

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19825

研究課題名(和文) Elastographyと新たな線維化診断を用いた非侵襲的NASH診断の新展開

研究課題名(英文) New development of non-invasive NASH diagnosis using Elastography and new fibrosis diagnosis

研究代表者

小泉 洋平 (KOIZUMI, YOHEI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)

研究者番号：60596815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：NASHモデルラットと正常ラットの肝組織を用いた観察、検討を行った。SHGイメージを用いて肝線維の太さ、密度、線維の3次元立体的構造のイメージングと定量化に成功した。従来は評価が難しかった『肝臓にどのように線維が付着しているのか』が立体的に評価可能である可能性が示唆された。肝表面構造の変化はNASH線維化進展の初期変化をとらえている可能性がある。肝表面のコラーゲン線維構造は病理組織検査で評価することが出来ないため、SHGは代替不能な測定技術である。また、NASH患者のElastography肝硬度値と肝線維構造には相関があり、肝硬変症例の同定にElastographyは有用であった。

研究成果の概要(英文)：Observations and studies were conducted using liver tissues of NASH model rats and normal rats. Using Second harmonic generation (SHG) image, we succeeded in imaging and quantification of 1) thickness of liver fiber, 2) density, 3) three-dimensional structure of fiber. It was difficult to evaluate how fibers are attached to the liver in the past. In this study, it was suggested that the progression of fibrosis may be stereoscopically evaluated. Changes in the hepatic surface structure may capture the initial change in the progress of NASH fibrosis. Since collagen fibril structure on the liver surface can not be evaluated by histopathological examination, SHG is an alternative measurement technique. In addition, Elastography liver hardness value of NASH patients correlated with liver fibrous structure, and Elastography was useful for identifying cases of cirrhosis.

研究分野：肝線維化

キーワード：Elastography SHG image NASH

### 1. 研究開始当初の背景

近年、肝炎ウイルスによる肝硬変、肝細胞癌が減少傾向を示している一方で、肝硬変と肝細胞癌の発症の原因の中で、NAFLDおよびNASHが占める割合が増加してきている。NAFLDにおいても、肝線維化が進み肝硬変へと進展する事で、発癌の危険性が増加する事から、肝線維化が、発癌のリスク因子であると考えられる。申請者らは、Real-time tissue elastography(RTE)を用いて、C型肝炎患者において肝硬度値を測定し、非侵襲的肝硬変診断方法を確立するとともに、RTEで計測した肝硬度値は肝線維化を反映している事を報告した。また、NAFLD患者においてもRTEで測定した肝硬度診断が有用であり、RTEは門脈圧亢進症の指標としても有用であることも既に報告しており、慢性肝疾患に対する非侵襲的診断に取り組んできた。

NASHの病態評価には肝線維化の評価が重要である。NASHの確定診断は、組織生検で行われ、線維化評価には鍍銀染色、AZAN染色、Sirius red染色などの染色標本が用いられている。本研究で用いる最新鋭の2光子励起顕微鏡は、生体組織深部での細胞や分子の動態を可視化し、経時的にイメージングすることができる。2光子励起顕微鏡を用いた解析の最大の特徴として、SHG(Second harmonic generation:第2次高調波発生)と呼ばれる非線形光学現象を利用して、無染色で肝の線維化の評価をすることが可能である。また、SHGはその特殊な発生条件のため、生体内では微小管やコラーゲン線維のような微小構造体を選択的に可視化できる。このことから、従来の染色を行った肝病理組織標本よりも、SHGイメージの方が、より詳細に肝線維化の初期変化や進行の過程を評価可能と思われる。細胞・分子レベルで解析することで、肝線維化において主要な役割を担う肝星細胞の動態や活性化と肝線維化の相関が解明されることが期待される。また、新たな方法での詳細な肝組織の検討結果と、Elastography測定結果を検討することで、より初期の段階から非侵襲的に肝線維化・肝発癌高リスク群を鑑別可能になることが期待される。本研究で、Elastographyを用いてNASH症例の肝硬度、肝脂肪量(Controlled Attenuation Parameter:CAPを使用して測定)を計測し、肝SHGイメージと対比することで、NASHの病期進行高危険群および肝発癌の高危険群を非侵襲的に診断する方法を確立できるのではと考えた。

### 2. 研究の目的

2光子励起顕微鏡を用いたSHG(Second harmonic generation)イメージは、コラーゲンの局在を反映することが知られており、斬新な線維化定量評価法として注目されている。このSHGイメージを用いて肝内のコラーゲン線維や肝星細胞の観察を行い、従来は困難であった肝線維化の初期変化や

進行の過程を経時的に評価する。また、申請者らはNAFLD・NASH症例において、線維化進行は発癌危険因子であることを報告してきた。SHGイメージと、申請者らが確立してきたElastographyを用いた非侵襲的肝線維化診断技術を組み合わせ、NAFLDからの肝硬変高リスク群やNASHからの肝発癌高リスク群を明らかにする。また、これら高リスク群を、Elastographyを用いて簡便かつ非侵襲的に評価可能なcut off値を明らかにする。具体的には、

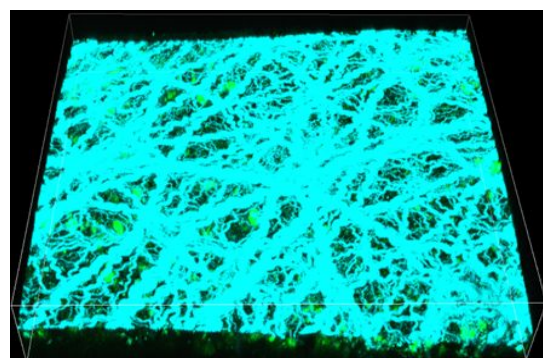
- 1) 2光子励起顕微鏡を用いて、NASHモデルマウスの生体肝組織を観察し、肝線維化の状態を経時的にかつ定量的に評価する。
- 2) Shear wave elastographyを用いてNASHモデルマウスの測定を行い、測定に寄与する組織学的因子を詳細に検討する。
- 3) 3つのElastography装置(Real-time tissue elastography、Shear wave elastography、Transient elastography)を用いてNASH患者の測定を行い、Elastographyの測定結果(肝硬度、肝脂肪量)とSHGシグナルとの相関を調べ、NAFLD・NASHの病期進行および発癌高危険群の診断に有用であるか解析し、高危険群のcut off値を定める。これらの項目について、明らかにすることを目的にした。

### 3. 研究の方法

NASHモデルマウスの肝組織における肝線維化の変化を2光子励起顕微鏡を用いて観察する。具体的にはSHGイメージングにより無染色かつ経時的に観察し、定量的評価を行う。線維化に伴う組織学的・形態学的な変化をスコア化による評価を同時に行う。SWEを用いてNASHモデルマウスの肝硬度測定を行い、測定に寄与する因子を明らかにする。2光子励起顕微鏡観察下において肝星細胞を同定し、その活性化と線維化の相関を明らかにする。得られた知見をもとに、NASH患者の肝病理組織でも観察を行い、Elastographyを用いて肝硬度および肝脂肪量を測定し、SHGイメージングで得られた結果と比較検討し、Elastographyを用いた非侵襲的診断の有用性を明らかにする。

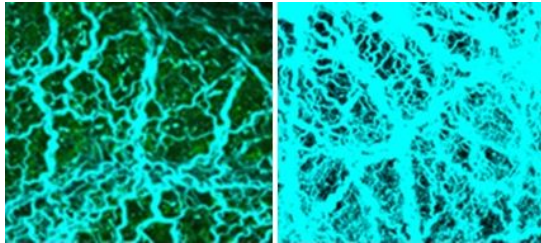
### 4. 研究成果

SHGイメージングの有用性・妥当性を明らかにするために、NASHモデルラットと正常ラットの肝組織を用いた観察、検討を行った。

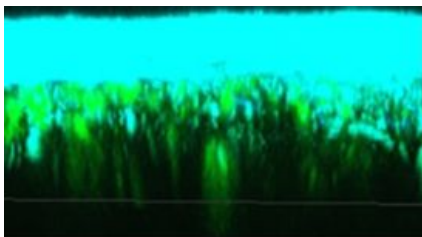


ラット肝表面線維構造の3次元SHGイメージ

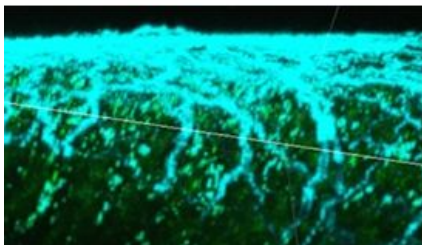
肝表面線維パターンを解析することで、従来は困難であった肝線維化の初期変化や進行の過程を経時的に観察した。(下図 左: 野生型ラットの正常肝表面 SHG イメージ、右: 肝硬変ラットの SHG イメージ)



また、SHG イメージを用いた 肝線維の太さ、密度、線維の 3 次元的立体構造のイメージングと定量化に成功した。(下図 上: 正常ラット肝表面 3D SHG イメージ、下: 肝硬変ラットの 3D SHG イメージ)



肝表面

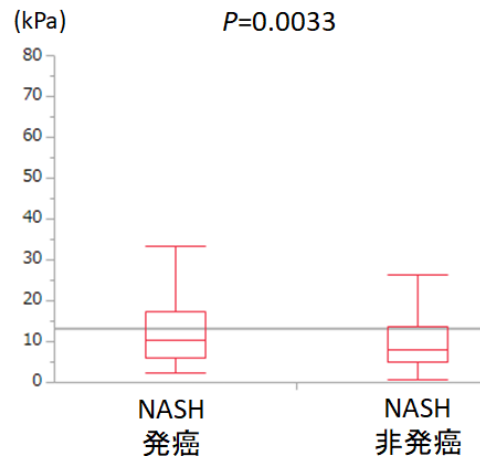


肝表面

内部

従来は評価が難しかった『肝臓にどのように線維が付着しているのか』が立体的に評価可能である可能性が示唆された。NASH モデルラットは線維化に伴い肝表面の SHG で示されるコラーゲン線維の構造変化がみられた。NASH 症例ではコントロール例と比較して、肝線維が太い、肝線維構造が深部まで進展している。線維構造の角度が急峻。という特徴があった。今回確認された肝表面コラーゲンの構造変化を、ワークステーションを用いて画像解析し、有意な変化として観察可能であった。肝表面構造の変化は NASH 線維化進展の初期変化をとらえている可能性がある。肝表面のコラーゲン線維構造は病理組織検査で評価することが出来ないため、SHG は代替不能な測定技術である。

次いで Elastography 装置を用いて NASH 患者の測定を行い、測定結果と SHG シグナルとの相関を調べた。NASH の非発癌症例と発癌症例の SHG シグナルと Elastography 測定結果を比較検討した。Elastography の肝硬度値と、肝線維構造・密度・線維自体の形態・太さには相関があり、肝硬変症例の同定に Elastography は有用であった。さらに、NASH 症例の発癌症例と非発癌症例を比較したところ、肝硬度に有意差がみられた。(P=0.0033)



今後、症例数をさらに重ねて、測定方法が異なる Shear wave elastography、Transient elastography、Real-time tissue elastography のうち、どの装置のパラメーターが線維構造変化をより反映するか明らかにしていく。なお、NASH 肝硬変症例の測定可能であった NASH 発癌症例が想定よりも少なく、発癌高危険群の Cut off 値の同定には至っておらず、今後症例数をさらに重ねて、論文発表予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

演題名「B mode による減衰計測を用いた新たな肝脂肪化診断 ~CAP との比較~」  
2017 年 日本肝臓学会西部会 演者: 小泉洋平、廣岡昌史、日浅陽一

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 洋平 (Kizumi, Yohei)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師 (病院教  
員)  
研究者番号: 60596815

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し