

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12054

研究課題名(和文)超音波内視鏡下エラストグラフィによる組織硬度測定による膵癌の臨床病理学的病態解析

研究課題名(英文)The clinicopathological analysis of pancreatic cancer from the viewpoint of tissue elasticity measured by EUS elastography

研究代表者

大野 栄三郎(Ohno, Eizaburo)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：00447822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では膵癌における「硬度」情報測定方法の確立及び「硬度」と膵癌の生物学的悪性度、分子生物学的特徴との関連を解明すべく研究を行った。新規硬度測定ツールであるEUS-shear wave elastographyは硬度計測に不安定性を示し、組織硬度評価にはヒストグラム解析を付加したStrain法が膵腫瘍硬度評価に安定した結果を示し、膵腫瘍の種類別に硬度が層別化されることを示した。膵癌の臨床病理学的特徴と硬度との関連では、高硬度の膵癌は切除後予後が有意に不良であることが示され、非切除例では抗がん剤治療の奏効期間と相関を認めた。現在組織硬度に関連する癌組織、CAFの遺伝子変異を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最新の膵癌治療戦略において、近年ではCAFをターゲットとして、膵癌関連間質の特徴を変化させることにより抗がん剤のドラッグデリバリーを改善をはじめとして化学療法の奏効率を向上させる試みが行われている。膵癌組織に対して癌線維性間質を組織学的所見以外で正確に評価する腫瘍は確立していない。本研究結果ではEUSエラストグラフィを用いた組織硬度計測の不安定性の課題が残るため、より正確な組織硬度計測手法の開発が期待される。本研究課題の結果成果は膵癌病態解明及び膵癌に対する新規治療開発の基礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we researched to establish a method for measuring "tissue elasticity" in pancreatic cancer(PC) by EUS elastography and to elucidate the relationship between "elasticity" and the biological behavior and molecular biological characteristics of PC. EUS-shear wave elastography, a novel elasticity measurement tool, showed instability in measurement, and the Strain elastography method with histogram analysis showed feasible results in the evaluation of elasticity of pancreatic tumor. In the relationship between the clinicopathological features of PC and tissue elasticity, high-elasticity "Hard" PCs showed significantly poor prognosis after surgical resection, and even in unresectable PC cases, it correlated with the duration of response to specific anticancer drug treatment. Currently, we are analyzing the gene mutation of PC and CAFs to investigate the correlated factors in histopathological specimens of PCs.

研究分野：膵疾患画像診断

キーワード：EUSエラストグラフィ 組織硬度 癌関連線維芽細胞 膵癌 シアウェーブエラストグラフィ ストレインエラストグラフィ ヒストグラム解析 超音波内視鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

難治性癌の代表である膵癌は全腫瘍体積の 90%を豊富な結合繊維増生で占め、その中にはコラーゲンを始めとする細胞外基質 (ECM)、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast:CAF) 脈管を含み、それら細胞外基質により惹起される組織硬度上昇が癌細胞をさらに悪性化させる。典型的な膵癌組織においては癌細胞を取り囲む豊富な線維芽細胞により阻血、乏血性の組織環境が構築されており、その結果抗癌剤抵抗性の上昇など、膵癌の生物学的悪性度、難治性に大きな影響を及ぼすと報告されている。(Olive et al., Science2009;Garrido-Laguna et al.,Clinical Cancer Research 2011他)。病理学的検討において、CAFのマーカーとして SMA、ピメンチン、CXCL12,Sonic Hedgehog(Shh)受容体、PDGF 受容体、Periostin、Fibroblast Activation Protein (FAP)等多数の分子が報告されており、過去の報告ではこれらの CAF マーカー群の発現は不良な予後と相関していると考えられてきた。共同研究者である榎本らは、最近間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell;以下 MSC) の未分化性維持に必要な分子として膜分子 Meflin (メフリン) を同定し、同分子が MSC の特異的なマーカー分子であることを報告した (Maeda et al.,Sci Rep,2016)。また ECM 内でコラーゲン同士の架橋構造を形成し、組織硬度を上昇させる蛋白である Lox(lysyl oxidase)の活性が Meflin 陽性 CAF の併存により低下することを発見している。このことは Meflin 陽性 CAF ががん抑制性 CAF としての機能を有していることを示唆し、また実際の膵癌組織中で、Meflin とこれまでの CAF (がん促進性 CAF) のマーカーである SMA 等の発現とでは組織硬度により違いがあると推測される。

我々はこれまで膵癌を代表とする膵腫瘍、膵炎症性病変の診断における超音波内視鏡検査 (EUS) の有用性につき報告してきた。超音波エラストグラフィは 2003 年に本邦で開発された、非侵襲的に組織弾性を測定して画像化・数値化する技術である。超音波エラストグラフィは相対的組織弾性を可視化する Strain elastography と、剪断弾性波測定にて組織弾性率の定量的評価を可能とする Shear wave elastography の 2 種類に大別される。EUS においては従来 Strain elastography のみが使用可能であった。しかし Strain elastography は関心領域内の組織硬度の相対値を描出するため、客観的な硬さを表す指標である弾性率 (Young 率) が算出不可能であり、硬度情報の絶対値評価並びに測定値の個体間の比較には大きな問題であった。今回、EUS 下に Shear wave elastography を測定可能なソフトウェアを使用する機会を得、膵癌の病態を組織硬度の面から解明することに思い至った。

2. 研究の目的

本研究は臨床的に世界で初めて EUS-Shear wave elastography (EUS-SWE) を用い、膵癌をはじめとする膵疾患の組織硬度を測定、評価することを基盤として、組織硬度と生物学的悪性度との関連を臨床的に評価すると同時に組織硬度に係る病理組織学的な要因、特徴を基礎的に評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EUS-SWE による膵癌患者の組織硬度測定の精度検証

* EUS-SWE の原理と評価法

Shear wave elastography は超音波 B-mode 画像上の対象領域に ROI をおき、ROI の近接部位に収束超音波を照射して音響放射圧を加え、発生した剪断弾性波 (shear wave) の伝播速度を測定することで対象組織の硬さを推測する方法である。伝播速度が速いほど硬く、遅いほど軟らかい組織と評価される。伝播速度は m/s または kPa で表示される。EUS を用いて膵疾患を観察し、各症例 5 回ずつの EUS-SWE 測定を行う。その平均値もしくは中央値を組織弾性率として算出する。組織弾性率は検者内、検者間の再現性の検討を行う。

* 原子間力顕微鏡 AFM の原理

原子間力顕微鏡とは、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の一種であり膵癌組織と探針の原子間にはたらく力を検出して画像を得る方法である。本検討では臨床的に測定した硬度と基礎的に組織硬度測定に用いられる原子間力顕微鏡による組織硬度測定の精度評価を行い、計測されたデータを EUS-SWE の硬度と対比する。

(2) 膵癌患者の進行度、治療効果 (化学療法奏効率) と組織硬度との関連性の検討

EUS において精密検査を行った膵癌患者の臨床病期、病理組織学的進展度診断、非切除症例且つ化学療法施行症例に対しては治療の奏効率、腫瘍縮小効果と組織弾性率との対比を行う。

(3) 膵癌組織の硬度に係る因子の病理組織学的検討 : Azan 染色、SMA、CD31 等の免疫染色による組織学的検討

膵癌組織硬度は膵癌組織中の線維芽細胞密度および組織中のコラーゲンやエラスチンの架橋により形成されると報告される。膵癌間質細胞に着目し、実際に組織硬度測定を行った膵癌組織中の CAF を含む線維芽細胞の組織学的特徴、細胞密度を解明する。

(4) 切除病理組織および生検膵組織中における、組織硬度に係る架橋タンパク (lysyl oxidase (Lox) の発現量) の測定と臨床的組織硬度との対比

実際の切除病理組織あるいは生検組織を LOX に関して免疫染色を行いその発現量を測定し、EUS-SWE 測定で得られた組織硬度との関連を検討する。

(5) 膵癌組織硬度に関連する遺伝子変異プロファイリングの検討

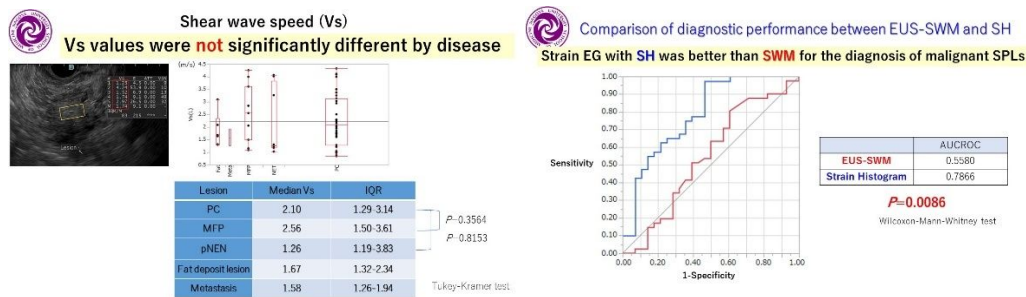
切除前に EUS-SWE にて組織硬度を計測した膵癌症例を対象に、切除病理組織のパラフィン切片より Laser Microdissection 法を用い、膵癌細胞および周囲の CAF を含め組織を採取し、DNA の抽出を行う。カスタムパネルにて膵癌組織中の遺伝子変異プロファイリングを検討し、病理組織所見、組織硬度と遺伝子変異プロファイルとの対比を行う。

4 . 研究成果

(1) EUS-SWE (EUS-guided shear-wave elastography) による膵癌組織硬度測定

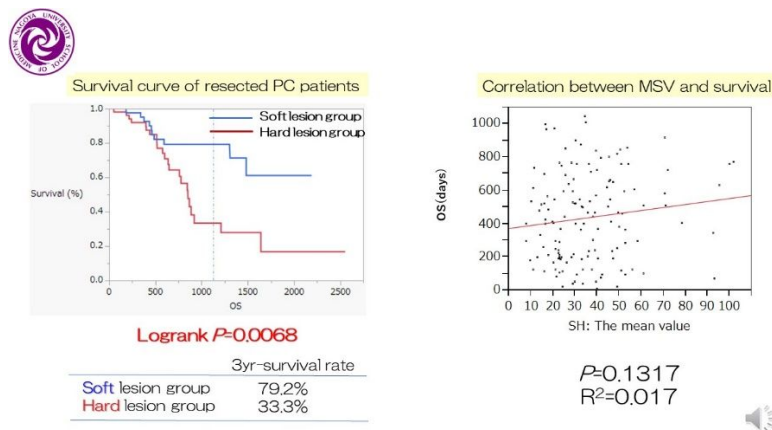
当該期間に膵癌 16 例を含む全 160 例に対して EUS-SWE による膵硬度測定が施行された。同時に Strain elastography の測定も施行し得られたデータは histogram 解析にて半定量化を行った。膵実質の組織硬度測定に関しては本ソフトウェアを用いた世界初のデータとして学会報告 (EUS2018) 及び論文報告 (Endoscopic ULTRASOUND 2019) を行った。EUS-SWE の膵疾患に対する測定精度評価を行った。EUS-SWE は内視鏡の位置により膵実質に与える圧迫効果がことなり、正常膵において部位により測定精度が変化した。また炎症性膵疾患である自己免疫性膵炎において、ステロイド治療の前後において同一症例の膵硬度が変化することを報告した (JMU 2019)。膵癌を含む膵腫瘍性病変に対する EUS-SWE による組織硬度測定精度の検証を行うため、もう一つの超音波エラストグラフィシステムである Strain elastography 法と対比して硬度測定を行った。その結果、EUS-SWE では膵癌症例では組織の不均一性が取得データの不均一性につながり、組織弾性率の定量化については再現性に問題が生じた。一方同時に施行した Strain elastography の

画像、Histogram 解析のデータからは、組織硬度の高い（硬い）膵癌組織ほど予後が悪い傾向を示した(Digestive Endosc2020)。これらの二種類の超音波 elastography 画像は相補的に用いる必要があることが示唆された。EUS-FNA にて得られた膵癌生検組織に対して AFM による硬度計測を試みた。その結果、膵癌組織の豊富な線維化、生検組織内の血液塊の混入なども影響し、安定した硬度計測は困難であった。



(2) 膵癌患者の進行度、治療効果（切除症例）と組織硬度との関連性の検討

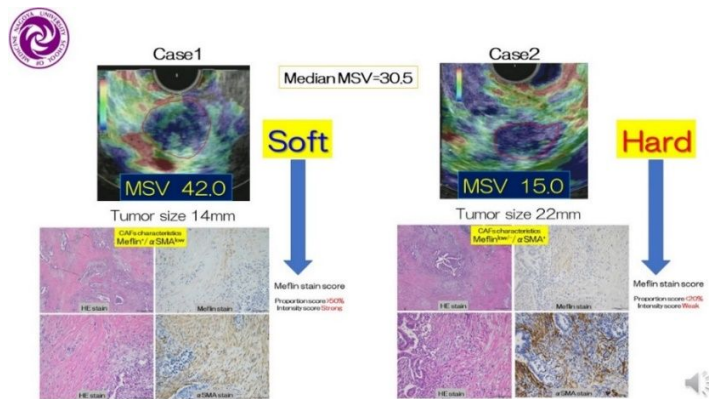
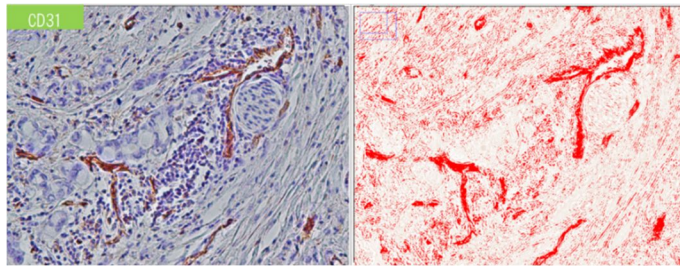
膵癌組織硬度と膵癌の生物学的悪性度、臨床像との対比を行うため、術前に EUS elastography を施行した患者の EUS による組織硬度所見と切除病理所見及び臨床像との対比を行った。組織硬度は EUS-SWE による組織硬度値及び Strain elastography 画像を Histogram 解析を行い半定量化した数値を用いた。結果、術前 EUS 画像にて高硬度を示した膵癌症例の切除後予後は有意に不良であった。膵癌の硬度に影響を与える病理学的因子を明らかにする目的に病理標本に対して AZAN 染色（線維芽細胞）alpha-SMA(CAF)、CD31(血管内皮細胞)、Meflin の免疫染色を施し、染色される画像的特徴と膵癌組織硬度との対比を行った。EUS elastography にて高硬度を示した膵癌組織においては Meflin 染色陽性 CAF の比率が高い傾向を示した（DDW2021 学会報告）



(3) 膵癌組織の硬度に係る因子の病理組織学的検討：Azan 染色、SMA、CD31 等の免疫染色による組織学的検討

膵癌の術前に EUS elastography にて計測した硬度と病理学的所見の対比のため、術前に組織硬度が高硬度であった 5 症例（MSV 中央値）、低硬度であった 5 症例（MSV 中央値）の切除病理組織標本に対し Azan, SMA, CD31 による免疫染色を行った。

結果として AZAN 染色と関連の高いパラメータとして、INF($P=0.0522$)、血管侵襲($P=0.1943$)、分化度($P=0.2545$)、CD31 染色と関連の高いパラメータとして MSV($P=0.0310$)、腫瘍径($P=0.0814$)、ly($P=0.0988$)、生存期間($P=0.2446$)が挙げられ、SMA と関連の高いパラメータとして、生存期間($P=0.2251$)、ly($P=0.1612$)が挙げられた。（未報告）



(4) 切除病理組織および生検膵組織中における、組織硬度に係る架橋タンパク (lysyl oxidase(Lox)の発現量)の測定と臨床的組織硬度との対比

現時点で膵癌組織内における Meflin 発現と硬度の関連性を解析しており、Lox の発現量の解析は継続課題としている。

(5) 膵癌組織硬度に関連する分子生物学的因子の解析

膵癌の術前硬度が切除後の膵癌患者の予後と相関することを解明し、それらが腫瘍中の CAF の形質により異なることを示した(DDW2021 学会報告)。切除組織に対して免疫染色(癌抑制性 CAF: メフリン、癌促進性 CAF: SMA)を行い、術前画像にて高硬度を示した膵癌と、低硬度の膵癌において、線維化の程度及びメフリン陽性 CAF の比率が異なった。現在膵癌組織硬度に関連する癌組織および CAF における遺伝子 mutation の検出のため膵癌病理組織標本より Laser microdissection 法にてがん組織を切り出し DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる解析を予定している(実験進行中)。

(論文成果)

Ohno E, et al.

Endosc Ultrasound. 2019 May-Jun;8(3):215-216. doi: 10.4103/eus.eus_6_19.

Ohno E, et al.

J Med Ultrason (2001). 2019 Oct;46(4):425-433

Ohno E, et al.

Digestive Endoscopy Jul-20 doi: 10.1111/den.13791. Online ahead of print.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohno E, Hirooka Y, Kawashima H, Ishikawa T, Tanaka H, Sakai D, Ishizu Y, Kuzuya T, Nakamura M, Honda T	4. 巻 46
2. 論文標題 Feasibility and usefulness of endoscopic ultrasonography-guided shear-wave measurement for assessment of autoimmune pancreatitis activity: a prospective exploratory study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Ultrason	6. 最初と最後の頁 425-433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10396-019-00944-4.	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 -

1. 著者名 Eizaburo Ohno	4. 巻 8
2. 論文標題 1)Feasibility of EUS-guided shear-wave measurement: A preliminary clinical study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endoscopic Ultrasound	6. 最初と最後の頁 215-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/eus.eus_6_19.	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Eizaburo Ohno
2. 発表標題 USEFULNESS OF EUS-GUIDED SHEAR-WAVE MEASUREMENT (EUS-SWM) FOR THE ASSESSMENT OF ACTIVITIES OF AUTOIMMUNE PANCREAS; A PROSPECTIVE EXPLORATORY STUDY
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野栄三郎
2. 発表標題 膵炎症性疾患に対するEUS下腓硬度測定（EUS-Shear Wave Measurement）の臨床的有用性の探索的検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野栄三郎
2. 発表標題 超音波内視鏡下shear-wave elastography による膵硬度測定の探索的検討
3. 学会等名 第92回日本超音波医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾亮、大野栄三郎
2. 発表標題 膵癌患者におけるEUS エラストグラフィ画像所見と予後の関連についての検討
3. 学会等名 第92回日本超音波医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木博貴、大野栄三郎
2. 発表標題 膵における超音波Shear wave dispersion の臨床的意義
3. 学会等名 第92回日本超音波医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eizaburo Ohno
2. 発表標題 Feasibility and limitation of EUS guided shear wave measurement for the pancreas
3. 学会等名 JDDW2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eizaburo Ohno, Yoshiki Hirooka, Hiroki Kawashima, Takuya Ishikawa, Hiroyuki Tanaka, Daisuke Sakai, Ryo Nishio, Tadashi Iida, Hiroataka Suzuki, Kouta Uetsuki, Jun Yashika, Kenta Yamada, Masakatsu Yoshikawa, Noriaki Gibo, Toshinori Aoki, Takeshi Yamamura, Kazuhiro Furukawa, Masanao Nakamura, Ryoji Miyahara
2. 発表標題 Feasibility of endoscopic ultrasound-guided shear-wave measurement: a preliminary clinical study
3. 学会等名 EUS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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	川嶋 啓揮 (Kawashima Hiroki) (20378045)	名古屋大学・医学部附属病院・准教授 (13901)	
研究分担者	廣岡 芳樹 (Hirooka Yoshiki) (50324413)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	宮原 良二 (Miyahara Ryoji) (50378056)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	中村 正直 (Nakamura Masanao) (60467321)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	石川 卓哉 (Ishikawa Takuya) (00792649)	名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------