

## 2025 年度 医療技術研究開発助成 成果報告書 [萌芽・探索型]

所 属 岐阜大学 第一内科  
松波総合病院 消化器内科

氏 名 奥野 充

### [研究テーマ]

胆道癌における個別化医療を可能とする包括的癌ゲノムプロファイリング用検査の開発

### [分野]

- ① 日常生活における健康無関心層の疾病予防、重症化予防に資する医療機器
- ② 予後改善につながる診断の一層の早期化に資する医療機器
- ③ 臨床的なアウトカムの最大化に資する個別化医療に向けた診断と治療が一体化した医療機器
- ④ 高齢者等の身体機能の補完・向上に関する医療機器
- ⑤ 医療従事者の業務の効率化・負担軽減に資する医療機器
- ⑥ 次世代の医療機器開発・生産に資する要素技術・部品・部材の開発、製造基盤

### 1. 背景と目的

本研究の目的は、胆道癌への包括的がんゲノムプロファイリング(Comprehensive Genome Profile: CGP)検査を胆汁で行えるよう、予後改善につながる診断の早期化に関する開発を行うことである。

胆道癌症例の多くは、手術困難な状態で発見されており、抗癌剤治療が必要となる。しかし、有効な治療薬は未だ少なく、わが国の胆道癌の5年生存率は28.6%と極めて予後不良である。CGP検査は、癌遺伝子情報を解析し、癌遺伝子情報に合った治療薬(分子標的薬・免疫チェックポイント阻害剤等)を検索できるが、大量の癌細胞が必要である。

胆道癌では組織が硬く癌細胞も粗なため、癌細胞収集が困難であり、多くの胆道癌症例でCGP検査が行えていない。胆管組織以外の病理サンプルを用いたCGP検査用の新たな検体採取・作製法が必要である。

胆道癌の診断・治療のため内視鏡処置が行われ、この際多量の胆汁が容易に回収できる。我々は以前に多量の余剰胆汁を遠心分離することで胆汁セルブロック(cell block: CB)検体を作製でき、1スライド当たり約70個以上の癌細胞数を収集できることを報告した。また、胆汁CB検体はホルマリン固定パラフィン包埋標本(FFPE)として保存可能であり、胆道癌診断時に胆汁を採取しておけば、いつでもCGP検査が可能となる。そのため、胆汁CB検体を作製することで、これまで採取困難であった胆道癌細胞採取が容易に採取でき、CB検体がCGP検体として使用できれば予後改善につながられる可能性がある。

しかし、胆汁CB検体で、手術検体と同一の結果が得られるのか、また胆汁CB検体でCGP検査を行うために、必要な条件はあるかについては明確になっていない。本研究では胆道癌同一症例の胆汁CB検体と手術検体のnext-generation sequencing (NGS)検査結果を比較し、CB検体の有用性、CGP検査に必要な条件設定を明らかにすること目的に研究を行った。

### 2. 研究方法・計画

2018年～2024年に悪性胆管狭窄による閉塞性黄疸を来し、内視鏡下胆道ドレナージ術を施

行した症例のうち、胆汁 CB 検体を作製した77症例を対象とし研究を行った。このうち、胆汁CB 検体と手術検体比較が可能であった14症例の胆汁 CB 検体と手術検体の NGS を用いた癌遺伝子評価を行い、以下の2点につき評価した。

- ・CB 検体で手術検体と同等の癌遺伝子評価が可能か、どの程度一致した評価が可能か
- ・CB 検体で NGS 検査(CGP 検査)を行うために必要な条件があるか

上記につき、胆汁 CB 検体から NGS 検査に必要な DNA が抽出できるのか、また抽出した DNA を用いて NGS 検査が行えるのか評価した。また、NGS 検査が行えなかった検体においては、その原因検索を行った。

### 3. 研究成果及び考察

NGS 検査を行うため、まず両検体より DNA 抽出を行った。図1に示すように、DNA 抽出量は胆汁 CB 検体で有意に少ない結果であったが(CB 検体(166.6 [75.6-5504.5] ng) / 手術検体(4981.2 [1105.1-27719.1] ng) (P<0.01) 図1A)、DNA の品質を確認したところ、胆汁 CB 検体から手術検体と同等の品質の DNA を抽出することが可能であった(吸光度分析 260 nm/280 nm: CB 検体(1.88 [1.67-4.04]) / 手術検体(2.00 [1.84-2.09]) (P=0.18) 図1B)。

本研究助成を使用させて頂き、NGS 検査を施行した。NGS 検査は、3症例を TruSight Oncology 500 にて、残り11症例を Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 にて行った。NGS の成功率は CB 検体で 64%(9/14)、手術検体で 86%(12/14)であった。NGS 検査が行えなかった検体の主な理由は DNA 抽出量不足であった。

NGS read 数は両検体において有意差はなく(CB 検体 1388724 [1075545-95077806] / 手術検体 1414897 [1281373-102191580] (P=0.57) 図 1C)、また Coverage においても両検体に有意差は認めなかった(CB 検体 1150[80-6611] / 手術検体 5826 [25-6889] (P=0.67) 図1D)。

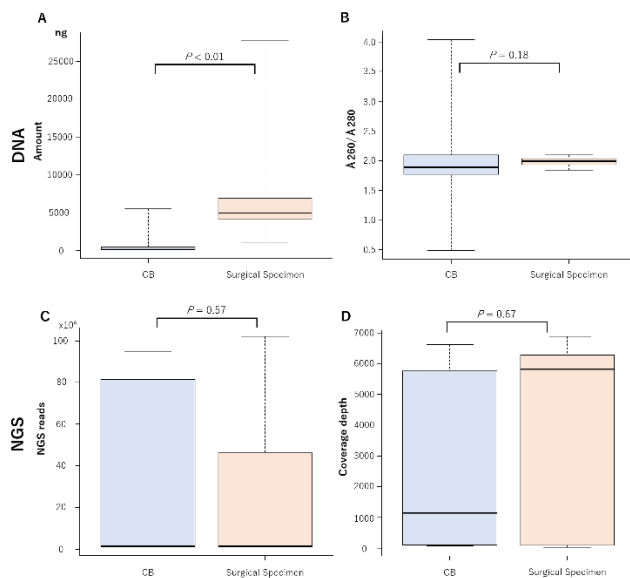


図1 胆汁 CB 検体と手術検体の DNA 抽出・NGS 結果

胆汁 CB 検体・手術検体とも NGS 評価が可能であった症例は8症例であった。この8症例にお

いて、50癌遺伝子の一致率を評価したところ、CB 検体と手術検体は 98-100%一致した結果が得られた(図2A)。また、アミノ酸配列に影響するミスセンスのみを評価した場合でも、同様に高い一致率を認めたことから、胆汁 CB 検体では手術検体とほぼ同一の癌遺伝子評価が行えると考えられた(図 2B)。遺伝子バリエーションの主な理由は Single nucleotide variant (SNV)であり、SNV の変化も概ね一致した結果が得られた(図3)。

50癌遺伝子において、FGFR、EGFR、ERBB 等治療薬につながる癌遺伝子も評価した。一部の検体ではこれら治療につながる遺伝子バリエーションを指摘出来ており、癌遺伝子評価はもちろん、治療薬検索につなげられる可能性が考えられた。

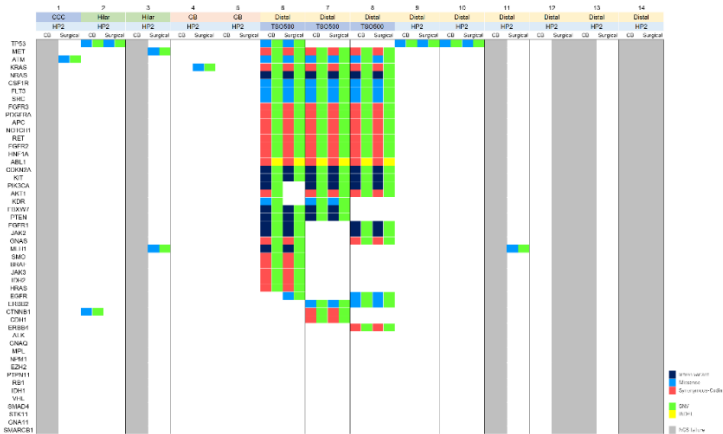


図2A 胆汁 CB 検体と手術検体の50癌遺伝子の一致率評価

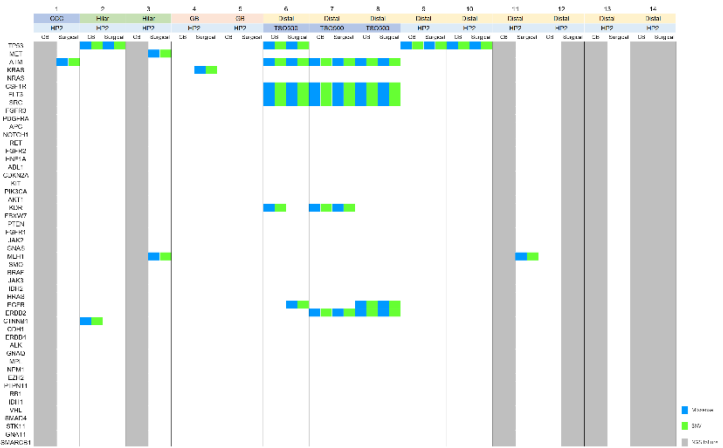


図2B 胆汁 CB 検体と手術検体の50癌遺伝子の一致率評価(ミスセンスのみ)

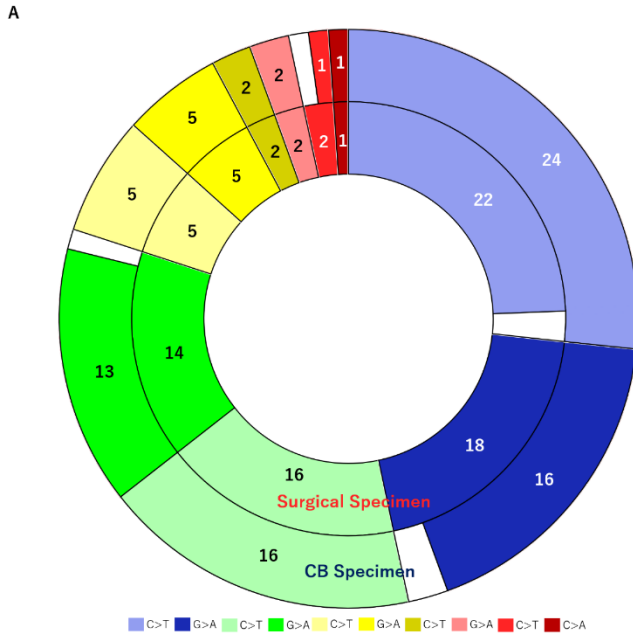


図3 CB 検体と手術検体の SNV 一致率評価

以上のことから、まず「CB 検体で手術検体と同等の癌遺伝子評価が可能か、どの程度一致した評価が可能か」については、CB 検体でも手術検体とほぼ同一の癌遺伝子評価が可能であり、CGP 用検体採取が困難な胆道癌症例において、胆汁 CB 検体を作製することで CGP 検査が行える可能性があると確認された。

一方で、胆汁 CB 検体の NGS 検査の成功率は 64% であり、決して十分な成功率ではなかった。そのため、「CB 検体で NGS 検査(CGP 検査)を行うために必要な条件があるか」につき評価し、CGP 検査に適した胆汁 CB 検体の条件設定を行った。

CB 検体での NGS 不成功理由として、DNA 抽出量の少なさが原因であった。十分な DNA 量を確保できるかは、実際に CB 検体作成後 DNA 抽出を行うまでわからないため、DNA 抽出のためのコストがかかってしまう。そのため、DNA を抽出せずとも十分な DNA 量を採取できる指標を見出す必要があった。

胆汁 CB 検体作製時に、採取した胆汁量および HE 染色スライドを確認することができる。また、HE 染色スライドでは、顕微鏡下にスライド 1 枚当たりに採取した癌細胞数を確認することができる。そのため、採取した胆汁量、またはスライド 1 枚当たりの採取した癌細胞数と、採取した DNA 量に関連があれば、DNA を抽出せずとも、CB 検体作製時に十分な DNA 抽出量が得られるか容易に予想できるため、これらの関連の有無について評価した。

DNA 抽出量と胆汁量、および採取した癌細胞数の関連を評価したところ、「採取した癌細胞数」にのみ正の相関を認めた ( $r=0.89$ ,  $P<0.01$  図 4A-C)。すなわち、採取した癌細胞が増加すれば DNA 抽出量が増え、NGS を行える可能性が高くなると判明した。また、必要最低限の癌細胞数(カットオフ値)を同定することで、検査に適した胆汁 CB 検体の条件が設定できるため、必要細胞数の同定のため ROC 解析を行った。ROC 曲線では、カットオフ値は 30 個以上(感度 89%、特異度 60%、 $AUC=0.77$  図 4E) であり、30 個以上の癌細胞採取例に限った場合、NGS 成功率は 64% →

80%に改善がみられた(図 4D)。

そのため、胆汁 CB 検体作成後、HE 染色にて 1 スライド当たり30個以上の癌細胞が採取できていれば、CGP 検査として使用可能であると考えられた。

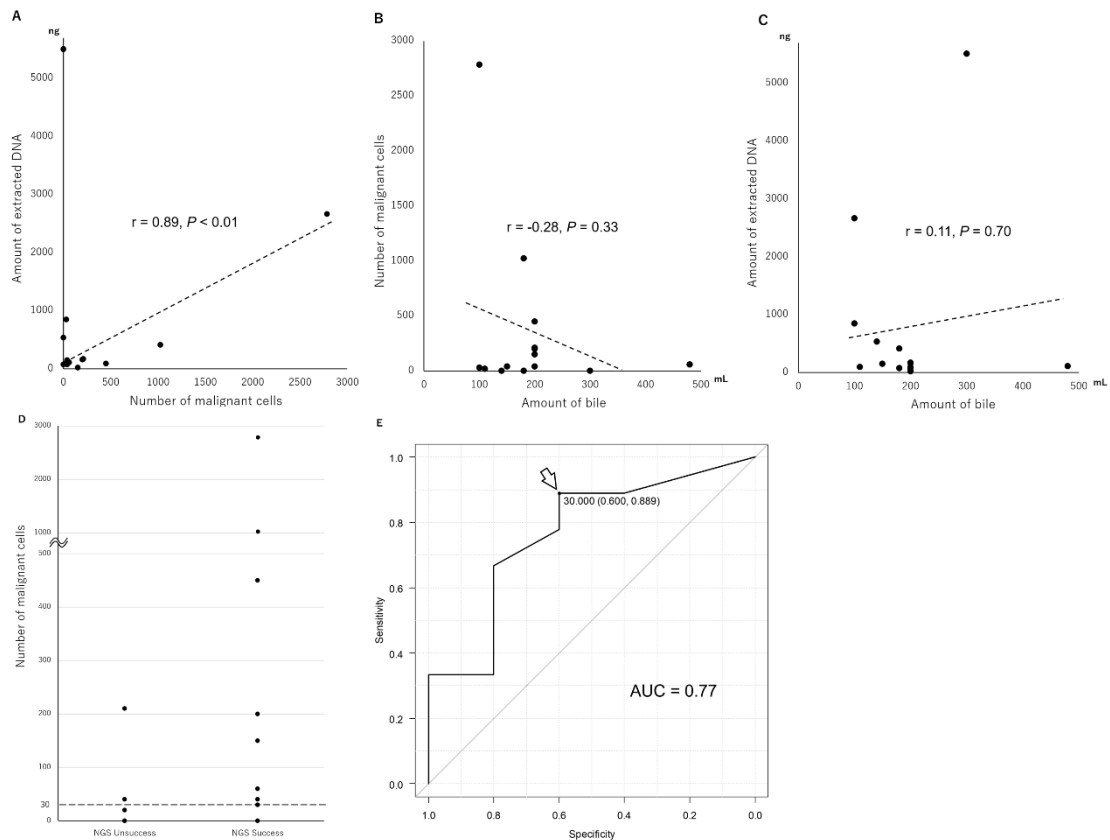


図4A-C DNA抽出量と採取した胆汁量、および癌細胞数の関連、D-E 癌細胞数と NGS 成功率との関連

#### 4. まとめ

本研究では、CGP 検査用の検体採取困難な胆管癌において、胆汁を用いた CB 検体にて手術検体と同等の癌遺伝子評価が可能であり、新たな CGP 検査用検体となりうる可能性を示した。加えて、CB 検体中の癌細胞数が少ないと、DNA 抽出量が低下し、NGS 検査が行えない可能性があり、癌細胞数が 30 個以上採取できている検体が必要であると明らかにした。

実臨床で用いられている CGP 検査を行うにあたり、保険診療で認可されている FoundationOne や NCC オンコパネルなどで検査できるか評価する必要がある。今後、非手術症例の胆汁 CB 検体を使用し、FoundationOne や NCC オンコパネルなどにて追加研究を行う予定である。

#### 5. 倫理面への配慮

本研究では、癌遺伝子情報を取り扱うこととなるため、患者本人の同意および、解析後の情報管理が重要である。

胆汁 CB 検体作製においては、すでに本研究施設において、遺伝情報の取り扱いにおける倫理委員会(申請番号:500, 587)の審査を通過しており、かつ、胆汁 CB 検体作製時に患者本人より同意、および同意書へのサインを得たうえで検体の作製を行っている。また、癌遺伝子検査結果の取り扱いについては、検体番号を匿名化したうえで解析を行い、解析結果も個人が特定できな

いよう外部と接続されないハードディスク上で情報を管理する。そのため、同意が得られた患者の検体のみを用いるため、倫理的な問題は解決されている。

## 6. 研究業績

- I. 胆道癌 CGP 用検体としての胆汁 Cell Block 検体の可能性と検査条件  
奥野充,向井強,清水雅仁 2025 年 10 月 31 日 Japan Digestive Disease Week (JDDW)  
2025 (シンポジウム 統合プログラム 3)
- II. 胆道癌 CGP 検査としての胆汁 Cell Block 検体の有用性:手術標本との比較  
奥野充,向井強,清水雅仁 2026 年 5 月 8 日 第 111 回日本消化器内視鏡学会総会(ワーク  
ショップ(総合 4))にて報告予定

本成果につき現在英論文投稿中である。

### 助成期間終了後の開発構想

今回の研究で、胆汁 CB 検体で手術検体と同一の癌遺伝子を評価できることが判明したが、実臨床で用いるには、保険診療で認可されている FoundationOne や NCC オンコパネルなどで胆汁 CB 検体が検査できるか評価する必要がある。

引き続き、「予後改善につながる診断の一層の早期化に資する医療機器」開発のため、非手術症例の胆汁 CB 検体を使用し、FoundationOne や NCC オンコパネルなどで追加研究を行う計画がある。我々は、現在までに非切除胆道癌の胆汁 CB 検体を約 50 症例分作製・保管しており、今後この検体を用いて研究を行う。

今回の研究より、CB 検体での NGS 検査における検体の条件設定が可能であったが、検査数（症例数）が少なく、統計学的な限界も見られた。そのため、追加研究にて検査精度および CB 検体を用いるための必要条件の見直しを行う予定である。追加研究の予定・成果報告の予定については、現在保管中の約 50 症例分の検体にてCGP検査を行う段階にあり、2年以内に追加研究を完了できる見込みである。追加研究の成果は、論文や国際学会での発表の上、3年以内に実臨床に応用できる様、進める予定である。

また、本方法が確立できれば、液体の検体(尿等)を使用したセルブロック検体でも同様に CGP 検査が行えると示せる可能性がある。追加研究終了後は、胆道癌に限らず組織検体採取が困難な悪性疾患についても研究していきたい。