

平成30年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

令和 1年 6月 3日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名 : 六反 啓文



研究課題 : 胆道がんの発生母地を対象とした包括的ゲノム解析、および発がんリスク予測
(テーマ)

研究期間 : 自 平成30年 4月 1日

至 平成31年 3月31日

研究指導者 : 氏名 柴田 龍弘



公益財団法人 がん研究振興財団

『胆道がんの発生母地を対象とした包括的ゲノム解析、 および発がんリスク予測』

(1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

1) 要旨

胆道がんは日本人に多い予後不良ながんであるが、胆道の早期病変や背景粘膜に生じるゲノム異常は、ほぼ未解明である。2018年度に我々は、背景粘膜のホルマリン固定検体から低頻度の体細胞変異を検出する系についてテストを行ったのち、小径胆囊がん及び背景胆囊粘膜のシークエンスを行った。小径胆囊がんでは4例中3例にTP53変異が検出された。背景胆囊粘膜の変異については、検出手法の見直しも含めて、今後も検討を継続する必要がある。

2) 序

胆道がんは日本を含めたアジアで多いがんであり、予後不良である。我々の研究室では2015年に日本人胆道がんのゲノム異常の全体像を解明し(文献1)、その際にERBB2の異常やFGFR2融合遺伝子などの治療標的も同定したが、これまでゲノム解析が行われた胆道がんは進行がんが多く、胆道の早期病変に生じるゲノム異常はほぼ未解明である。

我々は2018年度、腫瘍径の小さい胆道がんのゲノム解析を行うとともに、組織学的に正常な(：非腫瘍性に見える)胆囊粘膜において、がん関連の体細胞変異がみられるか否か検討することとした。その際、胆道のうち胆管ではがん周囲の粘膜上皮成分が病理標本作製完了までに脱落してしまうことが多いため、解析の難易度が高い。今回はまず、周囲粘膜上皮成分が比較的保たれる傾向のある「胆囊」を対象として解析を進める方針とした。

3) 実験方法

正常組織中に潜在する体細胞変異は、バルク検体中のアレル頻度が極めて低いこともあり、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded ; FFPE) サンプルから検出する有効な系は未だ確立されていない。そのため、遺伝子変異の有無がわからない FFPE サンプルを闇雲にシークエンスしても、検出変異の意義づけが難しくなる。今回我々はまず、正解（に近い）データがある非腫瘍性の胃粘膜サンプルを対象として、FFPE 由来 DNA から低頻度変異を検出する系のテストを行うことを、研究の第一段階に据えた（下記の「3-1」参照）。幸いにも、胃がんにおいて重要な役割を果たす既知のがん抑制遺伝子 X1 について、そのタンパク発現が免疫組織化学的に陰性となる（：遺伝子 X1 のフレームシフト変異やナンセンス変異などの短縮型変異の存在が予想される）、大きさ 0.15 – 0.95 mm ほどの胃粘膜病変 FFPE サンプルを複数例確保できたため、それらの解析から着手することとした。このテストサンプルでは、免疫組織化学の結果から体細胞変異の存在が予想される状況である。ただ、結果的にはこのテスト系に問題点もあったため、胆嚢サンプルを用いた解析では手法を切り替えて（下記「3-2」参照）進めた。

3-1) 背景胃粘膜サンプルを用いたシークエンス解析テスト

3-1a) サンプルの選定と DNA 抽出

東京大学医学部附属病院で外科的に切除された胃がん症例の背景胃粘膜の FFPE サンプルの中から、免疫組織化学でタンパク X1 の発現状態が変化した微小粘膜病変（胃がんのドライバー遺伝子の 1 つである「X1」の体細胞変異の存在が予想される微小病変）を 6 病変、収集した。この微小粘膜病変はいずれも長径 1mm 以下であり（長径 0.15 – 0.95 mm）、構造異型や細胞異型がなく、組織学的には正常であった。これら 5 病変の FFPE サンプルからフェノール・クロロホルム法により DNA を抽出した。同一症例のリンパ節（FFPE）由来 DNA を、体細胞変異検出のための正常リファレンスとして用いた。また、同一症例の胃がん部からも DNA を抽出してシークエンスを行った。

3-1b) シークエンスライブラリの作製（系 1）及びシークエンス解析

遺伝子 X1 の全コーディング領域を含んだカスタムパネル（Agilent 社 SureSelect XT）を作製したうえで、FFPE 由来ゲノム DNA 300 – 600 ng を出発量とし、hybrid capture 法によりライブラリを作製した。途中の pre-capture PCR 過程までは KAPA HyperPrep キットを用いて DNA を増幅させた。微小粘膜病変のライブラリのシークエンスに際しては、読み深度 ×20,000 を目指してレーン数を設定し、HiSeq (Illumina 社) でシークエンスし、当研究室の先行論文（文献 2）と同様の解析を行った。

3-2) 小径胆囊がん及び背景胆囊粘膜のシークエンス

3-2a) サンプルの選定と DNA 抽出

国立がん研究センター中央病院・病理診断科の許可・協力を得て、対象症例の FFPE ブロックの選定を進めた。具体的には、病理標本作製時の切り出し図も閲覧しつつ、① normal reference (胆囊以外の正常組織)、②non-dysplastic mucosa (異型のない胆囊背景粘膜)、③carcinoma (胆囊がん) の各部分の異型、および相互の位置関係を認識したうえで、解析に必要な FFPE ブロックを選定し、10um 厚の薄切切片からフェノール・クロロホルム法で DNA を抽出した。Non-dysplastic mucosa (異型のない胆囊背景粘膜) については、dysplastic な上皮が含まれないよう、顕微鏡下でマーキングを行いマクロダイセクションの手順を踏んだ。胆囊がん (carcinoma) については長径 2.5cm 以下の 11 症例を選び下記ライプラリ作製に進めたが、DNA がうまく増幅されなかった症例が多くかったため、シークエンスした小径胆囊がんは結果的に 4 例のみとなった（それら 4 例の長径は：2.0cm, 2.0cm, 2.2cm, 2.4cm）。4 例中 2 例で、non-dysplastic mucosa (異型のない胆囊背景粘膜) のシークエンスが行えた。また、正常肝臓・脾臓・リンパ節のいずれかから DNA を抽出して下記シークエンスを行い、体細胞変異検出のための正常リファレンスとした。

3-2b) シークエンスライプラリの作製（系 2）及びシークエンス解析

解析対象に胆囊背景粘膜もあったため、遺伝子数を最低限に絞ることが肝要と考え、16 遺伝子の変異をアンプリコンシークエンスにより検出できる既製品パネル Accel-Amplicon Plus Colorectal Cancer Panel (Swift 社) を用いた。本パネルがカバーする 16 遺伝子 (*AKT1*, *APC*, *BRAF*, *ERBB2*, *ERBB4*, *KIT*, *KRAS*, *NOTCH1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *POLE*, *PTEN*, *SMAD4*, *STK11*, *TP53*) は「大腸がん関連遺伝子」とうたわれているが、胆囊がんにおいて重要な遺伝子の多くが網羅されている (*KRAS*, *PIK3CA*, *SMAD4*, *TP53*) ことから、小径胆囊がんの遺伝子異常スクリーニングにも十分有用であると判断して今回使用した。FFPE 由来のゲノム DNA 60 - 140 ng を出発量とし、同パネルのプロトコール通りにライプラリを作製し、MiSeq (Illumina 社) にてシークエンスした。解析は当研究室の先行論文（文献 2）に則ったうえで、TVAF/NVAF > 50 を満たすものを選び、体細胞変異として検出した。

3-3) p53 発現異常を示す背景胆囊粘膜の病理組織学的解析

3-3a) p53 免疫組織化学

Citrate buffer (pH 6.0) による賦活化の後、1 次抗体として抗 p53 抗体 (mouse,

clone DO-1, Santa Cruz) を 100 倍希釈で用いて、ABC 法で染色した。

3-3b) CD10 免疫組織化学

Citrate buffer (pH 6.0) による賦活化の後、1 次抗体として抗 CD10 抗体 (mouse, clone 56C6, Novocastra) を 100 倍希釈で用いて、ABC 法で染色した。CD10 は腸上皮刷子縁のマーカーであり、正常の胆管・胆嚢上皮では発現するが、胆管がんでは陰性となることが多いと知られている (文献 3)。

4) 結 果

4-1) 背景胃粘膜サンプルを用いたシークエンス解析テスト

微小胃粘膜病変（および同一患者の胃がん）5患者6個を対象とした遺伝子 *X1* の deep シークエンスにおいては、当初 $\times 20,000$ の読み深度を目指したが、結果的には $\times 10,000$ 程度 ($\times 5,068 - \times 11,585$) の読み深度となった。検出された短縮型遺伝子変異（候補）のアレル頻度は図1のようになった（青字 Normal は微小粘膜病変、赤字 Tumor は胃がん部、赤矢印は遺伝子 *X1* の短縮型変異を示す。得られた結果は下記のとおりである：

- ① 組織学的に正常な微小胃粘膜病変（青字「Normal」）6個中2個で、遺伝子 *X1* の短縮型変異（候補）が検出された。
- ② 上記①の結果となる条件のフィルタ下では、胃がん部から検出された変異個数は、正常粘膜よりも多かった（4/4）。
- ③ 検出された変異のアレル頻度の中央値は全ての症例で（4/4）、胃がん部のほうが微小粘膜病変よりも高くなかった。この大小関係はフィルター条件に左右されない。

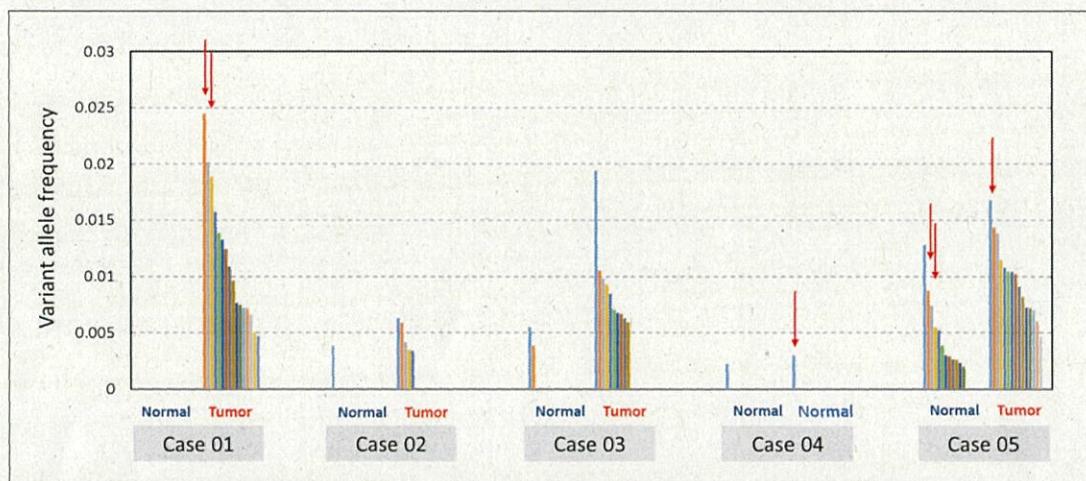


図1. シークエンステストサンプルから検出された遺伝子変異のアレル頻度の分布

青字 Normal は微小粘膜病変、赤字 Tumor は胃がん部。赤矢印は遺伝子 *X1* の短縮型変異を示す。

ただし、ここまで検出した変異には、エラーとの判別が難しいものも含まれており（特にアレル頻度が低い変異）、どこまでがエラーでどこからが真の変異かを断定するのは困難であった。このように正常 FFPE 細胞由来の DNA を用いて低頻度の体細胞変異を検出する際は、purity（病変含有率）が極端に低いため、エラーとの識別が難しい。対処法として、正常リファレンスサンプルの読み深度を更に増やすことが有効と思われた（研究遂行途中で判明した）ため、追加シークエンスをその後実行した。（この追加シークエンスをふまえた体細胞変異の検出は、今後検討していく。）

4-2) 小径胆嚢がん (≤ 2.5 cm) 及び背景胆嚢粘膜のシークエンス

上記のシークエンステスト（4-1）を通して、FFPE から極めて低頻度の変異を検出しエラーと識別する際の問題点が浮上した。即ち、フィルター設定が難しい事、そしてかなり深くシークエンスする必要がある事（ $\times 10,000$ 程度では不十分）である。これを踏まえ、胆嚢サンプルを対象とした解析は、手法を切り替えて（「3-2」参照）行った。

シークエンスした小径胆嚢がん 4 例から検出された体細胞変異は図 2 のようになつた。変異陽性例が最も多いのは *TP53* (3/4; 75%) であり、*NOTCH1* (2/4; 50%) が次いだ。*TP53* 変異をもつ 3 例のうち 1 例は、変異遺伝子が *TP53* のみであった。検出変異がなかった 1 例 (GB19T) を除く 3 例において、変異アレル頻度が最も高かった遺伝子は、それぞれ *PIK3CA*, *ERBB4*, *TP53* であり様々であった（ただし今回の系はアンプリコンシークエンスであり、アレル頻度と細胞集団に乖離がある可能性もある）。胆嚢がんに関する既報で予後不良群と相関があり高悪性度がんへの進展との関連が示唆されている *SMAD4* 変異（文献 4）については、4 例とも非検出であった。

	Cancer				Non-dysplastic mucosa		VAF median	# samples
	GB04T	GB06T	GB17T	GB19T	GB04ND	GB17ND		
<i>TP53</i>	0.093	0.067	0.897		0.617		0.355	4
<i>KRAS</i>		0.118			0.412		0.265	2
<i>KIT</i>	0.175				0.219		0.197	2
<i>STK11</i>	0.054				0.327		0.191	2
<i>NOTCH1</i>	0.124	0.130					0.127	2
<i>PTEN</i>	0.123				0.125		0.124	2
<i>ERBB2</i>	0.075				0.111		0.093	2
<i>PIK3CA</i>	0.923						0.923	1
<i>PDGFRA</i>					0.272		0.272	1
<i>BRAF</i>	0.271						0.271	1
<i>NRAS</i>	0.200						0.200	1
<i>SMAD4</i>					0.193		0.193	1
<i>ERBB4</i>		0.154					0.154	1
<i>APC</i>	0.050						0.050	1
<i>AKT1</i>								0
<i>POLE</i>								0

図 2. 胆嚢がん及び正常粘膜から検出された変異と、そのアレル頻度。（水色：ミスセンス変異、紫：ナンセンス変異、緑：スプライス変異、茶色：2 種類以上）

シークエンスした、組織学的に異型のない背景胆嚢粘膜 (non-dysplastic mucosa) 2 サンプルのうち、1 例 (GB17ND) は変異非検出であったが、もう 1 例 (GB04ND) で

は、8個の遺伝子 (*TP53*, *KRAS*, *KIT*, *STK11*, *PTEN*, *ERBB2*, *PDGFRA*, *SMAD4*) に変異が検出され、アレル頻度も比較的高いものであった (0.11 – 0.62)。ただし、既報における正常組織中の変異アレル頻度とは乖離しており、また、現段階の解析では normal panel による SNP 除外過程が不十分であるため、non-dysplastic mucosa に真の体細胞変異があるか否かは、今後慎重に検討を重ねる必要がある。後述する免疫染色では、このサンプル (GB04ND) に p53 染色異常を示す上皮はなかった。

4 – 3) p53 発現異常を示す背景胆囊粘膜の病理組織学的解析

シーケンスした小径胆囊がんは4例と少なかったものの、上記結果（4-2）より、胆囊発がんの早期過程における *TP53* 変異の重要性が示唆された。*TP53* 変異を有する病変は p53 の免疫染色で染色異常（過剰発現）をしばしば示すことが知られているため、続いて、組織学的異型のない背景胆囊粘膜を対象として、免疫組織化学的に p53 染色異常を示す領域を探索した。11例中2例で、p53 陽性領域がみられた。それらの領域の細胞形態は、周囲の円柱状上皮細胞に比べて丈が低く、立方状を呈する細胞が多い傾向があった。このような形態から、「p53 発現異常を伴う上皮は特徴的な粘液形質を示す上皮である可能性がある」という仮説を立て、腸型マーカーのうち CD10（: FFPE ブロックの年代を問わず染色及び評価が比較的容易である）を選んで免疫染色を行ったが、CD10 発現は保たれており、p53 隆起性領域との差は見られなかった。

シーケンスした胆囊組織のうち、*TP53* 変異と p53 免疫染色態度の一致率は、小径胆囊がんで 75% (3/4)、背景胆囊粘膜で 50% (1/2)、合計で 67% (4/6) であった。

5) 考 察

TP53 体細胞変異は胆嚢がん（進行がん）に最も多い遺伝子異常である（頻度約 50%；文献 1）。FFPE からの低頻度変異検出系のテストに一定期間を要したことから、年度内にシークエンスした胆嚢サンプルは少数例となってしまったが、小径胆嚢がん 4 例中 3 例で *TP53* 変異が見られ、同変異が胆嚢発がん過程の比較的早期段階で重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、免疫染色では p53 発現異常を示す成分は粘膜内にも確認され、この点からも比較的早期段階で *TP53* 変異が入ることが示唆される。このような *TP53* 変異の役割は、分化型の胃がんにおける *TP53* 変異の役割（文献 2）と類似している可能性がある。

今回の研究では、背景粘膜等の FFPE 様体から低アレル頻度の体細胞変異を検出するとの難しさに直面した。入手可能であれば、やはり、凍結サンプルを使用した方が正しい解析が進められる。今回 FFPE を対象として系 1（hybrid capture 法）と系 2（amplicon シークエンス）を行ったが、対象サンプルが異なるため両者の単純な比較はできない。少なくとも、最も robust とされる系 1においてかなり深くシークエンスする必要性が判明し、多数例を解析する際にはやや非現実的と思われた。今後 FFPE を用いて背景粘膜の変異を探索する場合は、代替マーカーを併用してスクリーニングしたうえでシークエンスし、且つ該当箇所を enrich する、などの工夫を施す必要がある。

胆嚢の非腫瘍性粘膜から今回検出された体細胞変異については、現段階の解析では normal panel による SNP 除外過程が不十分であるため、検出変異が真の体細胞変異があるか否かは今後の検討課題である。とくにアレル頻度が先行報告に比べて高すぎることもあり（cf. 正常胃粘膜における *TP53* 変異を検出した既報〔文献 5〕では、そのアレル頻度は 0.10-0.26%）、今後慎重に検討していく。

<参考文献>

1. Nakamura H et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. Nat Genet. 2015;47:1003-10.
2. Rokutan H et al. Initial and crucial genetic events in intestinal-type gastric intramucosal neoplasia. J Pathol. 2019;247:494-504.
3. Tretiakova M et al. Diagnostic utility of CD10 in benign and malignant extrahepatic bile duct lesions. Am J Surg Pathol. 2012;36:101-8.
4. Narayan RR et al. Regional differences in gallbladder cancer pathogenesis: Insights from a multi-institutional comparison of tumor mutations. Cancer. 2019;125:575-585.
5. Shimizu T et al. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with Helicobacter pylori infection. Gastroenterology. 2014;147:407-17. e3.

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

対象病変（胆嚢の小径がん）の凍結サンプルがなかったため、本研究では FFPE サンプルをシークエンス対象としたが、実際に FFPE 由来 DNA を用いて解析を進めたところ、極めて低頻度の体細胞変異を同定すること自体、当初の予想よりハーダルの高い作業であることが判明し、妥当な手法の確立・選択も容易ではなかった（最近、正常組織中に存在する低頻度のゲノム異常を検出した海外の研究成果が発表されつつあるが、いずれも凍結サンプルを用いたシークエンス研究である）。しかし FFPE サンプルは、診断の確定した entity を後ろ向きに短期間で複数例確保できる点や、切片内で組織像を確認しながら病変を enrich できる点などで優位性があることも確かであり、今後も希少 entity に含まれるゲノム異常の検出に一定の役割を果たすと考えられる。

今後の研究アプローチとしては、多数症例の FFPE を材料として、p53 の染色異常や TP53 体細胞変異をスクリーニングしていくことを重要視している。さらに、TP53 変異が入りやすい症例について炎症や年齢などの背景因子を解析し、発がんリスク予測につながる研究を進めたい。

2019 年 4 月からは、東京大学医学部附属病院の病理部にて、日常的な病理診断および分子遺伝学的な研究を進めていくこととなった。東京大学でも豊富な FFPE 材料を扱い、引き続き上記研究に取り組みたい。

謝 辞

今回の助成を通して本質的な研究課題への取り組みを支えてくださいました、公益財団法人がん研究振興財団及び関係者の皆様に深く感謝申し上げます。また、私はリサーチ・レジデント制度の頃よりお世話になりました。数年にわたり助成をいただき、研究に集中する環境・機会を得られた事が、私にとっては財産であり、研究マインドを持った現在の私につながっております。本当に有難うございました。