

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 三角健人

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、さらにその罹患率は上昇傾向にある。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、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と肝内末梢の隔壁胆管、小葉間胆管は組織学的な形態が異なっている。双方は発生上の由来も異なっているとされ、肝芽細胞が肝内胆管、肝外胆管前駆細胞が肝外胆管へと分化する。臨床的にも、腫瘍の局在に従って肝内胆管癌、肝外胆管癌は別個に扱われているが、その連続性から、境界の定義については統一された見解がないのが現状である。一方、肝内胆管癌も均質な集団ではなく、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。そのうち一群は傾向として肝門付近に発生し、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**」、「**perihilar large duct type**」、後者については「**peripheral type**」、「**peripheral small duct type**」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。

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**、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。東京大学医学部附属病院での肝内胆管癌連続切除症例 102 例を対象に、上記 4 項目の染色、スコアリングを行い、肝内胆管癌の 2 分類を行った。さらに、各群の臨床病理学、分子病態学的な特性について解析を行った。

粘液産生や S100P が陽性、N-cadherin や NCAM が陰性の時に、その頻度に応じ 1 または 2 点加点し、4 点以上を 1 型肝内胆管癌、2 点以下を 2 型肝内胆管癌、合計点が 3 である

場合は分類不能とした。42例(41.2%)が1型肝内胆管癌、56例(55.0%)が2型肝内胆管癌に分類され、残る4例(3.9%)が分類不能であった。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、2型との比較で、血清CEA、CA19-9が高値の傾向があり、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(いずれも  $p < 0.001$ )。2型肝内胆管癌は慢性肝疾患を背景に発生する頻度が高く ( $p = 0.027$ )、有意差はみられないが立方状または低円柱状の細胞からなる細管状を呈する傾向があり ( $p = 0.067$ )、特にいわゆる細胆管細胞癌の典型的組織像を呈する腫瘍は全例が2型肝内胆管癌であった ( $p < 0.001$ )。1型肝内胆管癌は、2型肝内胆管癌に比し、全生存率、無再発生存率ともに有意に不良であった ( $p < 0.001$ )。KRAS変異は12例中10例が1型肝内胆管癌に認められ ( $p < 0.001$ )、一方IDH1, IDH2変異21例、FGFR2転座6例は全例が2型肝内胆管癌であった(それぞれ  $p < 0.001$ ,  $p = 0.038$ )。

上記のような1型肝内胆管癌の免疫組織化学的形質、分子遺伝学的特徴は既知の肝外胆管癌の特徴と共通するものであった。また、肝細胞と胆管細胞の双方向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、肝内胆管癌が発生することが報告されており、高率にIDH変異を有する2型肝内胆管癌は肝前駆細胞に由来する腫瘍である可能性が示唆される。

本分類は、今後臨床においても、予後予測に有用である可能性がある。一方、S100Pは1型肝内胆管癌のほぼ全例にびまん性に陽性になるが、N-cadherinやNCAMの感度は比較的低く、2型肝内胆管癌を包括する陽性指標は探索の余地があった(第二章)。

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、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。BAP1, PBRM1遺伝子はいずれもクロマチン再構成に関与している癌抑制遺伝子として知られている。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。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、PBRM1変異についての解析も興味を持たれる。BAP1, PBRM1変異は特定のホットスポットを有さないが、免疫組織化学染色によって同等の評価が可能であることが報告されており、東京大学医学部附属病院での肝内胆管癌連続切除症例108例を対象に、BAP1, PBRM1染色を行い、臨床病理学、分子病態学的な特性について解析を行った。

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、4例(3.7%)のみが領域性に陰性像を呈した。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、6例(5.6%)が領域性の陰性像を呈し、3例(2.8%)がモザイク状の陰性像を呈した。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 ( $p = 0.011$ )、神経周囲浸潤が少なかった ( $p = 0.007$ )。また、粘液産生が少なく、

S100P が陰性、N-cadherin が陽性で(いずれも  $p < 0.001$ )、*IDH1/2* 変異が高頻度であった ( $p = 0.008$ )。そして、BAP1 発現消失肝内胆管癌 25 例は全例が 2 型肝内胆管癌であり ( $p < 0.001$ )、全生存、無再発生存ともに予後良好であった(それぞれ  $p = 0.018$ ,  $p = 0.034$ )。PBRM1 発現消失肝内胆管癌ではいずれの項目でも有意差は認められなかった。BAP1 変異は、2 型肝内胆管癌の陽性指標の一つであった (第三章)。

Albumin mRNA は従来肝細胞マーカーとして知られており、肝細胞癌のほぼ全例に陽性である一方で、肝内胆管癌では albumin RNA-ISH は陰性とされてきた。しかし、最近開発された高感度 RNA-ISH 法では、肝内胆管癌でも albumin RNA-ISH の陽性像が報告されるようになり、肝内胆管癌では 99%で陽性、肝外胆管癌では全例で陰性という文献もみられた。これは肝内胆管癌の発生機序の解明にあたって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、より肝内に特異的な 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。今回東京大学医学部附属病院での肝内胆管癌連続切除症例 73 例を対象に、albumin RNA-ISH を行い、臨床病理学、分子病態学的な特性について解析を行った。

肝内胆管癌では、42 症例(57.5%)が albumin RNA-ISH 陽性であり、うち 24 症例(34.2%)では腫瘍の 51%以上が陽性となった。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。Albumin 陽性肝内胆管癌は、血清 CEA 値が有意に低く ( $p < 0.001$ )、肉眼的には腫瘤形成型であり ( $p < 0.001$ )、神経周囲侵襲が少なく ( $p = 0.002$ )、またリンパ節転移が少なかった ( $p = 0.005$ )。また、粘液産生に乏しく、免疫組織化学的には S100P が陰性で、一方 N-cadherin は陰性であった(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 ( $p = 0.001$ )。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 ( $p < 0.001$ )。技法として、肝内胆管癌における albumin RNA-ISH 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。また、背景肝細胞での陽性像だけでなく、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。結論として、肝内胆管癌における albumin mRNA の発現は 2 型肝内胆管癌の陽性指標であった。

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。