

氏名	池田 恵理子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 673 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	膵神経内分泌腫瘍の悪性度を規定する因子の探索及びその臨床応用
論文審査委員	(委員長) 教授 眞嶋 浩 聡 (委員) 教授 野田 弘 志 准教授 齋藤 心

論文内容の要旨

1 研究目的

膵神経内分泌腫瘍(Pancreatic neuroendocrine tumor: PanNET)は、症例毎に多彩な特徴を呈する腫瘍である。現在は WHO2017 分類に基づき核分裂像と Ki-67 index を用いて grade 評価を行っているが、細胞増殖能のみに着目した grade 評価では、正確な予後予測が困難である。また、Ki-67 index は予後予測のみならず、治療方針決定にも有用とされるが、超音波内視鏡下穿刺吸引生検(endoscopic ultrasonography-fine needle aspiration biopsy : EUS-FNAB)を用いた Ki-67 index では過小評価される危険性がある。本研究の目的は、病理学的手法を基盤とした多角的な観点から、PanNET の悪性度を規定する因子を探索し、PanNET の精度の高い悪性度評価の確立および各因子の臨床病理学的意義を検討することである。

2 研究方法

主研究(1、2)と付随研究(3、4)を行った。いずれの研究においても、各因子および臨床予後との相関についての統計学的検討には、統計ソフト EZR または SSPS を用いた。

1、PanNET における臨床病理学的特徴の検討

1990 年 4 月～2020 年 3 月に自治医科大学附属病院で外科切除された Pancreatic neuroendocrine neoplasms (PanNENs)症例 70 例(PanNET68 例)と EUS-FNAB で採取された PanNET 症例(31 例)を対象とし、臨床病理学的な評価を行なった。

2、組織透明化技術と 3D イメージを用いた検討

組織透明化技術 ILLUminate Cleared organs to Identify target molecules(LUCID)・3D イメージを用いて、PanNET の微小検体における Ki-67 index 算出方法のプロトコールを作製し、その有用性を検証した。また、腫瘍血管の形状を 3D 観察し、臨床病理学的意義を検討した。

3、膵液細胞診による PanNET の診断の検討

主膵管近傍に位置する PanNET のうち、EUS-FNAB を施行した 11 例と内視鏡的逆行性膵管造影(endoscopic retrograde pancreatography:ERP)下膵液細胞診を施行した 7 例を比較し、主膵管に影響を及ぼしている PanNET における ERP 下膵液細胞診の有用性を検討した。

4、膵切除検体の病理学的検索における超音波検査併用の有用性の検証

検体超音波検査を併用して病理学的検索を行った 57 例を対象とし、超音波検査を併用した病理

標本作製方法を検討した。

3 研究成果

1、PanNETにおける臨床病理学的特徴の検討

臨床病理学的特徴は概ね既報と同様であった。新たに未熟な腫瘍血管の存在に着目し、腫瘍の転移再発との相関を認めた。EUS-FNAB 検体と外科切除検体の **grade** の一致率は約 **56.3%**であった。

2、組織透明化技術と 3D イメージを用いた検討

3D 免疫組織化学により、EUS-FNAB 程度の微小検体でも外科切除検体と同等の **Ki-67 index** が算出可能となった。また、3D 観察では **hotspot** を特定することも容易であった。微小検体における **Ki-67 index** の診断精度向上には、カウント可能な腫瘍細胞数を増やすだけでなく、**hotspot** の検索が重要であることが明らかになった。

また、3D 観察によって、従来の病理評価方法では観察し得なかった腫瘍血管の形状の観察が可能になった。また、腫瘍血管の形状にはバリエーションを認めており、特に **G2** で多彩な傾向にあったが、腫瘍血管の形状における臨床的意義は見出せなかった。

3、膵液細胞診による PanNET の診断の検討

膵管に影響を及ぼしている PanNET に対しては ERP 下膵液細胞診の診断率は **71.4%**で、偶発症率は EUS-FNAB と有意差はなかった。ERP 下膵液細胞診では、EUS-FNAB の細胞診と同様に **salt and pepper pattern** を伴う小型で類円形の核が観察されたが、いずれも細胞集塊にはつれは目立たず、配列に関しては、膵管癌で観察される細胞集塊の形状と類似する細胞学的所見を認めた。

4、膵切除検体の病理学的検索における超音波検査併用の有用性の検証

膵切除検体の病理学的検索における超音波検査は、適切な病理組織標本の作製に有用であった。

4 考察

外科的切除検体・EUS-FNAB 検体を用いた臨床病理組織学的検討から PanNET の悪性度規定因子として **Ki-67 index** と腫瘍血管の形状に着目した。外科切除検体における **Ki-67 index** は悪性度規定因子として確立されているが、あくまで外科的切除が前提となる。検査の段階で得られる EUS-FNAB 検体において精度の高い **Ki-67 index** を測定する病理診断の手法は検討の余地があり、治療方針の判断材料としては問題であった。この問題を解決するべく、組織透明化技術と 3D イメージを併用し、新たな **Ki-67 index** 評価方法を開発した。

まず、3D 免疫組織化学を用いることで微小検体でも手術検体と同等の **grade** 評価が可能であることを検証した。本研究では、病理検索の精度向上として、微小検体において正確な **grade** 評価を行うには、母数となる腫瘍細胞数の増加に加え、**hotspot** の同定が必要であることを報告した。

また、3D 観察により腫瘍血管分岐や口径不同などの腫瘍血管の形状は悪性度と関連性がある可能性が示唆された。しかし、臨床病理組織学的検討の結果により注目した未熟な腫瘍血管と腫瘍血管の形状には関連性は認められなかった。

さらに、付随研究として、少数の解析ではあるものの、主膵管に影響を及ぼしている PanNET に対する ERP 下膵液細胞診は、高い正診率と安全性を兼ね備える検査であることが示唆された。

また、正確な病理診断・研究結果を得るための適切な病理組織標本を作製する方法として、超音波検査を用いた病理組織標本の作製方法が有用であることを明らかにした。

5 結論

上記の主研究と付随研究を通して、PanNETの悪性度を規定する因子を探索した。必ずしも新規の因子を探索するだけでなく、既存の因子の検査方法を改善することや、根本的な標本の診断精度を向上させることも、悪性度規定因子の探索において非常に重要であった。

論文審査の結果の要旨

本研究の原点は、消化器内科医としての経験を通じ、膵神経内分泌腫瘍の臨床経過が grade 分類と解離する症例があることに池田恵理子氏が疑問を感じたことにある。病理学的により精度の高い核分裂像および Ki-67 index の判定を行うことで、臨床経過を反映する grade を規定することを目的とした研究を行った。

まず、膵神経内分泌腫瘍 68 例において、病理学的項目と grade、転移再発との関連性を比較検討し、高悪性度を示唆する腫瘍の臨床病理学的特徴の検索を行った。転移症例は全て G2 であること、術前 EUS-FNAB 検体と切除標本の比較では G2 を G1 と過小評価する症例を認め正診率は 56.3%であったと報告している。同時に、未熟な腫瘍血管の存在や高 Ki-67 index が転移再発と相関があることを述べている。

以上を背景に、術前の EUS-FNAB 検体における Ki-67 index 評価方法の精度向上が必要と考え、組織透明化技術と 3D イメージを用いることで、微小検体において観察可能な腫瘍細胞数を増やす新規のプロトコルを開発した。さらに、3D 免疫組織化学を用いて Ki-67 陽性腫瘍細胞の hotspot を同定し、その部分の Index を採用することで外科切除検体と同等の Ki-67 index が算出可能なことを報告している。また、組織透明化技術と 3D イメージの手法を用いることで、詳細な腫瘍血管の形状観察を行う事ができ、膵神経内分泌腫瘍とくに G2 症例の亜分類への展望にも言及している。これらの新規 Ki-67 index 評価法は今後の実臨床への応用が十分期待できる。

副次的研究として、安全性の面から ERP 下膵液細胞診は膵神経内分泌腫瘍の局在によっては EUS-FNA の代替法として選択肢になり得ることについても考察している。加えて、膵切除検体の切り出し・標本作成時に超音波を用いる有用性に関して論文報告を行っている。

論文自体には大きな問題はなかった。非専門家にもわかりやすくするために背景の充実を指示した。また、本文中に細かな記載ミスが多かったために、修正を指示した。これらは適切に修正されている。

本論文は上記のように、新規性、独創性のある研究をまとめたものであり、多大な労力を垣間見ることができ、学位論文として申し分のないものである。

最終試験の結果の要旨

本研究は、膵神経内分泌腫瘍(PanNET)に関して、①臨床病理学的特徴、②組織透明化技術と

3D イメージを用いた Ki-67 index の算出方法、腫瘍血管の形状、を検討した研究である。①は既報通りに G2 と G1 を比較すると悪性度は G2 の方が高かった。未熟な腫瘍血管が新たな着眼点であったが、G2、G1 ではその頻度に差はなく、転移再発例で観られる頻度が高かった。しかし、これは②の腫瘍血管の形状の解析とは結び付かず、今後の更なる検討に期待したい。

Ki-67 index は腫瘍の増殖能を示す値であるが、NET においては G1, G2, G3 というグループ分類に使用される。これが腫瘍の悪性度や予後と関連することが示されており、手術不能例における治療選択の指標の一つとなっている。Hotspot で計測することが重要であるが、EUS-FNAB などの術前の臨床検体では、ある一断面での評価に留まることが多い。深切切片を作成して評価する細胞数を増やすこともできるが、貴重な検体のロスにつながる。今後のゲノム医療の展開を考えると検体のロスは避けるべきである。この問題点を解決すべく、池田恵理子氏は組織透明化技術と 3D イメージを用いた検討を行った。このような検討はこれまでになく、十分に新規性、独創性のある研究である。

厚さ 2mm の組織を使用したために条件設定が大変だったとのことであった。約 7 日間の染色、洗浄が必要であったが、最終的には当初の目的通りの解析が可能であった。Ki-67 index を、FNAB 検体、手術検体、透明化検体の hotspot、coldspot、マルチスライス（平均）で比較検討し、手術検体と hotspot での評価がよく関連することを示した。この手法を用いれば FNAB 検体でも過小評価することなく、また貴重な検体をロスすることなく、正しい Ki-67 index を評価することができ、臨床に益することは大と考える。免疫染色して観察が可能になるまでに 7 日間を要する点が問題であるが、実際の FNAB 検体は本検討よりもかなり薄いために、時間短縮は十分可能と思われる。問題は観察するための共焦点顕微鏡がかなり特殊な装置であるため、申請者も東京大学大学院工学系研究科の研究生になって東京大学で研究を進めなければならなかった点にあると思われる。

腫瘍血管の形状の検討では、血管を 3 次元で構築することにより、従来の病理学的評価ではできなかった立体的な血管構築の観察が可能になった。太い腫瘍血管、網目様構造、口径不同などのバリエーションがあり、G2 症例で多彩なバリエーションが多かった。少数例の検討のために腫瘍血管の形状と PanNET 悪性度の関連は示せなかった。また、臨床病理学的特徴として捉えられた未熟な腫瘍血管が本検討で評価されていないのは残念であった。トマトレクチンによって構築した 3D イメージでは、未熟な腫瘍血管が描出されなかったとのことであるが、今後更なる検討が望まれる点である。

付随研究として、腭液細胞診による PanNET の診断が可能な症例があること、正確な病理診断・研究を行うためには超音波像を用いながら適切な断面で標本作製することが重要であることなどを示した。後者は既に自治医科大学紀要に報告されている。

論文中には細かな記載ミスなどが多かったが、発表スライドでは概ね訂正されていた。プレゼンテーションは落ち着いて、明快に行われた。質疑応答でも的確に返答することができ、自身で努力して研究を展開してきたことがうかがわれた。

本研究は以上の如く、新規性、独創性に優れた研究であり、論文は投稿中でまだアクセプトはされていないが、内容的に問題なく、学位論文として申し分のないものである。全員一致で合格と判定した。