

## 胆・膵腫瘍の分子病理診断

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/34257">http://hdl.handle.net/2297/34257</a>

## 胆・膵腫瘍の分子病理診断

佐々木 素子\*

中 沼 安 二\*\*

### 要 旨

解剖学的にも発生学的にも、膵と肝門部－肝外胆管系は近似しており、膵癌（導管癌）と胆管癌、胆・膵の乳頭状と平坦な前癌病変もよく似ている。胆・膵腫瘍の発癌過程では、p53, p16, EZH2, KRAS, DPC4, Hedgehog 系, MUC ムチンなどが重要な役割を持ち、発現様式をはじめダイナミックな変動を示す。これらは胆・膵腫瘍の分子病理診断の代表的なマーカーであり、また分子標的治療の面でも鍵を握る分子と考えられる。

### はじめに

分子病理診断には大きく分けて、① 診断補助：悪性度診断と予後予測、鑑別診断、腫瘍の病型分類などを目的とするものと、② 分子標的治療のコンパニオン診断の2つがある。最近、乳癌（ER, PgR, HER2）、胃癌（HER2）、肺癌（EGFR）、大腸癌（EGFR）などの分子標的治療が日本でも保険適用になり、コンパニオン診断も盛んに行われるようになった。胆・膵領域では、膵癌の KRAS が補助診断項目として保険適用になっているが、分子標的治療はまだ臨床研究の段階である。解剖学的にも発生学的にも膵と肝門部－肝外胆管系は近似している<sup>1)</sup>。両者はほとんど同じ時期に前腸から発生し、胆管周囲付属

腺、pancreatic duct gland の分布をはじめ、膵管と胆管は類似している<sup>1-3)</sup>。また、膵癌（導管癌）と胆管癌、膵管系と胆管系に発生する papillary と flat な前癌病変（intraductal papillary mucinous neoplasm : IPMN と intraductal papillary neoplasm of the bile duct : IPNB, pancreatic intraepithelial neoplasia : PanIN と biliary intraepithelial neoplasia : BiLIN）はよく似ていることが知られている<sup>4)</sup>。したがって分子標的治療についても、胆・膵腫瘍では共通の分子が効果的な標的となる可能性がある。本稿では、胆・膵腫瘍の分子病理診断について幾つかの代表的な分子を取り上げ、私どもの成績を加えながら解説する。

### p53

p53 経路と p16/Rb 経路は細胞周期をコントロールする基本的な経路で、ほとんどの癌でこれらの経路に含まれる因子に何らかの変異が生じている。p53 は代表的な癌抑制遺伝

\* 金沢大学医薬保健研究域医学系 形態機能病理学准教授

\*\* 同 教授

キーワード：胆道癌、膵癌、K-ras, p53, p16, EZH2, MUC

子であり、免疫染色で p53 タンパク質の過剰発現やその蓄積を解析することが、腫瘍の異常 p53 を検出する方法として広く用いられている。変異型 p53 は MDM2 活性化を介して分解されずに蓄積するため、免疫染色で容易に検出される。なお、炎症や発癌早期段階で生じる老化細胞では変異のない p53 タンパク質が蓄積するので、このような病変部での p53 陽性像の解釈には注意が必要である。

## 1. 胆管腫瘍

p53 の異常は、胆管の発癌過程で BillIN, IPNB の後期に出現することが知られている<sup>9)</sup>。私どもの検討でも BillIN での発現はほとんどなく、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%、胆嚢癌で 60% と、発生部位によって陽性率が異なる傾向にある（投稿準備中）。したがって、高分化型腺癌の診断に 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ことも念頭に置くべきである。

## 2. 膵腫瘍

膵癌発癌のモデルでは、KRAS 変異, p53 変異, p16 異常, sonic hedgehog 経路が重要とされる<sup>6)</sup>。p53 の異常は PanIN の後期段階に起こり、膵癌では 50~75% 程度に認められる<sup>6)</sup>。IPMN では、腺腫-境界悪性相当の 30%、癌の 50~60% に p53 の異常が見られる。

### p16, EZH2

#### <p16>

p16 も代表的な癌抑制遺伝子で、多くの癌で遺伝子変異、遺伝子欠失、プロモーター領域の高メチル化による不活化が知られる。

p16 はさまざまなストレスや癌遺伝子の活性化によって誘導され、細胞周期の G<sub>1</sub> 期停止、すなわち細胞老化を起こす。近年、癌遺伝子誘導性細胞老化 “oncogene-induced senescence” の概念が注目されている<sup>7)</sup>。この機構では、前癌病変では細胞老化が高率に見られ、癌への進展を抑制すること、細胞老化からの bypass/escape により発癌することが示されている。また、p16 経路の下流である Rb の変異やヒトパピローマウイルス (HPV) 感染などでは p16 の蓄積をみる。

#### <EZH2>

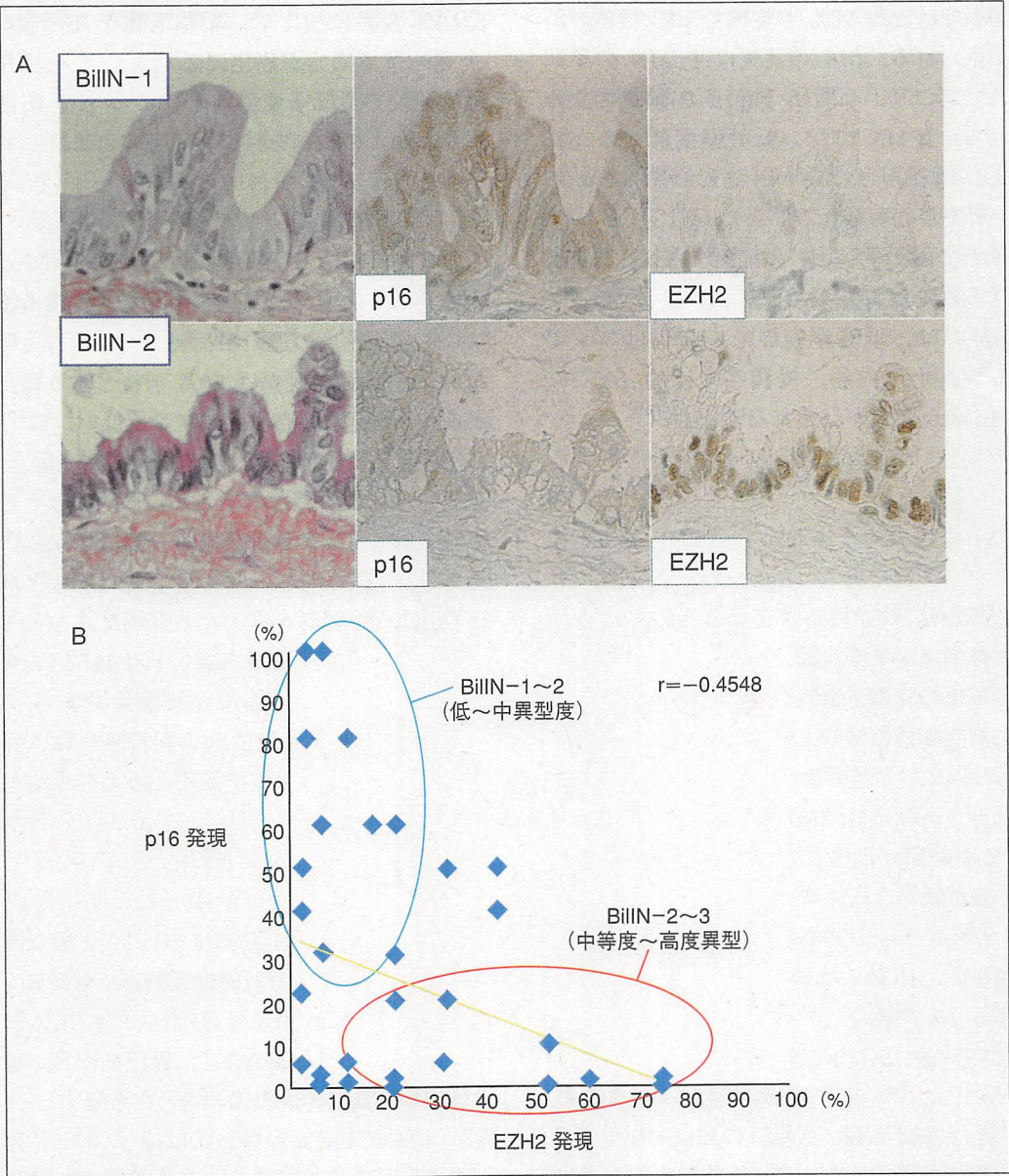
EZH2 は、Bmi1 と並ぶ代表的なポリコム群タンパク質で、ヒストンのメチル化により癌抑制遺伝子 p16 や E カドヘリンなどの発現抑制に働く。各種の癌において過剰発現が見られ、浸潤などの高い癌悪性度や予後不良との関連が報告されている<sup>8-11)</sup>。EZH2 の過剰発現は細胞老化からの bypass/escape に働くと考えられ、EZH2 は有用な治療標的分子になる可能性がある<sup>9)10)</sup>。EZH2 ノックダウンは癌細胞の増殖、浸潤、腫瘍形成能を抑制し、薬剤感受性を亢進することが報告されている<sup>9-11)</sup>。また、EZH2-peptide によって末梢単核球が刺激され、EZH2 特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導されるとする報告もある<sup>9)</sup>。

## 1. 胆管腫瘍

胆管癌では、前癌病変である BillIN の早期段階では p16 の発現亢進がしばしば見られる（図 1）。BillIN の進展とともに発現が低下し、浸潤癌では p16 発現はほとんど見られない<sup>10-12)</sup>。なお、一部の胆管癌では p16 発現が広範な場合もあり、Rb 変異などを反映している。一方 EZH2 の発現は、胆管癌の多段階発癌経路の BillIN-1, BillIN-2, BillIN-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 1）<sup>5)10)11)</sup>。EZH2 の過剰発現が p16 プロモーター領域



図1 胆管上皮内異型病変 (BiIIN) における p16, EZH2 発現



A：低異型度病変 (BiIIN-1 相当) では、p16 陽性、EZH2 陰性である。一方、中～高異型度病変 (BiIIN-2 相当) では、p16 陰性、EZH2 陽性である。  
B：BiIIN における p16, EZH2 発現の逆相関

メチル化を誘導し、その結果として p16 の発現低下を来したものと考えられる<sup>10)</sup>。胆管癌の多くは EZH2 過剰発現を示すので、私どもは、EZH2 免疫染色は胆管腫瘍の悪性度診断に有用と考えている。IPNB においても、低異型度のものでは EZH2 発現はほとんどないが、浸潤癌合併例では高率に EZH2 過剰発現をみる (投稿準備中)。



## 2. 膵腫瘍

膵癌では、約 95% の症例で p16 機能の消失が見られる。p16 の消失は PanIN の早期段階で起こり、一般に PanIN-2 前後で認められる。IPMN では、低異型度群での p16 消失はほとんどないが、癌では約 80% に p16 消失が認められる。

膵癌では、約 70% の症例で EZH2 発現が見られ、低分化型でより発現率が高い<sup>12)</sup>。IPMN では、低異型度群での発現は 5% であるが、上皮内癌、浸潤癌では約 50% に EZH2 発現亢進が見られる<sup>13)</sup>。

## KRAS

Ras は代表的な癌遺伝子産物で、GTP 結合タンパク質である。Ras には、K-ras, H-ras, N-ras の 3 種が含まれる。Ras はさまざまな増殖因子受容体からのシグナルを中継して下流の経路を活性化し、細胞の増殖、接着、細胞骨格の維持、生存や分化を制御している。Ras に変異が生じると Ras の GTPase が低下し、細胞外刺激のない状態でも恒常的に Ras 経路が活性化し、増殖シグナル ON の状態が続く。活性型 Ras 変異は多くの癌に見られ、K-ras は膵管癌、大腸癌、肺癌、胆道癌など、H-ras は膀胱癌、口腔癌、N-ras は悪性リンパ腫などでの高頻度の変異が報告されている。K-ras 遺伝子の変異の多くはコドン 12, 13, 61 の点突然変異である。抗 EGFR 治療は肺癌、大腸癌の代表的な分子標的治療であるが、KRAS 変異のある患者では治療効果が低いことが明らかとなり、現在、抗 EGFR 投与適用のコンパニオン診断として KRAS 変異の測定が保険適用となっている。

KRAS 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<sup>7)</sup>。肺癌や膵癌の 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見られる<sup>7)</sup>。KRAS 変異に加えて、細胞老化を bypass/escape 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<sup>7)10)</sup>。

## 1. 胆管腫瘍

胆管癌における KRAS 変異は 4~100% と報告され、大きくばらついている<sup>14)</sup>。検出法による検出感度の違いが反映されていると思われる。KRAS 変異は 50% 前後とする報告が多く、後述の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<sup>14)</sup>。私どもの検討では BillIN の早期段階の一部にも 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っている（投稿準備中）。現在、胆管癌の抗 EGFR 治療は臨床試験段階である<sup>15)</sup>。KRAS 変異率が比較的低い胆管癌には、将来的に抗 EGFR 治療が適用できるのかもしれない。

## 2. 膵腫瘍

膵癌では、KRAS 変異は 90% と非常に高率であり、PanIN の低異型度病変でも変異を有することが知られる<sup>6)</sup>。IPMN での KRAS 変異の頻度は 30~80% で、異型度が高いほど変異率も高い。大腸癌の場合を考慮すると、KRAS 変異率が高い膵癌には抗 EGFR 治療があまり使えないのかもしれない。

## MUC

ムチンは多量の糖鎖（分子量の 50~80%）と MUC 遺伝子がコードするムチンコアタンパク質よりなる<sup>16)</sup>。MUC ムチン遺伝子は現在 MUC1 から MUC21 まで同定されている。コアタンパク質にはそれぞれの MUC ムチンに特有のタンデムリピート構造がある。

また、MUC ムチンには膜結合型 (MUC1, MUC3A, MUC3B など) と分泌型 (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 など) があり、それぞれの MUC ムチンが臓器・細胞特異的に生理学的に分布する<sup>16)</sup>。代表的な MUC ムチンの MUC1 は膜結合型で、乳腺をはじめ腺細胞に広範に分布する。MUC2, MUC5AC, MUC6 は分泌型で、MUC2 は大腸、MUC5AC は胃腺窩上皮、MUC6 は幽門腺に発現する。非腫瘍性疾患でも、MUC 発現はダイナミックに変動する<sup>16)</sup>。例えば肝内大型胆管では、正常では MUC3, MUC5B が発現する。胆管周囲付属腺では MUC6 発現を示す<sup>16)</sup>。正常大型胆管では MUC2, MUC5AC 発現はないが、肝内結石症では炎症に伴う反応性変化として表層に MUC5AC 発現、付属腺 (特に壁内腺) の MUC6 発現が亢進し、「胆管粘膜の胃粘膜化」が見られる<sup>17)</sup>。MUC5AC は分泌型のゲル形成性ムチンであり、結石発生に関与している可能性がある。肝内結石症では、腸分化を規定する CDX2 依存性の腸上皮化生が見られることもある<sup>17)</sup>。

MUC ムチンの癌における臨床病理学的意義に関して、膜結合型ムチンの MUC1, MUC4 は予後不良と関連する<sup>16) 18)</sup>。一方、MUC2 の発現は比較的良好な予後と関連する。MUC1, MUC4 はそれぞれ  $\beta$  カテニン経路、HER2 経路との関連があり、治療標的として注目されている。また胆・膵領域では、後述のごとく MUC5AC は発癌過程の早期段階から陽性となり、早期マーカーとして有用と考えられる<sup>16) 19)</sup>。MUC ムチンは IPMN や IPNB の亜型分類にも補助的に用いられており、予後推定因子としても考えられている<sup>4) 16)</sup>。

免疫染色による MUC1 発現の解釈には、抗体のタイプによる染色性の違いに注意が必要である。代表的な上皮細胞マーカーの epithelial membrane antigen (EMA) は、

MUC1 ムチンコアタンパク質に多量の糖鎖がついた糖タンパク質 glycosylated-MUC1 である<sup>16)</sup>。一方、“MUC1”としてよく病理診断に用いられる抗体 MUC1/DF3 (CA15-3) は、MUC1 ムチンのコアタンパク質 (+ シアル基) 部分を認識する<sup>16)</sup>。非腫瘍性胆管はほぼ MUC1/DF3 陰性であるが、胆管癌では鋭敏に陽性像を示す<sup>16) 19)</sup>。この染色性は、癌化に伴う糖鎖付加異常による抗原エピトープ/コアタンパク質の露出を反映している。in situ ハイブリダイゼーション法を用いた検討では、肝内胆管には広範に MUC1 mRNA が検出され、EMA の染色動態とおおむね一致する<sup>16) 17)</sup>。

## 1. 胆管腫瘍

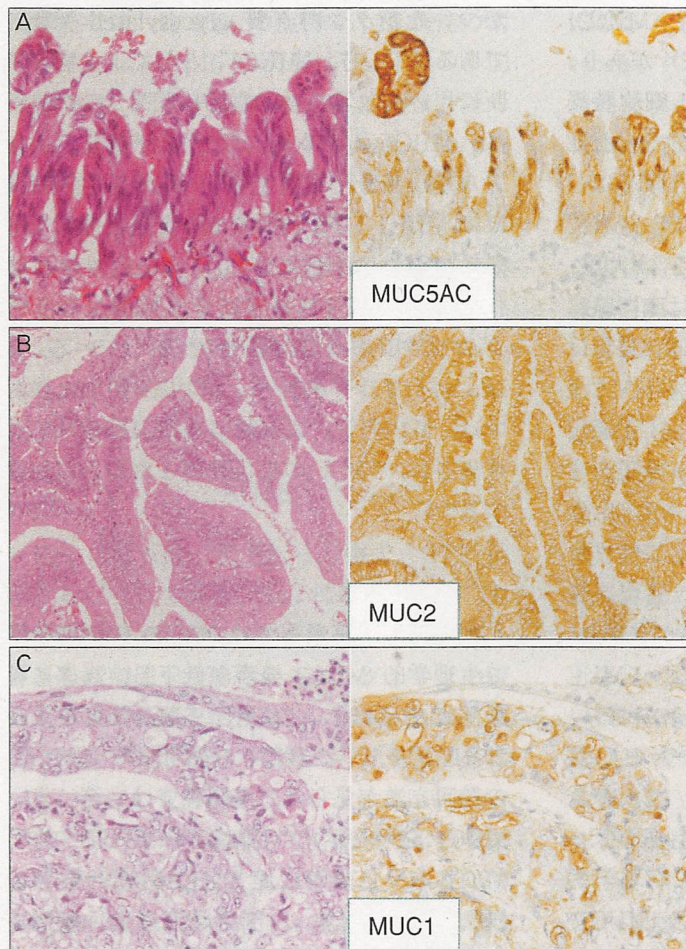
胆管癌の発癌過程では、BillIN の早期段階で生理学的 MUC3 発現が低下し、高率に胃腺窩上皮型ムチンの MUC5AC 発現が見られる (図2)<sup>16) 19)</sup>。BillIN の後期段階で MUC1 の発現亢進が見られ、浸潤癌では広範に高い MUC1 発現を示す (図2)<sup>16) 19)</sup>。IPNB では、MUC5AC 発現が広範で、浸潤癌合併例の浸潤部で MUC1、一部の粘液癌合併症例で MUC2 発現が目立つ (図2)<sup>16) 19) 20)</sup>。通常型の胆管癌、管状腺癌などでの MUC2 発現率は低く、MUC2 発現は IPNB (腸型) と粘液癌の特徴と言える<sup>16) 20)</sup>。MUC2, MUC5AC, MUC6 は、後述の IPMN に準じた IPNB の亜型分類の補助にも用いられる<sup>4)</sup>。ただし亜型分類は、本来は組織、細胞形態に基づいて行われており、MUC 発現パターンと多少のずれが生じる症例もある。また IPNB では複数の亜型が混在していて、亜型分類に苦慮する症例も見られる。

## 2. 膵腫瘍

MUC1 は、PanIN の後期段階で発現亢進が見られ、PanIN-3 の 85%、浸潤癌の大多



図2 胆管腫瘍における MUC ムチン発現



A：胆管上皮内異型病変（BilIN）早期段階での MUC5AC 発現

B：IPNB（腸型）での MUC2 発現

C：胆管癌（浸潤癌）での MUC1 発現

数で発現が亢進している。また、BilIN と同様に PanIN の早期段階で MUC5AC 発現が見られる。IPMN では、浸潤部を除くと MUC1 発現はまれである<sup>20)</sup>。反対に MUC2 は腸型 IPMN で発現し、IPMN に合併した粘液癌でも広範な MUC2 発現をみる<sup>20)</sup>。一方、PanIN や通常の膵癌ではほとんど MUC2 は発現しない。

#### おわりに

胆・膵腫瘍の分子病理診断について、幾つ

かの代表的な分子を取り上げて解説した。胆・膵領域の癌は早期発見が困難で、いまだに予後不良な悪性腫瘍の1つである。しかし比較的症例が少ないこともあり、分子標的治療の適用は乳癌や肺癌など他臓器の癌が先行しているのが現状である。今後、分子病理診断を基盤にした分子標的治療の発展が望まれる領域である。

#### 文 献

- 1) Zaret K S, et al: Generation and regeneration of

- cells of the liver and pancreas. *Science* 322 (5907): 1490–1494, 2008.
- 2) Nakanuma Y, et al: Intrahepatic peribiliary glands of humans. II. Pathological spectrum. *J Gastroenterol Hepatol* 9 (1): 80–86, 1994.
  - 3) Strobel O, et al: Pancreatic duct glands are distinct ductal compartments that react to chronic injury and mediate Shh-induced metaplasia. *Gastroenterology* 138 (3): 1166–1177, 2010.
  - 4) WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Bosman F T, et al, eds). IARC, Lyon, 2010.
  - 5) Ishikawa A, et al: Frequent p16<sup>INK4a</sup> inactivation is an early and frequent event of intraductal papillary neoplasm of the liver arising in hepatolithiasis. *Hum Pathol* 35 (12): 1505–1514, 2004.
  - 6) Singh P, et al: Major molecular markers in pancreatic ductal adenocarcinoma and their roles in screening, diagnosis, prognosis, and treatment. *Pancreas* 40 (5): 644–652, 2011.
  - 7) Mooi W J, et al: Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 355 (10): 1037–1046, 2006.
  - 8) Varambally S, et al: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624–629, 2002.
  - 9) Xiao Y: Enhancer of zeste homolog 2: A potential target for tumor therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 474–477, 2011.
  - 10) Sasaki M, et al: Over-expression of polycomb group protein EZH2 relates to decreased expression of p16<sup>INK4a</sup> in cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis. *J Pathol* 215 (2): 175–183, 2008.
  - 11) Yamaguchi J, et al: Papillary hyperplasia of the gallbladder in pancreaticobiliary maljunction represents a senescence-related lesion induced by lysolecithin. *Lab Invest* 89 (9): 1018–1031, 2009.
  - 12) Ougolkov A V, et al: Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res* 14 (21): 6790–6796, 2008.
  - 13) Nakahara O, et al: Carcinogenesis of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Loss of MicroRNA-101 Promotes Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2. *Ann Surg Oncol* 2011. (Epub ahead of print)
  - 14) Momoi H, et al: Microsatellite instability and alternative genetic pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 35 (2): 235–244, 2001.
  - 15) Lubner S J, et al: Report of a multicenter phase II trial testing a combination of biweekly bevacizumab and daily erlotinib in patients with unresectable biliary cancer: A phase II Consortium study. *J Clin Oncol* 28: 3491–3497, 2010.
  - 16) Sasaki M, et al: 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.
  - 17) Sasaki M, et al: Expression of apomucins in the intrahepatic biliary tree in hepatolithiasis differs from that in normal liver and extrahepatic biliary obstruction. *Hepatology* 27 (1): 54–61, 1998.
  - 18) Shibahara H, et al: MUC4 is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma—mass forming type. *Hepatology* 39 (1): 220–229, 2004.
  - 19) Sasaki M, et al: Characterization of apomucin expression in intrahepatic cholangiocarcinomas and their precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hepatology* 24 (5): 1074–1078, 1996.
  - 20) Yonezawa S, et al: Significance of mucin expression in pancreatobiliary neoplasms. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 17 (2): 108–124, 2010.



---

Molecular Pathological Diagnosis in Biliary and Pancreatic Tumours

Motoko Sasaki, Yasuni Nakanuma

Department of Human Pathology, Kanazawa University Graduate School of Medicine