

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

がん研究会 がん研有明病院 肝胆膵外科
医長 伊藤 寛倫

(共同研究者)

がん研究会 がん研プレジジョン医療研究センター
プロジェクトリーダー 前佛 均

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は異なり、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cfDNAが浮遊していると考えられるが、胆汁内のcfDNA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ナージチューブ）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)

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。

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。

肝外胆管癌の治療前診断は胆管癌治療におけるアキレス腱である。肝外胆管癌や膵頭部癌の患者のほとんどは閉塞性黄疸を契機として、画像診断上、胆管狭窄病変として確認されるが、生検による組織診断は容易でない。現状での胆管癌術前診断のゴールドスタンダードは胆汁(擦過)細胞診であるが、癌細胞の検出率は低く、40-70%⁽¹⁾と報告されている正診率は、複数回ERCPを繰り返して得られる値であり、1回のERCPによる細胞診の正診率は本研究での40%とそれほど変わらないと思われる。ERCPは急性膵炎を引き起こすリスクがあり、診断のために複数回繰り返すことは、患者にとってリスクとなるだけでなく、手術などその後の治療を遅らせる要因となりうるので、できるだけ避けるべきである。それに対して、本研究での胆汁バイオプシーは、閉塞性黄疸治療のためのERCP時に検体が採取でき、患者への追加侵襲なしに施行可能である。

本研究における、胆汁バイオプシーの感度は71%であり、胆汁細胞診のそれが31%であったのに比して、有意に優れていた。一方で、特異度は80%で、偽陰性がいくつか見られた。本研究での胆汁バイオプシー陽性は、1つ以上の変異遺伝子が検出されることと定義した。古典的な多段階癌化説によれば、正常（胆管）粘膜細胞が癌化するまでには、複数の遺伝子変異の蓄積が必要とされており、単一の遺伝子変異が、非癌細胞より検出されることがあることを考えると、胆汁バイオプシー陽性の定義も症例数、検査する遺伝子数を増やしたうえで、再検討する必要があるかもしれない。同時に、検査する遺伝子数、高頻度変異部位（ホットスポット）数を増やせば、さらに感度は上がると考えられる。本研究では市販のジーンチップを用いたため、検査した遺伝子は14遺伝子に限られていることは特記すべきで、この中には、既報されている胆管癌に高頻度にみられる変異遺伝子の一部（例えばARID1A）は含まれていない。したがって、胆汁バイオプシーの診断精度をさらに改善するためには、胆管がん診断に特化した検査遺伝子のセットを再検討する必要がある。

胆管癌（肝内胆管癌、肝門部胆管癌、下部胆管癌、胆嚢癌）及び膵臓癌腫瘍の全遺伝子解析は、切除標本を用いた研究がすでに行われ、遺伝子変異の種類及び頻度が既に報告されている⁽³⁻⁶⁾。膵癌ではKRAS変異がほとんどすべて（96%）の膵癌で認められるのに対して、胆管癌には比較的低頻度（26%から9%）の変異がTP3, KRAS, SMAD4, ARID1Aなど様々な遺伝子に確認されている。本研究で胆汁内cfDNAに検出された遺伝子変異と、切除組織を用いた研究で報告された遺伝子変異頻度とはほぼ一致する結果が得られたが、今回検査した遺伝子が限られていることもあり、単一患者での胆汁cfDNA内の遺伝子変異と切除組織より抽出したDNA内の遺伝子変異が一致するかどうかは、今後の課題として行う予定である。

要 約

悪性胆管狭窄の組織診断は難しい。ERCPによる胆汁細胞診が現在の標準診断法であるが、その正診率は40-70%と未だ十分でない。近年、体液中の浮遊DNAを利用したリキッドバイオプシーが可能となり、今後の臨床利用が期待される。本研究の目的は胆汁を用いたリキッドバイオプシー系を確立し、胆管がん含む悪性胆管狭窄患者の診断能を検討することである。3例のコントロール含む計44患者を対象とした。うち40例（91%）でcfDNAが検出可能であった。さらにcfDNAのターゲットシーケンスにより26例（65%）で変異遺伝子が検出された。1つ以上の変異遺伝子の検出を癌陽性の場合の胆汁リキッドバイオプシーの感度が71%、特異度80%、精度73%であり、胆汁細胞診のそれぞれ31%、100%、40%に比して、感度、精度は有意に優れていた。胆管悪性病変に対する胆汁を用いたリキッドバイオプシーは可能であり、癌の診断法としてだけでなく、分子標的薬など、治療選択のガイドとなりうると期待される。

文 献

1. Burnett AS, Calvert TJ, Chokshi RJ. Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10–y review of the literature. *J Surg Res* 2013;184:304 – 11.
2. Navaneethan U, Njei B, Lourdasamy V, et al. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2015;81:168 – 76.
3. Churi CR, Shroff R, Wang Y, et al. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS One* 2014;9:e115383.
4. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 2015;47:1003 – 10.
5. Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, et al. Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017;7:1116 – 1135.
6. Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015;518:495 – 501.