

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

胆と膵 (2004.01) 25巻1号:27～32.

【膵胆管合流異常 残された問題】

胆嚢粘膜過形成の発生時期と発癌に関する分子生物学的考察

丹野誠志, 中野靖弘, 小泉一也, 小山内学, 柳川伸幸, 藤井常志, 奥村利勝, 小原 剛, 高後 裕

胆嚢粘膜過形成の発生時期と発癌に関する分子生物学的考察\*

丹野誠志<sup>1)</sup>、中野靖弘<sup>2)</sup>、小泉一也<sup>2)</sup>、小山内学<sup>2)</sup>、柳川伸幸<sup>3)</sup>、藤井常志<sup>4)</sup>、奥村利勝<sup>1)</sup>、小原 剛<sup>5)</sup>、高後 裕<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>旭川医科大学 総合診療部(〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1)、<sup>2)</sup>同 第3内科、<sup>3)</sup>旭川厚生病院消化器科、<sup>4)</sup>市立旭川病院消化器科、<sup>5)</sup>美瑛町立病院内科

Satoshi Tanno, Yasuhiro Nakano, Kazuya Koizumi, Manabu Osanai, Nobuyuki Yanagawa, Tsuneshi Fujii, Toshikatsu Okumura, Takeshi Obara, Yutaka Kohgo

Key Words: 膝胆管合流異常、胆嚢粘膜過形成、胆嚢癌、遺伝子異常

\*Molecular changes in epithelial hyperplasia of the gallbladder with pancreaticobiliary maljunction

要 約

胆嚢癌高危険因子である合流異常において、胆嚢粘膜過形成の発生時期と胆嚢癌発生への関与について明らかにするため、小児例と成人例の合流異常を対象に分子生物学的変化を検討した。胆嚢粘膜過形成を小児例 64%(7/11)、成人例 79%(38/48)に認めた。小児・成人例のいずれにおいても胆嚢粘膜過形成の細胞増殖能は正常胆嚢粘膜に比べて有意に高かった。K-ras 遺伝子変異は小児例では検出されず、成人例の胆嚢癌周囲の高度過形成で認められた。p53 蛋白過剰発現は、胆嚢癌で認められたが、小児・成人例の胆嚢粘膜過形成では検出されなかった。合流異常では細胞増殖能の亢進した胆嚢粘膜過形成が出生時から高率に存在し、逆流膵液と胆汁との混和によって生成された変異原物質に数十年間持続的に曝され、遺伝子変化を起こしやすい病態を生じることによって、胆嚢癌発生に深く関与すると考えられる。

はじめに

胆嚢癌の高危険因子である合流異常では、胆嚢癌発生過程に関わる病理組織学的変化や遺伝子変化の研究が近年急速に進んだ。特に、小児例を含む幅広い年齢の合流異常を対象とした胆嚢病変の解析は、出生時からの病理学的変化や分子生物学的変化の解明に寄与すると考えられる。本稿では、合流異常で注目されている胆嚢粘膜過形成の発生時期および胆嚢癌発生過程における役割を明らかにするため、小児例と成人例の合流異常について、著者らの成績を中心に、最近の知見を交えながら概説する。

I. 胆嚢上皮の病理組織学的変化

合流異常における胆嚢癌の発生経路については、当初、合流異常を合併していない胆嚢癌の発生経路と同様に、化生性変化の重要性が報告され、metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence<sup>1)</sup>が考えられていた。しかし、その後の検討で、化生性変化は加齢とともに増加し、男性に比べて女性に多い病理組織学的変化であること<sup>2)</sup>、合流異常における頻度は合流異常非合併胆嚢より低いこと<sup>3-6)</sup>などが明らかにされた。このように、従来提唱されていた化生性変化を含む胆嚢癌発生経路は合流異常においては考えにくい。

近年の研究によって、合流異常の胆嚢上皮には過形成性変化が多く認められること、特に胆嚢癌を合併しやすい胆管非拡張型

に高率に認められることが報告され、合流異常の胆嚢癌発生過程における胆嚢粘膜過形成の関与が注目されている。

II. 合流異常と胆嚢粘膜過形成

原発性の胆嚢粘膜過形成はElfvigら<sup>7)</sup>によってはじめて報告された稀な疾患であり、合流異常を合併しない切除胆嚢では0.4-5.9%に認められる。ところが、五十嵐<sup>8)</sup>やYamamotoら<sup>9)</sup>は、合流異常合併胆嚢において、それぞれ 38.5%、87%と極めて高率に胆嚢粘膜過形成を認めることを報告した。その後も、胆嚢粘膜過形成が合流異常では高率に認められることが諸家によって報告され<sup>3, 4, 5, 8, 10)</sup>、現在では胆嚢粘膜過形成が合流異常合併胆嚢における特徴的な病理組織学的変化と考えられている。

合流異常には、胆管拡張を伴う「胆管拡張型」と、胆管拡張のない「胆管非拡張型」があり、後者において胆嚢癌発生頻度の高いことがよく知られている。筆者らは、胆嚢粘膜過形成が非拡張型に高率に認められること、さらに、胆管非拡張型では高度な過形成性変化が認められることをこれまで報告した<sup>11)</sup>。胆嚢癌発生率の高い胆管非拡張型で高率に存在することは、胆嚢粘膜過形成が合流異常での胆嚢癌発生に深く関与することを示唆している。

胆嚢癌発生過程における胆嚢粘膜過形成の役割をさらに明らかにするには、小児例を含む幅広い年齢の合流異常を対象とした研究が重要である。Tokiwaらは、小児合流異常例について検討し、28例中14例(50%)に胆嚢粘膜過形成を認めたと報告した<sup>6)</sup>。筆者らは、小児合流異常11例(生後15日~14歳、男児3例、女児8例)について検討し、胆嚢粘膜過形成を7例(64%)に認めた<sup>12)</sup>。このことは、胆嚢粘膜過形成がすでに小児期から成人とほぼ同等の頻度で存在することを示唆している。すなわち、合流異常では胆嚢粘膜過形成が小児期からすでに高率に存在し、数十年間にわたって逆流膵液による慢性持続的な刺激を受けていると考えられる。

III. 胆嚢粘膜過形成の発生機序

胆嚢粘膜過形成はどのような発生機序で出現するのであろうか? Tokiwaら<sup>6)</sup>は、合流異常条件下では胆嚢粘膜からある種の増殖刺激物質が産生されて胆嚢粘膜過形成を引き起こすのではないかと推測している。Kanekoら<sup>5)</sup>は、免疫染色法によって合流異常合併胆嚢粘膜におけるtransforming growth factor  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ )の過剰発現を明らかにし、autocrine/paracrine機序によるTGF  $\alpha$ の関与を発生機序として推測している。

一方、Celoriaら<sup>13)</sup>は、胆嚢内圧上昇や胆汁中コレステロール濃度の増加が胆嚢粘膜過形成の発生に関与すると報告している。前者の「胆嚢内圧上昇説」は、合流異常における胆嚢粘膜過形成の発生機序を説明する上で以下の点で合理的であると考えられる。第1に、胆嚢粘膜過形成は胆嚢内に逆流膵液が停滞し、胆嚢内圧が上昇しやすい胆管非拡張型に多いこと。第2に、逆流膵液による慢性刺激が原因であれば、加齢によって胆嚢粘膜過形成の頻度は増加するはずであるが、小児期から成人と同程度の頻度で出現していること。第3に、胆嚢粘膜過形成は合流異常を伴わない胆嚢でも認められることである。

合流異常における胆嚢粘膜過形成の発生機序を一元的に説明しうる確立した説はいまだないが、Celoriaら<sup>13)</sup>の「胆嚢内圧上昇説」については今後さらに検討が必要と思われる。

IV. 胆嚢粘膜過形成の細胞増殖能

胆嚢癌発生過程における胆嚢粘膜過形成の役割を考える上で、その細胞増殖能がどうなっているのかはきわめて重要である。高い細胞増殖能を有する細胞では細胞回転が亢進しているため、遺伝子変異を起こしやすく、より癌化をきたしやすいと考えられる。

筆者らは、Ki-67染色(Ki-67 labeling index, Ki-67 LI)を用い

て、成人例の胆嚢粘膜過形成について検討し、特に過形成性変化の高度な上皮では軽度の過形成よりKi-67 LIが高いことを報告した<sup>11)</sup>。さらに、小児例でも胆嚢粘膜過形成では合流異常非合併胆嚢上皮に比べて高いKi-67 LIを示すことを報告した(表1)<sup>12)</sup>。Tokiwaらは、小児合流異常例の胆嚢粘膜過形成において、高度過形成では軽度過形成に比べ有意に高い細胞増殖能を示すことを報告した<sup>6)</sup>。

これらの報告は、胆嚢粘膜過形成が成人と同様に小児期からすでに高い細胞増殖能を伴うことを示しており、細胞増殖能亢進が数十年間の長期にわたって胆嚢粘膜過形成では持続していることを意味している。細胞増殖能亢進を伴う胆嚢粘膜過形成は、DNAダメージを受けやすく、きわめて遺伝子異常を起こしやすい状態にあると推測される<sup>14)</sup>。このように、胆嚢粘膜過形成は高い細胞増殖能を小児期より長期にわたって保ちながら、合流異常の胆嚢癌発生過程に重要な役割を果たしていると考えられる。

## V. 胆嚢粘膜過形成の遺伝子異常

癌の発生過程には多数の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が多段階的に関与する。多くの癌で癌遺伝子 *K-ras* と癌抑制遺伝子 *p53* の異常が報告されており、合流異常における胆嚢癌発生過程、特に胆嚢粘膜過形成においても研究されている。また、近年、癌抑制遺伝子 *DPC-4* (*Smad-4*)の異常やマイクロサテライト不安定性(MSI)、*COX-2* 蛋白発現についても検討されている。

### 1) *K-ras* 遺伝子

散発性胆嚢癌では、40-84%に*K-ras*遺伝子変異が認められる<sup>15)</sup>。Hanadaら<sup>16)</sup>は、Stage Iの合流異常合併胆嚢癌では、50%に*K-ras* codon 12 の点突然変異を認め、合流異常非合併胆嚢癌(6%)に比べて高率であることを報告した。

また、胆嚢粘膜過形成を含む非癌部における*K-ras*遺伝子変異について、Tomonoら<sup>17)</sup>は合流異常合併胆嚢癌の57%、癌近傍の異型上皮では60%、Matsubaraら<sup>18)</sup>は非癌部の60%に*K-ras*遺伝子変異を認めると報告した。Iwaseら<sup>10)</sup>は、胆嚢粘膜過形成の36%に*K-ras*変異を検出したと報告した。一方、Itoiら<sup>19)</sup>は合流異常合併胆嚢癌の非癌部(炎症、化生、過形成粘膜を含む)には*K-ras*変異を認めないと報告している。

筆者らの検討では、小児合流異常例の胆嚢粘膜過形成<sup>12)</sup>および癌非合併例の胆嚢粘膜過形成には*K-ras*変異を認めなかったが、癌周囲の胆嚢粘膜過形成の13%に*K-ras*変異を検出した(表2)。興味深いことに、胆嚢粘膜過形成のgrade別検討では、軽度過形成では*K-ras*変異を認めなかったが、高度過形成に認めた<sup>11)</sup>。この結果は、合流異常の胆嚢癌発生過程では、胆嚢粘膜過形成から*K-ras*変異が関与することを示している。

合流異常の胆嚢癌発生経路を推測するために、*K-ras*遺伝子の変異型に注目した研究も報告されている。Hanadaら<sup>4)</sup>は、合流異常例における同一胆嚢内の粘膜過形成、異型上皮、癌部では同じ*K-ras* 遺伝子の変異型を示すことから、*hyperplasia-dysplasia-carcinoma* sequenceが考えられると報告している。Iwaseら<sup>10)</sup>は、症例数は少ないながら腺腫でも*K-ras*変異を認めると報告し、*hyperplasia-adenoma-carcinoma* sequenceも考えられると指摘した。なお、化生性上皮の役割についてはいまだ不明な点が多く、*metaplasia*を介する癌発生経路には否定的な報告もあることから<sup>3, 4)</sup>、今後さらに検討が必要である。

### 2) *p53* 遺伝子

*p53* 蛋白の過剰発現は、散発性胆嚢癌の40%-92%に認められる<sup>14)</sup>。また、癌浸潤部以外の異型上皮や上皮内癌にも*p53* 蛋白発現がみられるが、化生性上皮では*p53* 蛋白発現を認めないことが報告されている<sup>14, 20)</sup>。Hanadaら<sup>16)</sup>は、合流異常合併胆嚢癌(Stage I)の67%、合流異常非合併胆嚢癌の65%に*p53* 蛋白過剰発現を認めると報告した。

胆嚢粘膜過形成などの非癌部胆嚢粘膜における*p53* 蛋白発現について、筆者らは、進行胆嚢癌では*p53* 蛋白発現を認めたが、胆嚢粘膜過形成部では認められないことを報告した(表3)<sup>11)</sup>。一方、Matsubaraらは、胆嚢癌部で80.0%、非癌部(化生上皮、過形成、炎症性上皮を含む)で27.8%に*p53* 蛋白発現を認めると報告し<sup>21)</sup>、さらに、*p53* 遺伝子エクソン5-8についてPCR-SSCP法を用いて検討し、癌部では全体で75%、非癌部では35.7%に*p53* 遺伝子異常を検出したと報告した。

*p53* 遺伝子異常は合流異常の胆嚢癌発生過程の後期に関与すると考えられるが、今後さらに検討が必要である。

### 3) *DPC-4* 遺伝子、マイクロサテライト不安定性(MSI)、*COX-2*

*DPC-4* は膵癌で高頻度に遺伝子変化を起こす癌抑制遺伝子であるが、胆道癌での異常も近年報告されている。Shimotakeら<sup>22)</sup>は、小児合流異常35例の胆嚢・胆管上皮を用いて*K-ras*遺伝子と*DPC-4* 遺伝子の異常を検討し、粘膜過形成や化生性変化を伴う5例に*K-ras*変異を認め、そのうち胆管癌を合併した1例に*DPC-4* 遺伝子異常を認めたことから、*DPC-4* 遺伝子異常は癌発生過程の後期に関与するのではないかと報告した。

DNAミスマッチ修復遺伝子の異常によるマイクロサテライト不安定性(MSI)は、家族性非ポリポーシス大腸癌や散発性癌などの発癌・進展への役割が注目されている。Nagaiら<sup>23)</sup>は、合流異常36例を検討し、*K-ras*変異とMSIが胆嚢粘膜過形成(9例)ではそれぞれ33.3%、0%、異型上皮(7例)では28.6%、85.7%、胆嚢癌(25例)では60%、80%に認められ、MSIが胆嚢癌発生過程に重要な役割を担っていると報告している。

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、アラキドン酸カスケードにおける律速酵素であり、2種類のアイソザイムであるCOX-1とCOX-2がある。近年、COX-2発現が発癌や癌の増殖・進展機構に関与することが注目されている。Tsuchidaら<sup>24)</sup>は合流異常30例の胆嚢病変を免疫組織学的に検討し、再生上皮で11.1%、粘膜過形成86.4%、異形性上皮75%、癌部の80%にCOX-2発現を認めたと報告している。Fuminoら<sup>25)</sup>は小児の合流異常31例について検討し、過形成性変化のない13例に比べて胆嚢粘膜過形成18例(58%)では、COX-2発現の染色スコアが有意に高いことを報告した。このように、COX-2過剰発現は小児の胆嚢粘膜過形成から亢進しており、胆嚢癌発生過程に重要な役割を果たしている可能性がある。

## VI. 合流異常における胆嚢の多段階発癌過程

合流異常の胆嚢癌発生過程には、*metaplasia-dysplasia-carcinoma* sequence と *hyperplasia-dysplasia-carcinoma* sequence の2つの発生経路が考えられる。しかし、本稿で述べた近年の検討結果は、後者、すなわち胆嚢粘膜過形成が合流異常における胆嚢癌の発生に深く関与することを示している。

合流異常における胆嚢癌発生過程では、細胞増殖能の亢進した胆嚢粘膜過形成が小児期から数十年間にわたって存在し、逆流膵液と胆汁との混和によって生成された変異原物質などに曝されることによって、遺伝子変化を起こし腫瘍性変化を生じるのではないかと推察される(図)。

おわりに

合流異常における胆嚢癌発生経路として、*hyperplasia-dysplasia-carcinoma* sequence 説を支持する成果が集積されている。今後、小児例、成人例を含む幅広い年齢の合流異常を対象とすることによって、発癌に関与する多段階的な遺伝子変化をさらに解析する必要がある。また、マイクロアレイなどの技術による網羅的な解析によって、将来、発癌リスクの評価も可能となることが期待される。

文献

1. Yamagiwa, H. Tomiyama, H. Intestinal metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the gallbladder. *Acta Pathol Jpn*, 36, 989-997, 1986.
2. Kozuka, S., Tsubone, N., Yasui, A., et al. Relation of adenoma to carcinoma in the gallbladder. *Cancer*, 50, 2226-2234, 1982.
3. 高木 進. 膵・胆管合流異常症例の臨床的ならびに胆嚢粘膜の病理組織学的研究. *東京医科大学雑誌* 47, p3-17, 1989.
4. Hanada, K., Itoh, M., Fujii, K., et al. Pathology and cellular kinetics of gallbladder with an anomalous junction of the pancreaticobiliary duct. *Am J Gastroenterol*, 91, 1007-1011, 1996.
5. Kaneko, K., Ando, H., Ito, T., Kasai, K., et al. Increased cell proliferation and transforming growth factor- $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) in the gall-bladder epithelium of patients with pancreaticobiliary maljunction. *Pathol Int*, 46, 253-260, 1996.
6. Tokiwa, K. and Iwai, N. Early mucosal changes of the gallbladder in patients with anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct. *Gastroenterology*, 110, 1614-1618, 1996.
7. Elfving, G., Lehtonen, T., Teir, H. Clinical significance of primary hyperplasia of gallbladder mucosa. *Ann Surg*, 165, 61-69, 1967.
8. 五十嵐 裕章. 膵・胆管合流異常における胆嚢壁の特徴的变化に関する研究 画像および病理組織学的所見について. *胆道* 5:517-525, 1991.
9. Yamamoto, M., Nakajo, S., Tahara, E., et al. Mucosal changes of the gallbladder in anomalous union with the pancreatobiliary duct system. *Pathol Res Pract*, 187, 241-246, 1991.
10. Iwase, T., Nakazawa, S., Yamao, K., et al. Ras gene point mutations in gallbladder lesions associated with anomalous connection of pancreatobiliary ducts. *Hepatogastroenterology*, 44, 1457-1462, 1997.
11. Tanno, S., Obara, T., Fujii, T., et al. Proliferative potential and K-ras mutation in epithelial hyperplasia of the gallbladder in patients with anomalous pancreaticobiliary ductal union. *Cancer*, 83, 267-275, 1998.
12. Tanno, S., Obara, T., Fujii, T., et al. Epithelial hyperplasia of the gallbladder in children with anomalous pancreaticobiliary ductal union. *Hepatogastroenterology*, 46, 3068-3073, 1999.
13. Celoria, G. C., Rodrigues Otero, J. C., Proske, S. A., et al. Papillary hyperplasia and cholesterosis of the gallbladder. *Medicina (B Aires)*, 54, 31-34, 1994.
14. Kamel, D., Paakko, P., Nuorva, K., et al. p53 and c-erbB-2 protein expression in adenocarcinomas and epithelial dysplasias of the gall bladder. *J Pathol*, 170, 67-72, 1993.
15. Ohashi, K., Tstsumi, M., Nakajima, Y., et al. Ki-ras point mutations and proliferation activity in biliary tract carcinomas. *Br J Cancer*, 74, 930-935, 1996.
16. Hanada, K., Itoh, M., Fujii, K., et al. K-ras and p53 mutations in stage I gallbladder carcinoma with an anomalous junction of the pancreaticobiliary duct. *Cancer*, 77, 452-458, 1996.
17. Tomono, H., Nimura, Y., Aono, K., et al. Point mutations of the c-Ki-ras gene in carcinoma and atypical epithelium associated with congenital biliary dilation. *Am J Gastroenterol*, 91, 1211-1214, 1996.
18. Matsubara, T., Sakurai, Y., Sasayama, Y., et al. K-ras point mutations in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Cancer*, 77, 1752-1757, 1996.
19. Itoi, T., Watanabe, H., Yoshikawa, T., et al. K-ras mutations in gallbladder carcinomas in patients with anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct. *Acta Med Biol*, 44, 71-77, 1996.
20. Wistuba, II, Gazdar, A. F., Roa, I., et al. p53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 27, 360-365, 1996.
21. Matsubara, T., Funabiki, T., Jinno, O., et al. p53 gene mutations and overexpression of p53 product in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 6, 286-293, 1999.
22. Shimotake, T., Aoi, S., Tomiyama, H., et al. DPC-4 (Smad-4) and K-ras gene mutations in biliary tract epithelium in children with anomalous pancreaticobiliary ductal union. *J Pediatr Surg*, 38, 694-697, 2003.
23. Nagai, M., Watanabe, M., Iwase, T., et al. Clinical and genetic analysis of noncancerous and cancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *World J Surg*, 26, 91-98, 2002.
24. Tsuchida, A., Nagakawa, Y., Kasuya, K., et al. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in pancreaticobiliary maljunction. *Oncol Rep*, 10, 339-343, 2003.
25. Fumino, S., Tokiwa, K., Ono, S., et al. Cyclooxygenase-2 expression in the gallbladder of patients with anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct. *J Pediatr Surg*, 38, 585-589, 2003.