

令和元年5月26日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06750

研究課題名(和文)胆道癌における包括的遺伝子配列解析による悪性化メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文) The comprehensive sequence analysis of genes concerning malignant alteration in the bile duct cancer

研究代表者

尾上 俊介 (ONOE, SYUNSUKE)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20807515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：異時性胆管癌での次世代シーケンサーによる包括的遺伝子配列解析を行った。症例1の初発病変にAPC、CDKN2A、CDKN2B、CDKN1B、MDM2、CD274、STK11、次発病変にAPC、CDKN2A、CDKN2B、CDKN1B、MDM2、CD274、STK11、PTPRD、SMAD4、KEAP1、ARID1A、FBXW7、PIK3R1の変異を認めた。症例2の初発病変にAPC、TP53、JAK1、RB1、SMAD4、AMER1、次発病変にAPC、TP53、JAK1、RB1、SMAD4、AMER1、KRAS、CDKN2A、CDKN2Bの変異を認めた。4つの遺伝子に共通した変異を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、異時性胆管癌での包括的遺伝子配列解析により、初発病変と次発病変では次発病変において新たな変異が付加されていた。悪性化に関する新たな知見が明らかになっており、本研究成果の学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Gene sequences were analyzed in heterochronic cholangiocarcinomas by next-generation sequencing. In case 1, several gene mutations were identified in APC, CDKN2A, CDKN2B, CDKN1B, MDM2, CD274 and STK11 in the primary lesion and in APC, CDKN2A, CDKN2B, CDKN1B, MDM2, CD274, STK11, PTPRD, SMAD4, KEAP1, ARID1A, FBXW7 and PIK3R1 in the secondary lesion. In case 2, several variations were found in APC, TP53, JAK1, RB1, SMAD4 and AMER1 in the primary lesion and in APC, TP53, JAK1, RB1, SMAD4, AMER1, KRAS, CDKN2A and CDKN2B in the secondary lesion. The common mutations were those in APC, CDKN2A, CDKN2B and SMAD4 in both cases. New variations in the secondary lesion were detected, compared with those in the primary lesion, in heterochronic cholangiocarcinoma.

Further investigations will be required to clarify the malignant alterations. Our results are thought to be a clue for the development of novel methods for the diagnosis and therapy of cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胆管癌 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

日本において、胆道癌の罹患率は諸外国と比較して高い傾向にあり、年間約2万人が胆道癌で亡くなっている。胆道癌の切除不能症例、再発症例に対する治療は抗癌剤による化学療法が中心となるが、大腸癌など他の消化器癌と比較し、分子標的治療薬など新規治療法の開発が遅れている。これは胆道癌の切除が限られた施設でしか行うことができず、臨床病理学的検討や化学療法に関する研究が十分に行われなかったためと考えられる。

また、近年、分子標的治療薬の実用化に伴い、バイオマーカーを利用する層別化による個別化医療がきわめて重要であることが明らかになっている。他の癌に対する個別化医療においてはHER2、BCR-ABL、EGFR、KIT、ALK、KRASなどがバイオマーカーとして臨床で用いられている。しかし、胆道癌ではそのようなバイオマーカーはいまだ明らかではなく、薬剤感受性に関わる腫瘍ゲノム情報もいまだ十分に解明されていない。

1998年から2016年に名古屋大学医学部腫瘍外科では約900例を胆管癌の切除症例を有し、これまで胆管癌に関する病理学的研究を系統的に行ってきた。乳頭状・鋸歯状構造を有する乳頭型胆管癌の臨床病理学的検討により浸潤成分の増加とともに連続的に癌の進行度が上昇することを明らかにしている。また、乳頭型胆管癌であっても浸潤癌成分>50%群と通常型胆管癌では予後と病理組織学的背景が類似していることも明らかにしている。

バイオマーカーや新規治療法の開発には発癌メカニズム、特に悪性化に関わるメカニズムの解明は極めて重要である。いまだ胆道癌での発癌や悪性化に関するメカニズム解明がされていないのは、前癌病変や早期癌などの進行癌として完成される前の病態モデルでの研究が不十分なためと考えられる。

これまで報告してきた浸潤癌成分の増加とともに連続的に癌の進行度が上昇することと病理学的背景が類似していることより、胆管癌による遺伝子発現の違いやIPNBと浸潤胆管癌の遺伝子発現に関して遺伝子解析を行なうことにより悪性化や癌の進行に関する遺伝子の同定が可能と考えられる。これらの遺伝子はバイオマーカーや新規治療法の新たな標的遺伝子の候補となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では次世代シーケンサーを用いて胆管癌の遺伝子配列の包括的に解析を行ない、悪性化や癌の進行に関する遺伝子を同定する。これらの遺伝子の機能解析を進めることにより悪性化に関するメカニズムの解明を目指すことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

【胆管癌に対する次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子配列解析】

名古屋大学医学部腫瘍外科にて切除術施行された胆管癌症例3例についてパラフィン包埋サンプルを薄切し、未染プレパラートを作成した。HE染色にて癌組織のマーキング後に、未染プレパラートからレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションにて癌組織を回収後、DNAを抽出した。抽出したDNA濃度およびQCratioによるDNAの断片化を検討した。

新たに異時性胆管癌2例の切除標本よりパラフィン包埋サンプルを作成し、HE染色にて癌組織のマーキング後に未染プレパラートよりレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションにて回収した癌組織のDNA抽出を行なった。抽出したDNAのDIN、断片化ライブラリーの評価を行

なった。癌のイニシエーション、プログレッション、薬剤感受性などとの関連が報告されている 421 遺伝子の変異を解析対象とする次世代シーケンサーによる解析を行なった。

4. 研究成果

【胆管癌に対する次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子配列解析】

胆管癌症例 3 例についてパラフィン包埋サンプルを薄切し、未染プレパラートを作成した。HE 染色にて癌組織のマーキング後に、未染プレパラートからレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションにて癌組織を回収後、DNA を抽出した。DNA 濃度は 3.0 から 74.6ng/μL であり、260/280 値は 1.90 から 1.97、230/280 値は 2.26 から 2.27 であった。DNA の断片化の指標である QCratio は 0.06 から 0.24 であった。DNA 濃度は十分であったが、次世代シーケンサーでの解析には QC ratio が 0.1 より大きいことが必要であるが、予想以上に断片化が進んでおり、3 例中 1 例は解析のできないことが明らかになった。

そのため、新たに異時性胆管癌 2 例の切除標本よりパラフィン包埋サンプルを作成し、HE 染色にて癌組織のマーキング後に未染プレパラートよりレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションにて回収した癌組織の DNA 抽出を行なった。症例 1 の初発病変の DNA 量は 308 から 406ng、症例 1 の次発病変の DNA 量は 1732.5ng、症例 2 の初発病変の DNA 量は 465.5 から 784ng であり次発病変の DNA 量は 262.5 から 360.5ng であった。次世代シーケンサーに必要な DNA がとれており、これらの DNA を用いて、癌のイニシエーション、プログレッション、薬剤感受性などとの関連が報告されている 421 遺伝子を解析対象とする次世代シーケンサーによる異時性胆管癌 2 例の包括的遺伝子配列解析を行った。

症例 1 の初発病変の DIN1.9、断片化ライブラリー割合が 32.8 から 92.6ng であり、次発病変の DIN3.1、断片化ライブラリー割合が 700.7ng であった。症例 1 の初発病変においては APC、CDKN2A、CDKN2B、CDKN1B、MDM2、CD274、STK11 に変異を認め、次発病変において APC、CDKN2A、CDKN2B、CDKN1B、MDM2、CD274、STK11、PTPRD、SMAD4、KEAP1、ARID1A、FBXW7、PIK3R1 に変異を認めた (表 1)。

表 1

	First lesion	Secondary lesion
Case1	APC	APC
	CDKN2A	CDKN2A
	CDKN2B	CDKN2B
	CDKN1B	CDKN1B
	MDM2	MDM2
	CD274	CD274
	STK11	STK11
		PTPRD
		SMAD4
		KEAP1

		ARID1A FBXW7 PIK3R1
--	--	---------------------------

同一患者の病変であるが、初発病変に認めなかった PTPRD、SMAD4、KEAP1、ARID1A、FBXW7、PIK3R1 の変異を次発病変に認めた。

症例 2 の初発病変の DIN2.1 から 2.3、断片化ライブラリー割合が 295.9 から 346.5ng であり、次発病変の DIN1.5 から 1.8、断片化ライブラリー割合が 136.4 から 169.4ng であった。症例 2 の初発病変においては APC、TP53、JAK1、RB1、SMAD4、AMER1 に変異を認め、次発病変において APC、TP53、JAK1、RB1、SMAD4、AMER1、KRAS、CDKN2A、CDKN2B に変異を認めた（表 2）。

表 2

	First lesion	Secondary lesion
Case2	APC	APC
	TP53	TP53
	JAK1	JAK1
	RB1	RB1
	SMAD4	SMAD4
	AMER1	AMER1
		KRAS
		CDKN2A
	CDKN2B	

同一患者の病変であるが、初発病変に認めなかった KRAS、CDKN2A、CDKN2B の変異を次発病変に認めた。

異時性胆管癌において初発病変に認められた変異が次発病変にも認められ、次発病変において新たな変異が付加されていることを明らかにした。

また症例 1 および症例 2 の初発、次発病変において共通して APC、CDKN2A、CDKN2B、SMAD4 に変異を認めた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし