HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	超音波内視鏡下穿刺吸引法による検体を用いた胆道癌ゲノム解析の研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	平田, 幸司
Description	配架番号：2558
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14092号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77926
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Hirata_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　平　田　幸　司

学位論文題名

超音波内視鏡下穿刺吸引法による検体を用いた胆道癌ゲノム解析の研究

(A novel approach for the genetic analysis of biliary tract cancer specimens obtained through endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration using targeted amplicon sequencing)

【背景と目的】胆道癌は本邦では膵癌についで予後不良の疾患である。胆道癌の発生頻度は全世界で年々増加傾向であり、特にアジアで多く、本邦では年間約 2 万人が胆道癌のため亡くなっている。外科的切除が唯一の根治治療の手段となるが、早期発見が困難であるため、診断時に治癒切除困難なケースも多くみられる。切除不能の場合にはゲムシタビン、シスプラチンや 5-FU などの薬物を中心とした全身化学療法による治療が行われるが、生存期間中央値は 5〜12 か月とその治療効果は十分とはいえない現状である。分子標的薬に関してはエルロチニブやセツキシマブといった EGFR をターゲットとする薬剤に関する臨床試験が行われてきたが、優位な治療効果は得られていない。そのため現在ではゲムシタビンとシスプラチンを組み合わせた全身化学療法が標準治療となっているが、生存期間中央値は 5〜12 か月程度と、その治療効果は十分とは言えない現状である。生存期間中央値は 5〜12 か月程度と、その治療効果は十分とは言えない現状である。生存期間中央値は 5〜12 か月程度と、その治療効果は十分とは言えない現状である。生存期間中央値は 5〜12 か月程度と、その治療効果は十分とは言えない現状である。生存期間中央値は 5〜12 か月程度と、その治療効果は十分とは言えない現状である。生存期間中央値は 5〜12 か月程度と、その治療効果は十分とは言えない現状である。生存期間中央値は 5〜12 か月程度と、その治療効果は十分とは言えない現状である。5 年生存率が約 20%と未だ難治な癌として位置づけられており、有効な治療法の開発が望まれている。

近年、高速シークエンサーによる癌ゲノム解析により、多くの癌におけるドライバー遺伝子が明らかとなり、すでに肺癌、乳癌、大腸癌では、ゲノムバイオマーカーに基づいた個別化医療が進んでいる。現在のところ胆道癌については、ゲノム情報に基づく分子標的治療戦略が十分に確立している状況ではないが、2015 年に Nakamura らが世界で初めて大規模な包括的ゲノム解析を行い、胆道癌術後検体における 32 個のドライバー遺伝子を同定して報告したことを機に、近年、切除不能胆道癌に対するバイオマーカーに基づいた分子標的治療の臨床試験が国内外で行われている。

超音波内視鏡下穿刺吸引法（endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration:EUS-FNA)は、内視鏡先端に組み込まれた超音波装置により病変を描出して経消化管的に専用針による穿刺を行い、病変組織を回収する方法である。1992 年に Vilmann ら

によりはじめて報告されてから、その安全性と有用性が確認されたことにより 2010 年に本邦において保険収載され、現在では広く臨床現場で施行されている。胆道癌において EUS-FNA による検体を用いたゲノム解析はいまだ報告されていないが、外科的切除検体と比較して検体量が少ないため、解析が不十分となる可能性がある。EUS-FNA は高い安全性に加えて，通常の生検が困難な胆嚢癌や転移性リンパ節からも組織採取が可能であるため，同検査法によるゲノム解析が有効であれば、今後切除不能胆道癌において、バイオマーカーの同定および迅速に分子標的治療を行うことに際しての有用性が期待される。
したがって、EUS-FNA 検体を用いた胆道癌遺伝子解析の実用性と有用性を明らかにすることを目的として本研究を行った。
【対象と方法】2013 年 9 月～2018 年 4 月の間、当院で胆道腫瘍に対して EUS-FNA を施行し、病理学的に腺癌もしくは腺扁平上皮癌と診断された胆道癌症例を対象とした。EUS-FNA で採取された胆道癌組織検体は-30℃の状態で保管した。組織から抽出した DNA は適切な精製と濃度調整を行い、PCR にてターゲット領域の増幅をおこなうことで遺伝子ライブラリを作成し、高速シーケンサーを用いてホットスポットパネルによる癌関連遺伝子の解析を行った。またシーケンスノイズを少なくして解析の質を高め、体細胞変異と生殖細胞変異との区別を行うことを目的とし、同一個体の末梢血単核細胞に対しても同様に解析をおこなった。
【結果】胆道腫瘍原発および所属リンパ節に対し EUS-FNA を 79 例 79 病変に施行し、病理学的に腺癌もしくは腺扁平上皮癌と診断された 51 例のうち、腫瘍組織および末梢血が凍結保存されていた 21 例 21 病変の解析を行った。年齢中央値は 66.5 歳(範囲 39-85 歳)、胆嚢癌 12 例、肝内胆管癌 6 例、肝外胆管癌 3 例。採取組織の DNA は精製を行うことで全例で良好に抽出され、遺伝子解析が可能であった。平均リード長は 119bp、平均リード深度は 2855x であった。全体で 39 遺伝子のうち 80 の single nucleotide variant (SNV) および 8 の INDEL (挿入欠失) を同定し、これらの解析の結果 14 遺伝子のうち 28 の病原性変異を同定した(21 例中 20 例(95.2%))。内訳は胆嚢癌が 11 遺伝子で TP53、KRAS、CDKN2A、NRAS、PIK3CA、FBXW7、HNF1A、RB1、ERBB2、CTNNB1、SMARCB1、肝内胆管癌は 6 遺伝子で KRAS、TP53、BRAF、PIK3CA、IDH1、SMARCB1、肝外胆管癌では 3 遺伝子で TP53、SMAD4、PIK3CA であった。分子標的治療の対象となりうる変異 (BRAF、NRAS、PIK3CA、IDH1)は 21 例中 7 例でみられた。
【考察】EUS-FNA で得られる微小な組織からでも、高重複で塩基配列解析をおこなうことが可能であった。その要因として、解析対象となるライブラリの作成までのステップ、すなわち EUS-FNA により採取した組織の迅速な評価、適切な保存、抽出した DNA の精製といった過程が重要であると考えられた。胆嚢癌の 1 例で病原性変異が認められなかったが、病理学的診断に使用した部位の HE 染色像は多量の腫瘍細胞を含んでおり、腫瘍細胞を含んでいなかった可能性は考え難いため、病原性変異をもっていなかったか、もしくは変異がホットスポット外であったことが理由として考えられた。胆嚢癌や肝内胆管癌といった部位の胆道癌では、一般的な組織採取法である内視鏡的経乳頭生検で腫瘍組織を採取できないことがしばしばあるが、安全で十分な組織採取が可能な EUS-FNA という手技は、胆道癌症例の遺伝子解析において有用であると考えられた。一方で、EUS-FNA は穿刺ルートに腫瘍の播種を引き起こす可能性が膵癌において報告されており、胆道癌においても十分留意し、検査対象を決定する必要があると思われた。
【結語】EUS-FNA で採取した微小な胆道癌組織に対してでも、質の高いターゲットシーケンスを行うことは可能であり、本研究に用いた手法は、分子標的治療の選択に際して臨床応用が可能である。