



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15208
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87682
Type	doctoral thesis
File Information	YAMADA_Toru.pdf



学 位 論 文

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)

2022 年 9 月

北 海 道 大 学

山 田 徹

学 位 論 文

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)

2022 年 9 月

北 海 道 大 学

山 田 徹

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
実験方法	10 頁
結果	16 頁
考察	35 頁
総括および結論	39 頁
謝辞	40 頁
利益相反	41 頁
引用文献	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Toru Yamada, Yoshitsugu Nakanishi, Hideyuki Hayashi, Shigeki Tanishima, Ryo Mori, Kyoko Fujii, Keisuke Okamura, Takahiro Tsuchikawa, Toru Nakamura, Takehiro Noji, Toshimichi Asano, Aya Matsui, Kimitaka Tanaka, Yusuke Watanabe, Yo Kurashima, Yuma Ebihara, Soichi Murakami, Toshiaki Shichinohe, Tomoko Mitsuhashi, and Satoshi Hirano

Targeted amplicon sequencing for primary tumors and matched lymph node metastases in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma

HPB, Article in Press, <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2021.11.008>

本研究の一部は以下の学会に発表予定である。

1. Toru Yamada, Yoshitsugu Nakanishi, Keisuke Okamura, Takahiro Tsuchikawa, Toru Nakamura, Takehiro Noji, Toshimichi Asano, Aya Matsui, Kimitaka Tanaka, and Satoshi Hirano

Targeted amplicon sequencing for primary tumors and matched lymph node metastases in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma

The 34th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery,
June 10-11, 2022, Matsuyama, Ehime, Japan

【要旨】

【背景・目的】

リンパ節転移陽性の肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma; EHCC) は、根治切除例でも極めて予後不良である。よって、リンパ節転移を呈する EHCC に関する生物学的特徴に基づいた有効な周術期療法の開発が急務となっている。

近年、次世代シーケンシング (next generation sequencing; NGS) 技術の普及により、胆道癌においても遺伝子プロファイルの解析が進んできている。他のがん腫においては、原発巣と転移巣との間の遺伝子プロファイルの比較検討が行われているが、胆道癌では同様の研究は未だ報告されていない。

今回、EHCC における原発巣と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、その差異を検討することを目的とした。

【方法】

2012 年 6 月から 2017 年 6 月の期間で、北海道大学消化器外科 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。原発巣検体とリンパ節転移巣検体より DNA を抽出し、160 のがん関連遺伝子を標的とした遺伝子パネルを用いたターゲットシーケンス解析を行い、原発巣とリンパ節転移巣との間で、得られた遺伝子変異プロファイルの比較検討を行った。さらに、遺伝子変異の結果を含めた各種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】

対象となった 41 例のうち、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。残りの 29 例について、DNA 抽出とシーケンス解析のためのライブラリー調整の過程でさらに 13 例を追加で除外した。最終的に 16 例 (32 検体) に対してシーケンス解析を行った。*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。16 例中 13 例 (81.3%) では、原発巣とリンパ節転移巣で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追加で *CDK12* の変異が検出された。2 例 (4 検体) については、標的とした 160 遺伝子について変異が検出されなかった。検出された遺伝子変異の数が 5 個以上の群は 4 個以下

の群と比べ、有意に予後不良であった(生存期間中央値: 10.4 カ月 vs 38.1 カ月、 $P < 0.001$)。

【考察】

本研究では、EHCC においてリンパ節転移巣を構成する癌細胞に共通する遺伝子異常は見いだせなかった。遺伝子変異プロファイルは症例によって様々であり、EHCC の高い遺伝的異質性(**genetic heterogeneity**)が伺われた。原発巣と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おり、リンパ節転移陽性の EHCC 患者の新規治療法の開発においては、原発巣検体の遺伝子解析の情報が有用であると考えられた。また、検出された遺伝子変異の個数は唯一の有意な予後規定因子として抽出され、術後の予後予測という観点からも遺伝子解析の情報が有用であると考えられた。

【結論】

EHCC において、原発巣と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。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。

【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CNA	copy number alteration
CT	computed tomography
DIN	DNA integrity number
DNA	deoxyribonucleic acid
EHCC	extrahepatic cholangiocarcinoma
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
ERCP	endoscopic retrograde cholangiopancreatography
FDG-PET	fluorodeoxyglucose-positron emission tomography
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
HE	hematoxylin and eosin
HPD	hepatopancreatoduodenectomy
IHC	immunohistochemistry
IHCC	intrahepatic cholangiocarcinoma
Ins/Del	insertion/deletion
LNM	lymph node metastasis
MH	major hepatectomy
MST	median survival time
NGS	next generation sequencing
OS	overall survival
PCR	polymerase chain reaction
PET-CT	positron emission tomography-computed tomography
POCS	peroral cholangioscopy
por	poorly differentiated adenocarcinoma
RFS	recurrence free survival
SNV	single nucleotide variant
SSPPD	subtotal stomach-preserving pancreatoduodenectomy
tub1	well differentiated tubular adenocarcinoma
tub2	moderately differentiated tubular adenocarcinoma

【緒言】

胆管癌は、胆管上皮から発生する比較的稀な上皮系の悪性腫瘍であり、大きく肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma; IHCC) と肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma; EHCC) に分類される。さらに EHCC は肝門部領域胆管癌 (perihilar) と遠位胆管癌 (distal) に分類される。特にアジア地域で多いとされているが、近年、ヨーロッパや北米でも罹患数が増加傾向であり、消化器系の癌全体の 3% をなす (Rizvi et al., 2013)。EHCC に対する唯一の根治的治療は外科的切除であるが、根治的切除後でも再発が多く、5 年生存率は肝門部領域胆管癌で 9-44%、遠位胆管癌で 20-45% と報告されている (Blechacz et al., 2017; DeOliveira et al., 2007; Nagino et al., 2013; Nakanishi et al., 2020)。加えて、リンパ節転移陽性は強力な予後不良因子であるとされ (DeOliveira et al., 2007; Murakami et al., 2011)、Nagino ら (Nagino et al., 2013) は、2001 年から 2010 年の間に根治的切除術が施行された肝門部領域胆管癌患者の 5 年生存率が、リンパ節転移陰性で 67.1% であるのに対し、リンパ節転移陽性では 22.1% であったと報告している (Figure.1)。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の報告も存在し (Hoehn et al., 2015; Morine et al., 2017)、Mizuno ら (Mizuno et al., 2017) は、リンパ節転移陽性の肝門部領域胆管癌について、術後の 5 年生存率が手術単独では 15.0% であったのに対し、術後化学療法 (gemcitabine) 併施では 32.9% であったと報告している。しかしながら、未だ術後化学療法についての十分なコンセンサスが得られていないのが現状である。リンパ節転移陽性の EHCC の治療戦略の更なる発展のためには、術後化学療法の治療標的たるリンパ節転移を引き起こす癌細胞の分子生物学的特徴を明らかにすることが必要不可欠である。

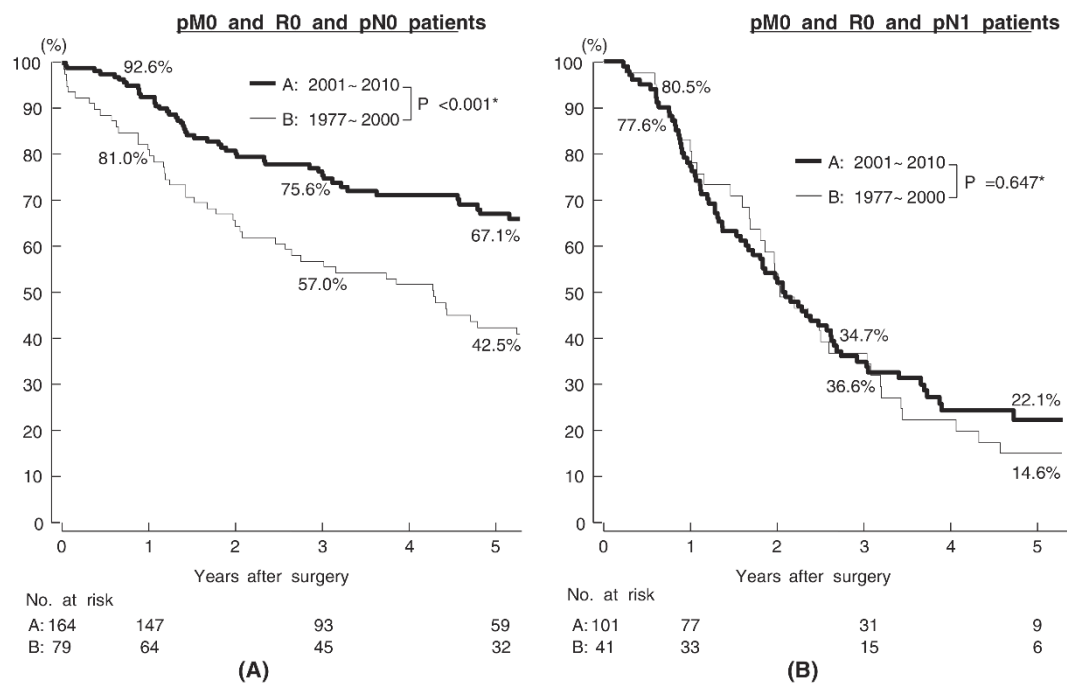


Figure.1 肝門部領域胆管癌患者の術後生存曲線

2001年から2010年の間に根治的切除術(R0)が施行された肝門部領域胆管癌患者の5年生存率は、(A)リンパ節転移陰性で67.1%あったのに対し、(B)リンパ節転移陽性で22.1%であった。

(Nagino M, et al. 2013. Annals of Surgery より引用)

次世代シーケンシング (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 の持つ様々な遺伝子異常が同定され、EHCC の生物学的特徴に対する理解が深まってきた (Lee et al., 2017; Lowery et al., 2018)。EHCC は遺伝的異質性 (genetic heterogeneity) が高い癌腫とされ、腫瘍は異なる変異を有する複数のサブクローンから構成され、その中でも転移を引き起こすサブクローンはごく一部に限られていると考えられている (Figure.2: Brandi et al., 2015; Jamal-Hanjani et al., 2015)。したがって、転移巣を構成する癌細胞の遺伝子異常が原発巣の癌細胞の遺伝子異常と異なっている可能性がある。

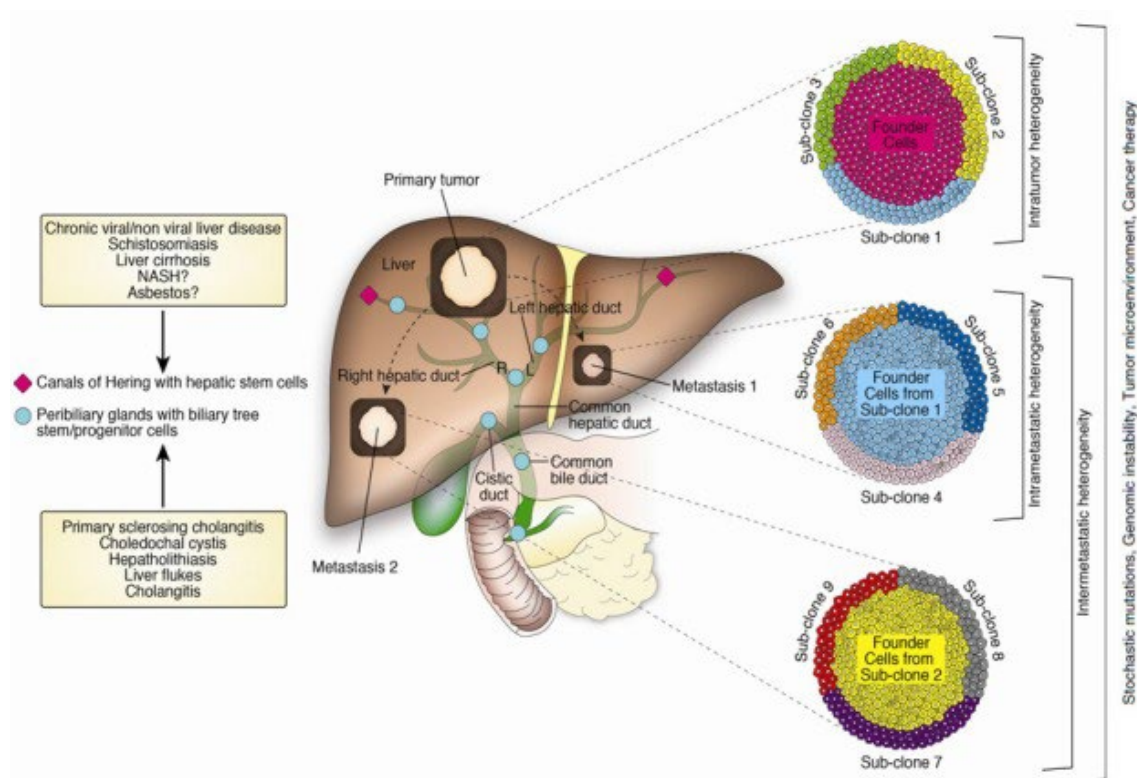


Figure.2 胆道癌における genetic heterogeneity のモデル

腫瘍は複数の異なるサブクローンより構成される。転移能を有するサブクローンの癌細胞が転移巣を形成し、腫瘍の成長にともなってさらに複数の異なるサブクローンが形成されていく。

(Brandi G, et al. 2015. Oncotarget より引用)

他の癌腫においては原発巣と転移巣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。その多くでは両者の変異プロファイルの一致率は高いと結論づけられており、大腸癌では 73-79% (Brannon et al., 2014; Vakiani et al., 2012; Vignot et al., 2015; Crumley et al., 2016; Moorcraft et al., 2017)、乳癌では 75-89% (Meric-Bernstam et al., 2014; Bertucci et al., 2016; Tang et al., 2015)、肺癌では 78-94% (Vignot et al., 2013; Xie et al., 2018) と報告されている。その一方で、一致率は低いと結論づけた報告もいくつか存在し (Kovaleva et al., 2016; Kjallquist et al., 2018; Cejalvo et al., 2017; Schrijver et al., 2018)、Zou ら (Zou et al., 2018) は 65 例の他臓器転移を有する結腸直腸癌患者に対する NGS を用いた解析で、肺転移の 50%、肝転移の 55% に、原発巣とは異なる遺伝子変異を認めたと報告している。また、Ng ら (Ng et al., 2017) は、同時性の遠隔転移を有する乳癌患者の原発巣と転移巣検体に対する全エクソンシーケンス解析を行い、9 例中 4 例で転移巣にのみ、*SMAD4*、*TCF7L2*、*TCF (ITF2)* を含めた上皮間葉転換 (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) 関連遺伝子の変異を認めたと報告している。しかしながら、EHCC における同様の研究報告は未だ存在しない。

また、胆道癌のリンパ節転移の術前診断に関しては、これまでに様々な検討が行われてきた。Ohtani ら (Ohtani et al., 1996) は胆嚢癌における術前の造影 CT 検査において、リンパ節の径が 10mm 以上、かつリング状あるいは不均一に造影されるものを転移ありとした場合、感度が 36-47%、陽性的中率が 92-94% であり、術前診断に有用であると報告している。しかし、Noji ら (Noji et al., 2008) は同様の検討を他の胆道癌でも行い、有用性が示されなかったと報告している。Seo ら (Seo et al., 2008) は IHCC のリンパ節転移の術前診断における FDG-PET 検査、CT 検査、MRI 検査の正診率が、それぞれ 86%、68%、57%、感度がいずれも 43% であったと報告しており、FDG-PET 検査が有用であったと報告している。一方で、Adachi ら (Adachi et al., 2015) は PET-CT の感度は 31.2% と低く、不十分であるとしている。EHCC を含めた胆道癌における各種画像検査所見は、リンパ節転移診断の補助となる可能性はあるが、術前治療を行うか否かの判断材料としては不十分であるのが現状であると考えられる。EHCC の原発巣とリンパ節転移巣の遺伝子変異解析を行うことによって、リンパ節転移を有する EHCC に特徴的な遺伝子異常が同定されれば、術前の生検検体あるいは liquid biopsy を用いた遺伝子変異解析によって、リンパ節転移診断の補助、さらには術前治療を行う根拠となる可能性がある。

本研究では、EHCC の原発巣とリンパ節転移巣の遺伝子異常を網羅的に解析

し、両者の遺伝子プロファイルの差異について検討することを目的とした。さらに、遺伝子異常を含めた臨床病理学的因子と術後生存との関係性についても検討を行った。

【実験方法】

対象症例

北海道大学病院消化器外科 II で根治的切除が施行され、術後の病理組織学的検討でリンパ節転移が陽性と診断された EHCC 患者を対象とした。生存解析におけるバイアスを避けるため、局所進展度が pT4 の患者および他の悪性疾患の既往のある患者は除外した。腫瘍は、the International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumors, 7th edition に従って Stage 分類を行った (Sobin et al., 2009)。本研究では、手術前に「将来的に医学研究に用いる目的で保管し使用すること」を文章で同意 (包括同意) した患者の検体のみを使用した。本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得たものである (承認番号: 017-0035)。

pilot study (対象期間および組織量の決定)

本研究では、切除標本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、解析を行うことを想定した。FFPE 検体は、保管期間が長くなると抽出される DNA の品質が落ち、遺伝子パネル解析の成功率が低下すると報告されている (Figure.3: 小田ら., 2018)。

そこで、まず pilot study として、2008 年～2011 年の検体 (リンパ節転移巣のみ) を用いて、遺伝子パネル解析に耐え得る品質の DNA が抽出可能であるかを検討した。後述する手法によって FFPE 検体より DNA を抽出し、分光光度計によって DNA の濃度と吸光度比を測定した。純度の目安として吸光度比 A260/A280 が 1.7～1.9 の範囲を高純度の DNA と判断した (小田ら., 2018)。同時に、十分な DNA の量を抽出するために必要な組織量を決定するため、FFPE の未染色標本の厚さと枚数に関して検討を行った。リンパ節転移巣の大きさは症例によってばらつきがあるため、比較的大きな転移巣を有するものは 5 μ m 厚の未染色標本を 3 枚、転移巣の小さなものは 5 μ m 厚の未染色標本を 7 枚使用した。結果を Table.1 に示す。2 症例 (症例 1 と 5) で DNA の濃度が低く、純度も低かったため、使用する検体を 8 μ m 厚の未染色標本 7 枚に増やして再抽出を行った。その結果、2 症例とも十分な濃度と純度の DNA が得られた。

FFPE 検体の保管期間に関しては最長 9 年経過した症例であっても、十分な組織量があれば DNA の濃度・純度に関しては問題ないと考えられた。しかしながら、DNA の品質が保たれていても遺伝子パネルを用いたターゲットシーケンス解析の成功率は経時的に低下するため、可能な限り保存期間の短い症例を選択す

ることが望ましいと考えられた。また、用いる組織量については 8 μ m の未染色標本 7 枚を考慮したが、小さなリンパ節転移巣では薄切の過程で FFPE のブロック標本より転移巣が消失してしまう可能性があり、必要最小限の枚数が望ましいと考えた。

以上より、対象期間は検体の保存期間が 5 年以内 (2012 年 6 月～2017 年 6 月) とし、DNA の抽出に際しては FFPE ブロックより 8 μ m 厚の未染色標本を 5 枚作製し、使用することとした。

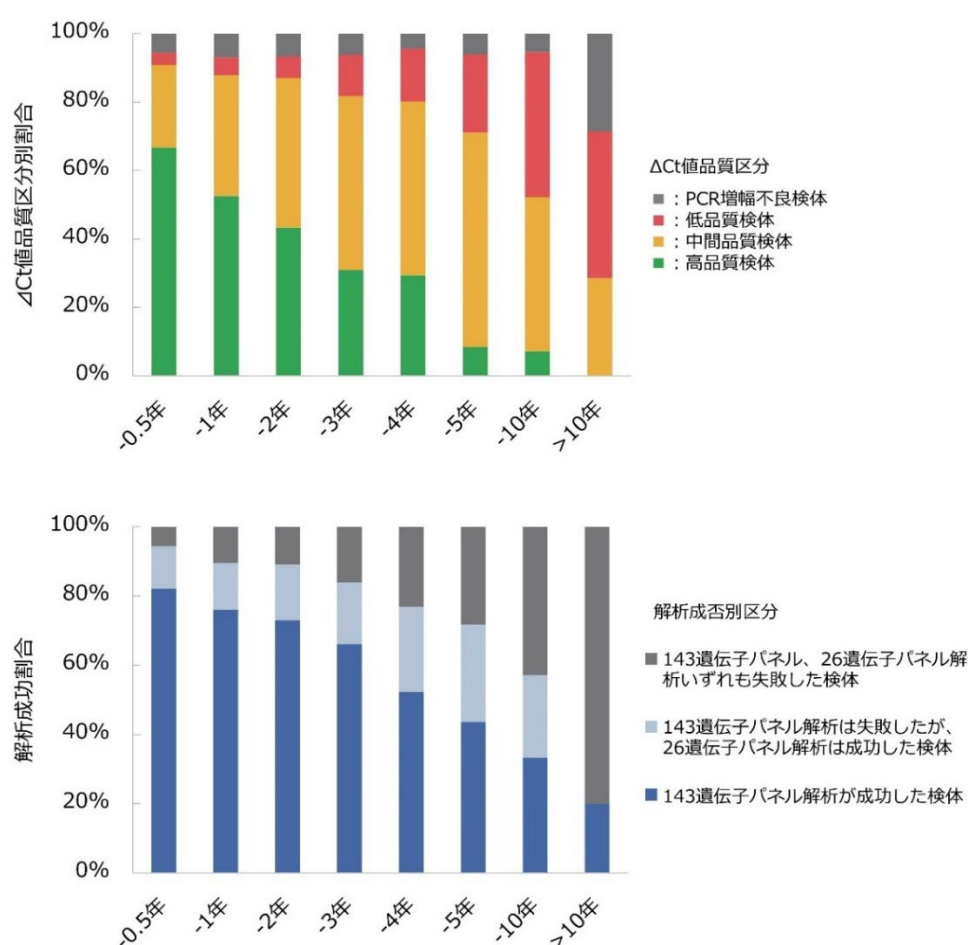


Figure.3 FFPE 検体の保存期間が DNA 品質に与える影響

FFPE 検体の保存期間が長くなるにつれて、抽出される DNA の品質が低下し、遺伝子パネル解析の成功率も低下する。143 遺伝子パネル解析では、5 年の経過で成功率が 50%を下回る。

(小田ら. 2018. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. より引用)

Table.1 リンパ節転移巣からの DNA 抽出結果 (pilot study)

No.	Year of surgery	Thickness (μm)	Number of slices	Nucleic acid concentration (ng/μl)	A260/A280
1	2011	5	3	15.8	1.69
		8	7	433.5	1.90
2	2010	5	3	26.5	1.78
3	2009	5	7	44.7	1.67
4	2009	5	7	162.4	1.72
5	2008	5	7	7.8	1.67
		8	7	279.9	1.92
6	2008	5	7	36.1	1.75

DNA の抽出

原発巣およびリンパ節転移巣の FFPE ブロックより、hematoxylin and eosin (HE) 染色標本を 1 枚と、8μm 厚の未染色標本を 5 枚作製した。HE 染色標本上に腫瘍位置のマーキングを行い、その領域内の腫瘍細胞含有割合を目視で計測した。腫瘍細胞含有割合の計測は 2 名のコンセンサスに基づいて行った (Toru Yamada, Hideyuki Hayashi)。HE 染色標本と対比しながら、未染色標本上の腫瘍部分のみを肉眼的に切り取った (manual macro-dissection)。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて DNA の抽出を行った。NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) および Agilent 2200 TapeStation System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて、抽出した DNA の純度と濃度の測定を行い、DNA の品質を DNA integrity number (DIN) で数値化した。日本病理学会のガイドライン (Kanai et al., 2018) を参考に、DIN 値のカットオフを 2.2 と定め、原発巣とリンパ節転移巣の DIN 値の平均が 2.2 に満たない症例は遺伝子パネル解析が困難と判断した。DIN 値の平均が 2.2 以上の症例については、Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NE) を用いて DNA の濃度の正確な測定を行った。

Multiplex PCR とライブラリー調整

本研究では、北海道大学病院癌遺伝子診断部のクーク検査で用いられている Human Comprehensive Cancer Panel (Qiagen) を用いた (Hayashi et al., 2020)。Human Comprehensive Cancer Panel (Qiagen) は 160 のがん関連遺伝子を標的とした遺伝子パネルである (Table.2)。GeneRead DNAseq Panel PCR Kit V2 (Qiagen) および Human Comprehensive Cancer Panel (Qiagen) を用いて multiplex PCR を施行し、標的遺伝子の DNA 増幅を行った。GeneRead DNA Library I Core Kit (Qiagen)、GeneRead Adapter I Set A 12-plex (Qiagen)、GeneRead DNA Library I Amp Kit (Qiagen) を用いて PCR 産物のライブラリー調整を行った。Agilent 2200 TapeStation System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) および Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NE) を用いて、ライブラリー調整後の DNA のサイズと濃度の測定を行った。

Table.2 Human Comprehensive Cancer Panel が標的とする 160 のがん関連遺伝子

<i>ABL1</i>	<i>BUB1B</i>	<i>DDR2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>IDH2</i>	<i>MEN1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>AKT1</i>	<i>CARD11</i>	<i>DICER1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IKZF1</i>	<i>MET</i>	<i>PHF6</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>AKT2</i>	<i>CBL</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>FH</i>	<i>IL6ST</i>	<i>MLH1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SMO</i>
<i>ALK</i>	<i>CBLB</i>	<i>ECT2L</i>	<i>FLCN</i>	<i>IL7R</i>	<i>MSH2</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SPOP</i>
<i>AMER1</i>	<i>CD79A</i>	<i>EGFR</i>	<i>FLT3</i>	<i>JAK1</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>	<i>SRC</i>
<i>APC</i>	<i>CD79B</i>	<i>EP300</i>	<i>FUBP1</i>	<i>JAK2</i>	<i>MTOR</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>STK11</i>
<i>AR</i>	<i>CDC73</i>	<i>EPCAM</i>	<i>GATA1</i>	<i>JAK3</i>	<i>MUTYH</i>	<i>PRDM1</i>	<i>SUFU</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CDH1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GATA2</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MYC</i>	<i>PRKARIA</i>	<i>TERT</i>
<i>ARID2</i>	<i>CDK12</i>	<i>ERBB3</i>	<i>GATA3</i>	<i>KDR</i>	<i>MYD88</i>	<i>PTCH1</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CDK4</i>	<i>ERBB4</i>	<i>GNA11</i>	<i>KIT</i>	<i>NF1</i>	<i>PTEN</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>ATM</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERCC5</i>	<i>GNAQ</i>	<i>KLF6</i>	<i>NF2</i>	<i>PTPN11</i>	<i>TP53</i>
<i>ATRX</i>	<i>CHEK2</i>	<i>ESR1</i>	<i>GNAS</i>	<i>KMT2D</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>RAC1</i>	<i>TSC1</i>
<i>BAP1</i>	<i>CIC</i>	<i>EZH2</i>	<i>GPC3</i>	<i>KRAS</i>	<i>NFKB1A</i>	<i>RB1</i>	<i>TSC2</i>
<i>BCL6</i>	<i>CREBBP</i>	<i>FAM46C</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RET</i>	<i>TSHR</i>
<i>BCOR</i>	<i>CRLF2</i>	<i>FANCA</i>	<i>H3F3A</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>ROS1</i>	<i>U2AF1</i>
<i>BRAF</i>	<i>CSF1R</i>	<i>FANCD2</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>NPM1</i>	<i>SDHB</i>	<i>VHL</i>
<i>BRCA1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FANCE</i>	<i>HNFI1A</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>NRAS</i>	<i>SETD2</i>	<i>WT1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>CYLD</i>	<i>FAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>MAP4K3</i>	<i>PALB2</i>	<i>SF3B1</i>	<i>XPC</i>
<i>BRIP1</i>	<i>DAXX</i>	<i>FBXO11</i>	<i>HSPH1</i>	<i>MDM2</i>	<i>PAX5</i>	<i>SLC7A8</i>	<i>ZNF2</i>
<i>BTK</i>	<i>DDB2</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>MED12</i>	<i>PBRM1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>ZRSR2</i>

ターゲットシーケンス解析

MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA) を用いてターゲットシーケンス解析を行った。GenomeJack と呼ばれる Mitsubishi Space Software の解析パイプラインを用いてシーケンスデータに対する遺伝子変異抽出 (curation) と注釈付け (annotation) を行い (Hayashi et al., 2020)、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。

術後フォローアップ

術後フォローアップとして、5 年間を目標に 3~6 ヶ月毎の通院を継続した。受診毎に造影 CT 検査を行った。本検討では最終フォローアップを 2021 年 3 月までとした。術後化学療法は当院では施行しなかったが、一部の症例はかかりつけ医との相談で術後化学療法が施行された。

生存解析と統計解析

検出され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背景について比較を行った。名義変数の二変量解析にはカイ 2 乗検定または Fisher の正確検定を、連続変数の二変量解析には Mann-Whitney U 検定を用いた。全生存率は Kaplan-Meier 法を用いて分析し、ログランク検定を用いて比較検討した。全生存率は、手術日から死亡日または最終受診日までとして検討した。有意性の閾値は $P < 0.05$ とした。すべての統計分析は、JMP version 16.0 software (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いて行った。

【結果】

対象症例

2012 年 6 月から 2017 年 6 月の間で、根治的切除が施行された EHCC 患者は 104 例であった。そのうち、リンパ節転移が陽性であったのは 41 例 (39%) であり、術前治療が行われた症例は認めなかった。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 (傍大動脈リンパ節転移) を認めた 1 例、組織型が腺扁平上皮癌 (adenosquamous cell carcinoma) 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。残りの 29 例について、原発巣とリンパ節転移巣の HE 標本を確認した。リンパ節転移巣については、最も径の大きな切片を選択した。リンパ節転移巣の直径が 2mm 未満で、十分な濃度と純度の DNA 抽出が困難であると予想された 8 例は除外した。残りの 21 症例を対象とし、検討を行った (Figure.4)

DNA 抽出とライブラリー調整

21 症例について、原発巣およびリンパ節転移巣の FFPE 未染色標本から DNA 抽出を行った (42 サンプル)。各々のサンプルについて quality check を行い、DIN 値を測定した (Table.3)。1 例 (症例 18) は、原発巣・リンパ節転移巣ともに抽出が不良であった。抽出された DNA の濃度の最小値は 8.1 ng/μL、DIN 値の最小値は 1.9 であった。3 例は DIN 値の平均が 2.2 未満であり、検討から除外した。残り 18 例 (36 サンプル) について、ライブラリー調整を行った。ライブラリー調整の過程で、DNA 増幅が不十分であった 2 例は追加で除外した。最終的に 16 例 (32 サンプル) のライブラリー DNA を得た (Figure.4)。16 例の臨床病理学的因子を含めた患者背景を Table.4 に示す。16 例中 2 例で、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウムによる術後化学療法が施行された。

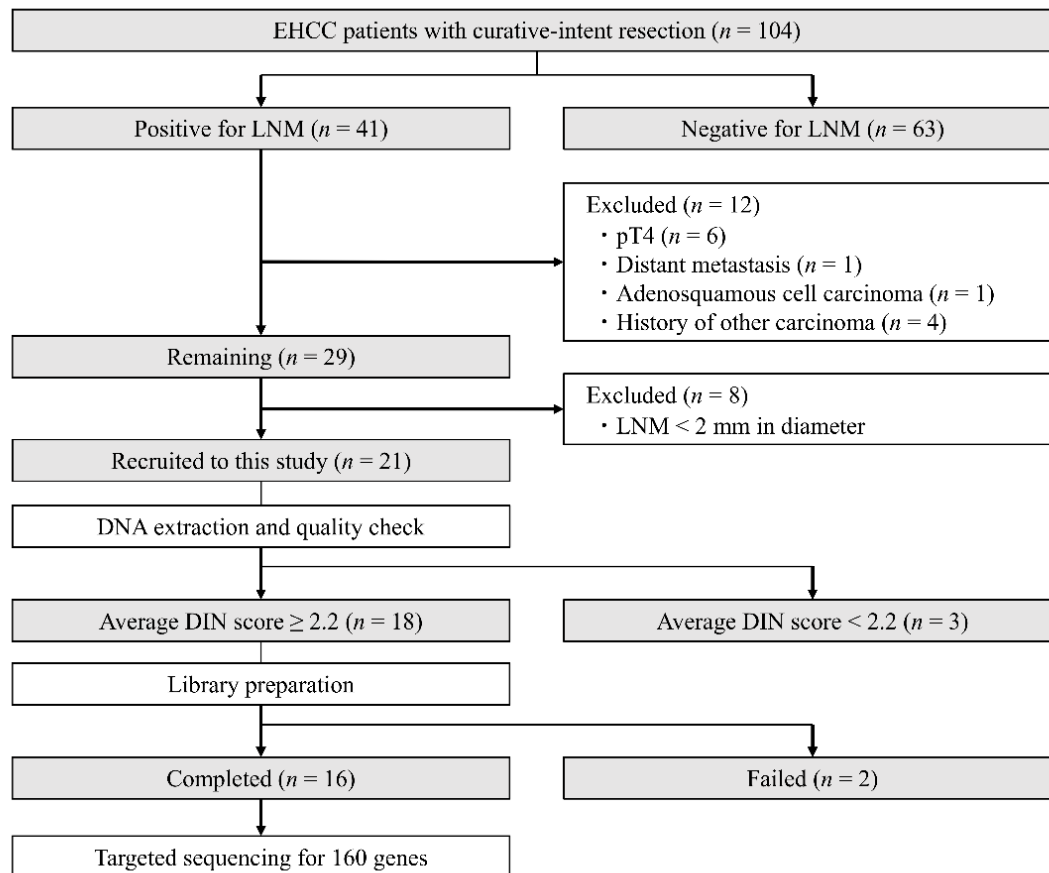


Figure.4 対象患者のフローチャート

根治的切除が施行された EHCC 患者は 104 例で、そのうちリンパ節転移陽性が確認されたのは 41 例であった。臨床病理学的に不適格な 20 例を除外し、21 例について検討を行った。DNA 抽出とライブラリー調整の過程で 5 例が追加で除外され、最終的に 16 例の患者についてターゲットシーケンス解析を施行した。

Table.3 21 症例(42 サンプル)の抽出 DNA の quality check および DIN 値

Patient No.		Nucleic acid concentration (ng/ μ L)	A260/A280	DIN score	The reason for exclusion
1	Primary	85.6	1.81	2.5	—
	LNM	46.3	1.83	2.3	
2	Primary	45.7	1.84	2.2	—
	LNM	46.9	1.83	2.2	
3	Primary	99.4	1.80	2.5	—
	LNM	157.2	1.82	2.9	
4	Primary	183.0	1.83	3.1	—
	LNM	123.9	1.80	2.7	
5	Primary	49.0	1.87	3.0	—
	LNM	124.0	1.80	2.9	
6	Primary	119.8	1.80	2.8	—
	LNM	77.4	1.78	2.5	
7	Primary	16.1	2.17	3.4	—
	LNM	71.6	1.85	3.2	
8	Primary	83.2	1.83	2.1	—
	LNM	49.2	1.84	2.9	
9	Primary	73.6	1.83	3.1	—
	LNM	162.0	1.83	2.5	
10	Primary	176.8	1.80	2.7	—
	LNM	30.6	1.81	2.4	
11	Primary	22.6	1.78	2.1	—
	LNM	57.6	1.81	2.5	
12	Primary	181.2	1.86	3.4	—
	LNM	89.4	1.83	2.8	
13	Primary	15.2	1.84	3.8	—
	LNM	43.0	1.97	3.2	
14	Primary	19.4	1.87	4.4	—
	LNM	18.1	1.84	4.3	

15	Primary	13.5	2.15	3.3	–
	LNM	8.1	2.59	2.7	
16	Primary	34.6	1.86	4.3	–
	LNM	28.8	1.89	4.9	
17	Primary	52.6	1.77	2.1	low DIN score
	LNM	35.4	1.78	1.9	
18	Primary	–	1.83	–	low DIN score
	LNM	–	1.87	–	
19	Primary	59.4	1.85	2.2	low DIN score
	LNM	9.4	2.03	2.0	
20	Primary	17.5	1.75	2.2	insufficient genome amplification
	LNM	11.3	1.79	2.4	
21	Primary	55.2	1.79	2.2	insufficient genome amplification
	LNM	122.4	1.82	2.4	

Table.4 ターゲットシーケンス解析を施行した 16 例の患者背景

Characteristics		Median (range) / n (%)
Age, years		66 (60-78)
Sex		
	Male	12 (75%)
	Female	4 (25%)
Primary tumor site		
	Perihilar	9 (56%)
	Distal	7 (44%)
Surgical procedure		
Perihilar	MH	5 (31%)
	SSPPD	0 (0%)
	HPD	4 (25%)
	Distal	
	MH	0 (0%)
	SSPPD	5 (31%)
	HPD	2 (13%)
Main histological type		
	tub1	5 (31%)
	tub2	8 (50%)
	por	3 (19%)
T-factor of the primary tumor		
Perihilar	pT1	0 (0%)
	pT2a	5 (31%)
	pT2b	4 (25%)
Distal	pT1	0 (0%)
	pT2	2 (13%)
	pT3	5 (31%)

Family history of any carcinomas		
No	10	(63%)
Yes	6	(37%)
Neoadjuvant chemotherapy		
No	100	(100%)
Yes	0	(0%)
Adjuvant chemotherapy		
No	14	(88%)
Yes (with tegafur-gimeracil-oteracil potassium)	2	(13%)
Tumor recurrence		
No	3	(19%)
Yes	13	(81%)
Recurrent site		
Local only	0	(0%)
Lymph node	2	(13%)
Other organs (liver, lung, or bone)	4	(25%)
Local and lymph node	1	(6%)
Local and other organs	2	(13%)
Lymph node and other organs	4	(25%)

遺伝子変異 (Genomic mutations)

32 サンプルについて、77 個の非同義 (nonsynonymous) SNV と 14 個の Ins/Del、計 91 個の遺伝子変異が同定された。変異は *TP53*、*MAP3K1*、*SMAD4*、*APC*、*ARID1A* を含む 31 種の遺伝子に認められた。最も高頻度に認められたのは *TP53* の変異 (12/32 サンプル、38%) であった (Figure.5)。32 サンプル中 28 サンプル (88%) では何らかの遺伝子変異が検出された。1 サンプルあたりの変異数は 0-9 個であり、中央値は 2 個であった。検出された遺伝子変異の一覧を Figure.6 に示す。遺伝子変異プロファイルは 16 例中 13 例 (81.3%) で完全に一致していた。不一致の 1 例 (症例 11) では、リンパ節転移巣のサンプルにのみ、原発巣のサンプルでは認められなかった *CDK12* の変異が検出された。2 症例 (4 サンプル) では 160 の標的遺伝子に関する変異は検出されなかった。

EHCC の発生部位による遺伝子変異の種類、頻度の違いについても検討した。肝門部領域胆管癌 (9 例) と遠位胆管癌 (7 例) それぞれについて、検出された遺伝子変異の一覧を Figure.7 に示す。肝門部領域胆管癌では合計 38 個の遺伝子変異が検出され、1 サンプルあたりの変異数は 0-6 個、中央値は 2 個であった。一方、遠位胆管癌では合計 53 個の遺伝子変異が検出され、1 サンプルあたりの変異数は 0-9 個、中央値は 3 個であった。*TP53*、*MAP3K1*、*SMAD4*、*APC*、*NOTCH1* の 5 遺伝子については肝門部領域胆管癌と遠位胆管癌のどちらからも変異が検出されたが、他の 26 遺伝子については、いずれか一方でしか変異が検出されなかった。発生部位による明らかな pathway の違いは見いだすことができなかった。

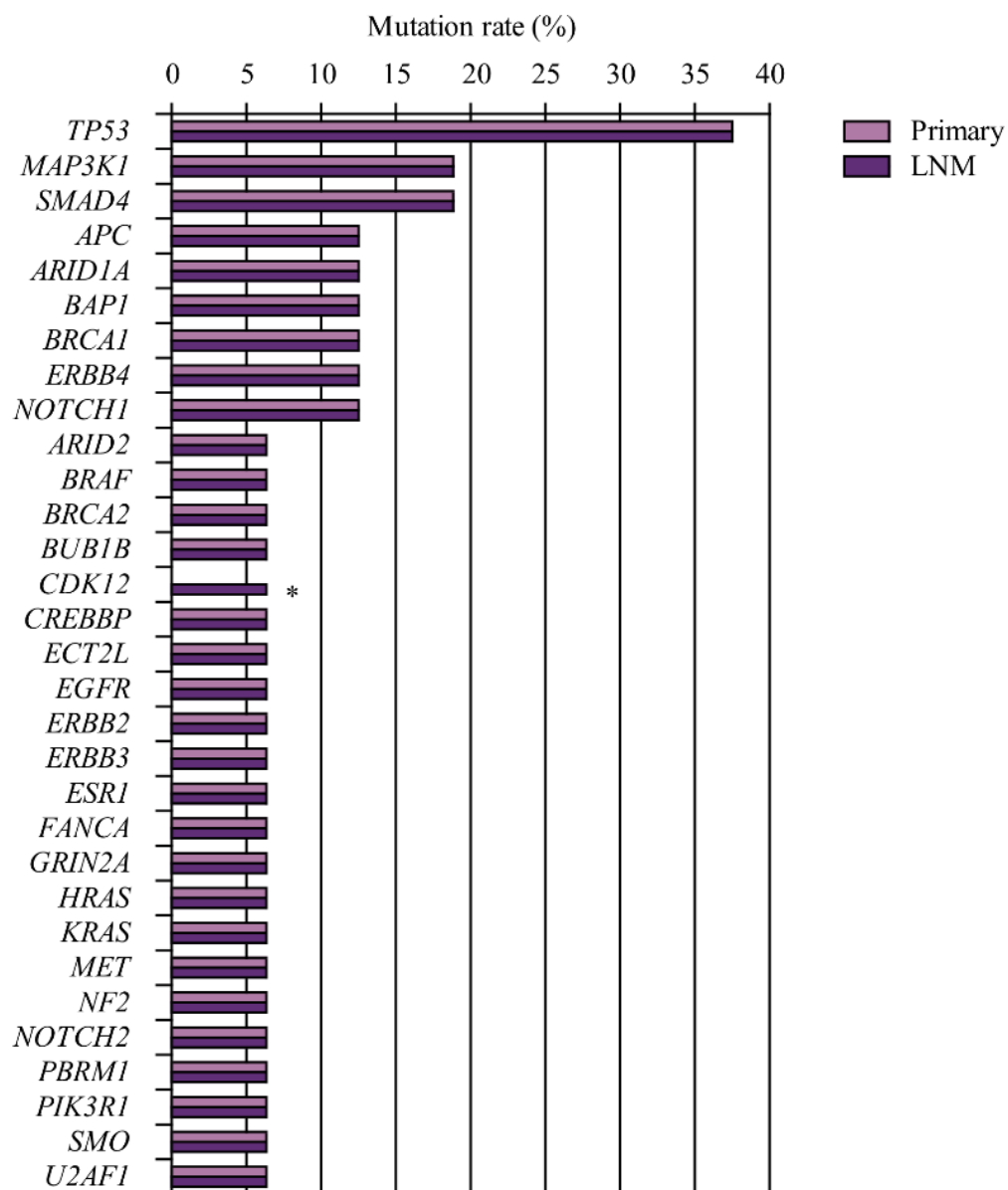


Figure.5 検出された遺伝子変異の頻度

16 症例について 31 種の遺伝子に変異が認められた。原発巣と転移巣で変異が異なっていたのは 1 例のみで、リンパ節転移巣のサンプルで *CDK12* の変異が認められた(*)。

Patient No.	5	1	2	6	4	9	8	10	7	11	16	14	15	13	12	3
Location	Distal		Perihilar		Distal		Perihilar		Distal		Perihilar		Distal		Perihilar	
Outcome	dead	dead	dead	dead	dead	dead	dead	dead	dead	dead	alive	alive	alive	alive	alive	alive
OS (months)	7	10	12	22	25	28	30	37	38	38	44	45	48	51	58	73
RFS (months)	5	5	8	13	12	9	25	13	12	13	44	4	48	33	58	62
Tumor	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
TP53																
MAP3K1																
SMAD4																
APC																
ARID1A																
BAP1																
BRC1																
ERBB4																
NOTCH1																
ARID2																
BRAF																
BRCA2																
BUB1B																
CDK12																
CREBBP																
ECT2L																
EGFR																
ERBB2																
ERBB3																
ESR1																
FANCA																
GRIN2A																
HRAS																
KRAS																
MET																
NF2																
NOTCH2																
PBRM1																
PIK3R1																
SMO																
U2AF1																

Perihilar

Distal

Concordant SNV

Concordant Ins/Del

Discordant SNV

Figure.6 16 症例の術後生存および遺伝子変異

検出された遺伝子変異のうち、原発巣とリンパ節転移巣で変異が一致していたものを緑色 (Concordant SNV) および青色 (Concordant Ins/Del) で、不一致のものを赤色 (Discordant SNV) で示した。(P, 原発巣; M, リンパ節転移巣; Perihilar, 肝門部領域胆管癌; Distal, 遠位胆管癌)

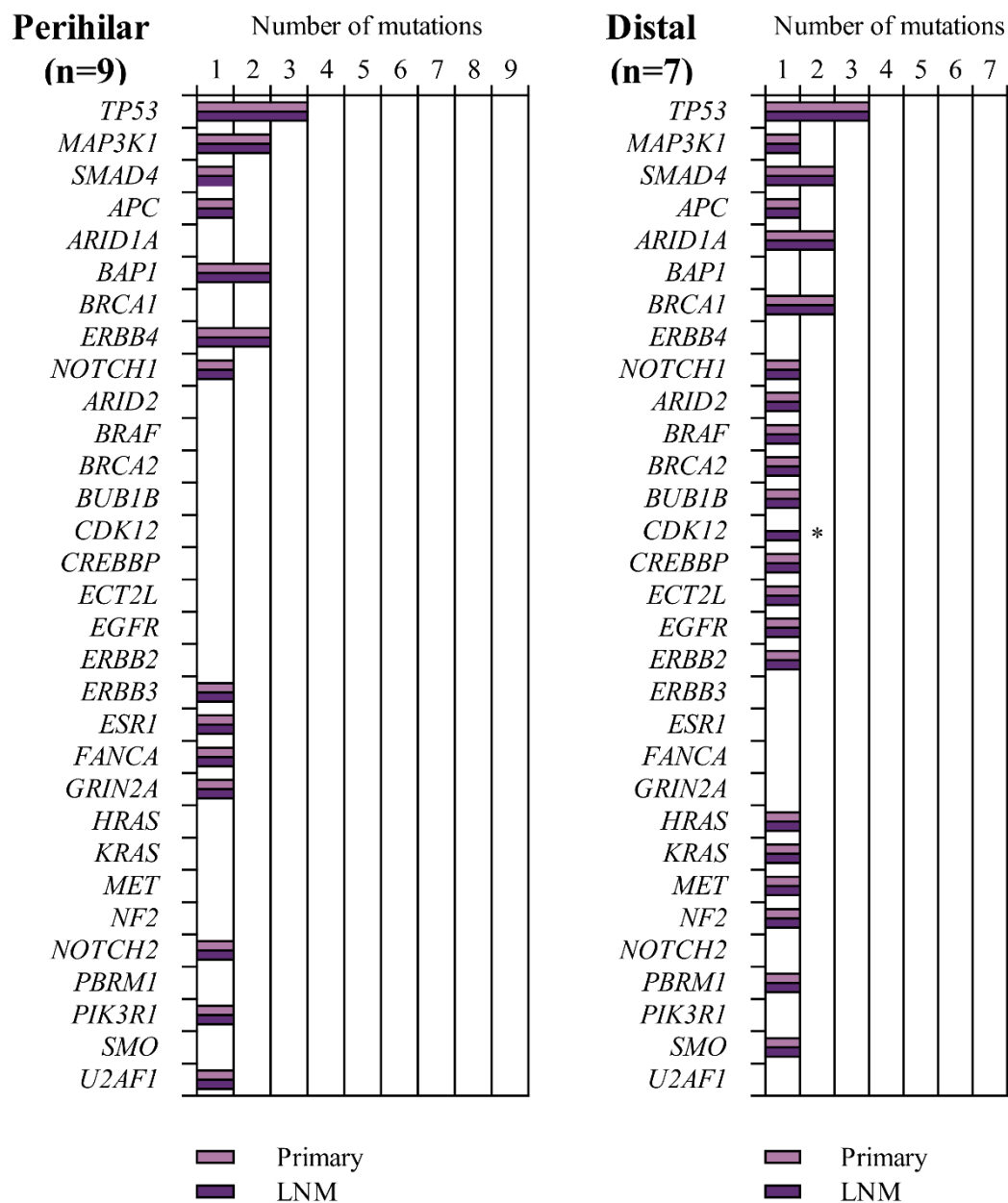


Figure.7 EHCC の発生部位別の遺伝子変異

TP53、MAP3K1、SMAD4、APC、NOTCH1 の変異は共通して認められたが、その他の遺伝子変異については、肝門部領域胆管癌と遠位胆管癌のどちらか一方でのみ変異が検出された。(Perihilar, 肝門部領域胆管癌; Distal, 遠位胆管癌; LNM, リンパ節転移巣)

コピー数多型(CNA)

本研究では、計 18 個の CNA が検出された。検出された CNA を Table.5 に示す。症例 8 で認められた 2 種の CNA (*CDK12* と *ERBB2*) については原発巣とリンパ節転移巣で一致していたが、他の 14 個の CNA に関しては原発巣とリンパ節転移巣のいずれか一方でしか検出されなかった (Figure.8)。

Table.5 検出された CNA

Patient No.	Gene (P)	Genes (LNM)	Amplification/Loss
1	<i>BRAF</i>	—	Amplification
	<i>BUB1B</i>	—	Amplification
	<i>EGFR</i>	—	Amplification
	<i>EZH2</i>	—	Amplification
	<i>IKZF1</i>	—	Amplification
	<i>MAP2K1</i>	—	Amplification
	<i>MET</i>	—	Amplification
2	—	—	—
3	<i>EP300</i>	—	Amplification
	—	<i>JAK3</i>	Loss
4	<i>SMAD4</i>	—	Loss
5	—	—	—
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	<i>BRCA1</i>	Amplification
	<i>CDK12</i>	<i>CDK12</i>	Amplification
	<i>ERBB2</i>	<i>ERBB2</i>	Amplification
	—	<i>SMARCA4</i>	Loss
9	—	—	—
10	—	—	—
11	—	—	—
12	<i>ERBB2</i>	—	Amplification
	<i>PHF6</i>	—	Amplification
13	—	—	—
14	—	—	—
15	—	—	—
16	—	—	—

(P, 原発巣; LNM, リンパ節転移巣)

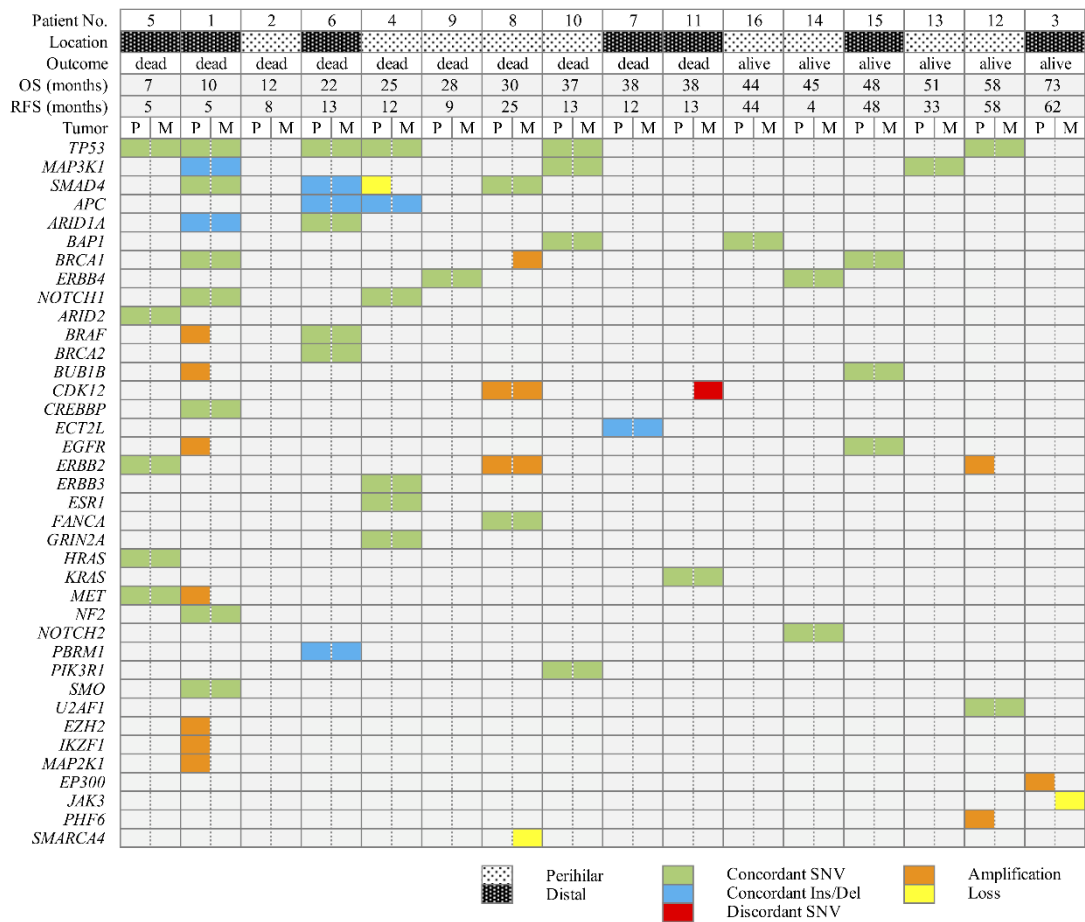


Figure.8 16 症例の術後生存および CNA を含めた遺伝子異常

検出された CNA のうち、増幅 (Amplification) を橙色で、欠失 (Loss) を黄色で示した。

遺伝子変異の個数と他の臨床病理学的因子との相関

検討した 16 例について、検出された遺伝子変異の個数で 2 群に分け、術後の全生存率について解析を行った。変異の個数が 0-4 個の群 (Low 群: 12 例) と 5 個以上の群 (High 群: 4 例) で分けたとき、生存解析の P 値が最小 ($P < 0.001$) 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 (Table.6)

Table.6 遺伝子変異の個数と他の臨床病理学的因子との二変量解析

Variables	Median (range) / n (%)				<i>P</i> -value
	Number of mutations				
	Low (0-4)		High (≥5)		
Age, years	71	(66–73)	65	(60–78)	0.089
Sex					0.182
Male	8	(67)	4	(100)	
Female	4	(33)	0	(0)	
Tumor location					0.146
Perihilar	8	(67)	1	(25)	
Distal	4	(33)	3	(75)	
Histological type of tumor					0.065
tub1, tub2	11	(92)	2	(50)	
por	1	(8)	2	(50)	
T-factor					0.350
pT2	9	(75)	2	(50)	
pT3	3	(25)	2	(50)	
Adjuvant chemotherapy					0.383
No	11	(92)	3	(75)	
Yes	1	(8)	1	(25)	

術後生存解析

術後の全生存率 (overall survival; OS) と無再発生存率 (recurrence free survival; RFS) の Kaplan-Meier 曲線を示す (Figure.9)。OS の中央値は 37 (7-73) カ月であった。観察期間中の再発は 13 例で認められ、RFS の中央値は 13 (5-62) カ月であった。遺伝子変異プロファイルと OS、RFS および再発形式、転帰を Table.7 に示す。

臨床病理学的因子と術後の全生存率のログランク検定による単変量解析では、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 (Table.8)。生存期間中央値 (median survival time; MST) は Low 群で 38.1 カ月であったのに対し、High 群で 10.4 カ月であった ($P < 0.001$)。一方、RFS については両群間で有意差を認めなかった ($P = 0.070$)。両群の術後 OS および RFS の Kaplan-Meier 曲線を Figure.10 に示す。High 群では術後予後が有意に不良であり、術後 25 カ月以内に全例死亡した。

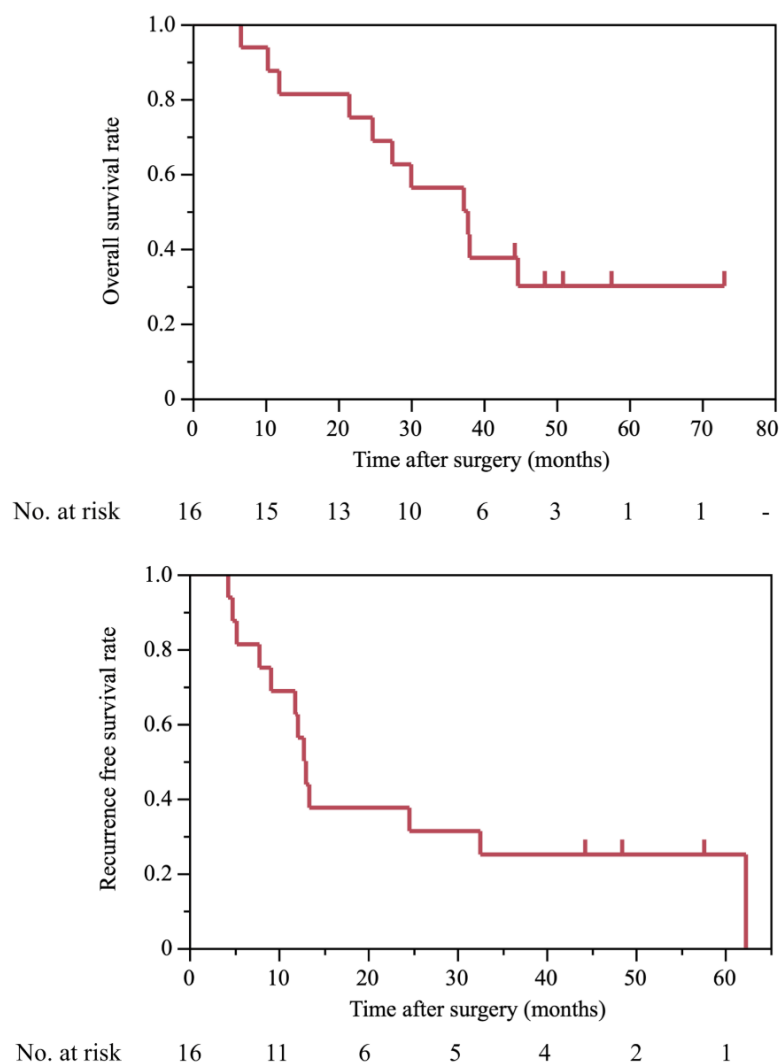


Figure.9 術後 OS と RFS の Kaplan-Meier 曲線

検討した全症例 (16 例) の、OS および RFS の Kaplan-Meier 曲線を示す。OS の中央値は 37 (7-73) カ月、RFS の中央値は 13 (5-62) カ月であった。

Table.7 遺伝子変異プロファイルと術後生存・再発・転帰

Patient No.	Mutation Profile	OS (months)	RFS (months)	Sites of recurrence	Outcome
5	<i>TP53, ARID2, ERBB2, HRAS, MET</i>	7	5	bone	dead
1	<i>TP53, MAP3K1, SMAD4, ARID1A, BRCA1, NOTCH1, CREBBP, NF2, SMO</i>	10	5	lymph node, liver, bone	dead
2	–	12	8	peritoneum	dead
6	<i>TP53, SMAD4, APC, ARID1A, BRAF, BRCA2, PBRM1</i>	22	13	lymph node, liver, lung	dead
4	<i>TP53, APC, NOTCH1, ERBB3, ESR1, GRIN2A</i>	25	12	liver	dead
9	<i>ERBB4</i>	28	9	local, liver	dead
8	<i>SMAD4, FANCA</i>	30	25	liver, peritoneum	dead
10	<i>TP53, MAP3K1, BAP1, PIK3R1</i>	37	13	lymph node, liver	dead
7	<i>ECT2L</i>	38	12	lymph node, liver	dead
11	<i>KRAS, CDK12*</i>	38	13	lymph node	dead
16	<i>BAP1</i>	44	44	–	alive
14	<i>ERBB4, NOTCH2</i>	45	4	local, lymph node	alive
15	<i>BRCA1, BUB1B, EGFR</i>	48	48	–	alive
13	<i>MAP3K1</i>	51	33	lymph node, bone	alive
12	<i>TP53, U2AF1</i>	58	58	–	alive
3	–	73	62	lymph node	alive

Table.8 臨床病理学的因子と術後生存の単変量解析

Variables	No. of patient, n (%)	MST (months)	Univariate <i>P</i>-value
Age, years			0.096
<66	8 (50)	44.3	
≥66	8 (50)	24.8	
Sex			0.450
Male	12 (75)	30.1	
Female	4 (25)	37.3	
Primary tumor site			0.734
Perihilar	9 (56)	37.3	
Distal	7 (44)	37.9	
Histological type of tumor			0.527
tub1, tub2	13 (81)	37.9	
por	3 (19)	10.4	
T-factor			0.515
pT2	11 (69)	37.3	
pT3	5 (31)	37.9	
Adjuvant chemotherapy			0.221
No	14 (88)	37.9	
Yes	2 (13)	24.8	
Number of mutations			<0.001
0-4	12 (75)	38.1	
≥5	4 (25)	10.4	

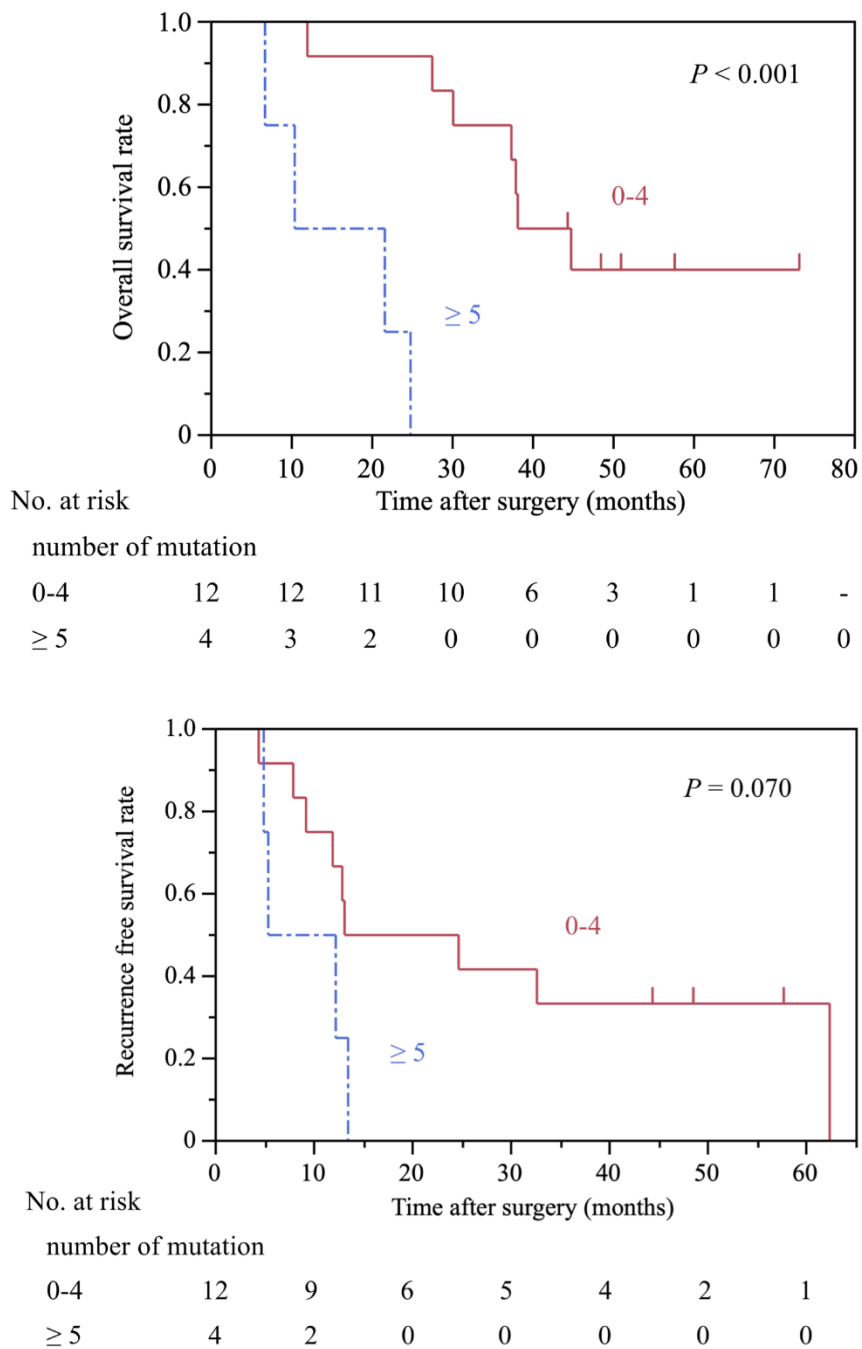


Figure.10 検出された遺伝子変異の個数と術後 OS および RFS との関係

遺伝子変異が 5 個以上の群では術後 OS が有意に不良 ($P < 0.001$) であり、術後 25 ヶ月以内に全例死亡した。術後 RFS に関しては両群間で有意差を認めなかった ($P = 0.070$)。

【考察】

本研究では EHCC の原発巣および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 のがん関連遺伝子を対象とした遺伝子パネルを用いたターゲットシーケンス解析を行った。その結果、16 例中 14 例 (88%) で遺伝子変異が同定された。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。原発巣とリンパ節転移巣との間の遺伝子変異 (SNV、Ins/Del) の一致率は極めて高かったが、CNA の一致率は低かった。

1. 遺伝子変異の一致率について

今回の検討では、遺伝子変異 (SNV、Ins/Del) の一致率は高く、81.3%であった。EHCC においては、その解剖学的特徴から、他の癌腫と比較して腫瘍が小さいうちから胆管を閉塞するため、黄疸、胆管炎などの臨床症状を来しやすいと考えられ、原発巣が成長して複数のサブクローンを形成する前に外科的切除が行われている可能性がある。実際、いくつかの研究では、根治的切除を施行された EHCC について、浸潤の深さは中央値で約 6mm であったと報告されている (de Jong et al., 2011; Aoyama et al., 2018; Shinohara et al., 2019; Zhao et al., 2019; Oba et al., 2021)。加えて、肝外胆管の壁は固有筋層を欠いており、薄い平滑筋 (線維筋層) のみを有するため、原発巣が複数のサブクローンを形成する前に癌細胞がリンパ流に乗って転移を来す可能性がある。これらは EHCC における原発巣と転移巣の遺伝子変異の一致率が極めて高い理由のひとつと考えられる。

また、本検討で対象とした 16 例の EHCC は、全例術前治療が行われていない treatment-naive な症例である。先に示した、他の癌腫における原発巣と転移巣の比較研究の多くは、treatment-naive な同時性の転移巣検体のみならず、術後療法が施行された異時性の転移再発巣検体も併せた検討である。本検討により、treatment-naive な EHCC における原発巣と同時性のリンパ節転移巣との遺伝子変異の高い一致率は示されたが、異時性の転移再発、特に術後補助療法が施行された症例の転移再発巣との遺伝子変異の一致率は検討されておらず、今後の重要な課題である。

2. CNA の一致率について

他の癌腫においては、遺伝子変異 (SNV、Ins/Del) と同様に CNA に関しても一致率は高いと報告されている (Kawamata et al, 2018)。しかし、本検討では遺伝子変異と比較して CNA の一致率は低く、同定された 18 個の CNA のうち 14 個は

原発巣あるいはリンパ節転移巣のいずれかでしか検出されなかった。不一致の 14 個の CNA のうち、原発巣にだけ認められる遺伝子増幅 (Amplification) が 10 個と高頻度であった。CNA の検出精度は対象とする腫瘍の purity (純度) と heterogeneity に影響されると報告されている (liu et al., 2013)。本研究では、DNA 抽出の際の腫瘍の切り取りを肉眼的に行っており (manual macro-dissection 法)、特にリンパ節転移巣では正常のリンパ球も少なからず含まれてしまうため、腫瘍含有率が低くなり、リンパ節転移巣で CNA が検出されなかった症例が存在する可能性がある。今後の検討課題として、より正確な CNA の検出・検討を行うために、顕微鏡を用いた micro-dissection 法で腫瘍細胞のみを切り取り、腫瘍細胞含有率を向上させる必要があると考えられる。

3. EHCC の genetic heterogeneity と新規治療開発について

変異の認められた遺伝子は 31 種であった。22 種の遺伝子変異については 16 例中 1 例 (6%) でしか変異を認めず、最も高頻度に変異を認めた *TP53* でも 16 例中 6 例 (38%) でしか変異を認めなかった。この結果は、EHCC に対する大規模な遺伝子変異解析の先行研究 (Nakamura et al., 2015; Wardell et al., 2018) と概ね一致した結果であり、この高い genetic heterogeneity により共通した遺伝子異常が見いだせないことが、EHCC に対する効果的な標的療法の開発を困難なものとしていると考えられる。胆道癌に対する標的療法についての臨床試験はいくつか行われているが (Sahu et al., 2017; Haber et al., 2019)、標準治療として確立するまでには至っていないのが現状である。これらは all comer を対象とした臨床試験であり、遺伝子異常に合わせた分子標的薬などで治療をする個別化治療 (precision medicine) とは異なるものである。既報では、胆道癌の 40-58% は治療標的となる遺伝子異常を少なくとも一つは持っているとして報告されており (Nakamura et al., 2015; Wardell et al., 2018; Xue et al., 2019)、遺伝子異常に基づく分子標的治療が良好な成績を示した例も報告されている (Bunyatov et al., 2019)。2019 年 6 月より、本邦でもがん遺伝子パネル検査が保険適応となっており、今後、EHCC を含む胆道癌患者に対する治療開発は、遺伝子異常に基づく個別化治療が主体となってくるものと思われる。

本研究から得られた知見より、リンパ節転移を有する EHCC 患者に対する個別化治療においては、原発巣を用いた遺伝子変異解析の結果が有用であると考えられる。術後治療においては、手術によって得られた原発巣検体を用いた解析を行うことができるが、術前治療についてはどの検体を対象に遺伝子変異解析を行うかが問題となる。遺伝子パネル検査の様に多数の遺伝子を網羅的に解析するには、ある程度多くの腫瘍量が必要である。しかし、内視鏡的逆行性胆管膵管造影

検査(ERCP)や経口胆道鏡検査(POCS)による生検では十分な組織量の採取が困難であることも多く、それらに変わる手法として、liquid biopsy による解析が注目されている。Zillら(Zill et al., 2015)は、胆道癌 8 例と膵癌 18 例の検討で、生検検体から検出された遺伝子変異の 90.3%が血液中の cell-free DNA の解析でも同様に検出可能であったと報告している。EHCC における liquid biopsy による解析研究が進めば、術前治療のみならず、術後の異時性の転移再発症例においても治療方針決定の有用な情報となる可能性が高く、今後更なる研究の進展が期待される。

EHCC については、*ERBB2*(*HER2*)や *ARID1A* の変異が治療標的として挙げられており、その頻度はそれぞれ 11-20%、5-12%と報告されている(Jain et al., 2016)。本研究でも両者の変異が検出されており、*ERBB2*(*HER2*)が 1 例(6%)、*ARID1A* が 2 例(13%)であった。また、胆道癌における個別化治療として、近年、*FGFR* 遺伝子の変異が治療標的として注目されている。特に IHCC で頻度が高く、13-17%と報告されているが、EHCC においては頻度が低く、5%と報告されている(Javel et al., 2018; Churi et al., 2014)。日本人の胆道癌患者 445 例について検討した本邦の多施設共同試験(PRELUDE 試験: Maruki et al, 2020)でも、*FGFR* 融合遺伝子の変異頻度は IHCC で 7.4%、EHCC(perihilar のみ)で 3.6%と報告されている。*FGFR* 阻害剤に関する臨床試験は複数行われており、*FGFR* 変異陽性の既治療進行胆管癌に対する Infigratinib (BGJ398)の Phase2 試験では、奏功率 14.8%、病勢コントロール率 75.4%であったと報告されている(Javel et al., 2018)。また、*FGFR2* 融合遺伝子陽性の既治療進行胆管癌に対する Pemigatinib (INCB054828)の Phase2 試験(FIGHT-202)では、奏功率が 35.5%、病勢コントロール率が 82.2%と良好な成績であった(Abou-Alfa et al., 2020)。本邦でも 2021 年 6 月より、がん化学療法後に増悪した *FGFR2* 融合遺伝子陽性の治癒切除不能な胆道癌に対して、Pemigatinib が保険適応となっている。本研究では、*FGFR2*と *FGFR3* について検討したが変異は検出されず、*FGFR2* 融合遺伝子については採用した遺伝子パネルに含まれていないものであった。今後、*FGFR2* 融合遺伝子についても検討を行い、治療開発の可能性を探っていくことが望まれる。

4. 遺伝子異常と術後予後予測について

術後生存解析におけるバイアスを避けるため、強力な予後不良因子となる局所進展度が T4 の症例と遠隔転移を有する症例を除外した。また、背景を極力そろえるため、組織型は adenocarcinoma (tub1、tub2、por)に限定し、他の悪性腫瘍の既往のある症例も除外して検討を行った。本研究では、リンパ節転移陽性の

EHCC 患者において、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。いくつかの研究では、遺伝子変異の個数と術後生存との有意な相関について報告されており (Nakamura et al., 2015; Goto et al., 2020)、これらの報告と同様に、本研究では検出された遺伝子変異の個数の寡多が唯一の予後予測因子として抽出された。ただし、本研究は症例数が 16 例と少なく、今後症例を増やして validation study を行っていく必要がある。また、術後生存に決定的に影響する特定の遺伝子変異や pathway を同定するためには、より大規模での検討が必要不可欠であり、今後の重要な検討課題である。

【総括および結論】

① 本研究から得られた新知見

1. 160 のがん関連遺伝子パネルを用いたターゲットシーケンス解析によって、EHCC の原発巣とリンパ節転移巣の遺伝子変異プロファイルの一致率が高いことが示された。
2. 臨床病理学的因子と全生存率の単変量解析で、遺伝子変異の個数のみが有意な予後規定因子として抽出された。

② 新知見の意義

本研究を通して得られた知見は、リンパ節転移陽性の EHCC 患者に対する新規治療法の開発・研究において、原発巣検体を対象とすることの妥当性を支持するものである。EHCC においてはリンパ節転移巣が小さく、検討が難しい場合が少なくないが、原発巣に対する検討でリンパ節転移巣を成す癌細胞の遺伝子変異の特徴をある程度捉えることが可能であると考えられる。また、遺伝子変異検索を行うことは、治療方針の決定のみならず、術後の予後予測においても有用である可能性を示唆する結果であった。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開され得るか

EHCC の原発巣の遺伝子変異解析結果をベースにした、リンパ節転移陽性患者に対する個別化治療の研究（新規治療の開発、適応症例の選択等）が進む可能性がある。

④ 今後の課題

本研究の課題として、単施設での検討であり、症例数が限定的であったことが挙げられる。今後、より大規模な多施設共同での研究が望まれる。また、用いた FFPE 検体のうち、ホルマリン固定が不良な検体や保存期間が長期に及び検討対象とならなかった検体が多く存在することも問題である。より正確な検討のためには、「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」に則った適切な検体採取を日常診療において実践する必要がある。また、本研究を実臨床に応用するにあたっては、大規模臨床試験により結果を再検証する必要がある。

【謝辞】

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授、ならびに北海道大学病院 病理診断科 松野 吉宏 教授に深く感謝いたします。

また、本研究においてご指導ご鞭撻をいただいた、北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 中西 喜嗣 特任助教、慶応義塾大学医学部 腫瘍センター ゲノム医療ユニット 特任講師 林 秀幸先生、ならびに北海道大学病院 病理診断科 三橋 智子 先生に心から感謝を申し上げます。

最後に、本研究を支えて下さった、北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ、北海道大学病院病理診断科・病理部、Mitsubishi Space Software の皆様に心より御礼を申し上げます。

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

- Abou-Alfa, GK., Sahai, V., Hollebecque, A., Vaccaro, G., Melisi, D., Al-Rajabi, R., Paulson, AS., Borad, MJ., Gallinson, D., Murphy, AG., et al. (2020). Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 21, 671-684.
- Adachi, T., Eguchi, S., Beppu, T., Ueno, S., Shiraishi, M., Okuda, K., Yamashita, Y., Kondo, K., Nanashima, A., Ohta, M., et al. (2015). Prognostic impact of preoperative lymph node enlargement in intrahepatic cholangiocarcinoma: a multi-institutional study by the Kyushu Study Group of Liver Surgery. *Ann. Surg. Oncol.* 22, 2269-2278.
- Aoyama, H., Ebata, T., Hattori, M., Takano, M., Yamamoto, H., Inoue, M., Asaba, Y., Ando, M., Nagino, M. (2018). Reappraisal of classification of distal cholangiocarcinoma based on tumour depth. *Br. J. Surg.* 105, 867-875.
- Bertucci, F., Finetti, P., Guille, A., Adelaide, J., Garnier, S., Carbuccia, N., Monneur, A., Charafe-Jauffret, E., Gonvalves, A., Viens, P., et al. (2016). Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget.* 7, 27208-27219.
- Blechacz, B. (2017). Cholangiocarcinoma: current knowledge and new developments. *Gut Liver.* 11, 13-26.
- Brandi, G., Farioli, A., Astolfi, A., Biasco, G., Tavolari, S. (2015). Genetic heterogeneity in cholangiocarcinoma: a major challenge for targeted therapies. *Oncotarget.* 6, 14744-14753.
- Brannon, AR., Vakiani, E., Sylvester, BE., Scott, SN., McDermott, G., Shah, RH. Kania, K., Viale, A., Oschwald, DM., Vacic, V., et al. (2014). Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol.* 15, 454.

Bunyatov, T., Zhao, A., Kovalenko, J., Gurmikov, B., Vishnevsky, V. (2019). Personalised approach in combined treatment of cholangiocarcinoma: a case report of healing from cholangiocellular carcinoma at stage IV.

Cejalvo, JM., Martinez de Duenas, E., Galvan, P., Garcia-Recio, S., Burgues Gasion, O., Pare, L., Antolin, S., Martinello, R., Blancas, I., Adamo, B., et al. (2017). Intrinsic subtypes and gene expression profiles in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 77, 2213-2221.

Churi, CR., Shroff, R., Wang, Y., Rashid, A., Kang, HC., Weatherly, J., Zuo, M., Zinner, R., Hong, D., Meric-Bernstam, F., et al. (2014). Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS One.* 9, e115383.

Crumley, SM., Pepper, KL., Phan, AT., Olsen, RJ., Schwarts, MR., Portier, BP. (2016). Next-generation sequencing of matched primary and metastatic rectal adenocarcinomas demonstrates minimal mutation gain and concordance to colonic adenocarcinomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 140, 529-535.

de Jong, MC., Hong, SM., Augustine, MM., Goggins, MG., Wolfgang, CL., Hirose, K., Schulick, RD., Choti, MA., Anders, RA., Pawlik, TM. (2011). Hilar cholangiocarcinoma: tumor depth as a predictor of outcome. *Arch. Surg.* 146, 697-703.

DeOliveira, ML., Cunningham, SC., Cameron, JL., Kamangar, F., Winter, JM., Lillemoe, KD., Choti, MA., Yeo, CJ., Schulick, RD. (2007). Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann. Surg.* 245, 755-762.

Goto, T., Kunimasa, K., Hirotsu, Y., Nakagomi, T., Yokoyama, Y., Higuchi, R., Otake, S., Oyama, T., Amemiya, K., Mochizuki, H., et al. (2020). Association of mutation profiles with postoperative survival in patients with non-small cell lung cancer. *Cancers.* 12, 3472.

Haber, PK., Sia, D. (2019). Translating cancer genomics for precision oncology in

biliary tract cancers. *Discov. Med.* 28, 255-265.

Hayashi, H., Tanishima, S., Fujii, K., Mori, R., Okada, C., Yanagita, E., Shibata, Y., Matsuoka, R., Amano, T., Yamada, T., et al. (2020). Clinical impact of a cancer genomic profiling test using an in-house comprehensive targeted sequencing system. *Cancer Sci.* 111, 3926-3937.

Hoehn, RS., Wima, K., Ertel, AE., Meier, A., Ahmad, SA., Shah, SA., Abbott, DE. (2015). Adjuvant chemotherapy and radiation therapy is associated with improved survival for patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 22, 1133-1139.

Jain, A., Javel, M. (2016). Molecular profiling of biliary tract cancer: a target rich disease. *J. gastrointest. Oncol.* 7, 797-803.

Jamal-Hanjani, M., Quezada, SA., Larkin, J., Swanton, C. (2015). Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin. Cancer Res.* 21, 1258-1266.

Javel, M., Lowery, M., Shroff, RT, Weiss, KH., Springfield, C., Borad, MJ., Ramanathan, RK., Goyal, L., Sadeghi, S., Macarulla, T., et al. (2018). Phase II study of BGJ398 n patients with *FGFR*-altered advanced cholangiocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 36, 276-282.

Kanai, Y., Nishihara, H., Miyagi, Y., Tsuruyama, T., Taguchi, K., Katoh, H., Takeuchi, T., Gotoh, M., Kuramoto, J., Arai, E., et al. (2018). The Japanese society of pathology guidelines on the handling of pathological tissue samples for genomic research: standard operating procedures based on empirical analyses. *Pathol. Int.* 68, 63-90.

Kawamata, F., Patch, AM., Nones, K., Bond, C., McKeone, D., Pearson, SA., Homma, S., Liu, C., Fennell, L., Dumenil, T., et al. (2018). Copy number profiles of paired primary and metastatic colorectal cancers. *Oncotarget.* 9, 3394-3405.

Kjallquist, U., Erlandsson, R., Tobin, NP., Alkods, A., Ullah, I., Stalhammar, G., Karlsson, E., Hatschek, T., Hartman, J., Linnarsson, S., et al. (2018). Exome

sequencing of primary breast cancers with paired metastatic lesions reveals metastasis-enriched mutations in the A-kinase anchoring protein family AKAPs. *BMC Cancer*. 18, 174.

Kluge, R., Schmidt, F., Caca, K., Barthel, H., Hesse, S., Georgi, P., Seese, A., Huster, D., Berr, F. (2001). Positron emission tomography with [(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose for diagnosis and staging of bile duct cancer. *Hepatol*. 33, 1029-1035.

Kovaleva, V., Geissler, AL., Lutz, L., Fritsch, R., Makowiec, F., Wiesemann, S., Hopt, UT., Passlick, B., Werner, M., Lassmann, S. (2016). Spatio-temporal mutation profiles of case-matched colorectal carcinomas and their metastases reveal unique de novo mutations in metachronous lung metastases by targeted next generation sequencing. *Mol. Cancer*. 15, 63.

Lee, H., Ross, JS. (2017). The potential role of comprehensive genomic profiling to guide targeted therapy for patients with biliary cancer. *Therap. Adv. Gastroenterol*. 10, 507-520.

Liu, B., Morrison, CD. Johnson, CS., Trump, DL., Qin, M., Conroy, JC., Wang, J., Liu, S. (2013). Computational methods for detecting copy number variations in cancer genome using next generation sequencing: principles and challenges. *Oncotarget*. 4, 1868-1881.

Lowery, MA., Ptashkin, R., Jordan, E., Berger, MF., Zehir, A., Capanu, M., Kemeny, NE., O'Reilly, EM., El-Dika, L., Jarnagin, WR., et al. (2018). Comprehensive molecular profiling of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinomas: potential targets for intervention. *Clin. Cancer Res*. 24, 4154-4161.

Maruki, Y., Morizane, C., Arai, Y., Ikeda, M., Ueno, M., Ioka, T., Naganuma, A., Furukawa, M., Mizuno, N., Uwagawa, T., et al. (2021). Molecular detection and clinicopathological characteristics of advanced/recurrent biliary tract carcinomas harboring the *FGFR2* rearrangements: a prospective observational study (PRELUDE study). *J. Gastroenterol*. 56, 250-260.

Meric-Bernstam, F., Frampton, GM., Ferrer-Lozano, J., Yelensky, R., Perez-Fidalgo, JA., Wang, Y., Palmer, GA., Ross, JS., Miller, VA., Su, X., et al. (2014). Concordance of genomic alterations between primary and recurrent breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1382-1389.

Mizuno, T., Ebata, T., Yokoyama, Y., Igami, T., Sugawara, G., Yamaguchi, J., Nagino, M. (2017). Adjuvant gemcitabine monotherapy for resectable perihilar cholangiocarcinoma with lymph node involvement: a propensity score matching analysis. *Surg. Today.* 47, 182-192.

Moorcraft, SY., Jones, T., Walker, BA., Ladas, G., Kalaitzaki, E., Yuan, L., Begum, R., Eltahir, Z., Wotherspoon, A., Montero-Fernandez, A., et al. (2017). Molecular profiling of colorectal pulmonary metastases and primary tumours: implications for targeted treatment. *Oncotarget.* 8, 64999-65008.

Morine, Y., Shimada, M., Ikemoto, T., Arakawa, Y., Iwahashi, S., Saito, YU., Yamada, S., Imura, S. (2017). Effect of adjuvant gemcitabine combined with low-dose 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy for advanced biliary carcinoma. *Anticancer Res.* 37, 6421-6428.

Murakami, Y., Uemura, K., Sudo, T., Hashimoto, Y., Nakashima, A., Kondo, N., Sakabe, R., Ohge, H., Sueda, T. (2011). Prognostic factors after surgical resection for intrahepatic, hilar, and distal cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 651-658.

Nagino, M., Ebata, T., Yokoyama, Y., Igami, T., Sugawara, G., Takahashi, Y., Nimura, Y. (2013). Evolution of surgical treatment for perihilar cholangiocarcinoma: a single-center 34-year review of 574 consecutive resections. *Ann. Surg.* 258, 129-140.

Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shiota, 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.

Nakanishi, Y., Okamura, K., Tsuchikawa, T., Nakamura, T., Noji, T., Asano, T., Matsui, A., Tanaka, K., Murakami, S., Ebihara, Y., et al. (2020). Time to recurrence after surgical resection and survival after recurrence among patients with perihilar and distal cholangiocarcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* 27, 4171-4180.

Ng, CKY., Bidard, FC., Piscuoglio, S., Geyer, FC., Lim, RS., de Bruijn, I., Shen, R., Pareja, F., Berman, SH., Wang, L., et al. (201). Genetic heterogeneity in therapy-naïve synchronous primary breast cancers and their metastases. *Clin. Cancer Res.* 23, 4402-4415.

Noji, T., Kondo, S., Hirano, S., Tanaka, E., Suzuki, O., Shichinohe, T. (2008). Computed tomography evaluation of regional lymph node metastases in patients with biliary cancer. *Br. J. Surg.* 95, 92-96.

Oba, M., Nakanishi, Y., Amano, T., Okamura, K., Tsuchikawa, T., Nakamura, T., Noji, T., Asano, T., Tanaka, K., Hirano, S. (2021). Stratification of postoperative prognosis by invasive tumor thickness in perihilar cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 28, 2001-2009.

Ohtani, T., Shirai, Y., Tsukada, K., Muto, K., Hatakeyama, K. (1996). Spread of gallbladder carcinoma: CT evaluation with pathologic correlation. *Abdom. Imaging.* 21, 195-201.

Rizvi, S., Gores, GJ. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology.* 145, 1215-1229.

Sahu, S., Sun, W. (2017). Targeted therapy in biliary tract cancers-current limitations and potentials in the future. *J. Gastrointest. Oncol.* 8, 324-336.

Schrijver, W., Selenica, P., Lee, JY., Ng, CKY., Bruke, KA., Piscuoglio, S., Berman, SH., Reis-Filho, JS., Weigelt, B., van Diest, PJ., et al. (2018). Mutation profiling of key cancer genes in primary breast cancers and their distant metastases. *Cancer Res.* 78, 3112-3121.

Seo, S., Hatano, E., Higashi, T., Nakajima, A., Nakamoto, Y., Tada, M., Tamaki,

N., Iwaisako, K., Mori, A., Doi, Ryuichiro., et al. (2008). Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts lymph node metastasis, P-glycoprotein expression, and recurrence after resection in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery*. 143, 769-777.

Shinohara, K., Ebata, T., Shimoyama, Y., Nakaguro, M., Mizuno, T., Matsuo, K., Nagino, M. (2019). Proposal for a new classification for perihilar cholangiocarcinoma based on tumour depth. *Br. J. Surg.* 106, 427-435.

Sobin, LH., Gospodarowicz, MK., Wittekind, C. (2009). International union against cancer UICC TNM classification of malignant tumours 7th edn. Wiley-Blackwell: Oxford, pp 122-128.

Tang, MH., Dahlgren, M., Brueffer, C., Tjitrowirjo, T., Winter, C., Chen, Y., Olsson, E., Wang, K., Torngren, T., Sjostrom, M., et al. (2015). Remarkable similarities of chromosomal rearrangements between primary human breast cancers and matched distant metastases as revealed by whole-genome sequencing. *Oncotarget*. 6, 37169-37184.

Vakiani, E., Janakiraman, M., Shen, R., Sinha, R., Zeng, Z., Shia, J., Cercek, A., Kemeny, N., D'Angelica, M., Viale, A., et al. (2012). Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 30, 2956-2962.

Vignot, S., Frampton, GM., Soria, JC., Yelensky, R., Commo, F., Brambilla, C., Palmer, G., Moro-Sibilot, D., Ross, JS., Cronin, MT., et al. (2013). Next-generation sequencing reveals high concordance of recurrent somatic alterations between primary tumor and metastases from patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 2167-2172.

Vignot, S., Lefebvre, C., Frampton, GM., Meurice, G., Yelensky, R., Palmer, G., Capron, F., Lazar, V., Hannoun, L., Miller, VA., et al. (2015). Comparative analysis of primary tumour and matched metastases in colorectal cancer patients: evaluation of concordance between genomic and transcriptional profiles. *Eur. J. Cancer*. 51, 791-799.

Wardell, CP., Fujita, M., Yamada, T., Simbolo, M., Fassan, M., Karlic, R., Polak, P., Kim, J., Hatanaka, Y., Maejima, K., et al. (2018). Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. *J. Hepatol.* 68, 959-969.

Xie, F., Zhang, Y., Mao, X., Zheng, X., Han-Zhang, H., Ye, J., Zhao, R., Zhang, X., Sun J. (2018). Comparison of genetic profiles among primary lung tumor, metastatic lymph nodes and circulating tumor DNA in treatment-naïve advanced non-squamous non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 121, 54-60.

Xue, L., Guo, C., Zhang, K., Jiang, H., ang, F., Dou, Y., Liu, X., Lin, H., Dong, X., Zhao, S., et al. (2019). Comprehensive molecular profiling of extrahepatic cholangiocarcinoma in Chinese population and potential targets for clinical practice. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 8, 615-622.

Zhao, Y., Nakanishi, Y., Ogino, M., Oba, M., Okamura, K., Tsuchikawa, T., Nakamura, T., Noji, T., Asano, T., Tanaka, K., et al. (2019). Validation study of tumor invasive thickness for postoperative prognosis in 110 patients who underwent pancreatoduodenectomy for distal cholangiocarcinoma at a single institution. *Am. J. Surg. Pathol.* 43, 717-723.

Zill, OA., Greene, C., Sebisano, D., Siew, L., Leng, J., Vu, M., Hendifar, AE., Wang, Z., Atreya, CE, Kelley, RK., et al. (2015). Cell-free DNA next-generation sequencing in pancreatobiliary carcinomas. *Cancer Discov.* 5, 1040-1048.

Zou, SM., Li, WH., Wang, WM., Li, WB., Shi, SS., Ying, JM., Lyu, N. (2018). The gene mutational discrepancies between primary and paired metastatic colorectal carcinoma detected by next-generation sequencing. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 144, 2149-2159.

小田義直, 畑中豊, 桑田健, 森井英一, 金井弥栄, 落合淳志. (2018). ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規程. 日本病理学会.