

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08769

研究課題名(和文)胆道がんの臨床病理学的特徴を規定する遺伝子発現・異常の同定と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Identification of gene expression and abnormalities that define clinicopathological features of biliary tract carcinoma and their application in diagnosis and treatment

研究代表者

尾島 英知(Ojima, Hidenori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：80342905

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)：予後良好で特徴的な組織形態像を示す細胆管細胞癌(CoCC)に注目して、その分子病理学的意義を検討した。肝内胆管癌(CCC)のCoCC成分の有無による遺伝子発現の差異をGene Set Enrichment Analysis、遺伝子異常をWhole exome sequenceデータベースを用いて解析した。その結果、CoCC成分を有するCCCは予後良好・炎症反応・血管新生に関連する遺伝子群と優位に相関し、代表的なTP53をはじめとする癌関連遺伝子の遺伝子異常が有意に低く、臨床病理学的所見と合致した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形態学から導かれる胆道領域がんの生物学的特性に関わる臨床病理学的特徴を有する腫瘍として、細胆管細胞癌を選び分子病理学的手法を用いた解析を行なった。その結果、形態学的と臨床病理学的な関連が、分子病理学的にも裏付けされることが示された。本研究から導き出された機能分子や機能解析結果は、不明な点が多い胆道領域がんの腫瘍増殖・進展機構の一端を明らかにしただけでなく、将来の治療戦略や治療評価への応用の可能性を示唆する結果となった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular pathological significance of cholangiolocellular carcinoma (CoCC). We analyzed the differences in gene expression of cholangiocellular carcinoma (CCC), with and without CoCC, using gene set enrichment analysis as well as gene abnormalities using a whole-exome sequence database. Thus, a group of CCC with CoCC, in comparison with CCC without CoCC, was found to be significantly associated with genes involved in favorable prognosis, inflammatory response, and angiogenesis; in contrast, the gene abnormalities of cancer-related genes, such as the typical TP53, were significantly low. These results are consistent with the clinicopathological feature of CoCC.

研究分野：病理学

キーワード：胆道領域がん 細胞株 細胆管細胞癌 分子病理学的 遺伝子変異 GSEA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、胆道領域がんの臨床病理学的研究は形態学的側面だけでなく、遺伝子解析によるがんの増殖の鍵となりうるドライバー遺伝子異常やドライバー分子経路の解明と、それらを標的とした分子標的治療の開発が行われている。しかし、これらは網羅的な解析手法に基づいた重要な基礎データであるものの、個々の腫瘍の臨床病理学的特性に基づいた詳細な検討までは至っていない。さらに、このような遺伝子解析結果を臨床応用する際に必要とされる、多数のバイオリソースを用いた前臨床試験は胆道領域がんにおいては非常に貧弱な状況であるだけでなく、仮に治療が行われた場合においてもその臨床病理学的評価方法はほとんど確立されていない。従って、難治性がんである胆道領域がんの生物学的特性や発がんメカニズムの解明、さらには治療成績向上のためには、臨床病理学的特性を詳細に把握することと同時に、それらと“紐付け”可能な臨床検体を用いた包括的な分子病理学的検討が必要と考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、胆道領域がんを子細に観察して得られた生物学的特性に関わる臨床病理学的特徴を、分子病理学的手法を用いて詳細に解析し、得られた機能分子が病理学的診断や治療への応用・適応が可能か否かを検証する。こういった解析により、胆道領域がんの臨床病理学的特徴に裏付けされた生物学的特性を規定する分子機構の一端を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

胆道領域がんの生物学的特性に関連する臨床病理学的特徴を有する胆道領域がん症例を、匿名化された臨床病理学的データベースから選別・抽出する。様々な視点から候補となる症例を検討した結果、血流動態をはじめとする様々な臨床病理学的特徴が通常の腫瘍形成型肝内胆管癌と異なる細胆管細胞癌を検討対象とし、その生物学的特性を規定する臨床病理学的特徴と深く関連する候補分子の同定を試みた。

2003～10年に国立がん研究センターにて採取された腫瘍形成型の肝内胆管癌手術検体のうち、腫瘍検体から凍結組織包埋剤を用いて凍結保存し蒐集されている胆道領域がんの手術材料(診療の為に使用された残余の組織)を用いて検討した。凍結組織検体から薄切標本を作製し、そこから抽出したRNAを用いたマイクロアレイ(Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarrays ver 1.0)による遺伝子発現解析を実施し、さらに、同一症例の切除標本による遺伝子発現解析を実施した。細胆管細胞癌成分の有無により検体を二群に分類し、二群間での遺伝子発現の差異を Gene set enrichment analysis (GSEA)により検討した。さらに詳細に二群間の差異を検討するため、臨床病理学的因子や遺伝子異常(Whole exome sequence データベースを利用)との相関を解析した。

#### 4. 研究成果

遺伝子発現解析に供した 37 例中で細胆管細胞癌の成分 (図 1) が認められたものは 15 例であり、このうち病変全体が細胆管細胞癌の形態を示していたものは 3 例であった。臨床病理学的検討を実施すると、細胆管細胞癌成分のみられた群は有意に生命予後良好であり (図 2)、肝門部門脈侵襲および神経周囲浸潤の割合は低く、CA19-9 は低値であった (表 1)。

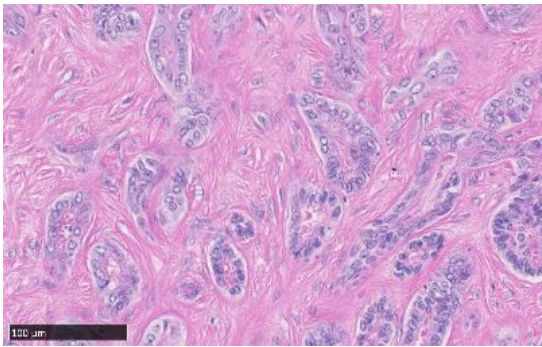


図 1 細胆管細胞癌の組織所見

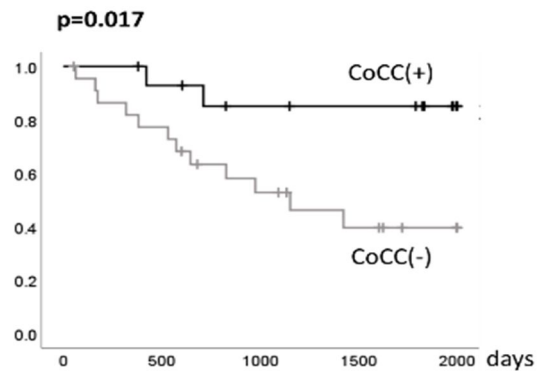


図 2 細胆管細胞癌 (CoCC) 成分あり (CoCC(+)) と無し (CoCC(-)) の術後生存日数

	n	CoCC(comp+partial)	CoCC(-)	p
sex (M/F)*	38	6/9	17/6	0.037
age ± SE**	38	66.73 ± 2.892	66.8 ± 1.58	0.983
etiology (viral/non-viral)*	38	2/13	3/20	0.979
CA19-9 (>=100/<100)*	38	3/12	13/10	0.026
1log10 CA19-9 ± SE**	38	1.60 ± 0.12	2.36 ± 0.30	0.026
CEA (>=5/<5)*	38	2/13	7/16	0.226
log10 CEA ± SE**	38	0.51 ± 0.08	0.61 ± 0.13	0.545
size ± SE**	38	56.67 ± 8.02	53.76 ± 5.53	0.76
vp (+/-)*	38	12/3	18/5	0.898
vv (+/-)*	38	8/7	13/10	0.847
ly (+/-)*	38	10/5	20/3	0.134
ne (+/-)*	37	8/7	19/3	0.026
im (+/-)*	38	3/12	6/17	0.666
pN (+/-)*	25	3/10	5/7	0.32
PVlr (+/-)*	30	1/12	10/7	0.004
back liver (CH/NL)*	36	2/13	2/19	0.471

\*Chi-squared test, \*\*T-test

表 1 細胆管細胞癌 (CoCC) 成分の有無と臨床病理学的因子の関係

また、これらの遺伝子発現プロファイルを用いて GSEA を行ったところ、細胆管細胞癌成分の認められなかった症例では、胆管癌予後不良遺伝子群として報告されている Andersen ' s cholangiocarcinoma class 2 の遺伝子群が有意に発現上昇していた ( 図 3 )。 Andersen ' s cholangiocarcinoma class を規定する遺伝子群の発現を基にこれら 37 例をクラスター解析すると、細胆管細胞癌成分を有する全 15 例が予後良好と報告される class 1 高発現サブクラスに分類された一方、細胆管細胞癌成分を有さない群では 7 例が class 1 高発現サブクラスに、 15 例が class 2 高発現サブクラスに分類された。細胆管細胞癌成分を有する症例は全て Andersen ' s class 1 に分類されたことから、胆管細胞癌成分の意義を検討するため、 class 1 に分類された 22 例を用いて GSEA を行ったところ、細胆管細胞癌成分を有する群では炎症応答、上皮・間葉転換、血管新生などに関連する遺伝子群が有意に高発現していた ( 図 4 )。血管新生に関連する遺伝子の発現は、全 37 例においても、細胆管細胞癌成分を有する群で有意に高発現しており、加えて血管内皮マーカーの発現も有意に高かった。また細胆管細胞癌成分を有する症例では、胆道癌で高頻度に遺伝子異常が検出される TP53 や KRAS などの変異は全く検出されなかった。

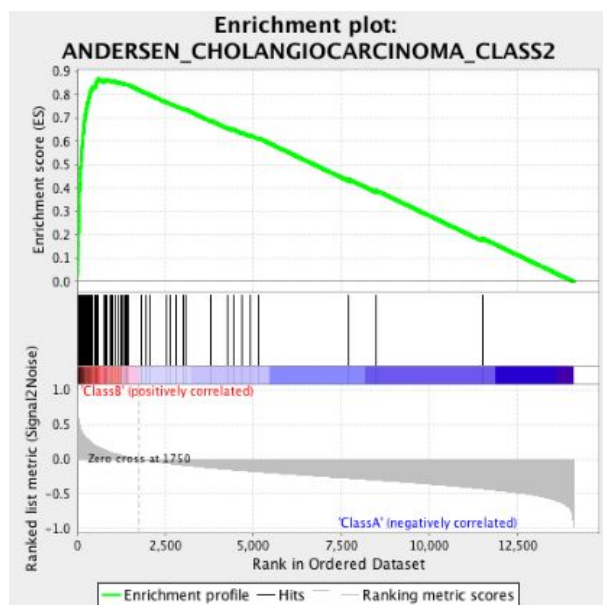


図 3 CoCC 成分がない肝内胆管癌では、胆管癌予後不良遺伝子群として報告されている Andersen ' s cholangiocarcinoma class 2 の遺伝子群が有意に発現上昇

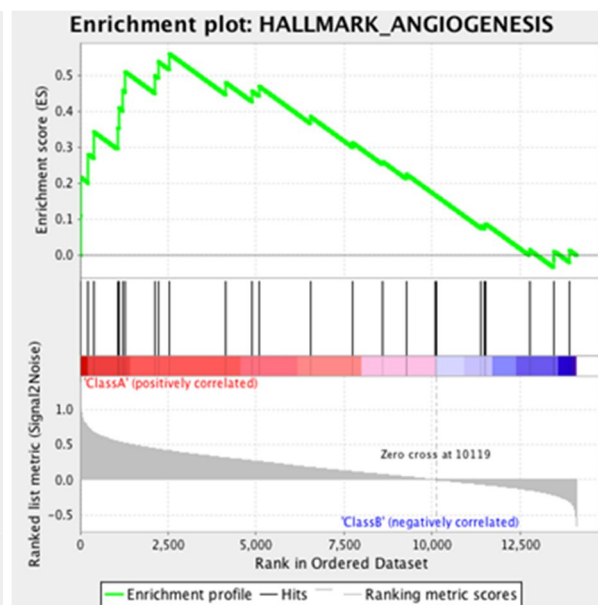


図 4 class 1 高発現サブクラスに分類された症例では CoCC 成分を有する腫瘍に血管新生因子の関連遺伝子群が有意に発現上昇

また、血管新生に関連する分子 ( OLR 1、SPP 1 ) の免疫染色への応用を目指して、細胞株や実際の組織標本を用いた免疫染色の検討を行ったが、その評価が困難であり、多数症例で染色して検討するには至らなかった。今後も、他の候補遺伝子の検討を続けてゆく方針である。

上記の結果から、細胆管細胞癌成分を有する肝内胆管癌には、その特徴的な形態学的所見を反映した間質系遺伝子の発現上昇を認めるとともに、主要なドライバー遺伝子の変異が低い予後良好な病変であることが明らかとなり、臨床病理学的特性の裏付けだけでなく、肝内胆管癌の発癌機構を考える上で重要な組織形態学的知見であることが判った。さらに、治療を考える上でも非常に重要な知見であることが示唆された。

なお、得られた候補遺伝子に関する validation study を、慶應義塾大学の胆道領域がん切除検体を用いて確認する検討は、該当症例数が少ないことから断念した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto Y., Yamagishi S., Tanizawa Y., Tajimi M., Okusaka T., Ojima H	4. 巻 48
2. 論文標題 PI3K-mTOR pathway identified as a potential therapeutic target in biliary tract cancer using a newly established patient-derived cell panel assay	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 396, 399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyy011	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 尾島英知, 益田悠貴, 前原純樹, 上野彰久, 坂本康成	4. 巻 35
2. 論文標題 肝胆膵領域に対する病理学的治療効果判定	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 1002 -1009
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 Sakamoto Yasunari, Yamagishi Seri, Okusaka Takuji, Ojima Hidenori	4. 巻 8
2. 論文標題 Synergistic and Pharmacotherapeutic Effects of Gemcitabine and Cisplatin Combined Administration on Biliary Tract Cancer Cell Lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1026 ~ 1026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8091026	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 尾島英知
2. 発表標題 肝腫瘍の病理と臨床、その基本事項と未来像. ~NASHや糖尿病との関連も含めて~
3. 学会等名 日本超音波医学会第48回北海道地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾島英知
2. 発表標題 病理形態学を基盤とした、胆道悪性腫瘍の進展に関わる分子機構の解明
3. 学会等名 第65回 日本病理学会秋期特別総会 (学術研究賞演説) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakamoto Y, Yamagishi S, Okusaka T, Ojima H.
2. 発表標題 Synergistic Effects and Pharmacotherapeutic Activity of Gemcitabine and Cisplatin Combination Therapy in Biliary Tract Cancer Cell Lines
3. 学会等名 United European Gastroenterology Week (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takemura Y, Ojima H, Oshima G, Kubota N, Shinoda M, Kitago M, Yagi H, Abe Y, Hori S, Masuda Y, Nishimura Y, Hibi T, Sakamoto M, Kitagawa Y.
2. 発表標題 Gamma-Synuclein is a novel prognostic marker and promotes tumor cell migration in biliary tract carcinoma
3. 学会等名 Gastrointestinal Cancers Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----