

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08692

研究課題名(和文)胆汁を用いたリキッドバイオプシーの確立と胆管がん術前診断への応用

研究課題名(英文)Liquid biopsy for the bile: a novel diagnostic tool for extrahepatic bile duct cancer

研究代表者

伊藤 寛倫 (Ito, Hiromichi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長

研究者番号：30790539

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)：肝外胆管がんの術前組織診断は胆汁・胆管擦過細胞診が現在の標準診断法であるが、その正診率は未だ十分でなく、新しい診断法の開発は喫緊の課題である。本研究では、胆汁を用いたリキッドバイオプシー診断法を開発し、胆道癌患者のがん診断能を評価した。26例の胆管癌疑い患者より胆汁を採取し、胆汁内の無細胞DNAを抽出し、がん細胞由来の変異遺伝子を含むctDNAを検出した。細胞診による悪性細胞の検出率46%に対し、ctDNA検出率は81%。術後2例が良性胆管狭窄であることが判明し、リキッドバイオプシーのがん診断感度と精度は83%、81%で、従来の胆汁細胞診の42%、46%と比して大いに改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立された、胆汁リキッドバイオプシー系は、簡便でかつ従来の細胞診よりも高感度である。癌の診断法として有望だけでなく、ターゲットシーケンスする標的遺伝子を選べば分子標的薬の治療選択のガイドとなりうると期待される。

研究成果の概要(英文)：Preoperative tissue diagnosis for biliary cancer remains a clinical challenge. While bile cytology is a current gold standard, its accuracy has been reported as low as 40-70% and a novel diagnostic tool needs to be developed. In the present study, we established the method of liquid biopsy using bile juice sampled from the patients with suspected biliary cancer and evaluated its diagnostic accuracy. In the analysis for the bile from 26 patients (24 with bile duct cancer and 2 benign stricture), malignant cell was detected in 46%, whereas ctDNA was in 81%. The sensitivity and accuracy of bile liquid biopsy were 83% and 81%, compared with 42% and 46% for traditional bile cytology, respectively.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：肝外胆管がん リキッドバイオプシー 胆汁 無細胞DNA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノムシーケンス技術の進歩と低コスト化により、様々ながん種のゲノム解析が行われ、幾つかの癌種ではゲノムプロファイルに基づいた治療選択(プレジジョン医療)が可能となった。適切な治療選択のためには治療前の腫瘍生検によるゲノム採取が必要であるが、消化器癌の中で最も難治性で予後不良の癌のひとつである胆管がんは、内視鏡による組織生検が可能な胃がんや大腸がんと異なり、切除手術検体以外のゲノム解析が困難である。

現在の胆管がんの治療前組織診断は胆管擦過細胞診、胆汁細胞診によって行われるが、癌細胞の採取自体が難しく、かつ細胞診は主観的かつ定性的で、特に胆管がんの細胞診正診率は、胆汁細胞診で30%、擦過細胞診で40-70%と極端に低い<sup>1,2</sup>。さらには、たとえ癌細胞が採取されても、免疫染色やゲノム解析など、治療選択の助けとなるバイオマーカーの分析するには量的に不十分である。従って、現状の侵襲的で不正確な診断法に代わる、正確でゲノム情報まで検出可能な診断法の開発が喫緊の課題である。

最近注目を浴びている“リキッドバイオプシー”は、血液や体液(尿、腹水、唾液など)中に遊離する癌細胞由来の無細胞DNA(cfDNA、ctDNA)を測定し、様々な診断に応用する新たな診断技術である。胆管がん患者の胆汁内には、がん細胞よりも多数のctDNA断片が浮遊すると思われ、リキッドバイオプシーの原理を用いれば、胆管がんの診断能が向上するのではないかと。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胆管がんに対する、全く新しいリキッドバイオプシープラットフォームの開発である。具体的には、胆管がん患者より採取した胆汁からctDNAを検出する検出法の確立と、ctDNAによるリキッドバイオプシーの胆管がん診断能の評価である。

### 3. 研究の方法

閉塞性黄疸主訴にENBDを挿入し、胆汁を採取し得た肝外胆管がん疑い(CTなどの画像診断による)患者26例を対象とした。

胆汁内の無細胞DNAを抽出には市販のMagMAX cell-free DNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific)を用い、Oncomine cfDNA 解析キット(Thermo Fisher Scientific)によりcDNAライブラリを作成した。ライブラリを14遺伝子、240箇所以上のホットスポットをカバーするIon530チップによるターゲットシーケンスを行った。検出頻度の閾値は0.1、1箇所以上の変異検出をctDNA陽性と定義した。リキッドバイオプシーによるガン診断能と従来の胆汁細胞診の診断能を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 対象症例

対象患者の術前臨床診断は、肝門部胆管がん14例(54%)、下部胆管がん8例(31%)、胆嚢がん4例(15%)であった。全症例、切除手術を行い、最終組織診断で2例が良性胆管狭窄と判明し、残り24例は術前診断通りの診断であった。対象症例の患者背景と、臨床診断を表1にまとめた。

表1. 患者背景と臨床・最終組織診断

	N=26
年齢 (median, range)	73 (48-86)
男性 (n, %)	21 (81)
閉塞性黄疸 (n, %)	26 (100)
臨床診断 (n, %)	
肝門部胆管癌	14 (54)
下部胆管癌	8 (31)
胆のう癌	4 (15)

(2) 無細胞 DNA の抽出と変異遺伝子の検出

胆汁内の無細胞 DNA の抽出とターゲットシーケンスは全例で抽出可能であり、21 例 (81%) で遺伝子変異が検出された (表 2)。

表 2. ctDNA 内の変異遺伝子頻度

遺伝子 (n, %)	N=26
TP53	12 (46)
KRAS	6 (23)
APC	4 (15)
GNAS	2 (8)
ERBB2	2 (8)
PIK3CA	2 (8)
FBXW7	1 (4)
SMAD4	1 (4)
CTNB1	1 (4)
MAP2K1	1 (4)
EGFR	1 (4)
NRAS	0
BRAF	0
AKT1	0

検出された変異は症例あたり中間値 1 箇所 (1-6) で、変異遺伝子は p53 が 46%、KRAS が 23%、APC が 15% で検出された。

(3) 胆汁リキッドバイオプシーによる胆管がん診断と、従来の胆汁擦過細胞診 (または胆管生検) との比較

26 例の対象患者 (胆管がん 24 例、良性胆管狭窄 2 例) のうち、従来の胆汁細胞診または胆管生検でがん細胞が検出されたものは 10 例であった。一方、変異遺伝子を含む無細胞 DNA 検出によるリキッドバイオプシー陽性例は 21 例。細胞診とリキッドバイオプシーの診断能の比較を表 3 にまとめた。

表 3. 胆汁細胞診、胆汁リキッドバイオプシーの比較

	胆汁細胞診	胆汁リキッド生検	細胞診 + リキッド生検*
Sensitivity (% , 95% CI)	42 (22-63)	83 (63-95)	92 (73-99)
Specificity (% , 95% CI)	100 (16-100)	50 (1-98)	50 (1-99)
Negative predictive value (NPV) (% , 95% CI)	13 (9-17)	20 (5-57)	33 (7-77)
Positive predictive value (PPV) (% , 95% CI)	100	95 (83-99)	96 (85-99)
Accuracy (% , 95% CI)	46 (27-66)	81 (61-93)	88 (70-98)

\*いずれか一方の検査陽性をがん陽性と判定

胆汁リキッドバイオプシーにより、胆管がん診断の感度は細胞診の 42% から 83% に、精度も 46% から 81% に改善した。胆汁細胞診とリキッド生検いずれか陽性をがんの診断とした場合、感度、精度はそれぞれ 92%、88% となった。

#### (4) 臨床的意義と今後の展望

本研究では、胆管がん疑いの患者より採取された胆汁を用い、胆汁内 cfDNA の同定とそのシーケンスによる癌特異的遺伝子変異の検出が可能であることが示された。胆汁中に微量含まれる癌由来遺伝子が高い精度で検出できることは、内視鏡的生検が不可能または困難な胆管内悪性腫瘍(胆管癌、胆のうがんなど)において、癌の診断(悪性胆管狭窄か良性狭窄かの判定)の助けになるのみならず、ターゲットシーケンスを行う遺伝子を上手く調整すれば、腫瘍の分子遺伝的特性に基づいた抗がん剤(分子標的薬)の選択にも利用できる可能性があり、本研究結果の意義はすこぶる大きい。胆管がんはその部位(肝門部、下部、胆嚢)において、変異遺伝子の頻度に差があることが、これまでに報告されている<sup>3-5</sup>。したがって、今後は、病変の部位別に、ターゲットシーケンスを行う遺伝子群の胆最適化によって、診断法としてのチューニングが望まれる。

#### 文献

1. Burnett AS, Calvert TJ, Chokshi RJ. Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10-y review of the literature. *J Surg Res* 2013; 184(1):304-11.
2. Navaneethan U, Njei B, Lourdasamy V, Konjeti R, Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2015; 81(1):168-76.
3. Churi CR, Shroff R, Wang Y, Rashid A, Kang HC, Weatherly J, Zuo M, Zinner R, Hong D, Meric-Bernstam F, Janku F, Crane CH, Mishra L, Vauthey JN, Wolff RA, Mills G, Javle M. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS One* 2014; 9(12):e115383.
4. Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, Lim JQ, Huang MN, Padmanabhan N, Nellore V, Kongpetch S, Ng AWT, Ng LM, Choo SP, Myint SS, Thanan R, Nagarajan S, Lim WK, Ng CCY, Boot A, Liu M, Ong CK, Rajasegaran V, Lie S, Lim AST, Lim TH, Tan J, Loh JL, McPherson JR, Khuntikeo N, Bhudhisawasdi V, Yongvanit P, Wongkham S, Totoki Y, Nakamura H, Arai Y, Yamasaki S, Chow PK, Chung AYP, Ooi L, Lim KH, Dima S, Duda DG, Popescu I, Broet P, Hsieh SY, Yu MC, Scarpa A, Lai J, Luo DX, Carvalho AL, Vettore AL, Rhee H, Park YN, Alexandrov LB, Gordan R, Rozen SG, Shibata T, Pairojkul C, Teh BT, Tan P. Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017; 7(10):1116-1135.
5. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 2015; 47(9):1003-10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 伊藤寛倫	4. 巻 82
2. 論文標題 肝内胆管癌の分子学的診断	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 肝胆臓	6. 最初と最後の頁 185-187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 伊藤寛倫	4. 巻 79
2. 論文標題 胆汁を用いたゲノム解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 肝胆臓	6. 最初と最後の頁 1101-1103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M Muramatsu, H Ito, H Zembutsu
2. 発表標題 Clinical relevance of cell-free DNA analysis with for bile juice assessed through amplicon-based deep sequencing for bile juice from patients with malignant biliary obstruction due to pancreato-biliary in bile duct and pancreatic cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤寛倫、村松万里江、前佛均 他
2. 発表標題 Bile liquid biopsy for malignant biliary obstruction: a promising novel diagnostic tool in the era of precision medicine
3. 学会等名 消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤寛倫、村松万里江、前佛均 他
2. 発表標題 Bile liquid biopsy for malignant biliary obstruction: A promising novel diagnostic tool in the era of precision medicine
3. 学会等名 日本癌治療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marie Muramatsu, Hironichi Ito, Hitoshi Zembutsu
2. 発表標題 Clinical relevance of cell-free DNA analysis with amplicon-based deep sequencing for bile juice from patients with malignant biliary obstruction due to pancreato-biliary cancer
3. 学会等名 Annual meeting of American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironichi Ito, Marie Muramatsu, Mamiko Miyashita, Hiroyuki Ono, Takafumi Sato, Yoshihiro Mise, Yosuke Inoue, Yu Takahashi, Akio Saiura, Hitoshi Zembutsu
2. 発表標題 Bile liquid biopsy for malignant biliary obstruction: a promising novel diagnostic tool in the era of precision medicine
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019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	前佛 均  (Zembutsu Hitoshi)  (90372820)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター リキッドバイオプシー診断開発プロジェクト・プロジェクトリーダー (部長クラス)  (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------