

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16439

研究課題名（和文）胆道癌における形態別にみた上皮内病変の胆管内分布とclonality

研究課題名（英文）Usefulness of adding genomic mutation information for diagnosis of horizontal cholangiocarcinoma progression

研究代表者

高橋 裕之（Takahashi, Hiroyuki）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10516503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：胆管癌切除検体を用いた今回のターゲットシーケンスでは、何らかの遺伝子変異が91%において検出された。またTP53変異は78%に認められた。腫瘍におけるp53の免疫染色も施行したが、TP53変異とp53染色パターンには高い一致率がみられた。断端のシーケンス解析では断端陽性症例全例で胆管断端に遺伝子変異が認められ、その遺伝子変異は主腫瘍と一致し、すべてにTP53変異を認めた。断端陰性症例の40%では胆管断端に遺伝子変異が認められ、1例を除き主腫瘍と同じ遺伝子変異であり、2例以外ではTP53変異陽性であった。断端陰性症例の吻合部再発は2例に認められ、いずれも断端に遺伝子変異を認める症例であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管癌では胆管炎や胆道ドレナージに伴う再生異型やスキップあるいは多発病変が存在する可能性があり、術中の迅速診断、さらに永久標本をもってしても切除断端の判定に苦慮する場合がある。本研究では、胆管がんはTP53変異を持つことが多くターゲットシーケンスで検出することができること、断端陰性症例でも、TP53等の変異が検出されることがあり、TP53変異とp53免疫染色は相互によく関連し、断端評価に利用できることが示された。未だ周術期リスクの高い胆管癌根治手術において、根治のための過不足ない手術を施行するための確実な断端診断は必須事項であり、ゲノム情報の付加は正診率向上に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this targeted sequencing of resected cholangiocarcinoma specimens, some type of genetic mutation was detected in 91% of cases. TP53 mutations were found in 78%. Immunostaining for p53 in tumors showed a high concordance between TP53 mutations and p53 staining patterns. Sequencing of truncal segments showed that all truncal positive cases had a genetic mutation in the bile duct truncus that was consistent with the primary tumor, and all had TP53 mutations. In 40% of the truncus-negative cases, a genetic mutation was found in the bile duct transection, with the same genetic mutation as the main tumor in all but one case, and all but two cases were TP53 mutation-positive. Anastomotic recurrence was observed in two cases of negative margins, both of which had genetic mutations in the margins.

研究分野：胆管癌

キーワード：胆管癌 切除断端診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胆道は肝の全領域から十二指腸乳頭部までおよぶ広範な領域で、胆道癌治療で全胆道が切除されることはなく、多発癌の正確な頻度は不明である。しかし、胆汁という共通の消化液にさらされる胆道においても食道や頭頸部領域腫瘍で示される“field defect”の関与は想像に難くない。そのため、胆道癌の多発頻度は想像以上に高い可能性がある。一方、胆道癌の多くでは胆道狭窄に伴う胆管炎が背景にあるため、非癌部胆管上皮には広範な修飾(再生異型)が加わり、時に腫瘍性病変との鑑別に苦慮する。これはしばしば議論になる胆管切除断端の予後因子としての臨床的意義や、胆道発癌機序を考える上で重要な問題である。

## 2. 研究の目的

胆道癌切除材料に含まれる BillIN や再生異型上皮などの胆管内病変の分布や、これらの遺伝子変異を詳細に解析することは、ヒト胆道発癌・進展機構を知る上で極めて重要である。そして、胆道の発癌素地を考えた場合、膵胆道の発生の共通性と両臓器の可塑性が、診断と治療の両面において胆道癌の新たな視点から見直すヒントとなると考えられる。また、胆道切除標本の全割標本を用いた、きめ細かなアプローチは、欧米における high-volume center においても避けられることが多く、オリジナリティーの高い情報発信となる。

本研究では胆管癌の切除材料を用いて胆道上皮内病変の形態的特徴と長軸方向への分布、遺伝子変異を詳細に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

2018 年から 2023 年までに当院において根治切除を施行した胆管癌 32 例を対象とした。全割標本を用いて主病変から胆管切除断端に至る胆管粘膜の病理所見を連続的に評価し、腫瘍最深部と先進部、切除断端胆管粘膜よりゲノム DNA を抽出、ターゲットシーケンスによる変異解析を行い、HE 像と p53 免疫染色所見を対比した。

ターゲットシーケンスは日本人の胆管癌に関する既報を参考に、高頻度な変異がみられた 20 遺伝子を搭載したカスタムパネルを用いて、各部位におけるドライバー変異情報を取得している。

## 4. 研究成果

対象とした 32 例の内訳は年齢中央値は 75 歳、性別は男性 28 例、女性 4 例であった。術前 CEA、CA19-9 の中央値は CEA 2.4 ng/ml、CA19-9 33U/ml で、32 例中 23 例では術前内視鏡下に陰性生検が施行されていた。

診断は広範囲胆管癌 4 例、肝門部胆管癌 5 例、遠位胆管癌 22 例、IPNB1 例であり、施行術式については 27 例で膵頭十二指腸切除が、5 例で HPD が施行された。

病理診断では stage0 1 例、16 番リンパ節転移による stage4 が 2 例あり、リンパ節転移が半数に認められ、HM1 (断端 cis) が 4 例、HM2 (断端間質浸潤陽性) が 3 例であった。

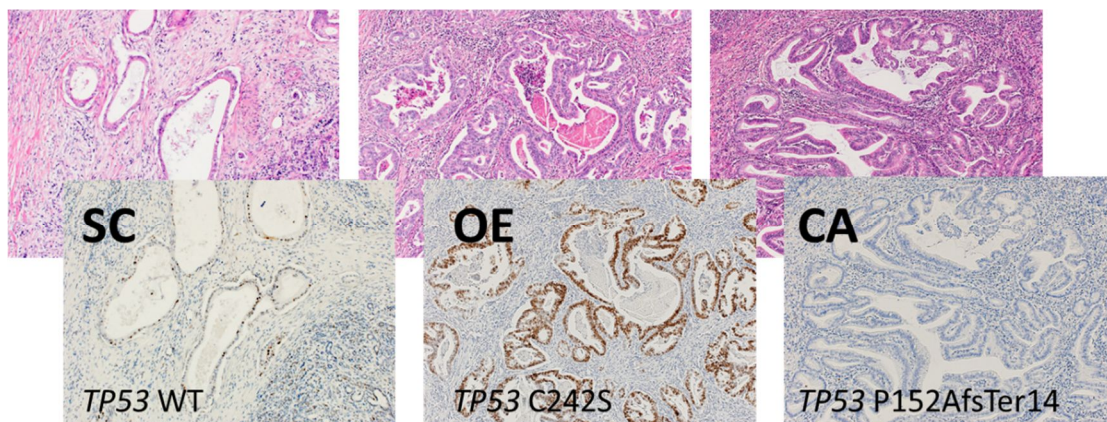
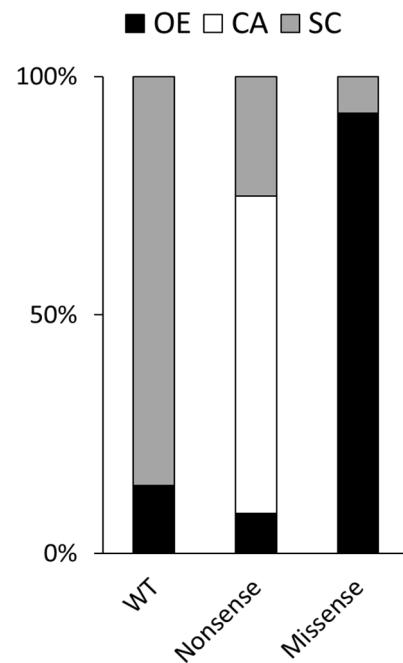
予後はリンパ節転移陽性例で再発 7 (44%)、リンパ節転移陰性例で再発 4 (25%)とリンパ節転移陽性例で多く認められた。吻合部の再発はリンパ節転移ありなしともに 2 例ずつで認められた。

次に腫瘍のシークエンスデータを示す。

今回のターゲットシークエンスでは何らかの遺伝子変異が 32 例中 29 例 (91%) において検出された。TP53 変異は 32 例中 13 例でミスセンス変異、12 例でナンセンス変異と、32 例中 25 例 (78%) に認められた。

腫瘍における p53 の免疫染色も施行したが、Missense 変異 13 例中 12 例で腫瘍細胞核における過剰発現 (OE) パターン、Nonsense 変異 12 例中 8 例で腫瘍細胞での発現が全くみられない complete absence (CA) パターンを呈していた。

TP53 遺伝子変異と p53 免疫染色の結果を対比すると、免染で OE パターンを示すものの 86% がミスセンス変異、CA パターンを示すものはナンセンス変異しかなく、SC パターンは WT に多いという結果であり、同変異と染色パターンには高い一致率がみられた。



TP53 遺伝子変異をマッピングしてみると、DNA-binding domain に変異が集中していることがわかる。また、ナンセンス変異はおおむね CA パターンを示すが、300 番目以降のナンセンス変異では CA パターンになっていなかった。

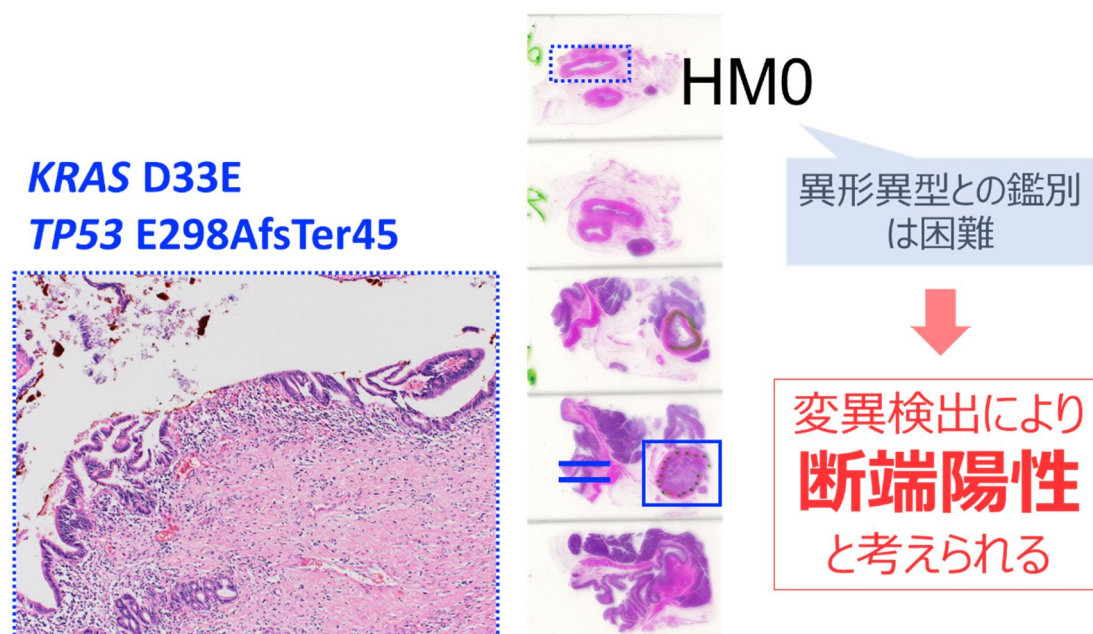
TP53 以外の遺伝子変異について見てみると、柴田論文で定義された Kinase-RAS module 変異 (KRAS/ERBB2/BRAS/NRAS/PIK3KA/STK11) は、32 例中 20 例に認められた。さらに、分化度や組織型の違う複数領域のサンプリングの結果、ポリクローナルと考えられた病変が 5 例、16% に確認された。

最後に断端のシーケンス結果を示す。

最終病理診断では HM0 25 例、HM1 4 例、HM2 3 例であり、HM1 および HM2 症例では全例胆管断端に遺伝子変異が認められ、その遺伝子変異は主腫瘍と一致し、すべてに TP53 変異を認めた。

HM0 症例 25 例のうち 10 例(40%)では胆管断端に遺伝子変異が認められ、1 例を除き主腫瘍と同じ遺伝子変異であり、2 例以外では TP53 変異陽性であった。HM0 症例で吻合部再発は 2 例に認められ、いずれも断端に遺伝子変異を認める症例であった。

代表症例を示す。病理診断 HM0 であったが、ターゲットシーケンスで KRAS および TP53 の変異を認めた。鏡検上異型細胞の診断は困難であり、変異検出の方が高感度である可能性を示唆する。



まとめると、胆管がんは TP53 変異を持つことが多く、ターゲットシーケンスで検出することができる。HM0 の症例でも、TP53 等の変異が切除断端で検出されることがあり、TP53 変異と p53 IHC 染色は相互によく関連し、断端評価に利用できる。

本研究では、胆管癌の水平方向への進展評価における連続変異プロファイリングは有益であり、切除断端診断に応用できる可能性のあることが示された。今後、さらに症例数を積み上げ、臨床応用へと発展させるためのエビデンスを蓄積したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>高橋 裕之                     |
| 2. 発表標題<br>胆管癌進展度診断に対するゲノム変異情報付加の有用性 |
| 3. 学会等名<br>第78回日本消化器外科学会総会           |
| 4. 発表年<br>2023年                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|