

【要約】

The efficacy of bile liquid biopsy in the diagnosis and treatment of biliary tract cancer

(胆道癌診療における胆汁リキッドバイオプシーの有用性)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：加藤直也教授)

三浦義史

【背景】胆道癌は診断が困難かつ予後不良な癌腫のひとつである。Endoscopic Retrograde Endoscopic Cholangiopancreatography(ERCP)時の生検などによる組織診断が確定診断となるが、透視下で行われる手技であるため正確な生検が困難なことが背景にある。胆汁細胞診の感度は 30%-40%、胆管生検の感度も 40-50%程度と低い。^{*1} 近年、腫瘍由来の遺伝子変異を標的とした様々な新規治療薬が開発されてきており遺伝子解析の重要性が高まっている。胆道癌においては国際共同研究により 32 のドライバー遺伝子が同定されており、Target Sequence が可能である。^{*2} 遺伝子解析のためには組織検体を採取する必要があるが、非手術例や遠隔転移のない症例については胆管生検が主体となり、前述のように解析のための検体の採取方法としては十分な精度とは言えず、検体量も微小であり十分でない。組織採取が困難な場合、液状検体から腫瘍由来の cell free DNA(cfDNA)などの微小成分を解析する Liquid biopsy という手法が発展してきている。しかし、遠隔転移のないような局所病変、早期癌については血清での検出率は低下することが複数の癌腫による検討で知られており限局性の病変については血清以外の、病変部により関連性のある液状検体の方が望ましい可能性がある。^{*3} 胆道癌においては ERCP 時に胆汁の採取が可能であり、胆道に露出した腫瘍組織から脱落した細胞の含有が期待される。胆汁採取は生検等と比較して容易に採取でき、追加の身体侵襲を伴わない。胆汁のリキッドバイオプシーについては少数例の報告があり、胆嚢癌を対象とした既報では細胞診の感度が 46%に対して、リキッドバイオプシーによる遺伝子診断の感度は 58%であった。^{*4} また、良悪性を含む胆道狭窄症について病理診断と遺伝子診断の組み合わせについて検討した報告があり、病理診断の感度 50%から 74%へ、特異度 99%から 100%へと重ね合わせ効果を認めており、病理診断と遺伝子診断を組み合わせることが診断においても有用な可能性が示唆されていた。^{*5} 胆汁リキッドバイオプシーによる胆道狭窄症の鑑別において、良性狭窄群を含む十分な症例数の報告はなく、今回我々は胆道狭窄症例の胆汁細胞診検体を中心に Target Sequence との併用による検査精度の検討と、併せて治療標的となる遺伝子変異が胆汁から同定できるかを検討した。

【方法】研究デザインは後方視的観察研究で 2018 年 4 月 - 2021 年 3 月にかけて千葉大学医学部附属病院で ERCP を行い、胆道狭窄を認めた 72 例を対象とした。悪性狭窄 43 例の内訳は肝門部胆管癌 24 例、胆嚢癌 10 例、遠位胆管癌 5 例、肝内胆管癌 4 例であった。良性狭窄 29 例の内訳は原発性硬化性胆管炎(PSC) 9 例、IgG4 関連胆管炎ないし自己免疫性膵炎(IgG4-related disease, IgG4RD) 5 例、慢性膵炎 3 例、その他狭窄（術後狭窄、Mirizzi 症候群等）12 例であった。悪性狭窄例は CT、MRI の画像上、増大傾向のある腫瘍性病変、脈管浸潤、遠隔転移を認める例ないし生検や手術検体の組織診断で悪性の診断となった例を対象とした。胆道癌以外の悪性腫瘍による狭窄例は除外した。良性狭窄例は 6 ヶ月のフォロー期間で病変の増悪を認めない胆道狭窄例とした。また胆道癌以外の悪性腫瘍の併存例、胆汁採取時点で化学療法導入後、合併症リスクが高い、ないし同意が得られない例は除外した。

【検体採取】胆汁は ERCP 時、造影カテーテルのカニューレ直後に採取し 2-3mL を胆汁細胞診に用い、残りの 2-4mL を保存用に取り分けた。保存用の胆汁は 24 時間以内に 20000G、10 分で遠心分離し上清と沈渣に分け、-80°C の冷凍庫に保存した。胆管生検組織は ERCP 時に生検鉗子で狭窄部から 2-3 回採取した。手術検体は手術時の切除検体のホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)組織を使用した。病理診断は千葉大学病院の病理診断科で行った。血液検体は ERCP 直前に採取し、20000G、10 分で Buffy coat と上清に遠心分離し、-80°C の冷凍庫に保管した。

【DNA 抽出】胆汁沈渣、手術検体の FFPE 標本、Buffy coat から QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を使用して DNA の抽出を行い、nano drop 8000(Thermo Fisher Scientific)で定量を行った。胆汁上清 1-2cc から cell free DNA Isolation kit(Thermo Fisher Scientific)を使用し、King fisher duo prime2(Thermo Fisher Scientific)で cfDNA の自動抽出を行った。cfDNA の定量は Qbit(Thermo Fisher Scientific)を用いた。

【遺伝子解析】抽出した DNA または cfDNA から Ion Ampliseq Library Kit 2.0(Thermo Fisher Scientific)を使用してライブラリ作成を行った。multiplex PCR を施行し、プライマー配列の除去、アダプタライゲーション、精製を行い Library を作成した。Multiplex PCR には胆膵癌に高頻度に同定されるドライバー遺伝子(Significantly Mutated Genes)を標的とした胆膵癌パネル(60 遺伝子、280,220bp)を用いた。^{*6} Multiplex PCR は 99°C 2 分、99°C 15 秒、60°C 8 分を 1

サイクルとし、DNAは21サイクル、Cell Free DNAは25サイクルで増幅を行った。テンプレート調整後、Ion Chef (Thermo Fisher Scientific)によりエマルジョンPCRと半導体チップローディングを施行し、Ion Proton(Thermo Fisher Scientific)を使用してNGSを実施した。得られたシーケンスデータの処理にはIon Torrent Suite Software(Torrent Suite version 5.0.4 ; Thermo Fisher Scientific)を用いた。体細胞変異は白血球をリファレンスとし同定した。生殖細胞系列変異は白血球で同定された変化(バリエント)をヒトゲノムのリファレンス配列であるhg19と比較して同定した。アミノ酸変化の機能解析はPolyphen、SIFTを用いて評価した。Coverage depth ≥ 100 , Variant allele frequency (VAF) $\geq 5\%$, p値0.05をカットオフ値とした。発がんに関連する変異、ならびに治療標的となる遺伝子変異の同定はOncoKBにてアノテーションした。*7

【統計解析】カテゴリーデータについてはFisher検定等の一般的な統計学的手法を用いた。検査の重ね合わせの検討にはMcNemar testを用いた。P値は0,05未満を統計学有意とした。解析にはSPSS version26 (IBM)を用いた。

【結果】年齢の中央値は良性群66歳(interquartile range[IQR] 23-88), 悪性群74歳(IQR, 68-79)で有意差は認められなかった(p=@)。胆汁中のCell free DNA濃度中央値は良性1300ng/ml, 悪性560ng/mlで有意差は認められなかった。(P=0.12) 良性群では21%(6/29)から腫瘍性変異が同定された。(PSC 3例, IgG4RD 2例, 先天性胆道拡張症 1例) 良性狭窄群から検出された腫瘍性変異の内訳はKRAS, BRCA2がそれぞれ2例(7%), SMAD4, ERBB2, GNASがそれぞれ1例(3%)であった。悪性群においては47%(20/43)から腫瘍性変異が同定された。悪性狭窄群から検出された変異の内訳はTP53が13例(30%), KRASが4例(9%), ELF3が3例(7%), SMAD4, ERBB2, ARID1A, KMT2Cがそれぞれ2例(5%), ARID2, BRCA2, PBRM1, ERBB3, BRAF, FGFR2, IDH1, ATM, PIK3CA, STK11, RNF43がそれぞれ1例(2%)であった。悪性群において細胞診Class I-IIIの胆汁に対してClass IV-Vの胆汁で有意に変異の検出率が高かった。(35%[11/31] vs 75%[9/12], P=0.012)

【診断能】細胞診の感度は27.9%(95%CI:0.153-0.437), 特異度は100%(95%CI:0.828-1.000), 正確性は56.9%(95%CI:0.447-0.686)であった。胆管生検の感度は48.8%(95%CI:0.333-0.645), 特異度は100%(95%CI:0.828-1.000), 正確性は69.4%(95%CI:0.575-0.798)であった。遺伝子診断については腫瘍性変異の検出を悪性とした場合、感度46.5%(95%CI:0.312-0.623), 特異度79.3%(95%CI:0.603-0.920), 正確性59.7%(95%CI:0.475-0.943)であった。細胞診検査と遺伝子診断の組み合わせ効果をMacNemar検定で検討すると、感度53.5%(P<0.001), 正確性63.9%(P=0.332)となり、有意な感度の上昇が見られた。

【組織との一致】手術例17例について組織と胆汁の遺伝子変異を比較すると64.7%(11/17)で共通した変異が同定され、胆汁から変異が検出された例に限ると84.6%(11/13)で共通した変異が同定された。

【治療標的となる変異】胆汁中から同定された変異の内、Food and Drug Administration(FDA)で承認されている治療薬のある変異を26%(11/43)の悪性狭窄例で認めた。変異の内訳はKRAS 4例, ATM 2例, BRCA2, BRAF, ERBB2, IDH1, PIK3CAがそれぞれ1例であった。ATM, BRCA2に対してはOlaparib, BRAFに対してはVemurafenib, ERBB2に対してはTrastuzumab, PIK3CAに対してはAlpelisibが, KRASについてはG12C変異に対してSotorasibが治療標的とする変異である他、特にIDH1についてはIvosidenibが胆道癌に対しての有効性をClarIDHy試験で示しており、実臨床への使用が期待されている。*8

【考察】本研究は良悪性を含めた胆道狭窄症の診断において胆汁によるLiquid biopsyとTarget sequenceの有用性の検討を行った最初の報告になる。結果では胆汁細胞診とLiquid biopsyを組み合わせることで感度の有意な上昇が認められたものの、精度についての有意差は認められなかった。細胞診Class I-IIIの明らかな腫瘍細胞が同定できない胆汁検体からも腫瘍由来のcfDNAが検出されたことで感度の上昇が見られたものの、良性狭窄例においても腫瘍由来の変異が検出されたことが要因であった。しかし、良性狭窄例に分類されて変異が同定された症例についてはPSCなどの慢性炎症を来す胆道癌の高リスク群を含んでおり、PSCでも変異が検出された例と、変異が検出されなかった例で今後長期経過を追った際に何らかの違いが生じる可能性はある。もし変異が検出された症例において早期に発癌が認められた場合、今回の検討以上にリキッドバイオプシーの精度は高いものと思われる。実際に今回の検討症例の中でも、検査時点では下部胆管に狭窄があり、自己免疫性膵炎による下部胆管狭窄疑い

でフォローとなった例で、観察期間中に病変の増悪を認め、胆嚢管癌の診断となった症例があった。同症例の胆汁細胞診は Class III であったがリキッドバイオプシーでは *TP53*, *ARID1A* の腫瘍性の変異が同定されていた。このことから、悪性の病理学的診断がされなかった例においても変異が検出された場合、画像所見の再評価や、より短い間隔でのフォローアップを行うことは早期診断につながる可能性があり、リキッドバイオプシーの有用性が期待される。また、本研究においては組織検体と一致した変異が胆汁細胞診から高率に検出されていた。一部の症例で腫瘍組織とリキッドバイオプシーで一致しない変異が検出されているものの、検出元の腫瘍組織の DNA は切り出した切片の一部から抽出されたものであり腫瘍全体の変異を反映したものではないことも一因である。胆汁のリキッドバイオプシーは腫瘍内の *heterogeneity* を克服することができる有用な手段と考えられ、胆汁中から同定された治療標的となる変異に対する治療は、標準治療としての選択肢の少ない胆道癌においては、治療機会を増やすことにつながり、有益であるとともに、予後延長に寄与する可能性がある。今回悪性胆道狭窄症例の胆汁から治療標的となる変異が同定されており、特に近年 FDA で胆道癌に対して承認を得た *IDH1* が胆汁中からも検出できたことは、胆汁を組織検体の代用として利用しうる結果の一つであった。一方で *Sequence* 検査自体はコストの高い検査であり検査を行うにあたっては期待値の高い検体を用いる必要がある。期待値の低い検体を *Sequence* に出して変異が検出されず、患者の治療選択肢が狭まることは悲劇的である。今回の検討において、Class I-III の胆汁検体と比較し Class IV-V の検体で有意に変異が同定されやすく、Class IV-V では 83% と大半の症例で腫瘍由来の変異が同定されていた。このことから、胆道癌の治療選択において、生検等で組織検体の採取が困難な場合、Class IV-V 相当の胆汁検体が採取されているのであれば、同検体をリキッドバイオプシーに用いて治療標的遺伝子変異を探索することは、*Sequence* 可能な生検検体を採取するために繰り返し ERCP を行うよりも患者への負担は少ないものと考えられる。本研究の限界として後ろ向き試験であること、実際のコホートと比べると PSC 症例が多いことがあり、実臨床におけるリキッドバイオプシーの正確性は更に高いことが予想され、他施設での前向き試験を行うと更にリキッドバイオプシーの有用性を支持する結果が出る可能性がある。また今回の検討では治療標的となる変異は胆汁中から 26% の例でしか認められなかったが、治療を目的とした解析には適さないと思われた胆汁細胞診 Class I-III の検体が多かったため、Class IV-V の検体中心に解析を行えばより高頻度に治療適応となる変異が同定されることが見込まれる。

【結論】胆汁リキッドバイオプシーは、胆道狭窄症例の良悪性の鑑別において診断感度を向上させた。また、治療標的遺伝子変異の同定も可能であり、治療選択肢が拡大する可能性が示唆された。悪性の診断がつかなくても胆汁中から腫瘍性の変異が検出された例については慎重な経過観察が必要と考えられた。また、組織検体が採取困難な症例ではゲノム解析の代替手段としてリキッドバイオプシーが有用と考えられた。

【参考文献】

- *1 Navaneethan U, Njei B, Lourdasamy V, Konjeti R, Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 2015 81(1):168-76. DOI: 10.1016/j.gie.2014.09.017
- *2 Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 2015 47(9):1003-10. DOI: 10.1038/ng.3375
- *3 Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early - and late - stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 19;6(224):224ra24. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094
- *4 Kinugasa H, Nouse K, Ako S, et al. Liquid biopsy of bile for the molecular diagnosis of gallbladder cancer. *Cancer Biol Ther.* 2018 19(10): 934-938. DOI: 10.1080/15384047.2018.1456604
- *5 Singhi AD, Nikiforova MN, Chennat J, et al. Integrating next-generation sequencing to endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP)-obtained biliary specimens improves the detection and management of patients with malignant bile duct strictures. *Gut.* 2020 69(1):52-61. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317817
- *6 Hirotsu Y, Otake S, Ohyama H, et al. Dual-molecular barcode sequencing detects rare variants in tumor

and cell free DNA in plasma. Sci Rep. 2020 25;10(1):3391. DOI: 10.1038/s41598-020-60361-3.

*7 Okawa Y, Ebata N, Kim NK, et al. Actionability evaluation of biliary tract cancer by genome transcriptome analysis and Asian Knowledge Base. Oncotarget, 2021 12(15):1540-1552. DOI: 10.18632/oncotarget.28021

*8 Abou-Alfa GK, Macarulla T, Javle MM, et.al. Ivosidenib in *IDH1*-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol.2020 21(6):796-807. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30157-1