

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16495

研究課題名（和文）肝内胆管癌治療戦略樹立を目指した亜分類ならびに背景因子を踏まえた腫瘍微小環境解析

研究課題名（英文）Tumor microenvironment analysis with consideration to subclassification and backgrounds to establish appropriate treatment strategies for intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

木下 正彦（Kinoshita, Masahiko）

大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：30896303

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝内胆管癌（ICC）における各亜分類（small / large duct型）別の臨床病理学的検討を行い、両者の特徴を比較した。その結果、large duct型ではリンパ節転移や肝門部脈管浸潤例が有意に多いことが明らかとなり、各亜分類において至適な外科治療戦略が異なる可能性が示唆された。また、腫瘍微小環境解析ではsmall duct型の一部で樹状細胞による抗原提示から癌免疫編集が高度に生じている症例が認められることが明らかとなった。これにより、至適な薬物治療戦略についても亜分類で異なる特徴を示す可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

WHO分類に示された肝内胆管癌の亜分類について、両者の詳細な臨床病理学的な差異はこれまで明らかではなかった。本研究により、肝内胆管癌の亜分類が外科手術および薬物療法を含む治療戦略樹立に影響を及ぼすことが示唆された。

代表的な難治癌の1つである肝内胆管癌において、至適な治療戦略樹立を目指したバイオマーカー探索は重要な役割を果たす。本研究で亜分類が治療に及ぼす影響が示唆されたことで、これを踏まえて今後治療戦略を再考していく必要がある。これは肝内胆管癌治療成績向上に大きく寄与していく可能性を有する。

研究成果の概要（英文）：We investigated a clinicopathological study of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) in each subclassification (small/large duct type) and compared the characteristics of the two subclasses. The results revealed that incidences of lymph node metastasis and hilar vascular invasion were significantly higher in the large duct type, suggesting that the optimal surgical treatment strategy for each subclassification may differ. Tumor microenvironment analysis revealed that some patients with small duct type showed a high degree of cancer immunodeficiency due to antigen presentation by dendritic cells. This suggests that optimal drug treatment strategies may be different for each subclassification.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：肝内胆管癌 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma; ICC) は慢性肝炎などを背景に Hering 管や小型胆管から発生する small duct 型と、肝内結石などによる慢性胆道炎症を背景に大型胆管から発生する large duct 型に大別される(WHO Classification of Tumours 2019)。分子生物学的に、前者は *IDH1/2* 遺伝子変異や *FGFR2* 融合遺伝子が認められることがある一方、後者は *KRAS* 遺伝子変異や *SMAD4* 遺伝子欠損が約 3 割の症例で認められる。さらに small duct 型は腫瘍形成型 ICC として進行することが多く、large duct 型は主に胆管浸潤型 ICC として進行し、リンパ管/神経周囲浸潤の頻度が高く small duct 型に比較して予後が不良とされる。すなわち、背景因子や発生母地となる胆管の多様性は、結果的に分子生物学的/臨床病理学的な ICC の多様性を生み出し、治療成績にも影響する。しかしその治療法は現状、背景因子や亜分類に関わらず、外科的治療および数種類の薬物療法が一律に標準治療とされている。

癌細胞は増殖の過程で生じた遺伝子変異の蓄積によりクローン進化をおこす。この遺伝子変異量 (tumor mutation burden; TMB) が多い場合、癌細胞に非自己抗原が提示され、抗原提示細胞を介して免疫担当細胞が誘導、抗腫瘍免疫反応が惹起される。癌細胞はこの抗腫瘍免疫反応を回避すべく、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment; TME) において癌免疫編集を引き起こし、PD-1/PD-L1 経路に代表される免疫寛容機能を誘導することで増殖することが知られている。しかし ICC は一般に TMB が少なく、TME 内で免疫寛容機能が果たす役割が小さい腫瘍が多い。一方、塩素系有機溶剤曝露に伴う職業性胆管癌では、従来の ICC に比較して TMB が非常に多く認められ (Mimaki S, et al. Carcinogenesis 2016)、TME 構成細胞の表面に免疫疲弊分子が高頻度に発現していることをこれまでに報告した(Sato Y, et al. Pathol Int 2017, Sato Y, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2020)。このような結果から、職業性胆管癌では免疫チェックポイント阻害薬 (Immunocheckpoint inhibitor; ICI) の効果が期待されることが示唆され、当グループを中心に実施した医師主導型臨床試験の中間報告では、ICI を投与した職業性胆管癌全例で画像上腫瘍が消失したことを報告している (図 1 Tanaka S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2022)。ICC における背景因子の多様性が遺伝子変異や TME、および治療の有効性に大きく寄与すると考えられる結果である。

このように発生母地となる胆管や背景因子の多様性は、結果的に TME における差異を形成しうることが示唆された。さらに、他癌種においては術前化学療法施行による TME 構成細胞変化の可能性についても検討が行われており、腫瘍壊死による抗原放出を背景に構成細胞の変化が惹起され、TME 内で宿主の抗腫瘍免疫応答が誘導されやすい環境に変化すると報告 (Kuwabara S, et al. Cancer Sci 2019)もある。しかし ICC における TME については、これまでに網羅的な解析は行われているものの、各々の背景や亜分類を加味した視点からの解析は全くなされていない。これを明らかにすることは代表的な難治癌の一つである ICC において、明確な病態分類、およびより効果的な治療戦略を樹立させるために必要と考えられた。

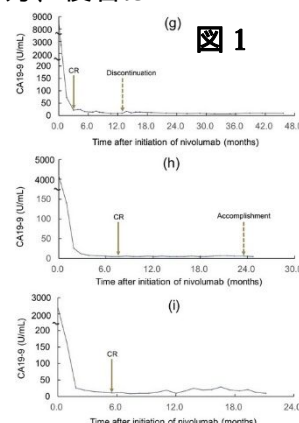


図 1

2. 研究の目的

本研究では、ICC の各亜分類および各背景因子別に遺伝子変異 (driver gene) やそれに伴う TME の差異、変化を解明し、明確な病態分類ならびに治療戦略樹立を目指したバイオマーカー探索を目的とした。

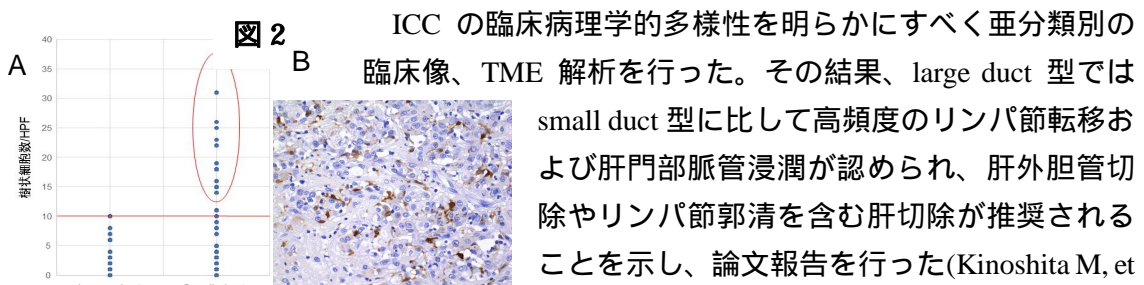
これまで他癌種と同様に、ICC における TME 解析は報告されている。しかしウイルス性およびアルコール/非アルコール性肝炎、肝内結石、原発性硬化性胆管炎や塩素系有機溶剤曝露など、ICC には特有の背景因子が多く認められ、前述のような ICC 亜分類を形成するものの、これら各々の視点からみた解析はなされていない。各背景因子により発癌過程、発癌形態が異なることに着目し、網羅的な解析に加え、それぞれの TME 解析に基づいた治療戦略やバイオマーカーの探索を目指すものであり、これまでになかった視点に立つ研究である。

3. 研究の方法

各背景因子、画像所見、肉眼形態および HE 染色標本をもとに ICC 全例を small duct 型および large duct 型に分類した。両者の分類が困難な症例については遺伝子解析により *IDH1/2* 遺伝子変異、*FGFR2* 融合遺伝子発現、*KRAS* 遺伝子変異や *SMAD4* 遺伝子欠損などの driver gene を評価し、これらの結果と併せて総合的に分類することとし、その上で癌部および前癌病変での TME における免疫担当細胞 (制御性 T 細胞、腫瘍関連マクロファージ、CD4/CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、B 細胞など)、がん関連線維芽細胞、腫瘍血管および微小環境内細胞における免疫抑制性分子 (PD-1、PD-L1、CTLA-4 など) の発現について、CD3、CD4、CD8、CD20、CD25、CD80、CD163、PNA_d、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM3、LAG3 など を標的とした免疫組織学的検討で分類群別に解析した。また、TME 内における TLO の発現量や、その構成する免疫細胞でも同様の検討を行い、各亜分類、背景因子や化学療法による差異を評価する。同時に、combined positive score も算出し、免疫組織学的に Epithelial mesenchymal transition や mismatch repair (MMR)/ MSI についても評価した。

これらの結果を踏まえて ICC 各亜分類における TME の病態と臨床像、病因、病理学的特徴および外科治療後の予後との関連を検討した。

4. 研究成果



C	Small duct type DC高発現 (n=20)	Small duct type DC低発現群 (n=44)	P
CD8陽性細胞数	81.5 (13-296)	43.5 (3-142)	0.003
PD1陽性細胞数	23 (0-152)	4.14(0-96)	0.004
CTLA4陽性細胞数	3.33 (0-39)	0.43 (0.23)	0.001
CPS (combined positive score)	12 (1-78)	5.5 (0-67)	0.037
TPS (tumor proportion score)	2.25 (0.57)	0.56 (0-73)	0.043

さらに TME 構成細胞を検討すると、両群間で TME 構成細胞における PD-1 や CTLA-4 などの免疫疲弊分子発現に差は認められなかつ

たものの、small duct 型において抗原提示細胞である樹状細胞 (dendric cell; DC) が高発現 (HPF>10) している症例が有意に多かった (図 2A, B)。さらに DC 高発現群では低発現群に比して TME 構成細胞における免疫疲弊分子の発現が有意に多かった (図 2C)。これらの結果より、small duct 型の一部では、DC による抗原提示により惹起された腫瘍免疫を回避するべく、TME 内で癌免疫編集が生じている可能性が示唆された。 ICC における背景因子や亜分類は TME の多様性に繋がると考えられる結果である (論文作成中)。

職業性胆管癌での知見も踏まえ、これまで明らかにした ICC における TME の多様性は、ICC の治療に影響を及ぼすバイオマーカーの解明、ひいてはより効果的な個別化治療戦略樹立に繋がる重要な知見である、と考えている。現状 ICC では、ICI である Durvalumab が胆道癌へ一律に保険適用とされ、遺伝子パネル検査で治療薬が適用される症例も少なく、個別化治療が進んでいるとは言えない。本研究結果はより効果的な ICC 個別化治療戦略を樹立するために重要な役割を果たすものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kinoshita Masahiko, Sato Yasunori, Shinkawa Hiroji, Kimura Kenjiro, Ohira Go, Nishio Kohei, Tanaka Ryota, Kurihara Shigeaki, Kushiyama Shuhei, Tani Naoki, Kawaguchi Takahito, Yamamoto Akira, Ishizawa Takeaki, Kubo Shoji	4. 巻 31
2. 論文標題 Impact of Tumor Subclassifications for Identifying an Appropriate Surgical Strategy in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 2579 ~ 2590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-023-14833-1	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 -

1. 著者名 Kinoshita Masahiko, Ueda Daiju, Matsumoto Toshimasa, Shinkawa Hiroji, Yamamoto Akira, Shiba Masatsugu, Okada Takuma, Tani Naoki, Tanaka Shogo, Kimura Kenjiro, Ohira Go, Nishio Kohei, Tauchi Jun, Kubo Shoji, Ishizawa Takeaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Deep Learning Model Based on Contrast-Enhanced Computed Tomography Imaging to Predict Postoperative Early Recurrence after the Curative Resection of a Solitary Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2140 ~ 2140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15072140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Masahiko, Tanaka Shogo, Kodai Shintaro, Takemura Shigekazu, Shinkawa Hiroji, Ohira Go, Nishio Kohei, Tauchi Jun, Kanazawa Akishige, Kubo Shoji	4. 巻 46
2. 論文標題 Increasing incidence and severity of post-hepatectomy adhesion around the liver may be influenced by the hepatectomy-related operative procedures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Asian Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 228 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.asjsur.2022.03.044	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 -

1. 著者名 Kinoshita Masahiko, Kawaguchi Takahito, Tanaka Shogo, Kimura Kenjiro, Shinkawa Hiroji, Ohira Go, Nishio Kohei, Tanaka Ryota, Kurihara Shigeaki, Kushiyama Shuhei, Ishizawa Takeaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Application of Indocyanine Green Fluorescence Imaging for Tumor Localization during Robot-Assisted Hepatectomy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4205 ~ 4205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15174205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 0件）

1. 発表者名 木下 正彦
2. 発表標題 亜分類からみた肝内胆管癌外科治療戦略の再考
3. 学会等名 日本肝癌研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木下 正彦
2. 発表標題 Large duct type intrahepatic cholangiocarcinoma is an independent risk factor for lymph node metastasis
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下 正彦
2. 発表標題 肝内胆管癌における亜分類を踏まえた腫瘍微小環境解析
3. 学会等名 日本外科学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 木下 正彦
2. 発表標題 Clinicopathologic features in each subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma; Can subclassifications of ICC influence appropriate treatment strategies?
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 木下 正彦
2. 発表標題 亜分類別治療成績からみた肝内胆管癌手術戦略の再考
3. 学会等名 日本消化器病週間
4. 発表年 2022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

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