

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19064

研究課題名(和文)胆管内乳頭状腫瘍の分子病理学的解析

研究課題名(英文) Intraductal papillary neoplasm of the bile duct: histological and molecular analysis of 27 patients

研究代表者

内藤 嘉紀(Naito, Yoshiki)

久留米大学・大学病院・講師

研究者番号：50465712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胆管内乳頭状腫瘍(IPNB)の局在による分子病理学的特徴の差異をIPNB 27症例を用いて比較検討した。肉眼的には粘液産生を伴う嚢胞形態は肝外IPNBでは認められなかった($P < 0.001$)。免疫組織学的染色では、MUC5ACのみ有意差がみられたが($P < 0.05$)、KRASやPIK3CA、P53、P16についての有意差はなかった。予後にも有意差はみられなかった($P=0.899$)。IPNBは局在による臨床分子病理学的に類似した疾患群であった。

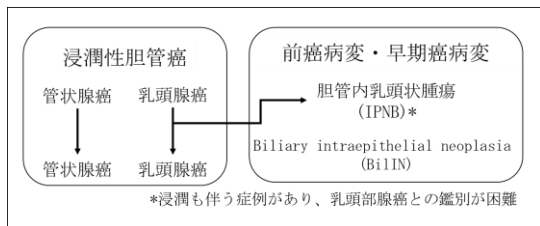
研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated clinicopathological features, somatic mutation and aberrant expressions in 27 tumors of IPNBs. Macroscopically, there were no cystic types in the extra-IPNB ($P < 0.001$). Immunohistochemically, MUC5AC was expressed in 9 tumors (90%, 9/10) in the intra-IPNB, but was expressed only in 7 tumors in extra-IPNB (41%, 7/17) ($P < 0.05$). There were no differences in the somatic mutation (KRAS and PIK3CA) and aberrant expressions (P53 and P16). There were no significant differences in overall survival between intra-IPNB and extra-IPNB ($P=0.899$). This study revealed that intra-IPNB and extra-IPNB present mostly the common clinicopathologic features and molecular analysis.

研究分野：人体病理

キーワード：人体病理 肝胆道系腫瘍 胆管内乳頭状腫瘍 分子病理

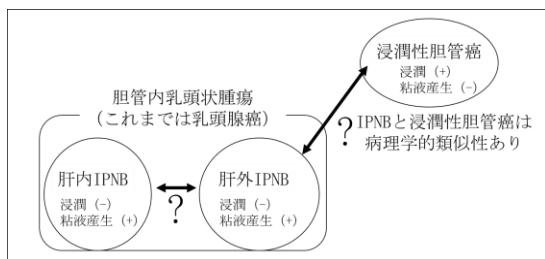
1. 研究開始当初の背景

(1) 胆管内乳頭状腫瘍 (Intraductal papillary neoplasm of the bile duct 以下、IPNB) は「胆管腔内あるいは胆嚢壁内に乳頭状に発育する胆道上皮の乳頭状腫瘍性病変」と定義され、発生頻度が少ない予後良好な新しい疾患群とされている[1, 2]。また、浸潤を伴う症例の存在や粘液産生能の有無などの点から、これまで診断されてきた乳頭腺癌との異同が不明確であり、病理診断する際のコンセンサスが得られていないのが現状である。



(2) 肝内/肝外 IPNB の臨床病理学的相違点がある：IPNB の多くは乳頭腺癌と診断されてきた症例である。肝内 IPNB では非浸潤性で高粘液産生性症例が多いが[1]、肝外 IPNB では浸潤を伴う症例が多く、高粘液産生性を伴う症例は少ないため、肝内 IPNB と肝外 IPNB との形態病理学的差異がある事が示唆された。

(3) 肝外 IPNB と浸潤性胆管癌 (乳頭腺癌) の違い：肝内胆管発生の IPNB の約半数が胆管固有上皮型であり、肝外胆管発生の IPNB についても多くの症例で胆管固有上皮型であった。一方で、肝内/肝外浸潤性胆管癌でも殆どの症例で胆管固有上皮型であり、肝外 IPNB と浸潤性胆管癌の明確な違いが指摘できていない。



2. 研究の目的

本研究は、前述の背景に対して、以下の2点を明らかにするために、臨床病理学的検討及び遺伝子解析を行う事とした。

- (1) 肝内/肝外 IPNB を同一疾患群として考えることの妥当性
- (2) 肝外 IPNB と浸潤性胆管癌の違いを分子病理学的に解明

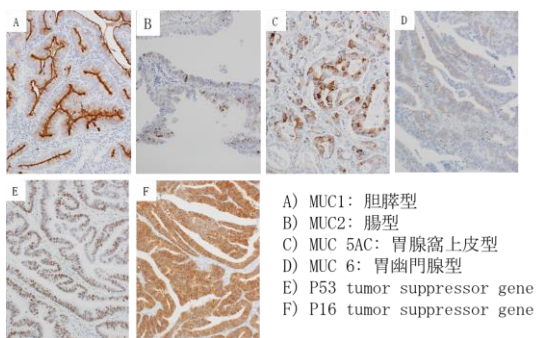
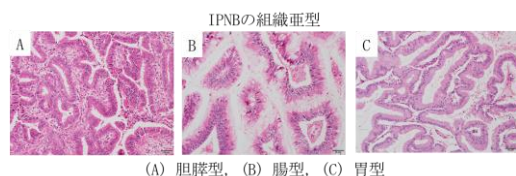
3. 研究の方法

(1) IPNB の定義

- ①腫瘍の主体は非浸潤癌であり、胆管内に薄い線維性間質を軸とする乳頭状増殖を示す腫瘍。
- ②周囲胆管との連続性がみられる。
- ③卵巣様間質がみられる。

(2) 検討症例：対象症例は、IPNB 27 症例であり、肝内胆管を主座とする IPNB 10 症例、肝外胆管を主座とする IPNB 17 症例を用いて臨床病理学的検討を行った。また、肝外胆管癌 19 症例については、肝外 IPNB との比較検討に用いた。

(3) 免疫組織化学染色による比較検討：本研究では、粘液形質である MUC1 (Ma695, dilution 1:100; Novocastra, Newcastle, UK)、MUC2 (Ccp58, dilution 1:100; Novocastra, Newcastle, UK)、MUC5AC (CLH2, dilution 1:100; Novocastra, Newcastle, UK)、MUC6 (CLH5, dilution 1:50; Novocastra, Newcastle, UK)、及びがん抑制遺伝子である P53 (PAb1801, dilution 1:200; Leica, Newcastle, UK)、P16INK4a (16P04, Ready to use; Cell Marque, California, USA) の評価を行った。



(2) 遺伝子解析: KRAS/BRAF/GNAS 及び PIK3CA の mutation を解析した。KRAS、BRAF、PIK3CA については、F-PHFA* customized kit (Riken Genesis Co, Ltd) を用いた CFX Connect real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc) で検討を行った。一方で、GNAS は IPNB パラフィン組織より抽出した DNA をテンプレートとして用いて、酵素 KOD FX Neo Polymerase [TOYOBO] にて、PCR により増幅、DNA シーケンス解析を行った。

【PCR 反応条件】 94°C/2min → [98°C/10sec → 50°C/30sec → 68°C/30sec] × 40 cycles → 68°C/5min → 4°C × ∞

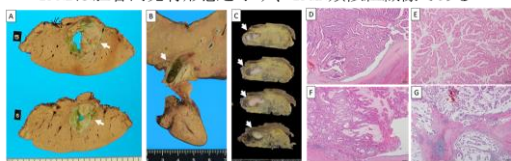
GNAS Primer:

(F)GTAAACGACGCCAGTAGACCTTTGCTTTAGATTG
GCAA, (R) AACTTGGTCT CAAAGATTCC AGAAG

4. 研究成果

(1) 臨床病理学的検討の結果：肝内及び肝外 IPNB における発症年齢は、それぞれ 65.6 ± 8.8 歳と 69.6 ± 8.4 、男女比は 8:2 と 12:5 で、共に有意差を認めなかった ($P=0.209$ 、 $P=0.932$)。肉眼的には粘液産生を伴う嚢胞形態を示すのは 6 症例 (6/10) みられたが、肝外 IPNB では認められず、局在による肉眼形態の差異が指摘された ($P < 0.001$)。組織学的には、全例で乳頭状増殖を示す腫瘍細胞が認められた。全例で胆管内増殖を主としていたが、浸潤癌を伴う症例もみられた。浸潤癌の形態は管状腺癌と粘液癌に大別する事が出来たが、浸潤を併発する頻度についての有意差はなかった (肝内 IPNB : 4/10、肝外 IPNB : 10/17) ($P=0.584$)。生存期間も局在による有意差はなかった (肝内 IPNB vs 肝外 IPNB : 1861.4 ± 1244.6 (day) vs 1622.9 ± 804.9 (day)、 $P=0.899$)。IPNB におけるリンパ節転移症例は肝外 IPNB 1 症例、再発例は肝内 IPNB 1 症例であった。

IPNBは胆管内発育形態を示す、IPMN類似組織像である



A-C:肉眼形態

(A) 嚢胞型。胆管の嚢胞状拡張がみられ、内腔には顕著な粘液が含有されている。(B, C) 胆管拡張型。腫瘍は胆管内を充填するように増殖しているが、粘液産生は目立たない。

D-G:組織像

(D, E) 腫瘍細胞の乳頭状増殖の組織像。(F, G) 浸潤部は管状腺癌(F)と粘液癌(G)に分けられる。

(2) 粘液形質の差異を確認するために、免疫組織学的染色を行なったが、MUC5ACのみ有意差がみられた (肝内 IPNB : 9/10、肝外 IPNB : 7/17) ($P < 0.05$)。しかしながら、その他の免疫組織化学染色の結果に有意差はみられなかった。

(3) IPNB における遺伝子解析

Molecular aberrations	Intra-hepatic IPNB	Extra-hepatic IPNB	p-Value
KRAS (RT-PCR) ¹⁾	1 (n=7)	1 (n=16)	0.529
PIK3CA (RT-PCR) ²⁾	0 (n=7)	1 (n=16)	0.663
GNAS (Sanger)	0 (n=8)	0 (n=16)	-
P53 (IHC) overexpression	3 (n=10)	9 (n=17)	0.448
P16 (IHC) expression	8 (n=10)	7 (n=17)	0.118

KRAS, PIK3CA, GNAS, P53, P16 遺伝子の検討を行った。KRAS¹⁾は、肝内 IPNB では G12C、肝外 IPNB では G12D/G13D, PIK3CA²⁾では肝外

IPNB で一例のみ E542K が認められた。P53 は肝内 IPNB で 3 症例 (3/10)、肝外 IPNB は 9 症例 (9/17) であったが有意差は認められなかった (0.448)。また、P16 についても、肝内 IPNB で 8 症例 (8/10)、肝外 IPNB で 7 症例 (7/17) であり、局在による有意差は認められなかった。しかしながら、P16 については IPNB の 56% (15/27) で陽性となっている為、IPNB の発癌機構への関与が疑われる因子であることが予想された。

(3) 今回の検討では、[1]肝内/肝外 IPNB を同一疾患群として考えることの妥当性、[2]肝外 IPNB と浸潤性胆管癌の違いを分子病理学的に解明、を目的として研究を進めてきた。[1]については、年齢や性別など、疫学的見地からの有意差は認められないものの、肝内 IPNB では粘液産生を伴う嚢胞型病変が有意に多く、両者間に差異がみられた。また、MUC5AC についても両群間で有意差がみられた。以上の事からも、肝内 IPNB は胃型粘液形質を有する IPNB が多く、粘液高産生性の特徴を有している可能性が示唆された。しかしながら、胆管癌の主要遺伝子異常として知られている KRAS や P53、PIK3CA、P16 では局在による差異がみられず、肝内と肝外 IPNB は遺伝子学的に類似した腫瘍として考える事が出来た。IPNB はリンパ節転移や再発例が少なく、予後良好疾患群として考える事が出来た。

(4) [2] 肝外 IPNB と浸潤性胆管癌の違いを分子病理学的に解明、についての検討は未だ充分に出来ていないが、IPNB の局在に関わらず GNAS 変異がなく、KRAS 変異もごく少数である事が確認され、これらの遺伝子が IPNB の major gene ではない可能性が示唆された。特に、GNAS は IPNB で一定頻度みられるとする報告もあったが、実際には IPNB と GNAS 変異には関係がない事が指摘出来た。浸潤性胆管癌との違いについては、肝外胆管癌 19 症例中、KRAS 変異がみられたのは 3 症例 (3/19)、GNAS 変異は全例変異なしであった (0/19)。この結果からは、肝外 IPNB と浸潤性胆管癌の間に分子生物学的な差異がない可能性が考えられた。しかしながら、P16 免疫染色では、肝外胆管癌の 2 症例のみで陽性となっていた事から、Rb-P16 経路に関与する因子の違いが生じている可能性が示唆されます。今後は、Rb-P16 因子を中心に検討を進めていく予定である。

<文献>

- Naito Y, et al. World J Gastroenterol. 2012;18:3673-3680
- Kubota K, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014;21:176-185

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 1 件)

内藤嘉紀、中島収、鹿毛政義、矢野博久、【コランギオパシー】胆管の乳頭状腫瘍、肝胆膵、査読無、71 巻、2015、887-894

[学会発表] (計 4 件)

① The 6th Asian Pacific Association for the Study of the Liver

② The 25th Asia Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting

③ International Liver Cancer Association 10th Annual Conference

④ American Association for the Study of Liver Diseases 2016

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤嘉紀 (YOSHIKI Naito)

久留米大学医学部病理学講座 講師

研究者番号 : 50465712

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()