

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07024

研究課題名（和文）胆道癌における統合分子サブタイピング法の確立

研究課題名（英文）Establishment of Integrated Molecular Subtyping Method for Bile Duct Cancer

研究代表者

福島 敬宜（Fukushima, Noriyoshi）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40384937

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：胆道癌の統合分子サブタイピングの確立を目的に、受容体型チロシンキナーゼの一種 PDGF-D とプロテアーゼである matriptase について検討した結果、癌間質での matriptase 高発現例は予後不良であった。また、肝外胆管癌について、腫瘍の不均一性を考慮した新たなスコアシステムを考案して報告した。さらに、胆管癌の生検、細胞診の診断精度向上の有用なマーカーを選定するため10種類の抗体について免疫組織化学染色で検討したところ、感度、正診率では、S100P と IMP3 が比較的良好な成績を示した。p53、S100A4、Maspin は、感度は低かったが特異度は高く、症例によっては有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌は予後不良な癌腫の一つで、有効な早期診断マーカーや分子標的治療などもまだない。腫瘍の完全切除が為されれば、ある程度の予後改善が見込めるが、解剖学的に切除範囲が制限されることが多く、全体としては依然として大幅な予後改善が困難な腫瘍である。今回の研究により胆管癌の生検診断自体に役立つマーカー（S100P と IMP3）を明らかにした。また、matriptase という物質が癌の間質で高発現していることを明らかにしたことや腫瘍の不均一性を考慮して予後を予測できる新たなスコアシステムの考案により生検標本などでも症例の層別化を行える可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：To establish integrated molecular subtyping of biliary tract cancer, we investigated platelet-derived growth factor-D (PDGF-D), a receptor-type tyrosine kinase, and matriptase, a protease. We found that tumors with high expression of matriptase in the tumor stroma have a poor prognosis. We also proposed a new histological scoring system for extrahepatic cholangiocarcinoma that can predict prognosis by taking tumor heterogeneity into account. Furthermore, in order to select useful markers for improving the diagnostic accuracy of biopsy and cytological diagnosis of cholangiocarcinoma, 10 antibodies were examined by immunohistochemical staining. In terms of sensitivity and positive diagnosis rate, S100P and IMP3 performed relatively well. On the other hand, p53, S100A4, and Maspin had low sensitivity (less than 50%) but specificity (100%), and were considered useful for diagnosis in some cases.

研究分野：人体病理学

キーワード：胆管癌 バイオマーカー 早期診断 PDGF-D Matriptase 腫瘍分化度

## 1. 研究開始当初の背景

胆道癌は予後不良な癌腫の一つで、有効な早期診断マーカーや分子標的治療などもまだない。腫瘍の完全切除が為されれば、ある程度の予後改善が見込めるが、解剖学的に切除範囲が制限されることが多く、全体としては依然として大幅な予後改善が困難な腫瘍である。

胆道癌の発症には明確な地域差があり、アジア、南米地域で多く西欧、北米で少ない。例えば日本における胆道癌発症数は年間約 27,600 例であり、米国の 4.6 倍（人口比調整後）と非常に多い。部位別では、肝外胆管癌は日本、韓国、胆嚢癌はチリ、アルゼンチン、インド、ペルーなどで多い。アジア地域（特にタイ国）での胆道癌発症には寄生虫が関与している例が多いが、日本ではその関与は少ない。また膵胆管合流異常を有する人の胆道癌発症率は 4.9% と非常に高い。このように、胆道癌は、その発症部位や背景因子による発症数の違いなど、その発症には、多様な因子の関与があると考えられることも、有効な診断法や治療法の開発を難しくしていると考えられる。分子病理学的には、近縁の膵管癌でも高率に異常の見られる p53 遺伝子、K-ras 遺伝子、p16、Smad4 などの変異が見られるが、その頻度は膵管癌より低いこと、いくつかの成長因子 (Met, EGFR, COX-2) も高発現していること、遺伝子メチル化や microRNA などの異常も見出されてきている。さらに 2015 年に、国立がん研究センターで胆道癌についての大規模な包括的ゲノム解析が為され、FGFR2 融合遺伝子や IDH1 変異を含む胆道癌におけるいくつかの新規ドライバー遺伝子 (FGFR1-3, PIK3CA, ALK などのほか、IDH1, IDH2, CCND1, MDM2, BRCA1, 2 など) は分子標的治療のターゲットとなり得るが同定された [Nakamura H, et al, Nature genetics (2015)]。また、2017 年には千葉県立がんセンターからもゲノム解析結果が報告されている [Noguchi R, et al, Oncology letter (2017)]。これらの研究では、遺伝子異常や遺伝子発現などのパターンが、胆道癌では異なることが確認されたことも興味深い。一方、病理学的な観点から、胆道癌の発育進展や悪性度に腫瘍の微小環境が関与していることへの理解も進んできており、腫瘍-間質の相互作用などにさまざまな分子が関与していることも分かってきた。また、多くの消化器癌で観察されるように、胆道癌でも腫瘍先進部でしばしば budding (小細胞胞巣に崩れて浸潤する像) や上皮間葉転換 (EMT) 様の像が見られ、これらの像は予後不良因子として知られるようになった。これら budding や EMT 様変化にも腫瘍の微小環境が関与し、腫瘍細胞の浸潤・移動や血管新生、転移能の獲得などを促進している可能性がある。以上のように、胆道癌においてもようやくゲノムデータが蓄積されつつあるが、今後は、それらの中で何が実際的な診断や治療に応用可能であるか、いかに胆道癌の発育進展に微小環境が関与しているかという問いに答えるべく、一つ一つ検証していく必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、胆道癌の適切な治療戦略や今後の胆道癌研究の基盤となる様な統合分子サブタイピング法の開発を目的とする。本研究で目指す分子サブタイピング法の特長は、腫瘍細胞のみをターゲットとせず腫瘍の発育進展に関与していると考えられる周囲微小環境 (癌関連線維芽細胞、血管・リンパ管内皮細胞や免疫細胞など) を含め、そこで得られた候補分子を統合して行うことである。分子タイピングに有用な候補分子それぞれについて臨床病理学的意義

を明らかにし、さらに実臨床応用を目指し分子標的治療のターゲットになる分子候補について臨床検体での検証を行う。

### 3. 研究の方法

ゲノム解析結果の公開データベースから診断や治療ターゲットとしての候補分子について、様々な観点から抽出し、胆道癌組織での発現や分布を組織マイクロアレイを用いて可及的に多くの分子について解析し、有力な候補分子についてその臨床病理学的意義を明らかにする。本課題の前解析として、platelet derived growth factor-D (PDGF-D)を候補分子の一つとして解析し本研究に進んだ。PDGFは受容体型チロシンキナーゼの一種で、正常組織では細胞の増殖、分化、遊走、胎生期の発達に関連している [Ustach CV, Cancer Res (2004)]。様々な癌細胞株でPDGF-B、PDGF-Dの高発現が確認され、腫瘍の進展との関連が報告されているが、PDGF-Dとそれを活性化させるマトリプターゼの胆道癌細胞およびその癌間質（主に癌関連線維芽細胞）での発現 [PDGF-Dが関与する癌間質相互作用] 頻度や分布に関する研究報告はなく、我々は癌細胞と癌間質の両者におけるそれぞれの分子の発現状態を解析することとした。同様に、ゲノム解析結果のデータベースから胆道癌の診断や治療ターゲットとしての候補分子を複数抽出し、組織上での発現頻度・局在を免疫組織化学などにより検討し、その検討結果から抽出した候補分子について、臨床病理学的意義の検討、in vitroでの機能解析を行った。

### 4. 研究成果

胆道癌の統合分子サブタイピングの確立の最初の検討として、受容体型チロシンキナーゼの一種で、正常組織では細胞の増殖、分化、遊走、胎生期の発達に関連している platelet-derived growth factor-D (PDGF-D)を候補分子の一つとして解析した。胆管癌では、豊富な癌間質を伴うが、その主たる構成要素である癌関連線維芽細胞を誘導する因子の一つとしてもPDGF-Dが報告されて

いる。また、PDGF-Dがリガンドとして作用するためには matriptase などのプロテアーゼが必要であり、これらも同時に検討した。その結果、肝外胆管癌においては、多くの腫瘍細胞がPDGF-Dおよびmatriptaseを発現していることがわかった (図1)。また、癌間質では発現が高度な腫瘍と乏し

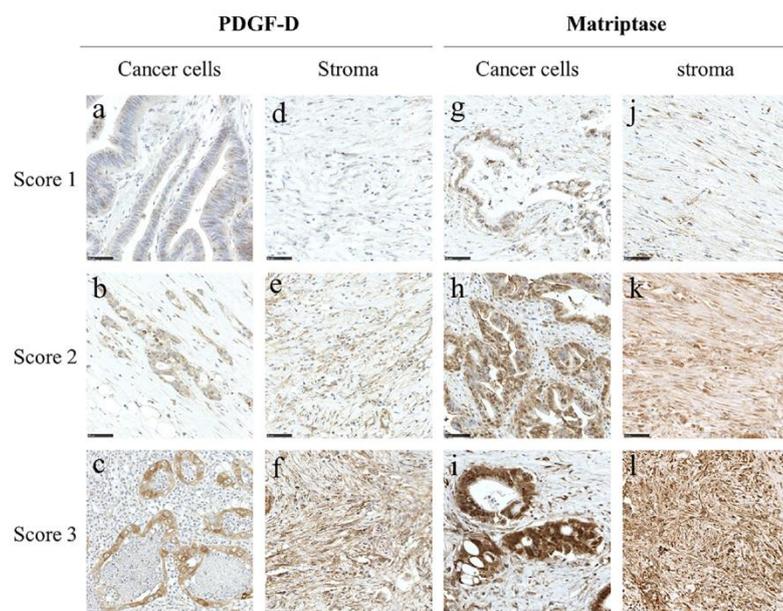


図1 Representative immunostaining of extrahepatic bile duct cancer for platelet-derived growth factor (PDGF)-D (a-f) and matriptase (g-l). Scale bar 1/450mm.

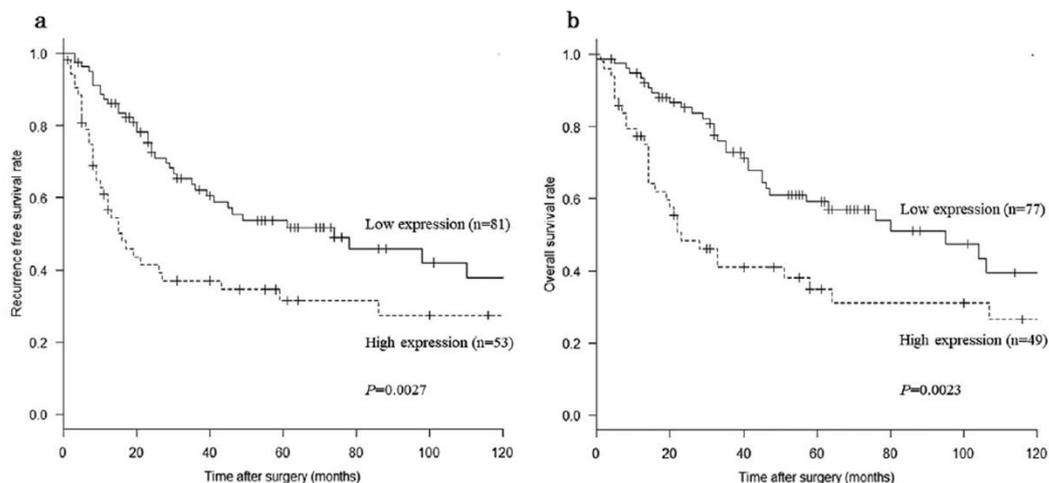


図2 (a) Kaplan-Meier curves for recurrence-free survival of patients with stromal expression of matriptase. (b) Kaplan-Meier curves for overall survival of patients with stromal expression of matriptase.

い腫瘍が存在することを明らかにした (図1)。そして、癌間質で matriptase が高発現している腫瘍は無再発生存期間 (RFS)、全生存期間 (OS) ともに不良で、多変量解析でも独立した予後規定因子となることを明らかにした (図2, 表1)。以上の結果は、Pathology International 誌に報告した。

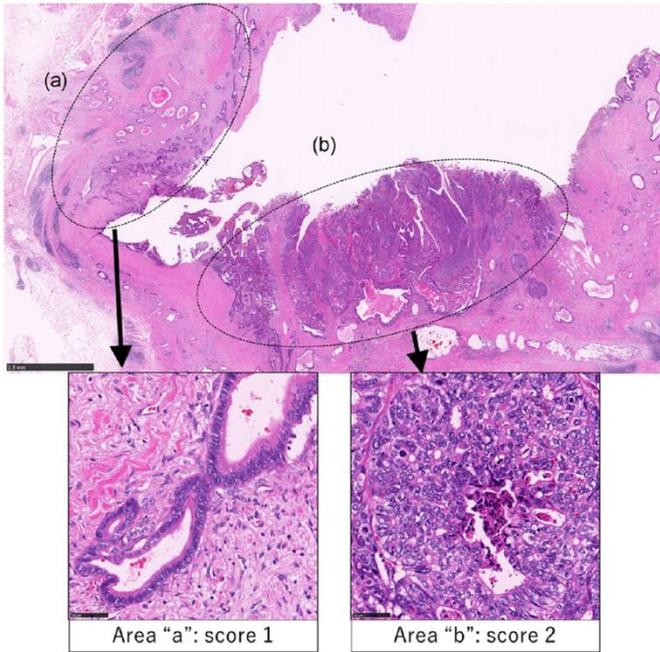
次に、胆管癌細胞株 (TFK-1・KKU-100) と肝星細胞株 (TWNT1) を用いて、共培養下における癌細胞の遊走アッセイとフローサイトメトリー (FCM) を用いた Matriptase 発現の解析を行った。胆管癌細胞株を用いた遊走アッセイでは、単培養下と比較して共培養下で癌細胞の遊走能亢進がみられた。また、FCM を用いた Matriptase 発現の解析では、単培養下と比較して共培養下において癌細胞での発現亢進が確認された。

肝外胆管癌について、その発生部位に関連しない評価項目である分化度について、腫瘍の不均一性を考慮したスコアリングシステムを考案しその有用性を検証した (図3)。1995年から2015年の21年間に本学附属病院で切除された肝外胆管癌257症例。既存の分類である肝門部胆管癌と遠位胆管癌に加え、分類が困難な3管合流部に発生する癌などを分類不能癌と分類しその頻度を調べた。分化度については、前立腺癌で用いられる Gleason 分類を参考に、腫瘍の主たる2成分をスコアリングし、その和を最終的な評価 (histological glandular differentiation score: HGD スコア) とし、予後との関連を解析した。その結果、HGD スコアはその点数が高くなるにつれて予後不良となる傾向があり、多変量解析にてすべての独立した予後関連因子だった。さらに、リンパ節転移の有無を組み合わせることで、全肝外胆管癌症例の予後を有効に層別化することができた (図4)。さらに、HGD スコア高得点と癌間質の Matriptase 高発現に相関を認めた。肝外胆管癌患者の予後層別化に有用な指標となる HGD スコアを考案・提唱することができた。この結果は、Pathology International 誌に報告した。

表1 Multivariate analyses of factors associated with recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS)

Variables	Hazard ratio (95% confidence interval)	Multivariate analysis P-value
RFS		
Age (≥70 years)	1.5 (1.0-2.1)	0.034
Lymph node metastasis	1.8 (1.2-2.6)	0.0021
Residual tumor (microscopic or macroscopic)	2.6 (1.9-3.5)	<0.0001
Matriptase expression in cancer stroma	1.7 (1.2-2.4)	0.0050
OS		
Lymphatic invasion	1.7 (1.1-2.8)	0.031
Residual tumor (microscopic or macroscopic)	2.3 (1.7-3.2)	<0.0001
Matriptase expression in cancer stroma	1.7 (1.2-2.5)	0.0093

1. Select two dominant constituent components.



2. Score each area based on tumor cell differentiation.

Score 1: Well differentiated  
Score 2: Moderately differentiated  
Score 3: Poorly differentiated or undifferentiated

3. Add the two scores.

Final histological glandular differentiation score: 1+2="3"

図3 Steps to evaluate the differentiation degree of a tumor.

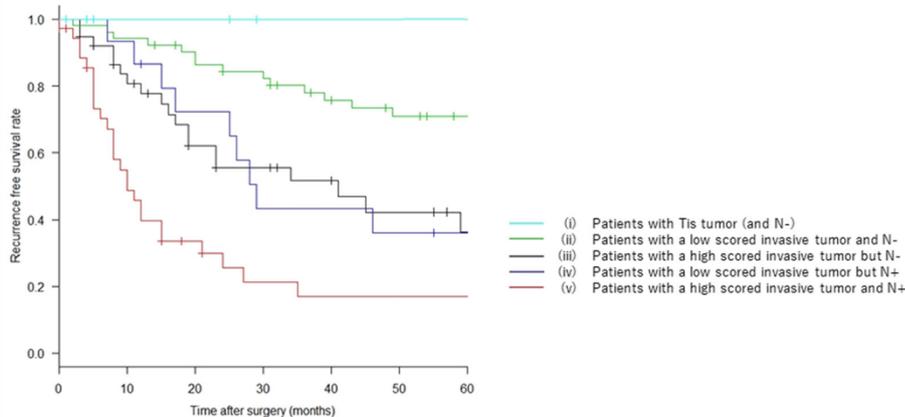


図4 Recurrence-free survival analysis (Kaplan-Meier curves) according to classification based on histological glandular differentiation (HGD) score and lymph node metastasis. N-, N-negative; N+, N-positive.

表2 Immunohistochemistry of tissue microarrays from of 257 cases of extrahepatic bile duct carcinoma

	S100P	IMP3	GLUT1	p53	S100A4	Maspin	MUC17	CD10	MDM2	SMAD4 <sup>a</sup>
Negative	31	54	111	132	151	151	199	224	213	143
Positive	226	203	146	125	106	106	58	33	44	114
Sensitivity	88%	79%	57%	49%	41%	41%	23%	13%	17%	44%
Specificity	90%	50%	90%	100%	100%	100%	90%	30%	100%	100%
Accuracy	88%	77%	59%	52%	46%	46%	27%	14%	23%	48%

<sup>a</sup>Loss of SMAD4 expression was classified as positive.

これらの研究と並行して、組織マイクロアレイ（肝外胆管癌 257 例）において、S100P、IMP3、GLUT1、p53、S100A4、Maspin、MUC17、CD10、MDM2、SMAD4 など 10 種類のマーカーについて免疫組織化学的に検討したところ、感度、正診率では、S100P（各 88.3%、88.4%）、IMP3（同 79.8%、77.6%）と比較的良好な成績を示したが、特異度は S100P で 90%、IMP3 は 50%であった（表 2）。一方、p53、S100A4、Maspin は、感度は 50%未満と低かったが、特異度は 100%であり、症例によっては診断に有用と考えられた。この結果は Diagnostic Cytopathology 誌に報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubota K, Jang JY, Nakanuma Y, Jang KT, Haruyama Y, Fukushima N, et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Clinicopathological characteristics of intraductal papillary neoplasm of the bile duct: a Japan Korea collaborative study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 581 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.785	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 該当する
1. 著者名 Komatsubara T, Sakuma Y, Sata N, Fukushima N.	4. 巻 70(11)
2. 論文標題 Histological evaluation of tumor differentiation score and prognosis of extrahepatic bile duct cancer: A proposal for a new histological grading system.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 857-864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13014.	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 福嶋敬宜	4. 巻 37 臨増
2. 論文標題 胆管内乳頭状腫瘍	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 病理と臨床.	6. 最初と最後の頁 218-220
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 Morita K, Oshiro H, Mito K, Mieno MN, Tamba-Sakaguchi M, Niki T, Miki A, Koizumi M, Sakuma Y, Komatsubara T, Sata N, Fukushima N.	4. 巻 97(49)
2. 論文標題 Prognostic significance of the degree of lymphatic vessel invasion in locally advanced, surgically resectable pancreatic head cancer: A single center experience.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e13466.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000013466.	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 Komatsubara T, Oshiro H, Sakuma Y, Sata N, Niki T, Fukushima N.	4. 巻 69(2)
2. 論文標題 Overexpression of matriptase in tumor stroma is a poor prognostic indicator of extrahepatic bile duct cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 86-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12769.	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 Morita K, Mito K, Niki T, Fukushima N.	4. 巻 68
2. 論文標題 Is an atypical flat lesion (AFL) a precursor lesion of the pancreatic ductal adenocarcinoma in human?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 491-493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12670.	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 Mito K, Saito M, Morita K, Maetani I, Sata N, Mieno M, Fukushima N.	4. 巻 18(4)
2. 論文標題 Clinicopathological and prognostic significance of MUC13 and AGR2 expression in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 407-412.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2018.04.003.	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 Sano N, Tabata K, Oda T, Yanagita M, Suzuki T, Komatsubara T, Kawata H, Fukushima N.	4. 巻 50(3)
2. 論文標題 Bile cytology diagnosis in challenging cases: Validation of diagnostic bile cytology criteria and extensive study for immunocytochemical markers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagn Cytopathol	6. 最初と最後の頁 123-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dc.24930.	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7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福島敬宜
2. 発表標題 胆嚢病変の病理像 - 基礎編
3. 学会等名 NEXT-TV Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島敬宜
2. 発表標題 膵・胆道疾患の病理と細胞診
3. 学会等名 第34回関東臨床細胞学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島敬宜
2. 発表標題 胆嚢病変の病理像 - 実践編
3. 学会等名 NEXT-TV Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriyoshi Fukushima,
2. 発表標題 Tumor-stromal interaction in pancreatic and biliary carcinoma; histopathologic viewpoint.
3. 学会等名 The 31st Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福嶋敬宜
2. 発表標題 膵胆道系腫瘍の病理診断と解決すべき課題.
3. 学会等名 基礎研究医養成活性化プログラム サマーセミナー2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田畑 憲一, 小松原利英, 池田恵理子, 福嶋敬宜
2. 発表標題 肝外胆管癌診断に免疫組織化学染色の有用性と臨床病理学的検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田智博, 渡邊温子, 中村香織, 二階堂貴, 池田恵理子, 小松原利英, 大城久, 福嶋敬宜
2. 発表標題 胆汁細胞診における免疫細胞化学染色の有用性について
3. 学会等名 第57回日本臨床細胞学会秋期大会 2018.11.17
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 福嶋 敬宜、池田 恵理子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 金芳堂	5. 総ページ数 232
3. 書名 臨床に役立つ消化器病理 ギュッと1冊! まるごとBOOK-web動画付	

1. 著者名 福嶋 敬宜, 二村 聡	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 264
3. 書名 臨床に活かす病理診断学	

〔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
---------	---------