

【要約】

Investigation of carcinogenic risk in pancreaticobiliary  
maljunction using molecular profiling

(分子プロファイリングを用いた膵・胆管合流異常  
における発癌リスクの検討)

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)

遠山 翔大

胆嚢や胆管の粘膜から発生する胆道癌（Biliary tract cancer: BTC）は、地理的な発生率の差異を示し、北米では10万人あたり2.33-2.35人、欧州では10万人あたり2.00-3.59人、南米では10万人あたり2.73-12.42人と差がある。本邦においては年間2万人以上が診断され日本におけるBTCの発症率は10万人あたり17人で、5年生存率は胆嚢がんで39.8%、胆管癌で24.2%である。BTCは通常進行期で診断され、予後不良である。BTCのリスク要因には、胆石、胆道感染症、肥満、糖尿病、非アルコール性脂肪肝疾患、膵・胆管合流異常（Pancreaticobiliary maljunction: PBM）などが挙げられる。

PBMは、膵管と胆管が十二指腸壁外で接合している先天異常であり、胆道癌の高リスクである。PBMは先天性胆道拡張症を伴う型と胆管拡張を伴わない非拡張型に分類される。本邦の全国調査によるとPBM患者2,561人の登録患者のうち、胆道拡張症を伴う方では胆嚢がん6.9%、胆管がん13.4%と高率に発癌することが報告されている。非拡張型では胆嚢がん3.1%、胆管がん37.4%と、胆嚢がんをより高率に発癌することが報告されている。健常人と比べ遥かに発癌リスクが高く、若年での発癌も見られることからPBM患者におけるBTCの高発症率は、この疾患の病態生理を理解する上で極めて重要である。

PBMにおける発癌メカニズムは、膵液が胆管に逆流することにより、タンパク分解酵素である膵酵素、ホスホリパーゼA2、および変異誘発性物質が胆管上皮に逆流し、炎症が引き起こされる。この有害物質への曝露により、胆管上皮に過形成変化が引き起こされ、異形成、そして癌へ至ると推定されている。PBMを背景に発癌した患者の癌部およびその周辺上皮では、KRAS遺伝子およびTP53遺伝子における変異の頻度が高いことが報告されている。そのため、PBM患者の胆嚢における過形成は、遺伝的に前癌状態であり、BTCの多段階発癌における初期の事象であると考えられている。すなわち、PBMに由来する胆道癌はPBMのない胆道癌とは発生過程が異なるため遺伝的背景に差異が生じている可能性があるが、既報ではKRASやTP53といった限られた遺伝子変異の報告に留まっているため依然として不明である。また、PBMが明らかとなった時点で予防的切除が実施されるが、肝管空腸吻合部狭窄や肝内結石など長期経過後の合併症の問題もあり、予防的切除のタイミングについては議論の余地がある。

近年、大規模研究により胆道癌に高頻度に変異する遺伝子が明らかになっており注目されている。本研究では、PBM患者におけるBTC発癌の遺伝子プロファイルを明らかにするために、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(Laser capture microdissection: LCM)により分離した胆嚢癌および正常隣接組織を用いて、60の癌関連遺伝子の次世代シーケンシングを行った。

本研究では、2014年4月から2024年3月までに千葉大学医学部附属病院および山梨県立中央病院で外科的切除を受けたPBMと診断された患者を対象とした(n=9)。PBMは、MRCP（磁気共鳴胆管膵管撮影）またはERCP（内視鏡的逆行性胆管膵管撮影）で確認される、膵管と胆管が十二指腸壁外で合流している患者と定義した。切除組織をレトロスペクティブに解析した。

本研究はヘルシンキ宣言に従って実施され、山梨県立中央病院臨床研究事務局と千葉大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得ている(山梨県立中央病院臨床研究事務局:管理番号ゲノム H26-7、千葉大学大学院医学研究院倫理委員会:承認番号生 1101)。

この研究には、PBM with BTC(n=4)、PBM without BTC(n=5)、Non-PBM with BTC(n=8)が含まれた。各群の平均年齢(平均±標準偏差)は58.3±14.0歳、46.4±8.7歳、76.5±7.1歳で、男女比はそれぞれ100、80、33%であった。PBM with BTC患者のUICC病期は、I期0%、II期25%、IIIA期25%、IIIB期25%、IVA期0%、IVB期0%であった。Non-PBM with BTC患者のUICC病期は、I期0%、II期50%、IIIA期33%、IIIB期17%、IVA期0%、IVB期0%であった。

まず膵胆管合流異常を背景に胆道癌を合併した4症例を解析した。各症例について、LCMを用いて5-10の組織サンプルを採取し、パネルシーケンスを実施した。症例1では、肉眼および顕微鏡観察により、癌、異形成、過形成、正常上皮といった明確な組織学的領域が確認された。パネルシーケンスの結果、癌部と周囲の過形成粘膜および異形成粘膜において異なるDriver変異が確認された。具体的には、TP53、ARID2、APCなどの癌遺伝子変異が主に癌部に集中して見られた一方で、過形成や異形成粘膜ではこれとは異なる変異が検出された。また、正常胆管においても、BRCA遺伝子変異が点在していることが確認された。残りの3症例についても同様にパネルシーケンスを実施したところ、すべての症例において多様なoncogenic mutationが確認された。これらの変異は、癌部、異形成粘膜、過形成粘膜それぞれで特徴的な分布を示し、腫瘍周囲組織が腫瘍進展に伴い異なる遺伝子変異を蓄積していることが示された。次いで、5名の未発癌のPBM患者を解析した結果、2名には特筆すべき遺伝子変異は認められなかった。また、1名にはARID2、ARID1A、STK11遺伝子の変異が確認されたものの、ほとんどの変異は発癌において重要な変異ではなかった。これらの結果から、BTCを発症していないPBM患者の胆管組織では、悪性形質への変化が最小限である可能性が示唆される。続いて、合流異常を伴わない胆道癌の合計8症例を解析した。それぞれの症例で腫瘍領域1箇所と非腫瘍領域1~3箇所を解析した。結果は、腫瘍領域では、TP53やKRASなどのoncogenic mutationが確認され、これらは胆道癌におけるドライバー変異として既報で報告されているものと一致していた。一方で、非腫瘍領域ではこれらのoncogenic mutationはほとんど見られなかった。

本研究では60の癌関連遺伝子を元にしたパネルシーケンスを行いPBMにおける遺伝子変異の特徴を示すことができた。PBM患者のうち、癌発症例のみならず予防的切除施行例についても解析し、各症例において病理学的に組織像の異なる複数個所の組織をLCMにより正確に分離し、癌部のみならず背景粘膜についても詳細に検討し、背景粘膜においても多様な遺伝子変異が起きていることを明らかにした。さらに、PBMのない胆嚢癌患者の癌部、非癌部の遺伝子プロファイルも解析しPBM患者と比較することで、PBMが胆道粘膜の遺伝子に及ぼす影響を評価することができた。

合流異常を背景とした発癌例では癌部と周囲の異形成粘膜・過形成粘膜で異なる Driver 変異が観察された。特に癌部では TP53、ARID2、APC などの癌遺伝子変異が主に集中して見られた一方、過形成や異形成粘膜ではこれとは異なる変異が検出された。これらの変異は、発癌の異なる段階で蓄積されたものであり、それぞれの組織領域が発癌の多段階的プロセスを反映していることが示唆された。

また、予防的切除例では、発癌例の背景粘膜と異なり、背景粘膜にほとんど遺伝子変異が認められなかった。予防的切除例では比較的年齢が若い症例が多く、危険因子に暴露される期間が短いことが遺伝子変異の蓄積に至らない要因として作用している可能性がある。これらの結果から、PBM 発癌例では多様な遺伝子変異が多段階的に蓄積されている一方、発癌していない予防的切除例では、発癌閾値に達しておらず、背景粘膜が比較的安定していることが明らかとなった。

本邦の胆道癌診療ガイドラインでは、膵胆管合流異常が診断された場合、胆道癌発癌予防のために早期に予防的切除を行うことが推奨されている。特に若年例での早期切除は、遺伝子変異の蓄積を防ぎ、将来的な発癌リスクを低下させる重要な戦略であると考えられる。その一方、若年で診断され、手術が行われると晩期合併症である吻合部狭窄や肝内結石などにより QOL の低下など来す可能性がある。今回の研究では予防的切除検体においては背景粘膜に遺伝子異常が起きていない症例が多く、その時点では発癌リスクが高くない可能性が示唆された。そのため若年例でかつ変異が多くない症例では待機的な手術も選択肢となり得ると考える。胆管粘膜生検は侵襲が大きいことやサンプリングエラーの可能性も懸念される。我々の施設では胆汁の Liquid biopsy により組織と同程度の感度で遺伝子変異を同定できることを報告しており、胆道背景粘膜全体の変化を反映している可能性がある。そのため、胆汁を用いた Liquid biopsy による遺伝子解析によりリスクの層別化を図ることができ、今後さらなる研究を進めていく予定である。

本研究デザインは後方視的研究であった。また、限られた施設からの症例であり胆道癌を伴う PBM 症例が少なかったため、より多くの症例を追加し評価することが望ましい。しかしながら、各症例の粘膜を組織像により丹念に分離し複数個所の組織をそれぞれ遺伝子解析することで、PBM 患者における発癌機構を評価することができた。

PBM 患者の胆管組織における遺伝子変異の空間的および時間的な不均一性を明らかにし、多段階的な発癌プロセスが存在することを示した。この知見は、PBM 患者における発癌リスクの層別化や予防的介入の有効性を検討するための重要な基盤となると考える。