

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10684

研究課題名（和文）胆道癌リンパ節転移巣における浸潤・増殖機序に関する検討

研究課題名（英文）Epithelial- Mesenchymal transition and genetic mutation in Lymph node metastasis in extrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

中西 喜嗣（Nakanishi, Yoshitsugu）

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：40447058

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肝外胆管癌におけるリンパ節転移メカニズムの解明の為1)大腸癌でリンパ節転移の危険因子とされる腫瘍先進部における簇出（TB）数と臨床病理学因子ならびに術後予後との関係に関する検討 2)TB数と上皮-間葉転換（EMT）関連蛋白発現強度との関係の検討 3)次世代シーケンサーを用いた次世代原発巣とリンパ節転移巣との間の遺伝子変異の差異の検討を行なった。結果 1)TB数がhigh gradeの症例は、浸潤関連因子と関係を持ち、予後不良。 2)EMTパターンを示した症例群ではTB数が多い傾向。 3)リンパ節転移に特異的な遺伝子変異は認めなかった。原発巣とリンパ節転移巣では遺伝子変異がほぼ一致していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1)の結果から癌細胞がTBの形態をとることが転移のプロセスで重要であると示唆された。また、TBはEMTの形態学的表現形であることが推測されたが、2)の結果はこれを強く支持する結果と言える。しかし、3)の結果からはリンパ節転移に特化した遺伝子変異は同定できなかったことから、EMTは遺伝子変異だけで説明できるものではないことが示唆された。さらに3)の結果から肝外胆管癌の遺伝子変異は症例ごとに異なっているが、転移巣においても原発と変異がほぼ同等であることから、症例ごとに原発巣における遺伝子変異を調べることにより、再発転移巣の治療ターゲットとなる遺伝子変異を推測することが将来的に可能になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism of lymph node metastasis in extrahepatic cholangiocarcinoma (EHCC), we performed studies as follows: 1) the association between the number of tumor budding (TB) at the invasive area and clinicopathological factors, postoperative prognosis. 2) associations between the number of TB and expression of immunohistochemical staining of proteins associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). 3) gene mutations in primary tumor and lymph node metastasis by using next generation sequencer. Results. 1) There were significantly associations between high number grade of TB and invasive natural factors and adverse prognosis. 2) There was significantly correlation between high staining of EMT pattern and higher number of TB. 3) There was not characteristic mutation of lymph node metastasis. However, mutations in primary and lymph node were almost same.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝外胆管癌 肝門領域胆管癌 遠位胆管癌 EMT リンパ節転移 Tumor Budding 遺伝子変異 NGS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胆道癌は難治性消化器癌の代表的疾患である。根治の可能性のある治療法は、臍頭十二指腸切除または大量肝切除を基本とする高侵襲外科的手術のみであり、確立された術後補助療法は現在のところ存在しない。根治手術後においても、術後5年生存率は約40%である。特にリンパ節転移を認めた症例に関しては、術後5年生存率は20%以下である。リンパ節転移は胆管癌の最も重要な予後規定因子であることは、数々の研究で報告されている。よって、胆管癌の治療成績向上には、リンパ節転移症例に対する有効な術後補助療法の開発が必須である。そのためには、リンパ節転移を生じる癌細胞の分子生物学的特徴を捉えることが必須であるが、胆道癌においてはリンパ節転移に注目した分子生物学的研究は存在していない。

近年、癌転移機構で注目されている理論が、**Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)** である。**EMT**とは癌細胞の形質が上皮系から間質系に変化することで浸潤・運動能を獲得するという理論である。この**EMT**の形態病理学的表現形でないかと推測されているのが、**tumor budding (TB)** である。**TB**は浸潤先進部に存在する5個未満の癌細胞塊と定義される。大腸癌の領域では、**TB**はリンパ節転移の危険因子として既に臨床応用されている。しかし、胆道癌においては**EMT**ならびに**TB**に関する研究報告は存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究は、肝外胆道癌 (**extrahepatic cholangiocarcinoma: EHCC**) の原発巣ならびにリンパ節転移検体を用いて、**(1) TB**と臨床病理学的因子、ならびに術後予後の関係の解明、**(2) TB**と**EMT**関連タンパク発現との関係、**(3) リンパ節転移癌細胞の原発巣ならびにリンパ節転移巣における遺伝子変異の差を明らかにすることで、将来的にリンパ節転移症例に対する有効な治療法開発の一助になることを目的とした。**

## 3. 研究の方法

### **(1) TBと臨床病理学的因子、ならびに術後予後の関係の解明**

肝門部胆管癌 (perihilar cholangiocarcinoma: PHCC) 195例、遠位胆管癌 (distal cholangiocarcinoma: DCC) 115例を用いて、腫瘍浸潤先進部におけるTBの数を200倍視野で測定し、recursive partitioning techniqueを使用し、予後との関係を解析して、TB数により予後を層別化し、TB gradeを作成した。また、TB gradeと各種臨床病理学的因子との関係を検討した。

### **(2) TBとEMT関連タンパク発現との関係**

PHCC 164例、DCC 102例の代表切片の腫瘍先進部を2mm径の針で撃ち抜いて作成したtissue macro array (TMA)を用いて、上皮系 (E-cadherin) および間質系 (vimentin) タンパク質発現について免疫組織学的染色を行い、その染色強度とTB数との関係を検討した。

### **(3) リンパ節転移癌細胞の原発巣ならびにリンパ節転移巣における遺伝子変異の差の解析**

リンパ節転移陽性であったEHCC 16例の原発巣とリンパ節転移巣のホルマリン固定パラフィンからDNAを抽出し、両病巣における遺伝子変異差を腫瘍関連遺伝子160種のパネルを用いて、次世代シーケンサーにて解析した。

## 4. 研究成果

以下、(1)(2)については、"Impact of tumour budding grade in 310 patients who underwent surgical resection for extrahepatic cholangiocarcinoma" (Ogino M, Nakanishi Y, et al. *Histopathology*.74(6):861-872,2019)にて発表した。

### **(1) TBと臨床病理学的因子、ならびに術後予後の関係の解明**

TB gradeについてはPHCCにおいてTB数0-4, 5-11, 12≤の3群に、DCCにおいては0-4, 5≤の2群に分類され、いずれの症例群においてもTB gradeがhigh gradeになるに従い、有為に予後不良であり、浸潤に関する臨床病理学的因子の悪化、リンパ節転移の増加を認めた。

### **(2) TBとEMT関連タンパク発現との関係**

E-cadherin陽性かつVimentin陰性をepithelial phase、E-cadherin陰性かつvimentin陽性をmesenchymal phaseとした場合、Epithelial phaseはmesenchymal phaseと比較して優位にTB数が少ないことが判明した。よって、TB数は腫瘍先進部におけるEMT変化を反映していることが示唆された。

また、少数例における予備研究として、少数のリンパ節転移陽性例における原発巣の a)中心、b)腫瘍先進部、c)リンパ管内、転移陽性リンパ節の d)周囲リンパ洞、e)リンパ節転移巣におけるE-cadherinの染色態度の検討を行なったところ、a)陽性 b)陰性 c)陽性 d)陽性 e)陽性となることが多かった。このことからEMTは通常考えられているより、腫瘍が原発巣から脈管に侵入するまでの短い期間でのみ起こっている変化であることが示唆された。

### **(3) リンパ節転移癌細胞の原発巣ならびにリンパ節転移巣における遺伝子変異の差の解析**

この研究に関しては、論文執筆中であり、未発表である。

合計32病変において31種類 (TP53, MAP3K1, SMAD4, APC, ARID1Aを含む)の遺伝子変異を認めた。16例の原発巣での遺伝子変異は特徴的なものはなく、最も頻度が多い変異はp53であっ

たが、6例(37.4%)に留まった。また、原発巣とリンパ節転移巣間の遺伝子変異の状態はほぼ同一(15/16例)であり、1例のみでリンパ節巣に変異の追加を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogino Mariko, Nakanishi Yoshitsugu, Mitsunashi Tomoko, Hatanaka Yutaka, Amano Toraji, Marukawa Katsuji, Nitta Takeo, Ueno Takashi, Ono Masato, Kuwabara Shota, Yamada Tooru, Hirano Satoshi	4. 巻 74(6)
2. 論文標題 Impact of Tumour Budding Grade in 310 Patients Who Underwent Surgical Resection for Extrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 861-872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.13827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻野真理子, 中西喜嗣, 三橋智子, 畑中 豊, 田中公貴, 浅野賢道, 倉島 庸, 海老原裕磨, 村上壮一, 中村 透, 土川貴裕, 岡村圭祐, 七戸俊明, 平野 聡
2. 発表標題 肝外胆管癌における tumor buddingの臨床応用に向けた検討
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Ogino, Yoshitsugu Nakanishi, Satoshi Hirano et al.
2. 発表標題 Impact of the quantity of isolated tumor buds for postoperative prognosis in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma
3. 学会等名 the 30 th meeting Japan society of Hepato-Biliary-Pancreas Surgery
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平野 聡  (Hirao Satoshi)  (50322813)	北海道大学・医学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	土川 貴裕  (Tsuchikawa Takahiro)  (50507572)	北海道大学・大学病院・講師    (10101)	