

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 高橋 智昭

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器・腫瘍外科学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	消化器内科学	教授	前田 慎
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	泌尿器科学	准教授	中井川 昇
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	生化学	講師	仙石 徹

Significance of HMGA2 expression as independent poor prognostic marker in perihilar and distal cholangiocarcinoma resected with curative intent

肝門部周囲胆管癌，遠位胆管癌における HMGA2 発現の予後予測因子としての意義

1. 序論

肝外胆管癌は予後不良な悪性腫瘍の一つであり，その主占拠部位により肝門部周囲胆管癌，遠位胆管癌に分類される．外科的切除が長期生存を期待できる唯一の治療法であるが，再発率は高く，治癒切除が得られた症例であっても 5 年生存率は肝門部周囲胆管癌が 25-40%(DeOliveira et al., 2007; Dinant et al., 2006; Madariaga et al., 1998; Miyazaki et al., 1998; Nagino et al., 1998; Nishio, Nagino, & Nimura, 2005), 遠位胆管癌は 27-44%(DeOliveira et al., 2007; Yoshida et al., 2002)と予後不良である．上皮間葉転換(Epithelial mesenchymal transition: EMT)は上皮系細胞から間葉系細胞への形態変化を示す過程であり胎生期の臓器発生において重要な役割を果たすが悪性腫瘍においてはその浸潤能力，転移能力の獲得に進展に関与する(Kalluri & Weinberg, 2009)．High-mobility group AT-hook 2(HMGA2)は，様々な悪性腫瘍において EMT を介して増殖・分化に関わり，予後不良因子として報告されている(Zhang, Mo, & Wang, 2019)．本研究では肝外胆管癌に分類される肝門部周囲胆管癌，遠位胆管癌における HMGA2 蛋白発現と臨床因子との関連を比較検討した．

2. 実験材料と方法

教室で 2009 年 1 月から 2016 年 12 月までに術前治療を施行せずに根治切除を企図して外科切除を行い，組織型が腺癌であった，肝門部周囲胆管癌 41 例と遠位胆管癌 39 例を対象とした．対象症例の切除標本ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学染色で HMGA2 蛋白の発現を評価した．HMGA2 の発現と臨床病理学的因子や予後との関連を統計学的に解析，検討した．

3. 結果

HMGA2 蛋白は一部の症例で腫瘍細胞の核濃染として発現を認めた．その発現量を 1 視野内における発現割合に応じて 4 段階に群分けを行い，発現割合の多い 2 群を HMGA2 陽性，少ない 2 群を HMGA2 陰性とし，2 群に群分けを行った．HMGA2 発現陽性率は，肝門部周囲胆管癌，遠位胆管癌それぞれで 51%と 41%であった．HMGA2 陽性群，陰性群の臨床病理学的因子を比較すると，肝門部周囲胆管癌では HMGA2 陽性群で血管侵襲($P=0.020$)，神経侵襲($P=0.048$)が有意に多く，遠位胆管癌では低分化腺癌が HMGA2 陽性群で有意に高率であった

($P=0.013$). 生存分析では, HMGA2 陽性群は陰性群と比較し, 全生存期間で肝門部周囲胆管癌($P=0.02$), 遠位胆管癌($P=0.0008$)いずれのサブタイプにおいても有意に予後不良であった. Cox 回帰比例ハザード分析では, 肝門部周囲胆管癌で HMGA2 陽性($P=0.015$)とリンパ節転移陽性($P=0.006$), 低分化腺癌($P=0.001$), リンパ管浸潤($P=0.006$), 血管浸潤($P=0.004$)が単変量解析で有意な予後不良因子であり, 多変量解析では, HMGA2 陽性($P=0.003$)と低分化腺癌($P<0.001$)が独立した予後規定因子であった. 遠位胆管癌では HMGA2 陽性($P=0.003$)とリンパ節転移陽性($P<0.001$), 低分化腺癌($P=0.024$)が単変量解析で有意な予後不良因子であり, 多変量解析では HMGA2 陽性($P=0.012$)とリンパ節転移陽性($P=0.017$)が独立した予後規定因子であった.

4. 考察

本研究の結果から, 肝門部周囲胆管癌, 遠位胆管癌には HMGA2 を強く発現しているサブタイプが存在し, それらの症例は発現のない症例と比較し有意に予後不良であることが明らかになった. HMGA2 の発現は他の悪性腫瘍においてリンパ節転移や遠隔転移, 血管侵襲, リンパ管侵襲, 神経侵襲, 腫瘍の悪性度と相関が見られることが報告されており, 本研究でも肝門部周囲胆管癌で血管侵襲と神経侵襲, 遠位胆管癌において腫瘍の悪性度と相関が認められ, HMGA2 の発現が腫瘍の悪性度を反映する因子であることが示唆された. HMGA2 は EMT に様々なパスウェイを介して重要な役割を果たしており, その関連パスウェイとして TGF β パスウェイや Wnt/ β カテニンパスウェイなどが関与していることが報告されている. また micro RNA である let7 ファミリーが HMGA2 の発現を制御することも報告されている. HMGA2 発現は予後予測因子に有用なバイオマーカーであり, 術後の治療方針の決定に有用である可能性が示唆された. また, HMGA2 さらには HMGA2 の LIN28, let-7 による調節機構は新規治療薬開発のターゲットとして有用である可能性がある

審査にあたり, 以上の論文内容とともに, 申請者が在学中に行ない, 本学位論文執筆に至る過程にも関係する, “胆管癌, 膵癌の発生部位に応じた分類と治療プロトコル開発のためのバイオマーカー探索“における CAGE 法による遺伝子解析結果などについて説明がなされた後, 以下の質疑応答が行われた.

まず中井川副査より以下の論評と質問がなされた.

- 1) 肝内胆管癌, 肝外胆管癌, 膵癌の CAGE 法による解析で分子生物学的には解剖学的分類通りに分類されたのか, もしくは解剖学的分類では異なるものが混在するサブタイプが存在したか
- 2) 上皮間葉転換に関与する因子である HMGA2 について実験を行なっているが, 上皮間葉転換の有無を評価するために, 上皮系マーカーや間葉系マーカーの発現評価は行なっている

のか。

- 3) 術後化学療法の効果に関する解析では HMGA2 陽性群、陰性群いずれでも効果がないとの結果となっているが、今回の症例全体で術後化学療法の効果は示されているか。

これらの論評、質問に対して以下の回答を得た。

- 1) CAGE 法による解析の結果ではほぼ解剖学的に分類された。しかし、肝外胆管癌の遠位胆管癌は、同じ肝外胆管癌の肝門部周囲胆管癌と同一のクラスターではなく、膵癌と同じクラスターに分類された。
- 2) 本研究では、遺伝子解析データから同定したマーカー候補として HMGA2 に着目し検証を行なったため、現在はまだ上皮系マーカーや間葉系マーカーの評価を行っていない。今後研究を進めていく上でその評価を検討している。
- 3) 本研究の症例全体では術後化学療法の有効性は示されていない。HMGA2 陰性群に症例を限れば術後化学療法の効果を示すことができれば、HMGA2 陽性群における上皮間葉転換による化学療法抵抗性の可能性を示唆する結果になり得ると考え解析を行なったが期待する結果は得られなかった。

次に、仙石副査より以下の論評と質問がなされた。

- 1) 今回解析した RNA-seq のデータでは、上皮間葉転換を示唆するデータが示されているか。
- 2) 他の HMGA 群の遺伝子は予後に関係しないのか。また、RNA-seq データでの発現はどうか。
- 3) HMGA2 が関与し上皮間葉転換を引き起こすと言われているパスウェイの中で、肝外胆管癌でどのパスウェイが特に関与しているか明らかになっているか
- 4) HMGA2 をターゲットとした治療薬として、有効な低分子や酵素などは開発されているか。

これらの論評、質問に対して以下の回答を得た。

- 1) RNA-seq データで、上皮系マーカーの減少や間葉系マーカーの上昇は、予後不良な群で認められる所見ではあるが、いずれの群に対しても有意に高発現、低発現であるわけではない。
- 2) HMGA1 も既報では他の癌腫で予後不良因子として報告されている。今回解析したデータでは予後不良群における HMGA1 の発現は有意なものではなかった。
- 3) 肝外胆管癌で特に関与が示されているパスウェイはない。今後の研究で、上皮間葉転換の有無とともに、各パスウェイでの発現因子などを評価し検証する必要があると思われる。
- 4) HMGA2 をターゲットとした低分子治療薬や酵素など実臨床で使用できるものはない。これまでの報告で、RNA 干渉や合成 RNA などでの治療効果の有効性を示す報告がある。

最後に前田主査より以下の論評と質問がなされた。

- 1) HMGA2 の機能はどのような機能か。正常細胞で発現しているか。
- 2) 胆管癌の HMGA2 の発現異常はどの遺伝子異常で起きているか解明されているか。
- 3) 本研究の結果を踏まえ、肝外胆管癌、肝内胆管癌、膵癌について今後治療方針を変更する必要性があると思われるか。
- 4) 原発巣と転移巣で HMGA2 の発現を評価した症例はあるか。
- 5) HMGA2 の発現は癌の進行によって発現するのか。もしくは発癌時から発現しているのか。

これらの論評、質問に対して以下の回答を得た。

- 1) HMGA2 はそれ自体に転写活性はないが、標的遺伝子の特定配列に結合してクロマチン構造を変化させて他の転写因子を含む様々な遺伝子発現を調節することで標的遺伝子の転写を制御する。成人正常細胞では一般的には発現しないが、生殖細胞では一部発現が見られる。
- 2) 胆管癌の HMGA2 の発現異常において特定の遺伝子変異は解明されていない。HMGA2 の Let-7 結合部位発現異常や、Let-7 の発現異常の他、LIN28 も HMGA2 と同様に正常細胞では発現しない遺伝子であり、発現異常の原因として推測され、それらの解明が治療標的薬の開発に必要と思われる。
- 3) 現在でも肝外胆管癌と肝内胆管癌は同じレジメンが適応されている。本研究で肝外胆管癌は肝内胆管癌よりも膵癌に近い特徴を持つことが推察され、肝外胆管癌と肝内胆管癌は別の悪性腫瘍として治療法の開発や臨床試験が行われるべきであると考えている。
- 4) 本研究では原発巣のみで HMGA2 の発現を評価しており、今後転移巣での発現評価、比較は必要であると思われる。
- 5) HMGA2 の発現は発癌時から認められる所見であると考えられる。その根拠として本研究でも進行度による発現頻度の変化が明らかでないこと、これまでの HMGA2 の報告で、前癌病変でも発現が見られることが挙げられる。

以上のように各質問に対して回答を得た。審査員による協議の結果、本研究は博士（医学）の学位論文に値するものと判定された。