

新しい膵外分泌機能検査の開発

研究報告者 丹藤雄介 弘前大学医学部附属病院内分泌代謝内科学 講師

共同研究者

今 昭人, 近澤真司, 佐藤江里, 松本敦史, 松橋有紀, 田中 光, 柳町 幸
(弘前大学医学部附属病院内分泌代謝内科学)

中村光男 (弘前大学医学部保健学科病因・病態検査学)

下瀬川徹 (東北大学病院)

ワーキンググループ委員

【研究要旨】

慢性膵炎の診断や膵外分泌不全に対する治療の評価に、感度が良好で低侵襲かつ簡便に施行できる膵外分泌機能検査の必要性が指摘されているが、現在保険診療で認められており実施可能な検査はPFD[®]試験のみである。GLP-1は、膵β細胞からインスリンを分泌させるインクレチンホルモンであり糖尿病治療薬として臨床的に使用されているが、ラット膵腺房細胞においてGLP-1はc-AMPを増加させ、Ca²⁺存在下でアミラーゼを分泌させることも知られている。今回われわれは、インクレチンを利用した膵外分泌機能評価の可能性を検討した。対照は糖尿病の治療にインクレチン関連薬を使用した14名(GLP-1 receptor agonist 5名, DPP-4 inhibitor 9名)で、それぞれの治療開始および治療開始2週間後に血中膵酵素、PFD[®]試験を施行した。血中P型アミラーゼは3名で正常基準値(>60 U/L)を超えて上昇した。腹痛・背部痛などの膵炎症状を示した被験者はなかった。GLP-1 receptor agonist 使用患者においてPFD[®]試験の増幅傾向(p=0.08)を認めた。GLP-1負荷によるPFD[®]試験の感度増幅は、外分泌機能検査に関する問題を解決する糸口となる可能性がある。

A. 研究目的

膵外分泌機能評価は、膵疾患患者の病期把握や予後予想に必要であり、消化酵素補充療法導入の目安としても重要である。しかし現在、臨床的に実施可能な膵外分泌機能検査はPFD[®]試験のみである。この検査は機能低下を幅広く検出可能ではあるが、軽度機能低下の判定にはバラツキが大きく、一方で便中脂肪量との相関からのカットオフ値が検討されていないため、膵外分泌の機能不全(40 g以上の脂肪摂取で脂肪便5 g以上と定義される)と機能低下の混乱を招いている。¹³C-BTA呼気試験はまだ保険適用がなく、蓄便による便中脂肪量の測定は、分析が煩雑、検体取り扱いに難があるなどの理由により、一部の施設で研究目的にしか施行されていない。海外でスクリーニングとして用いられている糞便中エラスターゼ1濃度の測定も、bacterial overgrowthなどの影響があるな

ど問題が多い。そこで、膵外分泌機能が定量化でき、検体採取に侵襲が少なく、検体取り扱いが煩雑ではない新しい検査法の確立が求められている。

本研究では、特に早期の機能低下を検出する機能試験の開発を目的に、GLP-1負荷によるPFD[®]試験の感度増幅について検討した。昨年度のデータを踏まえ、本年度はDPP-4 inhibitorで間接的にGLP-1濃度を高めることによって、GLP-1 receptor agonistと同様の効果が認められるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

治療目的でExendin-4またはsitagliptinを導入した2型糖尿病患者の、導入前と導入2週間後にPFD[®]試験を施行し、膵外分泌機能を比較検討した。すなわちExendin-4またはsitagliptinによる膵外分泌刺激および非刺激で

差が生じ、インクレチン負荷試験として膵外分泌機能を評価することが可能かどうかを検討した。統計的手法にはウィルコクソンの符号付順位検定を用いた。

(倫理面への配慮)

PFD 試験の実施および臨床検査値の解析については、十分な説明に基づく同意を得て行い、個人情報保護に十分配慮した。

C. 研究結果

治療上の必要性があり Exendin-4 導入が予定となった 2 型糖尿病患者 5 例(男性 3 例, 女性 2 例)から同意を得, PFD[®] 試験を施行した。さらに, 経口血糖降下薬である sitagliptin が導入予定となった 2 型糖尿病患者 9 例(男性 4 例, 女性 5 例)からも同様に同意を得, PFD[®] 試験を施行した。PFD[®] 試験と同時に血中膵型アミラーゼおよび血中リパーゼを測定し

た。2 型糖尿病患者における PFD[®] 試験の結果は, Exendin-4 投与前が平均 $75.66 \pm 8.0\%$ であり, Exendin-4 投与後が平均 $83.56 \pm 5.3\%$ と Exendin-4 投与後が有意ではないが高値傾向 ($p = 0.08$) で, 増加の程度は平均 7.9 ± 7.0 ポイントあった(図 1)。一方, sitagliptin 投与前は平均 $83.11 \pm 11.2\%$, sitagliptin 投与後は平均 $70.82 \pm 5.0\%$ ($p = 0.28$) であった(図 1)。血中膵型アミラーゼは Exendin-4 導入患者で 2 例, sitagliptin で 1 例, 正常者標準値を超えて高値となったが, 血中リパーゼは変化を認めなかった。(図 2, 表 1)。試験期間中に腹痛や背部痛などの膵炎症状を示した被験者はいなかった。

D. 考察

現在我が国で保険診療上実施可能な膵外分泌機能検査は PFD[®] 試験のみである。慢性膵炎の診断や膵外分泌機能に対する治療法の評価のために, さらに感度が良好で低侵襲かつ簡便に施行できる膵外分泌機能検査の必要性が指摘されている。欧米においては侵襲的ではあるが膵機能検査法の gold standard とされるセクレチン試験が, FDA 認可の合成ヒトセクレチン (*ChiRhoStim*[®]) を使用して施行されているため, さまざまな試験をセクレチン試験との比較で検討することが可能である。本邦ではすでにセクレチンは販売されておらず, 欧米からの個人輸入かつ厚生労働省許可で使用となるため, それらの問題を解決し, 今回のインクレチンを使用した PFD[®] 試験増幅法と実際の膵機能の相関を検討しなければならない。一方で, 欧米ではスクリーニング検査として糞便中エラス

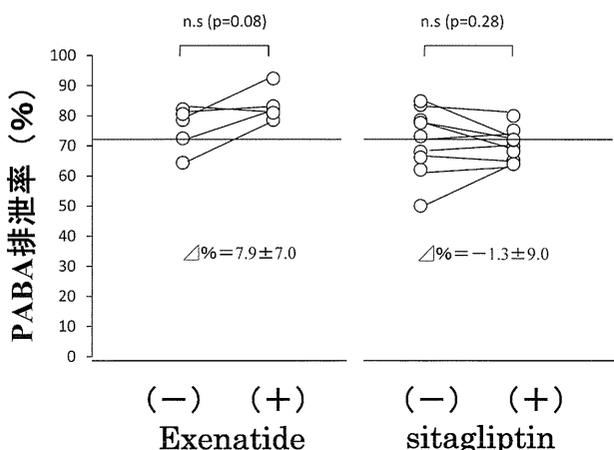


図 1 Exenatide および sitagliptin 負荷による PFDtest 結果の変化

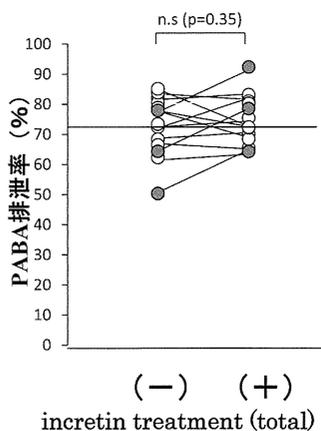


図 2 インクレチン負荷による PFDtest 結果の変化 (filled circle はアミラーゼの上昇を認めた症例)

表 1 インクレチン負荷による検査値の変化

		mean ± SD		
		前	後	P 値
Total	p-amy	29.86 ± 8.1	41.0 ± 28.4	0.21
	lipase	30.5 ± 13.7	34.9 ± 16.0	0.38
	PFD	73.25 ± 9.9	75.37 ± 8.0	0.35
Exenatide	p-amy	34.4 ± 5.9	64.6 ± 36.8	0.14
	lipase	37.8 ± 11.6	44.8 ± 11.2	0.29
	PFD	75.66 ± 8.0	83.56 ± 5.3	0.08
Sitagliptin	p-amy	27.33 ± 8.2	27.89 ± 9.8	0.89
	lipase	26.44 ± 13.6	29.22 ± 16.1	0.64
	PFD	83.11 ± 11.2	70.82 ± 5.0	0.28

ターゼ1濃度や糞便中キモトリプシン活性の測定も行われている。これらの検査は、bacterial overgrowthの影響も受けやすい¹⁾とされ、高感度とは言えないものの、糞便中エラスターゼ<200 μg/day程度の軽度膵外分泌機能低下とされる範囲において、今回のインクレチンを使用したPFD[®]試験増幅法との相関を検討する意義はあると考えられる。

さらに、現在、松本、中村らによって検討中のBenzoyl-L-Tyrosyl-[1-¹³C]Alanineを基質とした¹³C-BTA法²⁾は、一定の条件下で膵外分泌機能不全(40g以上の脂肪摂取で脂肪便5g以上と定義)の検出に有用である。この方法は、安定同位体¹³Cで標識した基質を経口的に投与し、一定間隔で回収した呼気CO₂中の¹³C/¹²C存在比の変化を検討することで、その基質の消化吸収のされ方を評価する方法である。この原理では、膵外分泌は刺激されず、基礎分泌を判定していることになる。インクレチンを使用することによって刺激された膵機能を検査することも可能と考えられ、今後検討が必要である。

今回、検討したGLP-1 receptor agonist Exendin-4(Byetta[®])は、膵β細胞からインスリンを分泌させる作用の他、ラットにおいて膵腺房細胞のc-AMPを増加させ、Ca²⁺存在下でアミラーゼを分泌させることが知られている³⁾。膵疾患が疑われる患者にExendin-4を単回使用することの安全性は検討されなければならない⁴⁾が、膵外分泌機能が低下していない糖尿病患者において、PFD[®]試験の結果が増加していることより、この方法によって軽度の機能低下を評価できる可能性が示唆される。一方DPP4 inhibitorは内因性GLP-1のDPP-4による分解を阻害する事で、インクレチン作用を示すが、その際のGLP-1濃度は、通常時の3~5倍程度とされている。内服の方が侵襲は少なく簡便であると考えたが、今回の検討でDPP4 inhibitor服用前後でのPFD[®]試験の検査値に変化がなかったことより、この濃度でのGLP-1の膵外分泌刺激作用は弱いものであると考えられた。

E. 結論

PFD試験をExendin-4による膵刺激下、膵非刺激下で施行し、その結果を比較することで、膵外分泌機能を評価できる可能性が示唆された。一方、Exendin-4の代わりにDPP-4インヒビターを用いた場合は、PABA排泄率に変化は無かった。膵刺激の程度等の基礎的検討、試験条件、安全性などを検討しながら、その実用性についてさらに検討する必要がある。

F. 参考文献

1. Hahn JU, Kerner W, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lankisch PG. Low fecal elastase 1 levels do not indicate exocrine pancreatic insufficiency in type-1 diabetes mellitus. *Pancreas* 36(3): 274-278, 2008.
2. Matsumoto A, Tando Y, Yanagimachi M, Tanaka H, Mikami E, Suda T, Nakamura T. Study of the reserve capacity of total pancreatectomy patients based on fecal fat excretion and the Benzoyl-L-tyrosyl- [1-¹³C] alanine breath test. *安定同位体と生体ガス 医学応用* 4(1): 4-17, 2012
3. Malhotra R, Singh L, Eng J, Raufman JP. Exendin-4, a new peptide from Heloderma suspectum venom, potentiates cholecystokinin-induced amylase release from rat pancreatic acini. *Regul Pept.* 41(2): 149-56, 1992
4. 丹藤雄介, 佐藤江里, 中村光男. インクレチン関連薬と膵炎. *Medical Practice* 29(1): 106-110, 2012.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

Elasticity Imaging (shear wave 法)による膵弾性の評価

研究報告者 廣岡芳樹 名古屋大学医学部附属病院光学医療診療部 准教授

共同研究者

小嶋聡一（理化学研究所分子リガンド生物研究チーム）、桐田暁子（理化学研究所分子リガンド生物研究チーム）
堀口明彦（藤田保健衛生大学胆膵・総合外科）、入澤篤志（福島県立医科大学会津医療センター準備室）
伊藤鉄英（九州大学大学院病態制御内科学）、糸井隆夫（東京医科大学 消化器内科）
竹原康雄（浜松医科大学医学部附属病院放射線部）、山口武人（千葉県がんセンター）
春日井俊史（袋井市立袋井市民病院消化器科）、石川卓哉（名古屋第一赤十字病院消化器内科）
伊藤裕也（名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科学）、桑原崇通（名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科学）

【研究要旨】

【目的】 Elasticity Imaging (shear wave 法) (以下 SW 法) は、組織内に shear wave (剪断弾性波) を発生させ、その速さの測定により組織の弾性率 (kPa) を算出する方法である。SW 法により臓器の組織弾性を弾性率として定量化することが可能となったが、膵に対する報告は少ない。今回、再現性のある膵弾性の測定方法の確立と、疾患別の弾性を示すことを目的として検討を行った。

【方法】 2012年10月から12月までの3か月間に、膵に対して Philips 社製 iU22 (elastPQ) を使用して、SW 法により膵の弾性率を測定した55例を対象とした。弾性率は、同じ部位にて5回の評価可能な値を得られるまで繰り返し測定し、5回の弾性率の平均値を算出した。全測定回数に対し、弾性率を測定し得た回数の割合を測定成功率と定義し、測定成功率が60%以下のものは検討から除外し、以下の3項目につき検討した。1) 正常膵における測定成功率と、測定成功率に寄与する因子。2) 正常膵における弾性率の5回測定の再現性。3) 各疾患別の膵弾性率の比較。

【結果】 1) 測定成功率は平均80.6%であった。全55例中、50例が検討対象、5例が検討対象外となった。検討対象外5例中2例が測定不能、3例が測定成功率60%以下であった。測定成功率と相関する因子については、膵と腹部大動脈との距離のみ有意に相関 ($r_s = 0.65$; $P < 0.01$) を示した。2) 膵弾性率を被験者に1回測定した時の級内相関係数 ICC (1, 1) は $\rho = 0.451$ (95% CI: 0.29–0.61)、5回測定した時の級内相関係数 ICC (1, 5) は $\rho = 0.80$ (95% CI: 0.68–0.89) であった。3) 正常膵、慢性膵炎、膵癌、腫瘤形成性膵炎の弾性率 (kPa) は 3.30 ± 1.87 , 9.45 ± 7.06 , 18.1 ± 16.1 , 44.1 ± 31.5 であった。正常膵に比して膵癌と慢性膵炎の弾性率は有意に高かった (膵癌: $P = 0.012$ ・慢性膵炎: $P = 0.001$)。

【結論】 膵弾性を再現性高く測定可能な SW 法は、新たな膵疾患診断法の一つになり得る。

A. 研究目的

慢性膵炎は膵線維化の進行と共に、膵外分泌・内分泌機能の低下から栄養障害や糖尿病を発症し、生命予後の短縮、QOLの低下をきたす疾患である¹⁾。進行した慢性膵炎の多くは治療による予後改善が得られにくいいため、慢性膵炎の予後を改善するには、慢性膵炎を早期に診断し、早期より積極的に治療介入する必要がある¹⁾。慢性膵炎を早期に診断することは臨床的に重要な課題であり、難治性膵疾患に対する調査研究班(下瀬川班)では“膵線維化の鋭敏な検

出法の開発”を研究課題として取り上げている。

Elasticity Imaging は組織弾性を画像化できる超音波診断技術であり、腫瘍や線維化などの硬い組織を検出することが可能である^{2~5)}。肝臓領域においては肝線維化の進行度を高精度に診断できることが報告されており⁵⁾、その技術は膵線維化診断にも応用可能と考えられる。名古屋大学では、2004年より Elasticity Imaging (strain 法) を膵臓に実施し、その臨床的有用性を報告してきた^{1~3)}。2012年からは Elasticity Imaging (shear wave 法: SW 法) による検討も

開始した。そこで、SW法による再現性のある膵弾性の測定方法の確立と、膵疾患に対する有用性を検討することを目的として本研究を計画した。

B. 研究方法

対象：2012年10月から12月の3ヶ月間に、膵に対して Philips 社製 iU22 (elastPQ) を使用して、SW法により膵の弾性率を測定した55例を後ろ向きに検討した。55例の平均年齢は62.8歳、男女比は33：22であった。疾患の内訳は正常膵39例、慢性膵炎10例、膵癌4例、腫瘤形成性膵炎2例であった。慢性膵炎10例の診断基準別の内訳は、確診5例、準確診2例、早期慢性膵炎3例であった。

方法：弾性率は5回の評価可能な値が得られるまで繰り返し測定し、測定成功率が60%以下のものは検討から除外した。各疾患の定義は、2009年慢性膵炎臨床診断基準⁴⁾を満たす例を慢性膵炎例、満たさない例を正常例と診断し、膵癌と腫瘤形成性膵炎は手術またはEUS-FNAによる組織診の結果で診断した。慢性膵炎と正常膵は、膵頭部または膵体部、膵癌と腫瘤形成性膵炎は病変部の弾性率を測定した。以下3項目につき検討した。1)正常膵における測定成功率と、測定成功率に寄与する因子(年齢、性別、BMI、皮下脂肪、膵と体表の距離、膵と大動脈の距離)。2)正常膵における弾性率の5回測定の再現性、3)各疾患別の膵弾性率の比較。統計学的手法として1), 2), 3)に関してそれぞれ、Spearmanの順位相関係数、級内相関係数(ICC)、Kruskal-Wallis test・Mann-Whitney U-testを使用した。

倫理面への配慮：

本研究は通常行われる医療行為を後ろ向きに検討した研究であり、研究対象者へのインフォームドコンセントやIRBの承認は特に取得しなかったが、現在、前向き研究のためにIRB申請中である。また本研究に関して、関連企業や営利団体との利益相反関係は一切認めない。

C. 研究結果

1)測定成功率は平均80.6%であった。全55例中、50例が検討対象、5例が検討対象外となった。検討対象外5例はすべて正常膵例で、2例が測定不能、3例が測定成功率60%以下であった。測定不能の原因は膵の描出困難、測定成功率60%以下の原因は血管の拍動による影響であった。測定成功率と相関する因子については、膵と腹部大動脈との距離のみ有意に相関($r_s=0.65$ ； $P<0.01$)を示した。

2)膵弾性率を被験者に1回測定した時の級内相関係数 ICC(1, 1)は $\rho=0.451$ (95%CI：0.29-0.61)、5回測定した時の級内相関係数 ICC(1, 5)は $\rho=0.80$ (95%CI：0.68-0.89)で、5回測定で95%CIの下限值が $\rho=0.60$ を超えた。再現性の高い膵弾性率の測定には、5回以上の測定が必要と考えられた。

3)正常膵、慢性膵炎、膵癌、腫瘤形成性膵炎の弾性率(kPa)は 3.30 ± 1.87 , 9.45 ± 7.06 ・ 18.1 ± 16.1 , 44.1 ± 31.5 (図1)であった。正常膵に比して膵癌と慢性膵炎の弾性率は有意に高かった(膵癌： $P=0.012$ ・慢性膵炎： $P=0.001$)。膵癌例の背景膵、腫瘤形成膵炎の背景膵は、 3.57 ± 1.84 , 12.42 ± 5.37 であった。背景膵に比して膵癌と腫瘤形成膵炎の弾性率は共に有意差は認めなかった(膵癌： $P=0.07$ ・腫瘤形成膵炎： $P=0.11$)。慢性膵炎の診断と弾性率に対してROC曲線を作成し、cut-off値を4.24 kPaに設定すると、感度80%、特異度73

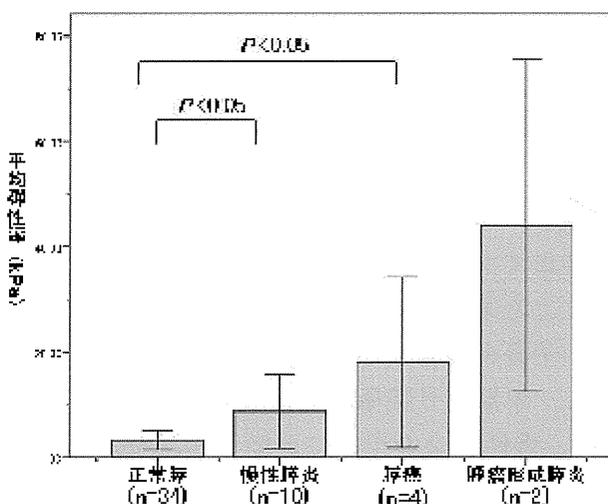


図1 疾患別の弾性率

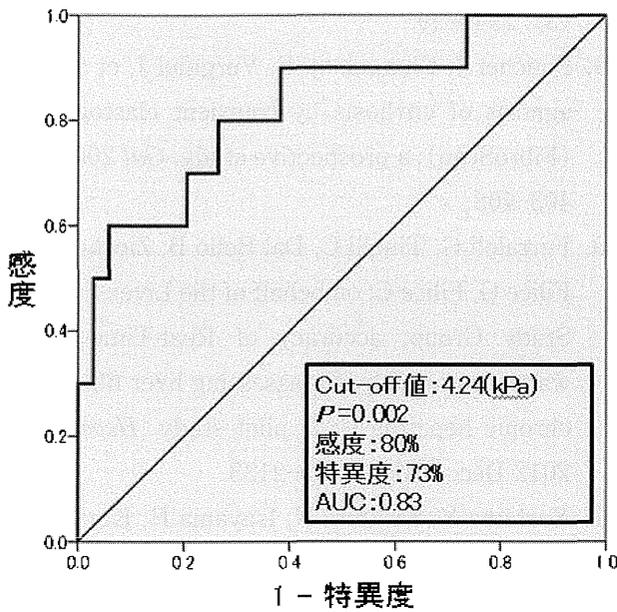


図2 ROC 曲線(慢性膵炎の診断・弾性率)

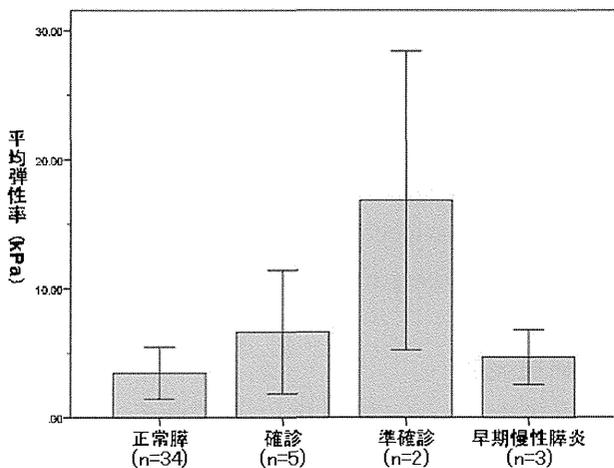


図3 慢性膵炎の各診断別の弾性率

%, AUC 0.83で慢性膵炎の診断が可能であった(図2)。慢性膵炎の確定例, 準確定例, 早期慢性膵炎の弾性率(kPa)は, 6.62 ± 4.78 , 16.8 ± 11.9 , 4.67 ± 2.01 で, すべての診断群で正常膵に比して弾性率は高かった(図3)。

D. 考察

現在日常臨床で用いられている慢性膵炎診断技術の多く(CT, MRI, ERCP, BT-PABA 試験)は, 膵線維化進行度(早期の膵線維化を含む)を診断することはできない。唯一超音波内視鏡検査のみ, 膵線維化進行度(早期の膵線維化を含む)を診断できることが報告されているが^{6,7)}, 専門性の高い検査であり, 所見が主観的であるなどの問題点もある⁸⁾。そのため膵線維化の進

行度診断には, 客観性の高い新規診断技術の開発・導入が必要と考えられる。客観的な線維化診断として, 肝に対してtransient elastography (TE)が使用され, TEによって測定された弾性率と肝生検による線維化診断結果に相関性があるという報告⁹⁾がある。またSW法も肝に対して使用され始め, TEを上回る正確性を有するという報告¹⁰⁾もある。臓器の違いはあるが, 膵線維化の早期診断, 定量的診断に期待できる結果と考える。

SW法による膵弾性率測定は5回以上弾性率を測定することによって再現性の高い, 信頼が得られる方法になると考えられた。また慢性膵炎だけではなく, 膵癌など腫瘍性病変においても正常膵に比較し有意に高い弾性率を示した。他報告¹¹⁾でも同様な結果が見られ, SW法による膵弾性率測定は, 再現性, 客観性のある新たな疾患診断法になり得ると考えられた。

当研究の問題点としては後ろ向きの研究であること, 症例数が少数であること, 病理結果との比較を行っていないことがあげられる。組織生検では組織学的膵線維化を十分に評価できないため¹²⁾, 肝と同様な手法で膵に対して弾性率と線維化の相関を検討することは容易ではない。また慢性膵炎の手術例は極めて少ないため, 病理検体との比較も困難であるが, 今後手術検体による膵線維化と膵弾性率の比較を行い, 膵線維化と膵弾性率との相関に関して前向きに検討を行う予定である。

E. 結論

Elasticity Imaging (shear wave 法)は新たな膵疾患診断法の一つになり得ると考える。症例を前向きに集積し, 病理組織と弾性率との関連を検討することにより, 膵線維化の鋭敏な検出法の開発へ向け検討を行っていく。

F. 参考文献

1. 厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班, 日本膵臓学会, 日本消化器病学会. 慢性膵炎臨床診断基準2009. 膵臓 2009; 24: 645-708.
2. Uchida H, Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Hara K, Nonogaki K, Kasugai T, Ohno E, Ohm-

- iya N, Niwa Y, Katano Y, Ishigami M, and Goto H. Feasibility of tissue elastography using transcutaneous ultrasonography for the diagnosis of pancreatic diseases. *Pancreas*. 2009; 38(1): 17–22.
3. Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Ohno E, Ishikawa T, Matsubara H, Itoh Y, Nakamura M, Miyahara R, Ohmiya N, Niwa Y, Ishigami M, Katano Y, Goto H. Diagnosis of pancreatic disorders using contrast-enhanced endoscopic ultrasonography and endoscopic elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7(Suppl): S63–S67.
 4. Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Ohno E, Ishikawa T, Itoh Y, Nakamura Y, Hiramatsu T, Nakamura M, Miyahara R, Ohmiya N, Ishigami M, Katano Y, Goto H. Clinical oncology for pancreatic and biliary cancers: Advances and current limitations. *World J Clin Oncol* 2011; 2(5): 217–224.
 5. Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2011; 46(3): 350–358.
 6. Varadarajulu S, Eltoun I, Tamhane A, Eloubeidi MA. Histopathologic correlates of noncalcific chronic pancreatitis by EUS: a prospective tissue characterization study. *Gastrointest Endosc*. 2007; 66(3): 501–509.
 7. Albashir S, Bronner MP, Parsi MA, Walsh RM, Stevens T. Endoscopic ultrasound, secretin endoscopic pancreatic function test, and histology: correlation in chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105(11): 2498–2503.
 8. Wallace MB, Hawes RH, Durkalski V, Chak A, Mallery S, Catalano MF, Wiersema MJ, Bhutani MS, Ciaccia D, Kochman ML, Gress FG, Van Velse A, Hoffman BJ. The reliability of EUS for the diagnosis of chronic pancreatitis: interobserver agreement among experienced endosonographers. *Gastrointest Endosc*. 2001; 53(3): 294–299.
 9. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, et al : Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55: 403–408.
 10. Ferraioli G, Tinelli C, Dal Bello B, Zicchetti M, Filice G, Filice C; on behalf of the Liver Fibrosis Study Group: accuracy of Real-Time shear wave elastography for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis C: A pilot study. *Hepatology*. 2012 Dec; 56(6): 2125–2133.
 11. Yashima Y, Sasahira N, Isayama H, Kogure H, Ikeda H, Hirano K, Mizuno S, Yagioka H, Kawakubo K, Sasaki T, Nakai Y, Tada M, Yoshida H, Omata M, Koike K. Acoustic radiation force impulse elastography for noninvasive assessment of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2012 Apr; 47(4): 427–432.
 12. DeWitt J, McGreevy K, LeBlanc J, McHenry L, Cummings O, Sherman S. EUS-guided Trucut biopsy of suspected nonfocal chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc*. 2005; 62(1): 76–84.
- G. 研究発表**
1. 論文発表 該当なし(論文報告を予定)
 2. 学会発表 該当なし(学会報告を予定)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得 該当なし
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし

慢性膵炎の早期診断に対するプロテアーゼ依存 TGF- β 活性化反応を 標的とした新規線維化診断法の臨床的有用性に関する多施設共同研究

研究報告者 廣岡芳樹 名古屋大学医学部附属病院光学医療診療部 准教授

共同研究者

小嶋聡一（理化学研究所分子リガンド生物研究チーム）、桐田暁子（理化学研究所分子リガンド生物研究チーム）
堀口明彦（藤田保健衛生大学胆膵・総合外科）、入澤篤志（福島県立医科大学会津医療センター準備室）
伊藤鉄英（九州大学大学院病態制御内科学）、糸井隆夫（東京医科大学 消化器内科）
竹原康雄（浜松医科大学医学部附属病院放射線部）、山口武人（千葉県がんセンター）
春日井俊史（袋井市立袋井市民病院消化器科）、石川卓哉（名古屋第一赤十字病院消化器内科）
伊藤裕也（名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科学）、桑原崇通（名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科学）

【研究要旨】

線維化初期マーカー TGF- β LAP 断片は、プロテアーゼ依存 TGF- β 活性化反応にて産生される副産物であり、初期の線維化マーカーとしての役割が期待されている。そこで慢性膵炎の早期診断に対する TGF- β LAP 断片の有用性を検討する事を目的に本多施設共同研究を計画した。検討項目は以下2項目である。検討1) 血漿 TGF- β LAP 断片濃度を測定し、慢性膵炎の5つの診断区分(慢性膵炎確診、慢性膵炎準確診、早期慢性膵炎、慢性膵炎疑診及び早期慢性膵炎疑い)との関連を検討する。検討2) 研究期間内の膵切除例に対しては、切除膵における病理組織学的及び分子生物学的解析を詳細に行い、プロテアーゼ依存 TGF- β 活性化反応の慢性膵炎診断に対する有用性を探索的に検討する。本研究の有用性が明らかになれば、血液検査で早期の慢性膵炎を診断できるようになり、より低侵襲で客観性の高い診断方法の提供が可能になる。

A. 研究目的

慢性膵炎は膵線維化の進行とともに、膵外分泌・内分泌機能の低下から栄養障害や糖尿病を発症し、生命予後の短縮、QOLの低下をきたす疾患である¹⁾。進行した慢性膵炎の多くは治療による予後改善が得られにくいため、慢性膵炎の予後を改善するには、慢性膵炎を早期に診断し、早期より積極的に治療介入する必要がある¹⁾。慢性膵炎を早期に診断することは臨床的に重要な課題であり、難治性膵疾患に対する調査研究班(下瀬川班)では“膵線維化の鋭敏な検出法の開発”を研究課題として取り上げている。

一方 TGF- β は、①細胞増殖抑制、②細胞外基質産生促進活性、③上皮-間葉細胞分化転換誘導活性、の三大活性を介して、肺線維症、肝硬変、腎炎、増殖性網膜症、心筋梗塞、嚢胞性線維症、強皮症など様々な組織の線維症と深く

かかわっているサイトカインである²⁾。そこで線維化における TGF- β シグナルの研究が精力的に進められ、TGF- β 活性化経路の一つとしてプロテアーゼ依存 TGF- β 活性化反応(図1)が発見された^{3,4)}。現在本活性化反応を標的とした線維化診断法の開発(図2)が試みられており⁵⁾、血漿 TGF- β LAP 断片は初期の肝線維化を検出できる可能性が報告されている⁶⁾。一方肝線維化で中心的役割をなす肝星細胞と膵線維化の中心的役割をなす膵星細胞とは、発現遺伝子の大部分が類似しているといわれており⁷⁾、本活性化反応は膵臓における初期の線維化にも関与している可能性が高い。そこで本活性化反応を標的とした線維化診断法の、慢性膵炎早期診断に対する臨床的有用性を検討することを目的に本多施設共同研究を計画した。

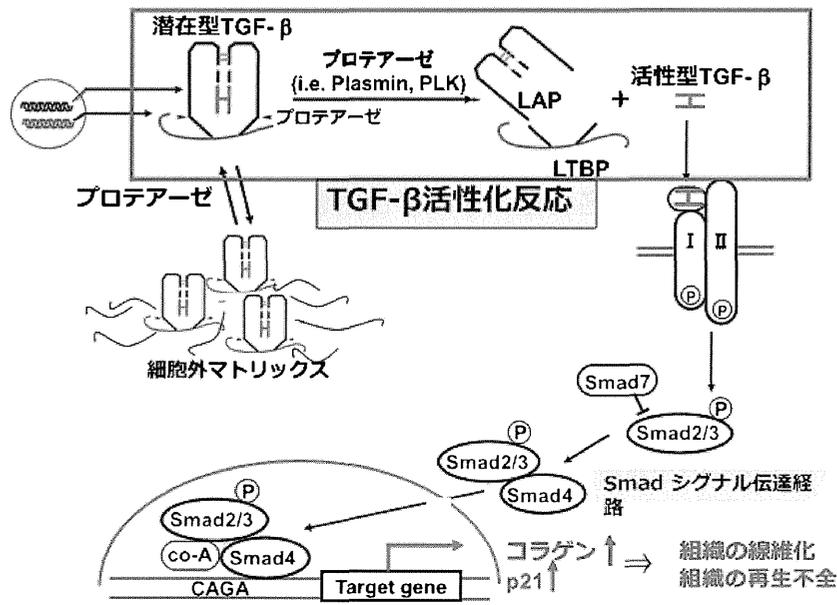


図 1

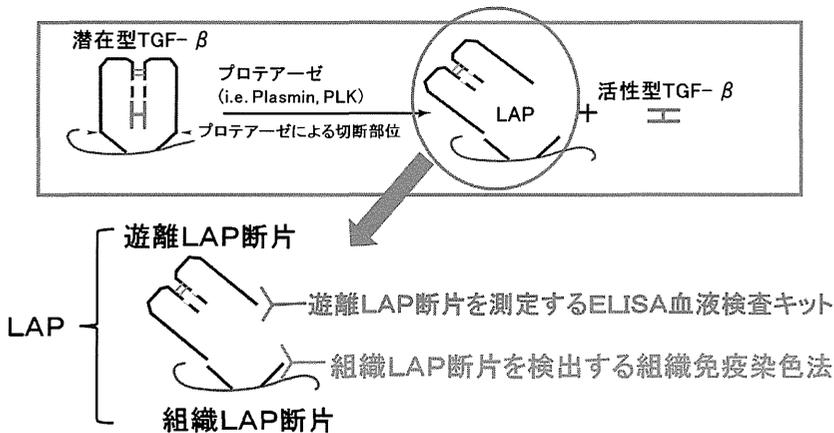


図 2

B. 研究方法

対象：

名古屋大学消化器内科及び共同研究機関において、「慢性膵炎臨床診断基準2009」を用いて「慢性膵炎確診」，“慢性膵炎準確診”，“早期慢性膵炎”，“慢性膵炎疑診” 或いは “早期慢性膵炎疑い” と診断され、且つ患者の同意が得られた症例。

目標症例数：

「慢性膵炎臨床診断基準2009」における各診断区分(慢性膵炎確診，慢性膵炎準確診，早期慢性膵炎，慢性膵炎疑診，早期慢性膵炎疑い) 20例の全100例。

研究期間：

平成24年1月から，平成26年10月まで。

研究の概要①：

登録全症例の血漿 TGF-β LAP 断片濃度を測定し，慢性膵炎各診断区分(慢性膵炎確診，慢性膵炎準確診，早期慢性膵炎，慢性膵炎疑診及び早期慢性膵炎疑い)との関連を検討する。

研究の概要②：

研究期間内の膵切除例に対しては，切除膵における病理組織学的及び分子生物学的解析を詳細に行い，プロテアーゼ依存 TGF-β 活性化反応の慢性膵炎診断に対する有用性を探索的に検討する。具体的には切除膵組織をモノクローナル抗体にて免疫染色し，切除膵における LAP 断片の発現を観察する。また分子生物学的解析としては以下の4つの実験を行う。

1) in vitro PSC(膵星細胞)を用いて，PSCの活性化(=αSMAの発現)に伴い，培養液中に放出される LAP 断片と活性型 TGF-β の量

をそれぞれの ELISA で定量し、三者の相関をみる。

2) in vitro PSC を用いて、PSC の活性化に伴い生成、細胞表面に残る LAP 断片と α SMA との蛍光二重染色を行い、両者の相関をみる。

3) in vitro PSC を用いて、TGF- β を切断活性化する本体である細胞表面の血漿カリクレイン-uPAR 複合体が増えることを確かめる。

4) 1)~3) を uPAR (血漿カリクレインのレセプター) 高発現細胞や PLK siRNA KD (血漿カリクレイン産生をノックダウンした) 細胞、FOY (血漿カリクレイン活性を阻害する) 投与細胞で施行し、TGF- β 活性化反応の亢進または抑制の有無を検討する。

尚、血漿 TGF- β LAP 断片濃度の測定、組織 TGF- β LAP 断片に対する免疫染色及び TGF- β 活性化反応のメカニズム解析は、すべて独立行政法人理化学研究所に委託して行う。

倫理面への配慮：

本研究は名古屋大学医学部附属病院 IRB (承認番号：1313) および独立行政法人理化学研究所倫理委員会 (承認番号：和光第三18-13(8)) の承認をうけ、ヘルシンキ宣言に準拠して施行する。実施に当たっては、文書および口頭にて被験者の同意を取得する。研究の参加は被験者の自由意思である。研究途中であっても、口頭もしくは文書による同意の撤回は可能である。たとえ研究の参加に同意されなくても、本研究以外に享受出来る診療に不利益を生じることはない。同意の撤回とともに、管理している試料はすべて復元不可能な状態に処理する (試料は、匿名化されていることを確認後感染性廃棄物として処理、印刷物等はシュレッダーで粉碎して廃棄、電子情報はディスクをフォーマットするなどして消去する)。論文もしくは学会等での発表は、個人を特定できない形式で行う。各共同研究機関と名古屋大学、或いは理化学研究所間での検体および診療情報の移動は、匿名化した状態で行う。本研究に関して、関連企業や営利団体との利益相反関係は一切認めない。

C. 研究結果

平成23年10月に独立行政法人理化学研究所

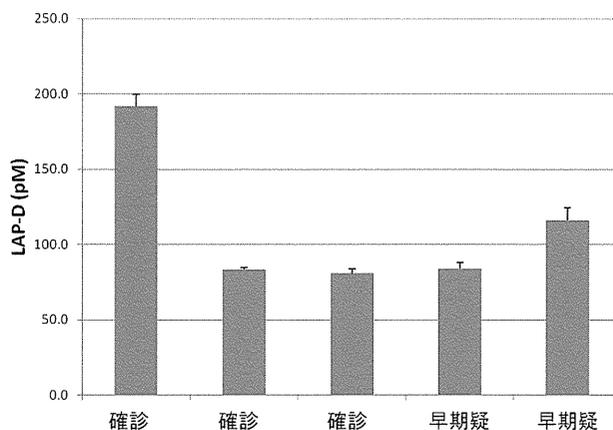


図 3

倫理委員会の承認を得て、平成24年1月に名古屋大学医学部附属病院 IRB に承認された。平成24年1月より症例集積を開始し、平成24年12月31日までに名古屋大学より16例 (手術例1例) を登録し、その内の5例について解析 (理化学研究所) を終了している。

5例の内訳は、慢性膵炎確診例3例、早期慢性膵炎疑い例2例であり、各群の TGF- β LAP 断片の平均値は、それぞれ118.6 (80.8-191.8)、99.8 (83.6-115.9) であった (図 3)。確診例においてやや高値を示したが、一定の傾向は認めていない。

D. 考察

今後の展望は名古屋大学にて症例集積を継続し、併行して理化学研究所での解析を行う。本研究の有効性を確認するには、更なる症例集積が必要であり、経過観察による検査値の遂移を観察する必要がある。研究の忍容性、有効性が確認された暁には、多施設共同研究へと移行したい。本研究の有用性が明らかになれば、血液検査で早期の慢性膵炎を診断できるようになり、低侵襲で客観性の高い診断方法の提供が可能になるため、早期の研究完了を目標とする。

E. 結論

慢性膵炎早期診断に対する TGF- β LAP 断片の有用性に関する多施設共同研究を計画した。現在、代表施設にて本研究の忍容性および有効性を確認中である。

F. 参考文献

1. 厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班, 日本膵臓学会, 日本消化器病学会: 慢性膵炎臨床診断基準2009. 膵臓 2009; 24: 645-708.
2. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1286-92.
3. Okuno M, Akita K, Moriwaki H, et al. Prevention of Rat Hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- β . *Gastroenterology.* 2001; 120: 1784-800.
4. Akita K, Okuno M, Enya M, et al. Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF- α /kallikrein-mediated activation of latent TGF- β . *Gastroenterology.* 2002; 123: 352-364.
5. 原 詳子, 小嶋聡一: TGF- β と線維症—TGF- β を標的とした線維症の予防・治療法, 診断法開発の試み. 医学のあゆみ 2010; 10: 977-82.
6. 原 詳子, 桐田暁子, 松浦知和, 他: プロテアーゼ依存 TGF- β 活性化反応副産物(LAP 断片)の初期線維化マーカーとしての有用性検討. 肝臓 2011; 52(Suppl. 1): A359.
7. Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, et al. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med.* 2005; 83: 795-805.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

新規線維化診断技術として, ①モノクローナル抗体を用いて血漿 TGF- β LAP 断片濃度を測定する血液検査キット(ELISA), および②モノクローナル抗体を用いて組織に残った TGF- β LAP 断片を検出する免疫染色法が開発され, 米国および本国にて特許申請済みである(特許 US7, 803, 553; JP 4653660).

2. 実用新案登録 該当なし(予定もなし)
3. その他 該当なし(予定もなし)

膵癌の疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例の Profile

研究報告者 佐田尚宏 自治医科大学消化器・一般外科 教授

共同研究者

黒河内顕, 遠藤和洋, 兼田裕司, 小泉 大, 笹沼英紀 (自治医科大学消化器・一般外科)

【研究要旨】

慢性膵炎の手術適応のひとつに「膵癌との鑑別困難例」が挙げられている。膵機能温存の観点からも不要な膵切除は避ける必要があり、膵癌・慢性膵炎の鑑別は、膵疾患診断において残された重要な課題である。診療ガイドライン2009では、「慢性膵炎と鑑別すべき疾患としては膵癌が最も重要であり、腫瘍形成性膵炎と膵癌の鑑別が困難な例がある。」と述べられているが、その具体例の提示はなく、鑑別診断の方法についても言及していない。厚生労働省難治性疾患等克服研究事業難治性膵疾患に関する調査研究班に参加する61施設を対象に、2001-2011年の期間において、1.膵癌疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例と、2.非膵癌と考え経過観察した膵癌症例について症例の症例数および Profile 調査を行った。1.膵癌疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例は79例報告された。術後診断の内訳は、自己免疫性膵炎27例、慢性膵炎45例、その他7例であった。そのうち9例に、術前に生検や細胞診にて class IV, V を認めた。2.非膵癌と考え経過観察した膵癌症例は16例が報告された。観察開始時診断は、自己免疫性膵炎2例、慢性膵炎10例、その他3例であった。今回 Profile 調査を実施して、膵癌の術前診断の困難性を再認識し、比較検討すべき興味深い点を見出せた。今後、画像・病理を含め詳細な分析を行い、ワーキンググループを組織し、アトラスの作成を企画する予定である。

A. 研究目的

慢性膵炎の手術適応のひとつに「膵癌との鑑別困難例」が挙げられている。膵機能温存の観点からも不要な膵切除は避ける必要があり、膵癌・慢性膵炎の鑑別は、膵疾患診断において残された重要な課題である。診療ガイドライン2009¹⁾では、「CQ1-11慢性膵炎と鑑別すべき疾患にはどのようなものがあるか？(膵癌との鑑別は容易か?)」という Clinical Question が設定されており、その Statement では「慢性膵炎と鑑別すべき疾患としては膵癌が最も重要であり、腫瘍形成性膵炎と膵癌の鑑別が困難な例がある。」と述べられている。しかし、その具体例の提示はなく、鑑別診断の方法についても、modality として、US, CT, MRI, MRCP, ERCP, EUS, FDG-PET が列挙されているに過ぎない。今後、膵癌・慢性膵炎の鑑別診断法をより具体化することが必要である。

本研究の目的は、膵癌疑いで切除される症例 Profile を類型化し、不要な切除を可能な限り

回避するための方法を考察することである。

B. 研究方法

厚生労働省難治性疾患等克服研究事業難治性膵疾患に関する調査研究班における共同研究として膵癌疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例 Profile 調査を企画した。自治医科大学附属病院倫理委員会の承認を得て、同研究班に参加する61施設を対象に、2001-2011年の期間において、1.膵癌疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例と、2.非膵癌と考え経過観察した膵癌症例について症例の症例数および Profile 調査を行った。まず1次調査票(症例の抽出)を参加61施設に送付、28施設から症例数の報告を得た。続いて2次調査票(Profile 調査)を送付し、24施設から回答を得た。

C. 研究結果

1. 膵癌疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例 79例が報告された。術後診断の内訳は、自

己免疫性膵炎27例，慢性膵炎45例，その他7例であった。詳細な検討では，自己免疫性膵炎例の6例に，術前に生検や細胞診でclass IV，Vを認めた。その6例中2例はEUS下穿刺吸引細胞診でのclass IVであった。自己免疫性膵炎において手術回避のために，複数の施設からステロイドの使用が提案された。

慢性膵炎例の3例にも膵管擦過細胞診でclass Vを認めた。その他，診断根拠としてEUSでの低エコー腫瘍の存在を挙げる症例が11例みられた。症例毎の手術回避のために，7例でEUS下穿刺吸引細胞診の施行を提言された。

2. 非膵癌と考え経過観察した膵癌症例

16例が報告された。観察開始時診断は，自己免疫性膵炎2例，慢性膵炎10例，その他3例であった。その他の内訳は，急性膵炎，良性乳頭狭窄，後腹膜線維症であった。全16例の経過中に手術が施行された例が9例あり，そのうちPPPDやPDなどの切除術を施行した例は5例であった。経過観察開始時，腫瘍を認めた症例は6例，そのうち2例はEUS下穿刺吸引細胞診が施行されたが，悪性所見を認めなかった。

D. 考察

膵病変は病変径に反比例して生検の正診率が低く，時に術前診断が困難である。また膵癌は消化器癌の中で最も予後の悪い癌であり，小病変でも膵外進展，リンパ節・血行性転移を示すことがある。そのため経過観察が困難で，術前に確定診断が得られない段階で切除に踏み切らざるを得ない症例があることが临床上重要な問題である。今回，膵癌疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例(Pseudopositive 症例)と非膵癌と考え経過観察した膵癌症例(Pseudonegative 症例)についてProfile調査を実施した。

膵癌疑いで切除された非膵癌症例においては，慢性膵炎の症例が多く認められた。術前に施行した生検や細胞診においてclass IVやVを認めた症例が9例あったことは非常に興味深く，今後CTを含めた臨床診断画像と病理組織像との比較検討進めていきたい。

一方，非膵癌と考え経過観察した膵癌症例においても経過観察開始時診断の多くは慢性膵炎であった。経過観察開始時から腫瘍を認めた例が7例(44%)あり，更にそのうち2例はEUS下穿刺吸引細胞診を施行し悪性所見を認めず，膵癌の術前診断の困難さを表している。経過観察中，切除術を施行し得た例は5例(31%)であり，術前診断の困難な症例がある一定割合存在することが示唆された。

今回のProfile調査を実施して，膵癌の術前診断の困難性を再認識した。今後，膵癌疑いで切除される慢性膵炎(非膵癌)症例を減少させることを目標として，画像・病理を含めた詳細な症例分析を行う。一般臨床において，診断困難な症例に遭遇した時の一助となるようなアトラス作成を予定している。アトラス作成ワーキンググループを組織して，来年度中の完成を目指す。

E. 結論

日常临床上重要な膵癌のPseudopositive 症例，Pseudonegative 症例の症例Profile調査を実施した。今後，画像を含め詳細な分析を行い，ワーキンググループを組織し，アトラスの作成を行う。

F. 参考文献

1. 日本消化器病学会編．慢性膵炎診療ガイドライン．南江堂 東京 2009.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 黒河内 顕，佐田尚宏，遠藤和洋，兼田裕司，小泉 大，笹沼英紀，安田是和：膵癌疑いで切除された慢性膵炎(非膵癌)症例のProfile調査．第43回 日本膵臓学会大会，2012(膵臓 vol. 27 No. 3: 278, 2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

Ⅱ. 慢性膵炎
2) 各個研究プロジェクト

慢性膵炎患者における *CFTR* 遺伝子の解析

研究報告者 成瀬 達 みよし市民病院 院長

共同研究者

藤木理代（名古屋学芸大学管理栄養学部）、北川元二（名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科）
石黒 洋（名古屋大学総合保健体育科学センター）、中莖みゆき（名古屋大学大学院健康栄養医学）
近藤志保（名古屋大学大学院健康栄養医学）、山本明子（名古屋大学総合保健体育科学センター健康栄養医学）
洪 繁（慶應義塾大学医学部システム医学）

【研究要旨】

膵導管細胞において $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 輸送を担う *CFTR* の遺伝子多型と慢性膵炎との関連を、慢性膵炎患者（アルコール性71人、特発性20人）および健常人180人を対象に解析した。その結果、特発性慢性膵炎患者では、Genotype (TG)₁₁-p.M470V-p.R1453W/(TG)₁₁-p.M470V の割合は15.0%で、健常群（1.7%）に比し有意な高値を示した。アルコール性慢性膵炎群では、Genotype (TG)₁₁-p.M470V-p.Q1352H/(TG)₁₁-p.M470V の割合は11.3%で、健常群（0.6%）に比し有意な高値を示した。Haplotype (TG)₁₁-p.M470V-p.L1156F および -790Δ-t(TG)₁₂-p.M470V は、アルコール性慢性膵炎群で高い頻度を示した。

A. 研究目的

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) は上皮細胞に発現する cAMP 依存性のイオンチャネルで、 Cl^- および HCO_3^- 輸送を担っている。膵嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF) は *CFTR* 遺伝子の変異によって発症する常染色体劣性疾患で、気道、腸管、膵管、胆管、汗管、輸精管などのイオンおよび水輸送が障害される¹⁾。*CFTR* は汗腺では Cl^- の再吸収に必要なため、*CFTR* 機能が低下すると汗の Cl^- 濃度が高くなる。慢性膵炎患者の約半数の汗中 Cl^- 濃度は、基準値（60 mM）を超える高濃度を示す²⁾。

私たちはこれまでに、日本人の慢性膵炎患者における *CFTR* 遺伝子多型を解析してきた³⁾。これら個々の遺伝子多型はチャネル機能の低下を伴うが、複数の多型を合併するとより高度の機能低下をもたらす⁴⁾。そこで、本研究では、*CFTR* 遺伝子の変異および多型の組み合わせを解析することにより、慢性膵炎と関連する Genotype を解析した。

B. 研究方法

インフォームドコンセント（名古屋大学医学研究科倫理委員会にて承認を得た「慢性膵炎における膵炎関連遺伝子の検討」、承認番号114-2）を得た慢性膵炎患者（アルコール性71人、特発性20人）、健常人180名を対象に、末梢血から白血球由来の DNA を抽出した。*CFTR* 遺伝子翻訳領域および翻訳領域の上流約 2 kb を PCR 法により増幅し、直接シーケンス法で遺伝子配列を決定した。統計解析には χ^2 検定を用いた。

C. 研究結果

CFTR 遺伝子の翻訳領域における多型

アルコール性慢性膵炎では、p.L1156F が 7 人（9.9%）、p.Q1352H が 12 人（16.9%）で、健常人（1.1%、3.9%）に比し有意（ $p < 0.01$ ）に高頻度であった。特発性慢性膵炎では、p.R1453W が 4 人（20%）で、健常人（5%）に比し有意（ $p < 0.05$ ）に高頻度であった（表 1）。

CFTR 遺伝子の非翻訳領域における多型

プロモーター領域の変異 -790Δt はアルコー

表 1 CFTR 遺伝子の翻訳領域における多型と頻度

	ex6a E217G	ex11 I556V	ex10 M470V	ex18 L1156F	ex22 Q1352H	ex24 R1453W
慢性膵炎群						
アルコール性 n=71	3 (4.2%)	2 (2.8%)	49 (77.5%)	7** (9.9%)	12** (16.9%)	2 (2.8%)
特発性 n=20	0 (0%)	2 (10%)	16 (80.0%)	1 (5.0%)	1 (5.0%)	4* (20.0%)
健常群 n=180	6 (3.3%)	12 (6.7%)	154 (85.6%)	2 (1.1%)	7 (3.9%)	7 (3.9%)

* Yates Chi square test $p < 0.05$ vs 健常群

** Yates Chi square test $p < 0.01$ vs 健常群

表 2 CFTR 遺伝子の非翻訳領域における多型と頻度

	5'UTR	
	-790Δt	125c
慢性膵炎群		
アルコール性 n=71	3 (4.2%)	11 (15.5%)
特発性 n=20	0 (0.0%)	0 (0.0%)
健常群 n=180	0 (0.0%)	16 (8.9%)

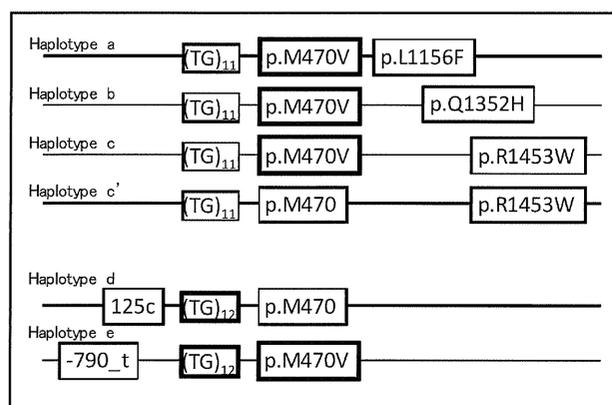


図 1 CFTR 遺伝子多型を含む Haplotype

アルコール性慢性膵炎患者にのみ 3 名 (4.2%) 認められた。125c はアルコール性慢性膵炎群に 15.5% の割合で認められ、健常群 (8.9%) に比し高い傾向にあったが有意ではなかった (表 2)。

CFTR 遺伝子多型を含む Haplotype の解析 (図 1)

Haplotype マーカーである Intron 8 の繰り返し配列 (TG)_n と各遺伝子多型の連鎖を解析した結果、p.M470V と (TG)₁₁ の連鎖は、健常群で 97.3%、アルコール性慢性膵炎群で 98.3%、特発性慢性膵炎群 100% であった。p.L1156F および p.Q1352H は、全ての群で

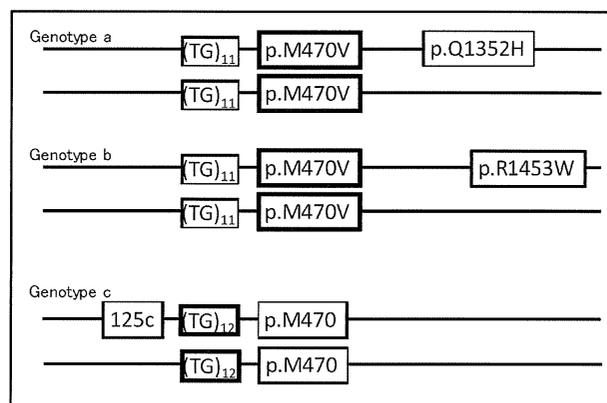


図 2 CFTR 遺伝子多型を含む Genotype

100% (TG)₁₁-p.M470V と連鎖していた (Haplotype a, b)。

p.R1453W と (TG)₁₁-p.M470V との連鎖 (Haplotype c) は、特発性慢性膵炎群では 100% であった。しかし、健常群では 85.7%、アルコール性慢性膵炎群では 50.0% であり、これらの群では Haplotype (TG)₁₁-p.M470-p.R1453W (Haplotype c') が認められた。

125c は健常群およびアルコール性慢性膵炎群に見られ、100% (TG)₁₂-p.M470 と連鎖していた (Haplotype d)。-790Δt はアルコール性慢性膵炎群にのみ見られ、100% (TG)₁₂-p.M470V と連鎖していた (Haplotype e)。

CFTR 遺伝子多型を含む Genotype の解析 (図 2)

慢性膵炎群に比較的多く見られる多型を含む Genotype を解析した結果、特発性慢性膵炎群では、Genotype (TG)₁₁-p.M470V-p.R1453W / (TG)₁₁-p.M470V (Genotype b) の割合は 15.0% で、健常群 (1.7%) に比し有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

アルコール性慢性膵炎群では、Genotype (TG)₁₁-p.M470V-p.Q1352H / (TG)₁₁-p.M470V (Genotype a)の割合は11.3%で、健常群(0.6%)に比し有意な高値を示した(p<0.05). 125c-(TG)₁₂-p.M470Vのホモ接合体(Genotype c)の割合は9.9%で、健常群(4.4%)に比し高い傾向を示したが有意ではなかった。

p.L1156F および -790Δ をもつ患者に共通の Genotype は認められなかった。

D. 考察

日本における CF の発症率は極めて低く⁵⁾、これまで報告のある日本人の *CFTR* 遺伝子変異も世界的に極めて稀なタイプのものである^{6~8)}。私たちはこれまでに日本人の慢性膵炎患者の *CFTR* 機能(汗中 Cl⁻ 濃度測定)²⁾ や *CFTR* 遺伝子多型を解析し、日本における慢性膵炎と *CFTR* 遺伝子との関連を示してきた^{3,9)}。

p.Q1352H および p.R1453W は、*CFTR* の第二 ATP 結合部位付近に位置し⁸⁾、チャンネルとしての機能は p.Q1352H で約 29%、p.R1453W で約63%に低下する⁴⁾。これらの多型が p.M470V と同一アレル上にあり、かつもう一方のアレルにも p.M470V をもつ場合、チャンネル機能は更に低下する。このような Genotype が患者群では健常群に比し高頻度に認められた。

p.L1156F については世界でも報告が無く、日本人に特異的な多型である⁹⁾。p.L1156F をもつ患者に共通の Genotype は認められなかったが、p.L1156F は (TG)₁₁-p.M470V と連鎖しており、アルコール性慢性膵炎患者に多く見られたことから、Haplotype (TG)₁₁-p.M470V-p.L1156F はアルコール性慢性膵炎との関連が示唆される。

125c はプロモーター領域の CAP サイトに存在するため、転写調節に係わることが予測される多型で、(TG)₁₂-p.M470V と連鎖していた。(TG)₁₂ は (TG)₁₁ に比べてスプライシング異常を起こしやすく、Exon9 を約20%欠損させる¹⁰⁾。従って、125c-(TG)₁₂-p.M470V をホモ接合体でもつ Genotype は、正常な機能をもつ

CFTR タンパクの量が少なくなることが考えられる。

-790Δ は、転写調節因子 Foxd3 の結合サイトの変異であるため、*CFTR* 遺伝子の発現量に影響する可能性がある¹¹⁾。更にこの変異は (TG)₁₂-p.M470V と連鎖しており、Exon9 の欠損や、チャンネル機能の低下も併せ持つ。

このように、遺伝子多型と疾患との関連を解析する際には、その多型を含む Haplotype や Genotype を解析することが重要である。

E. 結論

Genotype (TG)₁₁-p.M470V-p.R1453W / (TG)₁₁-p.M470V は特発性慢性膵炎との関連が示唆された。Genotype (TG)₁₁-p.M470V-p.Q1352H / (TG)₁₁-p.M470V、Haplotype (TG)₁₁-p.M470V-p.L1156F および -790Δ-(TG)₁₂-p.M470V はアルコール性慢性膵炎との関連が示唆された。

F. 参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班. 膵嚢胞線維症の診療の手引き(大槻 眞, 成瀬達編). アークメディア 2008.
2. Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, Fujiki K, Ko SB, Mizuno N, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Jin C, Suzuki R, Kitagawa M, Tsuda T, Kondo T, Hayakawa T. A finger sweat chloride test for the detection of the high-risk group of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: e80-5.
3. Fujiki K, Ishiguro H, Ko SBH, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for *CFTR* dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2004; 41: e55.
4. Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based

molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. Hum Mol Genet. 2003; 12: 2321-2332.

5. 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 大槻 眞: 第3回膵嚢胞線維症全国疫学調査の集計結果について「難治性膵疾患に関する調査研究」平成17年度総括, 分担研究報告書, p123-130, 2006.
6. 吉村邦彦, 安齋千恵子, 衛藤義勝: わが国の嚢胞線維症症例における *CFTR* 遺伝子変異に関する解析「難治性膵疾患に関する調査研究」平成18年度総括, 分担研究報告書, 2007, p261-264.
7. Nakakuki M, Fujiki K, Yamamoto A, Ko SB, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Maruyama S, Yanagimoto K, Naruse S, Ishiguro H. Detection of a large heterozygous deletion and a splicing defect in the *CFTR* transcripts from nasal swab of a Japanese case of cystic fibrosis. J Hum Genet. 2012; 57: 427-33.
8. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www3.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
9. 慢性膵炎患者における *CFTR* 遺伝子の解析
成瀬 達, 藤木理代, 北川元二, 石黒 洋, 中莖みゆき, 近藤志保, 山本明子 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究 平成23年度 総括・分担研究報告書 2012, 207-209.
10. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (TG)_n locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. J Clin Invest. 1998; 101: 487-96.
11. 成瀬 達, 藤木理代, 北川元二, 石黒 洋, 中莖みゆき, 近藤志保, 山本明子, 近藤孝晴. *CFTR* 遺伝子の発現調節機構. 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業難治性膵疾患に関する調査研究, 平成22年度総括・分担研究報告書, 2011, 221-223.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 藤木理代, 石黒 洋, 中莖みゆき, 近藤志保, 山本明子, 洪 繁, 北川元二, 成瀬 達, 慢性膵炎における *CFTR* 遺伝子の解析, 第43回日本膵臓学会大会(山形) 2012年6月28-29日.
 - 2) Kondo S, Fujiki K, Nakakuki M, Yamamoto A, Ko S, Kitagawa M, Naruse S, Ishiguro H. Polymorphisms of *CFTR* gene in Japanese patients with chronic pancreatitis. Joint APA/IAP Annual Meeting (Miami, Florida) October 31-November 3.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

慢性膵炎合併膵癌における DNA メチル化異常の解析

研究報告者 杉山政則 杏林大学医学部消化器外科 教授

共同研究者

中里徹矢, 鈴木 裕 (杏林大学医学部消化器外科)

【研究要旨】

【背景】慢性膵炎の発癌に関連する遺伝子異常は明らかでない。また、DNA のメチル化異常が発癌に関与するとされる。【目的】慢性膵炎合併膵癌と膵癌、慢性膵炎における各種遺伝子のメチル化異常を解析し差異を明らかにする。【対象と方法】慢性膵炎 4 例、膵癌 40 例、慢性膵炎合併膵癌 4 例の切除例を対象に、MGMT, reprim, p16各遺伝子について methylation specific PCR (MSP)法を行った。【結果】MGMT のメチル化は膵癌 16% に認めたが、慢性膵炎合併膵癌例、慢性膵炎例では 0% であった。reprim のメチル化は膵癌 95%、慢性膵炎合併膵癌 100%、慢性膵炎 20% に認めた。P16 では膵癌 5%、慢性膵炎合併膵癌 25%、慢性膵炎 0% にメチル化を認めた。reprim で慢性膵炎に比較し膵癌、慢性膵炎合併膵癌で有意にメチル化頻度が高い結果であった。【結語】reprim のメチル化は慢性膵炎と比較し膵癌、慢性膵炎合併膵癌で有意に頻度が高く、癌の進展への関連が示唆された。今後も検討項目を追加する予定である。

A. 研究目的

膵癌は未だに難治性の癌として知られている。分子生物学的手法により発癌のメカニズムや治療法について多くの研究がなされているが明らかにされていない。また、慢性膵炎は膵癌のリスクファクターとして知られているが、そのメカニズムや関連遺伝子など未だ不明な点が多い。一方では、多くの遺伝子のプロモーター領域のメチル化が蛋白発現抑制に関わり、炎症や発癌、癌の進展に関与するとされる。本研究は慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌を対象として、DNA メチル化状態を解析する事によりそれぞれの差違を明らかにし、慢性膵炎の発癌に関わる遺伝子異常を探索する事を目的とする。

B. 研究方法

慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌における DNA メチル化解析のために以下の①および②の方法により解析を行う。

① 慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌例の抽出

手術により切除された症例で、病理学的に確

定診断が為された症例を抽出する。

② 慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌例の DNA メチル化解析

病理学の専門家により対象症例のホルマリン固定パラフィン切片のプレパラートを作成し、細胞を分離、DNA を抽出する。

DNA のメチル化解析は MSP (methylation specific PCR)法により行う。これらの方法により膵癌に高頻度に発現する既知の遺伝子群 (MGMT, reprim, UHCL1, NPTX2 など)を最終的に 10 数種類程度解析する予定である。

(倫理面の配慮)

本研究は平成 23 年 7 月 25 日に杏林大学医学部倫理委員会において「膵腫瘍に関する臨床病理学および分子生物学的研究」として承認された。研究対象患者には説明の上、同意を得る。また、個人情報保護に努める。

C. 研究結果

① 杏林大学病院および関連病院で切除された膵手術症例の中から、膵癌 40 例、慢性膵炎合併膵癌 4 例、慢性膵炎 4 例を抽出した。

- ② MGMT, reprim0, p16の各癌抑制遺伝子についてMSPを行った。MGMTは膵癌5例(13%)にメチル化を認めた。慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎例ではメチル化を認めなかった。reprim0では膵癌34例(85%)、慢性膵炎合併膵癌4例(100%)、慢性膵炎1例(25%)にメチル化を認めた。慢性膵炎と比較し膵癌($p=0.005$)、慢性膵炎合併膵癌($p=0.048$)で有意にメチル化頻度が高かった。P16では膵癌2例(5%)、慢性膵炎合併膵癌1例(25%)、慢性膵炎0例(0%)であった。

D. 考察

DNAのメチル化による蛋白発現抑制は遺伝子の変異や欠失等と異なる。いわゆるepigeneticsな異常としてのDNAメチル化は、主に癌抑制遺伝子のプロモーター領域がメチル化修飾を受けることによりその発現が抑制されている。膵癌を対象とした網羅的なメチル化解析はこれまでに報告されている¹⁻³⁾。しかし、それらで抽出された各種遺伝子の機能解析や臨床病理学的因子との関連については明らかにされていない。

MGMTはDNA修復酵素であり正常細胞に発現している。膵癌での頻度は0~13%との報告がある。今回の検討では膵癌で13%であった。慢性膵炎合併膵癌と慢性膵炎との比較では差が見られなかった。膵癌の多段階発癌モデルでは早期から異常が見られるp16遺伝子でも各対象間で差は見られなかった。膵癌におけるp16のメチル化頻度は14~18%と報告されているが、今回の検討ではより低い結果であった。

reprim0はp53に関連する遺伝子で、cell cycle G2 phaseの停止に関わる。膵癌におけるメチル化頻度は高く、60-86%と報告されている^{2,4)}。今回の検討では膵癌では85%、慢性膵炎合併膵癌で100%と高頻度にメチル化を認めた。一方で慢性膵炎では20%であり、膵癌、慢性膵炎合併膵癌と差が認められた。このことからreprim0遺伝子プロモーター領域のメチル化は膵癌における発癌あるいは癌の進展に関連することが示唆される。

E. 結論

reprim0のメチル化は慢性膵炎と比較し膵癌、慢性膵炎合併膵癌で有意に頻度が高く、発癌や癌の進展への関連が示唆された。慢性膵炎合併膵癌と膵癌での差は明らかでなく、さらなる検討が必要と考える。

F. 参考文献

1. Ueki T, Toyama M, Sohn T, Yeo CY, Issa JP, Hruban RH, Goggins M: Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research*. 2000, 60: 1835-1839.
2. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M: Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer research*. 2003, 63: 3735-3742.
3. Omura N, Li CP, Li A, Hong SM, Walter K, Jimeno A, Hidalgo M, Goggins M: Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Biol Ther*. 2008, 7(7): 1146-1156.
4. Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Goggins M: Aberrant methylation of Repeimo correlates with genetic instability and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*. 2006, 107(2); 201-257.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし