

BilINから胆管癌への移行の観点から見た病理学的課題

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐々木, 素子, 中沼, 安二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/40629

胆道癌として外科切除された鑑別困難病変の検証—画像と病理所見の対比—

BilIN から胆管癌への移行の観点から見た病理学的課題

佐々木素子¹⁾・中沼 安二¹⁾

要約：肝内結石症などの慢性胆道疾患を背景に発生する胆道癌には、顕微鏡下に捉えられる前癌性異型上皮病変の存在することが知られ、胆囊上皮デイスプラジアなどの名称で呼ばれてきた。最近、この異型病変について biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) の名称が普及しつつあり、WHO の消化器癌分類 (2010) や胆道癌取り扱い規約第 6 版に掲載された。BilIN は胆道癌の多段階発癌過程を反映する前癌病変・初期癌病変と考えられている。病理組織学的には平坦型あるいは微小乳頭状の形態を示し、異型度に応じて BilIN-1, BilIN-2, BilIN-3 に分類される。BilIN 分類を用いた病理診断については、本稿で触れるいくつかの課題が残されている。しかし、BilIN の臨床病理学的解析は、胆道癌の発癌機序の解明、早期診断への応用などへの貢献が期待される。

Key words :胆道癌, biliary intraepithelial neoplasia (BilIN), p16, EZH2

はじめに

胆管癌、胆道癌の一部は肝内結石症や原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis : PSC) などの慢性胆道炎、胆管炎を背景に発生する。これらの疾患では癌の発生が予後規定因子であり、癌の早期発見、早期治療が重要である。現在、早期発見を目指して血清、胆汁を用いた種々の解析が試みられている。従来、慢性胆道疾患を背景に発生する胆道癌には、顕微鏡下に捉えられる前癌病変、癌関連病変、早期癌病変（非浸潤性）の存在することが知られてきた。これらの病変は胆管、胆囊上皮デイスプラジア、異型上皮、上皮内腫瘍など種々の名称で呼ばれていた。われわれは膵の異型病変として先に概念が確立している pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) との対応を図って、biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) の名称を提唱した^{1~3)}。2010 年に改訂された WHO の消化器癌分類には、intraductal papillary neoplasm of the bile duct

(IPNB) と並んで BilIN の名称が掲載され、最近発刊された胆道癌取り扱い規約第 6 版⁴⁾にも、胆道癌の前癌病変および初期癌病変として付記された。

BilIN は平坦型の形態を示す顕微鏡的な病変であり、CT などの画像検査では直接捉えられることはない。最近普及しつつある胆道内視鏡では、領域性の病変として認識され、胆管粘膜生検の対象となる可能性がある。以前より BilIN に代表される異型病変は、胆道癌症例の術中凍結診断での断端評価の際に、しばしば現場の病理医を悩ませてきた。また、肝内結石症や胆道癌の切除標本においても、異型病変の病理診断：癌かどうか、腫瘍性病変か反応性病変か、病変分布、断端評価について苦慮することも多い。本稿では、前癌病変、早期癌病変としての BilIN の病理組織所見と分子病理学的知見を概説し、病理学的課題について述べる。

I. BilIN

1. BilIN とは？

BilIN は胆管癌、胆道癌の多段階発癌過程を反映する病変と考えられている^{1~3)}。BilIN は顕微鏡下に同定される非浸潤性の胆管上皮の腫瘍性異型病変であり、平坦型あるいは微小乳頭状の形態を示し、異型度により BilIN-1, BilIN-2, BilIN-3 に分類される^{1~4)}。従

Issues on Biliary Intraepithelial Neoplasia (BilIN) as a Precursor Lesion of Cholangiocarcinoma

Motoko Sasaki et al

1) 金沢大学医薬保健研究域医学系形態機能病理学
(〒 920-8640 金沢市宝町 13-1)

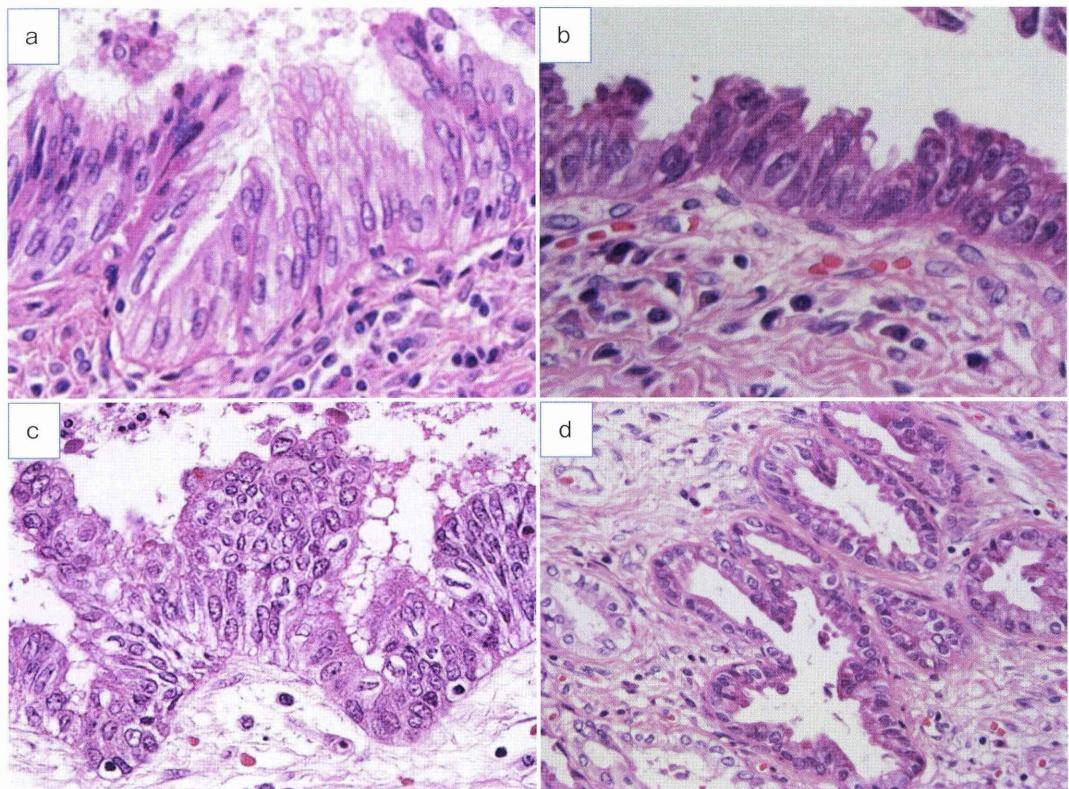


図 1 胆管上皮内腫瘍 (BilIN)
 a : BilIN-1 b : BilIN-2
 c : BilIN-3 d : 付属腺への進展 (glandular involvement)

来、肝内結石症やその他の慢性胆道炎、胆管炎や胆道形成異常症例に発生する胆管癌では、浸潤癌部以外の肝内大型胆管に種々の異型病変；BilIN がみられることが知られている^{1~3)}。同様の異型病変は、癌を合併しない PSC や先天性の胆道形成異常疾患でも認められる。また、胆石症や胆石症+胆囊癌の非癌部の胆囊粘膜にも時に類似の異型病変がみられる。慢性胆道疾患では、炎症に伴う胆管上皮の過形成あるいは反応性の異型性病変も出現することが知られており、BilIN との鑑別を要する。なお、BilIN 類似の異型病変は肝内小型胆管にも認められ、とくにウイルス性肝炎などの慢性進行性肝疾患で経験されることがある^{5,6)}。また、カロリ症や先天性肝線維症でも、小型胆管に BilIN 病変をみることがある。

2. 病理形態像（図1）

肉眼的には平坦な形態を示す。組織学的には、平坦な病変もあるが、多くの病変は微小乳頭状の増殖パターンを示す。HE 染色標本における異型の程度に基づき、BilIN-1, BilIN-2, BilIN-3 に分類される^{1~4)}。我が国では BilIN-3 は上皮内癌と同等に取扱われる。

BilIN-1（軽度異型）では、核は濃染し、大小不同、多層化を示し、核胞体比の増加をみる。BilIN-2（中等

度異型）では、核の大小不同が目立ち、核が管腔縁に迫り出し、BilIN-3（高度異型、上皮内癌）では核異型や細胞異型が増加し、極性の乱れが目立つ。BilIN-2 と BilIN-3 は、胆管および胆囊粘膜面でしばしば領域性の局面を形成する。BilIN-1 は、軽度デイスプラジア、BilIN-2 は高度デイスプラジア、BilIN-3 は、上皮内癌に相当する。これらの組織所見のうち、実際の病理診断に際して BilIN-1 は核の多層化、BilIN-2 は核の迫り出し、BilIN-3 はびまん性の細胞極性の乱れがあることがとくに重視される。

3. 分布

BilIN は肝門部大型胆管から肝外胆管において局所性もしくは領域性に分布し、非連続性に多発したようにみえることも経験される。高異型度の BilIN ほど広範囲に分布する傾向がある。肝門部胆管癌を対象とした検討では、約 70% の症例において大型胆管に BilIN を伴っていたとされる⁷⁾。

肝内結石症などでは、BilIN は胆管周囲付属腺にも認められ、胆管上皮の BilIN 病変から連続して胆管周囲付属腺に進展（glandular involvement）することもある⁸⁾（図 1d）。また、病理解剖症例の検討では、胆管周囲付属腺に偶発的に BilIN やそれに類似する低乳頭

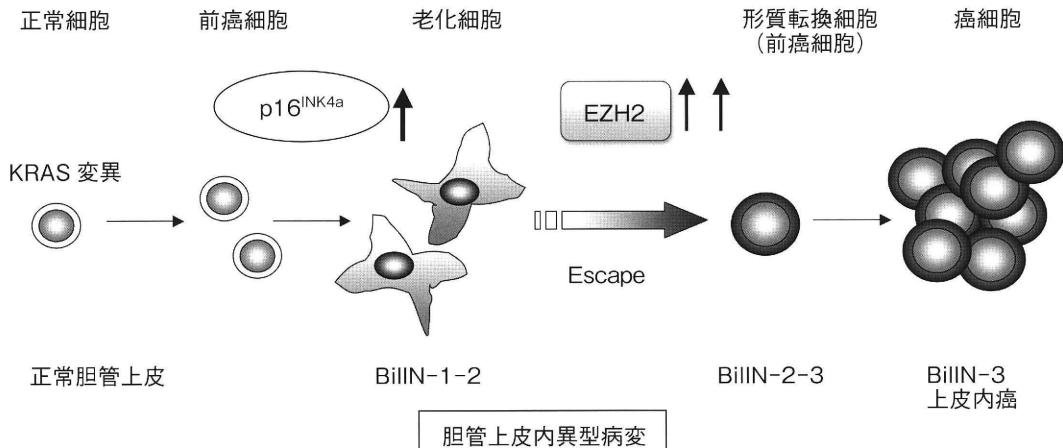


図 2 癌遺伝子誘導性細胞老化と胆道癌多段階発癌（文献 11 改変）

状の上皮の過形成性・増殖性病変をみる頻度はまれではない。われわれの検討では、約 5% の症例において胆管周囲付属腺に上皮の增生病変を認めた(論文投稿中)。

II. BilIN から胆管癌への進展と分子病理学

多段階発癌過程を経由して、BilIN 病変、とくに BilIN-3 が通常型の胆管癌および胆道癌へと進展すると考えられる。しかし、具体的な進展機序に関しては、不明な点が多く残されている。また、BilIN の発生から浸潤癌への進展にどれくらい時間がかかるのかについてもよくわかっていない。肝内結石症の検討では、浸潤癌を合併した症例ではほぼ全例に BilIN-3 がみられるのに対して、浸潤癌の合併のない症例で BilIN-3 を認めるることはまれである⁹⁾。このことは、BilIN の異型度が多段階に増加して BilIN-3 までに至った場合には、比較的速やかに浸潤癌へと移行する可能性を示唆している。一般に、DNA 損傷や遺伝子変異によって開始する多段階発癌過程の早期段階と後期段階の間に、細胞老化が癌抑制機構として働くと考えられている(図 2)^{10~12)}。この細胞老化からのエスケープ後は癌の進展が早い可能性がある。また、免疫監視機構を含めた癌抑制機構からのエスケープには年齢的な因子も関与すると考えられる。

慢性炎症を背景に発生する胆道癌の発生機序としては、慢性胆管障害の局所における胆管上皮の、異常な胆汁酸や酸化ストレスへの暴露による DNA 損傷、炎症細胞や間質細胞から分泌される TNF- α や IL-6 などさまざまなサイトカインや増殖因子、多くの生物学活性化物質の関与が示唆されている¹³⁾。その後、多段階的に遺伝子異常が生じた結果、前癌状態の細胞は癌抑制機構としてのアポトーシスや細胞老化からエス

ケープして発癌に至る。また、発癌過程には、免疫監視機構からの回避も関与する。さらに癌の進展過程では浸潤、転移に関連する分子や酵素の活性化が重要とされる¹³⁾。

BilIN を経由する多段階発癌過程では、種々の癌遺伝子、癌抑制遺伝子関連蛋白の発現や MUC ムチンコア蛋白発現などが多段階的に変動する^{13~16)}。これらの一連の分子群は BilIN の病理診断や異型度分類の補助に応用可能と期待される。

1. MUC ムチンコア蛋白

胆管癌の発癌過程では BilIN の早期段階で、生理的 MUC3 発現が低下し、高率に胃腺窩上皮型ムチンの MUC5AC 発現がみられる^{15,16)}。BilIN の後期段階で MUC1 の発現亢進がみられ、浸潤癌では広範に高い MUC1 発現を示す^{15,16)}。これらの変動は、膵臓の PanIN での報告と共通する。通常型の胆管癌；管状腺癌などでの MUC2 発現率は低い^{15,16)}。一方、IPNB では、MUC5AC 発現が広範で、浸潤癌合併例の浸潤部では MUC1 が発現する。粘液産生の目立つ IPNB や粘液癌合併症例では大腸型ムチンである MUC2 発現が高い^{15~17)}。

2. S100P

S100 ファミリー蛋白質に属する S100P は肝門部-肝外胆管癌で高率に発現し、通常、正常大型胆管上皮での発現はみられない¹⁸⁾。BilIN-1 において S100P が発現する頻度は低く、BilIN-2 や BilIN-3 ではその発現誘導が著明に認められる^{19,20)}。S100P は胃腺窩上皮型の形質でもあり、反応性、化生性変化を示す大型胆管上皮にも陽性になる点には注意が必要である。S100P と von Hippel-Lindau gene product, IMP3 の三つの免疫染色の組み合わせが、胆管生検における異型上皮病変の病理診断に有用であることも報告されている²¹⁾。

3. p53

代表的な癌抑制遺伝子である p53 の異常は胆管の発癌過程で BilIN, IPNB の後期に出現することが知られている。われわれの検討でも、BilIN-1, 2 では、変異型 p53 を示す免疫染色での陽性所見はほとんどみられない²²⁾。肝内胆管癌では 30% 前後が p53 陽性である。一方、p53 陽性率は肝外胆管癌で 40%, 胆囊癌で 60% と、肝内胆管癌よりも胆囊癌や肝外胆管癌において高い傾向にある²²⁾。したがって、高分化型腺癌の確定診断に p53 免疫染色が有用な場合もあるが、肝内胆管癌での陽性率は比較的低く、良悪鑑別の決め手にはならない。

4. p16, EZH2

p16 は代表的な癌抑制遺伝子で、多くの癌で、プロモーター領域の高メチル化などによる不活化が知られる。p16 は癌遺伝子の活性化などによって誘導され、細胞周期の G1 期停止、すなわち細胞老化を起こす。近年、“Oncogene-induced senescence” 癌遺伝子誘導性細胞老化の概念が注目されている^{10~12)}。この機構では、前癌病変では細胞老化が高率にみられ、癌への進展を抑制すること、細胞老化からのエスケープにより発癌することが示されている（図2）。

EZH2 は Bmi1 と並ぶ代表的なポリコーム群蛋白で、ヒストンのメチル化により癌抑制遺伝子 p16 や E-cadherin などの発現抑制に働く。各種の癌において過剰発現がみられ、浸潤などの高い癌悪性度や予後不良との関連が報告されている^{12,23~25)}。EZH2 の過剰発現は細胞老化からのエスケープに働くと考えられ、EZH2 は有用な治療標的分子になる可能性がある^{23~25)}。

胆道癌の多段階発癌過程では、BilIN の早期段階では、p16 の発現亢進がしばしばみられる（図2）。BilIN の進展とともに発現は低下する^{12,25)}。なお、一部の胆管癌は広範な p16 発現を示し、Rb 変異などを反映している。一方、EZH2 の発現は、BilIN-1, BilIN-2, BilIN-3、浸潤癌と進展するとともに、発現率が亢進し、p16 発現低下と逆相関する（図2）^{12,25)}。EZH2 の過剰発現が p16 プロモーター領域メチル化を誘導し、その結果として p16 発現の発現低下をきたすと考えられる¹⁰⁾。p16 と EZH2 免疫染色は BilIN と反応性病変との鑑別診断や悪性度診断の補助に有用である。

5. KRAS, GNAS

KRAS : KRAS 遺伝子変異は、前述の oncogene-induced senescence を誘導する代表的な遺伝子変異である^{10,11)}。肺癌や肺癌の KRAS 変異型のモデル動物でも、KRAS 変異により前癌病変では細胞老化による発癌抑制がみられる^{10,11)}。KRAS 変異に加えて、細胞老

化からエスケープする異常が癌化に必要であり、EZH2 過剰発現や遺伝子変異などによる p16 不活化などが、この役割を持つと考えられる^{10~12)}。

膵癌（浸潤性膵管癌）や PanIN では KRAS 変異は約 90% と高率である²⁶⁾。これに対して胆道癌における KRAS 変異は 50% 前後とする報告が多く、膵癌と比較すると低い。また、肝内胆管癌での報告は 20~30% とやや低く、発生部位による差と考えられる²²⁾。われわれの肝内結石症症例の検討では、BilIN の約 30~40% にも KRAS 変異を認めており、一部の胆管癌は、膵癌と同様の KRAS 変異が鍵となる発癌様式をとると考えている²²⁾。さらに BilIN に KRAS 変異を有する症例では、一見異型のない胆管周囲付属腺や大型胆管上皮にも KRAS 変異がみられる²²⁾。これは、BilIN に先行して、背景の付属腺や胆管上皮にすでに遺伝子変異が生じていることを示唆する。

GNAS : GNAS 変異は、BilIN、通常の肝内胆管癌ではほとんど検出されない^{22,27)}。これに対して IPNB では、30~50% と比較的高率に検出される^{28,29)}。これは膵臓の PanIN、膵癌（浸潤性膵管癌）での低い変異率²⁶⁾、IPMN での比較的高い変異率³⁰⁾と共にしており、胆膵の平坦型と乳頭型の前癌病変の差異を示唆する所見と考えられる。

III. BilIN の病理診断の問題点

1. BilIN の異型度分類

BilIN は多段階発癌過程を示す連続性の異型病変である。したがって、BilIN-1, -2, -3 の異型度分類は、一応の基準はあるが、実際には観察者間の診断一致率は高くない³¹⁾。これは、前立腺の prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) など他臓器の異型病変にも共通する問題点である。上述のごとく、分子病理学的には、BilIN-1/2 相当の低異型度病変と、BilIN-2/3 相当の高異型度病変の間には生物学的性格の違いがあると考えられ、両者の鑑別が重要と考えられる。診断補助として、S100P, p16, EZH2, p53, MUC1 などの免疫染色結果が参考になる。

2. BilIN vs 反応性、炎症性病変

慢性胆道系疾患ではしばしば、BilIN や癌と炎症性変化が同時に見られ、炎症に伴う胆管上皮の障害像が判断の妨げになることが経験されている。実際には反応性異型と BilIN-1 との鑑別はしばしば困難である。反応性の病変では細胞密度の増加と軽度の多層化が主体で、核は円形あるいは卵形で、核縁は平滑、クロマチンは纖細、均質で、上皮内への炎症細胞浸潤をみると

ことが少なくない³⁾。明らかな腫瘍性の細胞異型はない。平坦あるいは低乳頭状の病変で、範囲は局所性から広範囲に及ぶ。BilIN の診断は、炎症性病変の少ない部位で行うことを勧めるが、炎症部での異型度判断の今後の大きな課題である。

3. 化生性変化

BilIN では通常、胃腺窩上皮型ムチンの MUC5AC 発現が亢進しており、ある意味“腺窩上皮”化生を伴っているといえる^{15,16)}。また、時に腸型 (goblet cell metaplasia) の化生病変も認められる。とくに腸型の化生性変化を伴う BilIN の異型度の評価の指標を今後検討する必要がある。

4. BilIN vs 表層進展

胆管癌は上皮内で表層拡大進展を示すことがある。胆管癌の表層拡大進展は同じく上皮内癌である BilIN-3 とは本質的（概念的）に異なるものであるが、実際の病理組織における両者の区別は困難なことが多い⁹⁾。BilIN-3 の多くは BilIN-2 と連続性のある異型病変であり、BilIN-2 との鑑別が問題となる。これに加えて、癌の側方進展あるいは癌が再度胆管内腔に入り、上皮内病変を形成するいわゆる胆管での cancerization との鑑別は困難である。さらに IPNB の辺縁では、腫瘍細胞が低乳頭状-平坦な局面を形成して側方進展することもある。この場合も BilIN との鑑別は難しいことが多い。

胆管切除断端の異型上皮病変の取扱いに関して、断端部に表層拡大進展による上皮内癌が存在しても、予後に影響がないとされる³²⁾。また、IPNB の切除断端部における異型上皮病変の存在および臍断端部の PanIN の存在と予後との関連についての報告もある^{33,34)}。BilIN についても同様に断端部に BilIN が存在する場合の臨床的意義や取り扱いの指針を明らかにする必要がある。

5. 付属腺上皮への進展/浸潤癌との鑑別

肝内結石症などでは、BilIN 病変はしばしば胆管周囲付属腺への進展 (glandular involvement) (図 1d) を示す。この場合、癌の浸潤との鑑別を要する。とくに切除断端陽性の場合に、癌の局在が上皮内か壁内/壁外浸潤かは予後と関連するとされる。新しい胆道癌取扱い規約でも、この点を分けて評価することになっている⁴⁾。

おわりに

BilIN からの胆管癌への移行の観点から見た病理学的課題について、最近の知見を交えて概説した。BilIN

分類にはいくつかの問題点が残されている。胆管癌の前癌・初期癌病変である BilIN の早期診断は、早期治療による予後改善のためにも重要である。今までに主に外科切除症例の解析から蓄積された病理学的知見から、さらに胆道癌の発癌進展に関する臨床病理学的解析を進める必要がある。さらに今後、普及しつつある胆道内視鏡下での粘膜生検など新しい技術を用いて、BilIN 病変の早期診断が進歩することが期待される。

参考文献

- 1) Nakanuma Y, Curado MP, Franceschi S, et al.: Intrahepatic cholangiocarcinoma. WHO classification of tumors of the digestive system, 4th Ed, ed by Bosman rr, Carneiro F, Hruban RH, et al.: IARC Press, Lyon. 217-224, 2010.
- 2) Zen Y, Aishima S, Ajioka Y, et al.: Proposal of histological criteria for intraepithelial atypical/proliferative biliary epithelial lesions of the bile duct in hepatolithiasis with respect to cholangiocarcinoma : preliminary report based on interobserver agreement. Pathol Int 55 : 180-188, 2005.
- 3) Sato Y, Sasaki M, Harada K, et al.: Pathological diagnosis of flat epithelial lesions of the biliary tract with emphasis on biliary intraepithelial neoplasia. J Gastroenterol 49 : 64-72, 2013.
- 4) 日本肝胆脾外科学会編：臨床・病理 胆道癌取扱い規約第6版. 原出版, 2013.
- 5) Wu TT, Levy M, Correa AM, et al.: Biliary intraepithelial neoplasia in patients without chronic biliary disease : analysis of liver explants with alcoholic cirrhosis, hepatitis C infection, and noncirrhotic liver diseases. Cancer 115 : 4564-4575, 2009.
- 6) Rougemont AL, Genevay M, McKee TA, et al.: Extensive biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) and multifocal early intrahepatlc cholangiocarcinoma in non-biliary cirrhosis. Virchows Arch 456 : 711-717, 2010.
- 7) Aishima S, Kuroda Y, Nishihara Y, et al.: Proposal of progression model for intrahepatic cholangiocarcinoma : clinicopathologic differences between hilar type and peripheral type. Am J Surg Pathol 31 : 1059-1067, 2007.
- 8) Nakanuma Y, Sasaki M, Terada T, et al.: Intrahepatic peribiliary glands of humans. II. Pathological spectrum. J Gastroenterol Hepatol 9 : 80-86, 1994.
- 9) Sato Y, Harada K, Sasaki M, et al.: Histological characteristics of biliary intraepithelial neoplasia-3 and intraepithelial spread of cholangiocarcinoma. Virchows Arch 462 : 421-427, 2013.
- 10) Mooi WJ, Peeper DS : Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. N Engl J Med 355 : 1037-1046, 2006.

- 11) Braig M, Schmitt CA : Oncogene-induced senescence : putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* **66** : 2881–2884, 2006.
- 12) Sasaki M, Yamaguchi J, Itatsu K, et al. : Over-expression of polycomb group protein EZH2 relates to decreased expression of p16 INK4a in cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis. *J Pathol* **215** : 175–183, 2008.
- 13) Rizvi S, Gores GJ : Pathogenesis, diagnosis and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterol* **45** : 1215–1229, 2013.
- 14) Nakanuma Y, Sasaki M, Sato Y, et al. : Multistep carcinogenesis of perihilar cholangioacarcinoma arising in the intrahepatic large bile ducts. *World J Hepatol* **31** : 35–42, 2009.
- 15) Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y : Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system : physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem* **42** : 61–110, 2007.
- 16) Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS : Characterization of apomucin expression in intrahepatic cholangiocarcinomas and their precursor lesions : an immunohistochemical study. *Hepatology* **24** : 1074–1078, 1996.
- 17) Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, et al. : Significance of mucin expression in pancreatobiliary neoplasms. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **17** : 108–124, 2010.
- 18) Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, et al. : Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* **55** : 1876–1888, 2012.
- 19) Aishima S, Fujita N, Mano Y, et al. : Different roles of S100P overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma : carcinogenesis of perihilar type and aggressive behavior of peripheral type. *Am J Surg Pathol* **35** : 590–598, 2011.
- 20) Sato Y, Harada K, Sasaki M, et al. : Clinicopathological significance of S100 protein expression in cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **28** : 1422–1429, 2013.
- 21) Schmidt MT, Himmelfarb EA, Shafi H, et al. : Use of IMP3, S100P, and pVHL Immunopanel to Aid in the Interpretation of Bile Duct Biopsies With Atypical Histology or Suspicious for Malignancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **20** : 478–487, 2012.
- 22) Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, et al. : KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcino-
mas. *Cancer* **119** : 1669–1674, 2013.
- 23) Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. : The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419** : 624–629, 2002.
- 24) Xiao Y : Enhancer of zeste homolog 2 : A potential target for tumor therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **43** : 474–477, 2011.
- 25) Yamaguchi J, Sasaki M, Harada K, et al. : Papillary hyperplasia of the gallbladder in pancreaticobiliary maljunction represents a senescence-related lesion induced by lysolecithin. *Lab Invest* **89** : 1018–1031, 2009.
- 26) Kanda M, Matthaei H, Wu J, et al. : Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* **142** : 730–733, 2012.
- 27) Ong CK, Subimber C, Pairojkul C, et al. : Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet* **44** : 690–693, 2012.
- 28) Sasaki M, Matsubara T, Nitta T, et al. : GNAS and KRAS Mutations are Common in Intraductal Papillary Neoplasms of the Bile Duct. *PLoS One* **8** : e81706, 2013.
- 29) Tsai JH, Yuan RH, Chen YL, et al. : GNAS Is Frequently Mutated in a Specific Subgroup of Intraductal Papillary Neoplasms of the Bile Duct. *Am J Surg Pathol* **37** : 1862–1870, 2013.
- 30) Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E, et al. : Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep* **1** : 161, 2011.
- 31) Zen Y, Adsay NV, Bardadin K, et al. : Biliary intraepithelial neoplasia : an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. *Mod Pathol* **20** : 701–709, 2007.
- 32) Nakanishi Y, Kondo S, Zen Y, et al. : Impact of residual *in situ* carcinoma on postoperative survival in 125 patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **17** : 166–173, 2010.
- 33) Jung G, Park KM, Lee SS, et al. : Long-term clinical outcome of the surgically resected intraductal papillary neoplasm of the bile duct. *J Hepatol* **57** : 787–793, 2012.
- 34) Matthaei H, Hong SM, Mayo SC, et al. : Presence of pancreatic intraepithelial neoplasia in the pancreatic transection margin does not influence cancer. *Ann Surg Oncol* **18** : 3493–3499, 2011.

* * *