

研究報告書
平成29年度：A課題

令和元年6月9日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 公益財団法人がん研究会有明病院

住所 東京都江東区有明3-8-31

研究者氏名 伊藤 寛倫



(研究課題)

胆汁を用いたリキッドバイオプシーの確立と胆管がん術前診断への応用

平成30年3月9日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

はじめに

近年のゲノムシーケンス技術の進歩と低コスト化により、様々ながん種のゲノム解析が行われ、幾つかの癌種ではゲノムプロファイルに基づいた治療選択（プレジジョン医療）が可能となった。適切な治療選択のためには治療前の腫瘍生検によるゲノム採取が必要であるが、消化器癌の中で最も難治性で予後不良の癌のひとつである胆管がんは、内視鏡による組織生検が可能な胃がんや大腸がんと異なり、切除手術検体以外のゲノム解析が困難である。

現在の胆管がんの治療前組織診断は胆管擦過細胞診、胆汁細胞診によって行われるが、癌細胞の採取自体が難しく、かつ細胞診は主観的かつ定性的で、特に胆管がんの細胞診正診率は、胆汁細胞診で30%、擦過細胞診で40-70%と極端に低い^{1, 2}。さらには、たとえ癌細胞が採取されても、免疫染色やゲノム解析など、治療選択の助けとなるバイオマーカーの分析をするには量的に不十分である。従って、現状の侵襲的で不正確な診断法に代わる、正確でゲノム情報まで検出可能な診断法の開発が必要である。

最近注目を浴びている“リキッドバイオプシー”は、血液や体液中に遊離する癌細胞のcfDNA（無細胞DNA）を測定し、様々な診断に応用する新たな診断技術である。我々は、最近、進行がん患者の血液あるいは腹水に含まれるcfDNAを正確に測定するシステムを確立した。早期がんは血中のがん細胞が少なく、cfDNAの検出は難しい。理論的には、細胞診に用いられる胆汁には血中よりも多量のctDNAが浮遊していると考えられるが、胆汁内のctDNAを日常診療に応用可能なレベルで検出する技術や、得られた遺伝子変異情報の臨床応用に関する報告も皆無である。

我々は、1)既に確立した血中cfDNA検出の技術を改良・応用することにより、胆汁中に含まれるcfDNAの検出系を確立すること、2)リキッドバイオプシーによる胆管がんの術前診断法の確立を目的として本研究を行った。

結果

患者背景

2017年11月より2018年9月までに、胆汁採取した44症例を対象とした。うち41例は、閉塞性黄疸に対して、挿入したENBD（内視鏡的経鼻胆管ドレーナージュチューブ）より回収された胆汁、他3例はコントロールとして、良性胆嚢疾患患者（胆嚢腺筋腫症 2例、胆嚢ポリープ 1例）より術中採取した胆汁を用いてcfDNAの解析を行った。対象症例の患者背景、術前診断を表1にまとめた。

表1.患者背景と臨床診断

	N=44
年齢 (median, range)	72 (30-89)
男性 (n, %)	28 (64)
閉塞性黄疸 (n, %)	41 (93)
臨床診断 (n, %)	
肝門部胆管癌	16 (36)
肝内胆管癌	2 (5)
下部胆管癌	8 (18)
胆のう癌	4 (9)
膵頭部癌	9 (20)
大腸癌肝転移胆管腫瘍栓	1 (2)
十二指腸乳頭部腫瘤	1 (2)
胆嚢腺筋腫症	2 (5)
胆嚢ポリープ	1 (2)

胆汁内cfDNAの検出と、変異遺伝子

44患者より採取した胆汁より、40例（91%）よりcfDNAの精製・検出に成功した。精製には市販のMagMAX cell-free DNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific)を用い、さらにOncomine Colon cfDNA Assay kit (Thermo Fisher Scientific)によりcDNAライブラリを作成した。以降の解析はこれら40検体を対象とした。cfDNAのターゲットシーケンスには、既知の14遺伝子(AKT1, BRAF, CTNNB1, EGFR, ERBB2, FBXW7, GNAS, KRAS, MAP2K1, NRAS, PIK3CA, SMAD4, TP53, and APC)の240以上のホットスポットをカバーするIon 530チップを用いた。変異頻度の閾値を0.15とした時、26検体(65%)に計109か所の変異が検出された。変異遺伝子の検出頻度を表2に示す。

表2. 変異遺伝子検出頻度

遺伝子 (n,%)	N=40
TP53	11 (28)
KRAS	10 (20)
GNAS	2 (5)
PIK3CA	2 (5)
ERBB2	2 (5)
APC	1 (3)
FBXW7	1 (3)
SMAD4	1 (3)
CTNB1	1 (3)
MAP2K1	1 (3)
EGFR	1 (3)
BRAF	0
AKT1	0
NRAS	0

胆汁リキッドバイオプシーによる胆膵癌診断能

コントロールの良性胆嚢疾患患者3名を除いた37名の悪性閉塞性黄疸患者は全員、胆汁細胞診、または胆管生検を行い、11名（30%）が癌細胞陽性、26名（70%）は癌細胞陰性であった。胆汁細胞診陰性例のうち、胆汁リキッドバイオプシー陽性（cfDNA中に1つ以上の遺伝子変異が含まれるもの）は17例あり、従来の胆汁細胞診にリキッドバイオプシーを組み合わせることで、癌陽性率は28例(76%)となった。37例中、27例はその後の切除手術で組織診断が確定し、2例は術前診断に反して慢性胆管炎による胆管狭窄であった。残り10例は腹水細胞診、リンパ節・転移巣生検により悪性の診断が確定した。35例の悪性胆管狭窄と5例の良性疾患（含む2例の胆管狭窄）について、術前の胆汁細胞診・胆管生検と胆汁リキッドバイオプシー良悪性診断能を解析した。(表3)

表3. 胆汁細胞診、胆汁リキッドバイオプシーの比較

	胆汁細胞診	胆汁リキッド生検	細胞診+リキッド生検*
Sensitivity (% , 95% CI)	31 (17-49)	71** (54-85)	77** (60-90)
Specificity (% , 95% CI)	100 (48-100)	80 (28-99)	80 (28-99)
Negative predictive value (NPV) (% , 95% CI)	17 (14-21)	29 (16-44)	33 (19-51)

Positive predictive value (PPV) (%, 95% CI)	100	96 (81-99)	96 (82-99)
Accuracy (%, 95% CI)	40 (25-57)	73** (56-85)	78** (62-89)

*いずれか一方の検査陽性を癌陽性と判定した

** vs 胆汁細胞診、 $p < 0.05$

考 察

本研究では、悪性胆道狭窄・閉塞を疑いの患者より採取された胆汁を用い、胆汁内cfDNAの同定とそのシーケンスによる癌特異的遺伝子変異の検出が可能であることが示された。胆汁中に微量含まれる癌由来遺伝子が高い精度で検出できることは、内視鏡的生検が不可能であった胆管内悪性腫瘍（胆管癌、胆のうがん、胆管浸潤のある膵頭部癌）において、癌の診断（悪性胆管狭窄か良性狭窄かの判定）の助けになるのみならず、得られた腫瘍の分子遺伝的特性に基づいた抗がん剤（分子標的薬）の選択にも利用できる可能性があり、本研究結果の意義はすこぶる大きい。