、P R A S 4 0、S 6、E I F 4 G及びE R K 1 / 2 から成る群から選択される発明 2 6 に記載のシステム。

[発明 2 9]

(c) リレーショナルデータベース

をさらに含む発明 2 3 から 2 8 のいずれか一項に記載のシステム。

[発明 3 0]

前記発明のいずれか一項に記載の方法を含む操作を実施するためにプロセッサによって実行されるコンピュータ実行可能な命令を記憶するための、非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

[発明 3 1]

リン酸化プロファイルに従って腫瘍を特徴付ける方法であって、

(a) 腫瘍領域を他の非腫瘍領域と区別するために形態学的詳細を明らかにするように腫瘍の細胞試料のデジタル画像を捕捉するステップであって、

(a 1) 前記腫瘍の前記細胞試料は検出可能に標識された複数の特異的結合剤で標識され、

(a 2) 前記複数の特異的結合剤のうち少なくとも1つはリン酸化された形態のシグナル

10

20

30

40

50

伝達タンパク質に特異的であり、

(a 3) 前記特異的結合剤の前記検出可能標識は、

(a 3 a) 相互に共局在化される場合はスペクトル特性に基づいて相互に分離可能であり、

(a 3 b) 前記細胞試料から分離可能であり、

(a 3 c) 定量可能である、ステップと、

(b) 前記細胞試料の腫瘍領域内の 1 つ又は複数の対象区域 (A O I) を選択するため前記細胞試料の前記デジタル画像に注釈付けする機能をプロセッサ上で実行するステップと、

(c) 前記画像内の各 A O I について視野 (F O V) のサンプリング格子を計算する機能をプロセッサ上で実行し、各 F O V の単一又は複数の z 面において多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータを収集するステップと、

(d) 検出可能マーカーシグナルをコンピュータ処理により多重スペクトルデータ及び / 又はハイパースペクトルデータからセグメント化する機能をプロセッサ上で実行するステップと、

(e) 相互に比較されることになる F O V をデータセット構造に配置する機能をプロセッサ上で実行するステップと、

(f) 任意選択で、サイズの制約、強度の制約、又はサイズの制約と強度の制約との組み合わせに基づいて形態学的特徴の自動セグメント化をデータセット内の各 F O V の各検出可能マーカーシグナルに適用して、クラスタ分析から除外されることになる F O V の領域を識別する機能をプロセッサ上で実行するステップと、

(g) 任意選択で、 1 つ又は複数の F O V において前記クラスタ分析に含めるか、又は前記クラスタ分析から除外することになる領域の手動での指定を可能にする機能をプロセッサ上で実行するステップと、

(h) x 軸、 y 軸及び z 軸を有する画像スタック内に前記データセット構造をロードする機能をプロセッサ上で実行するステップであって、前記 x 軸及び前記 y 軸が F O V 内の空間座標を表し、前記 z 軸が 1 つ又は複数の層を含み、前記 z 軸の各層が単一の検出可能マーカーについての複数の x , y 座標での強度データを含む、ステップと、

(i) 非監視型、ノンパラメトリック、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムを前記画像スタックに適用して、 x , y 座標を、複数の z 軸層にまたがる検出可能マーカー強度の比率が同等である他の x , y 座標と一緒にグループ化する機能をプロセッサ上で実行して、同等の発現パターンを有する複数のクラスタを生成するステップであって、各クラスタはリン酸化プロファイルを示すものである、ステップとを含む方法。

[発明 3 2]

前記非監視型、ノンパラメトリック、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムが平均シフトクラスタ化アルゴリズムであり、前記平均シフトクラスタ化アルゴリズムへの入力の前記画像スタックであり、前記平均シフトアルゴリズムの出力が x , y アレイであり、前記 x 座標及び y 座標が入力された画像スタックの空間座標であり、各 x , y 座標での値が任意の x , y 座標が属するクラスタ番号を示す標識である発明 3 1 に記載の方法。

[発明 3 3]

前記細胞試料が組織試料であり、前記組織試料の画像が医師による注釈付け向けにデジタル表示され得る解剖学的組織の屈折率コントラスト画像であり、解剖学的組織に基づいて A O I が選定される発明 3 1 に記載の方法。

[発明 3 4]

前記 F O V サンプリング格子が A O I にまたがり規則的な間隔で配置された複数の F O V を含む発明 3 1 に記載の方法。

[発明 3 5]

各 F O V の z 面からの前記多重スペクトルデータ及び / 又は前記ハイパースペクトルデータが、患者、アッセイ、生検、切片、 A O I 位置及び / 又は F O V 位置に対するメタデ

10

20

30

40

50

ータ特性と併せて、ネスト化されたデータ構造又はデータベースに自動記憶される発明 3 1 に記載の方法。

[発明 3 6]

(a 4 a) 1 つのグループとしての比較対象として選択される前記 F O V が同一組織切片中の別々の腫瘍病巣に相当するか、又は

(a 4 b) 前記 F O V が同一患者から採取された別の生検材料と比較するために同一患者から採取された生検材料に基づいてグループ化されるか、又は

(a 4 c) F O V が腫瘍部位に基づいてグループ化されるか、又は

(a 4 d) F O V が患者に基づいて別の患者と比較するためにグループ化されるか、又は

(a 4 e) F O V が腫瘍遺伝子型に基づいてグループ化される

発明 3 1 に記載の方法。

[発明 3 7]

前記リン酸化タンパク質のうち少なくとも 1 つが P I - 3 キナーゼシグナル伝達経路又は M A P キナーゼシグナル伝達経路のメンバーである発明 3 1 に記載の方法。

[発明 3 8]

前記リン酸化タンパク質のうち少なくとも 1 つが A K T 、 P R A S 4 0 、 S 6 、 E I F 4 G 及び E R K 1 / 2 から成る群から選択される発明 3 1 に記載の方法。

[発明 3 9]

前記細胞試料が二温度固定法を使用して固定された組織試料である発明 3 1 に記載の方法。

[発明 4 0]

前記方法が (a) に従って前記デジタル化画像を捕捉するよう、また前記デジタル化画像を分析用画像処理分析 (A I A) システムへ伝達するように適合された分析用画像処理ハードウェアシステムを含むシステム上で実行され、前記 A I A システムが、プロセッサと、前記プロセッサに結合され、前記プロセッサによって実行されたとき (b) から (i) の操作をプロセッサに実施させるコンピュータ実行可能な命令を記憶するメモリとを含む発明 3 1 に記載の方法。

[発明 4 1]

表示装置 (1 1 7) を含む多重スペクトル画像処理システムによって実装される細胞試料画像処理方法であって、

細胞試料から多重スペクトルピクセルを含む画像データ (1 0 0) を取得するステップと、

n 個の単一チャネル画像 (1 0 4 、 1 0 6 、 1 0 8 、 1 1 0 、 1 1 2) を多数提供する多重スペクトルピクセルをスペクトルアンミキシングするステップと、

非監視型、ノンパラメトリック、密度ベースのクラスタ化アルゴリズムを前記 n 個の単一チャネル画像によって与えられる n + 2 次元の空間で応用することにより、複数のクラスタ (C 1 、 C 2) を生成するステップを含むクラスタ分析を実施するステップと、

クラスタ化によって得られたクラスタ化の結果の表現 (1 1 4 、 1 1 6) を前記表示装置 (1 1 7) に表示させるステップと

を含む方法。

[発明 4 2]

前記単一チャネル画像 (1 0 8) のうち少なくとも 1 つを表示させるステップと、前記クラスタ化の結果の前記表現 (1 1 4 、 1 1 6) を前記少なくとも 1 つの単一チャネル画像にオーバーレイとして表示させるステップとをさらに含む発明 4 0 に記載の方法。

[発明 4 3]

単一チャネル画像の数 n が 3 個より多いか又は 4 個より多い発明 4 0 又は 4 1 に記載の方法。

[発明 4 4]

前記クラスタ化アルゴリズムを実施する前に、前記アンミキシングされた画像データでローパスフィルタ処理される発明 4 0 、 4 1 又は 4 2 に記載の方法。

10

20

30

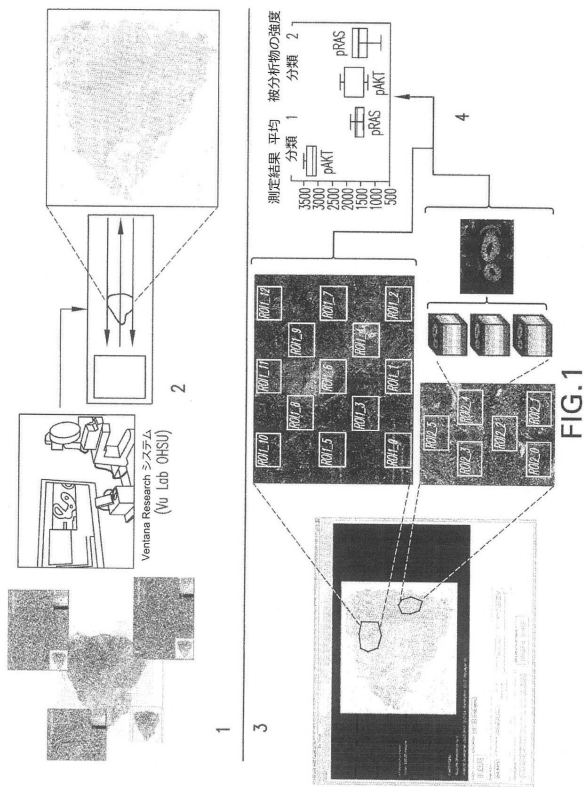
40

50

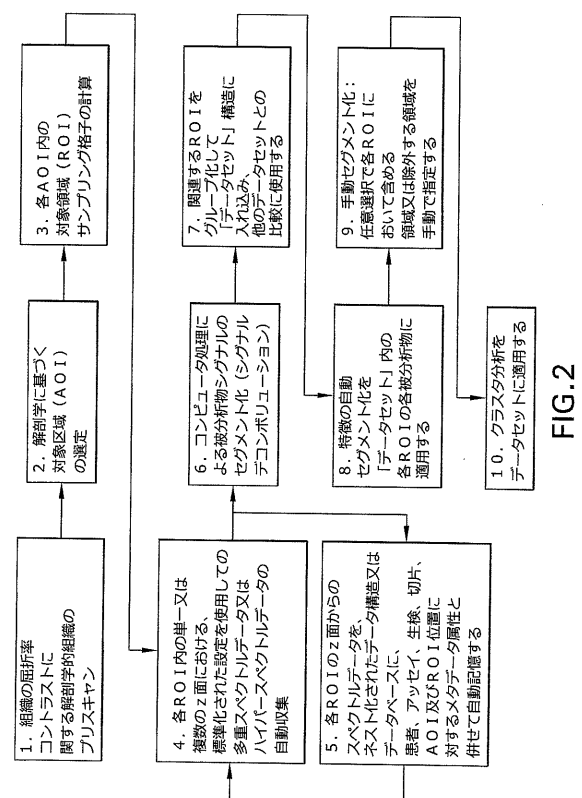
【 発明 4 5 】

前記クラスタ化アルゴリズムを実施する前に、前記アンミキシングされた画像データがビンニングされ、前記表示される画像（108）が、ビンニングされなかった画像データの分解能を有する発明 40 から 43 のいずれか一項に記載の方法。

【 図 1 】



【 図 2 】



【図 7】

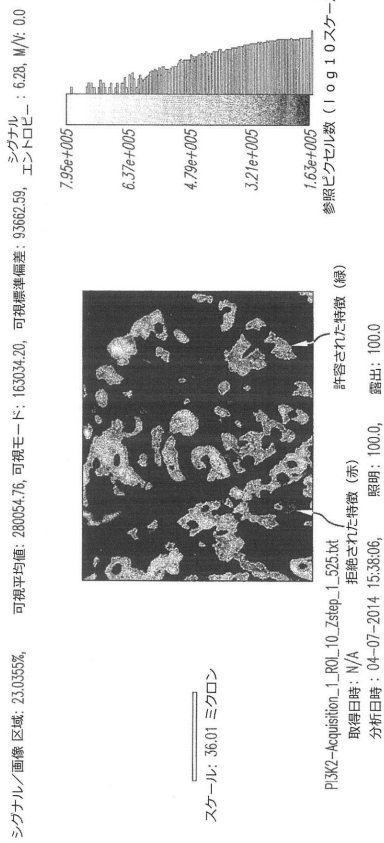


FIG.7

【図 8】

自動マスク設定

自動マスク ON: ☒ 自動マスク 可視: ☒

強度閾値種別
☒ 高めの値を限度に固定 ☐ 限度外の値を除外

強度範囲
☒ 画像表示閾値を使用 ☐ 標準強度閾値

定義された強度閾値
最低可視強度: 0.00 最高可視強度: 65535.00

流域セグメント化
流域セグメント化を使用する: ☐ セグメント化パラメータ
局所最大フィルタ足跡 (単位: ピクセル): 3.0
境界付近のノイズを除外する: ☐

特徴サイズ範囲
最大特徴区域 (単位: ピクセル): 16.0 最大特徴区域 (単位: ピクセル): 500.0
サイズ上限なし: ☒

ピクセル包含
☒ 4 箇所接続状態 ☐ 8 箇所接続状態

OK

FIG.8

【図 9】

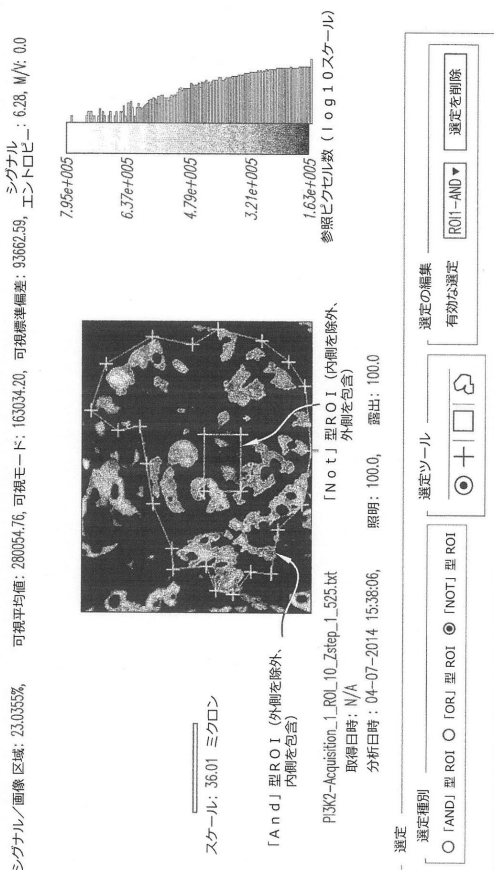


FIG.9

【図 10】

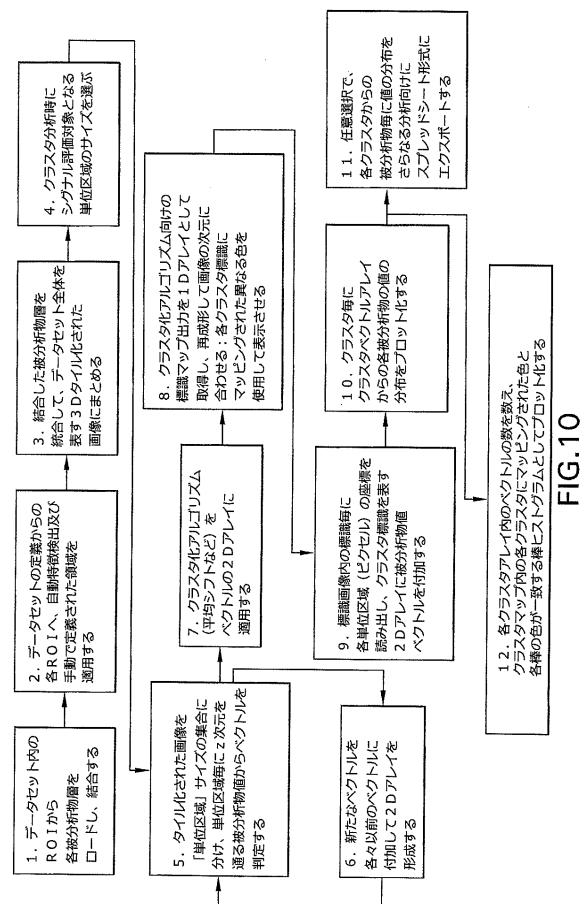


FIG.10

【図 1 1】

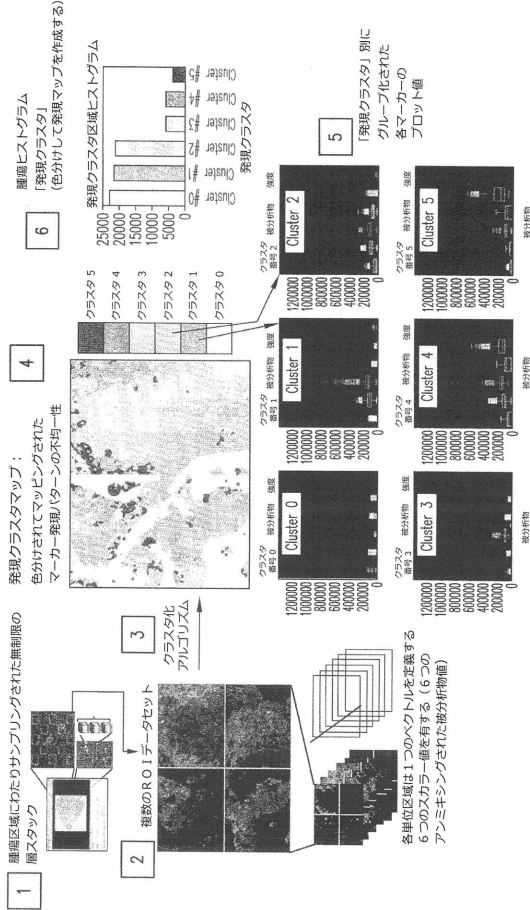


FIG.11

【図 1 3】

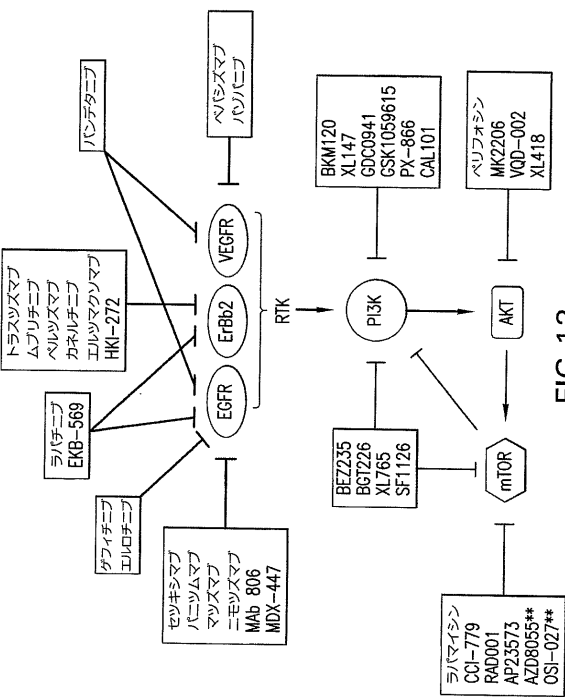


FIG.13

【図 1 2】

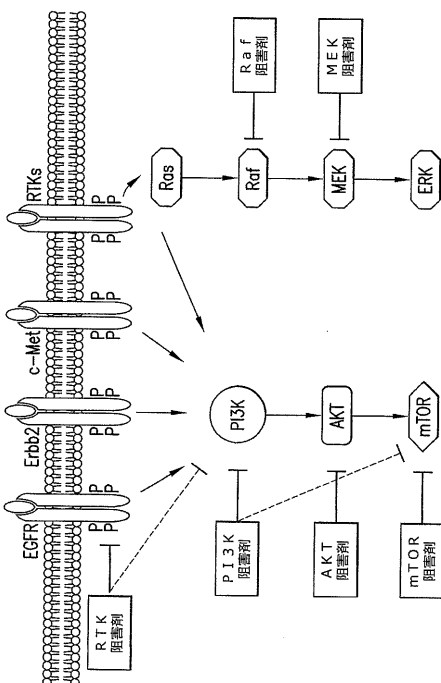


FIG.12

【図 1 4】

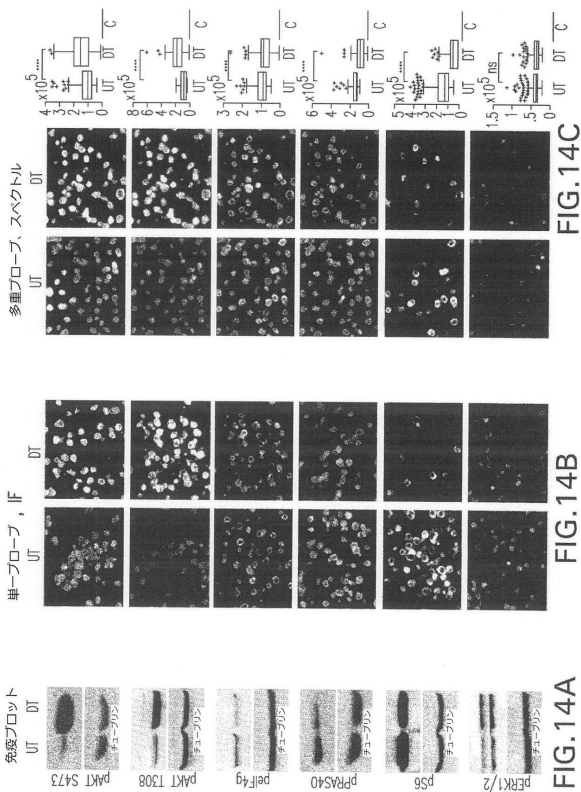
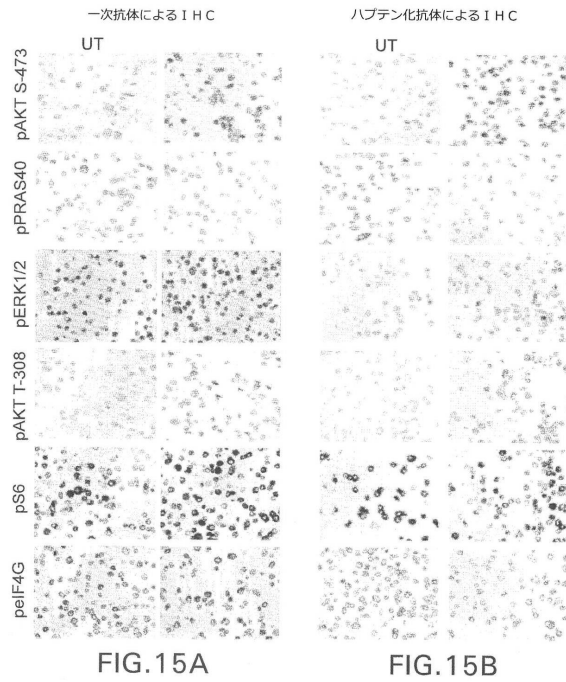


FIG.14A

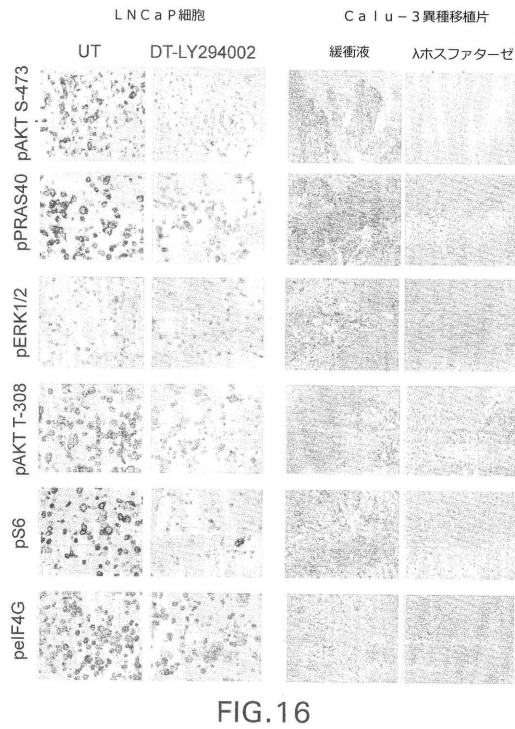
FIG.14B

FIG.14C

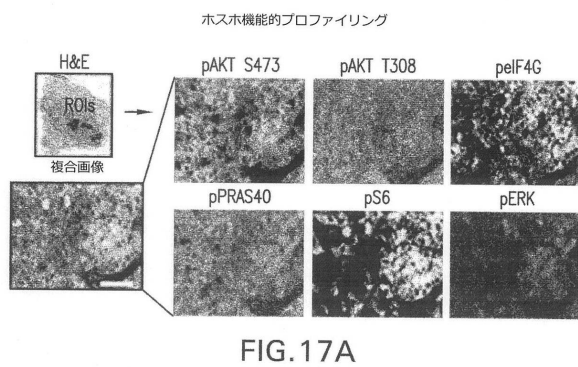
【図 15】



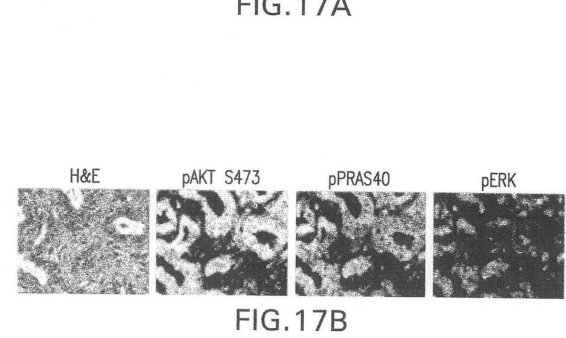
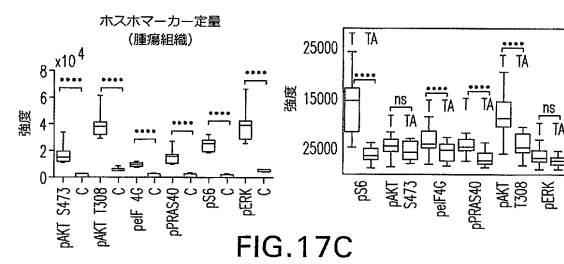
【図 16】



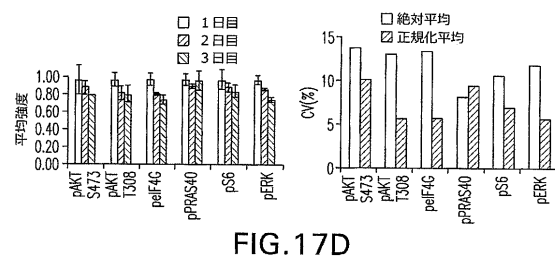
【図 17 A B】



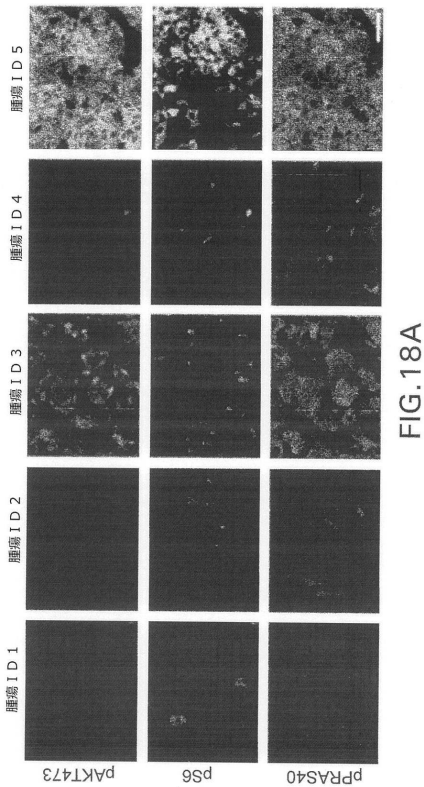
【図 17 C D】



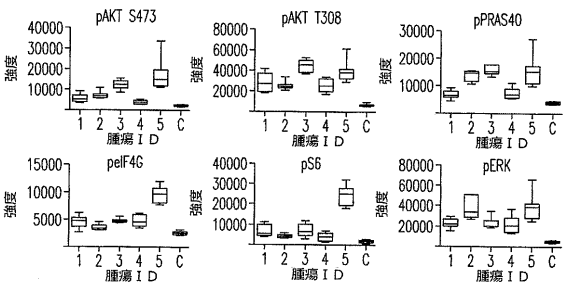
腫瘍組織中の MST I の再現性



【図 18 A】



【図 18 B】

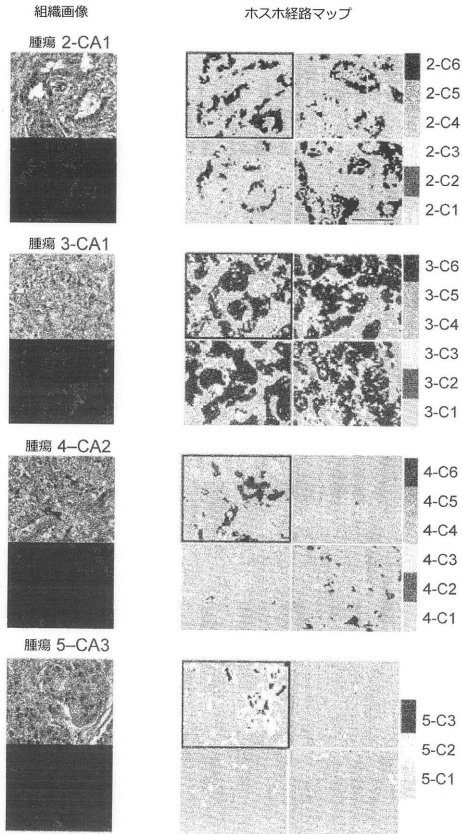


【図 18 C】

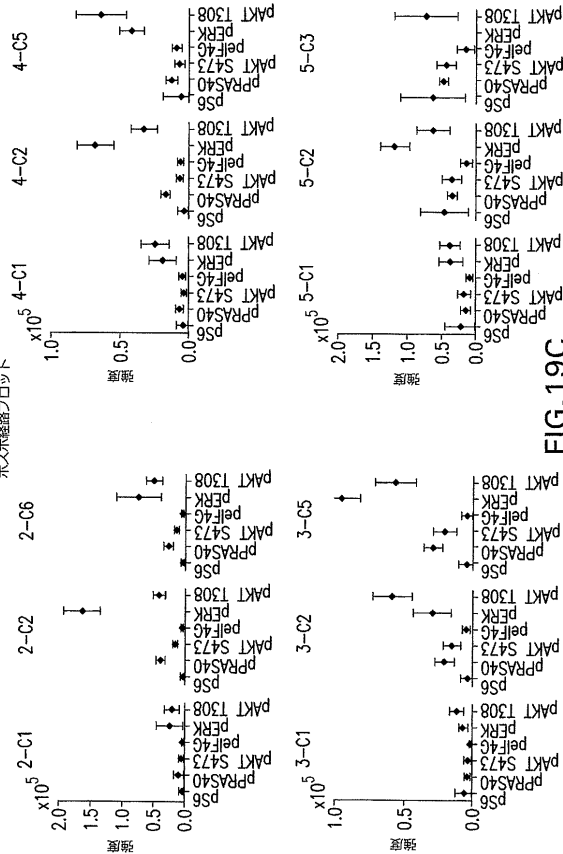
腫瘍 I D	突然変異	機能マーカー
1-CA3	PIK3CA E545K	ER+, PR+, HER2-, Ki67 (8%), PTEN+
2-CA1	不検出	ER+, PR-, HER2-, Ki67 (15%), PTEN+
3-CA1	AKT1	ER+, PR+, HER2-, Ki67 (80%), PTEN+
4-CA2	不検出	ER-, PR-, HER2-, Ki67 (95%), PTEN-
5-CA3	PIK3CA, TP53 H1047R, R248W	ER-, PR-, HER2+, Ki67 (100%), PTEN Eq

FIG.18C

【図 19 A B】



【図 19 C】



【図19D】

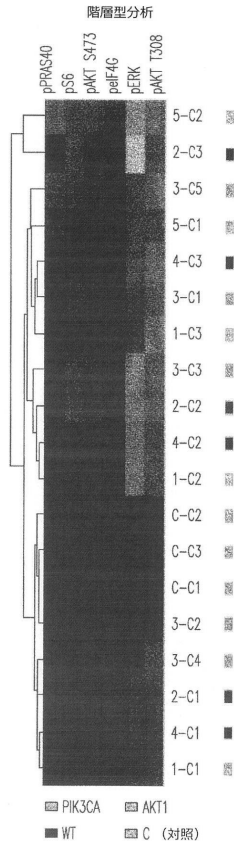
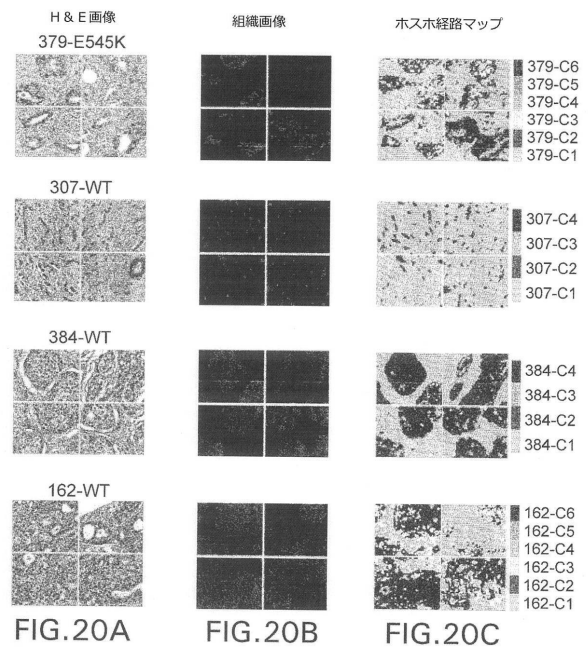


FIG.19D

【図20ABC】



【図20D】

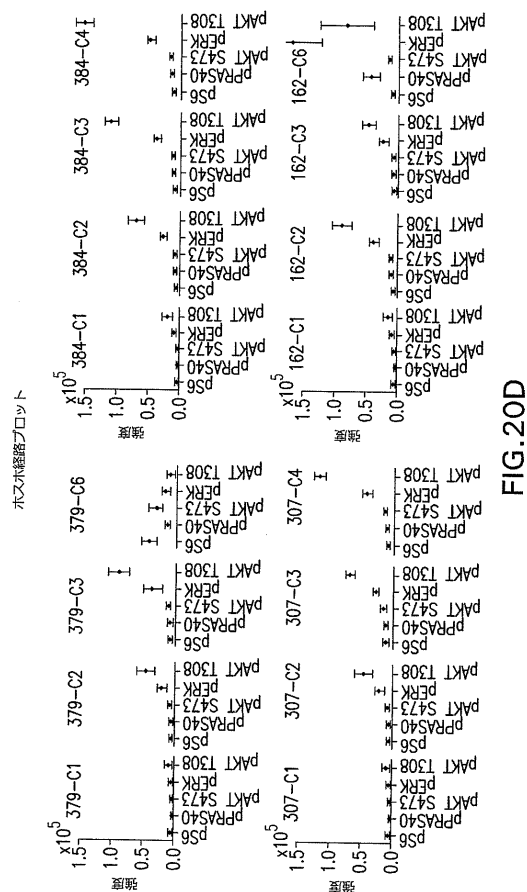


FIG.20D

【図20E】

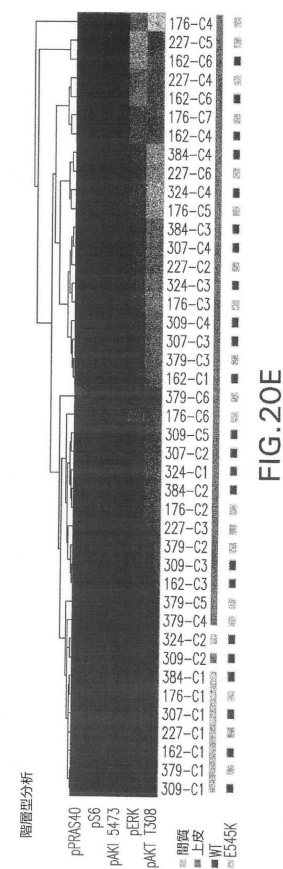


FIG.20E

【図 21】

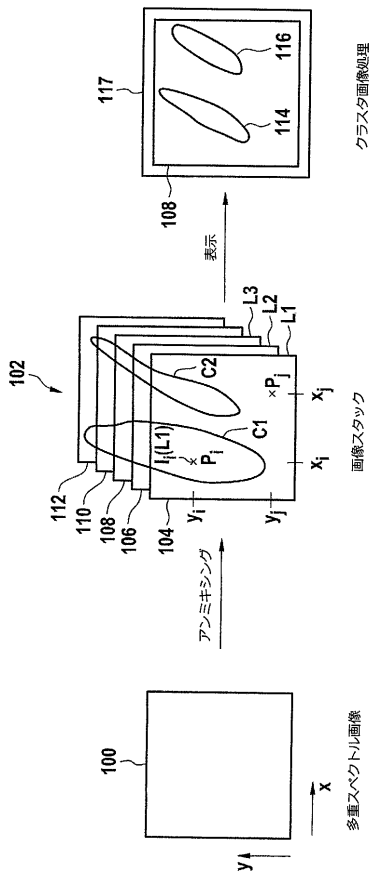


Fig. 21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 21/27

A

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(74)代理人 100147991

弁理士 鳥居 健一

(72)発明者 バーンズ, マイケル

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 7 3 7 , オロ・ヴァレー, イースト・ブシュ・ワイルダーネス・ドライブ 1 5 0 0 , ユニット 2 2 0 6

(72)発明者 チャフィン, デーヴィッド

アメリカ合衆国アリゾナ州 1 2 8 1 0 , ツーソン, ノース・ランターン・ウェイ 1 2 8 1 0

(72)発明者 ガルシャ, カール

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 6 2 9 , サファリー・セオドア・ルーズベルト・ウェイ 1 5 0 5 8

(72)発明者 グローガン, トーマス・エム

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 7 1 8 , ツーソン, ヴィア・アルカルデ 5 5 5 5

(72)発明者 ロバーツ, エステバン

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 7 4 2 , ツーソン, ウエスト・スノー・レオパード・ドライブ 4 7 6 0

(72)発明者 スティーヴンス, ベンジャミン

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 7 5 5 , オロ・ヴァレー, ノース・ロスト・アーティファクト・レーン 1 3 2 6 5

(72)発明者 ヴェンチュラ, フランク

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 7 3 5 , ツーソン, サウス・トワイライト・エコー・ロード 3 5 8 6

(72)発明者 シェフドテル, クリストフ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 8 5 , サニーヴェール, ノース・ベイビュー・アベニュー 6 0 4

(72)発明者 シャンムガム, カンダヴェル

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 2 2 6 , チャンドラー, ウエスト・ジャスパー・ドライブ 3 8 8 1

(72)発明者 グレイ, ジョー

アメリカ合衆国アリゾナ州 9 7 0 3 4 , レイク・オスウィーゴ, ノースショア・ロード 1 1 1 5

(72)発明者 ラムンノ・ジョンソン, ダミエン

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 6 6 3 , パンクーバー, イースト・サートィセカンド・ストリート 1 1 5

(72)発明者 ヴ, トス(タニア)

アメリカ合衆国オレゴン州 9 7 2 0 1 , ポートランド, サウスウエスト・エイティーンズ・アベニュー 2 2 1 8

審査官 倉持 俊輔

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 0 3 1 8 0 (J P , A)

米国特許出願公開第2014/0314299 (US, A1)

米国特許出願公開第2006/0245631 (US, A1)

特表2008-539763 (JP, A)

LOPEZ Moles Xavier et al., Clustering methods applied in the detection of Ki67 hot-spots in whole tumor slide images: An efficient way to characterize heterogeneous tissue-based biomarkers, Cytometry Part A, 2012年 6月22日, Vol.81A, pp.765-775

Levenson Richard et al., Spectral imaging in preclinical research and clinical pathology, Analytical Cellular Pathology, 2012年, Vol.35, pp.339-361

CHEN Ying et al., Automated 5-D analysis of cell migration and interaction in the thymic cortex from time-lapse sequences of 3-D multi-channel multi-photon images, Journal of Immunological Methods, 2009年, Vol.340, No.1, pp.65-80

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48, 33/53,

G01N 21/27,

G06F 17/40,

G06T 7/00,

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)