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 |
| 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 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k14092 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/77927 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Koji_Hirata.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文

## 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）

2020 年 3 月

北海道大学

平田　幸司

# 学位論文

## 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）

2020 年 3 月

北海道大学

平田　幸司

# 目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁
要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29 頁
結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36 頁

# 発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Koji Hirata, Masaki Kuwatani, Goki Suda, Marin Ishikawa, Ryo Sugiura, Shin Kato, Kazumichi Kawakubo, Naoya, Sakamoto
A novel approach for the genetic analysis of biliary tract cancer specimens obtained through endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration using targeted amplicon sequencing
Clinical and Translational Gastroenterology: 2019;10:e00022

本研究の一部は以下の学会に発表した。
Koji Hirata, Masaki Kuwatani, Goki Suda, Marin Ishikawa, Ryo Sugiura, Shin Kato, Kazumichi Kawakubo, Naoya, Sakamoto
A novel approach for the genetic analysis of biliary tract cancer specimens obtained through endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration using next-generation sequencing
Digestive Disease Week (DDW) 2019
2019 年 5 月 18-21 日・サンディエゴ，アメリカ

平田　幸司，桒谷　将城，坂本　直哉
超音波内視鏡下穿刺生検検体による胆道癌遺伝子解析
第 105 回日本消化器病学会総会　シンポジウム
2019 年 5 月 9-11 日・金沢，日本

# 要　旨

【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、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。高速シーケンサーを用いて、EUS-FNA 検体および同一個体の末梢血単核細胞から抽出した DNA の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。

【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。

【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。

# 略　語　表

本文中および図表に記載した略語は以下の通りである。

AC: adenocarcinoma
ASC: adenosquamous carcinoma
BTC: Biliary tract cancer
EHCC: Extrahepatic cholangiocarcinoma
ERCP: Endoscopic retrograde cholangiopancreatography
ETB: Endoscopic transpapillary biopsy
EUS-FNA: Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration
F: Female
GBC: Gallbladder cancer
HE: Hematoxylin and eosin
IHCC: Intrahepatic cholangiocarcinoma
INDEL: Insertion/ deletion
M: Male
ROSE: Rapid on-site evaluation
SNV: Single nucleotide variant
TAS: Targeted amplicon sequencing
UICC: Union for International Cancer Control

# 緒　言

胆道癌は胆道の上皮から発生する悪性腫瘍であり、その発症部位により肝内胆管癌、肝外胆管癌、胆嚢癌に分類される。本邦では膵癌についで予後不良の消化器癌であり、発生頻度は全世界で年々増加傾向である。胆管癌はアジアで多く、胆嚢癌は南米で多いという特徴をもつが、日本は比較的発症頻度の高い国として位置づけられており（表 1、2)、本邦では年間約 2 万人が胆道癌のため亡くなっている（de Groen PC et al., 1999; Shaib Y et al., 2004; Torre LA et al., 2015)。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、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全身化学療法が標準治療となる。これまで 5-FU、エトポシド、ロイコボリン、オキサリプラチン、ゲムシタビン、シスプラチンなどを組み合わせた、様々な臨床試験が行われてきたが（Ducreux, M et al., 2005; Rao, S et al., 2005; Ciuleanu et al., 2007; Sharma, A et al., 2010; Hezel AF et al., 2008; Valle J et al., 2010）（表 3)、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。分子標的治療に関しては、エルロチニブなどの EGFR をターゲットとする薬剤に関する臨床試験などが行われてきたが（Lee et al., 2012）（表 3)、いずれも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（Valle J et al., 2010; Okusaka T et al., 2010)、生存期間中央値は 11.7 ヶ月と、その治療効果は十分とはいえない。また 2 次治療としてのレジメンがなく、現在有効な治療法の開発が望まれている。

表 1. 胆管癌の地域別の発症頻度（Khan SA et al., 2019）

| 順位 | 地域 | 人口 10 万人に対する年齢調整罹患率 |
|---|---|---|
| 1 | タイ　北東部 | 85 |
| 2 | タイ　中央部 | 14.5 |
| 3 | 韓国 | 8.8 |
| 4 | 中国 | 7.6 |
| 5 | タイ　南部 | 5.7 |
| 6 | 台湾 | 4.7 |
| 7 | 日本 | 3.5 |
| 8 | イタリア | 3.4 |
| 9 | ドイツ | 3.0 |
| 10 | オーストリア | 2.7 |
| 11 | 英国 | 2.2 |
| 12 | アメリカ合衆国 | 1.6 |

表 2. 胆嚢癌の地域別の発症頻度（World cancer reserch fund, 2018）

| 順位 | 地域 | 人口 10 万人に対する年齢調整罹患率 |
|---|---|---|
| 1 | ボリビア | 14.0 |
| 2 | チリ | 9.3 |
| 3 | タイ | 7.4 |
| 4 | 韓国 | 6.8 |
| 5 | ネパール | 5.7 |
| 6 | バングラディッシュ | 4.7 |
| 7 | ペルー | 3.5 |
| 8 | 日本 | 3.4 |
| 9 | スロバキア | 3.0 |
| 10 | ニューカレドニア | 2.7 |
| 10 | レユニオン | 2.2 |
| 12 | アルジェリア | 1.6 |

**表 3　胆道癌に対する過去の臨床試験**

| 治療 | 症例数 | 奏功率 | 生存期間中央値 | P 値 | 著者 | 発行年 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5-FU | 29 | 7 | 5 | NA | Ducreux | 2005 |
| 5-FU + FA + CDDP | 29 | 19 | 8 | | | |
| 5-FU + FA + VP-16 | 27 | 15 | 12 | 0.2 | Rao | 2005 |
| 5-FU + EPI + CDDP | 27 | 19 | 9 | | | |
| OSI-7904L | 11 | 0 | 5.9 | NA | Ciuleanu | 2007 |
| 5-FU + LV | 11 | 9 | 7.4 | | | |
| GEM | 204 | 16 | 8.1 | <0.001 | Valle | 2010 |
| **GEM + CDDP** | 206 | 26 | **11.7** | | | |
| BSC | 27 | 0 | 4.5 | 0.039 | Sharma | 2010 |
| 5-FU + LV | 28 | 14 | 4.6 | | | |
| GEM + l-OHP | 26 | 31 | 9.5 | | | |
| GEM + l-OHP | 133 | 18 | 9.5 | 0.611 | Lee | 2012 |
| GEM + l- OHP + erlotinib | 135 | 34 | 9.5 | | | |

近年、高速シーケ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 らが世界で初めて胆道癌の手術検体を用いた大規模な包括的ゲノム解析を行い、32 個のドライバー遺伝子を同定した(Nakamura et al., 2015) (図 1)。また部位ごとに胆道癌の遺伝子変異がことなることや(Nakamura et al., 2015) (図 2)、多様ではあるもののその約 40%が治療のターゲットとなりうることも報告されており、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。実例としては fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) fusions をターゲットとして pan-FGFR kinase inhibitor を投与する臨床試験（Zhao D et al., 2017; Milind J et al., 2018）や、ほかにも BRAF、MEK や IDH1/2 をターゲットとした臨床試験（NCT02034110, NCT01242605, NCT02989857, NCT02273739, NCT02428855）がおこなわれている。

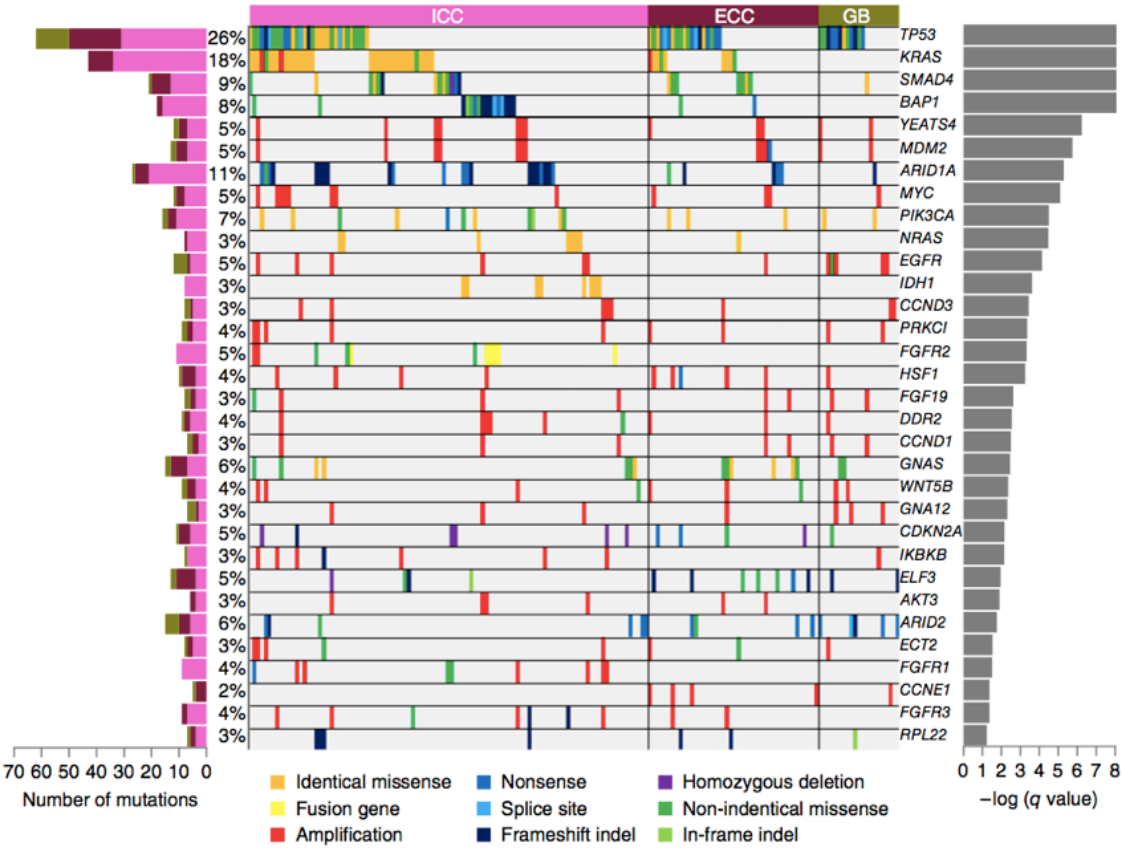



図 1. 胆道癌におけるドライバー遺伝子の種類と頻度

（Nakamura H, Arai Y, Tomoki Y et al. Genetic spectra of bilially tract cancer. Nat Genet. 2015; 47:1003-1010 ） より引用． ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; ECC, extrahepatic cholangiocarcinoma; GB, gallbladder cancer

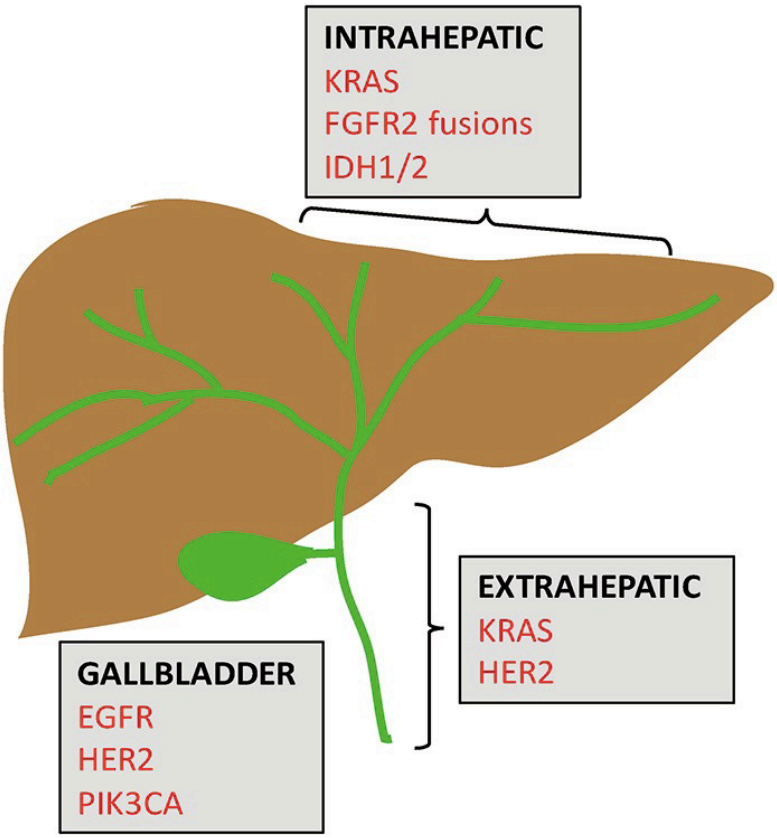



**図 2. 胆道癌におけるドライバー遺伝子の部位ごとの頻度差**
**（Nakamura H, Arai Y, Tomoki Y et al. Genetic spectra of bilially tract cancer. Nat Genet. 2015; 47:1003-1010）より引用**

癌遺伝子解析をおこなううえで、可能な限り多くの腫瘍組織を採取する必要がある。従来、胆道腫瘍に対する組織採取の方法としては、手術、経皮的針生検や内視鏡的経乳頭胆道生検（ETB）がおこなわれてきた。しかし手術は組織採取を目的とする限りでは侵襲が大きいこと、経皮的針生検は出血、胆汁性腹膜炎や他臓器損傷がおこるリスクが高いことから、現在あまり行われていない。ETB は、内視鏡的胆道造影下に施行する手技であり（図 3）、内視鏡的胆道ドレナージを行う際に同時に施行することができることから、現在多くの施設で施行されている手技である。一方で、ETB は肝外胆管狭窄を伴う胆道癌のみしか組織採取ができないこと、胆嚢癌に対する診断能が低いことや、処置に伴い 1.0～13.3%の頻度で膵炎を発症することが言われており（Freeman et al., 1996; Loperfido et al., 1998; Li et al., 2007）、適応やリスクを常に留意すべき検査である（表 4）。

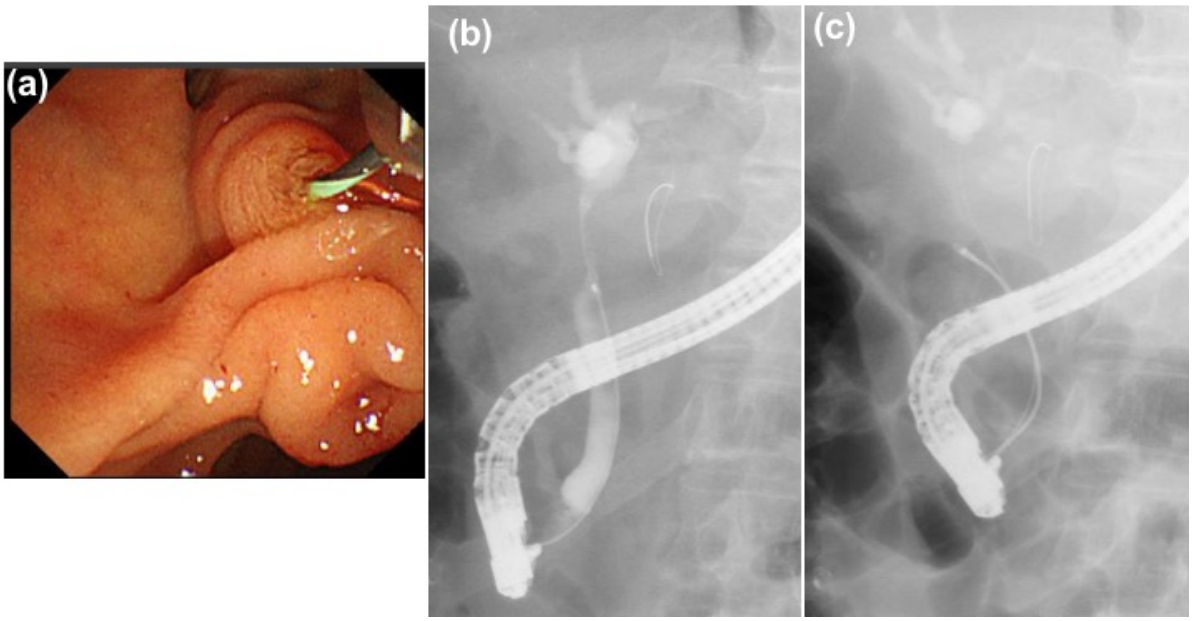



**図 3. 胆管癌の症例**

**(a) 内視鏡的に十二指腸乳頭部を確認し、胆管挿管をおこなっている所見**

**(b) 内視鏡的胆道造影をおこない、胆管の狭窄部を確認している所見**

**(c) 胆管の狭窄部に対して生検鉗子で生検を施行している所見**

**表 4　胆道癌に対する組織採取方法とその特徴**

| | 手術 | 経皮的生検 | ETB | **EUS-FNA** |
|---|---|---|---|---|
| 長所 | ・腫瘍組織を多量に採取可能 | ・簡便 | ・広く普及している<br>・胆道ドレナージと同時に検査が可能 | ・合併症が少ない<br>・感度が高い<br>・腫瘍部の外からアプローチ可能 |
| 短所 | ・侵襲が大きい | ・出血、胆汁性腹膜炎、他臓器損傷のリスクが高い | ・局在により採取不可<br>・胆嚢癌への診断能が低い<br>・膵炎のリスクが高い | ・採取される組織量が少ない<br>・熟練した技術が必要 |

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を用いて穿刺を行い、病変組織を回収する方法である（図 4)。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の高さ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。膵腫瘍や腹腔内腫瘍の組織採取に用いられることが多いが、胆道癌においてもその有用性は報告されている。起こり得る合併症は出血、感染、膵炎が挙げられるが、その頻度は 2%以下と安全性も確認されている手技である（Ghassan M et al., 2014; Hammound et al., 2014)。

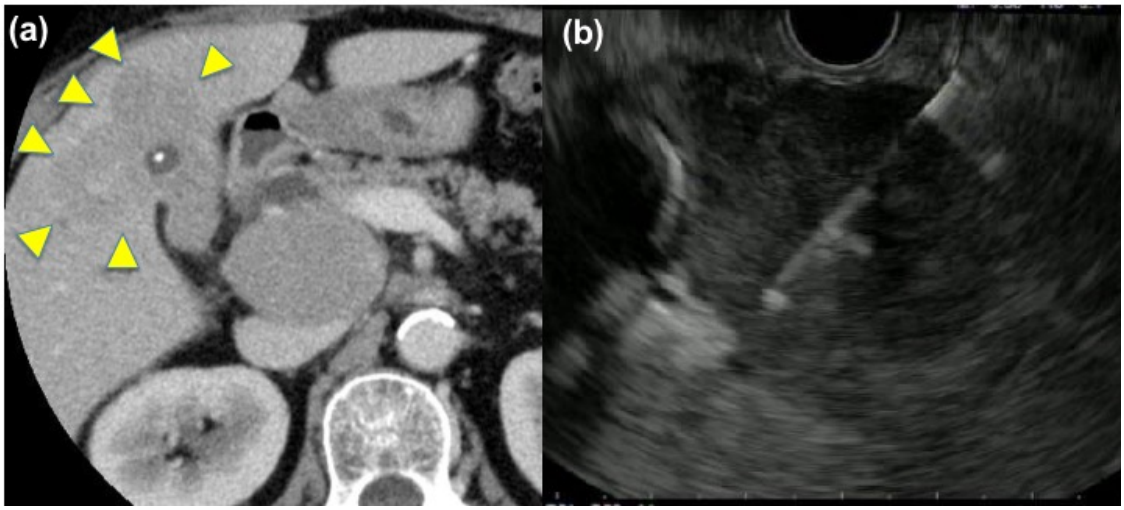



**図 4. 原発を穿刺した胆嚢癌の症例**
**（a）腹部造影 CT：肝に浸潤をきたしている胆嚢腫瘍の所見**
**（b）超音波内視鏡：胆嚢腫瘍部を低エコー腫瘤として描出し、専用穿刺針で腫瘍を穿刺している所見**

EUS-FNA により採取した組織を用いたゲノム解析は、膵臓、直腸癌、肺癌などの領域においては報告があるものの（Gleeson FC et al., 2015, 2016; Kameta E et al., 2016, Reynolds JP et al., 2017)、胆道癌ではまだ報告がない。EUS-FNA により採取した組織量は、手術検体と比較すると非常に少ないため、十分な解析をおこなうことができない可能性がある。EUS-FNA は内視鏡的経乳頭生検が困難な

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（図 5)、同検査法によるゲノム解析が可能であれば、切除不能進行胆道癌に対する分子標的治療における治療前精査として、EUS-FNA を用いることができる。

したがって、本研究は胆道癌の 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た。

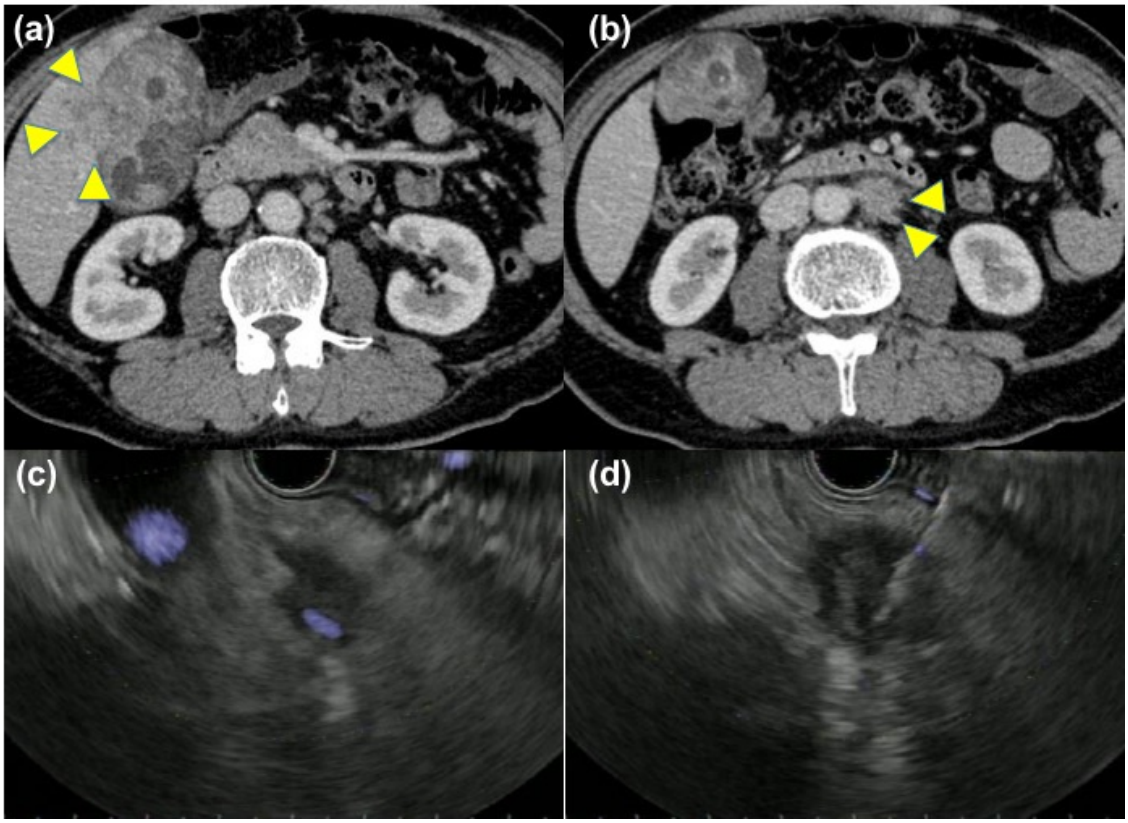



**図 5. 転移性腫瘍を穿刺した胆嚢癌の症例**

**(a) 腹部造影 CT：肝に浸潤をきたしている胆嚢腫瘍の所見**

**(b) 腹部造影 CT：傍大動脈リンパ節腫大の所見**

**(c) 超音波内視鏡：9 時方向に大動脈、6 時方向にリンパ節を描出している所見**

**(d) 超音波内視鏡：リンパ節に対し専用穿刺針で腫瘍を穿刺している所見**

# 方法

## 1. 研究の種類・デザイン

研究対象者から取得される既存試料を用いた後向きコホート観察研究

## 2. 対象となる患者

### （1）対象者

2012 年 4 月 1 日から 2017 年 3 月 31 日の間に北海道大学消化器内科を受診した胆道癌患者のうち、EUS-FNA による診療を行った者を対象とした。

### （2）選択基準

下記の①～④のすべてを満たすものを対象とした。

①胆道腫瘍が疑われ内視鏡的逆行性胆管造影および経乳頭的胆管生検を行った者のうち、病理学的診断が得られず、胆管、胆嚢およびリンパ節いずれかに対し EUS-FNA をおこなった者

②病理学的に腺癌もしくは腺扁平上皮癌と診断された者

③上記②のうち、解析可能な検体が保存されている者

④研究への参加について自由意思による同意が得られた者、もしくは研究の参加について拒否しない者

### （3）除外基準

下記の①～③のいずれかが該当したものは除外とした。

①北海道大学消化器内科を受診したが、当院で EUS-FNA を行わなかった胆道癌の者

②手術や全身化学療法による治療歴がある者

③その他，研究責任者が研究対象者として不適当と判断した者

## 3. 利用する試料

【既に保管されている試料】

FNA で採取された胆道癌組織検体および血液 7ml から採取した末梢血単核細胞（いずれも包括同意取得後に採取され、消化器内科研究室に-30℃の状態で保管されている試料）を利用した。

【調査項目】

対象者基本情報として、年齢、性別、診断名、治療歴について、研究対象者の診

療録から情報を入手し利用した。また血液生化学的検査（CEA、CA19-9)、画像検査結果（CT、MRI、US、EUS)、および病理検査結果（組織型）についても同様に研究対象者の診療録から情報を入手し利用した。さらに、北海道大学病院病理部に保管されている hematoxylin and eosin 染色がされている標本も利用した。

**4. 検討項目**

検討項目は下記の 4 項目とした。

・genomic DNA の質、量（濃度）および遺伝子解析の適格性
・遺伝子解析の成功率
・病原性遺伝子変異の検出率
・胆道癌の部位と遺伝子変異との関連性

**5. EUS-FNA で使用する機器**

コンベックス型超音波内視鏡（GF-UCT260, GF-UCT240; Olympus Medical Systems 社, Tokyo, Japan)、22 gauge もしくは 25 gauge の EUS-FNA 専用穿刺針（EXPECT™ もしくは Acquire™; Boston Scientific 社, Boston, US）を使用した。超音波観測装置は PROSOUND F75TM (Hitachi ALOKA, Tokyo, Japan)を使用した。

**6. EUS-FNA の手技**

超音波内視鏡により胃内もしくは十二指腸内腔から対象病変を描出し、脈管を介さない安全な経消化管ルートで穿刺針を病変内へ先進させた。穿刺後に穿刺針内の金属製スタイレットを抜去し、穿刺針内に 10ml のシリンジで陰圧をかけた状態で、穿刺針を病変内で前後にストロークさせた。ストローク回数は 10 回以上とし、ストローク長は可能な限り長くとるように施行した。

**7. 迅速細胞診検査（Rapid on-site evaluation: ROSE）**

EUS-FNA で得られた検体のうち、白色部に腫瘍組織が含まれているが、白色部には腫瘍組織以外にも正常組織、壊死組織、繊維性組織、粘液などがしばしば混入する。白色部に解析対象である腫瘍組織が十分量採取されていること、腫瘍組織以外の混入がないことを確認するために組織採取直後に迅速細胞診

（ROSE）を行った。ROSE は経験豊富な細胞診断士が、Romanowsky 手技（Diff-Quik stain; Kokusai Shiyaku, Kobe, Japan）により施行した。ROSE で腫瘍組織が含まれていると判断された白色部と連続した部位のうち、0.5-1.0 $mm^3$ 程度を迅速に切り分けて保存液（RNAlater; Life Technologies, Carlsbad, CA）へ浸し、摂氏 4℃で数日保管したのち、摂氏-30℃で保存した。連続する残りの白色部は、病理専門医により細胞学的および組織学的に評価をおこなった。

**8. 解析前の検体処理**

解析する腫瘍組織および末梢血単核細胞の DNA は、QIAGEN 社の AllPrep DNA/RNA mini kit（Qiagen, Valencia, CA）を用い、同社のプロトコールに準じて抽出した。抽出した DNA は、AMPure XP（BECKMAN COULTER）および 70%エタノールにより精製をおこなった。DNA の質および量（濃度）の評価は NanoDrop（Life Technologies）、Qubit dsDNA HS Assay Kit（Life Technologies）、StepOnePlus qPCR system with TaqMan assays（Life Technologies）によりおこなった。DNA 濃度は 2.0ng/ml 以上が望ましく（Life Technologies）、2.0 ng/mL 未満であった場合は、Nucleospin Genomic DNA Clean-up XP protocol（MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann, Germany）により濃縮をおこなった。

抽出した 10ng の DNA を使用し、既に網羅的解析によって同定されている胆道癌ドライバー遺伝子（Nakamura et al., 2015）を含む、50 の癌関連遺伝子（KRAS、NRAS、TP53、BRAF、FGFR1、FGFR2、FGFR3、IDH1、IDH2、SMAD4、EGFR、PIK3CA、CDKN2A、HRAS、ATM、RET、PTEN、PTPN11、HNF1A、FLT3、RB1、AKT1、CDH1、ERBB2、ERBB4、STK11、JAK2、JAK3、ALK、SRC、GNAS、SMARCB1、VHL、MLH1、CTNNB1、PDGFRA、KIT、KDR、FBXW7、APC、CSF1R、NPM1、MPL、MET、SMO、ABL1、NOTCH1、EZH2、GNA11、GNAQ）のうち 2790 の COSMIC alteration をターゲットとした Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies）に合わせて、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作成をおこなった。ライブラリの評価は Agilent 2,100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA）によりおこなった。

## 9. 解析

100 pmol/L の遺伝子ライブラリを Ion OneTouch 2 instrument（Life Technologies）により増幅し、Ion personal genome machine system（Life Technologies）でシーケンス解析をおこなった。解析結果は、Human genome built 19 をリファレンスとして、Ion Torrent Suite v5.6 software（Life Technologies）により変異検出およびアノテーションをおこなった。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ため（Saunders et al., 2012）、腫瘍部と末梢血単核細胞それぞれの遺伝子ライブラリをシーケンスし、Ion Torrent Suite v5.6 software における AmpliSeq tumor–normal pair workflow で体細胞変異の検出をおこなった。有意な変異解析結果のみを抽出するため、synonymous、intron、reference allele といった塩基配列や、2%以下（Life Technologies 推奨）の変異頻度を示すものについては除外するようフィルターを設定した。

## 10. 倫理的遵守事項

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2013 年 10 月修正）」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守して実施された。またあらかじめ臨床研究実施計画書と患者説明同意文書を北海道大学病院の長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会の承認及び研究機関の長の許可を得て行われた（自主臨床研究番号: 自 017-0072）。

# 結果

1. 患者背景

内視鏡的経乳頭胆道生検が施行された 689 例のうち、確定診断がえられなかった 79 例に EUS-FNA を行った。悪性腫瘍と診断された 51 例のうち、FNA 検体である腫瘍組織および末梢血単核細胞がともに保存されている 21 例を解析対象とした（図 6)。

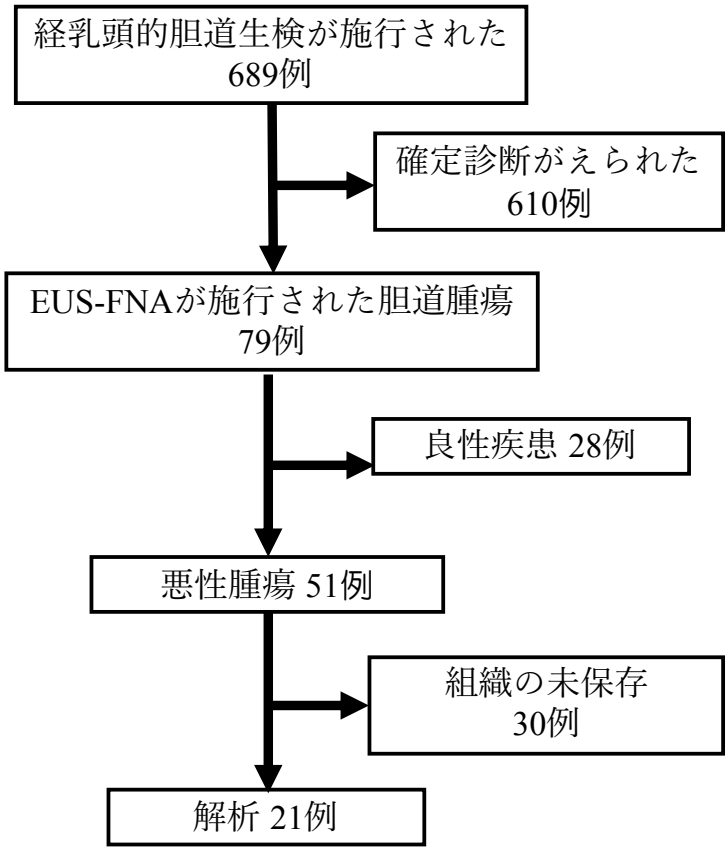



**図 6. 本研究におけるケースコホートデザイン**

年齢中央値は 66.5 歳（範囲 39-85 歳)、男性 15 例、女性 6 例。疾患は胆嚢癌 12 例（57.1%)、肝内胆管癌 6 例（28.6%)、肝外胆管癌 3 例（14.3%）であった。胆嚢癌 12 例のうち、原発を穿刺したものは 10 例、リンパ節を穿刺したものは 2 例、肝内胆管癌 6 例のうち、原発を穿刺したものは 5 例、リンパ節を穿刺したものは 1 例、肝外胆管癌のうち、原発を穿刺したものは 1 例、リンパ節

を穿刺したものは 2 例であった。病理学的診断は、胆嚢癌 2 例で腺扁平上皮癌であったが、他は全例腺癌であった。臨床病期は 17 例が stage Ⅳ、2 例が stage Ⅲ、2 例が stage II（Union for International Cancer Control（UICC）clinical staging system 第 8 版）であった（表 5)。Stage II の 2 例は、いずれも肝外胆管癌の症例で、それぞれリンパ節、原発を穿刺した。出血・感染・穿孔・胆汁漏出などの EUS-FNA 手技関連の合併症は、本研究の適格症例 21 例においては全くみられなかった。外科的治癒切除を行った症例は 2 例であった。除外症例 30 例との患者背景の比較において、有意な差を示す項目はみられなかった（表 5)。

**表 5. 臨床・病理学的患者背景**
**GBC: 胆嚢癌　IHCC: 肝内胆管癌　EHCC: 肝外胆管癌**
**UICC: Union for International Cancer Control**

| 臨床・病理学的特徴 | 適格症例（n=21） | 除外症例（n=30） |
|---|---|---|
| 年齢中央値（範囲、才） | 66.0 (39–85) | 71.0 (33-88) |
| 性別 | | |
| 男性（%） | 15 (71.4) | 17 (56.7) |
| 女性（%） | 6 (28.6) | 13 (43.3) |
| 病理診断 | | |
| 腺癌（%） | 19 (90.5) | 30 (100.0) |
| 腺扁平上皮癌（%） | 2 (9.5) | 0 (0.0) |
| 腫瘍の部位 | | |
| GB（%） | 12 (57.1) | 20 (66.7) |
| IHCC（%） | 6 (28.6) | 7 (23.3) |
| EHCC（%） | 3 (14.3) | 3 (10.0) |

| | | |
|---|---|---|
| EUS-FNAの対象部位 | | |
| 原発: GBC / IHCC / EHCC /合計（%） | 10 / 1 / 1 / 12 (57.1) | 13 / 2 / 3 / 18 (60.0) |
| リンパ節: GBC / IHCC / EHCC /合計（%） | 2 / 5 / 2 / 9 (42.9) | 7 / 5 / 0 / (40.0) |
| 初診時の臨床病期（UICC） | | |
| I（%） | 0 | 0 |
| II（%） | 2 (9.5) | 4 (13.3) |
| III（%） | 2 (9.5) | 9 (30.0) |
| IV（%） | 17 (81.0) | 17 (56.7) |
| EUS-FNA施行時の腫瘍マーカー | | |
| CA19-9 中央値（範囲、U/ml） | 221.0 (1.0–8512.5) | 162.4 (1.0-15136.1) |
| CEA 中央値（範囲、ng/ml) ng/ml | 7.9 (1.4–168.0) | 5.8 (1.8-254.8) |

2. genomic DNA およびライブラリ

腫瘍部からの 21 検体中 17 検体で 2.0 ng/ml 以上の DNA 濃度が、末梢血単核細胞から全検体で 2.0 ng/ml 以上の DNA 濃度がえられた。DNA 濃度が 2.0 ng/ml 未満であった 4 検体は、Nucleospin Genomic DNA Clean-up XP protocol (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG）を使用し、2.0 ng/ml 以上の DNA 濃度となるように調整した（表 6)。使用した穿刺針径は 21 例中 19 例で 22 gauge、2 例で 25 gauge であり、穿刺針径と得られた DNA 濃度との関連はみられなかった。抽出したすべての DNA は、AMPure XP および 70%エタノールにより精製をおこない、質の改善が得られた（図 7)。すべての作成した遺伝子ライブラリは 100 pmol/L 以上であり、コンタミネーションもみられなかった。処理をおこなったすべての組織において、DNA の断片化などによる

質の低下はみられず、DNA 抽出および遺伝子ライブラリ作成は問題なくおこなわれた。

**表 6. 抽出した genomic DNA とライブラリの濃度**

| | 原発 | gDNA 濃度 腫瘍(ng/μL) | gDNA 濃度 血球(ng/μL) | ライブラリ濃度 腫瘍(pM) | ライブラリ濃度 血球(pM) | UICC stage | 穿刺針径 (gauge) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | GBC | 1.2 → 7.2 | 60.4 | 2611 | 1770 | IV | 22 |
| 2 | GBC | 1.3 → 4.8 | 88.4 | 2278 | 33967 | IV | 22 |
| 3 | GBC | 1.5 → 6.2 | 44.0 | 2251 | 25167 | IV | 22 |
| 4 | GBC | 2.6 | 14.7 | 2268 | 6435 | IV | 22 |
| 5 | GBC | 3.9 | 45.4 | 3073 | 7856 | IV | 22 |
| 6 | GBC | 5.8 | 47.0 | 3107 | 8149 | IV | 22 |
| 7 | GBC | 3.4 | 10.2 | 2387 | 5868 | IV | 25 |
| 8 | GBC | 7.4 | 36.2 | 2611 | 5535 | IV | 22 |
| 9 | GBC | 8.6 | 22.4 | 2293 | 2939 | III | 22 |
| 10 | GBC | 16.5 | 54.0 | 3239 | 6313 | III | 25 |
| 11 | GBC | 8.2 | 36.8 | 12375 | 5843 | IV | 22 |
| 12 | GBC | 7.7 | 332.0 | 16403 | 7582 | IV | 22 |
| 13 | IHCC | 2.8 | 58.4 | 10854 | 16657 | IV | 22 |
| 14 | IHCC | 3.6 | 2.7 | 2616 | 41980 | IV | 22 |
| 15 | IHCC | 4.2 | 8.2 | 2278 | 10486 | IV | 22 |
| 16 | IHCC | 7.0 | 16.2 | 2593 | 2357 | IV | 22 |
| 17 | IHCC | 7.7 | 15.8 | 2093 | 2861 | IV | 22 |
| 18 | IHCC | 12.2 | 43.6 | 2941 | 869 | IV | 22 |
| 19 | EHCC | 1.4 to 5.9 | 34.8 | 3238 | 3930 | IV | 22 |
| 20 | EHCC | 4.1 | 2.1 | 11468 | 6589 | II | 22 |
| 21 | EHCC | 18.6 | 81.0 | 15888 | 9900 | II | 22 |

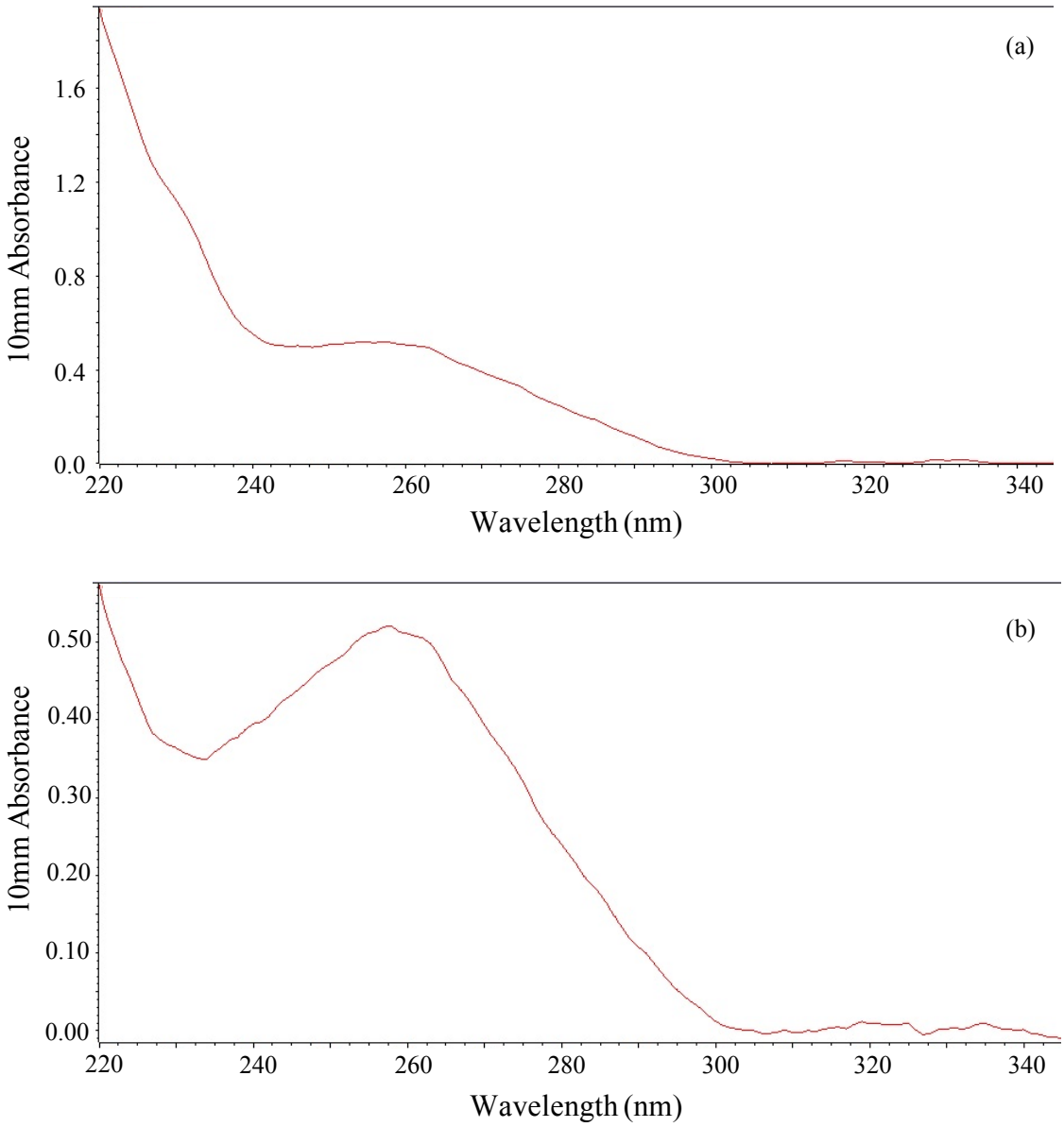



図 7. 抽出した DNA に対する NanoDrop™ system による評価
(a): 精製前の吸光度のグラフ。
230nm でみられる吸光度の上昇はグアジニン塩酸塩の混入を示す。
(b): 精製後の吸光度のグラフ。
260nm に吸光度のピークをもち、DNA 以外のコンタミネーションがある程度除去されたことを示す。

3. 遺伝子変異のプロファイル

Cancer Hotspot Panel v2 を用いた解析で、半導体チップの解析割合は 72%（範囲: 67-77%）、平均リード数は 5,595,584、平均リード長は 119bp であった。シーケンスのリード深度は平均で 2855 回（範囲 1617-7467 回）であった。ターゲットシーケンスにより、39 遺伝子のうち 80 の SNV と 8 の INDEL を検出した。そのうち、Ion Torrent Suite v5.6 software (Life Technologies）の AmpliSeq tumor–normal pair workflow による解析で、14 遺伝子の 28 病原性変異を検出した。病原性変異が検出されたのは 21 症例中 20 例（95.2%）で、1 例につき中央値 1 変異（範囲 1-5 変異）が検出された（表 7)。病原性変異の内訳は、TP53（12 例; 57.1%)、KRAS（8 例; 38.1%)、PIK3CA（3 例; 14.3%)、SMAD4（2 例; 9.5%)、CDKN2A（2 例; 9.5%)、BRAF（2 例; 9.5%)、SMARCB1（1 例; 4.8%)、NRAS（1 例; 4.8%)、CTNNB1（1 例; 4.8%)、IDH1（1 例; 4.8%)、FBXW7（1 例; 4.8%)、HNF1A（1 例; 4.8%)、RB1（1 例; 4.8%)、ERBB2（1 例; 4.8%）であった（図 8)。また EUS-FNA で得られた組織が少量であったケースでも、病原性変異は検出可能であった。(図 9)

**表 7　臨床病理学的所見と病原性遺伝子変異の詳細**

| | 年齢 | 性別 | 原発 | 穿刺部位 | 病理所見 | 病原性変異 | Locus | Variant type | 変異頻度 % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 73 | M | GBC | 原発 | AC | FBXW7 | chr4:153249384 | SNV | 32.5 (645/1998) |
| | | | | | | KRAS | chr12:25398280 | SNV | 43.7 (865/1978) |
| | | | | | | HNF1A | chr12:121431427 | SNV | 3.9 (59/1530) |
| 2 | 39 | M | GBC | 原発 | AC | TP53 | chr17:7579388 | SNV | 35.2 (539/1530) |
| 3 | 65 | M | GBC | 原発 | AC | TP53 | chr17:7578442 | SNV | 8.6 (121/1315) |
| | | | | | | KRAS | chr12:25398280 | SNV | 11.0 (220/1950) |
| | | | | | | TP53 | chr17:7577546 | SNV | 4.8 (59/1220) |
| 4 | 78 | M | GBC | 原発 | AC | NRAS | chr1:115256528 | SNV | 42.2 (843/1999) |
| 5 | 63 | M | GBC | 原発 | ASC | None | None | None | None |
| 6 | 54 | F | GBC | 原発 | ASC | PIK3CA | chr3:178936091 | SNV | 4.5 (90/1992) |
| | | | | | | CDKN2A | chr9:21971156 | SNV | 9.4 (188/1999) |
| | | | | | | RB1 | chr13:48941657 | SNV | 11.5 (229/2000) |
| | | | | | | TP53 | chr17:7578214 | INDEL | 8.2 (162/1974) |
| | | | | | | SMARCB1 | chr22:24134064 | SNV | 4.1 (48/1162) |
| 7 | 66 | M | GBC | 原発 | AC | KRAS | chr12:25398280 | SNV | 3.8 (76/1991) |
| | | | | | | TP53 | chr17:7577104 | SNV | 7.8 (155/1996) |
| 8 | 60 | F | GBC | リンパ節 | AC | TP53 | chr17:7574018 | SNV | 65.5 (1309/2000) |
| 9 | 72 | F | GBC | 原発 | AC | TP53 | chr17:7578256 | SNV | 21.3 (419/1972) |
| 10 | 73 | M | GBC | 原発 | AC | CDKN2A | chr9:21971145 | SNV | 8.4 (148/1768) |
| | | | | | | KRAS | chr12:25398280 | SNV | 2.6 (52/1996) |
| | | | | | | TP53 | chr17:7578214 | SNV | 39.2 (775/1975) |
| 11 | 72 | M | GBC | リンパ節 | AC | CTNNB1 | chr3:41266137 | SNV | 13.2 (191/1448) |
| | | | | | | KRAS | chr12:25398280 | SNV | 7.4 (125/1679) |
| | | | | | | TP53 | chr17:7578256 | SNV | 42.0 (544/1294) |
| 12 | 69 | F | GBC | 原発 | AC | ERBB2 | chr17:37880261 | SNV | 30.7 (613/2000) |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | 80 | M | IHCC | リンパ節 | AC | BRAF | chr7:140481397 | SNV | 2.5 (49/2000) |
| 14 | 66 | M | IHCC | 原発 | AC | KRAS | chr12:25398280 | SNV | 7.0 (140/1993) |
| 15 | 63 | M | IHCC | リンパ節 | AC | KRAS | chr12:25398280 | SNV | 45.6 (907/1987) |
| | | | | | | PIK3CA | chr3:178936091 | SNV | 33.1 (658/1985) |
| 16 | 85 | M | IHCC | リンパ節 | AC | BRAF | chr7:140481411 | SNV | 10.5 (209/2000) |
| | | | | | | TP53 | chr17:7578214 | INDEL | 12.3 (/1978) |
| 17 | 59 | F | IHCC | リンパ節 | AC | IDH1 | chr2:209113113 | SNV | 26.7 (534/2000) |
| 18 | 36 | M | IHCC | リンパ節 | AC | KRAS | chr12:25380275 | SNV | 4.6 (92/1997) |
| | | | | | | TP53 | chr17:7578526 | SNV | 3.8 (33/868) |
| | | | | | | SMARCB1 | chr22:24134064 | SNV | 3.8 (47/1238) |
| 19 | 51 | F | EHCC | リンパ節 | AC | TP53 | chr17:7578368 | SNV | 78.6 (792/1008) |
| | | | | | | SMAD4 | chr18:48591888 | SNV | 86.5 (1321/1527) |
| 20 | 72 | M | EHCC | 原発 | AC | PIK3CA | chr3:178952074 | SNV | 5.95 (119/2000) |
| 21 | 70 | M | EHCC | リンパ節 | AC | TP53 | chr17:7577114 | SNV | 12.6 (252/2000) |
| | | | | | | SMAD4 | chr18:48591931 | SNV | 6.9 (137/2000) |




図 8. 病原性遺伝子変異のプロファイル

G: 胆嚢癌、I: 肝内胆管癌、E: 肝外胆管癌

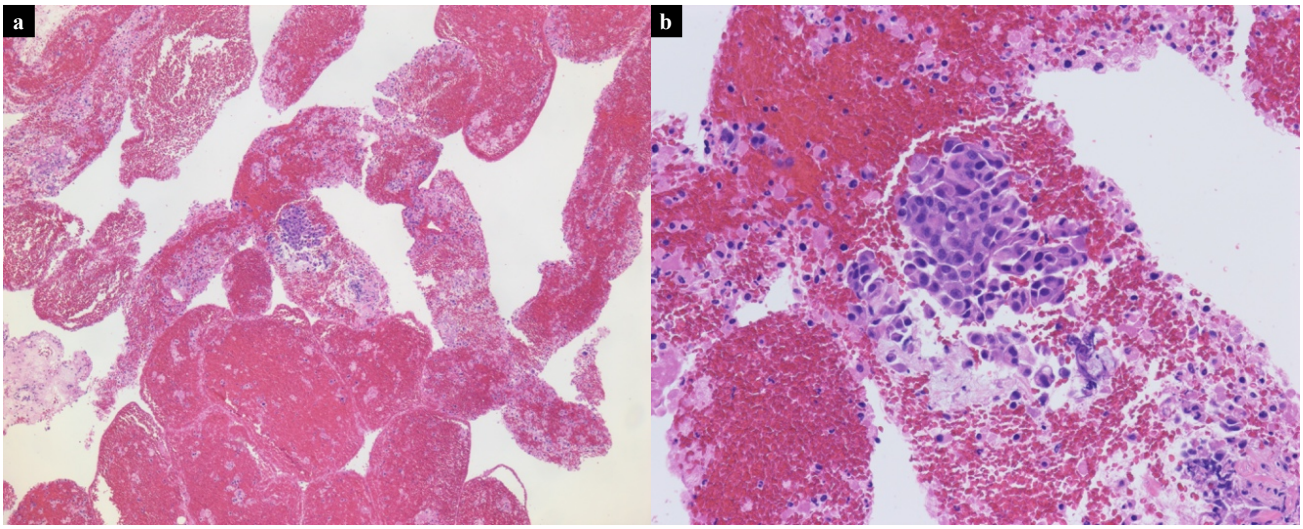
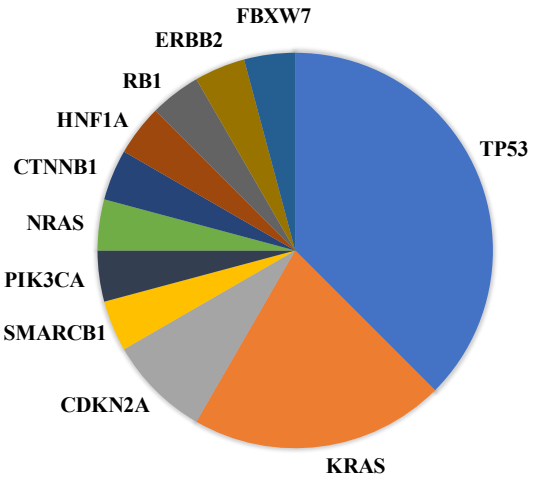



**図 9. EUS-FNA により採取した胆嚢癌の組織像（hematoxylin and eosin 染色）**
**(a) 5 倍率　(b) 20 倍率**

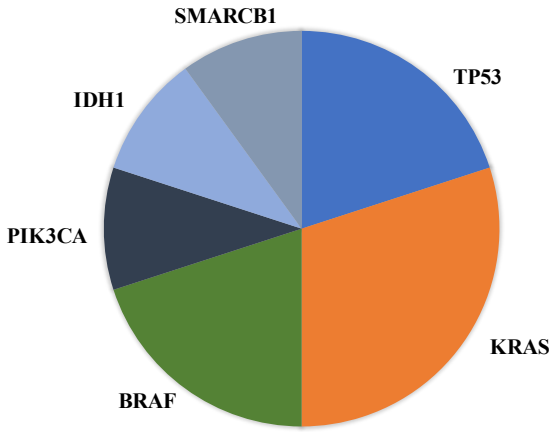
4. 臓器別の病原性変異の詳細

胆嚢癌の組織からは、11 の病原性変異が検出され（TP53、KRAS、CDKN2A、NRAS、PIK3CA、FBXW7、HNF1A、RB1、ERBB2、CTNNB1、SMARCB1）、TP53（75%）と KRAS（41.7%）の頻度が高かった（図 10a）。肝内胆管癌は 6 の病原性変異が検出され（KRAS、TP53、BRAF、PIK3CA、IDH1、SMARCB1）（図 10b）、肝外胆管癌では 3 の病原性変異が検出された（TP53、PIK3CA、SMAD4）（図 10c）。BRAF および SMARCB1 は肝内胆管癌のみで、SMAD4 は肝外胆管癌のみで検出された。腺扁平上皮癌と診断された胆嚢癌 2 例は、1 例で TP53、CDKN2A、RB1、PIK3CA、SMARCB1 の変異を、1 例では組織量が十分量採取されていたにも関わらず（図 11）、変異は検出されなかった。原発を穿刺した 12 例とリンパ節を穿刺した 9 例との間で、検出された遺伝子変異の部位や数に関しての差はみられなかった。

(a) gallbladder carcinoma




(b) intrahepatic cholangiocarcinoma




(c) extrahepatic cholangiocarcinoma

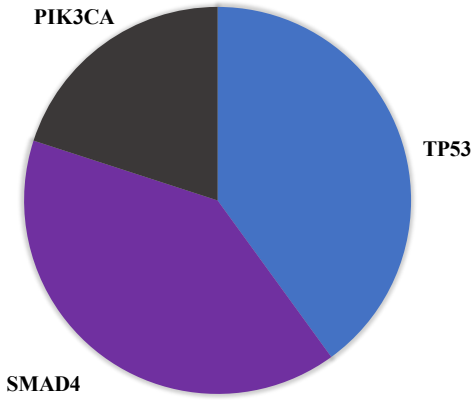



図 10.

(a) 胆嚢癌における病原性変異の割合

(b) 肝内胆管癌における病原性変異の割合

(c) 肝外胆管癌における病原性変異の割合

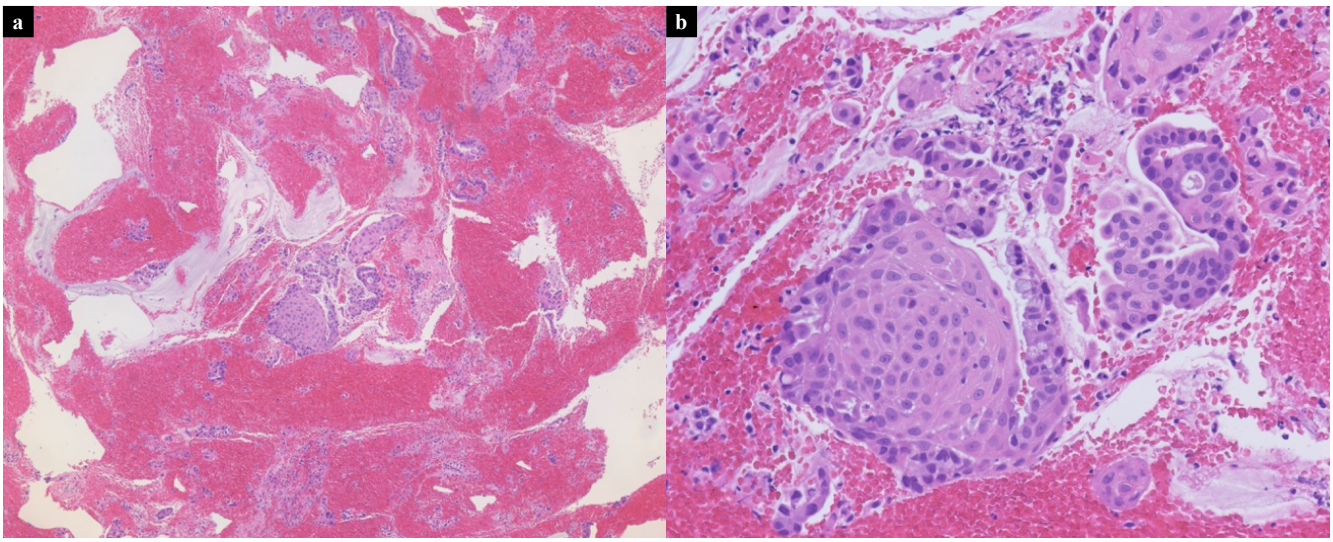



図 11. 病原性変異が検出されなかった胆嚢癌の HE 染色像。多量の異形細胞がみられる一方で、壊死、間質や結合組織などは目立たなかった。
(a) 5 倍率
(b) 20 倍率

# 考察

本研究は、EUS-FNA により採取した胆道癌組織を用いて、遺伝子解析を行った世界で初めての報告である。本研究では EUS-FNA で得られる微小な組織検体からでも、高重複で塩基配列解析をおこなえることを実証できた。病原性変異を 95.2%（20/21）と高頻度で認めたが、これは既報の経乳頭生検検体や手術により採取した組織検体に対する遺伝子解析（47.5%、92.1%、90.1%）と比較しても、同等以上であった（Yoo KH et al., 2016; Farshidfar F et al., 2017; Yadav S et al., 2017）。EUS-FNA により採取した組織検体に関して、膵癌・肺癌といった他臓器癌においてターゲットシークエンスをおこなった既報でも、病原性変異の同定は 61.7%、50%、100%であり（Gleeson FC et al., 2014; Young G et al., 2013; Kameta E et al., 2016）、遜色はなかった。良質な遺伝子ライブラリを作製できたことが、高重複の塩基配列解析および病原性変異の高頻度検出につながったと考えるが、良質な遺伝子ライブラリ作製の要因として、下記の 3 項目が考えられる。第一に、FNA で得られた白色検体を保存する前に、全例で迅速細胞診断を行っていることである。FNA で採取した白色検体には、しばしば間質、壊死や結合組織が含まれるため、迅速細胞診断を行うことで、これらの不必要な組織の混入を防ぐことができたと思われる。第二に、FNA 検体を適切な保存液である RNAlater に浸した上で凍結保存したことである。凍結検体として保存することで、ホルマリン検体でみられるような DNA の断片化や化学的修飾（Chin SF et al., 2018）が比較的少ない状態で保存されており、良質の DNA が抽出されたと思われる。第三に、AMPure XP と 70%エタノールによる精製をおこない、解析する DNA の質を上げたことが挙げられる。AllPrep DNA/RNA/Protein mini kit で組織から DNA を抽出した際、図 7a で示すとおりしばしばグアジニン塩酸塩を含むことがあり、これにより遺伝子ライブラリの質の低下がみられ、解析に影響を及ぼすことがある。実際に精製を行わずに解析をおこなってみたが、DNA の量は十分量であったにも関わらず、有効な解析を行うことができなかった（図 12）。

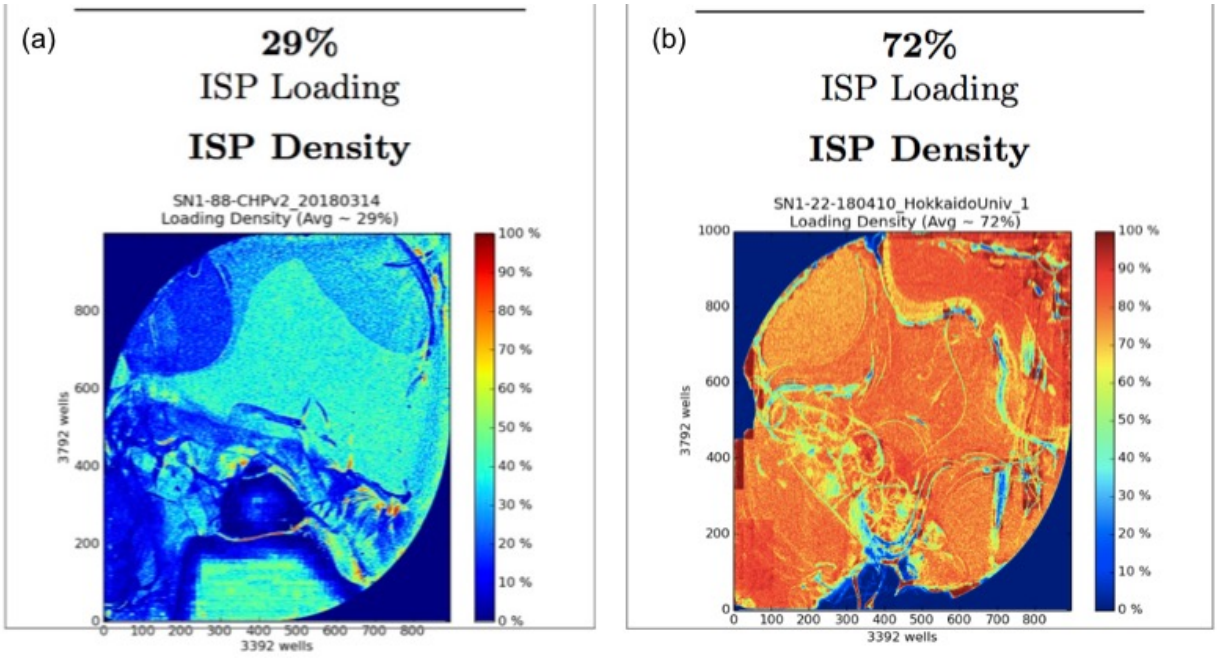



**図 12.半導体チップにおける loading rate**
**(a) DNA の精製を行わなかった場合。Loading rate は 29%であり、シーケンスのリード深度は平均で 0.1 回と、評価可能なライブラリがビーズに吸着していなかったことを示す。**
**(b) DNA の精製を行なった場合。Loading rate は 72%であり、半導体チップに良好なライブラリが収まっていることを示す。**

よって DNA の抽出をおこなった後に精製を十分に行いグアジニン塩酸塩等の混入物を除去することが、遺伝子ライブラリおよび解析の質の向上に寄与したと考えられる。

胆嚢癌の 1 例で病原性変異が認められなかったが、その理由として、病原性変異をもっていないか病原性変異がホットスポットでカバーされていなかった可能性、もしくは FNA で採取した組織が腫瘍細胞を含んでいなかった可能性が考えられる。病理学的診断に使用した部位の HE 染色像は、図 11 で示すように多量の腫瘍細胞を含んでおり、同部位と連続した箇所の一部を凍結保存していることから、腫瘍細胞を含んでいなかった可能性は考え難い。ゆえに病原性変異をもっていなかったか、変異がホットスポット外であった可能性が考えられる。

本研究では、胆嚢癌で KRAS 変異が 12 例中 5 例と多くみられている。Nakamura らの日本人を対象とした大規模包括的ゲノム解析によると、KRAS の変異は肝外胆管癌に多くみられ、胆嚢癌ではみられていない(Nakamura et al., 2015)。ただし、Nakamura らの報告では胆嚢癌は 28 症例しか含まれておらず、別の 26 例および 57 例の胆嚢癌を対象とした遺伝子解析（Simbolo M et al., 2014; Li M et al., 2014）では、それぞれ 19%、8%と報告されている。また本研究では、CT、MRI や内視鏡による画像検査により、膵癌や大腸癌といった多臓器の転移などは明らかに除外されていることも考慮すると、本研究で得られた KRAS 変異は胆道癌の病原性変異として矛盾ないものと考えられる。

EUS-FNA は膵癌や縦隔腫瘍の病理学的診断においてよく用いられるが、胆道癌の診断においても同様に、安全で有用性が高いという報告がなされている（Navaneethan U et al., 2014; Ohshima Y et al., 2011)。内視鏡的胆道造影下の経乳頭的生検は、胆道腫瘍の病理学的診断において一般的に行われているが、胆嚢癌や肝内胆管癌といった胆道癌においては、同生検法では腫瘍組織を採取できないことがしばしばある。また内視鏡的胆道造影検査は、処置に伴い 1.0～13.3%の頻度で膵炎を発症することが言われており(Freeman et al., 1996; Loperfido et al., 1998; Li et al., 2007)、重症化した場合は腫瘍に対する治療に影響を及ぼし、患者に不利益をもたらす場合もある。それゆえ、腫瘍部と適切な穿刺ルートが描出されれば確実な組織採取が可能である EUS-FNA は、遺伝子解析対象の組織採取において安全かつ有用な手技であるといえる。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ごく僅かではあるが存在する。近年、膵癌、転移性リンパ節や悪性黒色腫といった腫瘍に対して EUS-FNA を施行し、穿刺ルートに播種をおこしたという報告がされている（Sakamoto U et al., 2018; Shah JN et al., 2004; Doi S et al., 2008)。これまで胆道癌の症例では、FNA 穿刺ルートの播種に関する報告はないものの、十分留意をして検査を行う必要があると考える。

胆道癌はターゲットとなりうる遺伝子が低頻度かつ多様であり（Nakamura et al., 2015)、有効な分子標的治療は確立していない現状ではあるが、それぞれの腫瘍の遺伝子変異の特徴に応じた個別化治療が有効になってくると思われる。本研究では、21 例中 8 例で治療の対象となりうる遺伝子変異（BRAF、NRAS、PIK3CA、IDH1）が検出されているが、既にこれらをターゲットとした臨床試験が国外でおこなわれている（NCT 02304809、NCT01501604、

NCT02989857、NCT03118817)。今後は癌遺伝子解析が、より簡便かつ迅速に行うことができるようになり、すべての胆道癌症例で病原性遺伝子変異を解析・同定し、それぞれの遺伝子プロファイルに沿った分子標的治療が行われるようになることが予想される。本研究の結果は、今後発展すると思われる胆道癌に対する個別化治療に先立ち、EUS-FNA が治療標的を決定するうえで有用であり臨床応用への可能性を示した。さらに、EUS-FNA による胆道癌遺伝子解析は、標準治療に不応となった症例における遺伝子プロファイルの変化を評価できる可能性があり、さらに治療反応性を示す癌遺伝子を同定することができれば、分子標的治療を後治療として積極的に行う一つの判断材料になりうる。

本研究ではいくつかの limitation がある。第一に、迅速細胞診で評価した部位と、実際に遺伝子解析をおこなった部位とは厳密には異なることである。十分な組織量が保存されていれば、メチレンブルー染色等で腫瘍部を確認しながら腫瘍細胞の DNA を抽出することが可能だが、実際に保存されていたのは EUS-FNA で採取した組織のごくわずかな部分であり、染色等により解析可能な部位がさらに少なくなってしまうことが懸念されたため、今回は RNA later で保存されている組織の病理学的評価を行わなかった。第二に、症例数が少ないことが挙げられる。今回は保存されている症例数の都合により解析が 21 例となったが、今後はより多くの症例で本研究での手法を用いた解析を行い、今回の結果の信頼性が高めることが必要である。第三に、今回の解析は臨床での有用性を考慮し、tumor-normal pair workflow による体細胞変異のみを抽出し、生殖細胞変異の評価はおこなっていないことである。第四に、凍結保存した組織から抽出した DNA と、ホルマリンで保存した組織から抽出した DNA との質および濃度の比較をおこなっていない点があげられる。先に述べたようにホルマリンで保存した場合には、DNA の断片化や化学的修飾がおこることが知られている。本邦では、採取した組織はホルマリンで保存することが実臨床では一般的であるため、EUS-FNA で採取され、ホルマリンで保存された組織に対する胆道癌の DNA の質および濃度の評価をおこなうことで、今回の結果の実用性が高まると考えられ、今後検討すべき事項と考える。

# 結論

本研究において、以下の知見が得られた。

**・EUS-FNA で採取した微小な胆道癌組織検体に対してでも、適切な処理を行うことにより、質の高いターゲットシーケンスを行うことが可能である。**

今後、分子標的治療が切除不能進行胆道癌の標準治療となることが予想される中、EUS-FNA を基本にした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。本邦では 2019 年度から、標準治療がない固形癌患者、又は病勢の進行により標準治療が終了となった固形癌患者を対象とした癌遺伝子パネル検査が保険収載された。実臨床において、癌遺伝子パネル検査で使用される組織は、主に手術や鉗子生検で採取されたものであり、実際に治療に至った症例もみられる。一方で EUS-FNA により採取されたホルマリンで保存されている組織は、検体不良のため解析不可となることが多い。腫瘍細胞の含有量が少ないことや、ホルマリンによる腫瘍細胞の DNA の質の低下が原因として考えられるが、本研究を応用し、EUS-FNA の手法、採取した組織の保存方法や、ライブラリの調製等を工夫し、実臨床で分子標的療法までつなぐための方法を確立することが、今後取り組むべき課題である。

# 謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究に対する心構えや信念、実験方法、データ解釈、論文作成など、様々な面において御指導・御援助頂きました北海道大学病院光学医療診療部助教 桒谷将城先生、消化器内科助教　須田剛生先生には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

また、臨床における技術指導や、検体の採取などにご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科胆膵グループの諸先生方に、心より深く感謝申し上げます。

最後に、本研究にご協力いただきましたすべての患者様に、厚く御礼申し上げます。

2020 年 3 月

平田　幸司

# 利益相反

本研究に関して、研究にバイアスをもたらす可能性のある利害関係（金銭的・個人的関係）はありません。

# 引用文献

Chin, S.F., Santonja, A., Grzelak, M., Ahn, S., Sammut, S.J., Clifford, H., Rueda, O.M., Pugh, M., Goldgraben, M.A., Bardwell, H.A., et al. (2018). Shallow whole genome sequencing for robust copy number profiling of formalin-fixed paraffin-embedded breast cancers. Exp Mol Pathol *104*, 161-169.

Ciuleanu, T., Diculescu, M., Hoepffner, N.M., Trojan, J., Sailer, V., Zalupski, M., Herrmann, T., Roth, A., Chick, J., Brock, K.*, et al.* (2007). A randomised phase II study of OSI-7904L versus 5-fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) as first-line treatment in patients with advanced biliary cancers. Invest New Drugs *25*, 385-390.

de Groen, P.C., Gores, G.J., LaRusso, N.F., Gunderson, L.L., and Nagorney, D.M. (1999). Biliary tract cancers. N Engl J Med *341*, 1368-1378.

Doi, S., Yasuda, I., Iwashita, T., Ibuka, T., Fukushima, H., Araki, H., Hirose, Y., and Moriwaki, H. (2008). Needle tract implantation on the esophageal wall after EUS-guided FNA of metastatic mediastinal lymphadenopathy. Gastrointest Endosc *67*, 988-990.

Ducreux, M., Van Cutsem, E., Van Laethem, J.L., Gress, T.M., Jeziorski, K., Rougier, P., Wagener, T., Anak, O., Baron, B., Nordlinger, B., et al. (2005). A randomised phase II trial of weekly high-dose 5-fluorouracil with and without folinic acid and cisplatin in patients with advanced biliary tract carcinoma: results of the 40955 EORTC trial. Eur J Cancer *41*, 398-403.

Farshidfar, F., Zheng, S., Gingras, M.C., Newton, Y., Shih, J., Robertson, A.G., Hinoue, T., Hoadley, K.A., Gibb, E.A., Roszik, J., et al. (2017). Integrative

Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. Cell Rep *18*, 2780-2794.

Freeman, M.L., Nelson, D.B., Sherman, S., Haber, G.B., Herman, M.E., Dorsher, P.J., Moore, J.P., Fennerty, M.B., Ryan, M.E., Shaw, M.J., et al. (1996). Complications of Endoscopic Biliary Sphincterotomy. New England Journal of Medicine *335*, 909-919.

Ghassan M et al. (2004). Usefulness of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration in the diagnosis of hepatic, gallbladder and biliary tract Lesions. World journal of ganstrointestinal oncology *6*, 420–429.

Gleeson, F.C., Kerr, S.E., Kipp, B.R., Voss, J.S., Minot, D.M., Tu, Z.J., Henry, M.R., Graham, R.P., Vasmatzis, G., Cheville, J.C., et al. (2016). Targeted next generation sequencing of endoscopic ultrasound acquired cytology from ampullary and pancreatic adenocarcinoma has the potential to aid patient stratification for optimal therapy selection. Oncotarget *7*, 54526-54536.

Gleeson, F.C., Kipp, B.R., Kerr, S.E., Voss, J.S., Graham, R.P., Campion, M.B., Minot, D.M., Tu, Z.J., Klee, E.W., Lazaridis, K.N., et al. (2015a). Kinase genotype analysis of gastric gastrointestinal stromal tumor cytology samples using targeted next-generation sequencing. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association *13*, 202-206.

Gleeson, F.C., Kipp, B.R., Levy, M.J., Voss, J.S., Campion, M.B., Minot, D.M., Tu, Z.J., Klee, E.W., Lazaridis, K.N., and Kerr, S.E. (2014). Lung cancer adrenal gland metastasis: Optimal fine-needle aspirate and touch preparation smear cellularity characteristics for successful theranostic next-generation sequencing. Cancer cytopathology *122*, 822-832.

Gleeson, F.C., Kipp, B.R., Voss, J.S., Campion, M.B., Minot, D.M., Tu, Z.J., Klee, E.W., Sciallis, A.P., Graham, R.P., Lazaridis, K.N., et al. (2015b). Endoscopic ultrasound fine-needle aspiration cytology mutation profiling using targeted next-generation sequencing: personalized care for rectal cancer. American journal of clinical pathology *143*, 879-888.

Hammoud, G.M., Almashhrawi, A., and Ibdah, J.A. (2014). Usefulness of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration in the diagnosis of hepatic, gallbladder and biliary tract Lesions. World J Gastrointest Oncol *6*, 420-429.

Hezel, A.F., and Zhu, A.X. (2008). Systemic therapy for biliary tract cancers. Oncologist *13*, 415-423.

Kameta, E., Sugimori, K., Kaneko, T., Ishii, T., Miwa, H., Sato, T., Ishii, Y., Sue, S., Sasaki, T., Yamashita, Y., et al. (2016). Diagnosis of pancreatic lesions collected by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration using next-generation sequencing. Oncology letters *12*, 3875-3881.

Khan, S.A., Tavolari, S., and Brandi, G. (2019). Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. Liver International *39*, 19-31.

Lee, J., Park, S.H., Chang, H.-M., Kim, J.S., Choi, H.J., Lee, M.A., Chang, J.S., Jeung, H.C., Kang, J.H., Lee, H.W., et al. (2012). Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. The Lancet Oncology *13*, 181-188.

Li, M., Zhang, Z., Li, X., Ye, J., Wu, X., Tan, Z., Liu, C., Shen, B., Wang, X.A., Wu, W., et al. (2014). Whole-exome and targeted gene sequencing of gallbladder carcinoma identifies recurrent mutations in the ErbB pathway. Nat Genet *46*, 872-876.

Li, Z.S., Pan, X., Zhang, W.J., Gong, B., Zhi, F.C., Guo, X.G., Li, P.M., Fan, Z.N., Sun, W.S., Shen, Y.Z., et al. (2007). Effect of octreotide administration in the prophylaxis of post-ERCP pancreatitis and hyperamylasemia: A multicenter, placebo-controlled, randomized clinical trial. Am J Gastroenterol *102*, 46-51.

Loperfido, S., Angelini, G., Benedetti, G., Chilovi, F., Costan, F., De Berardinis, F., De Bernardin, M., Ederle, A., Fina, P., and Fratton, A. (1998). Major early complications from diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. Gastrointestinal Endoscopy *48*, 1-10.

Milind J, Maeve L, Rachna T, et al. (2018). Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma. Journal of Clinical Oncology *36*, 276-282.

Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shirota, T., Elzawahry, A., Kato, M., Hama, N., Hosoda, F., Urushidate, T., Ohashi, S., et al. (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. Nat Genet *47*, 1003-1010.

Navaneethan, U., Njei, B., Venkatesh, P.G., Lourdusamy, V., and Sanaka, M.R. (2015). Endoscopic ultrasound in the diagnosis of cholangiocarcinoma as the etiology of biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. Gastroenterol Rep (Oxf) *3*, 209-215.

Ohshima, Y., Yasuda, I., Kawakami, H., Kuwatani, M., Mukai, T., Iwashita, T., Doi, S., Nakashima, M., Hirose, Y., Asaka, M., et al. (2011). EUS-FNA for suspected malignant biliary strictures after negative endoscopic transpapillary brush cytology and forceps biopsy. J Gastroenterol *46*, 921-928.

Rao, S., Cunningham, D., Hawkins, R.E., Hill, M.E., Smith, D., Daniel, F., Ross, P.J., Oates, J., and Norman, A.R. (2005). Phase III study of 5FU, etoposide and leucovorin (FELV) compared to epirubicin, cisplatin and 5FU (ECF) in

previously untreated patients with advanced biliary cancer. Br J Cancer *92*, 1650-1654.

Reynolds, J.P., Zhou, Y., Jakubowski, M.A., Wang, Z., Brainard, J.A., Klein, R.D., Farver, C.F., Almeida, F.A., and Cheng, Y.W. (2017). Next-generation sequencing of liquid-based cytology non-small cell lung cancer samples. Cancer cytopathology *125*, 178-187.

Sakamoto, U., Fukuba, N., Ishihara, S., Sumi, S., Okada, M., Sonoyama, H., Ohshima, N., Moriyama, I., Kawashima, K., and Kinoshita, Y. (2018). Correction to: Postoperative recurrence from tract seeding after use of EUS-FNA for preoperative diagnosis of cancer in pancreatic tail. Clin J Gastroenterol *11*, 260.

Saunders, C.T., Wong, W.S., Swamy, S., Becq, J., Murray, L.J., and Cheetham, R.K. (2012). Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. Bioinformatics *28*, 1811-1817.

Shah JN1, F.D., Guerry D, Feldman M, Kochman ML. (2004). <Melanoma seeding of an EUS-guided fine needle track. - PubMed - NCBI.pdf>. Gastrointest Endosc Jun;*59*(7):923-4.

Shaib, Y., and El-Serag, H.B. (2004). The epidemiology of cholangiocarcinoma. Semin Liver Dis *24*, 115-125.

Sharma, A., Dwary, A.D., Mohanti, B.K., Deo, S.V., Pal, S., Sreenivas, V., Raina, V., Shukla, N.K., Thulkar, S., Garg, P., et al. (2010). Best supportive care compared with chemotherapy for unresectable gall bladder cancer: a randomized controlled study. J Clin Oncol *28*, 4581-4586.

Simbolo, M., Fassan, M., Ruzzenente, A., Mafficini, A., Wood, L.D., Corbo, V., Melisi, D., Malleo, G., Vicentini, C., Malpeli, G., et al. (2014). Multigene

mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. Oncotarget *5*, 2839-2852.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin *65*, 87-108.

Valle, J., Wasan, H., Palmer, D.H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S.P., et al. (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. N Engl J Med *362*, 1273-1281.

Yadav, S., N, D.E.S., Kumari, N., Krishnani, N., Kumar, A., and Mittal, B. (2017). Targeted Gene Sequencing of Gallbladder Carcinoma Identifies High-impact Somatic and Rare Germline Mutations. Cancer Genomics Proteomics *14*, 495-506.

Yoo, K.H., Kim, N.K., Kwon, W.I., Lee, C., Kim, S.Y., Jang, J., Ahn, J., Kang, M., Jang, H., Kim, S.T., et al. (2016). Genomic Alterations in Biliary Tract Cancer Using Targeted Sequencing. Transl Oncol *9*, 173-178.

Young, G., Wang, K., He, J., Otto, G., Hawryluk, M., Zwirco, Z., Brennan, T., Nahas, M., Donahue, A., Yelensky, R., et al. (2013). Clinical next-generation sequencing successfully applied to fine-needle aspirations of pulmonary and pancreatic neoplasms. Cancer cytopathology *121*, 688-694.

Zhao, D.Y., and Lim, K.H. (2017). Current biologics for treatment of biliary tract cancers. J Gastrointest Oncol *8*, 430-440