

博士論文

肝内胆管癌の二分類における
臨床病理および分子病態学的解析

三角 健人

第一章 序文	2
第二章 肝内胆管癌における特殊染色、免疫組織化学染色に基づく二群の分類	6
2.1 背景と目的	6
2.2 材料と方法	7
2.2.1 材料	7
1) 症例の選択	7
2) 組織マイクロアレイの作成	8
3) 倫理委員会の承認に関する事項	8
2.2.2 方法	8
1) 臨床情報の集積	8
2) 病理学的評価	9
3) 免疫組織化学染色	10
4) 粘液特殊染色および免疫組織化学的形質による肝内胆管癌の 2 亜分類	11
5) <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> および <i>KRAS</i> 遺伝子変異解析	13
6) FISH による <i>FGFR2</i> 融合遺伝子の解析	14
7) 統計的解析	14
2.3 結果	15
1) 症例概要	15
2) 肝内胆管癌の粘液産生および免疫組織化学的形質	16
3) 形態による肝内胆管癌の 2 亜分類	16
4) 粘液特殊染色および免疫組織化学的形質による肝内胆管癌の 2 亜分類	17
5) 肝内胆管癌における肝細胞癌マーカーの発現	17
6) 1 型、2 型肝内胆管癌の臨床病理学的特性	21
7) 1 型、2 型肝内胆管癌の組織学的形態	24
8) 1 型、2 型肝内胆管癌の遺伝学的解析	26
9) 肝内胆管癌の予後因子	28
10) 既存の分類との比較	32
2.4 考察	32
第三章 肝内胆管癌における BAP1, PBRM1 発現消失	38
3.1 背景と目的	38
3.2 材料と方法	39
3.2.1 材料	39
1) 症例の選択	39
2) 倫理委員会の承認に関する事項	40
3.2.2 方法	40
1) 免疫組織化学染色	40
2) 追加症例の解析	41

3) 統計的解析	41
3.3 結果	42
1) 背景肝における BAP1, PBRM1 の免疫組織化学染色	42
2) 肝内胆管癌における BAP1, PBRM1 の免疫組織化学染色	42
3) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の臨床病理学的特徴	46
4) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の粘液産生、S100P および N-cadherin の免疫組織化学的形質	46
5) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の遺伝学的形質	49
6) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌と 1 型/2 型分類の相関	49
7) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の予後	49
3.4 考察	52
第四章 肝内胆管癌における albumin mRNA の発現について	55
4.1 背景と目的	55
4.2 材料と方法	57
4.2.1 材料	57
1) 症例の選択	57
2) 倫理委員会の承認に関する事項	57
4.2.2 方法	57
1) Albumin RNA-ISH	57
2) 臨床病理学、分子病態学的因子について	58
3) 統計的解析	59
4.3 結果	59
1) 背景肝細胞、胆管における albumin RNA-ISH	59
2) 肝内胆管癌の albumin RNA-ISH	60
3) Albumin 陽性肝内胆管癌の臨床病理学的特性	60
4) Albumin 陽性肝内胆管癌の免疫組織化学、遺伝学的形質	65
5) Albumin 陽性/陰性肝内胆管癌と 1 型/2 型分類の相関	65
4.4 考察	68
第五章 結語	72
謝辞	73
参考文献	75

略語一覧

NCAM : Neural cell adhesion molecule

IDH : Isocitrate dehydrogenase

FGFR2 : Fibroblast growth factor receptor 2

BAP1 : BRCA associated protein-1

PBRM1 : Polybromo 1

FISH : Fluorescent in situ hybridization

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

IQR : Interquartile range

ISH : In situ hybridization

HDAC: Histone deacetylase

EZH2: Enhancer of zeste homolog2

要旨

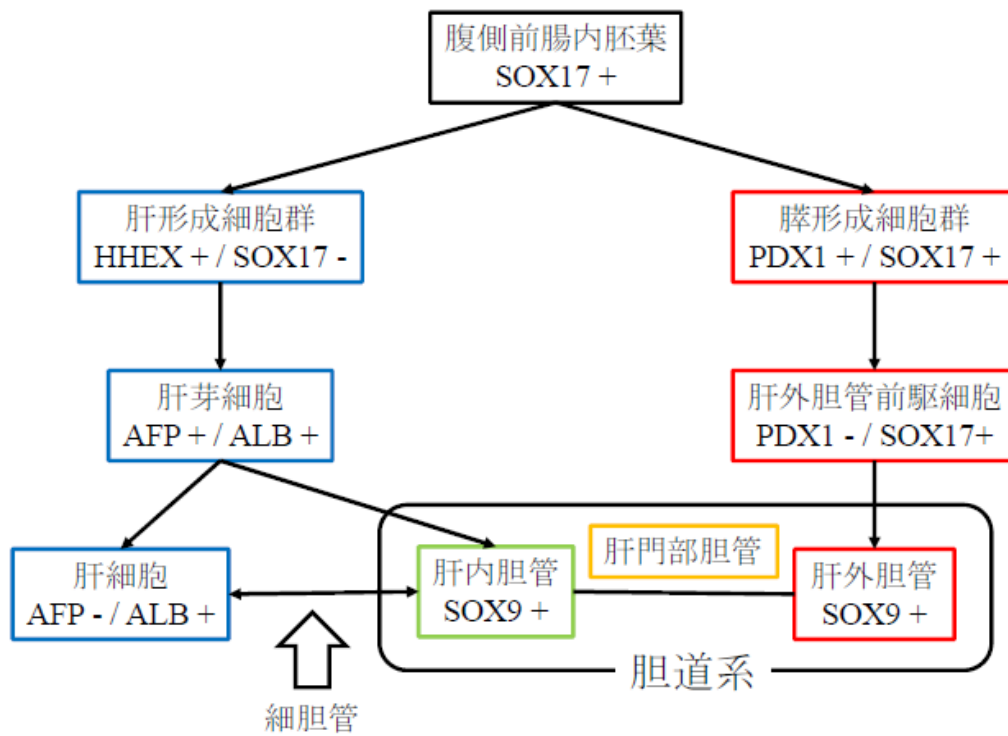
本研究では、肝内胆管癌において異なる形態、分子病態および臨床的特徴を有する二群の客観的な分類のために、肝内胆管癌切除症例について特殊染色、免疫組織化学染色を用いたスコアリングによって評価し、また臨床病理学的な解析を施行した。肝内胆管癌を粘液産生および S100P 陽性を特徴とする 1 型肝内胆管癌、N-cadherin, NCAM 陽性を特徴とする 2 型肝内胆管癌に分類したところ、2 型肝内胆管癌は肉眼的に腫瘤形成型で、組織学的には高分化で小型腺管構造を呈して増殖し、予後が良好であった。また、*IDH* 変異、*FGFR2* 融合遺伝子は 2 型肝内胆管癌、*KRAS* 変異は 1 型肝内胆管癌に有意に多く認められた。さらに、2 型肝内胆管癌においては *BAP1* の発現消失や *albumin* mRNA の高発現についても有意に多くみられた。

第一章 序文

肝内胆管癌は、肝細胞癌に次いで二番目に頻度が高い肝臓原発の悪性腫瘍であり、その罹患率はさらに上昇傾向にある(1, 2)。また、肝細胞癌と比較して予後の不良な一群としても知られており(3)、今後の診断、治療の発展のため肝内胆管癌の病態を明らかにする必要がある。

正常の胆管は肝内から肝外まで連続して樹状に分布しており、肝外から肝門付近の大型胆管においては円柱状の胆管上皮によって構成されているが、肝内末梢の隔壁胆管、小葉間胆管は立方上皮からなっており、組織学的な形態が異なっている(4, 5)。双方は発生上の由来も異なっているとされ、いずれもまず前腸内胚葉から分化するが、その後 *ALB* 陽性の肝芽細胞と *SOX17* 陽性の肝外胆管前駆細胞に分かれた後に、前者が肝内胆管、後者が肝外胆管に分化し、最終的に連続した胆道系を構成している(図)(6)。臨床的にも、腫瘍の局在に従って肝内胆管癌および肝外胆管癌は別個に扱われているが、肝内と肝外(肝門部)の境界については、日本でも原発性肝癌取扱い規約が胆管の分枝、胆管癌取扱い規約が門脈の走行に従って定義しており、どこまでを肝内胆管癌と呼称するのか統一された見解がないのが実情である(7, 8)。

上記のような取り決めで定義された肝内胆管癌自体も結果として均質な集団



図．肝胆道系の発生過程の模式図

肝内胆管は肝芽細胞、肝外胆管は肝外胆管前駆細胞からそれぞれ別個に分化し、その後一連の胆道系を形成する。

ではなく、その分布や形態によって大きく分けて二種類の腫瘍が含まれることが示唆されてきた(9-13)。そのうち一群は傾向として肝門付近に発生し、肝外胆管癌同様に大型の管腔または乳頭状構造を呈し、もう一群は末梢に発生し、小型の管腔構造を主体として増殖することが多い。それぞれの群の特徴を端的に抽出して、前者については「hilar type(9)」、「ordinary adenocarcinoma type(10)」、「conventional type(11)」、「bile duct type(12)」、「perihilar large duct type(13)」、後者については「peripheral type(9)」、「ductular type(10, 11)」、「cholangiolar type(12)」、「peripheral small duct type(13)」などの名称が使用されてきた。これら肝門部または末梢といった部位による分類は、立体的な構築をした肝臓内で、厳密で再現性のある肝門部側または末梢側の定義が困難であること、また例えば組織学的に大型胆管からなる腺癌が末梢に発生しうることから、部位や形態単独で腫瘍の病態を全て表現することが不可能であることといった問題点も含んでいる。よって、客観的かつ多くの病理診断施設で施行可能な分類方法を定めた上で臨床病理、分子病態学的な解析を行うことは意義が大きいと考えられる。

上記のごとく肝内外胆管の移行部の扱いについては議論があるが、一方で正常肝細胞と肝内胆管の移行部については組織学的に細胆管によって連続しており、原発性肝癌取扱い規約ではこれに対応する腫瘍として細胆管癌が独立した分類を与えられている(7)。しかし、これは独立した一群というより肝内胆管癌

の一重型であり、細径の胆管によって形成されるものを指すという立場があり、また逆に WHO 分類では肝細胞癌-肝内胆管癌の混合型肝癌で幹細胞としての特性を含む三重型のうちの一つに分類されており、その位置づけには未だ議論がある(14)。このことから、肝内胆管癌を均質な一群ではなく、肝細胞から肝外胆管までの両極のスペクトル上に位置する不均質な集団として捉え、これを解析することが肝内胆管癌の病態の理解には必須であると考えられる。

本研究では、Alcian-blue 染色により評価可能な粘液産生、また免疫組織化学染色により評価可能な S100P、N-cadherin および NCAM に着目した。このうち粘液産生、S100P については perihilar large duct type(15)、N-cadherin および NCAM については peripheral small duct type において高頻度に陽性であることが知られている(10, 16)。以上 4 項目について染色、スコアリングを行い、肝内胆管癌の 2 分類を行った。

この 2 分類を基にして、さらに各症例についてクロマチン再構成に関与する酵素である BAP1, PBRM1 の発現消失について、また肝細胞及び肝細胞癌において高発現であることが知られる albumin mRNA の発現について評価、解析を行った。

第二章 肝内胆管癌における特殊染色、免疫組織化学染色に基づく二群の分類

2.1 背景と目的

肝内胆管癌は、序文に記載の通りそれぞれ明瞭な特徴を有した二群に分けられることが知られている。これら二群の差は肉眼的、組織学的な形態の違いだけでなく、免疫組織化学染色によって肝内胆管癌を評価した際にも、いくつかの蛋白において有意な差が認められている。

S100P は S100 タンパク質ファミリーの 1 種であり、胎盤で初めて同定されたことから **placenta** の頭文字を取り **S100P** と命名され、その後乳癌、大腸癌などの腫瘍にも発現が確認された(17)。細胞内の **S100P** は細胞骨格蛋白である **ezrin** と、細胞外分泌された **S100P** は膜貫通受容体である **RAGE** と相互作用することにより、妊娠の成立と悪性腫瘍の進行に共通する機序である増殖、浸潤および血管新生に関わることが知られるようになった(18)。胆管癌についての先行研究では、肝外胆管癌のほぼ全例と肝内胆管癌の一部について **S100P** が陽性であり、さらに特筆すべきことに、**S100P** 陽性肝内胆管癌は末梢発生であっても肝外胆管癌と類似した組織像を呈する(15)。

N-cadherin は小型胆管、細胆管反応および肝細胞で陽性になるが、大型胆管では陰性であり、腫瘍の場合も「**cholangiolar type**」の肝内胆管癌で一部陽性になる

ことが知られている(16)。また、NCAM は細胆管反応で強陽性になる傾向があり、これも「ductular type」の肝内胆管癌で一部陽性になる(10)。いずれも感度は限定的であることから、二種のスコアリングを併用して「cholangiolar type」、「ductular type」を選別することを目指した。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

1) 症例の選択

東京大学医学部附属病院肝胆膵外科において、1995 年 1 月 1 日から 2013 年 12 月 31 日までに切除された連続症例を対象とし、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた。肝移植を除く肝内胆管癌初回切除例について対象とした。肝内胆管癌の定義は本邦で用いられる原発性肝癌取扱い規約と同様に、肝管二次分枝よりも肝内側を首座とするものを肝内胆管癌とした(19)。それより遠位の肝門部胆管癌、遠位胆管癌は除外し、また肉眼的に胆管内で乳頭状構造を呈するものは浸潤の有無にかかわらず胆管内乳頭状腫瘍として除外した。顕微的な胆管内増殖については対象に含むこととした。術前に動脈内注入療法や門脈塞栓療法を施行している症例については、診断、解析に十分な量が残存している症例を対

象とした。化学療法後の症例については除外した。

2) 組織マイクロアレイの作成

FISH の評価に用いるため、対象の肝内胆管癌症例について、組織マイクロアレイを作製した。各症例について、代表的な腫瘍部を含むパラフィンブロックから 2mm 径のコアを 2箇所くりぬき、24 症例分の 48 コアを集めて 1つのブロックに包埋し、組織マイクロアレイを構成した。

3) 倫理委員会の承認に関する事項

東京大学医学部附属病院での病理組織検体を用いた研究については、「肝腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」という題目で東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けている(審査番号 G2210)。

2.2.2 方法

1) 臨床情報の集積

患者の年齢、性別、術直前の採血結果、背景肝疾患および胆道疾患の有無について、カルテを参照した。背景肝疾患については、HBs-Ag、HCV-Ab 陽性の時についてそれぞれ B 型肝炎、C 型肝炎陽性と判定した。術後の定期的な血清腫瘍マーカー、超音波検査および CT 検査によって、再発の有無をスクリーニングした。再発については、画像診断によって肝内胆管癌として合致する腫瘍の再発が肝内または遠隔臓器に認められた日を再発日とし、また計 2 つ以上の画像診断によって再発が確認されたものとした。無再発生存期間は手術日と再発日の間の日数とし、全生存期間は手術日と死亡日の間の日数とした。

2) 病理学的評価

全患者について、病理レポートおよび組織スライドのレビューを筆者および病理専門医 1 名で行い、腫瘍の大きさ、肉眼像(19)、粘液分泌、優勢な分化度、低分化成分の有無、顕微的な上皮内病変または上皮内癌、肝門部結合組織への浸潤、脈管侵襲、主要血管への浸潤、神経周囲浸潤、肝内またはリンパ節転移、線維化の有無について記録した。肉眼像は腫瘍形成型または腫瘍形成胆管浸潤型に分類した。粘液産生については光学顕微鏡下に目視で観察し、Alcian-blue 染色(pH 2.5)によって以下のスコアリングを行った。腺腔内に粘液を有するものが 10%未満: スコア 0、腺腔内に粘液を有するものが 10%以上 50%未満: スコア 1、腺腔

内に粘液を有するものが 50%以上または細胞質内に粘液を高頻度に認めるもの:
スコア 2。分化度については、腺管形成の明瞭なものを高分化、腺管形成が不明
瞭、癒合腺管状、篩状または複雑な乳頭状、乳頭腺管状を呈するものを中分化、
充実性、胞巣状、または個細胞性に浸潤するものを低分化とした。主要血管浸潤
については門脈一次分枝、右/中/左肝静脈本幹、下右肝静脈、短肝静脈のいずれ
かに浸潤があるものとした。

背景肝については、胆管上皮内腫瘍、胆管微小過誤腫、胆管腺腫の有無を記録
した。また、ウイルス性肝炎やアルコール性肝疾患などの特定の肝疾患がみられ
ない場合は、活動性の炎症の有無にかかわらず感染以下がみられるものを慢性
肝疾患とし、腫瘍の胆道閉塞による門脈域の線維化は除外した。

また、既存の分類として、腫瘍の局在が明らかに末梢半分、肝門部半分にある
もの、どちらとも決しがたいものの三群への分類を行った。

3) 免疫組織化学染色

各症例について腫瘍を含む代表的なブロックに対し、3 μm の切片を薄切し、
自動染色装置 Benchmark XT (Roche, Basel, Switzerland)を用いて免疫組織化学染
色を施行した。染色に用いる抗体は、S100P (polyclonal, R&D Systems, Minneapolis,
MN, USA, 1:500 で希釈)、 N-cadherin (clone IAR06, Leica Microsystems, Wetzlar,

Germany, 1:100 で希釈)、NCAM (clone 1B6, Leica Microsystems, 1:50 で希釈)、Arginase-1 (clone SP156, Abcam, Cambridge, UK, 1:100 で希釈)、hepatocyte-specific antigen (Hep Par-1, clone OCH1E5, Dako, Glostrup, Denmark, 1:100 で希釈)を選択した。それぞれの染色について以下のようにスコアリングを行った。陽性細胞が 1%未満: スコア 0、陽性細胞が 1%以上 25%以下: スコア 1、陽性細胞が 26%以上 50%未満: スコア 2、陽性細胞が 51%以上 75%未満: スコア 3、陽性細胞が 76%以上: スコア 4。

4) 粘液特殊染色および免疫組織化学的形質による肝内胆管癌の 2 亜分類

上記 alcian-blue 染色、S100P、N-cadherin、NCAM 染色のスコアリングを用いて、体系化した分類を行った。これは肉眼像や組織像に依存しない半定量的な分類となるため、典型的には肝門部発生で大型管状構造を呈するような一群については 1 型肝内胆管癌、末梢発生で小型管状構造を呈するような一群については 2 型肝内胆管癌と改めて命名することとした。Alcian-blue 染色陽性、S100P 陽性、N-cadherin および NCAM 陰性の場合にはそれぞれ加点し、合計点数が 4 以上ならば 1 型、2 以下ならば 2 型、3 ならば分類不能とした(表 1)。

対象	染色スコア	点数
粘液 (alcian-blue)	スコア 2	2
	スコア 1	1
	スコア 0	0
S100P	スコア 3,4	2
	スコア 2	1
	スコア 0,1	0
N-cadherin/NCAM	合計スコア 0	2
	合計スコア 1,2	1
	合計スコア 3-8	0
分類		
合計点数 > 4: 1 型肝内胆管癌		
合計点数 < 2: 2 型肝内胆管癌		
合計点数 = 3: 分類不能		

表 1. 肝内胆管癌の特殊染色、免疫組織化学染色を用いた分類

5) *IDH1*, *IDH2* および *KRAS* 遺伝子変異解析

近年の大規模ゲノム解析によって判明した肝内胆管癌で頻度の高い遺伝子変異のうち(20-23)、ホットスポットを有する遺伝子として *IDH1/2* および *KRAS* を選択した。各症例について腫瘍を含む代表的なブロックに対し、10 μ m の切片を4枚薄切し、腫瘍を含む領域を十分量マクロダイセクションした。続いて自動核酸抽出装置 (Prepito-D, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)を用い、DNA を抽出した。対象となるホットスポットは、*IDH1* はエクソン4のコードン132、*IDH2* はエクソン4のコードン172、そして *KRAS* はエクソン2を対象とし(24, 25)、Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>)を参照して確認したうえで以下のプライマーを用い、PCRを行った。

IDH1: フォワードプライマー: TCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATAT

リバースプライマー: GGCCATGAAAAAAAAAACATGC

IDH2: フォワードプライマー: AAAACATCCCACGCCTAGTCC

リバースプライマー: GTGCCCAGGTCAGTGGATC

KRAS: フォワードプライマー: TAAGGCCTGCTGAAAATGACTG

リバースプライマー: TGGTCCTGCACCAGTAATATGC.

DNA のシーケンシングについては、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer および 3130xl Genetic Analyzer (Foster City, CA, USA)を用いて解析した。

6) FISH による *FGFR2* 融合遺伝子の解析

前項同様、FFPE ブロックを用いて FISH による解析が可能な遺伝子として *FGFR2* を選択した。腫瘍が含まれる組織マイクロアレイを 5 μ m 厚で薄切して脱パラフィン、親水化した。続いて FFPE FISH PreTreatment Kit (GSP 研究所、川崎) を用いて前処理を行った。親水化したスライドは 95°C、30 分間 Paraffin Pretreatment Solution で処理し、さらに protease にて 37°C、10 分間処理を行った。さらに 10 μ L の *FGFR2* Split Dual-Color FISH probe (GSP 研究所)を滴下して 81°C、5 分間変性させ、暗所にて 37°C、24 時間ハイブリダイゼーションした。その後室温で 2 倍塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム溶液を用いて 5 分洗浄し、DAPI で核染色を加え蛍光顕微鏡 (DM600 microscope, Leica Microsystems)で観察した。陽性判定基準は、(i) 1 ペア以上の緑、赤シグナルがシグナル径の 2 倍以上離れている細胞、または (ii) 対応する赤シグナルが確認されない単独の緑シグナルと、通常の黄シグナルの両方が同時に観察される細胞のいずれかが全体の 20%以上にみられることとした。

7) 統計的解析

定量的変数については Student の t 検定または Mann-Whitney の U 検定によって解析を行い、カテゴリー化されたデータは χ^2 検定または Fisher の正確確率検

定を用いた。全生存及び無再発生存曲線については Kaplan-Meier 法によって作成し、log-rank 検定によって比較した。予後因子については、単変量解析において有意な因子を用いて、Cox 回帰分析によって多変量解析も加えた。結果は P 値が 0.05 未満の際に有意差があると判定した。解析については EZR software (さいたま医療センター、自治医科大学)と JMP Pro 10 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。

2.3 結果

1) 症例概要

対象となったのは合計 102 症例であった。臨床、病理組織、免疫組織化学および遺伝学的解析を全例に施行したが、14 例については一部または全部の遺伝学的解析が不可能であった。

患者の年齢は 25-88 歳 (平均 63.3 歳) で、56 例が男性、46 例が女性であった。B 型肝炎は 9 例、C 型肝炎は 25 例に認められた。ほか、アルコール性肝障害が 3 例、Wilson 病が 1 例、そして病態の不詳な慢性肝障害が 3 例であった。背景に原発性硬化性胆管炎や肝内結石症などの胆道疾患を有する症例はみられなかった。

2) 肝内胆管癌の粘液産生および免疫組織化学的形質

粘液産生については、びまん性(スコア 2)が 43 例、局所的(スコア 1)が 21 例で、またほとんど粘液産生のみられないもの(スコア 0)が 38 例であった。S100P 陽性像は 57 例に認められ、うちスコア 4 が 39 例、スコア 3 が 2 例、スコア 2 が 5 例、スコア 1 が 11 例、そしてスコア 0 が 45 例であった。N-cadherin 陽性像は 71 例に認められ、うちスコア 4 が 22 例、スコア 3 が 14 例、スコア 2 が 15 例、スコア 1 が 20 例、そしてスコア 0 が 31 例であった。また、NCAM 陽性像は 52 例に認められ、スコア 4 が 5 例、スコア 3 が 10 例、スコア 2 が 7 例、スコア 1 が 30 例、そしてスコア 0 が 50 例であった。

3) 形態による肝内胆管癌の 2 亜分類

従前の肝内胆管癌の分類を踏襲し、肝内胆管癌を分類した。ただし、腫瘍の大きさや構築を鑑みると、腫瘍の肝門部側または末梢発生の厳密な定義は困難なため、発生部位による分類は採用しなかった。腫瘍は組織像に従って 2 つの亜型に分類した。そのうち 33 例(32.4%)は明らかな「large duct type」であり、粘液を多量に分泌する円柱状の細胞からなる大型で複雑な管状構造を呈していた。一方で 36 例(35.2%)が典型的な「small duct type」であり、粘液産生に乏しい立方状または低円柱状の細胞からなる小型で比較的均質な管状構造をとっていた。

ほか 33 例(32.4%)については上記の特徴の混合的な組織像を呈し、粘液産生の乏しい高円柱状上皮や、粘液産生の多い立方上皮などを有していた。

4) 粘液特殊染色および免疫組織化学的形質による肝内胆管癌の 2 亜分類

続いて、表 1 で示した分類法を用いて肝内胆管癌を 1 型、2 型に分類した。1 型肝内胆管癌は 42 例(41.2%)、2 型肝内胆管癌は 56 例(55.0%)がそれぞれ分類可能であり、残る 4 例(3.9%)が分類不能であった(表 2)。組織学的に典型的な「large duct type」を呈するものは全て 1 型に、「small duct type」を呈するものは全て 2 型に分類された。1 型、2 型それぞれにおける典型的な組織像を図 1 に、染色頻度について図 2 に示した。

5) 肝内胆管癌における肝細胞癌マーカーの発現

全ての肝内胆管癌について、特異的肝細胞マーカーの **arginase-1** は陰性であった。一方やや特異性の低い肝細胞マーカーの **Hep-par 1** については、局所的またはびまん性の陽性像が 14 例に認められ、スコア 4 が 1 例、スコア 3 が 2 例、スコア 2 が 2 例、そしてスコア 1 が 9 例であった。14 例のうち 1 型は 12 例、2 型が 1 例、判定不能が 1 例で、**Hep-par1** 陽性肝内胆管癌の殆どは粘液産生の豊富な大型腺管からなっており、組織学的な肝細胞との類似性は認められなかった。

(i)

Alcian-blue 染色スコア 2 (2)	S100P スコア		
N-cadherin スコア+ NCAM スコア	3,4 (2)	2 (1)	0,1 (0)
0 (2)	22	1	0
1,2 (1)	11	1	0
3-8 (0)	3	1	4

Alcian-blue 染色スコア 1 (1)	S100P スコア		
N-cadherin スコア+ NCAM スコア	3,4 (2)	2 (1)	0,1 (0)
0 (2)	3	0	0
1,2 (1)	1	1	3
3-8 (0)	1	1	11

Alcian-blue 染色スコア 0 (0)	S100P スコア		
N-cadherin スコア + NCAM スコア	3,4 (2)	2 (1)	0,1 (0)
0 (2)	0	1	0
1,2 (1)	0	0	10
3-8 (0)	0	0	27

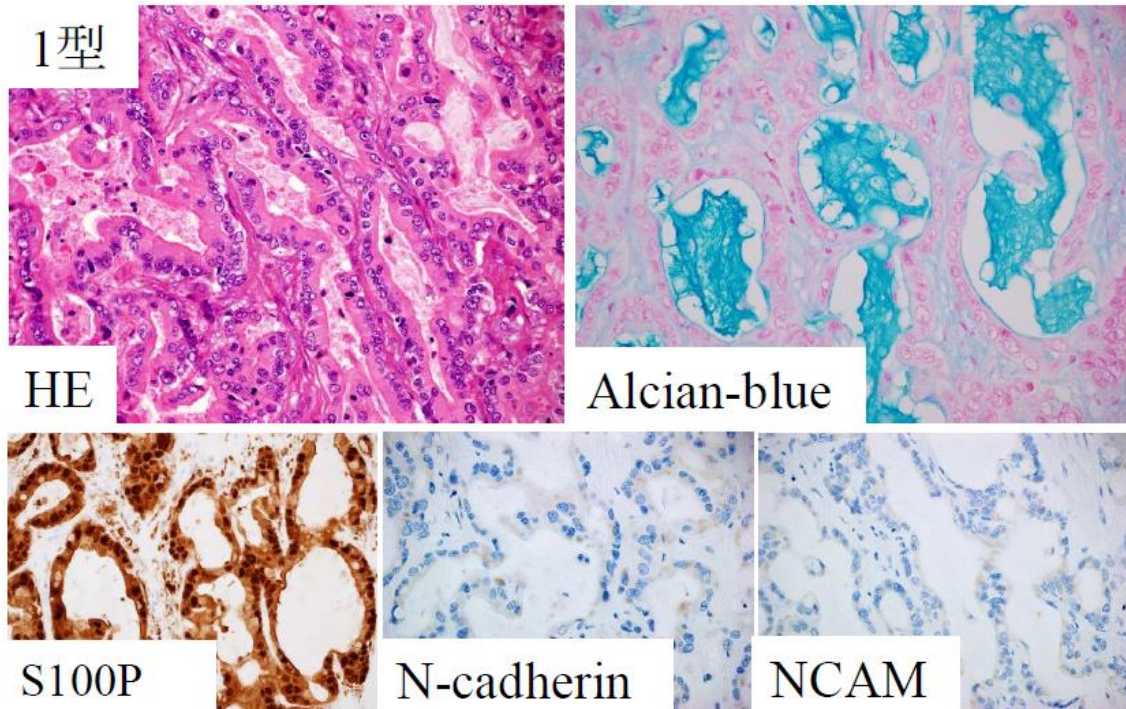
(ii)

分類	合計点	症例数
1 型:	> 4	42 例
2 型:	< 2	56 例
分類不能	3	4 例

表 2. 肝内胆管癌の 1/2 型分類

- (i) 各スコアのカテゴリーの症例数の詳細
- (ii) 各型の症例数の合計

(i)



(ii)

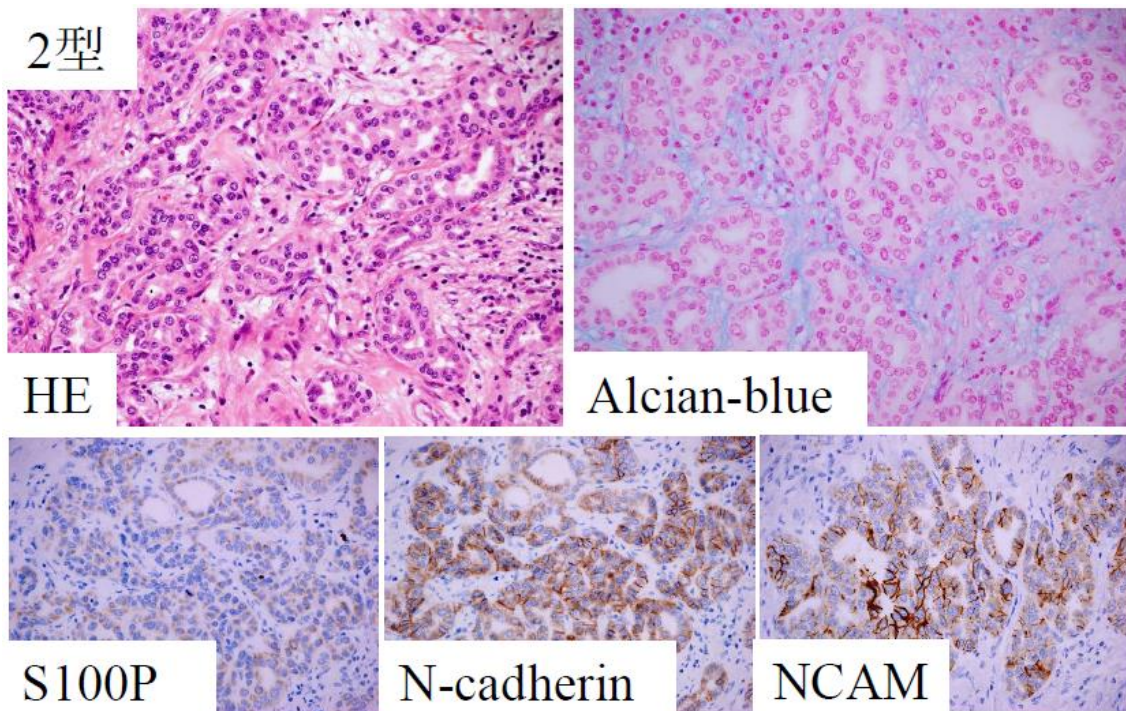
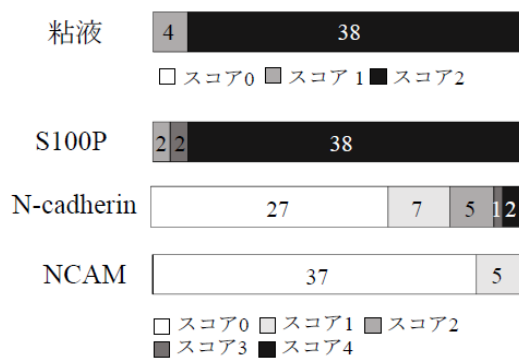


図 1. 典型的な 1/2 型肝内胆管癌の組織像および免疫組織化学的形質

- (i) 大型管状構造を示し粘液を多量分泌する 1 型肝内胆管癌。S100P 陽性、N-cadherin、NCAM 陰性を呈する。
- (ii) 小型管状構造を示し粘液に乏しい 2 型肝内胆管癌。S100P 陰性、N-cadherin、NCAM 陽性を呈する。

(i)

1型



(ii)

2型

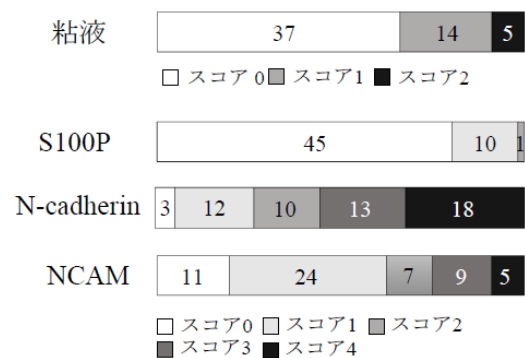


図 2. 1 型と 2 型肝内胆管癌の粘液および免疫組織化学染色のスコア

- (i) 1 型肝内胆管癌。粘液、S100P はほぼ全例に陽性だが、N-cadherin も一部陽性となる。
- (ii) 2 型肝内胆管癌。N-cadherin, NCAM とともにスコア 4 は半数に満たないものの、1 型と比較して高率に陽性であった。粘液が一部スコア 1-2 であるが、S100P は 1 例を除いて全例スコア 1 以下であった。

6) 1 型、2 型肝内胆管癌の臨床病理学的特性

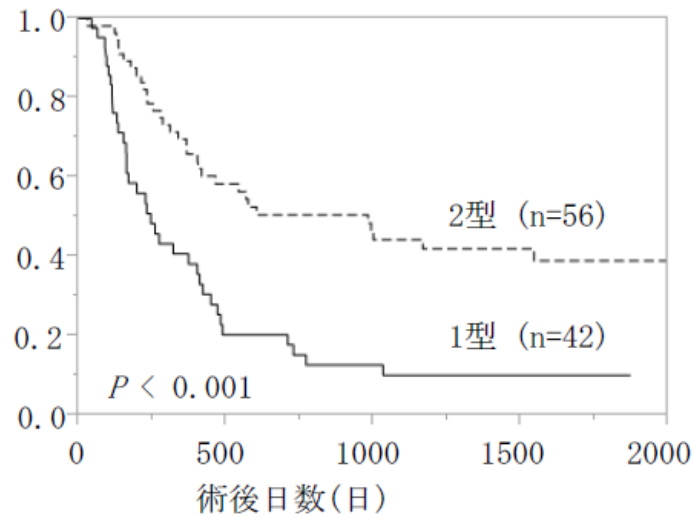
1 型、2 型肝内胆管癌の臨床病理学的特性について表 3 に示した。患者年齢、性別には有意差はみられなかった。2 型肝内胆管癌は 1 型肝内胆管癌と比較して慢性肝疾患を背景にしている頻度が有意に高かった(27/56, 48.2% vs. 11/42, 26.2%, $p = 0.027$)。腫瘍マーカーについては、1 型肝内胆管癌において CEA (中央値 6.2 vs. 3.3 ng/ml, $p < 0.001$)および CA 19-9 (中央値 1,158.5 vs. 36.0 U/ml, $p < 0.001$)が高値であった。ほか、1 型肝内胆管癌は肉眼的には腫瘤形成 + 胆管浸潤癌の形態を呈し、低分化成分が高率にみられ、周囲への上皮内進展が多く、富細胞性の線維化、肝門部浸潤、神経周囲浸潤およびリンパ節転移が多く認められた。背景肝では、胆管上皮内腫瘍は 1 型肝内胆管癌に多くみられた。

さらに、全生存、無再発生存いずれにおいても、1 型肝内胆管癌の方が有意に予後不良であった(図 3)。

	1 型 (n=42)	2 型 (n=56)	分類不能 (n=4)	1 型 vs. 2 型の p 値
年齢 [歳, 平均 ± 標準偏差]	66.4 ± 10.6	65.3 ± 10.1	61.8 ± 11.7	0.602
性別 [男性/女性]	22 / 20	31 / 25	3 / 1	0.770
慢性肝疾患	11 (26.2%)	27 (48.2%)	2 (50.0%)	0.027
ウイルス性肝炎	11 (26.2%)	21 (37.5%)	1 (25.0%)	0.237
B 型肝炎	4	4	1	
C 型肝炎	8	17	0	
その他の慢性肝疾患	0 (0.0%)	6 (10.7%)	1 (25.0%)	
アルコール性肝疾患	0	3	0	
Wilson 病	0	1	0	
病態不詳	0	2	1	
CEA [ng/ml, 中央値 (IQR)]	6.2 (19.9)	3.3 (3.5)	5.5 (6.0)	< 0.001
CA19-9 [U/ml, 中央値 (IQR)]	1158.5 (3038)	36.0 (61.0)	625.5 (323.0)	< 0.001
腫瘍径 [mm, 中央値 (IQR)]	53.6 (20.0)	41.0 (30.5)	56.5 (27.0)	0.098
肉眼像[腫瘍形成型/腫瘍形成+ 胆管浸潤型]	20 / 22	51 / 5	2 / 2	< 0.001
優勢な組織分化度[高/中/低]	8 / 30 / 4	23 / 30 / 3	0 / 2 / 2	0.067
低分化成分の有無	36 (85.7%)	19 (33.9%)	4 (100%)	< 0.001
周囲胆管内病変	28 (66.7%)	10 (17.9%)	2 (50.0%)	< 0.001
多中心性癒痕様線維化	2/31 (6.5%)	25/47 (53.2%)	0/3 (0.0%)	< 0.001
富細胞性線維化	16 (38.1%)	2 (3.6%)	1 (25.0%)	< 0.001
肝門部浸潤	27 (64.3%)	11 (19.6%)	2 (50.0%)	< 0.001
血管侵襲	42 (100%)	53 (94.6%)	4 (100%)	0.258
主要血管浸潤	9 (21.4%)	5 (8.9%)	1 (25.0%)	0.080
神経周囲浸潤	32 (76.2%)	14 (25.0%)	4 (100%)	< 0.001
肝内転移	10 (23.8%)	11 (19.6%)	1 (25.0%)	0.619
リンパ節転移	18 (42.9%)	3 (5.4%)	2 (50.0%)	< 0.001
胆管上皮内病変	11 (26.2%)	1 (1.8%)	1 (25.0%)	< 0.001
胆管微小過誤腫	9 (21.4%)	17 (30.4%)	0 (0.0%)	0.322
胆管腺腫	1 (2.4%)	2 (3.6%)	0 (0.0%)	1.000

表 3. 1 型および 2 型肝内胆管癌の臨床病理学的解析

(i) 無再発生存率



(ii) 全生存率

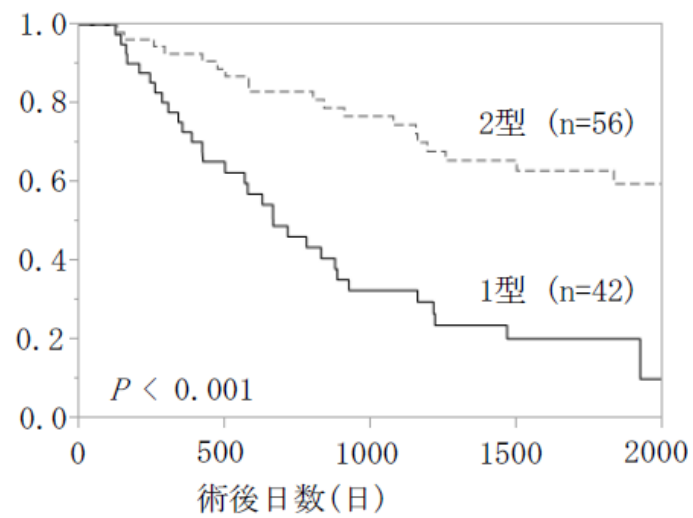


図 3. 1 型および 2 型肝内胆管癌の生存曲線

7) 1 型、2 型肝内胆管癌の組織学的形態

1 型肝内胆管癌は、肝外胆管癌同様に多彩な組織形態を呈する一方で、2 型肝内胆管癌には数点特徴的な組織像が認められた(図 4)。腫瘍細胞は主として立方状または低円柱状であったが(図 4a-c)、粘液産生の乏しい円柱状上皮が含まれる場合や、ほぼ全体を占める場合も認められた(図 4d)。ほか、胞体が多角形で好酸性の細胞が一部にみられることもあり、うち 3 例では殆どが上記の細胞からなる腫瘍であった(図 4e)。淡明な細胞からなるものも 1 例認められた(図 4f)。核異型度はおおむね軽度～中等度であった。構造的には細い管状で、小さな内腔を有することが多く、吻合、分枝を一部に伴っていた。それ以外に管腔の大きく開いたものや、篩状、乳頭状構築を示すもの、そして充実性に増殖するものであっても、2 型肝内胆管癌に分類されるものもあった(図 4A-F)。

いわゆる細胆管癌の組織像についても検討を行った。細胆管癌を、図 4a、b のような細胞質が乏しい小型立方状の上皮を有し、図 4A のように均一、小型で鹿角状に分枝吻合する構築を呈するものと定義したとき(26)、このような組織像が大半である症例は 12 例で、すべて 2 型肝内胆管癌であった。ただし、部分的であれば細胆管癌様の組織像が 2 型肝内胆管癌に含まれることはしばしばであり、細胆管癌と非細胆管癌の明瞭な区別は困難であった。

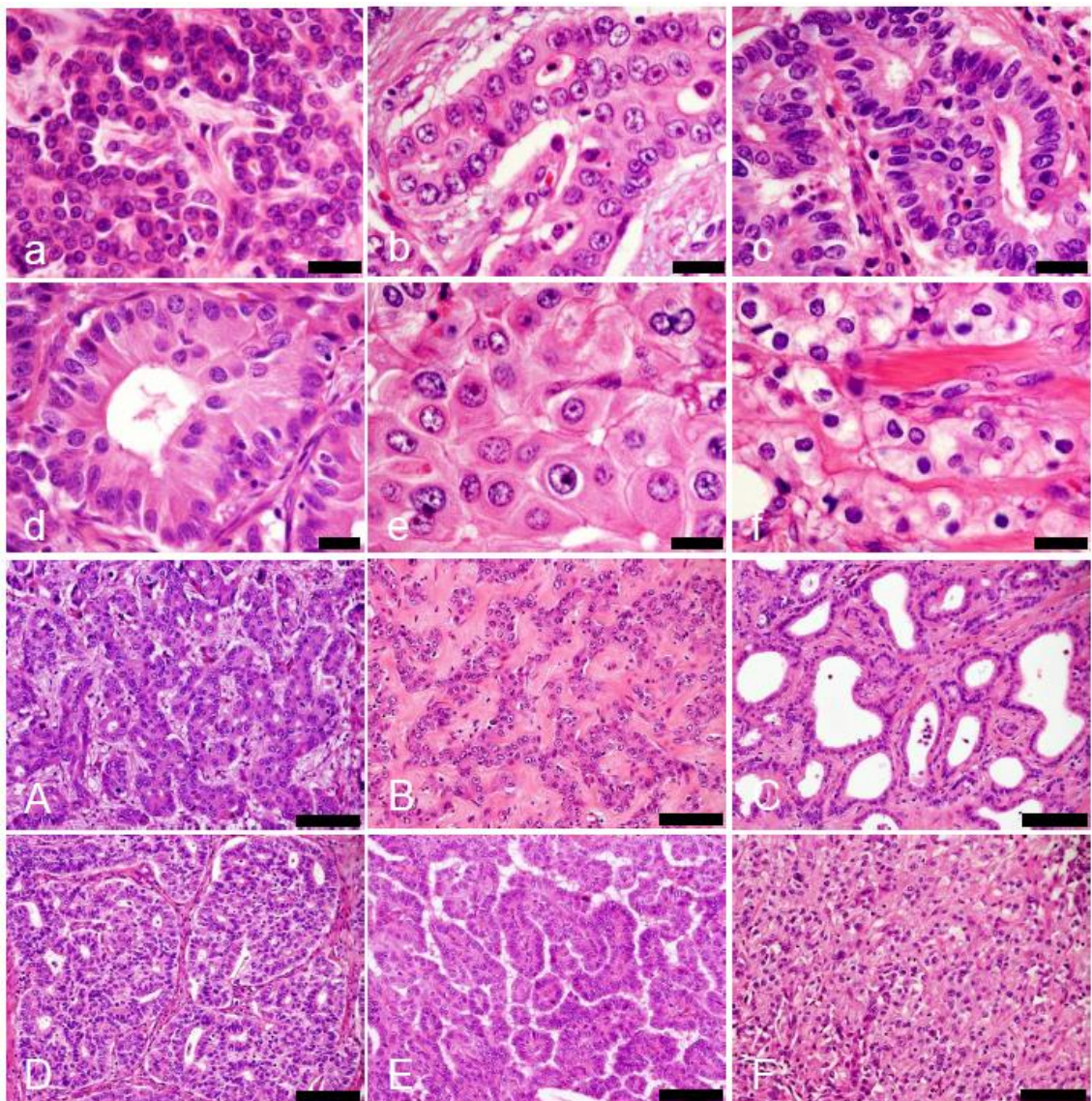


図 4. 2 型肝内胆管癌の組織像

(a-f) 2 型肝内胆管癌の細胞異型。黒線は $10\mu\text{m}$ 。いずれも粘液に乏しい。

(a) 小型立方状上皮。(b) 軽度核異型を有する立方状上皮。(c) 低円柱状上皮。

(d) 円柱状上皮。(e) 好酸性で腫大した細胞質を有する上皮。(f) 淡明な上皮。

(A-F) 2 型肝内胆管癌の構造異型。黒線は $50\mu\text{m}$ 。いずれも粘液に乏しい。

(A) 分枝した細管状構造。(B) 密な線維性間質内に、分枝した柱状構造を呈し、管腔が狭小。(C) 管腔の開いた管状構造。(D) 癒合、篩状腺管構造。(E) 乳頭状構造。(F) 充実性構造。

8) 1 型、2 型肝内胆管癌の遺伝学的解析

KRAS 変異は 88 例中の 12 例(13.6%)にみられ、そのうち G12V 変異が 4 例、G12D 変異が 3 例、G12A 変異が 2 例、そして G12S, A11T, A11S 変異がそれぞれ 1 例であった。*IDH1* または *IDH2* の変異は 95 例中の合計 21 例(22.1%)に認められ、そのうち *IDH1* は R132C 変異が 11 例、R132L 変異が 5 例、R132G 変異が 3 例、そして *IDH2* は R172M, R172K 変異がそれぞれ 1 例であった。

FGFR2 転座は 95 例中の 6 例(6.3%)であった。

1 型と 2 型で *KRAS* および *IDH* の変異頻度は大きく異なっていた(表 4)。*KRAS* 変異は 1 型肝内胆管癌 34 例中 10 例(29.4%)、2 型肝内胆管癌 50 例中 1 例(2.0%; $p < 0.001$)であった。*KRAS* 変異と組織像、免疫組織化学的形質との間には相関はみられなかった。唯一 *KRAS* 変異を伴った 2 型肝内胆管癌は同時に *IDH1* 変異も認められる症例であった。また、1 型/2 型の判定不能であった 4 例中 1 例(低分化で S100P スコア 2)が *KRAS* 変異陽性であった。

IDH1/2 変異については 2 型肝内胆管癌の 53 例中 21 例(39.6%)で認められたが、1 型肝内胆管癌においては 38 例中 0 例であった($p < 0.001$)。また、比較的高分化で均一な小型管状構造の多い 2 型肝内胆管癌において、*IDH* 変異陽性の 2 型肝内胆管癌は 21 例中 10 例(47.6%)が島状の増殖や大型の篩状構造、乳頭状構造を呈した(図 5A)。ただし、*IDH* 変異陰性 2 型肝内胆管癌 35 例中 9 例でも

		<i>KRAS</i> 変異	<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> 変異	<i>FGFR2</i> 転座
手法		PCR-シーケンシング	PCR-シーケンシング	FISH
合計		12 / 88 (13.6%)	21 / 95 (22.1%)	6 / 95 (6.3%)
1 型/2 型 分類	1 型	10 / 34 (29.4%)	0 / 38 (0.0%)	0 / 38 (0.0%)
	2 型	1 / 50 (2.0%)	21 / 53 (39.6%)	6 / 53 (11.3%)
	分類不能	1 / 4 (25.0%)	0 / 4 (0.0%)	0 / 4 (0.0%)
1 型 vs. 2 型の p 値		< 0.001	< 0.001	0.038

表 4. 1 型および 2 型肝内胆管癌の遺伝子変異

同様の組織像がみられた。また、2型肝内胆管癌のうち *IDH* 変異例の方が神経周囲浸潤が高頻度であり (*IDH* 変異 21 例中 9 例 42.9% vs. *IDH* 野生型 35 例中 5 例 14.3%; $p=0.017$)、またスコア 3 以上の NCAM 染色についても高頻度であった(図 5B; 21 例中 10 例 47.6% vs. 35 例中 4 例 11.4%; $p=0.004$)。その他の因子については有意差は見られなかった。

さらに、FGFR2 転座についても、2型肝内胆管癌のみで認められた(53 例中 6 例、11.3%)。組織学的には 3 例は乳頭状増殖が主としてみられ(図 5C)、残り 3 例は管状、細管状、細索状の成分が主体であった(図 5D)。

9) 肝内胆管癌の予後因子

単変量および多変量 Cox 回帰分析を行い、肝内胆管癌の予後因子について解析した(表 5,6)。単変量解析では、肉眼的な周囲胆管浸潤、1型肝内胆管癌、低分化成分の存在、肝門部浸潤、主要血管侵襲、神経周囲浸潤、肝内転移、またリンパ節転移が無再発生存、全生存ともに予後不良因子として認められた。

さらに、単変量解析にて p 値が 0.001 未満であった 6 項目について多変量解析を行ったところ、低分化成分および肝内転移は無再発生存、全生存ともに予後不良因子であり、また主要血管侵襲については無再発生存のみについて有意に予後不良因子であった。

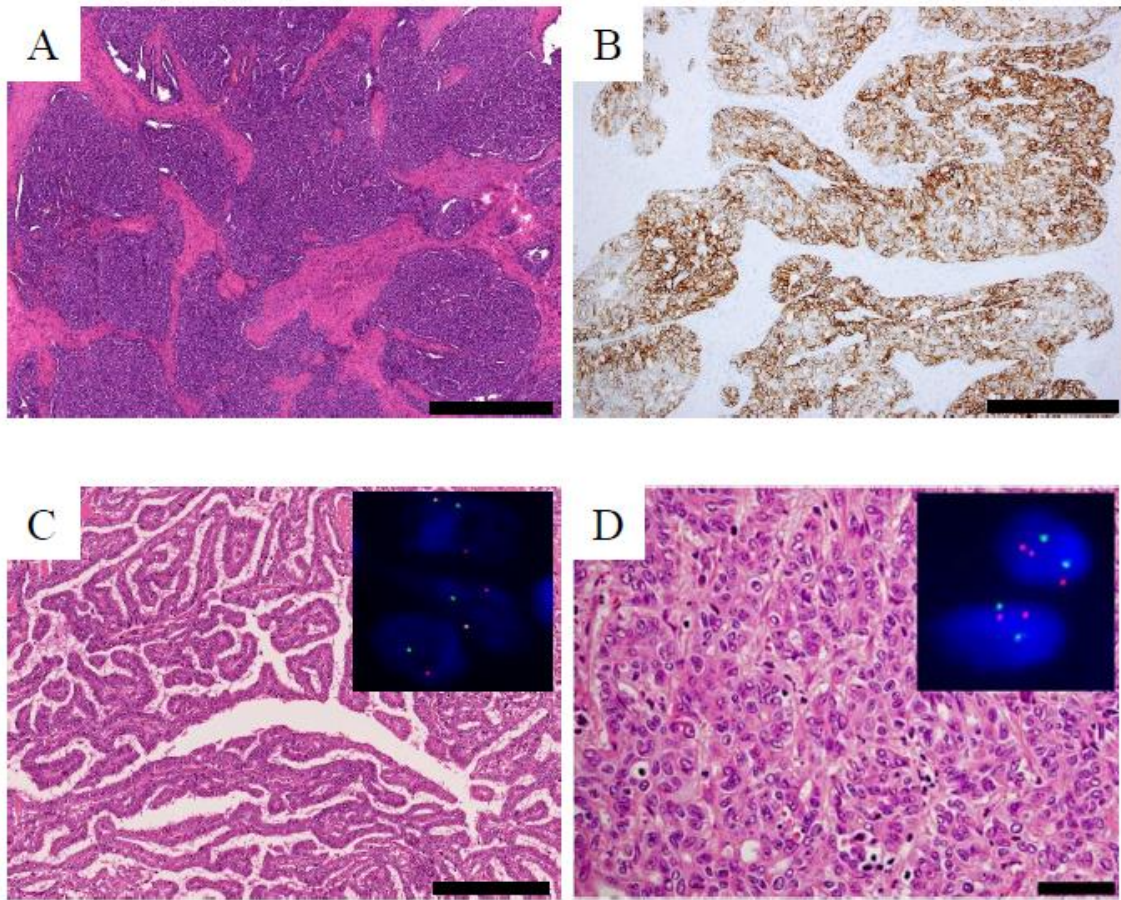


図 5. *IDH* 変異および *FGFR2* 転座を有する肝内胆管癌の組織像

- A) *IDH1* R132C 変異を伴う 2 型肝内胆管癌。島状増殖を呈する。黒線は 1mm。
- B) *IDH1* R132C 変異を伴う 2 型肝内胆管癌。NCAM 染色に陽性を呈する。黒線は 200 μ m。
- C) *FGFR2* 転座を伴う 2 型肝内胆管癌。乳頭状増殖を呈する。黒線は 250 μ m。緑、赤シグナルの分断がみられる。
- D) *FGFR2* 転座を伴う 2 型肝内胆管癌。管腔構造の不明瞭な索状構造を呈する。黒線は 100 μ m。緑、赤シグナルの複雑な再構成がみられる。

単変量解析	無再発生存		全生存	
因子	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値
年齢 [>65 歳 vs. <65 歳]	1.032 (0.652-1.634)	0.892	1.008 (0.596-1.705)	0.976
性別 [男性 vs. 女性]	1.048 (0.662-1.658)	0.843	1.078 (0.635-1.832)	0.780
慢性肝疾患 [あり vs. なし]	0.699 (0.429-1.138)	0.149	0.879 (0.508-1.520)	0.644
腫瘍径 [>5cm vs. ≤5cm]	1.787 (1.120-2.852)	0.015	1.551 (0.915-2.631)	0.103
肉眼的胆管浸潤 [あり vs. なし]	1.680 (1.034-2.729)	0.036	2.276 (1.332-3.888)	0.002
1 型/2 型分類 [1 型 vs. 2 型]	2.391 (1.496-3.822)	<0.001	2.996 (1.738-5.165)	<0.001
低分化成分が優勢 [yes vs. no]	1.868 (0.890-3.921)	0.099	2.822 (1.267-6.287)	0.011
低分化成分を含む [あり vs. なし]	4.035 (2.394-6.803)	<0.001	6.246 (3.125-12.49)	<0.001
肝門部浸潤 [あり vs. なし]	1.844 (1.161-2.927)	0.010	1.773 (1.042-3.015)	0.035
主要血管侵襲 [あり vs. なし]	3.953 (2.181-7.165)	<0.001	3.126 (1.621-6.028)	<0.001
神経周囲浸潤 [あり vs. なし]	2.428 (1.512-3.900)	<0.001	2.859 (1.648-4.962)	<0.001
肝内転移 [あり vs. なし]	2.879 (1.715-4.833)	<0.001	3.023 (1.726-5.296)	<0.001
リンパ節転移 [あり vs. なし]	2.807 (1.668-4.726)	<0.001	3.006 (1.672-5.404)	<0.001

表 5. 肝内胆管癌の予後因子について(単変量解析)

多変量解析	無再発生存		全生存	
因子	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値
1 型/2 型分類 [1 型 vs. 2 型]	1.283 (0.716-2.301)	0.402	1.441 (0.771-2.694)	0.252
低分化成分を含む [あり vs. なし]	2.716 (1.356-5.438)	0.005	3.795 (1.612-8.935)	0.002
主要血管侵襲 [あり vs. なし]	2.372 (1.254-4.485)	0.008	1.592 (0.798-3.176)	0.187
神経周囲浸潤 [あり vs. なし]	0.924 (0.518-1.647)	0.788	1.123 (0.597-2.111)	0.720
肝内転移 [あり vs. なし]	2.379 (1.362-4.157)	0.002	2.211 (1.233-3.967)	0.008
リンパ節転移 [あり vs. なし]	1.188 (0.665-2.125)	0.560	1.240 (0.664-2.313)	0.499

表 6. 肝内胆管癌の予後因子について(多変量解析)

10) 既存の分類との比較

腫瘍の局在による分類では、典型的な末梢型は 50 例(49.0%)、肝門部型は 32 例(31.2%)、そして分類不能型が 20 例(19.6%)であり、末梢型のうち 12 例が 1 型肝内胆管癌、肝門部型のうち 8 例が 2 型であった(表 7)。また、同じ末梢型 50 例の中でも、1 型肝内胆管癌は有意に予後不良であった。肝門部型、分類不能型については、1/2 型分類による予後の有意差はみられなかった(図 6)。

2.4 考察

肝内胆管癌という名称がそのまま意味するところは、肝内を原発とする胆管系の悪性腫瘍ということになるが、実際にはその解釈は必ずしも自明ではない。まず、「肝内」については、背景の胆管自体が肝内から肝外へ樹枝状に連続した構築をしており(4)、また腫瘍の浸潤、増大に伴い周囲の本来の構築が破壊されるため、境界領域で発生した腫瘍については例えば肝管二次分枝を基準とするといったような取り決めに要することがある(19)。また、「胆管癌」については、同一症例の中で肝細胞癌と胆管癌が隣接、混在する混合型肝癌の存在や、肝細胞、胆管細胞両方向への分化可能性を有する肝幹細胞についての研究の進展(27)、そして近年組織学的に胆管癌の構築を呈するような悪性腫瘍が胆管細胞ではなく

		肝門部型	末梢型	分類不能
1/2 型 分類	1 型	24 (23.5%)	12 (11.8%)	6 (5.9%)
	2 型	8 (7.8%)	38 (37.2%)	10 (9.8%)
	分類不能	0	0	4 (3.9%)

表 7. 既存の局在分類と 1/2 型分類による症例数の比較

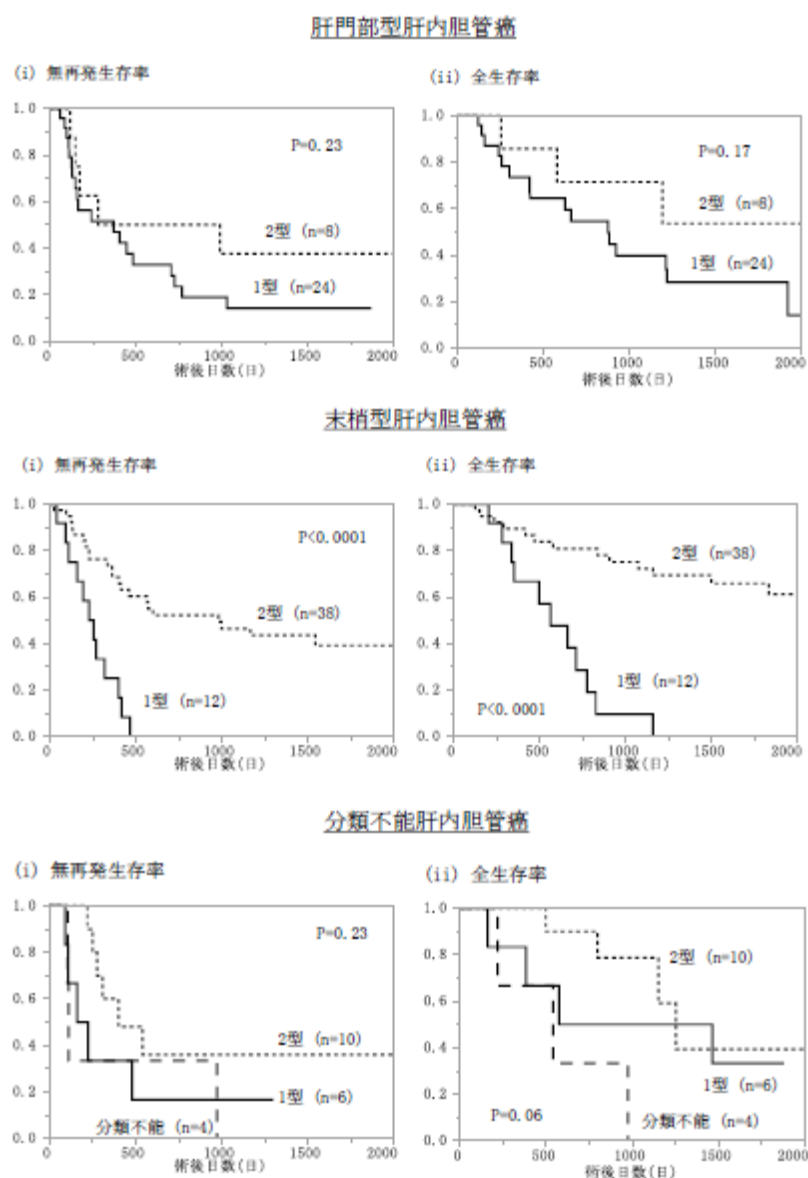


図 6. 肝内胆管癌の各局在分類における、1/2 型肝内胆管癌の予後

肝細胞から培養されうることが見出されたことなどから(28)、肝細胞性の腫瘍と胆管細胞性の腫瘍に一定の連続性が示唆されるといったことがある。すなわち、肝内胆管癌と診断される一連の腫瘍を均質な集団として扱うのではなく、その特性に従って分類し解析することが必要になると考えられる。

今回、粘液特殊染色と 3 項目の免疫組織化学染色を組み合わせることによって、殆ど(96.0%)の肝内胆管癌を 2 群に分類できることが示された。この分類は本来的には肝内胆管癌の局在分類、すなわち肝門部型と末梢型の 2 分類から出発したものであるが(13)、本研究において局在評価のみで行った分類では 20 例(19.6%)が分類不能であったのに比較して分類不能の件数が減少しており、かつ予後をより正確に反映していることや、今回の評価が客観的、半定量的なスコアによって行えることは大きな利点である。また、結果的に臨床病理学的なパラメーター、予後において明らかな有意差が示されたことは、この分類が肝内胆管癌の特徴的な 2 群を抽出できている傍証であると考えられる。

1 型肝内胆管癌を代表する染色項目として alcian-blue と S100P、また 2 型肝内胆管癌を代表する染色項目として N-cadherin と NCAM を選択したが、単体で感度特異度ともに最も 2 群を峻別しうるのは図 2 の通り S100P であった。実務的には、S100P を先行して染色すれば多くの場合は判定可能で、そこでスコア 2 となった時に N-cadherin や NCAM を染色することで補完するといった方法も考え

られる。逆に、N-cadherin と NCAM のスコアが 1 または 2 のため単体では判定不能だが、S100P や alcian-blue が陰性であることから 2 型肝内胆管癌と分類された症例が 13 例認められた。2 型肝内胆管癌を包括するような陽性指標を探索することは今後の課題と考えられる。

組織学的には、1 型肝内胆管癌は他の分類方法で「ordinary adenocarcinoma type」と表されるものとほぼ同一で(10)、通常肝外胆管癌でみられるような腺癌の組織像と類似していた。一方で 2 型肝内胆管癌はより肝内に特異的な組織像を呈することが多く、いわゆる細胆管癌として合致する組織像を呈する胆管癌についてもすべて 2 型肝内胆管癌に分類された。ただし、2 型肝内胆管癌の組織像は「ductular type」や「cholangiolar type」と考えられるものだけに留まらず(10-12)、円柱状上皮や乳頭状、篩状構造を呈するものも含まれていた。

遺伝学的解析についても、1 型 vs. 2 型の分類を支持する結果であった。2 例を除いて *KRAS* 変異は 1 型肝内胆管癌にみられ、一方 *IDH* 変異と *FGFR2* 融合遺伝子は 2 型 肝内胆管癌のみに認められた。既報においても *KRAS* 変異は肝外、肝内胆管癌の両方に認められるが、*IDH* 変異と *FGFR2* 融合遺伝子は肝内胆管癌に特異的であった(12, 23)。これらを総合して、1 型肝内胆管癌は肝外胆管癌と類似する性質を有する一群で、2 型肝内胆管癌は肝前駆細胞に由来する可能性がある一群であると言える。

肝細胞マーカーの染色を行ったところ、肝内胆管癌 14 例に Hep-par1 が陽性であったが、Hep-par1 は肝細胞マーカーとしての特異性がやや低く、他臓器を含めた腺癌で一部陽性になることや(29)、今回 Hep-par1 が陽性になった症例が組織学的には粘液を有する大型管腔構造を呈し、肝細胞癌の組織形態から大きく逸脱していたことから、肝細胞癌成分とは判断されない。また、肝細胞マーカーとして最も感度特異度に優れるとされる arginase-1 については(30)、好酸性多角形の細胞からなる腫瘍を含め全例に陰性であった。少なくともこれら 2 項目については、いずれの腫瘍も肝細胞癌成分は含んでおらず、全体が胆管癌であったと判定される。

一方で、2 型肝内胆管癌は B 型肝炎、C 型肝炎のような慢性肝疾患を背景に発生することが多く、この点は肝細胞癌と共通する点である。また、2 型肝内胆管癌には *IDH* 変異が高頻度に認められたが、これは TCGA database に基づく網羅的な解析において、典型的な組織像を呈する肝細胞癌は *IDH* 変異を伴わない一方で、その他の *IDH* 変異を有する肝腫瘍は組織学的および遺伝学的に肝内胆管癌に類似しているという既報と合致する結果である(31, 32)。慢性肝障害から通常肝細胞癌を発症するところ、*IDH* 変異が加わることによって肝内胆管癌方向に分化するという推測も可能であり、今後さらに研究を要する。

また、肝細胞癌、肝内胆管癌双方への分化を示す混合型肝癌においても、その

肝内胆管癌成分は 2 型の形質を呈することが予想される。現行の原発性肝癌取り扱い規約については、混合型肝癌の肝内胆管癌成分は腺癌であり、粘液産生を伴うという規定がなされている(7)が、もしこの肝内胆管癌が 2 型であるならば、粘液産生の頻度はむしろ低くなると考えられ、今後の研究を要する。

本分類は、生検または手術により腫瘍そのものを評価する必要があり、簡便に術前に行いにくいという問題があるが、今後肝内、肝門部境界の妥当な分類や、細胆管癌の適切な分類についての議論に資することが期待される。

一般的に予後不良とされる肝内胆管癌であるが(2)、その中でも 1 型肝内胆管癌は予後不良な一群であり、また脈管侵襲や肝門部浸潤、肝内転移といった各項目についても有意に多く認められた。1 型という分類そのものは多変量解析を行った際には予後に有意差はみられなかったものの、1 型が一般に浸潤傾向のより強い一群であるということは、治療方針の選択において一つの指標となりうる。また、遺伝子解析による二群間の明瞭な差が得られたことから、新規の分子標的薬が適応になった際に、免疫組織化学染色による 1 型/2 型分類をもって、遺伝子検索の対象を絞り込める可能性が示された。

今回の研究により、特殊染色および免疫組織化学染色によるスコアリングのみで肝内胆管癌のほとんどを、臨床病理学的、また分子病態学的に明確な差を有する二群に分類可能であることが示された。

第三章 肝内胆管癌における *BAP1*, *PBRM1* 発現消失

3.1 背景と目的

近年、肝内胆管癌においても大規模なゲノム解析が施行され、前章で示した *KRAS*, *IDH* 変異や *FGFR2* 融合遺伝子の他、*BAP1* や *PBRM1* 遺伝子についても変異が報告されるようになった(20, 23, 33)。*BAP1*, *PBRM1* 遺伝子はいずれも 3p 染色体上にあり、クロマチン再構成に関与していることが知られている。

BAP1 蛋白は HCF-1 と結合し、単一ユビキチン化ヒストン H2A を標的とした脱ユビキチン化を司っており、これの欠失は腎臓明細胞癌の 10-15%や、ほか悪性黒色腫などにおいて認められる(34, 35)。一方 *PBRM1* 遺伝子はクロマチン再構成複合体 SWI/SNF の構成要素である BAF180 をコードしており、これの欠失は特に腎臓明細胞癌では *VHL* に次いで二番目に頻度が高く、40-50%で変異がみられる(35, 36)。*BAP1*, *PBRM1* 遺伝子ともに、上記のエピジェネティックな気候により、癌抑制遺伝子として機能していることが知られている。

一方で、いずれの遺伝子も特定のホットスポットを有さず、その変異解析を直接行うためには whole exome sequencing などの費用の掛かる手法を必要とする。そのため、免疫組織化学染色による *BAP1*、BAF180 染色によって解析され

ることも多く、特に *BAP1* 遺伝子は免疫組織化学染色で陽性、陰性的中率ともに 98%以上といわれている(37-39)。

肝内胆管癌における *BAP1*, *PBRM1* 変異症例の臨床病理学的特徴については十分に明らかにされていないが、一方で *BAP1* 変異は胆管癌の中では殆ど肝内胆管癌のみで報告がなされており、肝外胆管癌での頻度は非常に低い(23)。これは *IDH* や *FGFR2* と同様の傾向と言え、*BAP1* 変異も 2 型肝内胆管癌の一つの陽性指標である可能性がある。また、腎臓明細胞癌では *BAP1*, *PBRM1* 変異はそれぞれ相互排他的であることが知られており(35, 40)、*PBRM1* 変異についても興味を持たれる。

今回の研究では、肝内胆管癌における *BAP1*, *PBRM1* 変異について免疫組織化学染色を用いて評価し、またその臨床病理学的解析、その他の免疫組織化学的形質および遺伝子変異との相関について解析した。

3.2 材料と方法

3.2.1 材料

1) 症例の選択

東京大学医学部附属病院肝胆膵外科において、1995 年 1 月 1 日から 2014 年

12月31日までに切除された連続症例計108例を対象とし、ホルマリン固定パラフィン包埋標本および組織マイクロアレイを用いた。肝内胆管癌の定義や除外基準については前章と同様に行った。

2) 倫理委員会の承認に関する事項

東京大学医学部附属病院での病理組織検体を用いた研究については、「肝腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」という題目で東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けている(審査番号 G2210)。

3.2.2 方法

1) 免疫組織化学染色

各症例について腫瘍を含む代表的なブロックに対し、3 μm の切片を薄切し、自動染色装置 Benchmark XT (Roche, Basel, Switzerland)を用いて免疫組織化学染色を施行した。染色に用いる抗体は、抗 BAP1 抗体 (sc-28383, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA, 1:25 で希釈)、抗 PBRM1/BAF180 抗体 (A301-591A, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA, 1:500 で希釈)を用い、増

感剤としては OptiView DAB IHC Detection Kit を使用した。核への染色像をもって陽性とし、細胞質への染色は評価しなかった。

2) 追加症例の解析

本研究は、前章の症例に加え 2014 年 1 月 1 日から 2014 年 12 月 31 日までの症例を解析の対象としており、この追加症例については臨床情報の追跡、病理組織診断のレビュー、alcian-blue 染色、および S100P, N-cadherin 免疫組織化学染色、*IDH1/2*, *KRAS* の変異解析、*FGFR2* の FISH を行った。

3) 統計的解析

定量的変数については Student の t 検定または Mann-Whitney の U 検定によって解析を行い、カテゴリー化されたデータは χ^2 検定または Fisher の正確確率検定を用いた。全生存及び無再発生存曲線については Kaplan-Meier 法によって作成し、Wilcoxon 検定によって比較した。予後因子については、単変量解析において有意な因子を用いて、Cox 回帰分析によって多変量解析も加えた。結果は P 値が 0.05 未満の際に有意差があると判定した。解析については EZR software (さいたま医療センター、自治医科大学) と JMP Pro 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用した。

3.3 結果

1) 背景肝における BAP1, PBRM1 の免疫組織化学染色

BAP1、PBRM1 とともに、背景の非腫瘍部分については小型胆管から大型胆管に至るまで陽性であり、一方肝細胞については全体に不均一で弱い陽性像であった(図 1A-C)。また、炎症細胞や血管内皮細胞も多くは強い陽性像を呈した。

2) 肝内胆管癌における BAP1, PBRM1 の免疫組織化学染色

多くの症例においては、BAP1, PBRM1 とともに、陽性強度にばらつきがあるものも含めてびまん性の染色(陽性率>90%、図 1D-F)か、ほぼ完全に陰性(陽性率<1%)のどちらかに該当した。BAP1 は 83 例(76.9%)でびまん性の陽性、21 例(19.4%)で完全な陰性であり(図 1G-I)、4 例(3.7%)のみが領域性に陰性像を呈した(図 2A-C)。PBRM1 は 74 例(68.5%)でびまん性の陽性、25 例(23.1%)で完全な陰性であり(図 1J-L)、6 例(5.6%)が局所的な陰性像を呈し(図 2D-F)、3 例(2.8%)がモザイク状の陰性像を呈した。

肝内胆管癌および背景胆管での BAP1, PBRM1 の染色頻度について表 1 に記した。なお、完全な陰性症例も部分陰性症例も同様に陰性症例として扱った。BAP1 と PBRM1 変異の間には相関関係がみられなかった。ただし、一例のみ BAP1 と PBRM1 が腫瘍内で相互排他的に陰性像を示すものがあった(図 2G-I)。

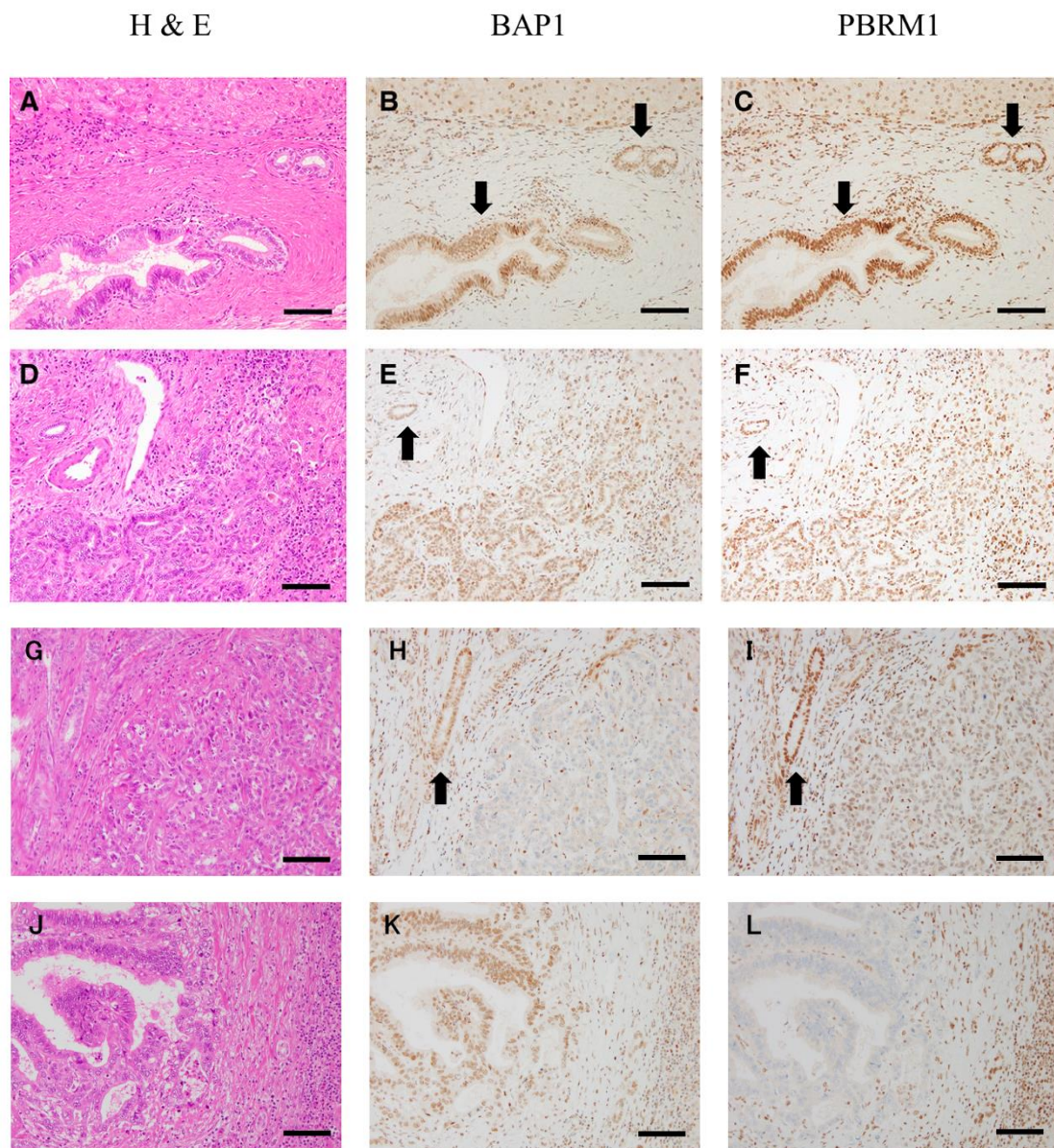


図 1. 背景肝、肝内胆管癌での BAP1, PBRM1 染色の例(矢印は背景胆管。黒線は 100 μ m)

A-C. 背景の大型胆管、小型胆管ともに BAP1, PBRM1 の発現消失はみられない

D-F. BAP1, PBRM1 とともに発現消失のみられない肝内胆管癌 (写真右下)

G-I. BAP1 のみでびまん性の発現消失のみられる肝内胆管癌 (写真右)

J-L. PBRM1 のみでびまん性の発現消失のみられる肝内胆管癌 (写真左)

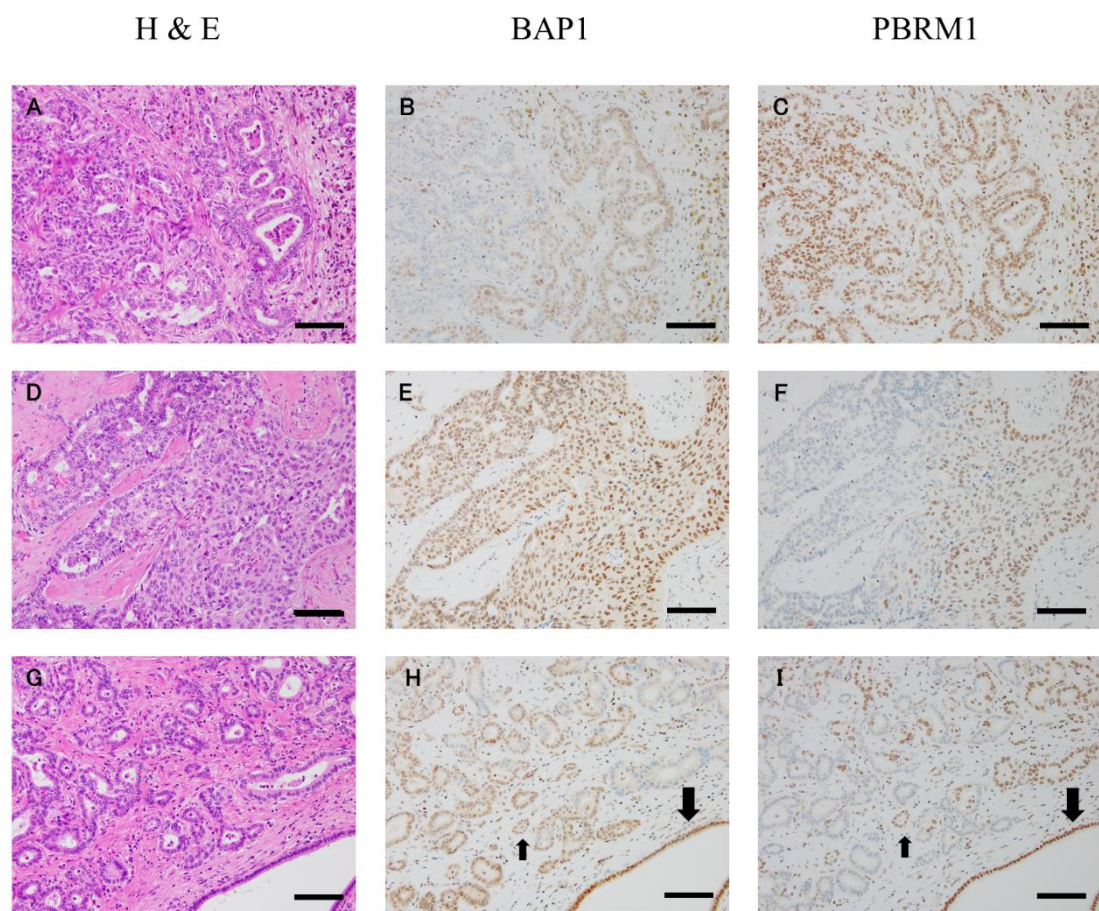


図 2. 肝内胆管癌での BAP1, PBRM1 染色の例(矢印は背景胆管。黒線は 100 μ m)
A-C. BAP1 のみで領域性に発現消失のみられる肝内胆管癌
D-F. PBRM1 のみで領域性に発現消失のみられる肝内胆管癌
G-I. BAP1, PBRM1 で相互排他的な発現消失のみられる肝内胆管癌

BAP1 / PBRM1 発現	肝内胆管癌	背景胆管	p 値
発現あり/発現あり	57 (52.8%)	108 (100.0%)	< 0.001
発現消失/発現あり	17 (15.7%)	0	
発現あり/発現消失	26 (24.1%)	0	
発現消失/発現消失	8 (7.4%)	0	

表 1. 肝内胆管癌、背景胆管における BAP1, PBRM1 の発現消失頻度

3) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の臨床病理学的特徴

BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の臨床病理学的特徴を表 2 に示す。BAP1 発現消失肝内胆管癌は CA19-9 の発現量が低く ($p=0.006$)、肉眼的には腫瘤形成型で ($p<0.001$)、神経周囲浸潤が少なかった ($p=0.004$)。また傾向として、背景に慢性肝疾患を有し、CEA が低く、分化度が高く、血管侵襲が少なく、またリンパ節転移が少なかったものの、いずれも有意な差ではなかった。一方で PBRM1 発現の有無は全ての項目において有意差はみられなかった。ただし、PBRM1 発現消失肝内胆管癌は CA19-9 が低値で、周囲胆管内病変、主要血管浸潤が少ない傾向は認められた。

4) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の粘液産生、S100P および N-cadherin の免疫組織化学的形質

BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の粘液産生、免疫組織化学的形質について表 3 に示す。BAP1 発現消失肝内胆管癌では粘液産生が少なく、S100P が陰性、N-cadherin が陽性の率が有意に高く認められた。一方で PBRM1 においてはいずれも有意差が認められなかった。ただし、PBRM1 発現消失肝内胆管癌は粘液産生が少なく、S100P が陰性の頻度が多い傾向にあった。

	BAP1 発現消失 (n=25)	BAP1 発現あり (n=83)	p 値	PBRM1 発現消失 (n=34)	PBRM1 発現あり (n=74)	p 値
年齢 [歳, 平均 ± 標準偏差]	63.6 ± 8.7	66.3 ± 10.4	0.205	67.1 ± 10.0	65.0 ± 10.1	0.315
性別 [男性/女性]	14 / 11	43 / 40	0.820	15 / 19	42 / 32	0.300
慢性肝疾患	11 (44.0%)	30 (34.9%)	0.481	14 (41.1%)	26 (35.1%)	0.663
ウイルス性肝炎	9 (36.0%)	24 (28.9%)		13 (43.3%)	20 (27.0%)	
B 型肝炎	2	6		2	6	
C 型肝炎	7	17		10	14	
B 型肝炎、C 型肝炎合併	0	1		1	0	
その他の慢性肝疾患	2 (8.0%)	5 (6.0%)		1 (2.9%)	6 (8.1%)	
アルコール性肝疾患	2	1		0	3	
Wilson 病	0	1		0	1	
病態不詳	0	3		1	2	
CEA [ng/ml, 中央値 (IQR)]	3.1 (2.2)	4.9 (6.0)	0.309	4.0 (5.2)	4.4 (5.4)	0.312
CA19-9 [U/ml, 中央値 (IQR)]	25 (47)	104 (1466)	0.006	40 (104)	90 (1273)	0.331
腫瘍径 [mm, 中央値 (IQR)]	42 (35)	45 (28)	0.135	48 (36)	44 (29)	0.252
肉眼像 [腫瘍形成型 / 腫瘍形成+胆管浸潤型]	23 / 2	54 / 29	0.011	23 / 8	51 / 26	0.497
優勢な組織分化度 [高/中/低]	10 / 15 / 0	23 / 51 / 9	0.159	12 / 20 / 2	21 / 46 / 7	0.766
周囲胆管内病変	5 (20.0%)	37 (44.6%)	0.035	10 (29.4%)	32 (43.2%)	0.206
微小血管浸潤	23 (92.0%)	82 (98.8%)	0.133	34 (100%)	72 (97.3%)	0.552
主要血管浸潤	2 (8.0%)	14 (16.9%)	0.352	2 (5.9%)	14 (18.9%)	0.089
神経周囲浸潤	6 (24.0%)	46 (55.4%)	0.007	16 (47.1%)	36 (48.6%)	1.000
肝内転移	6 (24.0%)	18 (21.7%)	0.789	8 (23.5%)	16 (21.6%)	0.808
リンパ節転移	2 (8.0%)	23 (27.7%)	0.057	8 (23.5%)	17 (23.0%)	1.000

表 2. BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の臨床病理学的特徴

	BAP1 発現消失 (n=25)	BAP1 発現あり (n=83)	p 値	PBRM1 発現消失 (n=34)	PBRM1 発現あり (n=74)	p 値
免疫組織化学的因子						
粘液産生 [少/中/多]	23 / 1 / 1	17 / 23 / 43	< 0.001	15 / 10 / 9	25 / 14 / 35	0.112
S100P [<1% / 1-50% / 51-100%]	23 / 2 / 0	24 / 16 / 43	< 0.001	18 / 3 / 13	29 / 15 / 30	0.259
N-cadherin [<1% / 1-50% / 51-100%]	0 / 13 / 12	33 / 23 / 27	< 0.001	8 / 13 / 13	25 / 23 / 26	0.554
遺伝学的因子						
<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> 変異	10/24 (41.6%)	11/77 (14.3%)	0.008	6/32 (18.8%)	15/69 (21.7%)	1.000
<i>KRAS</i> 変異	1/23 (4.3%)	11/71 (15.4%)	0.282	1/28 (3.6%)	11/66 (16.7%)	0.101
<i>FGFR2</i> 転座	3/24 (12.5%)	3/83 (3.8%)	0.126	2/30 (6.7%)	4/72 (5.6%)	1.000

表 3. BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の粘液産生、免疫組織化学的形質および遺伝学的形質

	BAP1 発現消失 (n=25)	BAP1 発現あり (n=83)	p 値	PBRM1 発現消失 (n=34)	PBRM1 発現あり (n=74)	p 値
1 型肝内胆管癌	0	44	< 0.001	14	30	0.292
2 型肝内胆管癌	25	34		20	39	
分類不能肝内胆管癌	0	5		0	5	

表 4. BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の 1 型/2 型分類

5) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の遺伝学的形質

BAP1 発現消失肝内胆管癌は *IDH1/IDH2* 変異が有意に多く認められた。また、有意差はみられなかったものの *FGFR2* 転座が多く、*KRAS* 変異が少ない傾向にあった。

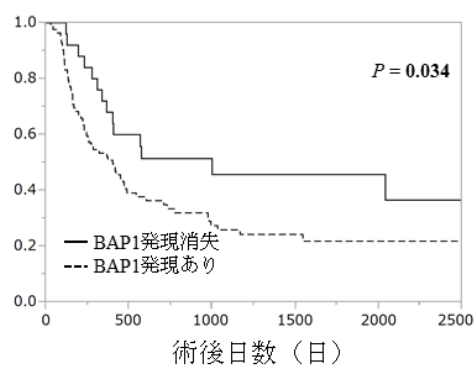
6) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌と 1 型/2 型分類の相関

BAP1 発現消失肝内胆管癌 25 例のうち、全例が 2 型肝内胆管癌であり、一方 BAP1 発現の保たれた 83 例については 2 型肝内胆管癌は 34 例(41.0%)であった。PBRM1 発現消失肝内胆管癌 34 例では、2 型肝内胆管癌は 20 例(58.8%)、PBRM1 発現の保たれた 74 例では 2 型肝内胆管癌は 39 例(52.7%)であった(表 4)。

7) BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の予後

BAP1 発現消失肝内胆管癌は、無再発生存、全生存ともに有意に良好であった(図 2)。PBRM1 は無再発生存、全生存ともに有意な差は認められなかった。さらに、BAP1 発現消失は単変量解析、多変量解析のいずれにおいても、無再発生存、全生存の予後良好因子であることが示された(表 5)。

A. 無再発生存



B. 全生存

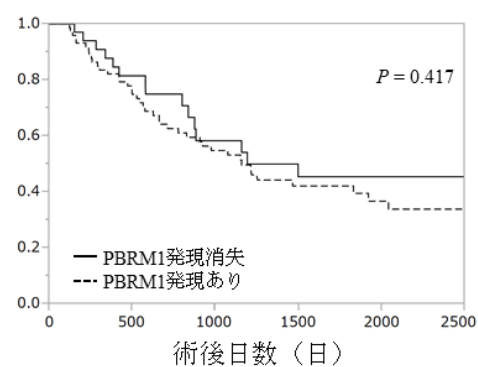
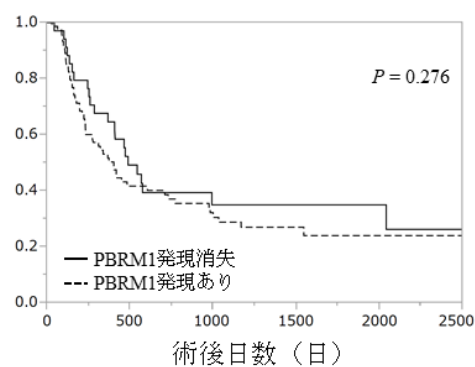
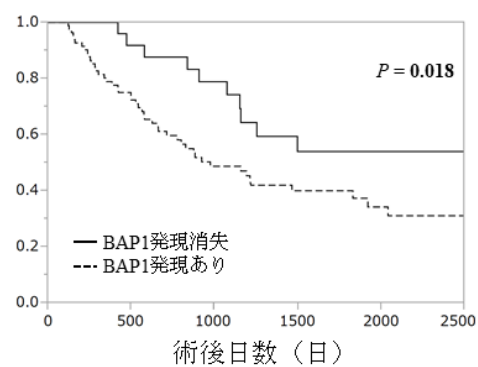


図 2. BAP1, PBRM1 発現消失肝内胆管癌の生存曲線

単変量解析	無再発生存		全生存	
因子	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値
BAP1 [発現あり vs. 発現消失]	1.792 (1.033-3.337)	0.038	1.884 (1.011-3.839)	0.046
PBRM1 [発現あり vs. 発現消失]	1.263 (0.779-2.120)	0.350	1.213 (0.694-1.441)	0.507
年齢 [>65 歳 vs. ≤65 歳]	1.046 (0.663-1.660)	0.848	1.035 (0.613-1.751)	0.896
性別 [男性 vs. 女性]	1.111 (0.706-1.762)	0.648	1.092 (0.648-1.860)	0.742
慢性肝疾患 [あり vs. なし]	0.761 (0.460-1.223)	0.264	0.905 (0.515-1.543)	0.718
腫瘍径 [>5cm vs. ≤5cm]	1.910 (1.193-3.032)	0.008	1.588 (0.932-2.675)	0.088
肉眼像 [腫瘍形成+胆管浸潤型 vs. 腫瘍形成型]	1.659 (1.008-2.662)	0.047	2.223 (1.290-3.761)	0.005
優位な分化度 [低～中 vs. 高]	1.760 (1.071-3.010)	0.025	2.370 (1.274-4.820)	0.005
主要血管浸潤 [あり vs. なし]	4.360 (2.363-7.650)	<0.001	3.368 (1.714-6.204)	<0.001
神経周囲浸潤 [あり vs. なし]	2.333 (1.466-3.756)	<0.001	2.749 (1.614-4.804)	<0.001
肝内転移 [あり vs. なし]	2.844 (1.677-4.671)	<0.001	3.105 (1.756-5.334)	<0.001
リンパ節転移 [あり vs. なし]	2.829 (1.670-4.680)	<0.001	3.115 (1.713-5.459)	<0.001

多変量解析	無再発生存		全生存	
因子	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値
BAP1 [発現あり vs. 発現なし]	1.893 (1.019-3.734)	0.043	2.212 (1.075-4.904)	0.030
腫瘍径 [>5cm vs. ≤5cm]	1.840 (1.080-3.120)	0.025	1.538 (0.921-2.788)	0.090
肉眼像 [腫瘍形成+胆管浸潤型 vs. 腫瘍形成型]	0.873 (0.499-1.499)	0.627	1.057 (0.551-2.004)	0.866
優位な分化度 [低～中 vs. 高]	1.367 (0.802-2.405)	0.255	1.920 (1.019-3.947)	0.043
主要血管浸潤 [あり vs. なし]	3.219 (1.675-5.985)	<0.001	1.954 (0.955-3.789)	0.066
神経周囲浸潤 [あり vs. なし]	1.355 (0.794-2.327)	0.265	1.755 (0.954-3.264)	0.070
肝内転移 [あり vs. なし]	2.148 (1.163-3.891)	0.015	2.935 (1.552-5.454)	0.001
リンパ節転移 [あり vs. なし]	1.817 (0.990-3.318)	0.054	1.745 (0.918-3.226)	0.088

表 5. 肝内胆管癌の予後因子について

3.4 考察

今回の研究では、**BAP1**, **PBRM1** 発現消失肝内胆管癌における臨床病理学、分子病態学的な形質についての解析を行った。**BAP1** の発現消失頻度は 23.1% で、近年アメリカ(15.6%)(20)やシンガポール(14.6%)(41)、日本(12%)(23)において施行されたゲノムワイド解析における **BAP1** 変異頻度よりもやや高く、また既報における免疫組織化学染色での発現消失頻度(26%)と同等であった(42)。

PBRM1 の発現消失頻度は 31.5%であり、アメリカ(17%)(20)、日本(8%)(23)の既報における頻度を上回った。この差の原因としては、凍結した小片を解析の対象とする遺伝学的解析と比較して、免疫組織化学染色はより広い腫瘍一ブロックの面積を視覚的に評価することで、部分消失症例についても判定が可能であることが考えられうる。また、後述の通り **BAP1** 発現消失肝内胆管癌は 2 型肝内胆管癌に多く認められるため、**B** 型肝炎、**C** 型肝炎の頻度など、各国での背景疾患の頻度によっても影響されるものと考えられる。

BAP1 発現消失肝内胆管癌は、有意差が示された因子に限っても、粘液産生に乏しく、**N-cadherin** が高頻度に陽性で、**S100P** が陰性であり、そして **IDH1**, **IDH2** 変異が多く認められ、いずれも 2 型肝内胆管癌の特徴として合致するものであった。そして、**BAP1** 発現消失肝内胆管癌の全例が 2 型肝内胆管癌とい

う結果であった。**PBRM1** 発現消失肝内胆管癌については有意差のみられる項目はなく、**KRAS** 変異が少ないことや、**S100P** 陽性率がやや低いという 2 型 肝内胆管癌の傾向が若干みられるのみであり、今回の解析の範囲では **PBRM1** 変異に病態上の意義は明らかでなかった。

2 型 肝内胆管癌が合計 59 例存在するのと比較すると、**BAP1** 発現消失が認められるのは 25 例(42.4%)に限られた。**BAP1** 発現消失がある症例はほぼ全例が 2 型肝内胆管癌ととらえることは可能だが、**N-cadherin** や **NCAM** 以上に 2 型肝内胆管癌を包括する特徴ではなかった。

BAP1, **PBRM1** 発現消失は、殆どがびまん性に認められたが、一部症例では部分的な消失にとどまっていた。もし **BAP1**, **PBRM1** 変異が肝内胆管癌発癌におけるイニシエーション変異であれば、腫瘍全体において発現消失が認められると考えられるため、両変異は肝内胆管癌の発癌過程における二次的な変異であると推測される。

臨床的には、**BAP1** 発現消失は無再発生存、全生存両方について予後良好因子であり、予後予測に用いるだけでなく、**BAP1** 変異肝内胆管癌ではエピジェネティック関連酵素である **HDAC** 阻害剤や **EZH2** 阻害剤の奏功が期待され(20, 32, 43)、肝内胆管癌において手術療法を除いて有効な治療法が限られている中(1)、**BAP1** 染色による判定が今後治療に直結する可能性がある。

また、**BAP1** または **PBRM1** どちらかの発現消失は肝内胆管癌の 47.2%に認められ、高分化肝内胆管癌に限ると 57.6%がいずれかの発現消失を伴っていた。また、背景胆管や炎症細胞が組織内陽性コントロールとして適していることもあり、肝腫瘍の鑑別が困難な際に、両染色が肝内胆管癌の病理診断上用いえると考えられる。

今後研究する課題として、例えば、*BAP1* 変異は、国際的には肝蛭関連肝内胆管癌よりも肝蛭非関連肝内胆管癌で頻度が高いことが知られている(33, 44)。今回の研究の結果と統合して考察すると、肝蛭非関連肝内胆管癌は 2 型肝内胆管癌、肝蛭関連肝内胆管癌は 1 型肝内胆管癌が多い可能性が示され、肝内胆管癌の発癌の機序の解明に繋げることができるものと考えられる。

結論として、肝内胆管癌において **BAP1** 発現消失は、2 型肝内胆管癌の指標の一つであり、**N-cadherin** は高頻度に陽性、粘液産生および **S100P** は陰性のことが多く、予後は良好であった。**PBRM1** には一定の傾向は見出されなかった。**BAP1**, **PBRM1** 染色を組み合わせることで肝内胆管癌の診断に用いることが可能であり、また今後の分子標的薬を含めた治療の選択に資するものと考えられる。

第四章 肝内胆管癌における albumin mRNA の発現について

4.1 背景と目的

アルブミンは血清中で最も多いタンパク質であり、その合成は肝細胞が担っている(45)。したがって albumin mRNA は肝細胞分化のマーカーとして知られており、正常の肝細胞だけでなく肝細胞癌においても発現が知られている(46)。1980 年代初頭には、albumin RNA-ISH が RNA の分布を可視化する技術として文献化され、またこれはホルマリン固定パラフィン包埋標本でも可能なことが示された(47)。以後示された肝細胞、肝細胞癌における albumin RNA-ISH はいずれもほぼ全症例が陽性であり(48, 49)、手法として免疫組織化学染色などと比較するとやや困難であるものの、信頼できる肝細胞分化マーカーとして確立した。ほか、肝細胞腺腫や肝芽腫(48)、胃原発の肝様腺癌に至るまで(50)、albumin mRNA の発現が示されている。

一方、肝内胆管癌における albumin RNA-ISH の結果には時期によって大きく変遷がみられた。最初期には、肝外胆管癌、肝内胆管癌はいずれも albumin RNA-ISH について陰性であると報告されていたが(48)、直近においては高感度の RNA-ISH 法を採用することにより肝内胆管癌 83 例のうち 82 例が albumin

mRNA 陽性であるという報告もなされた(51)。この報告では、肝外胆管癌や転移性肝癌については全くの陰性であった。すなわち、原発不明の肝腫瘍の診断においては、albumin RNA-ISH によって肝細胞癌、肝内胆管癌とそれ以外をほぼ確実に鑑別できるという結果であった。その他の報告では、albumin RNA-ISH は肝内胆管癌での陽性率 34%という文献もあり(52)、大きな隔たりがある。いずれにせよ、確たる肝細胞マーカーとして知られていた albumin mRNA が実際には肝内胆管癌にも陽性であることは複数の文献で示されていると言え、これは肝内胆管癌の発生機序の解明にあたっても重要な事実と考えられる。

一方で、肝内胆管癌のほとんどが肝外胆管癌と類似した 1 型肝内胆管癌と、肝内により特異的な 2 型肝内胆管癌に分類されるという前章までの結論を踏まえると、albumin RNA-ISH は一部症例のみで陽性になることが予想される。逆に、albumin RNA-ISH は肝内胆管癌の全例に陽性、肝外胆管癌の全例で陰性になるとすれば、現行の肝管二次分枝を境界にした作為的な肝内外の分類に妥当性があるということになる。

今回の研究では、高感度 albumin RNA-ISH 法を用いて肝内胆管癌における発現を評価し、またその他の臨床病理学的因子との比較を行った。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

1) 症例の選択

東京大学医学部附属病院肝胆膵外科において、2005 年 1 月 1 日から 2014 年 12 月 31 日までに切除された肝内胆管癌連続切除症例計 73 例を対象とし、ホルマリン固定パラフィン包埋標本および組織マイクロアレイを用いた。肝内胆管癌の定義や除外基準については前章と同様に行った。

2) 倫理委員会の承認に関する事項

東京大学医学部附属病院での病理組織検体を用いた研究については、「肝腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」という題目で東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けている(審査番号 G2210)。

4.2.2 方法

1) Albumin RNA-ISH

高感度 RNA-ISH には RNAscope® (Advanced cell diagnostics, Hayward, CA, USA) を用い、以下の通り行った。各症例を代表するホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 5 μ m の切片を薄切し、脱パラフィンを行った。各ブロックのほとんどは、背景の非腫瘍成分を含んでいた。前処理は RNAscope® 2.0 HD Reagent Kit (BROWN)を用い、HybEZ Oven (Advanced cell diagnostics)内で前処理液 1,2,3 を滴下しそれぞれ洗浄した。プローブには RNAscope® Probe - Hs-ALB (Advanced cell diagnostics)を用いてハイブリダイズした。また、2 症例については RNAscope® Positive Control Probe _ Hs-PPIB と RNAscope® Negative Control Probe _ DapB (Advanced cell diagnostics)をハイブリダイズし、それぞれ陽性コントロール、陰性コントロールとした。その後増感剤 1~6 を滴下し、DAB で発色した。

標本は二名の病理医によって別個に観察された。並行してヘマトキシリン-エオシン染色で腫瘍を確認し、反応性胆管上皮を除外した。各細胞について、細胞質に微細な点状または濃く集合した塊状の染色が得られたものを陽性とした。核内の染色は判定に含めなかった。陽性細胞の比率に応じて以下のようにスコアリングを行った。陽性細胞が 1%未満: スコア 0、陽性細胞が 1%以上 50%以下: スコア 1、陽性細胞が 51%以上: スコア 2。

2) 臨床病理学、分子病態学的因子について

本研究は、前章の症例のうち 2005 年 1 月 1 日以降のものについて対象としており、臨床情報、病理組織学的な因子、alcian-blue 染色、および S100P, N-cadherin 免疫組織化学染色、*IDH1/2*, *KRAS* の変異解析、*FGFR2* の FISH の結果については前研究を参照した。

3) 統計的解析

定量的変数については Student の t 検定または Mann-Whitney の U 検定によって解析を行い、カテゴリー化されたデータは χ^2 検定または Fisher の正確確率検定を用いた。全生存及び無再発生存曲線については Kaplan-Meier 法によって作成し、log-rank 検定によって比較した。結果は P 値が 0.05 未満の際に有意差があると判定した。解析については EZR software (さいたま医療センター、自治医科大学)と JMP Pro 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。

4.3 結果

1) 背景肝細胞、胆管における albumin RNA-ISH

背景肝細胞は非常に安定した陽性組織内コントロールで、いずれのスライドにおいても均一かつ濃く細胞質全体に染色された。間質細胞や炎症細胞では滲

んだような陽性像を呈することはあったものの、本来の陽性細胞で認められるような点状の染色はみられなかった。背景胆管では、細胆管は全スライド中認められた合計 1591 か所で全て陽性となり、小葉間胆管は 304 か所中 228 か所 (75.0%)、隔壁胆管は 97 か所中 14 か所(14.4%)に陽性、そしてそれ以上の大型胆管では 18 か所全例が陰性であった(図 1)。

2) 肝内胆管癌の albumin RNA-ISH

肝内胆管癌では、42 症例(57.5%)が陽性(スコア 1 または 2)であり、うち 24 症例(34.2%)では腫瘍の 51%以上が陽性(スコア 2)となった(図 2)。陽性率が低い症例では、領域性よりもモザイク状の陽性像を呈することがしばしばであった。一部陽性の場合、低分化領域で比較的陰性になることが多かったが、殆ど組織像、分化度が変わらない二領域間で明瞭な染色性の差が現れることもあった(図 3)。また、細胆管癌として典型的な組織像を呈する 10 症例については、9 症例が陽性となった。

3) Albumin 陽性肝内胆管癌の臨床病理学的特性

Albumin 陽性肝内胆管癌は、血清 CEA 値が有意に低く ($p<0.001$)、肉眼的には腫瘍形成型であり ($p<0.001$)、神経周囲侵襲が少なく ($p=0.002$)、またリンパ節転

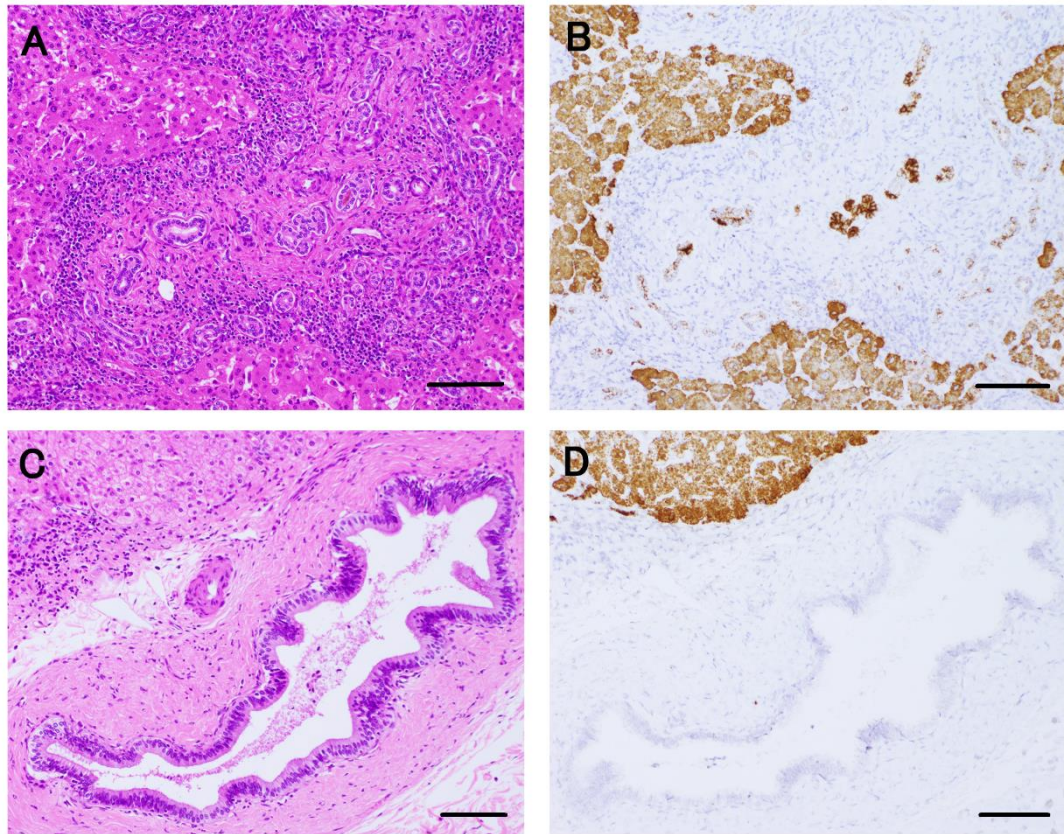


図 1. 背景肝における albumin RNA-ISH(黒線は 100 μ m)

A, B 肝細胞での均一かつ濃い陽性像に加え、小葉間胆管においても部分的には同等に濃い染色像を伴っている。炎症細胞、間質には陰性となっている。

C, D A, B と同一症例で、肝細胞には強く陽性となっているが、大型胆管では全く陰性となっている。

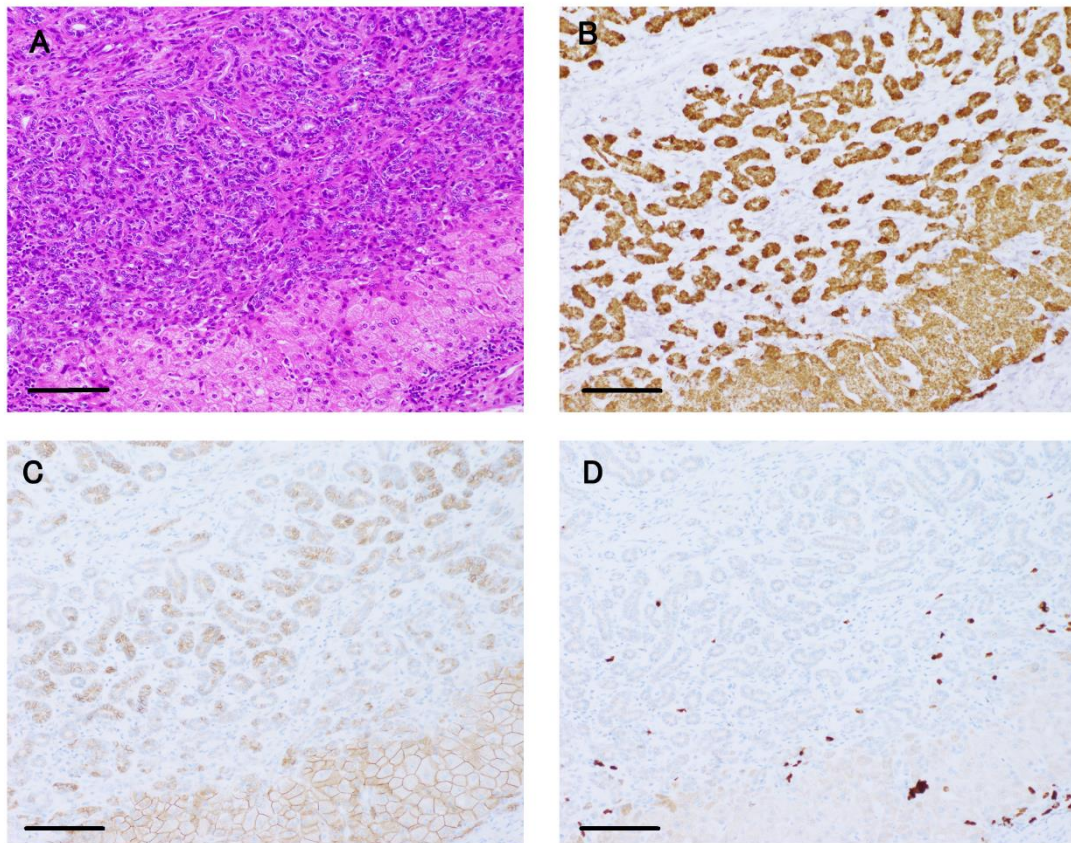


図 2. Albumin 陽性肝内胆管癌の一例(黒線は 100 μ m)

- A. 均一な小型管状構造を呈する肝内胆管癌の HE 染色像
- B. 肝内胆管癌において、背景肝細胞と同程度の濃く均一な albumin RNA-ISH 陽性像を呈している。また右下には非腫瘍の小葉間胆管、細胆管に同等の染色性がみられる
- C. N-cadherin 染色にも陽性になるが、陽性率はやや低い。背景肝細胞の細胞膜にも陽性になっている。
- D. S100P 染色は陰性。

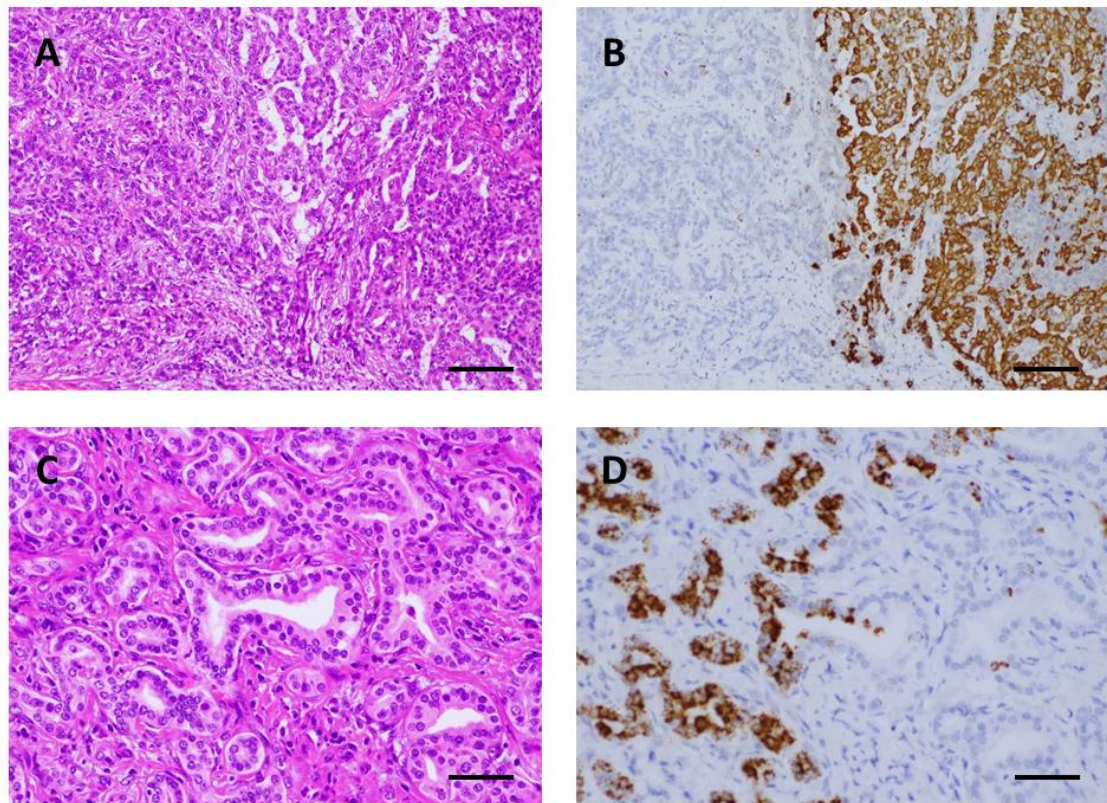


図 3. 類似した組織像を示す領域間で異なる albumin RNA-ISH 染色性を呈する例

A, B. 左右で近い管状構造を呈しているが、右側だけに明らかに強い陽性像が認められる(黒線は $100\ \mu\text{m}$)。

C, D. 同一の腺管内で陽性の領域と陰性の領域に分かれている(黒線は $50\ \mu\text{m}$)。

	Albumin 陽性肝内胆管癌 (n=42)	Albumin 陰性肝内胆管癌 (n=31)	p 値
年齢 [歳, 平均 ± 標準偏差]	66.7 ± 10.0	68.2 ± 8.6	0.507
性別 [男性/女性]	22 / 20	18 / 13	0.644
慢性肝疾患	19(45.2%)	8(25.8%)	0.141
B 型または C 型肝炎	15 (35.7%)	5 (16.1%)	0.110
B 型肝炎	3 (7.1%)	2 (6.5%)	
C 型肝炎	12 (23.3%)	3 (3.8%)	
慢性肝疾患	4 (9.5%)	3 (9.7%)	
CEA [ng/ml, 中央値 (IQR)]*	3.3 (3.3)	6.1 (7.1)	<0.001
CA19-9 [U/ml, 中央値 (IQR)]*	36.0 (87.5)	75.0 (1904)	0.143
腫瘍径 [mm, 中央値 (IQR)]*	40.0 (37.0)	46.0 (18.0)	0.603
肉眼像 [腫瘍形成型 / 腫瘍形成+胆管浸潤型]	37 / 5	15 / 16	<0.001
有意な組織分化度 [高/中/低]	17 / 23 / 2	10 / 14 / 7	0.070
周囲胆管内病変	9 (21.4%)	19 (61.3%)	<0.001
微小血管浸潤	40 (95.2%)	30 (96.7%)	1.000
神経周囲浸潤	12 (28.6%)	21 (67.7%)	0.002
肝内転移	10 (23.8%)	7 (22.6%)	1.000
リンパ節転移	5 (11.9%)	13 (41.9%)	0.005

表 1. Albumin 陽性/陰性肝内胆管癌の臨床病理学的特徴

移が少なかった($p=0.005$)。低分化成分は albumin 陰性肝内胆管癌で多い傾向があったが、統計学的に有意ではなかった。

また、albumin 陽性、陰性の肝内胆管癌の間で全生存、無再発生存期間に有意な差は認められなかった(図 4)。

4) Albumin 陽性肝内胆管癌の免疫組織化学、遺伝学的形質

Albumin 陽性肝内胆管癌は、粘液産生に乏しく、S100P が陰性で、一方 N-cadherin は陰性であった(表 2 ; いずれも $p<0.001$)。さらに、*IDH1/2* 変異 16 例は全て albumin 陽性肝内胆管癌であった($p<0.001$)。KRAS 変異は albumin 陽性肝内胆管癌に少ない傾向がみられた($p=0.068$)。

5) Albumin 陽性/陰性肝内胆管癌と 1 型/2 型分類の相関

前項、前前項の通り、albumin 陽性肝内胆管癌の特徴の多くは 2 型肝内胆管癌の特徴と一致しており、albumin 陽性肝内胆管癌 42 例のうち 35 例(83.3%)が 2 型肝内胆管癌であった。また、2 型肝内胆管癌 43 例から見ると、35 例(81.4%)が albumin 陽性肝内胆管癌という結果であった。Albumin 陰性肝内胆管癌 31 例のうち 1 型肝内胆管癌は 20 例(64.5%)となった。

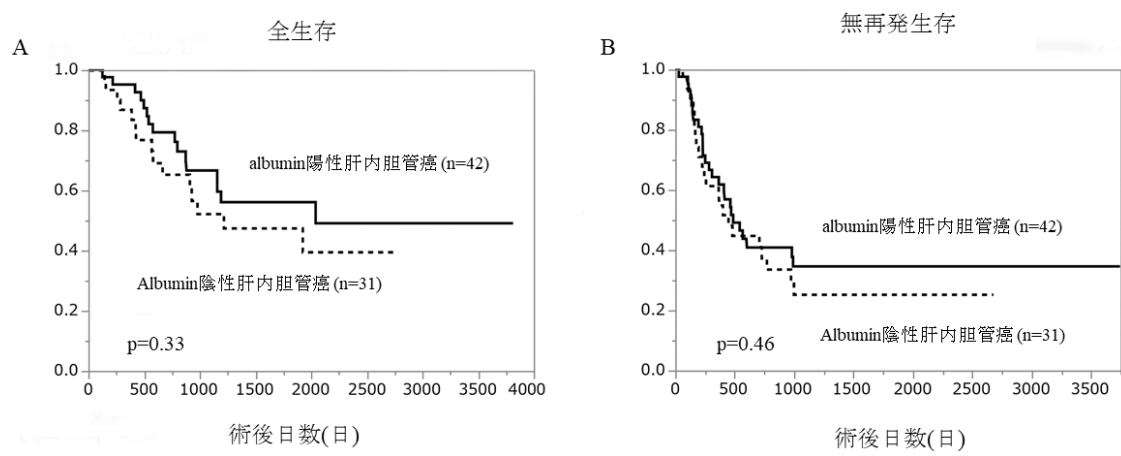


図 4. Albumin 陽性/陰性肝内胆管癌の生存曲線

	Albumin 陽性肝内胆管癌 (n=42)	Albumin 陰性肝内胆管癌 (n=31)	p 値
免疫組織化学的因子			
粘液産生 [少/中/多]	25 / 8 / 9	5 / 7 / 19	<0.001
S100P [<1% / 1-50% / 51-100%]	28 / 8 / 6	6 / 6 / 19	<0.001
N-cadherin [<1% / 1-50% / 51-100%]	3 / 15 / 24	16 / 10 / 5	<0.001
遺伝学的因子			
<i>IDH</i> 変異	16/42 (38.1%)	0/31 (0.0%)	<0.001
<i>KRAS</i> 変異	2/41 (4.9%)	6/31 (20.8%)	0.068
<i>FGFR2</i> 転座	3/42 (7.1%)	1/31 (3.2%)	0.628

表 2. Albumin 陽性/陰性肝内胆管癌の粘液産生、免疫組織化学的形質および遺伝学的形質

	Albumin 陽性肝内胆管癌 (n=42)	Albumin 陰性肝内胆管癌 (n=31)	p 値
1 型肝内胆管癌	5	20	< 0.001
2 型肝内胆管癌	35	8	
分類不能肝内胆管癌	2	3	

表 3. Albumin 陽性/陰性肝内胆管癌の 1 型/2 型分類

4.4 考察

今回の研究では、73 例の肝内胆管癌を対象に、高感度 RNA-ISH 法を用いて albumin mRNA の発現について評価し、うち 42 例(57.5%)で一部または全部が陽性となることが明らかとなった。Albumin 陽性肝内胆管癌は肉眼的には腫瘤形成型で、粘液産生に乏しく、神経周囲浸潤、リンパ節転移が少なく、S100P が陰性、N-cadherin が陽性であり、さらに IDH 変異は albumin 陽性肝内胆管癌に限られていた。これらはいずれも 2 型肝内胆管癌の特徴と一致しており、2 型肝内胆管癌 43 例のうち 35 例(81.4%)が albumin 陽性肝内胆管癌であった。

Albumin mRNA の発現は 2 型肝内胆管癌を代表する形質であると考えられる。

蛋白質や DNA と異なり、RNA はホルマリン固定、パラフィン包埋の過程において一定の分解を受けるため、高感度 RNA-ISH 法の普及以前に用いられてきた手法においては、対象とできる RNA はかなり限られていた(53, 54)。しかし、その時期にあっても albumin RNA-ISH は肝細胞分化のマーカーとして知られており、肝細胞における albumin mRNA の発現量の多さを反映しているものと考えられる(55)。

新しい高感度 RNA-ISH 法として製品化されたものは複数あるが、RNAscope®や ViewRNA®では 20 塩基程度の小プローブが連続して 2 つ結合し

た時のみ前増感剤が結合することによって特異性を確保し、また同一の RNA に対し小プローブの組み合わせを複数設定することで、RNA が部分的に分解されていても検出できるようになっており、さらにプローブに前増感剤、増感剤、標識プローブが分枝状に結合することで感度を上昇させている(56)。これらの技法の出現もあり、従前 albumin RNA-ISH は全例陰性とされていた肝内胆管癌であるが、一部が陽性であることが報告されるようになり(51, 52, 57)、今回の研究でもそれが改めて示される形となった。

肝内胆管癌に対する albumin RNA-ISH では、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックであっても背景肝細胞が確実にびまん性に陽性で、また間質や炎症細胞が確実に陰性であるという組織内コントロールの判定の容易さが大きな利点であった。ただし、肝内胆管癌の辺縁には非腫瘍の肝細胞が破壊されて不明瞭ながら散在性に残存していることも多く、腫瘍の辺縁のみで個細胞性に陽性になっているように見える場合は判定に注意を要した。

背景肝細胞での陽性像だけでなく、今回の研究では背景の胆管における albumin mRNA の発現についても明らかになった。胆管での染色性は胆管径に大きく依存しており、細胆管や小葉間胆管のレベルでは殆どが陽性を呈するものの、大型胆管のレベルでは陰性となった。これは、肝細胞、胆管細胞両方に分化しうる肝前駆細胞との発生における類縁性を反映しているとも考えられ

る。肝内胆管癌についても、今回 *IDH* 変異を有する肝内胆管癌が全例 albumin RNA-ISH 陽性であったことから、本来肝細胞癌、肝内胆管癌両方に分化しうる肝前駆細胞に *IDH* 変異が加わることによって肝内胆管癌方向への分化が決定づけられたような悪性腫瘍は albumin mRNA 陽性になるのではないかと推測される(31, 32)。過去に *ALB* 遺伝子を対象にした RT-PCR では、局所的に肝細胞分化や細管状の組織像を呈する肝内胆管癌のみで *ALB* の発現が上昇しているという結果も示されている(58)。Albumin mRNA の発現は肝内胆管癌と肝外胆管癌の発生機序の違いを示す好例と言える。

また、albumin mRNA は肝細胞だけでなく、正常の膵腺房や腺房細胞癌でも陽性になることが最近指摘されている(52)。albumin RNA-ISH はもはや肝細胞分化だけのマーカーではないことは今後注意を要する。胆管や膵腺房における albumin mRNA が実際にどの程度翻訳されているのかは albumin RNA-ISH 単体では解析できないが、既報では少なくとも肝細胞癌においては正常肝細胞と同程度の翻訳を受けることが示されており(55)、胆管や膵腺房での albumin mRNA の機能についても今後解析される必要がある。

結論として、高感度 albumin RNA-ISH は肝内胆管癌において組織内コントロールの確かな、安定した技法であった。肝内胆管癌のうち 57.5%が albumin

mRNA 陽性であり、これらの多くは 2 型肝内胆管癌の特徴と合致する性質を呈した。特に、*IDH* 変異例については全て albumin mRNA が陽性であった。

第五章 結語

本研究では、肝内胆管癌の病態解明を目的として、肝内での局在、組織像に依拠した二分類に着目し、より客観的かつ一般的に施行可能な alcian-blue 染色、S100P, N-cadherin, NCAM 免疫組織化学染色を用いた新しい亜型分類を提唱した。さらに、BAP1, PBRM1 の免疫組織化学染色、albumin RNA-ISH を行い、BAP1 発現消失、albumin mRNA の発現は、2 型肝内胆管癌の指標であることを示した。

この分類は、肝内胆管癌の中でも肝外胆管癌と共通する性質を有する 1 型、肝細胞癌と共通する性質を有する 2 型の二極の存在を明らかにするものであり、肝胆道系の腫瘍は、既存の肝細胞癌、肝内胆管癌、肝外胆管癌というカテゴリーを横断して、実際には連続的なスペクトルを形成することが示された。

これらの研究結果は、肝内胆管癌の発癌、増殖の機序の解明、また適切な肝内胆管癌、肝外胆管癌、細胆管癌の分類法の樹立に資することが期待される。また各免疫組織化学染色を組み合わせることで、病理診断や今後の治療選択にも用いることが可能であると考えられる。

謝辞

本研究の指導教官である東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、深山正久教授には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の遂行にあたり、杏林大学医学部病理学教室、柴原純二教授、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、林玲匡先生には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の標本作成にあたり、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、佐久間慶技術専門職員、山村はるみ技術補佐員に多大なるご協力を賜りました。

本研究全般において、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、国田朱子助教、田中淳助教には、数々のご教示、ご協力をいただきました。

本研究で、ご指導、ご鞭撻、ご高配、ご協力賜りました上記の方々、および東京

大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野の皆さまに、深謝申し上げます。
次第です。

東京大学肝胆膵外科・人工臓器移植外科 國土典宏教授には、患者データのご提供を頂きました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*. 2012;61(12):1657-69.
2. de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(18):1368-78.
3. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1215-29.
4. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. 2004;39(6):1739-45.
5. Roskams T, Desmet V. Embryology of Extra-and Intrahepatic Bile Ducts, the Ductal plate. *The Anatomical Record*. 2008;291(6):628-35.
6. 江畑智希, 水野隆史, 柳野正人. 肝内胆管癌と肝門部胆管癌の区別に関する最近の話題. *日本消化器病学会雑誌*. 2016;113(9):1525-32.
7. 日本肝癌研究会 編. 原発性肝癌取扱い規約 第6版: 金原出版, 東京; 2015.
8. 日本肝胆膵外科学会 編. 胆道癌取扱い規約 第6版: 金原出版, 東京;

2013.

9. Aishima S, Kuroda Y, Nishihara Y, Iguchi T, Taguchi K, Taketomi A, et al.

Proposal of progression model for intrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathologic differences between hilar type and peripheral type. *The American journal of surgical pathology*. 2007;31(7):1059-67.

10. Kozaka K, Sasaki M, Fujii T, Harada K, Zen Y, Sato Y, et al. A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'.

Histopathology. 2007;51(3):390-400.

11. Nakanuma Y, Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, Zen Y, Kosaka K, et al. Pathology of peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma with reference to tumorigenesis. *Hepatology Research*. 2008;38(4):325-34.

12. Liao J-Y, Tsai J-H, Yuan R-H, Chang C-N, Lee H-J, Jeng Y-M. Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: etiological, clinicopathological, and molecular features. *Modern Pathology*. 2014;27(8):1163-73.

13. Aishima S, Oda Y. Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 2015;22(2):94-100.

14. Chen J, He J, Deng M, Wu H-Y, Shi J, Mao L, et al. Clinicopathological, radiologic, and molecular study of 23 combined hepatocellular-cholangiocarcinomas with stem cell features, cholangiolocellular type. *Human pathology*. 2017;64:118-27.
15. Tsai JH, Huang WC, Kuo KT, Yuan RH, Chen YL, Jeng YM. S100P immunostaining identifies a subset of peripheral-type intrahepatic cholangiocarcinomas with morphological and molecular features similar to those of perihilar and extrahepatic cholangiocarcinomas. *Histopathology*. 2012;61(6):1106-16.
16. Yu T-H, Yuan R-H, Chen Y-L, Yang W-C, Hsu H-C, Jeng Y-M. Viral hepatitis is associated with intrahepatic cholangiocarcinoma with cholangiolar differentiation and N-cadherin expression. *Modern Pathology*. 2011;24(6):810-9.
17. Prica F, Radon T, Cheng Y, Crnogorac-Jurcevic T. The life and works of S100P-from conception to cancer. *American journal of cancer research*. 2016;6(2):562.
18. Aishima S, Fujita N, Mano Y, Kubo Y, Tanaka Y, Taketomi A, et al. Different roles of S100P overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma: carcinogenesis of perihilar type and aggressive behavior of peripheral type. *The American journal of surgical pathology*. 2011;35(4):590-8.
19. Yamasaki S. Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2003;10(4):288-91.

20. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nature genetics*. 2013;45(12):1470-3.
21. Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X, Chu JS, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nature communications*. 2014;5:5696.
22. Sia D, Losic B, Moeini A, Cabellos L, Hao K, Revill K, et al. Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2–PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nature communications*. 2015;6:ncomms7087.
23. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature genetics*. 2015;47(9):1003-10.
24. Kipp BR, Voss JS, Kerr SE, Fritcher EGB, Graham RP, Zhang L, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Human pathology*. 2012;43(10):1552-8.
25. Ho C-L, Kurman RJ, Dehari R, Wang T-L, Shih I-M. Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. *Cancer research*. 2004;64(19):6915-8.
26. Komuta M, Spee B, Borght SV, De Vos R, Verslype C, Aerts R, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic

progenitor cell origin. *Hepatology*. 2008;47(5):1544-56.

27. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2006;25(27):3818-22.

28. Fan B, Malato Y, Calvisi DF, Naqvi S, Razumilava N, Ribback S, et al. Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(8):2911.

29. Lugli A, Tornillo L, Mirlacher M, Bundi M, Sauter G, Terracciano LM. Hepatocyte paraffin 1 expression in human normal and neoplastic tissues: tissue microarray analysis on 3,940 tissue samples. *American journal of clinical pathology*. 2004;122(5):721-7.

30. Yan BC, Gong C, Song J, Krausz T, Tretiakova M, Hyjek E, et al. Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(8):1147.

31. Saha SK, Parachoniak CA, Ghanta KS, Fitamant J, Ross KN, Najem MS, et al. Mutant IDH inhibits HNF-4 [agr] to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature*. 2014;513(7516):110-4.

32. Farshidfar F, Zheng S, Gingras M-C, Newton Y, Shih J, Robertson AG, et al. Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant

Molecular Profiles. Cell reports. 2017;18(11):2780-94.

33. Chan-on W, Nairismägi M-L, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, et al.

Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. Nature genetics. 2013;45(12):1474-8.

34. Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. Nature Reviews Cancer. 2013;13(3):153-9.

35. Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, Parasramka M, Ho TH, Cheville JC, et al. Clear cell renal cell carcinoma subtypes identified by BAP1 and PBRM1 expression. The Journal of urology. 2016;195(1):180-7.

36. Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. Nature. 2011;469(7331):539-42.

37. Joseph RW, Kapur P, Eckel-Passow JE, Parasramka M, Ho T, Cheville JC, et al. Loss of BAP1 protein expression is an independent marker of poor prognosis in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. Cancer. 2014;120(7):1059-67.

38. Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavía-Jiménez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. Nature genetics. 2012;44(7):751-9.

39. Rao Q, Xia Qy, Wang Zy, Li L, Shen Q, Shi Ss, et al. Frequent co-inactivation of the SWI/SNF subunits SMARCB1, SMARCA2 and PBRM1 in malignant rhabdoid tumours. *Histopathology*. 2015;67(1):121-9.
40. Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2013;19(4):324.
41. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;54(1):173-84.
42. Andrici J, Goeppert B, Sioson L, Clarkson A, Renner M, Stenzinger A, et al. Loss of BAP1 expression occurs frequently in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Medicine*. 2016;95(2).
43. Al-Shamsi HO, Anand D, Shroff RT, Jain A, Zuo M, Conrad C, et al. BRCA-associated protein 1 mutant cholangiocarcinoma: an aggressive disease subtype. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2016;7(4):556.
44. Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nature genetics*. 2012;44(6):690-3.
45. Buyl K, De Kock J, Bolleyn J, Rogiers V, Vanhaecke T. Measurement of albumin secretion as functionality test in primary hepatocyte cultures. *Protocols in In*

Vitro Hepatocyte Research. 2015:303-8.

46. Murray G, Paterson P, Ewen S, Melvin W. In situ hybridisation of albumin mRNA in normal liver and hepatocellular carcinoma with a digoxigenin labelled oligonucleotide probe. *Journal of clinical pathology*. 1992;45(1):21-4.
47. Kojiro M, Kawano Y, Isomura T, Nakashima T. Distribution of albumin-and/or alpha-fetoprotein-positive cells in hepatocellular carcinoma. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1981;44(3):221-6.
48. Krishna M, Lloyd R, Batts K. Detection of albumin messenger RNA in hepatic and extrahepatic neoplasms: a marker of hepatocellular differentiation. *The American journal of surgical pathology*. 1997;21(2):147-52.
49. Oliveira A, Erickson L, Burgart L, Lloyd R. Differentiation of primary and metastatic clear cell tumors in the liver by in situ hybridization for albumin messenger RNA. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24(2):177-82.
50. Roberts CC, Colby TV, Batts KP, editors. Carcinoma of the stomach with hepatocyte differentiation (hepatoid adenocarcinoma). *Mayo Clinic Proceedings*; 1997: Elsevier.
51. Ferrone CR, Ting DT, Shahid M, Konstantinidis IT, Sabbatino F, Goyal L, et al. The Ability to Diagnose Intrahepatic Cholangiocarcinoma Definitively Using Novel

Branched DNA-Enhanced Albumin RNA In Situ Hybridization Technology. *Annals of surgical oncology*. 2014;1-7.

52. Terris B, Hergli I, Lin-Marq N, Rubbia-Brandt L. Letter to the Editor With Regard to the Article Entitled:“Branched Chain In Situ Hybridization for Albumin as a Marker of Hepatocellular Differentiation”. *The American journal of surgical pathology*. 2015;39(8):1156-7.

53. Veeck J, Dahl E. RNA expression analysis on formalin-fixed paraffin-embedded tissues in TMA format by RNA in situ hybridization. *Tissue Microarrays: Methods and Protocols*. 2010:135-50.

54. Penland SK, Keku TO, Torrice C, He X, Krishnamurthy J, Hoadley KA, et al. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Laboratory investigation*. 2007;87(4):383-91.

55. Sell S, Thomas K, Michalson M, Salatrepat J, Bonner J. Control of albumin and α -fetoprotein expression in rat liver and in some transplantable hepatocellular carcinomas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1979;564(1):173-8.

56. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The*

Journal of Molecular Diagnostics. 2012;14(1):22-9.

57. Shahid M, Mubeen A, Tse J, Kakar S, Bateman AC, Borger D, et al. Branched chain in situ hybridization for albumin as a marker of hepatocellular differentiation: evaluation of manual and automated in situ hybridization platforms. The American journal of surgical pathology. 2015;39(1):25-34.
58. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberghe W, Verslype C, et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. Hepatology. 2012;55(6):1876-88.