

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08552

研究課題名（和文）肝門部胆管癌におけるクリニカルシーケンスパネルを用いたゲノム解析とその応用

研究課題名（英文）Genome analysis using a clinical sequence panel in hilar cholangiocarcinoma

研究代表者

阿部 雄太（ABE, Yuta）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：70327526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肝門部胆管癌根治切除症例のうちDNA抽出を成功した全77例を解析した。NGSを用いて遺伝子配列を調べ、遺伝子変異を同定した。結果38種の遺伝子変異（のべ138変異）を同定した。病理学的に異なるとされる肝内胆管癌肝門部浸潤と大型胆管由来の肝門部胆管癌には遺伝子変異にある一定の傾向があった。胆道癌の共通ドライバー遺伝子とされるBRCA2, ERBB2, TP53については既報と同様の変異率であったがこれらと病理学的因子や予後因子に相関を認めなかった。しかし上記遺伝子異常に別の新規遺伝子異常の組み合わせが予後予測因子になりえる可能性が示唆された。これら新たな知見をまとめ現在論文作成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝門部領域胆管癌は非常に予後不良な疾患である。それは高い悪性度と手術の高侵襲のためであり、その治療成績向上には手術治療と組み合わせた効果的な薬物治療の開発が必要とされている。一方肝門部領域胆管癌は欧米では発生頻度が低いため研究が盛んではない。つまりその希少性から大規模研究が難しく新規治療薬の開発や臨床応用が非常に遅れている。この背景において本研究では次世代シーケンサーを用いた癌遺伝子パネルを用いて肝門部領域胆管癌の遺伝子解析を行い、特徴的な変異パターンを解析し病理組織像や患者予後と遺伝子異常にある一定の相関を知ることができた。これは今後の新たな治療効果判定や新規治療薬開発の基礎となり得る。

研究成果の概要（英文）：We analyzed all 77 radical resection sample from patients with hilar cholangiocarcinoma with successful DNA extractions. Gene sequences were sequenced using NGS to identify gene mutations. 38 gene mutations (138 mutations in total) were identified. Intrahepatic cholangiocarcinoma with hilar invasion and hilar cholangiocarcinoma derived from the large bile duct had a certain tendency for gene mutation. In addition, analysis by pathological factors revealed a significant difference between vascular infiltration and gene mutation, and lymphatic infiltration and lymph node metastasis and gene mutation. BRCA2, ERBB2, and TP53, which are common driver genes for biliary tract cancer, had the same mutation rates as previously reported, however, these were not correlate with pathological factors or prognostic factors. From our results, it was suggested that a combination of some genetic abnormalities could be a predictor of prognosis.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：胆道癌 ゲノム医療 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

肝門部領域胆管癌は極めて予後不良な悪性腫瘍の一つである。肝門部領域胆管癌に対する根治的な治療法が手術であることに異論はなく、手術の標準化、術後管理の向上、徹底した術前シミュレーションなどにより短期成績は改善しているものの、腫瘍としての悪性度は非常に高いため非切除例や術後再発例も多く依然十分な治療成績は得られていない。薬物療法や放射線療法などの併用が期待されていたが、未だに標準治療となりえず、新規治療法の開発は非常に遅れていると言わざるを得ない。治療選択肢が非常に少なく、新規治療薬が待ち望まれているのが現状である。

近年、癌における遺伝子変異は個人によって異なり、特定の遺伝子変異は薬剤感受性に関わるため、個人によって薬剤感受性も異なる可能性があることがわかってきた。肺癌での ALK 遺伝子など、様々な癌種において治療法の個別化が進んでいる。しかし、研究開発当初のところ肝門部領域胆管癌を含む胆管癌において有用性が示されている分子標的薬はない。国内において 260 例の各種胆道がんに対する遺伝子解析が行われ胆管癌特有のドライバー遺伝子の変異やコピー数の異常が報告されたが、(Nakamura et al, Nature gene, 2015) 胆管癌のうち肝門部領域癌の占める切除症例数が少ないため、十分なサンプルサイズのゲノムデータベースとはいえなかった。

そこで肝門部領域胆管癌は臨床的な多様性からゲノム異常については未だ不明な点は多いが、網羅的に解析することで層別化が可能であり、分子標的薬の治療効果や病理学的因子、予後と相関を示すことができるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は遺伝子診断パネルを用いて肝門部領域胆管癌の遺伝子変異を網羅的に解析し、ゲノムサブタイプを解明することにより、抗癌剤の治療効果、病理学的因子との相関性を研究し、個別化医療を確立するための基礎を作ることが目的である。“難治性”“希少性”の高い疾患において Precision medicine が着目されているなか、まさにそれに該当するのが肝門部領域胆管癌であり、肝門部領域胆管癌のみの検体で研究ができる施設は非常に限られているが、今回はハイブリウムセンターである当施設の臨床検体および臨床経過を用いることで研究可能となった。

3. 研究の方法

本研究では慶應義塾大学病院において蓄積された切除検体を対象として、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異検索を行う。切除検体のパラフィン固定切片から genetic DNA を抽出し、対象とする遺伝子のみを補足し濃縮し、次世代シーケンサー (NGS) を用いて遺伝子配列を調べ、前出の約 400 種類の遺伝子における遺伝子変異 (一塩基変異、挿入・欠失、融合遺伝子、コピー数増減) を同定した。データは、バイオインフォマティクスのプロセスにて加工され、GENEKEEPER® というデータベースソフトを用いて、必要な遺伝子異常のレポートを出力した。解析に使用するサンプルを採取した被験者の臨床データは全て揃っており、変異の有無により病勢、病理学的因子についての統合解析を行った。特にクラスタリング解析を行い、臨床経過、病理学的な因子の関連についても詳細に検討した。

4. 研究成果

研究開始時に用意していた、2013-2018 年までに肝門部胆管癌に対して根治手術を受けた 101 例の患者の切除検体パラフィン固定切片からの genetic DNA 抽出は固定法の問題や経時的

変化で抽出率が悪く、結果 37 例に対してのみ可能であった。よって 2019 年以降の胆道がん症例全 69 例を追加しシーケンスを施行した。その結果 DNA 抽出作業中 12 例、DNA 品質不良の 17 例を除き 40 例で DNA 抽出成功し全 77 例にて検証を行った。対象とする遺伝子のみを捕捉し濃縮、次世代シーケンサー（NGS）を用いて遺伝子配列を調べ、約 400 種類の遺伝子における遺伝子変異を同定した。現在のところ 38 の遺伝子変異（のべ 138 変異、頻度順に TP53 (20.5%), KRAS (17.6%), NOTCH (17.6%), ROS(14.7%), など）を同定しえた。これらの遺伝子変異パターンは一部において既報（Nakamura et al, Nature gene, 2015）との違いが確認されたが本研究では既報より多くの症例にて検討し得たためより精度の高い結果と考える。また肝門部領域胆管癌には肝内胆管癌肝門部浸潤と大型胆管由来の肝門部胆管癌を含むが、病理学的に異なるとされるこれら 2 つの疾患にはある一定遺伝子変異に傾向があることが本研究によって見いだされた。

また病理学的因子での解析では脈管浸潤と遺伝子変異の相関、リンパ管浸潤 + リンパ節転移と遺伝子変異における相関を検索した。胆道癌の共通ドライバー遺伝子とされる BRCA2, ERBB2, TP53 については既報と同様の変異率であったがこれらと病理学的因子や予後因子に相関を認めなかった。しかし上記遺伝子異常に別の新規遺伝子異常の組み合わせが予後予測因子になりえる可能性が示唆された。これら新たな知見をまとめ現在論文作成中である。

本研究成果の位置付けであるが、胆管癌についての研究は、疾患の少ない欧米では盛んではなく、罹患率の高い日本で行われた中村らの大規模研究では肝内胆管癌を多く含み、肝門部領域胆管癌に関して十分な数の解析ではなかったためデータとして十分ではなかった。本研究は肝門部領域胆管癌に限定したより精度の高く、臨床応用の可能なデータベースといえる。

今後の展望として現在、同一患者において採取した術前、術後 7 日目、術後 30 日目の血漿から cell free tumor DNA(ctDNA)を採取し治療後残存腫瘍モニタリングを開始している。本研究にて得た各患者の遺伝子異常情報をもとに特徴的な ctDNA を定め、それが術後に残存しているか、あるいは予後に相関するかの検討を始めている。これが確立すれば手術だけでは十分な根治が得られない本疾患に対する集学的治療の効果をモニタリングすることが将来的に可能となり実臨床に多いに役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yokose Takahiro, Kitago Minoru, Matsuda Sachiko, Sasaki Yasushi, Masugi Yohei, Nakamura Yuki, Shinoda Masahiro, Yagi Hiroshi, Abe Yuta, Oshima Go, Hori Shutaro, Yusuke Fujita, Nakano Yutaka, Endo Yutaka, Abe Kodai, Tokino Takashi, Kitagawa Yuko	4. 巻 111
2. 論文標題 Combination of KRAS and SMAD4 mutations in formalin fixed paraffin embedded tissues as a biomarker for pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2174 ~ 2182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14425	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 Yokose Takahiro, Kabe Yasuaki, Matsuda Atsushi, Kitago Minoru, Matsuda Sachiko, Hirai Miwa, Nakagawa Tomomi, Masugi Yohei, Hishiki Takako, Nakamura Yuki, Shinoda Masahiro, Yagi Hiroshi, Abe Yuta, Sakamoto Michiie, Kitagawa Yuko	4. 巻 12
2. 論文標題 O-Glycan-Altered Extracellular Vesicles: A Specific Serum Marker Elevated in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2469 ~ 2469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12092469	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横瀬崇寛, 北郷実, 中野容, 篠田昌宏, 八木洋, 阿部雄太, 高野公德, 大島剛, 北川雄光.
2. 発表標題 血清KRAS 遺伝子変異と血清CA19-9 による膵癌の予後予測因子の検討
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 北郷実, 中野容, 松田祐子, 横瀬崇寛, 遠藤泰, 堀周太郎, 大島剛, 阿部雄太, 八木洋, 篠田昌宏, 北川雄光
2. 発表標題 膵癌術後の予後予測因子としてのバイオマーカー探索
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------