

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09343

研究課題名(和文) 早期食道腺癌・接合部腺癌の蛍光プローブによる検出に関する多施設共同研究

研究課題名(英文) Multicenter study to detect early esophageal and esophagogastric junctional adenocarcinoma using a fluorescent probe

研究代表者

山本 桂子 (Yamamoto, Keiko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60791952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年の内視鏡診断学および治療法の進歩にともない、消化管癌が早期に発見され、内視鏡的に切除できるようになってきた。しかしBarrett食道腺癌を含む食道胃接合部腺癌は、画像強調内視鏡による観察を用いても、しばしばその正確な診断が難しいことがある。最近、がんの表面に発現するDPP-IVと特異的に反応して蛍光を発する、Glutamylprolyl hydroxymethyl rhodamine green (EP-HMRG) という蛍光物質が、開発された。この研究では、内視鏡的に切除された早期食道胃接合部腺癌にEP-HMRGを散布すると数分で蛍光を発することを証明し、早期発見に寄与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、将来的に増加が懸念される食道腺癌・接合部腺癌の内視鏡的切除の適応となる症例に対して、その診断能の向上に大きく貢献すると期待される。現在、この領域の癌の早期診断は非常に困難で発見が遅れたり、先進的な立場をとる施設においてもその正確な範囲診断が難しく、内視鏡治療で過不足のない切除範囲で治療に持ち込めない例も少なくない。本研究により、EP-HMRGによる蛍光イメージングが、食道胃接合部腺癌のより早期かつ正確な検出に、新たな検査法として寄与する可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in endoscopic diagnostics and techniques have enabled early detection and resection of gastrointestinal cancer. But it is still difficult to detect and diagnose early adenocarcinoma of the esophagogastric junction (EGJ) using conventional endoscopy or image-enhanced endoscopy.

Recently, a glutamylprolyl hydroxymethyl rhodamine green (EP-HMRG) fluorescent probe that can be enzymatically activated by a dipeptidyl peptidase (DPP)-IV expressed on the surface of several cancers has been developed. This study showed that the tumor lesions were visualized within a few minutes after the application of EP-HMRG and suggested that Fluorescence imaging with EP-HMRG could be useful for the detection of early EGJ adenocarcinoma lesions.

研究分野：消化器内科

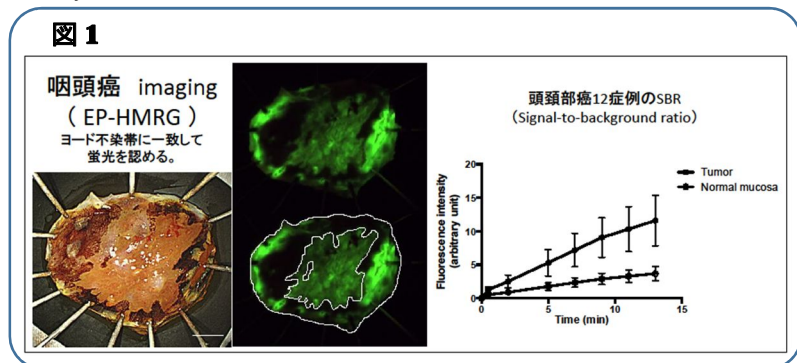
キーワード：食道胃接合部腺癌 蛍光イメージング DPP-IV

1. 研究開始当初の背景

近年の内視鏡診断学および治療法の進歩にともない、消化管癌が早期に発見され、内視鏡的に切除される例が多くなってきた。しかし Barrett 食道腺癌を含む食道腺癌および食道胃接合部腺癌は、色素散布法や画像強調内視鏡による観察でもその正確な診断が難しい。さらに、我が国の近年における *Helicobacter pylori* の感染率低下、除菌療法の普及によって、食道胃接合部腺癌・Barrett 食道腺癌の増加が懸念されており、確実な早期発見は早急に解決すべき命題である。

一方、連携研究者である東京大学の浦野らのグループは、多くのがん腫の細胞表面に発現している酵素によって蛍光を発する色素を複数開発し、診断分野での有用性が注目されている。その中でがん細胞表面に発現する DPP-IV の酵素活性によって蛍光を発する色素 (EP-HMRG) は、がん組織の表面に散布することで数分のうちに蛍光を発してがんを検出することができ、これまでに食道扁平上皮癌の切除標本において癌部特異的に蛍光を発することが報告されている (Scientific Reports 2016;6:26399)。また、研究分担者 (大西俊介、畑中豊) らは、頭頸部扁平上皮癌の内視鏡的切除標本 12 例に対して EP-HMRG を散布したところ、ヨード不染部位にほぼ一致して蛍光が観察された (図 1、Head neck, 2018; 40: 1466-75)。

そこで我々は、Preliminary study として、2 例の食道胃接合部腺癌の内視鏡切除標本を使用し、蛍光観察と病理標本での DPP-4 の発現状況の観察を行ったところ、いずれも EP-HMRG により蛍光を発し、良好なコントラストが得られた。したがって、EP-HMRG が Barrett 食道腺癌および接合部腺癌の早期発見、範囲診断のための内視鏡検査補助診断薬として有用でないかと考えた。



2. 研究の目的

早期食道腺癌、食道胃接合部腺癌の切除標本に EP-HMRG 散布を散布することにより、病変部に蛍光が観測されるか否かを調べ、EP-HMR 蛍光イメージングによる早期病変検出の可能性について検討する。

3. 研究の方法

対象は、北海道大学病院および他施設共同臨床研究として賛同の得られた国内 12 施設において内視鏡的切除術を施行予定の食道腺癌・接合部腺癌患者 (Barrett 腺癌を含む) とした。内視鏡的に切除された組織をゴム板にピンで固定した後、研究代表者および連携研究者 (浦野泰照) の研究室で所有している蛍光イメージング装置を用いて、EP-HMRG 散布前、散布後の signal-to-background ratio (CRB : Cancer/Background ratio) を 1 分毎に計 10 分間計測した。

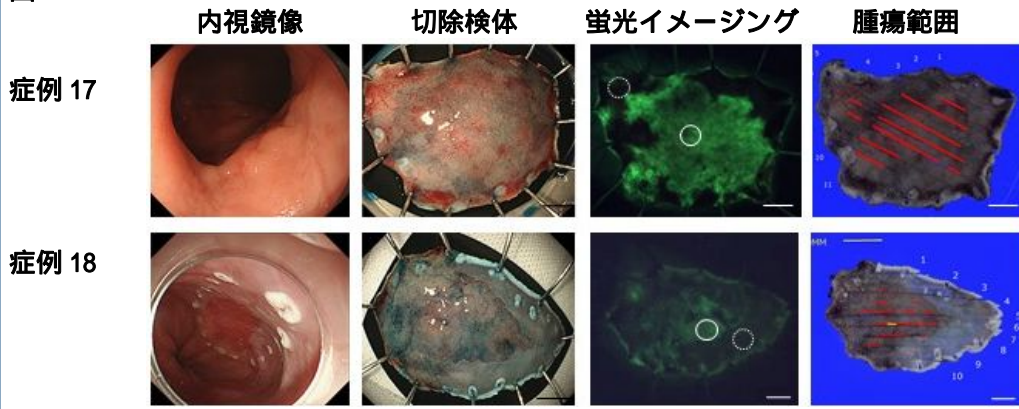
北海道大学以外の参加施設については、その都度研究代表者が蛍光イメージング装置と EP-HMRG を持参して参加施設に赴き蛍光撮影を行った。

主要検討項目は、がん組織における signal-to-background ratio。また、抗 DPP-IV 抗体による免疫染色を行い、がん組織における DPP-IV の発現の程度と蛍光強度との関連を調べた。さらに、癌および背景粘膜の粘液形質を表す MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、CDX2 の免疫染色を行い、各染色態と DPP-IV 発現との関連、蛍光強度との関連を検討した。

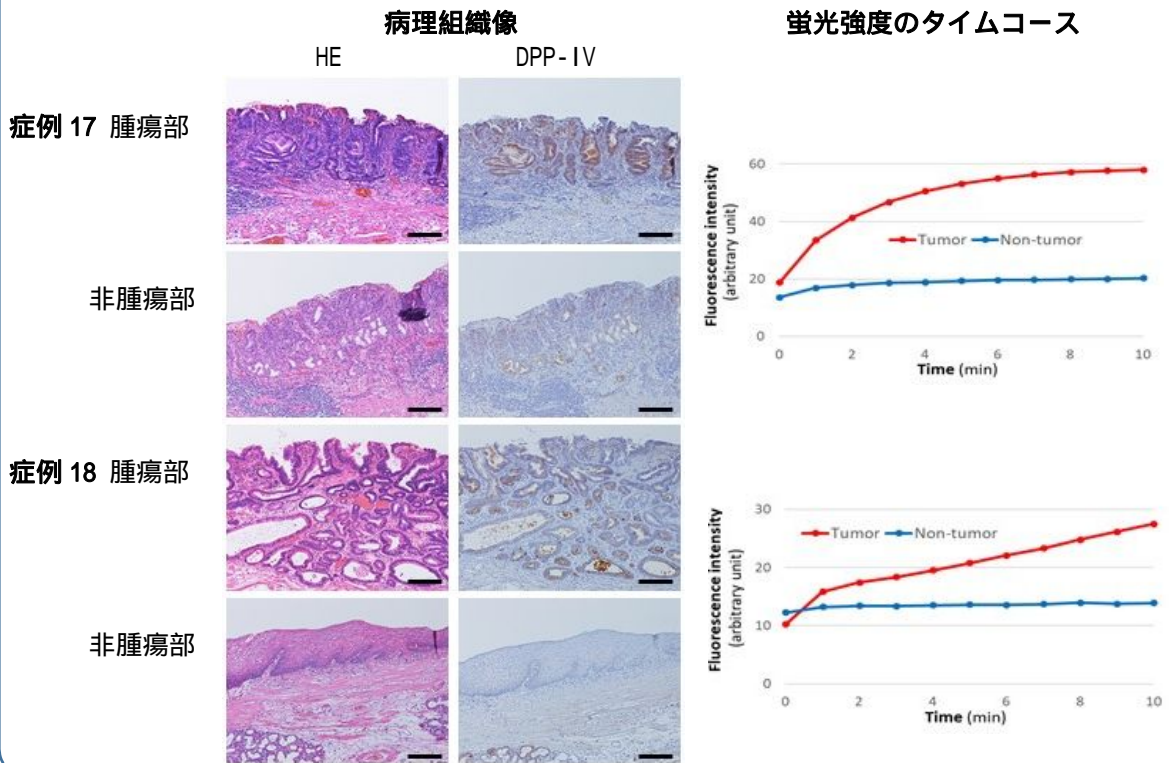
4. 研究成果

参加施設のうち、北海道大学病院 (当院) 恵佑会第 2 病院、北見赤十字病院、溪和会江別病院、市立函館病院から、計 21 症例が登録され、EP-HMRG による 蛍光イメージングを行った。全症例に対し、免疫染色を行い、病理学的所見とイメージング所見との対比を行った。結果、21 病変中、放射線照射例を除く 20 病変に DPP-IV が発現しており、EP-HMRG 散布後数分以内に腫瘍部に一致して経時的に増強する緑色の蛍光がみられた (図 2 : 代表症例)。

図 2

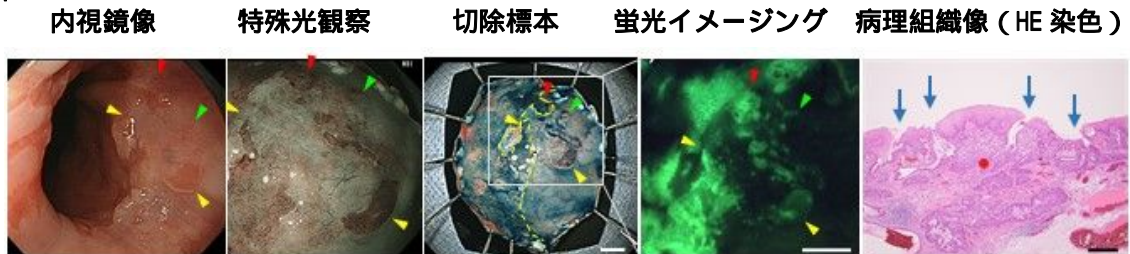


腫瘍部に一致して蛍光が観測される。



扁平上皮（非がん粘膜）下に病変が進展する症例では、扁平上皮表層に癌腺管が開口する小さなスポットにおいて点状の蛍光が良好に確認された（図 3：代表症例）。

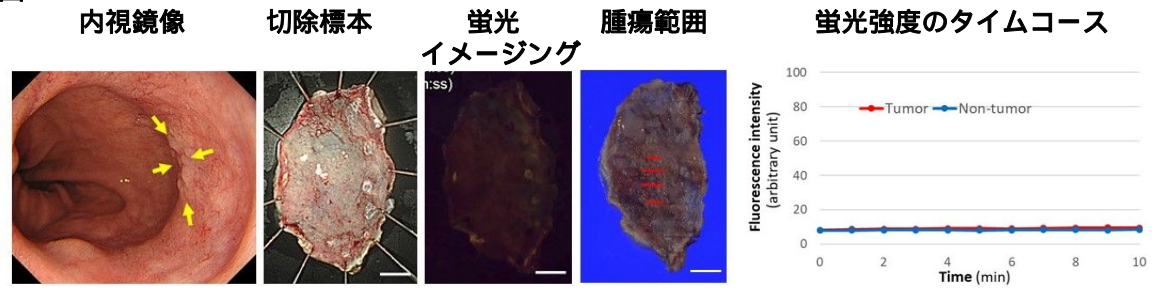
図 3



これは、EP-HMRG による蛍光イメージングが、食道胃接合部において非常に問題となっている、正常上皮の下層で浸潤増殖する腫瘍を、簡便かつ敏感に発見できる可能性があることを意味する、有用な所見である。

一方、腫瘍部位に放射線照射歴のある 1 例は、DPP-IV の発現はみられず、蛍光も観測されなかった（図 4）。

図 4

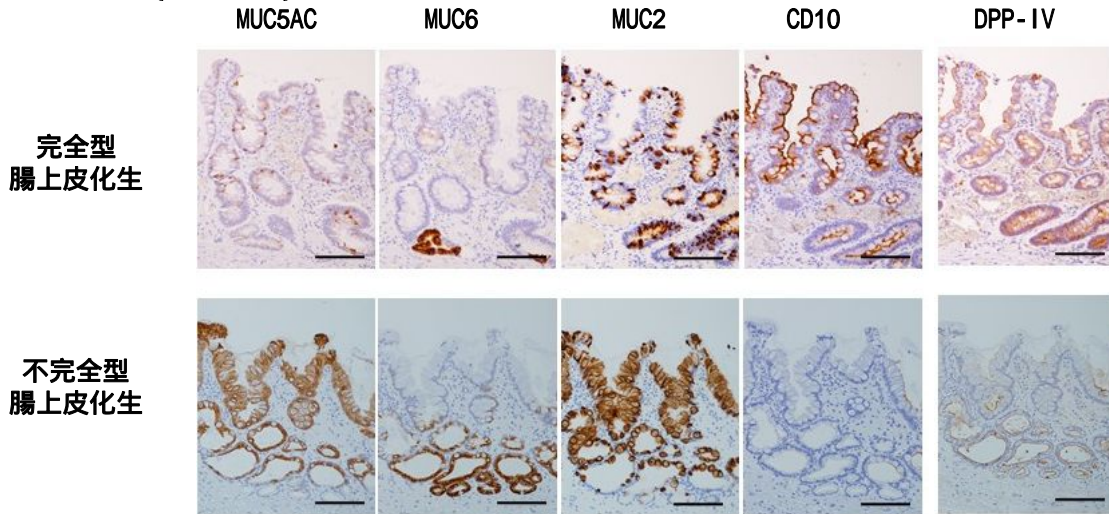


また、病変部と背景の蛍光の差を示す、CRB(Cancer/Background ratio)を算出したところ、ほとんどの症例で2-6倍、高いものでは12倍という高い値が得られた。

背景に完全型腸上皮化生を豊富に持つ症例3例は、CBRは0.5-1.3倍という低い値を示し、視覚的には周囲とのコントラストが得られづらく、蛍光イメージングによる検出の有用性が劣ることがわかった。原因は、がん組織だけでなく完全型腸上皮化生の刷子縁(CD10陽性)にもDPP-IVが発現する病理学的特徴によるものであった。(図5)

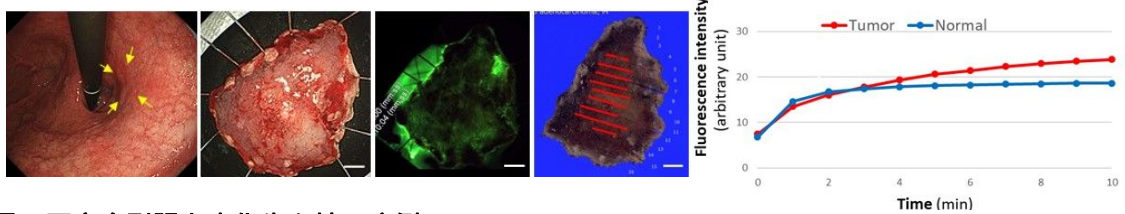
図 5

病理組織像(免疫染色)

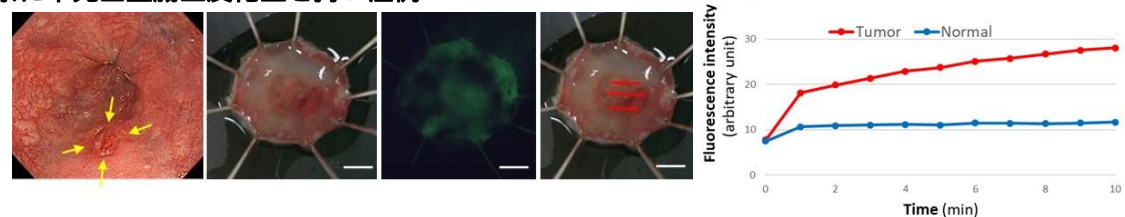


CD10とDPP-IVは発現態度が類似する。完全型腸上皮化生の刷子縁(CD10陽性)にはDPP-IVが発現しており、結果、腫瘍のみならず、背景粘膜にも蛍光を発するため、腫瘍部のコントラストが付きづらい。

背景に完全型腸上皮化生を持つ症例

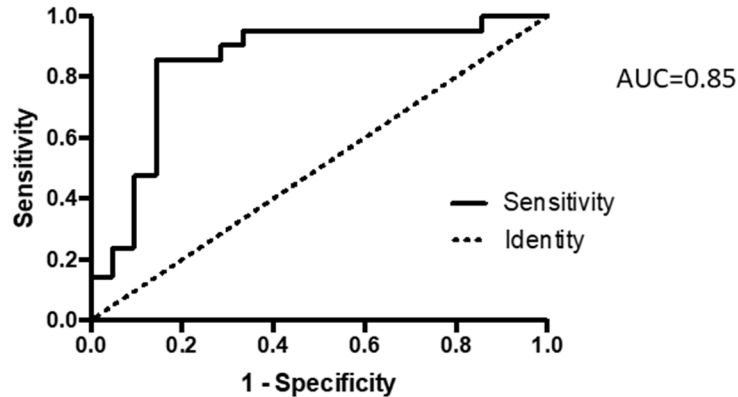


背景に不完全型腸上皮化生を持つ症例



全症例におけるDPP-IVを用いた蛍光イメージングの感度、特異度、正診率はそれぞれ85.7%、85.7%、85.7%という良好な結果であった(図6)

図 6



この研究により、EP-HMRG が早期食道腺癌および食道胃接合部腺癌において、腫瘍露出部で蛍光イメージングががんの検出に有用であることを示唆する結果を得た。特に、接合部の領域では、扁平上皮下にごん組織が被覆された状態で進行する症例の早期発見が難しいが、EP-HMRG はそれらの症例において、わずかながん露出部分で明瞭に蛍光が観測された。通常の内視鏡観察では診断が難しい病変を、簡便に発見できる可能性が高いと期待できる。

背景に完全型の腸上皮化生が存在する症例においては、腫瘍と背景の間で蛍光のコントラストがつかづらという難点がある。しかし、完全型腸上皮化生は、*Helicobacter pylori* 感染における胃粘膜に多いものの、診断が難しいとされる Barrett 食道腺癌の背景に出現する腸上皮化生はむしろ不完全型の腸上皮化生が多いとされる。不完全型腸上皮化生は DPP-IV がほとんど発現しないため、食道腺癌の発見の際には大きな問題とならないと考えられる。

この蛍光プローブが臨床応用されるには、プローブの生態における安全性の証明、蛍光を感知する内視鏡の開発などが必要である。また、隆起の高い病変では重力でプローブが流れ落ちるため、蛍光強度が比較的低い結果であった。隆起が目立つ病変は発見が容易であり、問題にはならないが、プローブの粘調性を高めるなどの工夫も有効である可能性がある。

今回の研究結果は、国内および海外の学会で報告を行い、論文化して投稿した。2020年1月、BMC Cancer に publish された。(Detection of early adenocarcinoma of the esophagogastric junction by spraying an enzyme-activatable fluorescent probe targeting Dipeptidyl peptidase-IV. BMC Cancer. 2020 Jan 28;20(1):64.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto K, Ohnishi S, Mizushima T, Kodaira J, Ono M, Hatanaka Y, Hatanaka KC, Kuriki Y, Kamiya M, Ehira N, Shinada K, Takahashi H, Shimizu Y, Urano Y, Sakamoto N.	4. 巻 28
2. 論文標題 Detection of early adenocarcinoma of the esophagogastric junction by spraying an enzyme-activatable fluorescent probe targeting Dipeptidyl peptidase-IV	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-6537-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keiko Yamamoto
2. 発表標題 Detection of Early Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction by Spraying an Enzyme-Activatable Fluorescent Probe Targeting Dipeptidyl Peptidase-IV
3. 学会等名 UEGW（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Ohnishi
2. 発表標題 Detection of Early Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction by Spraying an Enzyme-Activatable Fluorescent Probe Targeting Dipeptidyl Peptidase-IV
3. 学会等名 癌治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本桂子
2. 発表標題 DPP-IV活性により蛍光を発するプローブによる食道胃接合部腺癌の検出
3. 学会等名 消化器内視鏡学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Yamamoto
2. 発表標題 Fluorescence imaging of early carcinoma of the esophagogastric junction by topically spraying fluorescent probe targeting dipeptidyl peptidase-IV
3. 学会等名 DDW (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 桂子
2. 発表標題 DPP-IV活性により蛍光を発するプローブによる食道胃接合部腺癌の検出
3. 学会等名 消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	大西 俊介 (Ohnishi Shunsuke) (10443475)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	
研究 分担者	畑中 豊 (Yutaka Hatanaka) (30589924)	北海道大学・大学病院・特任准教授 (10101)	
連携 研究者	浦野 泰照 (Urano Yasuteru) (20292956)	東京大学・大学院薬学系研究科・教授 (12601)	