

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10197

研究課題名(和文)糖鎖分子マーカーを用いた肝内胆管癌の高感度診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of high sensitivity diagnostic system for intrahepatic cholangiocarcinoma using glycoprotein molecular marker

研究代表者

樋口 亮太 (Higuchi, Ryota)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20318059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新たな血清糖鎖分子マーカー (WFA-sialylated MUC1, 以下WFA)による診断は、胆道癌または肝内胆管癌患者において、対照被験者や良性胆道疾患患者よりも優れていた。癌のstageや組織型に依存せず、良性胆道疾患、胆管癌や肝内胆管癌ならびにstage I/IIの癌の診断で、従来の腫瘍マーカーよりも正確な診断能を示した。胆汁中のWFAも胆管癌や肝内胆管癌患者で良性胆道疾患よりも有意に高値を示し、その診断能は従来の腫瘍マーカーや胆汁細胞診よりも優れ、診断は正確であった。WFAは胆管癌や肝内胆管癌診断の有用なバイオマーカーで、将来的に臨床の現場で用いられるべきであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis with a new glycoprotein molecular marker (WFA-sialylated MUC1; WFA) was superior in patients with biliary cancer or intrahepatic cholangiocarcinoma compared to the control subjects and patients with benign biliary tract disease. WFA does not depend on the cancer stage or tissue type in the diagnosis of benign biliary tract disease, biliary cancer, intrahepatic cholangiocarcinoma and stage I / II cancers it also showed more accurate diagnostic ability than conventional tumor markers. WFA in the bile was also significantly higher in patients with biliary cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma than in those with benign biliary tract disease. It's diagnostic ability was superior to conventional tumor markers and bile cytology, and the diagnosis was accurate. WFA is a useful biomarker for the diagnosis of biliary cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma and is suggested that it should be used in the clinical setting in the future.

研究分野：胆道癌

キーワード：胆道癌 胆管癌 胆嚢癌 診断 マーカー WFA 糖鎖 術前

1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道癌および肝内胆管癌は消化器癌の中でも予後不良の癌腫である。これらは胆道上皮の慢性炎症を背景に発生するため、炎症病態が影響し、従来の腫瘍マーカーでは診断学的な有用性は乏しく、治療成績の向上に向けた早期診断マーカーの開発と診断システムの構築が急務である。

(2) 糖鎖は「細胞の顔」であり、細胞表面の粘液糖蛋白の糖鎖構造は癌化により変化する。本研究では、これら癌腫の組織標本を対象に、高感度糖鎖プロファイラーであるレクチンマイクロアレイを用いた癌特異的なプロレクチンの探索、プロテオーム解析による糖鎖のキャリアー蛋白の同定、新規レクチン-キャリアー蛋白のサンドイッチ ELISA による高感度測定系の構築によって同定された高感度糖鎖分子マーカー WFA-sialylated MUC1 が、胆道癌および肝内胆管癌の実用的な診断系を確立する。

2. 研究の目的

血清と胆汁中の WFA-sialylated MUC1 levels が胆道癌や肝内胆管癌の診断に有用か検討する。

3. 研究の方法

多施設で集められた 244 例の胆管癌、59 例の肝内胆管癌、287 例の胆道良性疾患、44 例の健常者の胆汁と血清サンプルを用いて、胆道癌や肝内胆管癌の WFA-sialylated MUC1 診断感度、CA19-9、CEA、胆汁細胞診との診断感度比較、コンビネーション診断の有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 血清サンプルにおいて、WFA-sialylated MUC1 (nL / μ g; 中央値、範囲) は、胆道癌/肝内胆管癌 (340, 56 - 2000) 肝門部胆管癌 (346, 131 - 1910)、遠位胆管癌 (252, 121 - 804)、胆嚢癌 (325, 56 - 2000) および肝内胆管癌 (498, 103 - 2000) 患者で、対照被験者 (84, 0.6 - 230) や良性の胆道疾患 (124, 25 - 594) よりも有意に高かった。肝内胆管癌患者は、他の部位の腫瘍を有する患者より高い WFA-sialylated MUC1 値を示した。

血清 CA19-9 レベル (U / mL) は、胆道癌/肝内胆管癌 (74, 0.6 - 1314)、肝門部胆管癌 (83, 1.4 - 998)、胆嚢癌 (48, 0.8 - 1033)、肝内胆管癌 (152, 0.8 - 1118) 患者は、対照被験者 (9, 0.3 - 85) や良性胆道疾患を有する患者 (12 人, 0.2 - 1069) よりも有意に高かった。

血清 CEA レベル (ng / mL) も胆道癌 (2.6, 0.3 - 92.4) や肝内胆管癌 (3.2, 0.4 - 92.4) 患者では、コントロール被験者 (1.3, 0.6 - 5.1) や良性胆道疾患 (2.6, 0.2 - 16.6) 患者よりも有意に高値であった。

WFA-sialylated MUC1 の血清レベル、CA19-9 と CEA を、胆道癌/肝内胆管癌患者で検討す

ると、WFA-sialylated MUC1 と CA19-9 ($r = 0.068$, $n = 303$)、WFA-sialylated MUC1 と CEA ($r = 0.080$, $n = 303$) で、相関を認めなかった。しかし、CA19-9 と CEA には有意な弱い正の相関を認めた ($r = 0.221$, $P = 0.01$, $n = 303$)。

(2) 胆汁試料でも、WFA-sialylated MUC1 (nL / μ g protein; 中央値、範囲) は、胆道癌/肝内胆管癌 (27, 10 - 653)、肝門部胆管癌 (24, 10 - 653)、遠位胆管癌 (29, 10 - 533)、胆嚢癌 (25, 11 - 341)、肝内胆管癌 (60, 25 - 432) で、良性胆道疾患患者 (7.4, 0.3 - 45) よりも有意に高値であった。

胆汁中 CA19-9 (U / μ g protein) も胆道癌/肝内胆管癌 (3372, 0.1 - 50156)、肝門部胆管癌 (3468, 0.1 - 32149)、および肝内胆管癌 (4819, 102 - 50156) 患者で、良性胆道疾患 (1038, 0.1 - 11389) 患者よりも有意に高値であった。

胆道癌または肝内胆管癌患者で胆汁中の WFA-sialylated MUC1 と CA19-9 を分析すると、弱い正の相関を認めた ($r = 0.270$, $P = 0.01$, $n = 183$)。

(3) 血清中の WFA-sialylated MUC1 による対照被験者および良性胆道疾患患者から胆道癌/肝内胆管癌患者の診断能 ROC 曲線分析にて実施した。WFA-sialylated MUC1、CA19-9 と CEA の曲線下面積は、胆道癌/肝内胆管癌と対照被験者の比較では 0.963 (カットオフ値 175.4L / mL)、0.857 (16.5U / mL)、および 0.767 (1.6ng / mL) であった。

胆道癌/肝内胆管癌と良性胆道疾患の比較では 0.873 (カットオフ値、214.2L / mL)、0.753 (27.6U / mL)、および 0.523 (2.8ng / ml) であった。診断に関して対照被験者や良性胆道疾患から胆道癌/肝内胆管癌の鑑別には、CA19-9 や CEA よりも WFA-sialylated MUC1 の方が、より良好な血清学的バイオマーカーであった。

胆汁中の WFA-sialylated MUC1 と CA19-9 による曲線下面積は、胆道癌/肝内胆管癌と対照被験者の比較で 0.896 (カットオフ値、13.5 nL / μ g protein) および 0.690 (1651U / μ g protein) であった。良性胆道疾患と胆道癌/肝内胆管癌の鑑別には、CA19-9 よりも胆汁中 WFA-sialylated MUC1 が、より良好な血清学的バイオマーカーであることを示唆した。

胆道癌/肝内胆管癌を鑑別するための WFA-sialylated MUC1 と CA19-9 の組み合わせ診断能評価を血清の WFA-sialylated MUC1 > 214.2 μ L / mL, CA19-9 > 27.6U / mL のカットオフで行うと、胆道癌/肝内胆管癌患者では 85.8% がカットオフ値を上回り、65.5% WFA-sialylated MUC1 のみカットオフ値を上回り、47.7% の患者が CA19-9 のみカットオフ値を上回り、6.7% が両方のカットオフ値以下であった。

胆道癌/肝内胆管癌を鑑別するため胆汁中

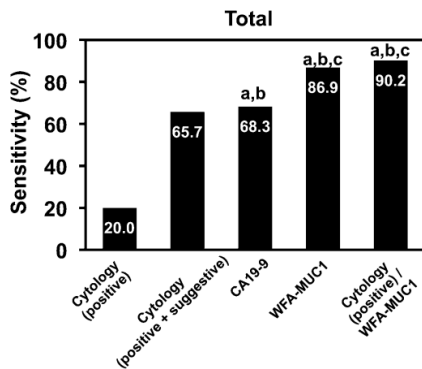
WFA-sialylated MUC1 > 13.5nL / μg と CA19-9 > 1651U / μg protein のカットオフ値で組み合わせ診断を行うと 89.3%がカットオフ値を上回り、77.8%WFA-sialylated MUC1 のみカットオフ値を上回り、35.3%の患者が CA19-9 のみカットオフ値を上回り、12.7%が両方のカットオフ値以下であった。

胆汁あるいは血清の WFA-sialylated MUC1 と CA19-9 を用いた組み合わせ診断は、胆道癌/肝内胆管癌の診断制度を改善することが示唆された。

(4) 胆汁細胞診は、良性胆道疾患の 115 人中 51 人、胆道癌/肝内胆管癌の 183 人中 140 人で行われた。良性胆道疾患ではクラス V と診断された症例はなく、5 人が (9.8%) が陽性疑い(クラス IIIb or IV)と分類されたものの、WFA-sialylated MUC1 では 5 例全例カットオフ値以下であった。

胆道癌/肝内胆管癌症例では、140 検体中 48 検体 (34.3%) が陰性 (class I/II/IIIa) と分類され、64 人 (45.7%) が陽性疑い (癌疑い) と分類され、28 名 (20%) のみが陽性 (癌) と分類された。胆汁中 WFA-sialylated MUC1 では陰性症例の 85%, 癌疑い症例の 90%, 陽性症例の 94%がカットオフ値より大きかった。

図 1



胆汁による診断感度は、細胞診 class V 20.0%, 細胞診 class IIIb 以上 65.7%、CA19-9(カットオフ値、1651U / μg protein) WFA-sialylated MUC1 (cut-off value, 13.5nL / μg protein), 細胞診 class V と WFA-sialylated MUC1 90.2%であった (図 1)

胆汁中の WFA-sialylated MUC1 は高感度のバイオマーカーであり、胆道癌/肝内胆管癌の診断で従来の胆汁細胞診や CA19-9 よりも優れていた。

(5) 血清 WFA-sialylated MUC1 と病理学的癌ステージを比較したが (図 2) 関連性は認められず、早期癌と進行癌、分化癌と未分化癌の比較 (図 3) でも類似していた。対照的に、血清 CA19-9 や CEA は、stage IV でステージ

I/II よりも高値を示し、血清 CA19-9 は乳頭型よりも、中分化/未分化型で高値を示した。

同様に、胆汁中 WFA-sialylated MUC1 や CA19-9 は病理学的癌ステージや組織型に関連性を認めなかった。

カットオフ値を血清では WFA-sialylated MUC1>214.2μL/mL, CA19-9 >27.6U / mL, CEA >2.8ng / mL、胆汁では WFA-sialylated MUC1>13.5nL / μg, CA19-9 >1651U / μg protein として検討すると、WFA-sialylated MUC1 は、stage I/II で CA19-9 よりも、stage I - IV で CEA よりも有意に高い診断感度を示した。

組織型別に検討すると WFA-sialylated MUC1 は CA19-9 と差はなかったが、CEA との比較ででは高い診断感度を示した。

WFA-sialyl MUC1 の腫瘍マーカーとしての有用性としてステージ、組織型に依存しない感度、また腫瘍マーカーの変動とは連動せず (図 2,3)、同時測定によって、より一層診断感度が向上するユニークな性質が明らかとなった。

図 2 胆道癌における腫瘍マーカーの診断感度 血清 stage 別

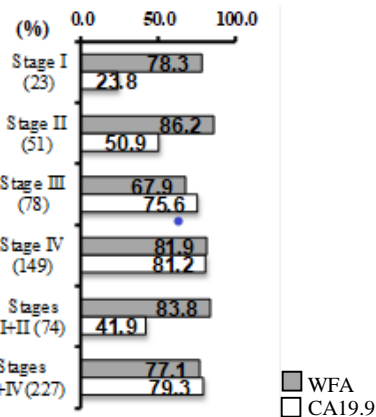
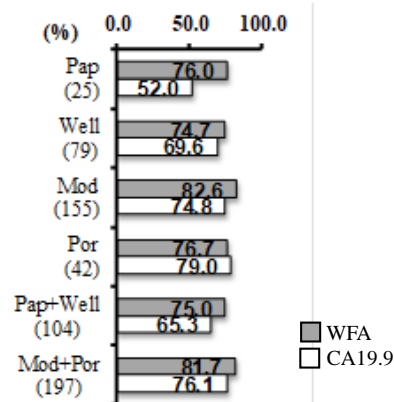


図 3 胆道癌における腫瘍マーカーの診断感度 血清組織型別



(6) まとめ

血清 WFA-sialylated MUC1 は胆道癌または肝内胆管癌患者で、対照被験者や良性胆道疾患患者よりも有意に高値を示し、特に肝内胆管癌患者で高い値を示した。癌の stage や組織型に関連せず、ROC 解析で、良性胆道疾患、胆管癌や肝内胆管癌ならびに stage I/II の診断では、CA19-9 や CEA よりも優れていた。胆汁中の WFA-sialylated MUC1 は胆管癌や肝内胆管癌患者で良性胆道疾患よりも有意に高値を示し、その診断能は CA19-9 や胆汁細胞診よりも優れ、診断感度は高値を示した。

研究成果における課題点としては、簡便で容易な測定システムの開発と全国への検査方法の普及が挙げられる。その解決策は、現在、SYSMEX 社で肝臓の線維化マーカーとなる Mac-2 Binding Protein 糖鎖修飾異性体を測定するための免疫学的測定装置 (HISCL シリーズ) が認可され、すでに全国多くの医療施設に導入されている。今回測定する MUC1 糖鎖修飾異性体の測定システムもこの免疫学的測定装置に搭載可能であり、有用性が証明できれば、安価で容易に全国にてこのマーカーの測定が可能となり、全国への検査方法の普及と治療成績の向上につなげることが可能となる。

課題を解決するための今後の臨床試験計画と実施に関しては、すでに複数の医療機関の協力体制のもとに、胆道癌、胆道良悪性疾患鑑別困難例、胆道良悪性疾患の生体試料の収集を開始しており、臨床情報の明らかな生体試料によるライブラリーを作製している。全国多くの医療施設に導入されている SYSMEX 社製の免疫学的測定装置と多施設共同研究で作成している生体試料ライブラリーを用いて、WFA-sialyl MUC1 が胆道癌の早期診断、癌の術前存在診断、進行度、生命予後、治療効果判定などの実用的なマーカーとなり得るか検証する予定である。

WFA-sialylated MUC1 は胆管癌や肝内胆管癌診断の有用なバイオマーカーで、将来的に臨床の現場で用いられるべきバイオマーカーであることが示唆された。

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 8 件)

Shoda J, Matsuda A, Shida T, Yamamoto M, Nagino M, Tsuyuguchi T, Yasaka T, Tazuma S, Uchiyama K, Unno M, Ohkohchi N, Nakanuma Y, Kuno A, Narimatsu H. Wisteria floribunda agglutinin-sialylated mucin core polypeptide 1 is a sensitive biomarker for biliary tract carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter study. J Gastroenterol、査読有、52 巻、2017、218 - 228

doi: 10.1007/s00535-016-1230-0.

Yamaguchi T, Yokoyama Y, Ebata T, Matsuda A, Kuno A, Ikehara Y, Shoda J, Narimatsu H, Nagino M. Verification of WFA-Sialylated MUC1 as a Sensitive Biliary Biomarker for Human Biliary Tract Cancer. Ann Surg Oncol、査読有、23 巻、2017、671 - 677

doi: 10.1245/s10434-015-4878-4.

Higuchi R, Yazawa T, Uemura S, Izumo W, Chaudhary RJ, Furukawa T, Yamamoto M. ENBD is Associated with Decreased Tumor Dissemination Compared to PTBD in Perihilar Cholangiocarcinoma. J Gastrointest Surg、査読有、21 巻、2017、1506 - 14

doi: 10.1007/s11605-017-3492-0.

Higuchi R, Yazawa T, Uemura S, Izumo W, Furukawa T, Yamamoto M. High-grade dysplasia/carcinoma in situ of the bile duct margin in patients with surgically resected node-negative perihilar cholangiocarcinoma is associated with poor survival: a retrospective study. J Hepatobiliary Pancreat Sci、査読有、24 巻、2017、456 - 465

doi: 10.1002/jhbp.481.

Higuchi R, Ota T, Yazawa T, Kajiyama H, Araida T, Furukawa T, Yoshikawa T, Takasaki K, Yamamoto M. Improved surgical outcomes for hilar cholangiocarcinoma: changes in surgical procedures and related outcomes based on 40 years of experience at a single institution. Surg Today、査読有、46 巻、2017、74 - 83

doi: 10.1007/s00595-015-1119-1

Matsuda A, Kuno A, Nakagawa T, Ikehara Y, Irimura T, Yamamoto M, Nakanuma Y, Miyoshi E, Nakamori S, Nakanishi H, Viwatthanasittiphong C, Srivatanakul P, Miwa M, Shoda J, Narimatsu H. Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1. Anal Chem、査読有、21 巻、2015、7274 - 7281.

doi: 10.1021/acs.analchem.5b01329.

Ariizumi S, Yamamoto M. Intrahepatic cholangiocarcinoma and cholangiolocellular carcinoma in

cirrhosis and chronic viral hepatitis.
Surg Today、査読有、45 巻、2015、682
- 7
doi: 10.1007/s00595-014-1031-0.

Nakamura M, Hashizume H, Oka H, Okada
M, Takakura R, Hisari A, Yoshida M,
Utsunomiya H. Physical Performance
Measures Associated with Locomotive
Syndrome in Middle-Aged and Older
Japanese Women. J Geriatr Phys Ther、
査読有、38 巻、2015、202 - 7

〔学会発表〕(計 7 件)

藤村 多嘉朗, 山下 依子, 周 正, 柳沢
美恵子, 望月 万里江, 河野 美玲, 萬
啓悟, 古垣 耕, 樋口 亮太, 正田 純一,
原田 直樹, 吉村 康史. HER2 陽性胆道が
ん細胞株に対する trastuzumab
emtansine の抗腫瘍効果の検討 日本癌治
療学会 2017 年

有泉 俊一, 小寺 由人, 山下 信吾, 大
森 亜紀子, 樋口 亮太, 谷澤 武久, 植
村 修一郎, 片桐 聡, 江川 裕人, 山本
雅一 胆管細胞癌に対する治療戦略 肝
切除と術後補助療法は肝内胆管癌の予後
を改善する 日本消化器外科学会総会
2017 年

樋口 亮太, 谷澤 武久, 山本 雅一 肝
門部胆管癌に対する治療成績向上にむけ
た取り組み 日本胆道学会 2017 年

樋口 亮太, 谷澤 武久, 植村 修一郎,
出雲 渉, 松永 雄太郎, 有泉 俊一, 小
寺 由人, 高橋 豊, 矢川 陽介, 古川 徹,
江川 裕人, 山本 雅一 肝外胆管癌に対
する術式別治療成績と予後規定因子の検
討 日本外科学会 2016 年

志田 隆史, 中沼 安二, 正田 純一 ベ
ンチからベッドへ 新規胆管癌糖蛋白質
マーカー、WFA-positive sialyl-MUC1 の
臨床的意義 多施設臨床試験の結果より
日本肝臓学会 2015 年

志田 隆史, 樋口 亮太, 山本 雅一, 柳
野 正人, 露口 利夫, 八坂 貴宏, 田妻
進, 内山 和久, 海野 倫明, 大河内 信
弘, 松田 厚志, 久野 敦, 成松 久, 正
田 純一 新規胆管癌糖蛋白質マーカー、
WFA-positive sialyl-MUC1 の臨床的意義
多施設臨床試験の結果より 日本胆道学
会 2015

樋口 亮太, 谷澤 武久, 矢川 陽介, 植
村 修一郎, 岡野 美々, 片桐 聡, 有泉
俊一, 小寺 由人, 梶山 英樹, 太田 岳
洋, 古川 徹, 山本 雅一 脈管浸潤を伴
う広範囲胆管癌に対する手術の成績 日
本外科学会 2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

樋口 亮太 (HIGUCHI Ryota)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20318059

(2)研究分担者

山本 雅一 (YAMAMOTO Masakazu)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60220498

有泉 俊一 (ARIIZUMI Shunichi)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40277158

正田 純一 (SHODA Junichi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 90241827

宇都宮 洋才 (UTSUNOMIYA Hirotoshi)
和歌山県立医科大学・共同利用施設・准教授
研究者番号: 60264876