

令和元年6月4日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10272

研究課題名(和文) 肝内胆管癌の遺伝子・分子生物学的機構に基づいたイメージバイオマーカーの研究

研究課題名(英文) Image biomarkers of intrahepatic cholangiocarcinoma based on genetic and biomolecular phenotypes

研究代表者

小坂 一斗 (Kazuto, Kozaka)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：80547175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌は原発性肝癌の中で肝細胞癌に次いで2番目に頻度が多く、近年では世界的な患者数の増加傾向が見られている。近年の遺伝子・分子生物学的研究により、肝内胆管癌の亜分類が提唱されており、これらは個別治療に重要である。今回我々は腫瘍糖代謝が小型胆管癌では強い亢進が見られないことを免疫組織化学的に明らかにし、これらがFDG-PET検査で確認出来ることを見いだした。またIDH1/2変異を有するものはMRI検査において高ADC値を呈することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌は予後の悪い悪性腫瘍の一つであり、早期に診断して外科治療することがもっとも有効な治療である。しかし、近年肝内胆管癌には少なくとも2つの異なった亜型があることが分かっており、それらの生物学的態度や有効な治療方法も異なっていることが明らかとなっている。これらの亜分類は腫瘍から検体を取り出し、病理学的、遺伝子生物学的に検討する必要がある。本研究ではこれらの亜分類をCTやMRIによる臨床画像で診断ないし類推する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic cholangiocarcinoma is the second most frequent primary liver cancer after hepatocellular carcinoma, and in recent years the worldwide trend for an increasing number of patients has been observed. Recent gene and molecular biological researches have proposed a subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma, which is important for personalized medicine. Here, we clarified by immunohistochemistry that tumor glucose metabolism was not strongly enhanced in small duct type of cholangiocarcinoma, and found that these can be confirmed by FDG-PET examination. We also found that those with IDH1 / 2 mutations show high ADC values rather than IDH1/2 wild type on MRI examination.

研究分野：放射線医学

キーワード：MRI 肝内胆管癌 FDG-PET/CT IDH1/2 グルコーストランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌は原発性肝癌の中で肝細胞癌に次いで多い癌であり、その頻度は様々な国、地域で増加傾向である。肝内胆管癌の原因として従来は肝内胆管結石や肝吸虫症、先天性胆道疾患などの胆道持続感染が大多数を占めていたが、近年はウイルス性肝炎を含む、慢性肝疾患を背景に発癌するものが増加している。胆道癌の癌遺伝子解析では種々の遺伝子異常が確認されており、一定の成果が挙げられている。胆道癌は発生部位により大きく遠位胆管癌、肝門部領域胆管癌、肝内胆管癌に分類できる。この胆道癌の発生部位あるいは発生母地が遺伝子解析により類推されるようになってきている。実際にこれらの胆道癌は、分子病理学的に多彩な腫瘍群であることが近年明らかになりつつある。今回、我々は肝内胆管癌の CT や MRI などの画像所見に注目した。肝内胆管癌の多くは腫瘍形成し、その他の肝悪性腫瘍や良性腫瘍との鑑別が重要である。さらに同じ肝内胆管癌でもその画像所見は腫瘍のサイズや発生部位、背景の肝疾患により多彩である。これは上記のような分子病理を反映した結果と捉えられる。肝内胆管癌の根治的治療として外科手術が第一選択であるが、早期発見が難しいことから、外科切除例でみた5年生存率は0-40%と満足に行く結果は得られていない。そのため、予後を改善する新たな治療戦略が喫緊の課題となっている。EGFR, HER2, VEGF は肝内胆管癌での過剰発現が報告されており、潜在的な治療ターゲットとして注目を集めている。その他にも c-MET、PIK3CA, KRAS などの遺伝子異常も報告されている。これらの分子をターゲットとした治療は乳癌 (eg, trastuzumab) や非小細胞肺癌 (eg, erlotinib)、大腸癌 (eg, cetuximab)、gastrointestinal stromal tumor (eg, imatinib)、そして肝細胞癌 (eg, sorafenib) で既に行われている。こうした目的で遺伝子解析技術を用いた分子バイオマーカーの研究が急速に進んでいるが、術前にそれらを類推する手立てが生検検体を得る以外にないため、一般臨床での広い活用は現時点では困難である。我々は MRI, CT などの一般臨床画像は分子病理学的メカニズムを反映していると考え、分子バイオマーカーと画像所見の対比することで画像バイオマーカーを推定できる可能性が大きいと考えた。これまでのところ肝内胆管癌において、その亜分類に基づいた分子病理学的背景と画像所見の関連に関する研究はなされていない。

### 2. 研究の目的

次世代シーケンス技術の進歩により、体細胞変異を包括的に同定することが可能となった。本研究では、肝内胆管癌の一般臨床画像所見 (CT, MRI, FDG-PET/CT) と次世代シーケンスおよび RT-PCR、免疫染色を使った病理学的所見を対比し、有用なイメージバイオマーカーを確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

当該施設の肝内胆管癌を集積する (検索期間: 2000年~2016年)

画像解析: Dynamic CT, 動注 CT, MRI T1 および T2 強調像、拡散強調像、Gd-E0B-DTPA 造影 MRI (dynamic phase および肝細胞相) 所見、FDG-PET/CT を詳細に解析し grading を行う。

遺伝子解析・病理解析: 各種分子マーカー (血管新生因子関連マーカー、幹細胞マーカー、肝細胞マーカー、胆管細胞マーカー、分子標的治療マーカー、腫瘍マーカー、肝細胞トランスポーター、など) の発現を免疫染色や体細胞変異を検討し、各種画像所見と比較する。

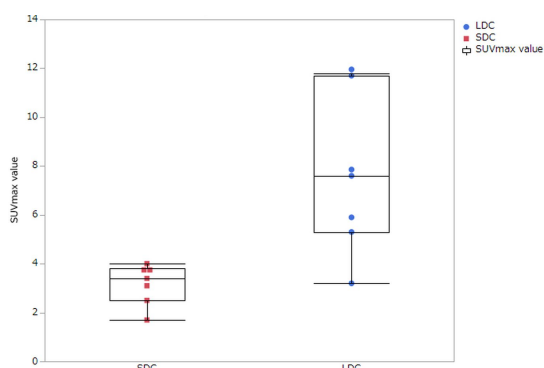
肝内胆管癌の層別化と予後の比較: 画像解析から得られた所見の中で遺伝子・病理解析を反映した画像バイオマーカーを確定させ、それらの予後との関連を検討する。

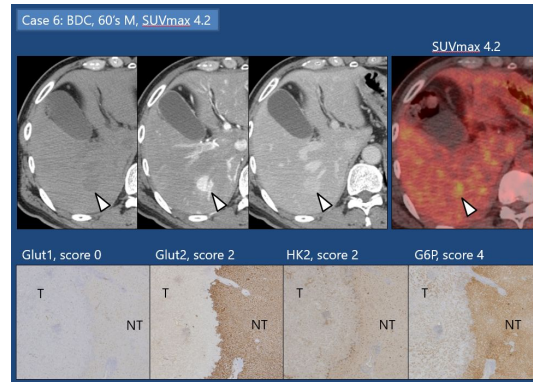
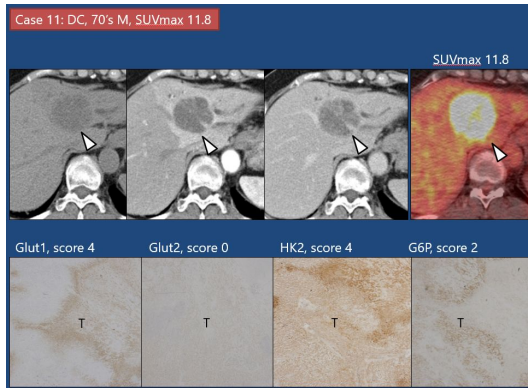
### 4. 研究成果

#### 4 - 1. 腫瘍形成型肝内胆管癌の糖代謝に基づく FDG-PET/CT, 免疫組織化学染色による亜分類

肝内胆管癌を発生母地に注目して病理組織学的に小型胆管癌と大型胆管癌に分類し、それぞれの糖代謝について、免疫組織化学的に検討した。小型腺腔~コード状の細胆管様増生を示し、粘液産生の乏しい腫瘍を BDC 群 (n=8, 背景肝は正常肝 6 例 (含む非特異性反応性変化), 慢性肝疾患 2 例, 腫瘍径は  $23 \pm 6.2\text{mm}$ )、明瞭な腺腔を形成し、粘液産生が明らかな腫瘍を DC 群 (n=9, 背景肝は正常肝 4 例, 慢性肝疾患 5 例, 腫瘍径  $51 \pm 26\text{mm}$ ) とし、FDG-PET の SUV-max 値を比較検討した。その結果、FDG-PET における SUV-max 値は BDC 群, DC 群それぞれ  $2.4 \pm 1.6$ ,  $8.2 \pm 4.1$  であった ( $p < 0.01$ )。

これらの所見は免疫組織化学染色によるグルコーストランスポーター発現、ヘキソキナーゼ 2 発現において、相関を認めた。すなわち、BDC では Glut1 の低発現、HK2 の低発現を認め、一方 DC では Glut1, HK2 の高発現を認めた。





またこれらの2群の予後を比較したところ、BDCはDCに比べて良好な予後が確認された。

以上より、腫瘍形成性肝内胆管癌は糖代謝の見地から小型胆管癌(SDC)と大型胆管癌(LDC)に分類することは妥当と考えられた。この研究結果は2015年胆道学会および2016年日本医学放射線学会、北米放射線学会で発表し、現在英文雑誌に投稿準備中である。

#### 4-2. ダイナミックCTを用いた腫瘍形成型肝内胆管癌および肝細胞癌(HCC)の診断能

外科切除された細胆管癌(n=10, 72±8.4歳, 25±6.7mm), 通常型胆管癌(n=16, 65±14歳, 49±25mm), HCC(n=18, 61±12歳, 35±22mm)を対象とし、4相ダイナミックCT(単純, 動脈優位相, 門脈相, 平衡相)における腫瘍の造影パターン(早期濃染の有無, 遅延性濃染の有無), 腫瘍周囲濃染の有無とパターン(楔状, リング状, 扇状), 結節内のGlisson鞘の取り込みの有無について2名の画像診断医に評価し、診断能を検討した。その結果、「腫瘍周囲早期濃染」、「腫瘍内の門脈枝の貫通」の診断一致率は低く客観性に欠き、一方で、「腫瘍早期濃染」、「腫瘍後期濃染」、「末梢胆管の拡張」は安定した画像所見であることが分かった。これに基づいて、診断アルゴリズムを作成したところ、細胆管癌の正診率は86.5-100%、通常型胆管癌の正診率は86.5-100%、肝細胞癌の正診率は100%となった。この研究結果は2017年肝癌研究会で報告した。

#### 4-3. 肝内局在から見た腫瘍形成性肝内胆管癌の画像的特徴と病理分類の検討

外科切除された腫瘍形成型肝内胆管癌(n=42)を対象とし、術前画像よりその局在を左右肝管(B-1)、領域胆管(B-2)、区域胆管(B-3)、亜区域胆管(B-4)、それ以下(B-5)に分類した。ダイナミックCTの後期動脈相で非腫瘍部肝葉より高吸収を示した場合、造影効果陽性と判定し、多血・乏血・リング・不均一のように分類した。FDG-PET/CTが施行されている24例ではSUVmax値を計測した。

結果はB-1、B-2、B-3、B-4、B-5はそれぞれ0、6、17、14、5例であり、B-2~B-5の平均腫瘍径は40±21mm, 52±21mm, 27±12mm, 22±3.7mm、背景肝の正常肝の割合はそれぞれ83%, 67%, 43%, 40%であった。B-2~B-5における画像所見(ダイナミックスタディ)では乏血の割合はそれぞれ50%, 56%, 14%, 0%であり、SUVmaxはそれぞれ3.7(n=2), 8.7(n=9), 3.7(n=8), 3.7(n=4)であった。B-2における病理組織診断は全例通常型胆管癌、B-3は通常型胆管癌n=14、通常型・細胆管癌の混合したものn=2、細胆管癌n=1、B-4は通常型胆管癌n=4、通常型・細胆管癌の混合したものn=4、細胆管癌n=6、B-5は通常型胆管癌n=2、通常型・細胆管癌の混合したものn=1、細胆管癌n=2であった。

腫瘍形成性肝内胆管癌のうち末梢に局在するものは乏血である頻度が少なく、SUV-max値が低い傾向にあり、細胆管癌成分を含むものが多いことが判明した。以上の研究結果は2018年肝癌研究会で報告した。

#### 4-4. 腫瘍形成型肝内胆管癌におけるIDH1/IDH2遺伝子変異を推測するMRイメージマーカーの開発

41例の腫瘍形成型ICCのうちIDH1/IDH2変異を有したものは14例あった。これらの14例中11例に病変のほとんどに細胆管癌様所見が病理学的に確認された。一方、IDH1/IDH2変異を認めない27例においても13例に細胆管癌様所見を認めたが、その割合はIDH1/IDH2変異を伴うものと比べて軽微であった。

これらのうち、MRI検査が行われた14例について、画像解析を行った(IDH1/IDH2変異有群n=5, IDH1/IDH2変異無群n=9)。このうち、IDH1/IDH2変異例では腫瘍中心部の見かけの拡散係数(ADC値)が有意に低い値(1.3±0.3mm<sup>2</sup>/s vs 1.8±0.3mm<sup>2</sup>/s, p<0.05)を示した。病理学的にはIDH1/IDH2変異有群では成熟した間質で占められており、一方、IDH1/IDH2変異無群では線維芽細胞を伴った活動性の線維組織がよく見られた。

	IDH positive	IDH negative		p
ADC/peripheral	1.2±0.1	1.3±0.4		n.s
Pathology of stroma in peripheral portion	Early 3 Early, activated 2 Early, mature 1	Activated 2 Early 4 Early, activated 2 Early, inflammation 1		
ADC/central	1.3±0.3	1.8±0.3		P<0.05
Pathology of stroma in central portion	Mature 6/6	Activated 5/9 Mature 4/9		

これらのコホートにおける生存期間の検討では、IDH1/IDH2 変異有群は IDH1/IDH2 変異無群に比べて長い傾向にあったが、有意差は見られなかった。

IDH1/IDH2 変異を直接画像化することは出来なかったが、これらが誘導する線維性間質(成熟線維性間質)が MRI 検査の ADC map で推定出来る可能性が示唆された(未発表)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

1. Kozaka Kazuto, et al. Dynamic CT findings of cholangiolocellular carcinoma: correlation with angiography-assisted CT and histopathology. Abdominal Radiology(査読あり). 2016:1-9.
2. Yoneda N., et al(10人中4番目). Benign Hepatocellular Nodules: Hepatobiliary Phase of Gadoxetic Acid-enhanced MR Imaging Based on Molecular Background. Radiographics(査読あり);36(7). 2016:2010-2710.1148/rg.2016160037.
3. 小坂 一斗, et al. 【肝腫瘍性病変の画像、病理、臨床】肝悪性腫瘍の画像診断 非肝細胞由来. 臨床画像;32(2). 2016:189-99.
4. 小坂 一斗, et al. 【肝内胆管癌:治療成績の改善を目指して】疫学・早期診断 早期画像診断はどこまで可能になったか. 肝・胆・膵(査読なし);72(1). 2016:13-22.
5. 小坂 一斗, et al. 【肝胆膵の鑑別診断のポイント】硬変肝にみられる結節性病変の鑑別. 画像診断(査読なし);36(4). 2016:54-9.
6. 小坂 一斗, et al. 【肝胆膵の鑑別診断のポイント】中心瘢痕を有する肝腫瘍の鑑別. 画像診断(査読なし);36(4). 2016:114-7.
7. Kitao Azusa, et al (10人中4番目). Gadoxetic Acid Enhanced Magnetic Resonance Imaging Reflects Co activation of catenin and Hepatocyte Nuclear Factor 4 in Hepatocellular Carcinoma. Hepatology Research(査読あり). 2017.
8. 小森 隆弘, et al(7人中4番目). 【胆管内腔発育型腫瘍の概念と実態】胆管内、胆道内腫瘍(膵管内腫瘍との比較を含めて) Intraductal papillary neoplasm of the bile duct(IPNB)の臨床像・画像診断(査読なし). 肝・胆・膵;75(6). 2017:1063-9.
9. 小坂 一斗. SIGNA Pioneer の使用経験および上腹部 MR の最新アプローチ. 映像情報 Medical(査読なし) (50). 2018:105-12.
10. 小坂 一斗, et al. 【救急放射線診断へのアプローチ】腹部/急性腹症 診断の進め方 閉塞性黄疸・胆道感染症. 臨床画像;34(10月増刊(査読なし)). 2018:198-9.
11. 小坂 一斗, et al. 胆道狭窄の画像診断. 臨床放射線(査読なし);63(8). 2018:885-95.
12. 小坂 一斗, et al. 【肝の画像診断 update】肝内胆管病変の画像診断. 画像診断(査読なし);38(10). 2018:1047-57.
13. 小森 隆弘, et al(8人中3番目). 【胆管内乳頭状腫瘍(IPNB)の病態と診療の現状】IPNB の画像による鑑別診断. 胆と膵(査読なし);39(8). 2018:719-25.
14. 松原 崇史, et al(4人中2番目). 【押さえておきたい臨床・画像分類】(第5章)腹部・骨盤 胆道系 膵臓に類似疾患をもつ胆道系腫瘍. 画像診断(査読なし);38(11). 2018:A190-A3.
15. 北尾 梓, et al(14人中4番目). 【個別化医療と放射線診療】肝細胞癌における各種遺伝子変異と画像診断 EOB-MRI を中心に. 日独医報(査読なし);63(1). 2018:57-63.
16. 北尾 梓, et al(7人中3番目). Refresher Course Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 読影のコツと注意点. 画像診断(査読なし);38(14). 2018:1448-56.

[学会発表](計 18 件)

1. Kozaka K. Varying 18F-FDG uptake and glucose transporter expression in mass forming type of intrahepatic cholangiocarcinoma. Japanese congress of radiology 75th: 2016.
2. Kozaka K. Varying 18F-FDG uptake and glucose transporter expression in mass forming type of intrahepatic cholangiocarcinoma. Radiology society of North America (RSNA) 102th: 2016.
3. Kozaka K. 『Imaging of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Up-to-date』. 97th German Roentgen Congress: 2016.
4. 小坂 一斗. Varying 18F-FDG uptake and glucose transporter expression in mass forming type of intrahepatic cholangiocarcinoma. 第52回肝癌研究会: 2016.
5. 小坂 一斗. 教育講演 13 消化器 2: 悪性腫瘍の鑑別 『肝内胆管癌の早期診断』. 第75回日本医学放射線学会総会: 2016.
6. 小坂 一斗. 『肝内胆管癌の画像診断』. 第45回断層映像研究会: 2016.
7. 小坂 一斗. 『肝嚢胞性疾患の画像診断』. 広島画像診断講演会: 2016.
8. Kozaka K. Image of Biliary System. Dissemination Seminar 2nd: 2017.
9. Kozaka K., et al. Sclerosing cholangitis: images and pathophysiology. RSNA: 2017.
10. 小坂 一斗. 胆管癌の画像的特徴: ダイナミック CT における肝細胞癌, 胆管細胞癌との対比. 第53回日本肝癌研究会: 2017.
11. 小坂 一斗. 教育講演消化器 3: 肝臓のびまん性疾患 3 Sclerosing Cholangitis 第76回日本医学放射線学会総会: 2017.
12. 小坂 一斗. 教育講演「消化器 1」 胆道狭窄の鑑別診断. 第53回日本医学放射線学会秋季臨床大会 2017.
13. 小坂 一斗. 肝腫瘍の血流画像診断. 高知放射線診療講演会: 2017.
14. 小坂 一斗. 肝内胆管癌の画像診断. 京都胆道カンファレンス: 2017.
15. Kozaka K. Hepatic metastases: Imaging variation and pitfalls. MRS2018: 2018.
16. Kozaka K., et al. Imaging features of hepatic metastases from various sources: Radiologic-pathologic correlation. RSNA: 2018.
17. 小坂 一斗. 肝内局在から見た腫瘍形成性肝内胆管癌の画像的特徴と病理分類 第54回日本肝癌研究会: 2018.
18. 小坂 一斗. SIGNA™Pioneer を用いた腹部 MRI の最新アプローチ. 第46回日本磁気共鳴医学会大会: 2018.

〔図書〕(計 2 件)

1. Kozaka K., et al. Pathology and Imaging of Peribiliary Cysts: Recent Progress. Pathology of the Bile Duct: Springer; 2017. p. 113-20.
2. Kozaka K., et al. Radiological Approaches to Biliary Diseases with Pancreatic Counterparts. In: Nakanuma Y, editor. Biliary Diseases with Pancreatic Counterparts: A New Disease Concept 2017. p. 217-34.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

小坂 一斗 (KOZAKA, Kazuto)  
 金沢大学・医学系・講師  
 研究者番号: 80547175

### (2)研究分担者

原田 憲一 (HARADA, Kenichi)  
 金沢大学 医学系 教授  
 研究者番号: 30283112