

氏 名	小松原 利 英
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 591 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	肝外胆管癌の臨床病理学的予後因子の探索
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 力 山 敏 樹 (委 員) 教 授 玉 田 喜 一 教 授 亀 崎 豊 実

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

胆道癌は、他の癌腫と比較し診断・治療に必要なエビデンスが乏しいため、分類も未成熟かつ使用可能な治療薬も少ない。世界的なガイドライン作成組織として知られる NCCN (National comprehensive cancer network) も胆道癌の治療ガイドラインは整備していない。一方で、本邦を含めた東アジア諸国では、消化器診療を行う上で比較的遭遇する機会の多い癌種であり、本邦からエビデンスを発信する意義は大きい。

肝外胆管癌は、現在運用されている UICC (Union for international cancer control) 第 8 版の TNM 分類や本邦のガイドラインでは、肝門部胆管癌あるいは遠位胆管癌に分類されるが実際にはそのどちらにも分類できない腫瘍がまれではない。肝外胆管癌を普遍的に評価する指標があれば臨床上有用と考えられる。本研究では、腫瘍の発生部位に関連しない古典的な評価項目である分化度と、肝外胆管癌の特徴の一つである豊富な癌間質に着目した。分化度に関しては、腫瘍の不均一性を考慮したスコアリングシステムを考案し、その有用性を検証した。癌間質においては、主たる構成成分である癌関連線維芽細胞を誘導する PDGF (Platelet Derived Growth Factor) -D と、その活性化に必要なセリンプロテアーゼである Matriptase に着目し、実際の外科切除標本を対象に免疫組織化学的な検証を行った。さらに、これらの結果をうけてその背景にどのような機序が存在するのかを解明するため、胆管癌細胞株と肝星細胞株を用いた追加実験を行いその結果を考察した。

### 2 研究方法

対象は、1995 年から 2015 年の 21 年間に自治医科大学附属病院消化器・一般外科で切除された肝外胆管癌 257 症例。既存の分類である肝門部胆管癌と遠位胆管癌に加え、分類が困難な 3 管合流部に発生する癌などを分類不能癌と分類しその頻度を調べた。分化度については、前立腺癌で用いられる Gleason 分類を参考に、腫瘍の主たる 2 成分をスコアリングし、その和を最終的な評価 (histological glandular differentiation score: HGD スコア) とし、予後との関連を解析した。PDGF-D および Matriptase の免疫組織化学的な評価については、癌細胞と癌間質の両方で評価を行い、その発現の程度と予後との関連を解析した。さらに、胆管癌細胞株 (TFK-1・KKU-100)

と肝星細胞株 (TWNT-1) を用いて、共培養下における癌細胞の遊走アッセイとフローサイトメトリーを用いた Matriptase 発現の解析を行った。

### 3 研究成果

腫瘍の発生部位は肝門部が 83 例 (32%)、遠位胆管が 101 例 (39%) で、残りの 73 例 (29%) は発生部位が肝門部とも遠位胆管とも分類しがたい分類不能癌だった。HGD スコアはその点数が高くなるにつれて予後不良となる傾向があり、多変量解析にてすべての独立した予後関連因子だった。さらに、リンパ節転移の有無を組み合わせることで、全肝外胆管癌症例の予後を有効に層別化することができた。

PDGF-D と Matriptase は免疫組織化学的に多数の症例の癌細胞で染色され、有効な予後因子ではなかった。その一方で、癌間質においてはその発現の程度は様々で腫瘍の差別化が可能だった。Matriptase が癌間質で高発現している症例では、発現の程度が乏しい症例と比較して有意に予後が不良であり、多変量解析においても独立した予後因子だった。さらに、HGD スコア高得点と癌間質の Matriptase 高発現に相関を認めた。

胆管癌細胞株を用いた遊走アッセイでは、単培養下と比較して共培養下で癌細胞の遊走能亢進がみられた。また、フローサイトメトリーを用いた Matriptase 発現の解析では、単培養下と比較して共培養下において癌細胞での発現亢進が確認された。その一方で、肝星細胞の Matriptase 発現には一貫した変化がみられなかった。

### 4 考察

本研究の結果より、全肝外胆管癌を対象とした発生部位に依存しない HGD スコアによる評価は有用と考えられた。これまでの古典的な評価方法では、評価が主観的で再現性にやや乏しいことに加え、肝外胆管癌のように腫瘍内の不均一性が強い場合、評価のばらつきが大きくなる。これらの欠点を補完し得る方法であり、リンパ節転移の有無と組み合わせることで臨床上重要な指標の 1 つになり得る。

免疫組織化学的な評価においては、癌細胞における PDGF-D・Matriptase の発現は一様に高頻度で予後の指標としての活用は難しいものの、癌間質においては発現の程度は様々であり、特に癌間質における Matriptase 高発現は重要な予後因子だった。Matriptase はこれまでに多くの癌種で発現亢進が知られているが、癌間質の発現に着目した研究は認めず、我々の得られた知見は重要と考えられた。しかしながら、免疫組織化学的な評価の特性上、癌間質のどの部位に発現がみられるかは不明瞭でありその生物学的意義については不明だった。

胆管癌細胞株を用いた細胞遊走アッセイでは、肝星細胞との共培養で遊走能亢進が確認され、共培養下ではその相互作用で癌促進性にはたらく機構の存在が考えられた。一方、フローサイトメトリーを用いた解析で癌細胞の Matriptase 発現亢進がみられたが、間質の細胞である肝星細胞にはそのような変化は認められず、「癌間質の Matriptase 高発現と予後不良の関連」を直接示唆するような所見は得られなかった。免疫組織化学的に癌間質に Matriptase が高発現する所見は、癌細胞における Matriptase の産生が亢進および細胞外へ脱落することによる現象を間接的に表している可能性を考えた。

## 5 結論

我々の考案した HGD スコアは肝外胆管癌患者の予後層別化に有用な指標である。さらに、免疫組織化学的に肝外胆管癌間質で Matriptase 発現が高度である所見も、独立した予後因子であることを明らかにした。培養細胞株を用いた実験では、胆管癌細胞株と肝星細胞株の共培養で癌細胞の Matriptase 発現が単培養下と比較し亢進していた。免疫組織化学的な所見は、癌細胞から産生された Matriptase が間質に蓄積したものを検出している可能性がある。本研究の結果からは、癌間質における Matriptase 発現の生物学的意義解明には至らなかったものの、臨床上有用と思われる予後因子を見出すことができた。今後の研究でその解明されていくことを期待する。

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文では、肝外胆管癌の新たな病理組織学的評価方法の確立を目指し、複数の組織分化度をスコア化して腫瘍を評価する方法 (Histological Glandular Differentiation: HGD) を構築し、予後予測の有効な指標となり得るかの検証を行い、予後との関連を認め有用であることが示された。

免疫組織化学的な癌間質における Matriptase 高発現は、予後との関連を認め有用と考えられた。

HGD score ならびに Matriptase 高発現の両者ともに腫瘍の発生部位に依存しない独立した予後因子であり、HGD スコアにおいてはリンパ節転移との組み合わせで予後の層別化が可能であり、予後予測のツールとして日常診療にも応用可能であることが示された。癌間質における Matriptase 高発現と予後との関連については新たな知見であり、その生物学的意義も解明されれば治療へ応用されていく可能性もある。

以上より、本学位論文は、学問的に非常に意義があり、新規性や独創性に富んだ内容であり、十分学位に値すると考えられた。

## 最終試験の結果の要旨

本学位論文では、肝外胆管癌の新たな病理組織学的評価方法の確立を目指し、複数の組織分化度をスコア化して腫瘍を評価する方法 (Histological Glandular Differentiation: HGD) を構築し、予後予測の有効な指標となり得るかの検証を行い、予後との関連を認め有用であることが示された。

免疫組織化学的な癌間質における Matriptase 高発現は、予後との関連を認め有用と考えられた。

HGD score ならびに Matriptase 高発現の両者ともに腫瘍の発生部位に依存しない独立した予後因子であり、HGD スコアにおいてはリンパ節転移との組み合わせで予後の層別化が可能であり、予後予測のツールとして日常診療にも応用可能であることが示された。癌間質における Matriptase 高発現と予後との関連については新たな知見であり、その生物学的意義も解明されれば治療へ応用されていく可能性もある。

以上より、本学位論文は、学問的に非常に意義があり、新規性や独創性に富んだ内容であり、十分学位に値すると考えられた。

審査員が指摘した事項は全て修正され、素晴らしく纏まった論文となっており、最終的に合格と判断した。