

平成30年 5月21日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461046

研究課題名(和文)胆管癌に対するFISH法を用いた新規内視鏡的診断方法とバイオマーカーの確立

研究課題名(英文) The establishment of novel endoscopic diagnostic method and biomarker for cholangiocarcinoma by fluorescence in situ hybridization

研究代表者

内藤 格 (NAITOH, Itaru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30527750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌診断における内視鏡的胆管生検検体を用いたfluorescence in situ hybridization (FISH)法の有用性つき検討を行った。FISH法は染色体3、7、17番セントロメアプローブ(CEP)を用いて、polysomyの検出を行った。H&E染色にFISH法を併用することにより、胆管癌の診断能は向上し、IgG4関連硬化性胆管炎との鑑別に有用であった。また、CEP7のpolysomyを示す症例では示さない症例と比較し、生存曲線が有意に不良であり、胆管癌の予後不良因子としてのバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the efficacy of fluorescence in situ hybridization (FISH) using transpapillary forceps biopsy specimens in the diagnosis of cholangiocarcinoma (CCA). We evaluated the copy number gains (> 2 copies) of CEP 3, 7, and 17 in patients with CCA and IgG4-related sclerosing cholangitis (IgG4-SC). The complementary use of FISH analysis using transpapillary forceps biopsy specimens improves the diagnostic yield for CCA in the differential diagnosis from IgG4-SC. Furthermore, a CEP 7 copy number gain may be a biomarker of poor prognosis in CCA patients.

研究分野：消化器内科 胆膵領域

キーワード：FISH法 胆管癌 IgG4関連硬化性胆管炎 胆管生検 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

(1)胆管癌は他の消化器癌と異なり、その解剖学的特徴から内視鏡的胆管生検では十分な組織採取が困難であり、内視鏡的胆管細胞診を併用したとしても、その診断能は不十分である。そのような中、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いた膵胆管狭窄に対する内視鏡的診断方法の有用性が少数であるが、報告されている。FISH 法は他疾患の診断、治療においては重要な役割を果たす機会が多くなっているが、特に胆道疾患での応用は十分なされていない。

(2) 悪性膵胆管狭窄疾患において FISH 法による染色体異常が高率にみられるとの報告があるが、過去の報告はすべて細胞診検体を用いたものであり、パラフィン検体を用いた報告はなされていない。

(3) 本邦において IgG4 関連硬化性胆管炎 (IgG4-SC) は胆管癌の重要な鑑別疾患であり、適切な鑑別診断が必要とされる。また、胆管癌の内視鏡的生検組織を用いた FISH 法による染色体異常と予後との関連性が明らかになれば、胆管癌治療におけるバイオマーカーとしての有用性も期待できる。

2. 研究の目的

(1)胆管癌のパラフィン組織検体における FISH 法を用いた染色体異常を同定し、胆管癌の内視鏡的胆管生検診断における FISH 法の有用性を明らかにする。

(2)本邦において胆管癌の重要な鑑別疾患である IgG4-SC との鑑別診断における内視鏡的胆管生検検体を用いた FISH 法の有用性を明らかにする。

(3)胆管癌の内視鏡的胆管生検検体における FISH 法による染色体異常と胆管癌の予後との関連性を検討し、胆管癌治療におけるバイオマーカーとしての FISH 法の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)外科的切除にて得られ、病理組織学的に胆管癌と確定診断されたパラフィン組織標本及び正常胆管のパラフィン組織標本を用いて、FISH 法を用いた染色体異常の発現を検索し、胆管癌組織における染色体異常を同定する。染色体異常としてはセントロメア 3 番、7 番、17 番の polysomy につき FISH プローブを用いて検討を行う。

(2)胆管癌を対象、IgG4-SC を比較対象として、内視鏡的胆管生検検体を用いて FISH 法による染色体異常の発現を検索し、過去の文献および(1)で得られた結果より、FISH 法を用いた内視鏡的胆管生検の診断能を検討する。従来の内視鏡的細胞診、胆管生検との間で診断

能の比較検討を行う。

(3)上記の解析から得られた胆管癌における FISH 法を用いた染色体異常と予後の関連につき検討を行い、予後予測因子としてのバイオマーカーとなり得る染色体異常を同定し、胆管癌の予後予測因子、バイオマーカーの確立を行う。

4. 研究成果

(1)対象

当院で内視鏡的胆管生検が施行された胆管癌 49 例、IgG4-SC 25 例を対象とし、retrospective に検討を行った。

(2)方法

内視鏡的胆管生検にて得られたパラフィン検体を用いて、FISH 法を用いた染色体異常の検討を行った。FISH 法は過去の文献を参考に、染色体 3 番、7 番、17 番セントロメアプローブ(CEP)と 9p21 領域特異プローブからなる Urovision を用いて、各々重なりのない 50 個の細胞について染色体異常の割合を比較検討した。

過去の文献および外科的切除により得られた正常胆管組織での検討から各々重なりのない 50 個の細胞を各症例で計測し、5 個以上の細胞にて、3 番、7 番、17 番染色体のうち 2 染色体以上にて polysomy (3 個以上のシグナル) が観察された場合を「FISH 陽性」と判定し、FISH 陽性を FISH 法による悪性診断の定義とした。

H&E 染色においては benign、atypical、suspicious、malignant に分類し、malignant を悪性とし、その診断を検討した。

FISH 法においては CEP3、7、17 のそれぞれの polysomy と FISH 陽性の頻度につき検討を行い、FISH 法の診断能につき検討を行った。

CEP3、7、17 のそれぞれの polysomy の有無での生存曲線について、kaplan-Meier 法を用いて検討を行った。

さらに胆管癌の予後予測因子を明らかにすることを目的に polysomy の有無に様々な臨床、病理所見を加えて、cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。

(3)結果

H&E 染色では胆管癌 49 例中、benign : 3 例 (6.1%)、atypical : 5 例 (10.2%)、suspicious : 7 例 (14.3%)、malignant : 34 例 (69.4%)であった。IgG4-SC 25 例中、benign : 22 例 (88%)、atypical : 3 例 (12%)であった。H&E 染色における胆管癌の診断感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、正確度は 69.4%、100%、100%、62.5%、79.7%であった。

FISH 法において、CEP3、7、17 の polysomy は胆管癌の 22 例 (44.9%)、13 例 (26.5%)、26 例 (53.1%)に認められ、IgG4-SC の 2 例 (8%)、0 例、3 例 (12%)に見られた。FISH 陽性は

胆管癌で 27 例(55.1%)に止めたが、IgG4-SC では見られなかった。H&E 染色にて悪性と診断ができなかった 15 例中 4 例(26.7%)で FISH 陽性で悪性の診断が可能であった。反対に H&E にて非悪性と診断され、FISH 陽性と診断された症例は見られなかった。FISH 法における胆管癌の診断感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、正確度は 55.1%、100%、100%、53.2%、70.3%であった。

H&E 染色と FISH 法の併用による胆管癌の診断感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、正確度は 77.6%、100%、100%、69.4%、85.1%であった。H&E 染色に FISH 法を併用することにより、感度は 55.1%から 77.6%に上昇し、特異度の低下も認めなかった。

FISH 陽性の有無、CEP3、7、17 の polysomy の有無で生存曲線の比較を行うと、CEP 7 の polysomy 症例では polysomy を示さない症例と比較して、生存曲線が有意に不良であった (log-rank $p=0.015$ 、生存期間中央値 11.9 vs 20.7 カ月)。一方、FISH 陽性の有無、CEP3、17 の polysomy の有無では生存曲線に差を認めなかった。年齢、性、PS、外科手術の有無、化学療法の有無、CEP 7 の polysomy の有無で cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行うと、CEP 7 の polysomy 症例は独立した予後不良の因子であった (hazard ratio: 2.42、95% CI : 1.12 - 5.22; $p=0.024$)。

(3)結論

内視鏡的胆管生検におけるパラフィン検体を用いた FISH 法による染色体数異常の検出は、胆管癌の診断能を向上させ、IgG4-SC との鑑別診断に有用であった。また内視鏡的胆管生検検体における CEP 7 の polysomy は、胆管癌の予後不良を予測するバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Kato A, Naitoh I, Miyabe K, Hayashi K, Kondo H, Yoshida M, Kato H, Kuno T, Takahashi S, Joh T. Differential diagnosis of cholangiocarcinoma and IgG4-related sclerosing cholangitis by fluorescence in situ hybridization using transpapillary forceps biopsy specimens. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読, Vol25, 2018, 188-194.
DOI: 10.1002/jhbp.536.

Kato A, Naitoh I, Kato H, Hayashi K, Miyabe K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Jinno N, Yanagita T, Takiguchi S, Takahashi S, Joh T. Case of pancreatic metastasis from colon cancer in which cell block using the Trefle®

endoscopic scraper enables differential diagnosis from pancreatic cancer. World J Gastrointest Oncol. 査読, Vol10, 2018, 91-95.
DOI: 10.4251/wjgo.v10.i3.91.

Yoshida M, Marumo Y, Naitoh I, Hayashi K, Miyabe K, Nishi Y, Fujita Y, Jinno N, Hori Y, Natsume M, Kato A, Iida S, Joh T. Autoimmune Hemolytic Anemia Obscured by the Obstructive Jaundice Associated with IgG4-related Sclerosing Cholangitis in a Patient with Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Case Report and Review of the Literature. Intern Med. 査読, 2018 in press
DOI:10.2169/internalmedicine.9818-17.

内藤 格、大原弘隆、中沢貴宏、清水周哉、林 香月、城 卓志
IgG4 関連硬化性胆管炎と原発性硬化性胆管炎の鑑別、臨床消化器内科 Vol33 203-210.2018

内藤 格、中沢貴宏
IgG4 関連疾患の診断と治療、Medical Practice、査読無、Vol34 ; 1149-1154.2017.

Naitoh I, Nakazawa T, Kato A, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kuno T, Takahashi S, Ohara H, Joh T. Predictive factors for positive diagnosis of malignant biliary strictures by transpapillary brush cytology and forceps biopsy. J Dig Dis. 査読, Vol17, 2016, 44-51.
DOI: 1 10.1111/1751-2980.12311.

Shimizu S, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kato A, Ohara H, Kuno T, Takahashi S, Joh T. IgG4-related Sclerosing Cholangitis with No Biliary Stricture but Severe Thickening of the Bile Duct Wall. Intern Med. 査読, Vol55, 2016, 1575-1579.
DOI:10.2169/internalmedicine.55.6302.

Nakazawa T, Shimizu S, Naitoh I. gG4-Related Sclerosing Cholangitis. Semin Liver Dis. 査読, Vol36, 2016, 216-228.
DOI: 10.1055/s-0036-1584321.

内藤 格、大原弘隆、中沢貴宏、林 香月、坂 哲臣、宮部勝之、近藤 啓、吉田道弘、梅村修一郎、藤田恭明、堀 寧、夏目まこと、加藤晃久、城 卓志
IgG4 関連硬化性胆管炎と PSC の鑑別はどこまで可能となったか？、肝胆膵、査読無、Vol73 ; 553-539.2016

[学会発表](計6件)

加藤晃久, 内藤 格、林香月、坂哲臣、近藤啓、吉田道弘、藤田泰明、夏目まこと、城卓志
経乳頭の胆管生検検体を用いた胆管癌の診断能向上における Fluorescence in situ hybridization(FISH)法の有用性
第 93 回日本消化器内視鏡学会総会
2017 年 5 月 11 日 大阪

加藤晃久, 内藤 格、林 香月
胆管癌診断における Fluorescence in situ hybridization(FISH)法を用いた新規胆管生検診断方法の有用性 ~ IgG4 関連硬化性胆管炎との鑑別診断を中心に ~
JDDW 2017
2017 年 10 月 13 日 神戸

内藤 格、中沢貴宏、大原弘隆
原発性硬化性胆管炎と IgG4 関連硬化性胆管炎の鑑別診断における現状と問題点
第 52 回日本胆道学会
2016 年 9 月 30 日 横浜

加藤晃久、内藤 格、林 香月、坂 哲臣、近藤 啓、西 祐二、梅村修一郎、夏目まこと、城 卓志
Fluorescence in situ hybridization(FISH)法を用いた経乳頭的胆管生検の胆管癌診断
第 52 回日本胆道学会
2016 年 9 月 29 日 横浜

内藤 格、中沢貴宏、大原弘隆
IgG4 関連硬化性胆管炎の鑑別診断における内視鏡検査の有用性
第 89 回日本消化器内視鏡学会総会
2015 年 5 月 31 日 名古屋

Kondo H, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kato A, Ohara H, Joh T. Predictive factors for positive diagnosis of malignant biliary strictures by transpapillary brush cytology and forceps biopsy.
UEGW2015
Oct 26 2015 Barcelona Spain

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 格 (NAITOH Itaru)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30527750

(2)研究分担者

中沢貴宏 (NAKAZAWA Takahiro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：70305522

宮部勝之 (MIYABE Katsuyuki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00543985