HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝外胆管癌のリンパ節転移細胞の分子生物学的特徴の解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	山田, 徹
Description	配架番号：2732
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15208号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87681
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YAMADA_Toru_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　山田　徹

学 位 論 文 題 名

肝外胆管癌のリンパ節転移細胞の分子生物学的特徴の解析
（The analysis of molecular biological characteristics of cells metastasized to lymph node from extrahepatic cholangiocarcinoma）

【背景と目的】

肝外胆管癌（extrahepatic cholangiocarcinoma; EHCC）の唯一の根治的治療は外科的切除であるが、根治切除後でも再発をきたすことが多く、特にリンパ節転移陽性例は極めて予後不良である。しかしながら、リンパ節転移陽性の EHCC に対する術後化学療法の予後改善効果については、未だ十分なコンセンサスが得られていないのが現状であり、有効な周術期療法の開発が急務となっている。近年、次世代シークエンシング（next generation sequencing; NGS）をはじめとする遺伝子解析技術の進歩により、EHCC においても様々な遺伝子異常が同定され、その生物学的特徴に対する理解が深まってきた。他のがん腫においては、原発巣と転移巣との間の遺伝子変異プロファイルの比較検討が複数行われているが、胆道癌における同様の研究は未だ報告されていない。そこで、本研究では、EHCC における原発巣と所属リンパ節転移巣の検体を用いた網羅的遺伝子解析を行い、両者の差異について検討することを目的とした。

【対象と方法】

2012 年 6 月から 2017 年 6 月の間で、北海道大学病院消化器外科Ⅱで根治的切除術が施行された EHCC 患者のうち、病理組織学的検討でリンパ節転移陽性が確認された患者 41 例を対象とした。対象患者の原発巣およびリンパ節転移巣のホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE）標本より DNA を抽出し、Human Comprehensive Cancer Panel（Qiagen）および MiSeq platform（Illumina, San Diego, CA）を用いて、160 のがん関連遺伝子を標的としたターゲットシークエンス解析を行った。シークエンスデータより、単塩基置換（single nucleotide variant; SNV）、挿入（insertion; Ins）/欠失（deletion; Del）、コピー数多型（copy number alteration; CNA）の情報を得た。原発巣とリンパ節転移巣との間で、遺伝子変異プロファイルの比較検討を行った。遺伝子変異の個数に応じて患者を 2 群に分け、両群間の臨床病理学的因子の比較を行った。また、遺伝子変異の個数を含めた臨床病理学的因子と術後予後との関連についても検討した。

【結果】

対象期間で根治的切除術が施行された EHCC は 104 例であり、そのうちリンパ節転移が陽性であったのは 41 例（39%）であった。生存解析におけるバイアスを避けるため、病理組織学的検討で局所進展度が pT4 であった 6 例、遠隔転移を認めた 1 例、組織型が腺扁平上皮癌であった 1 例、他の悪性疾患の既往がある 4 例は除外した。また、リンパ節転移巣の径が 2mm 未満で、DNA 抽出が困難であると予想された 8 例も除外した。DNA 抽出とシークエンス解析のためのライブラリー調整の過程で 5 例が不適格となり、最終的に 16 例（32 検体）に対してターゲットシークエンス解析を行った。*TP53*、*MAP3K1*、*SMAD4*、*APC*、*ARID1A* を含む 31 遺伝子に、計 91 個の遺伝子

変異が同定された。最も高頻度に認められたのは *TP53* の変異（12/32、38%）であった。32 検体中 28 検体（88%）では何らかの遺伝子変異が検出され、1 検体あたりの変異数は中央値で 2（0-9）個であった。16 例中 13 例（81.3%）で原発巣とリンパ節転移巣の遺伝子変異プロファイルが完全に一致していた。不一致の 1 例では、リンパ節転移巣にのみ原発巣で認められなかった *CDK12* の変異が認められた。2 例（4 検体）では、標的とした 160 遺伝子に関する変異は検出されなかった。CNA は計 18 個検出されたが、原発巣とリンパ節転移巣で一致していたのは 18 個中 4 個（22%）のみであり、残りの 14 個は原発巣とリンパ節転移巣のいずれかでしか検出されなかった。術後の全生存期間（overall survival; OS）の中央値は 38（7-73）ヵ月であった。観察期間中の再発は 13 例で認められ、無再発生存期間（recurrence free survival; RFS）の中央値は 12（5-62）ヵ月であった。検出された遺伝子変異の個数が少ない群（0-4 個: Low 群）と多い群（5 個以上: High 群）に分けたとき、術後の生存解析の *P* 値が最小となり、High 群で有意に予後不良であった。臨床病理学的因子を含めた患者背景に関しては両群間で有意差を認めなかった。各種臨床病理学的因子と術後の全生存率の単変量解析では、検出された遺伝子変異の個数のみが有意な予後予測因子として抽出された。生存期間中央値は Low 群で 38.1 ヵ月であるのに対し、High 群で 10.4 ヵ月であった（$P < 0.001$）。一方、RFS については両群間で有意差を認めなかった（$P = 0.070$）。High 群では術後予後が有意に不良であり、術後 25 ヵ月以内に全例死亡した。

【考察】

本研究では、EHCC の原発巣と所属リンパ節転移巣の遺伝子異常の差異を明らかにすべく、16 例の EHCC 患者を対象に 160 種のがん関連遺伝子を標的としたターゲットシークエンス解析を行った。結果、16 例中 14 例（88%）で何らかの遺伝子変異が同定された。原発巣と所属リンパ節転移巣の遺伝子変異の一致率は 16 例中 13 例（81.3%）と極めて高かったが、遺伝子変異のプロファイルは症例によって様々であり、リンパ節転移陽性の EHCC に共通する遺伝子変異は見いだせなかった。最も高頻度に変異を認めた *TP53* でも 16 例中 6 例（38%）でしか変異が認められず、EHCC の高い遺伝子異質性（genetic heterogeneity）が伺われた。したがって、リンパ節転移陽性の EHCC に対しては遺伝子解析結果に基づいた個別化治療が必要と考えられ、その際には原発巣検体の遺伝子解析で得られた情報が有用であると考えられた。また、生存解析においては特定の遺伝子異常と術後予後との相関は見いだせなかったが、検出された遺伝子変異の個数が唯一の予後予測因子として抽出された。リンパ節転移陽性の EHCC 患者に対する治療方針の決定のみならず、術後の予後予測という観点からも、原発巣検体を用いた遺伝子解析が有用である可能性が示された。

【結論】

EHCC において、原発巣と所属リンパ節転移巣の遺伝子変異プロファイルは高い確率で一致していることが示された。所属リンパ節転移陽性の EHCC 患者の治療方針の決定および術後の予後予測という観点で、網羅的な遺伝子解析が有用である可能性が示された。