

enhance cell proliferation in HCC cell lines, suggesting that *c19orf10* may be a growth factor produced by tumor epithelial cells and/or stromal cells, and, therefore, would be a good target for the treatment of HCC.

Material and Methods

SAGE and HCC samples

HCC and normal liver SAGE libraries that we had constructed were reanalyzed using SAGE 2000 software. The size of each SAGE library was normalized to 300,000 transcripts per library. Monte Carlo simulation was used to select genes whose expression levels were significantly different between the two libraries. Each SAGE tag was annotated using the gene mapping website SAGE Genie database (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>) and the SOURCE database (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>) as previously described.³⁰ An additional 15 SAGE libraries of normal and cancerous tissues from various organs were retrieved using the National Center for Biotechnology Information SAGEmap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>).

Fifteen HCC tissues (four HBV related and 11 HCV related) and the corresponding noncancerous liver tissues were obtained from HCC patients who received hepatectomy. Four normal liver tissues were obtained from patients undergoing surgical resection of the liver for the treatment of metastatic colon cancer. Additionally, 36 HCC tissues (17 HBV related and 19 HCV related) were obtained from HCC patients undergoing hepatectomy. These samples were snap frozen in liquid nitrogen immediately after resection and used for quantitative real time detection PCR (RTD PCR). Total RNA was extracted using a ToTALLY RNATM kit (Ambion, Austin, TX).

The study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki (1975) and was approved by the institutional ethical review board committee. All patients provided written informed consent for the analysis of the specimens.

Laser capture microdissection and RNA isolation

Laser capture microdissection (LCM) was performed as previously described.³¹ Briefly, 20 HCV related surgically resected HCC tissues were frozen in OCT compound (Sakura Finetech, Torrance, CA).³² Inflammatory cells and cancerous cells in HCC tissues were separately excised by LCM using a Laser Scissors CRI 337 (Cell Robotics, Albuquerque, NM) under a microscope. Total RNA was isolated from these cells using a microRNA isolation kit (Stratagene, La Jolla, CA) in accordance with the supplied protocol, with slight modifications.³¹

Construction of C19ORF10 expression plasmid and recombinant adenovirus vector

PCR was performed on a Marathon cDNA library from Huh7 cells using the following primers: sense primers:

5' GACCCTAGTCCAACATGGCGGCGCCC 3' (the first PCR), 5' ATGGCGGCGCCCAGCGGAGGGTGAACGGC 3' (the nested second PCR) and antisense primers: 5' CACCGGAGATGAGAAGGTGCCACCCGC 3' (the first PCR), 5' CAGGGCTGCTGGTACAGCTCAGTGCGCG 3' (the nested second PCR). The 5' and 3' ends of the cDNA were isolated using a SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech, Mountain View, CA) according to the manufacturer's recommendations. The PCR products were cloned into a TA vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) to generate the pcDNA3.1 *c19orf10* expression plasmid. Using this plasmid, a C terminally FLAG tagged construct of *c19orf10* was generated and inserted in a pSI mammalian expression vector (Promega, Madison, WI), which was driven by the SV40 promoter (pSI *c19orf10*).

The replication incompetent recombinant adenovirus vector expressing FLAG tagged *c19orf10* (Ad. *c19orf10* FLAG) was generated by homologous recombination using the AdMax system (Microbix, Toronto, Canada) as previously described.³³ The generated recombinant adenovirus was purified by limiting dilution, and the titer of viral aliquots was determined by the 50% tissue culture infectious dose method as previously described.³⁴

RTD-PCR

RTD PCR was performed as previously described.³¹ Briefly, template cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using SuperScriptTM II RT (Invitrogen). RTD PCR of *c19orf10* (Hs. 00384077 m1), *AFP* (Hs00173490 m1), *GPC3* (Hs01018938 m1), *KRT19* (Hs00761767 s1) and the *ACTB* internal control (Hs99999903 m1) was performed using a TaqMan[®] Gene Expression Assay kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The expression of selected genes was measured in triplicate by $\Delta\Delta$ CT method using the 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Cell lines and transfection of plasmids

Human liver cancer cell lines HuH1, Huh7, Hep3B, HLE and HLF as well as HEK293 and NIH3T3 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) in 5% CO₂ at 37°C. Transfection of plasmids was performed using FuGENETM 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's instruction. Briefly, 5×10^5 cells were seeded in a six well plate 12 hr before transfection, and 3 µg of plasmid DNA was used for each transfection. All experiments were repeated at least twice.

Purification of c19orf10-FLAG fused protein and production of anti-c19orf10 antibody

Approximately 500 ml of culture supernatant obtained from HEK293 cells infected with Ad. *C19ORF10* FLAG at a multiplicity of infection of 20 was applied to an anti FLAG affinity gel column (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The column was

Table 1. ESTs overexpressed in the HCC library

Tag sequence	p value	HCC	Normal liver	T/N ratio	Name	UniGene ID
TGGGCAGGTG	<0.00001	33	0	>33	Chromosome 5 open reading frame 13	Hs.483067
GCAAAATATC	<0.00001	31	2	15.5	Liver cancer associated noncoding mRNA, partial sequence	Hs.214343
AGCCTGCAGA	0.0002	12	1	12	Chromosome 19 open reading frame 10	Hs.465645
TTGTGCACGT	0.000228	12	1	12	CDNA FLJ45284 fis, clone BRHIP3001964	Hs.514273
ACATTCTTGT	0.000042	12	0	>12	Transcribed locus, strongly similar to XP_496055.1	Hs.76704
ACAAGTACCC	0.001161	10	1	>10	Chromosome 5 open reading frame 13	Hs.483067
GAGGTGAAGG	0.000174	10	0	>10	KIAA1914	Hs.501106
GCTGGAGGAG	0.000114	10	0	>10	Transcribed locus	Hs.520115

subjected to elution by competition with FLAG peptide (5 µg/ml), and each 1 ml fraction of the eluted aliquot was collected to obtain the most concentrated c19orf10 FLAG protein in accordance with the manufacturer's protocol. The anti c19orf10 antibodies were developed by immunizing rabbits with repeated intradermal injections of purified c19orf10 FLAG. Protein concentration was measured by the Bradford method.

Silencing gene expression by short interfering RNA

The selected short interfering RNA (siRNA) targeting *C19ORF10* (Si *C19ORF10*; Silencer Select siRNAs s31855) and the irrelevant control sequence (Si *Control*; Silencer Select siRNAs 4390843) was obtained from Applied Biosystems. Transfection of these siRNAs was performed using FuGENE™ 6 (Roche Diagnostics) as previously described.³⁰ Briefly, 2×10^5 cells were seeded in a six well plate 12 hr before transfection. A total of 100 pmol/l of siRNA duplex was used for each transfection. The experiments were performed at least twice.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was evaluated in quadruplicate using a Cell Titer 96 MTS Assay kit (Promega). Briefly, 2×10^3 HLE or HuH7 cells were harvested in a 96 well plate 12 hr before the transfection or addition of the recombinant proteins. Transfection of siRNAs or plasmids was performed using FuGENE™ 6 (Roche Diagnostics). After incubation with MTS/PMS solution at 37°C for 2 hr, the absorbance at 450 nm was measured. The experiments were performed at least twice.

Cell cycle analysis

Cells were fixed using 80% ice cold ethanol and incubated with propidium iodide for 10 min. DNA content was analyzed using a FACS Caliber flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) counting 10,000 stained cells. The distribution of cells in each cell cycle phase was determined using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Western blotting

Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, and the extracts were subsequently electrophoresed on sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gels and transferred onto protean nitrocellulose membranes. The blots were then incubated for 1 hr with an appropriate primary monoclonal antibody: phospho PI3K (#4228), phospho Akt (#4060), phospho GSK 3β (#9323), phospho c Raf (#9427), phospho MEK1/2 (#9154), phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (#4370), Cdk4 (CDK4 (#2906)), Cdk6 (#3136), cyclinD1 (#2926), cyclinD3 (#2936), phospho Rb (#9308), phospho P53 (#9286), phospho cdc2 (#9111) and β actin (#4970) (Cell Signaling Technology, Allschwil, Switzerland) and anti FLAG antibodies (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The blots were washed and exposed to peroxidase conjugated secondary antibodies, such as anti mouse or rabbit IgG antibodies, and visualized using the ECL™ kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). All experiments were performed at least twice.

Statistical analyses

Unpaired *t* tests and Kruskal Wallis tests were performed on the RTD PCR and cell proliferation data using GraphPad Prism software (www.graphpad.com).

Results

Identification of *C19ORF10* overexpression in HCC by SAGE

To comprehensively explore the candidate novel genes activated in HCC, we reanalyzed two SAGE libraries derived from HCC tissues and normal liver tissues.³⁰ After normalization of each SAGE library size to 300,000 tags, we compared the HCC and normal liver libraries to obtain the list of genes overexpressed in HCC. We identified 79 genes significantly overexpressed in the HCC library by more than ten fold when compared to the normal liver library (Supporting Information Table 1). Among them, we explored expressed sequence tags (ESTs) as candidates for novel HCC related genes to identify eight unique tags corresponding to seven ESTs (Table 1). We especially focused on the EST chromosome 19 open reading frame 10 (*c19orf10*) because the

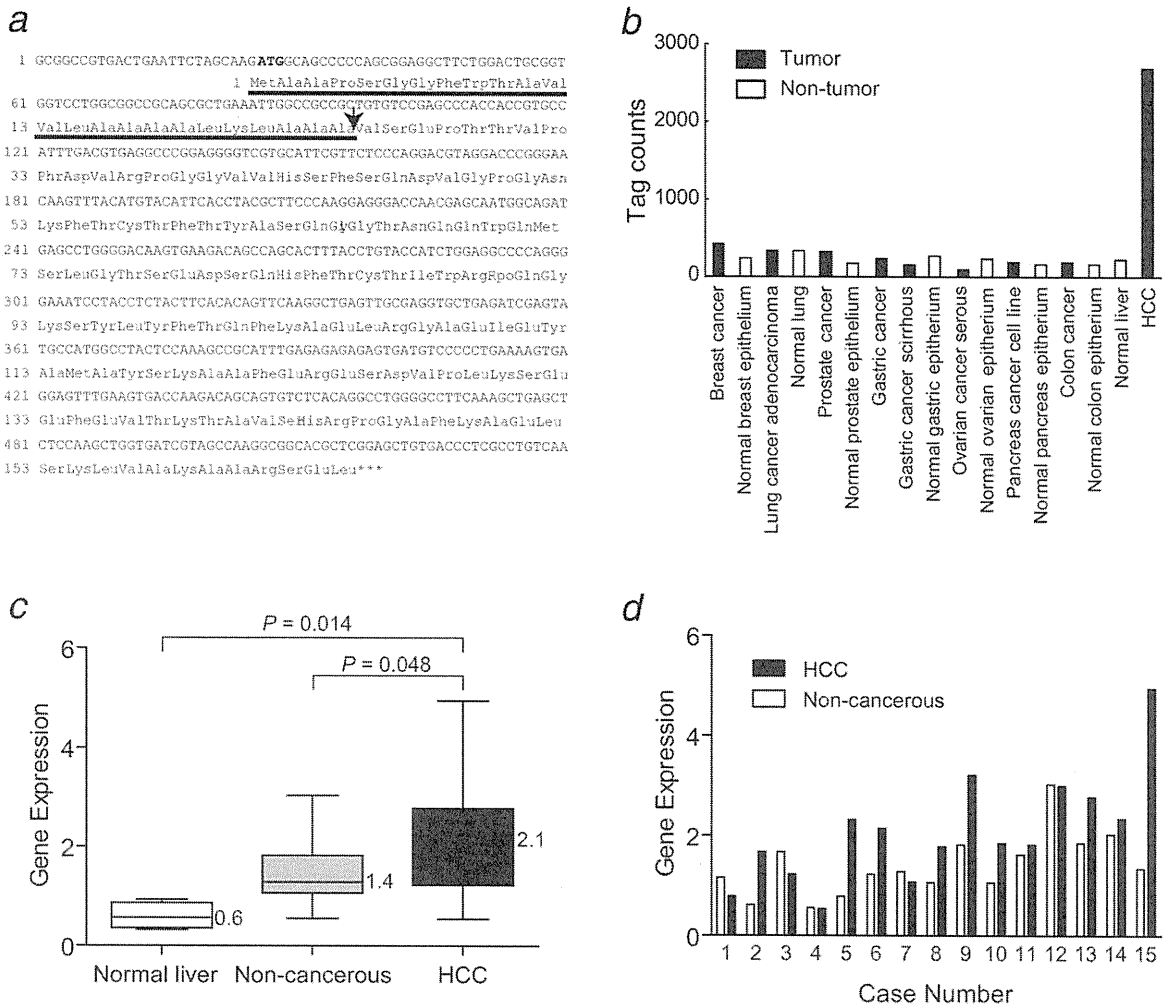


Figure 1. (a) Structure of a *c19orf10* gene and a *c19orf10* protein. The DNA sequence of *c19orf10* and amino acid alignment of the encoded *c19orf10* protein are shown. *C19orf10* is predicted to have a molecular weight of 17 kDa and contain a signal peptide cleavage site (indicated as a black arrow). (b) *C19orf10* gene expression profiles in various tissues by SAGE. Y axis indicates the number of tags corresponding to *c19orf10* in each tissue. (c, d) RTD PCR analysis of *c19orf10*. RNA was isolated from 34 tissue samples: 15 HCC, 15 corresponding noncancerous liver samples and four normal liver samples. Differential expression of each gene among normal liver tissues, noncancerous liver tissues and HCC tissues was examined using the Kruskal Wallis test and unpaired *t* test. The mean value of gene expression data in each group is indicated (c). *C19orf10* was overexpressed in 10 of 15 examined HCC tissues compared to the noncancerous liver tissues (d).

sequence presumably encoded a secretory protein with a signal peptide sequence (Fig. 1a).

When we examined the expression profiles of *c19orf10* using retrieved SAGE data from various cancers and their normal counterparts, we identified that *c19orf10* was abundantly expressed in human HCC (Fig. 1b). We further examined the publicly available EST profiles of *c19orf10* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) and confirmed its tendency to be overexpressed in HCC compared to the normal liver (data not shown). We validated the overexpression of *c19orf10* in 15 independent HCC tissues and adjacent noncancerous liver tissues by RTD PCR. Gene expression of *c19orf10* was significantly higher in the HCC tissues than in

the normal liver tissues and adjacent noncancerous liver tissues ($p = 0.014$ and 0.048 , respectively; Fig. 1c). *C19orf10* expression was elevated in HCC tissues compared to the adjacent noncancerous liver tissues in 10 of 15 patients (66.7%; Fig. 1d).

Overexpression of C19ORF10 in AFP-positive HCC

As HCC is a heterogeneous mixture of cancer epithelial cells and stromal cells, and a previous report indicated that *c19orf10* is expressed in fibroblast like synoviocytes. We, therefore, evaluated the expression of *c19orf10* in tumor epithelial cells and stromal cells separately using LCM and RTD PCR in 20 HCC tissues (Fig. 2a). Although tumor

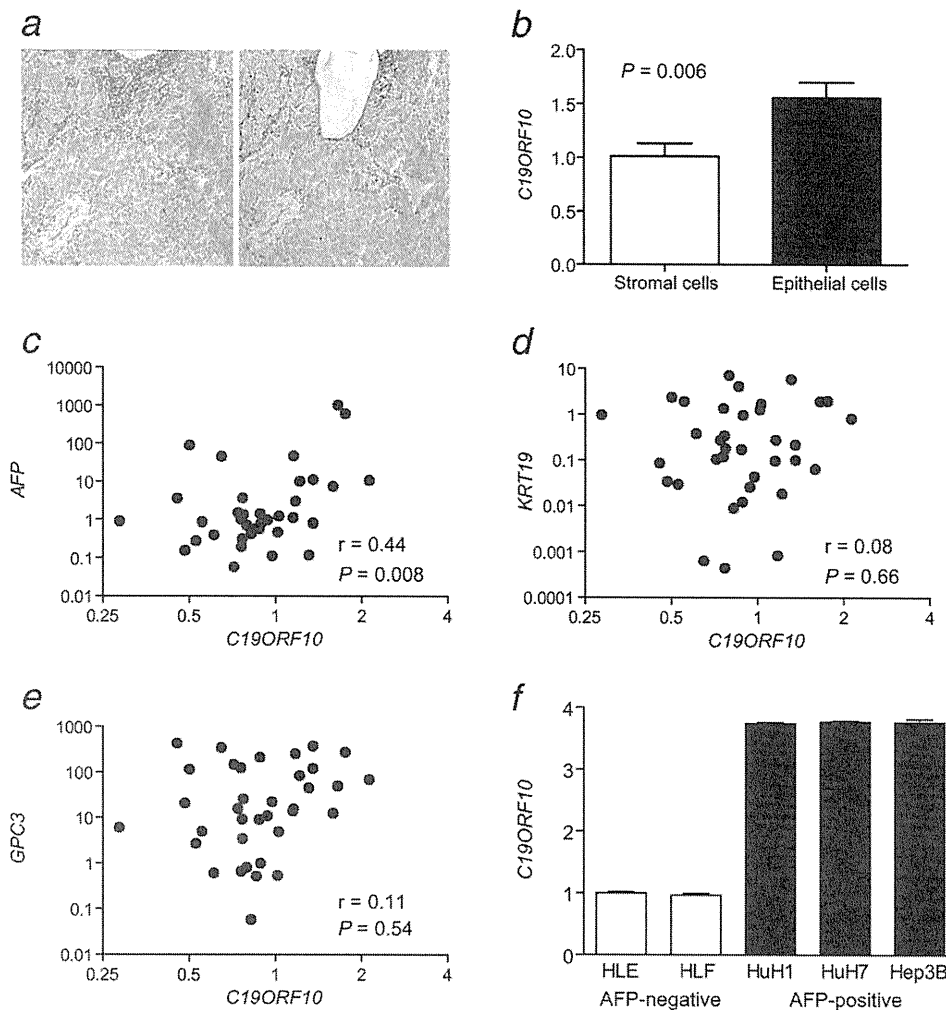


Figure 2. (a) Representative photomicrographs of an HCC tissue used for LCM (toluidine blue staining). Inflammatory mononuclear cells and stromal cells were separately captured (left: Pre LCM, right: Post LCM). (b) RTD PCR analysis of *c19orf10* expression in inflammatory mononuclear cells and tumor epithelial cells in 20 HCV related HCC tissues. Tumor inflammatory mononuclear cells and stromal cells were isolated using LCM. RNAs were isolated from these cells as well as parenchymal tissues from the same liver, followed by RTD PCR for *c19orf10* gene expression. Expression of the *c19orf10* gene was higher than that observed in HCC infiltrating inflammatory mononuclear cells. * $p < 0.05$. (c-e) Scatter plot analysis of *c19orf10*, *AFP*, *KRT19* and *GPC3* expression in HCC. RNA was isolated from 17 HBV related HCC and 19 HCV related HCC. (f) RTD PCR analysis of *c19orf10* in AFP negative (HLE and HLF) and positive (HuH1, HuH7 and Hep3B) liver cancer cell lines.

stromal cells expressed *c19orf10* at some level, the expression levels were significantly higher in tumor epithelial cells than in stromal cells ($p = 0.006$) (Fig. 2b).

To explore the relationship of *c19orf10* with other established HCC markers, we investigated the gene expression of *c19orf10*, *AFP* (alpha fetoprotein), *KRT19* (cytokeratin 19) and *GPC3* (glypican 3). Because only 1 of 15 HCC tissues analyzed above (Fig. 1d) was AFP positive (data not shown), we further investigated the expression of *c19orf10* in an additional 36 HCC tissues using RTD PCR. Interestingly, *c19orf10* expression was significantly positively correlated with *AFP* ($r = 0.44$, $p = 0.008$), but not with *KRT19* ($r = 0.08$, $p = 0.66$) nor *GPC3* ($r = 0.11$, $p = 0.54$) (Figs. 2c-2e).

Furthermore, when we examined the expression of *c19orf10* in AFP positive (HuH1, HuH7 and Hep3B) and negative (HLE and HLF) HCC cell lines, we identified the overexpression of *c19orf10* in AFP positive HCC cell lines (Fig. 2f). These data suggested that *c19orf10* is overexpressed and may play some role in AFP positive HCCs.

***c19orf10* regulates MAPK/Akt pathways and activates cell proliferation**

To explore the functional role of *c19orf10* in HCC, we performed *c19orf10* overexpression and knockdown studies using *c19orf10* low HLE cells and *c19orf10* high Hep3B and HuH7 cells, respectively. When we transfected HLE cells with

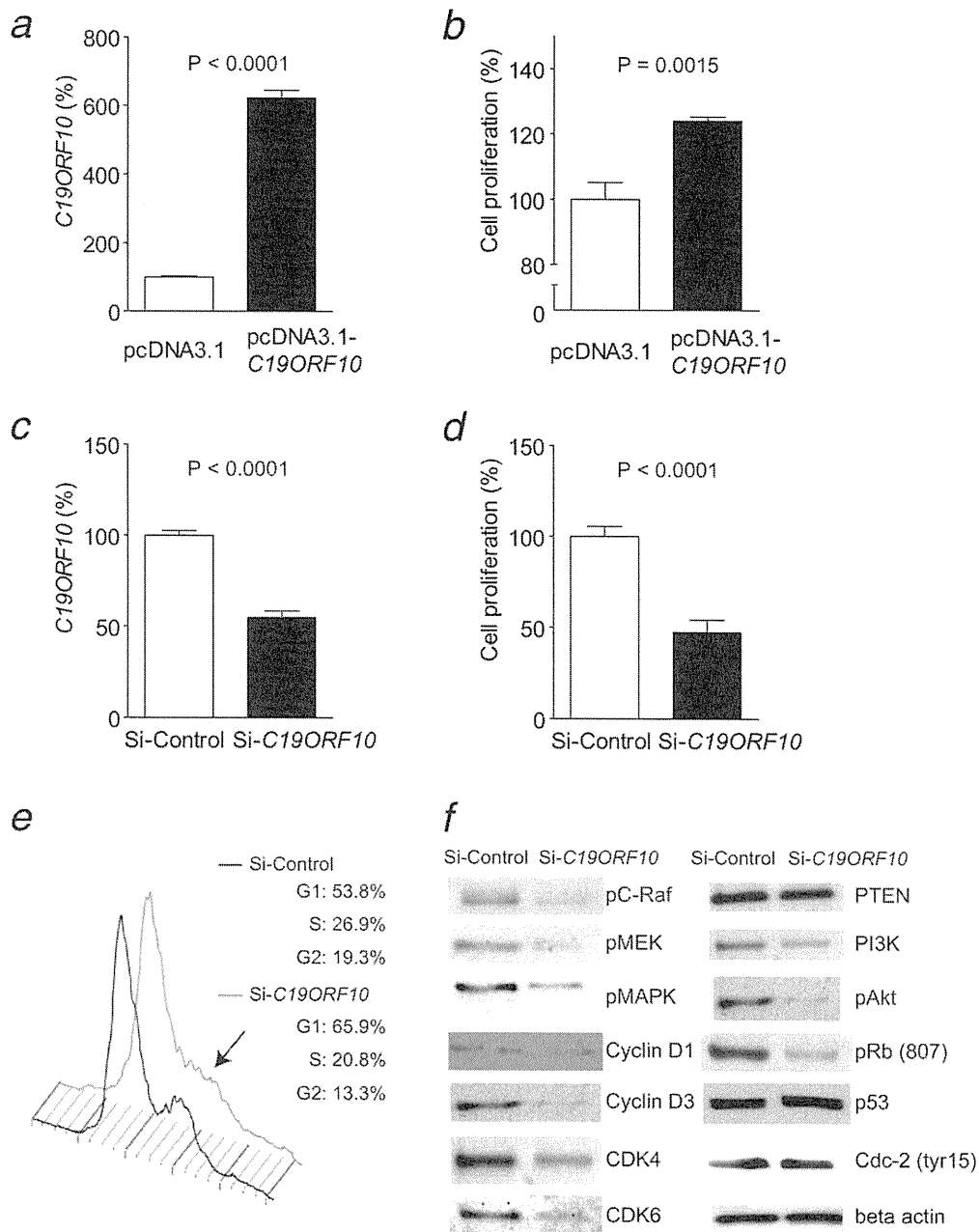


Figure 3. (a) RTD PCR analysis of *c19orf10* expression in HLE cells transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1 *c19orf10* plasmids. (b) Cell proliferation assay of HLE cells transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1 *c19orf10* plasmids. Cell proliferation was evaluated 72 hr after each plasmid transfection. (c) RTD PCR analysis of *c19orf10* expression in Hep3B cells transfected with Si Control or Si *c19orf10*. Gene expression was measured in triplicates 48 hr after transfection. (d) Cell proliferation assay of Hep3B cells transfected with Si Control or Si *c19orf10*. Cell proliferation was evaluated 72 hr after siRNA transfection. (e) Cell cycle analysis of HuH7 cells transfected with Si Control or Si *c19orf10*. Cell cycle was evaluated 72 hr after siRNA transfection. A black arrow indicates the G2 phase peak. (f) Western blotting analysis of Huh7 cells transfected with Si Control or Si *c19orf10*. Cells were lysed by RIPA buffer 72 hr after siRNA transfection.

pcDNA3.1 or pcDNA3.1 *c19orf10* plasmids, we identified an approximately sixfold overexpression of *c19orf10* when compared to the control 48 hr after transfection ($p < 0.0001$) (Fig. 3a). Interestingly, cell proliferation was modestly, but

significantly, enhanced compared to the control 72 hr after transfection ($p = 0.0015$) (Fig. 3b).

We also transfected siRNAs targeting an irrelevant sequence (Si Control) or *c19orf10* (Si *c19orf10*) in Hep3B and

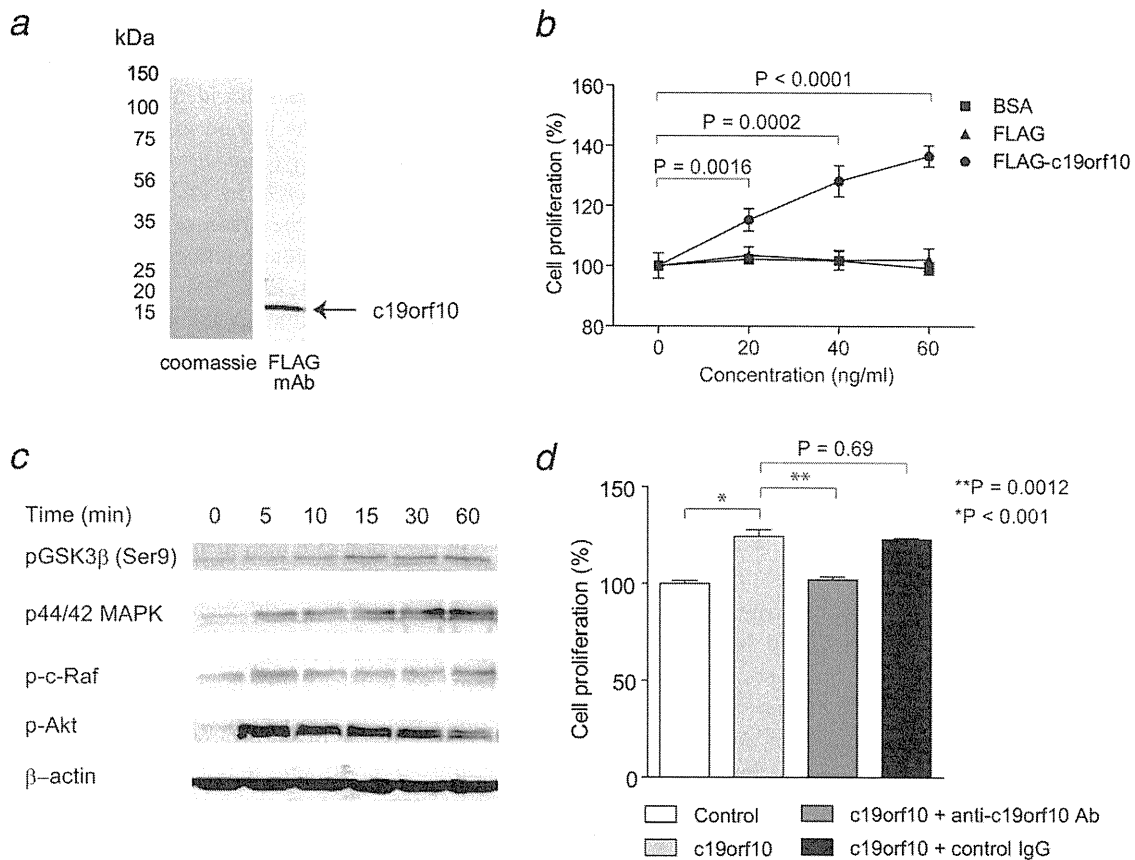


Figure 4. (a) Coomassie blue staining and Western blotting of culture supernatant of NIH3T3 cells transfected with pSI *c19orf10* FLAG. A black arrow indicates the 17 kDa *c19orf10* protein. (b) Cell proliferation assay of HLE cells supplemented with recombinant *c19orf10* FLAG, FLAG peptides or BSA. Cell proliferation was measured in quadruplicates 72 hr after supplementation. (c) Western blotting of HLE cells supplemented with *c19orf10* FLAG (40 ng/ml). Cells were lysed at indicated time after *c19orf10* supplementation. (d) Cell proliferation assay of HLE cells supplemented with control BSA (40 ng/ml) (white bar), *c19orf10* FLAG (40 ng/ml) (light gray bar), *c19orf10* FLAG (40 ng/ml) + anti *c19orf10* antibodies (gray bar) and *c19orf10* FLAG (40 ng/ml) + control mouse IgG (black bar).

HuH7 cells. We observed an ~50% decrease in *c19orf10* expression in Hep3B cells transfected with Si *c19orf10* compared to the control 48 hr after transfection with statistical significance ($p < 0.0001$). In this condition, cell proliferation was suppressed to 50% compared to the control 72 hr after transfection ($p < 0.0001$) (Figs. 3c and 3d). When we performed cell cycle analysis of HuH7 cells transfected with Si *Control* or Si *c19orf10*, we identified an increase of G1 phase cells and a decrease of S and G2 phase cells by *c19orf10* knockdown, suggesting that the G1 cycle arrest was caused by the knockdown of *c19orf10* (Fig. 3e).

We examined the representative MAPK/Akt pathway associated proteins and cell cycle regulators using Western blotting 72 hr after siRNAs transfection (Fig. 3f). Interestingly, phosphorylation of c Raf, MEK, MAPK, PI3K and pAkt was inhibited by knockdown of *c19orf10*, suggesting the involvement of *c19orf10* in the MAPK/Akt pathways. Furthermore, phosphorylation of Rb, CDK4 and CDK6 was also inhibited by knockdown of *c19orf10*, consistent with the

observation of G1 cell cycle arrest by *C19ORF10* knockdown. PTEN, p53 and phosphorylated CDC2 protein expression was not affected by knockdown of *c19orf10*.

***C19orf10* encodes the secretory protein and stimulates cell proliferation**

As the sequence of *c19orf10* suggested that it encodes a secretory protein, we transfected pSI *c19orf10* FLAG in NIH3T3 cells and examined the culture supernatant. Immunoprecipitation of the collected culture supernatant 48 hr after transfection using anti FLAG antibodies indicated the existence of a 17 kDa protein (*c19orf10*), compatible with the molecular weight of the 142 amino acids protein encoded by *c19orf10* (Fig. 4a). We purified *c19orf10* FLAG protein from the supernatant of HEK293 cells infected with Ad. *c19orf10* FLAG using an anti FLAG column. Supplementation of purified *c19orf10* FLAG into the culture media for 72 hr enhanced the proliferation of HLE cells in a dose dependent manner with statistical significance, whereas control FLAG peptides

and BSA had no effects on cell proliferation (Fig. 4b). Western blot analysis of HLE cells cultured with purified c19orf10 FLAG (40 ng/ml) or BSA control (40 ng/ml) indicated the immediate strong phosphorylation of Akt peaked 5 min after supplementation (Fig. 4c). The modest phosphorylation of GSK3 β (Ser9) and p44/42 MAPK also followed and peaked 60 min after c19orf10 supplementation. These data suggest that Akt pathway might be directly involved in the c19orf10 mediated cell proliferation signaling with the subsequent activation of MAPK pathway. Furthermore, addition of antibodies against c19orf10 to the culture media abolished the cell proliferation induced by c19orf10, whereas control IgG had no effects (Fig. 4d). Taken together, these data suggest that c19orf10 may be a growth factor overexpressed in AFP positive HCCs and activates the Akt/MAPK pathways, potentially through the activation of an unidentified c19orf10 receptor.

Discussion

SAGE facilitates the measurement of transcripts from normal and malignant tissues in a nonbiased and highly accurate, quantitative manner. Indeed, SAGE produces a comprehensive gene expression profile without *a priori* gene sequence information, leading to the identification of novel transcripts potentially involved in the pathogenesis of human cancer.¹⁹ In our study, we identified seven SAGE tags potentially corresponding to novel genes activated in HCC. Among them, we identified the secretory protein c19orf10 activated in a subset of HCCs.

Several serum markers including AFP, DCP and Glypican 3 are currently used for the detection and/or the evaluation of the treatment for HCCs in the clinic.^{15-18,35} These markers are known as oncofetal proteins, that is, expressed in the fetus, transcriptionally suppressed in the adult organ and reactivated in the tumor. We identified that the expression of *c19orf10* positively correlated with *AFP* expression but did not correlate with the expression of *GPC3* or the biliary marker *KRT19*. As *c19orf10* was rarely detected in the normal liver, it is possible that c19orf10 is also an oncofetal protein activated in HCC. We are currently developing a system to detect serum c19orf10 in HCC patients, and the significance of the serum c19orf10 value as an HCC marker should be clarified.

Recent advancement in molecular biology has revealed the considerable diversity of transcription initiation and/or termination of genes altered in the process of carcinogenesis.

Indeed, using 5' SAGE approach, we recently discovered the novel intronic transcripts activated in HCC.³⁶ Interestingly, when we investigated the transcription initiation of *c19orf10* using the 5' SAGE database, we identified a potential 5' splice variant initiated from the second exon of *c19orf10* (data not shown). Although we have not yet validated the presence of 5' splice variants in *c19orf10* by PCR, examination of 5' EST database also suggested the presence of the similar splice variants (GenBank Accession Number CR980295, BQ680744, BQ648461, *etc.*). Alteration of transcription initiation/termination in *c19orf10* might affect the abundance or function of c19orf10 protein, and the details of 5' splice variants in *c19orf10* should be clarified in future studies.

Molecular targeting therapy has rapidly emerged for solid tumors as well as for leukemia.³⁷⁻³⁹ Sorafenib is a multikinase inhibitor targeting Raf kinase in the MAPK pathway as well as VEGFR and the platelet derived growth factor receptor.^{40,41} In our study, we identified that c19orf10 activates the MAPK and Akt/PI3K pathways and contributes to the proliferation of HCC cell lines, although we still could not discover the potential receptor of c19orf10. Development of a neutralizing c19orf10 antibody may provide novel therapeutic options for HCC patients to inhibit these signaling pathways, and its efficacy should be evaluated in the future.

Recently, c19orf10 was found to be expressed in fibroblast like synoviocytes in the synovium using a proteomics approach.²⁹ In addition, a recent article indicated that c19orf10 was expressed in preadipocyte cells and involved in adipogenesis using two dimensional electrophoresis mass spectrometry analysis.²⁸ Thus, c19orf10 may have pleiotropic effects on various lineages of normal organs in various developmental stages, and the clarification of its distribution and biological properties in the whole body may provide more detailed information about the function of c19orf10.

In conclusion, we have identified the protein c19orf10 that regulates the Akt/MAPK pathways and cell cycle through an unidentified mechanism in HCC. Although further studies should be conducted to detect the potential c19orf10 receptor or signaling molecules binding to c19orf10, our study suggests that c19orf10 may be a novel growth factor, a potential tumor marker and also a potential target molecule for HCC treatment.

Acknowledgements

The authors thank Ms. Mikie Kakiuchi, Ms. Masayo Baba and Ms. Nami Nishiyama for their excellent technical assistance.

References

1. Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002;122: 1609-19.
2. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H, Kawashima T. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993;328:1797-801.
3. Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, De Medina M, Parker IT, Cheinquer H, Idrovo V, Rabassa A, Schiff ER. Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 1993;18:1326-33.
4. Mayans MV, Calvet X, Bruix J, Bruguera M, Costa J, Esteve J, Bosch FX, Bru C, Rodes J. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Catalonia, Spain. *Int J Cancer* 1990;46:378-81.

5. Mohamed AE, Kew MC, Groeneveld HT. Alcohol consumption as a risk factor for hepatocellular carcinoma in urban southern African blacks. *Int J Cancer* 1992; 51:537-41.
6. Smedile A, Bugianesi E. Steatosis and hepatocellular carcinoma risk. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005;9:291-3.
7. Floreani A, Baragiotta A, Baldo V, Menegon T, Farinati F, Naccarato R. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29:1425-8.
8. Tradati F, Colombo M, Mannucci PM, Rumi MG, De Fazio C, Gamba G, Ciavarella N, Rocino A, Morfini M, Scaraggi A, Taioli E. A prospective multicenter study of hepatocellular carcinoma in Italian hemophiliacs with chronic hepatitis C. The Study Group of the Association of Italian Hemophilia Centers. *Blood* 1998;91:1173-7.
9. Jones DE, Metcalf JV, Collier JD, Bassendine MF, James OF. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis and its impact on outcomes. *Hepatology* 1997; 26:1138-42.
10. Caballeria L, Pares A, Castells A, Gines A, Bru C, Rodes J. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus related cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1160-3.
11. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, Inoue O, Yano M, Tanaka M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Kuroki T, et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy. *Ann Intern Med* 1999; 131:174-81.
12. Yuen MF, Cheng CC, Laufer IJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000;31:330-5.
13. Peterson MS, Baron RL. Radiologic diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001;5:123-44.
14. Choi BI. The current status of imaging diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004;10:S20-S25.
15. Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62 (Suppl 1):57-63.
16. Tsai SL, Huang GT, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS. Plasma des gamma carboxyprothrombin in the early stage of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1990; 11:481-8.
17. Ikoma J, Kaito M, Ishihara T, Nakagawa N, Kamei A, Fujita N, Iwasa M, Tamaki S, Watanabe S, Adachi Y. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma using a sensitive assay for serum des gamma carboxy prothrombin: a prospective study. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:235-8.
18. Kasahara A, Hayashi N, Fusamoto H, Kawada Y, Imai Y, Yamamoto H, Hayashi E, Ogihara T, Kamada T. Clinical evaluation of plasma des gamma carboxy prothrombin as a marker protein of hepatocellular carcinoma in patients with tumors of various sizes. *Dig Dis Sci* 1993; 38:2170-6.
19. Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Application of serial analysis of gene expression in cancer research. *Curr Pharm Biotechnol* 2008;9:375-82.
20. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double blind, placebo controlled trial. *Lancet Oncol* 2009;10:25-34.
21. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.
22. Yamashita T, Hashimoto S, Kaneko S, Nagai S, Toyoda N, Suzuki T, Kobayashi K, Matsushima K. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269: 110-16.
23. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Hoshino N, Kaneko S. Genome wide transcriptome mapping analysis identifies organ specific gene expression patterns along human chromosomes. *Genomics* 2004;84:867-75.
24. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;50:100-10.
25. Yamashita T, Kaneko S, Hashimoto S, Sato T, Nagai S, Toyoda N, Suzuki T, Kobayashi K, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:647-54.
26. Tulin EE, Onoda N, Nakata Y, Maeda M, Hasegawa M, Nomura H, Kitamura T. SF20/IL 25, a novel bone marrow stroma derived growth factor that binds to mouse thymic shared antigen 1 and supports lymphoid cell proliferation. *J Immunol* 2001;167:6338-47.
27. Tulin EE, Onoda N, Nakata Y, Maeda M, Hasegawa M, Nomura H, Kitamura T. SF20/IL 25, a novel bone marrow stroma derived growth factor that binds to mouse thymic shared antigen 1 and supports lymphoid cell proliferation. *J Immunol* 2003;170:1593.
28. Wang P, Mariman E, Keijer J, Bouwman F, Noben JP, Robben J, Renes J. Profiling of the secreted proteins during 3T3 L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2405-17.
29. Weiler T, Du Q, Krokhn O, Ens W, Standing K, El Gabalawy H, Wilkins JA. The identification and characterization of a novel protein, c19orf10, in the synovium. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R30.
30. Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2010; 30:438-46.
31. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. Common transcriptional signature of tumor infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res* 2008;68: 10267-79.
32. Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Kaneko S. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006;44:1122-38.
33. Sakai Y, Morrison BJ, Burke JD, Park JM, Terabe M, Janik JE, Forni G, Berzofsky JA, Morris JC. Vaccination by genetically modified dendritic cells expressing a truncated neu oncogene prevents development of breast cancer in transgenic mice. *Cancer Res* 2004;64:8022-8.
34. Sakai Y, Kaneko S, Nakamoto Y, Kagaya T, Mukaida N, Kobayashi K. Enhanced anti tumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system by codelivering monocyte chemoattractant protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2001;8:695-704.
35. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, DeBoer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican 3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125: 89-97.
36. Hodo Y, Hashimoto S, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5' end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics* 2010;95:217-23.

37. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr, Davidson NE, Tan Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2 positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-84.
38. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
39. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, et al. Erlotinib in previously treated non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:123-32.
40. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;48:1312-27.
41. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006;66: 11851-8.

厚生労働科学研究費補助金
(総括・分担) 研究報告書

がん診療ガイドラインの作成(新規・更新)と公開の維持および
その在り方に関する研究

(研究分担者 宮崎 勝・千葉大学大学院医学研究院臓器制御外科学・教授)

研究要旨

本研究の目的は『エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン』を広く発信し、診療の均てん化を進めることである。昨年度施行したガイドラインアンケート調査の結果を活用し、今年度は新しく第2版作成委員会を組織し、更新作業を開始した。その特徴は、推奨度の設定にエビデンスの内容も加味し、委員の討議を経て決定するGRADEシステムを採用した。このような改定でよりよいガイドラインの作成を勧め、平成24年度に発刊予定とした。

A. 研究目的

胆道癌は予後不良の疾患であるが、その診断、治療に関してはレベルの高いエビデンスが少なく、各診療機関での内容のばらつきが多くなっているのが現状である。このため日本肝胆膵外科学会、日本癌治療学会が中心となり2007年に“エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン”を発刊した。本研究では、このガイドラインを広く一般に発信していく公開のための体制作り、および、ガイドラインの更新に向けた作業の進め方について検討することを目的とした。

B. 研究方法

2010年12月より、胆道癌診療ガイドライン改定作業を開始した。昨年度の研究で実施した、『エビデンスに基づく胆道癌診療ガイドライン』使用状況調査をもとに、コアメンバーによる会議にて、作成の方向性を示した。

その後、その内容に沿って、第2版策せ委員会を組織し、2011年10月に第1回作成会議を開催した。その討論内容に従い、クリニカルクエスチョン案をまとめ、これをもとに、各委員が推奨、推奨度、解説の作成を行っている。

(倫理面への配慮)

個別の患者を対象とする研究ではないため、研究対象者への対応に関する倫理面の問題はないと判断される。

C. 研究結果

アンケート調査により胆道癌診療ガイドラインが90%以上の回答で有用であったとされ、第1版が有効に使われていることが確認された。しかし、その問題点もいくつか挙げられた。具体的には推奨(度)が曖昧でわかりにくい、必ずしもエビデンスに基づいていない、他の治療法などの選択枝が書かれていない、作成委員に内科医、放射線科医を増やすべきといった点である。

この点を踏まえ、コアメンバーによる会議ではクリニカルクエスチョン形式を踏襲すること、推奨度の決定法について委員で深く検討する必要があること、文献検索は各CQごとのキーワードで行うこと、新しいエビデンスを構築するための臨床試験の提案をすること提案され、また、新規作成委員のメンバーについても検討された。結果、外科17名、内科6名、放射線科2名、病理2名、ガイドライン作成専門家1名の計28名の作成委員を選出した。

作成会議では以下の点が決定された。

- ◆ AGREE評価やアンケートによる意見を参考に改訂作業を行っていく。
- ◆ エビデンスが不足している分野には、今後の臨床試験を促す意味で、Research recommendationを記載していく必要がある。
- ◆ 推奨度は、エビデンスを研究形式のみでなく、その内容、質にまで踏み込んで評価し、それを参考に作成委員で推奨度を決定するGRADE systemを採用する。
- ◆ クリニカルクエスチョンごとに文献検索を行う。

厚生労働科学研究費補助金
(総括・分担) 研究報告書

その上で、各クリニカルクエスチョンについて検討された。
 ◆ 胆道ドレナージは術前、緩和目的をまとめた症にする。
 ◆ 病理診断における問題点について新たな大項目を作成する。
 ◆ 新たなクリニカルクエスチョンを加えて、現時点では全46題のクリニカルクエスチョンを設定する。

このような討議を踏まえ、現在、参考文献検索、各委員によるクリニカルクエスチョンの推奨、推奨度、解説の作成を行っている。

D. 考察

アンケート調査の結果、胆道癌診療ガイドラインが広く医療従事者に受け入れられ、有効に利用されている状況が判明し、よりよいものにするために、改定作業が開始された。

問題提起が多かった、作成委員の外科への偏りについては、内科医の増員、放射線治療医、病理医などの第1版作成の際には参加していなかった専門家が委員として加わり、より中立的なガイドラインの作成が期待される。加えて、ガイドライン作成専門家の委員への参加で、近年の診療ガイドラインのトレンドを押さえた、現実に即したものが完成することも期待される。

今回の改定作業における、重要な決定事項としては、推奨度の決定にGRADE systemを採用したことである。これまでの推奨度の決定では、エビデンスレベルに完全に依存していること、そのレベルの決定には研究形式のみが重要であり、その内容、重要性は全く加味されていなかった。一方、GRADE systemはエビデンスの研究形式で基礎的なポイントを定め、その内容にてレベルを上下させるものである。その上で、推奨度は委員の討議にて決定するものである。これにより、罹患数が少ないなどのためにレベルが高いエビデンスが少ない本疾患の診療において、曖昧な推奨でなく、より明確な推奨に表現が改められ、利用者の診療の指針として、より有効になることが期待される。

一方で、医学論文や学会、研究会を通して、広くGLの存在、内容を啓蒙していくことは重要であり、今後も論文掲載や学会発表などを通し、本GLの普及を目指していく必要があると考えられた。

E. 結論

今後、胆道癌診療ガイドラインの更新作業を進め、特に本邦における本疾患の医療均てん化を目指していく。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 吉富秀幸他、胆道癌診療ガイドラインの現状と改定へ向けての課題-ガイドライン利用アンケート調査結果を中心に- 胆と膵 2011 ; 32 : 263-269

2) 吉富秀幸他、胆嚢癌 消化器診療最新ガイドライン p232-235 2011 総合医学社

3) 宮崎勝他、見直される胆道がん診療の新展開 肝・胆・膵 62:1163-1178, 2011

4) Ohtsuka M et al. Similarities and differences between intraductal papillary tumors of the bile duct with and without macroscopically visible mucin secretion. Am J Surg Pathol 35:512-521, 2011

2. 学会発表

1) 加藤厚他 T2胆嚢癌における術前・術中深達度診断と肝中央下区域切除および胆管切除の意義について. 第23回日本肝胆膵外科学会・学術集会 プログラム・抄録集 p168(2011.06)

2) 清水宏明他 肝門部胆管癌の術式選択、特に左優位型(Bismuth 3b型)における左三区域切除の適応について. 第23回日本肝胆膵外科学会・学術集会 プログラム・抄録集 p149(2011.06)

3) 高屋敷吏他 非拡張型膵・胆管合流異常症に対する胆管切除再建の意義. 第66回日本消化器外科学会総会 抄録集 p260

4) 清水宏明他 肝門部胆管癌に対する血管合併切除の意義とその成績. 第66回日本消化器外科学会総会 抄録集p202

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

胆道・膵癌の治療：診療ガイドラインはどう変わるか？

胆道癌診療ガイドラインの現状と改訂へ向けての課題
—ガイドライン利用アンケート調査結果を中心に—吉富 秀幸¹⁾・木村 文夫¹⁾・清水 宏明¹⁾・吉留 博之¹⁾・大塚 将之¹⁾
加藤 厚¹⁾・古川 勝規¹⁾・宮崎 勝¹⁾

要約：胆道癌は依然として予後不良の疾患であり、また、その罹患数も増加傾向にある。しかし、本疾患にはレベルの高いエビデンスが少ないこともあり、その診療にはばらつきが多いのが現状である。このような背景の中、2007年11月に「エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン」が発刊された。改訂に向けて、日本胆道学会員を対象としたアンケート調査を行い、その結果を中心に今後の課題を探った。本ガイドラインは広く有効に活用され、また、その評価も高かった。一方で、推奨が曖昧である、作成委員に内科医や放射線科医の参加を増やした方がよい、5年以内に改訂を行うことが望ましいとの課題があげられた。また、一方で、本疾患の診療の進歩のためには、多施設が参加する臨床試験などを通し、新たなエビデンスの構築を行っていく必要も示唆された。今後、このような点を考慮しながら改訂作業を行っていく。

Key words：胆道癌，ガイドライン，胆管癌，胆嚢癌

はじめに

胆道癌は依然として予後不良の疾患であり、また、その罹患数も増加傾向にある。一方で、本疾患にはレベルの高いエビデンスが少ないこともあり、各施設で独自の経験に基づいた診療が行われ、そのばらつきも多いのが現状である。このような背景の中、本疾患に関わる医療従事者が抱くことが多いと考えられる臨床上の疑問点を明確化し、それに対する作成時点での指針を明らかにすることを目的として旧日本胆道外科学会、およびその組織を引き継いだ日本肝胆膵外科学会を中心に2007年11月に「エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン」¹⁾が発刊された。

本ガイドラインは後述のように広く臨床現場で使用され、有効に活用されている。また、インターネット上での公開などの工夫もされている。一方で、すでに発刊から3年以上が経過しており、新たなエビデンスの蓄積もあり、改訂が待たれるところである。本稿では、本ガイドラインの作成の経緯、現状を解説し、加えてガイドライン利用アンケート調査の結果を踏まえ、改訂に向けた今後の課題について探る。

I. ガイドライン作成の経緯、現状

臨床の現場において的確な判断を下すためには、個々の医療従事者が症例毎に見合った適切な情報を収集、吟味、整理してそれを応用していくことが重要である。しかし、膨大な情報が氾濫する現代においては、それぞれの医療従事者が個別に広い範囲にわたりこのような情報整理を行うことはもはや不可能といえる。

このような背景から、近年、多くの疾患に対して診療ガイドラインが作成されている。米国のInstitute of Medicineはその報告書の中で診療ガイドラインを「医療者と患者が特定の臨床場面で適切な決断を下せるよ

The Current Issues in Clinical Practice Guidelines for the Management of Biliary Tract and Ampullary Carcinomas : The Analysis of a Questionnaire Survey for Use of the Guidelines
Hideyuki Yoshitomi et al

1) 千葉大学大学院医学研究院臓器制御外科学
(〒260-8677 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

う支援する目的で、体系的な方法に従って作成された文章』としている²⁾。このような考えのもとで、わが国でも1990年代より各種疾患に対する診療ガイドラインが作成され、特に2000年代になり公的な研究費の補助がなされるようになってからは、半ば国家的なプロジェクトとしてその作成が広がった³⁾。

胆道癌診療ガイドラインもその一つとして、厚生労働省科学研究所のがん対策としてのガイドライン作成事業の一環として作成が始まった。作成に当たっては、外科14名、内科3名、放射線科1名、計18名の胆道癌診療に関わる専門家による作成委員会が組織された。前述のように、胆道癌診療に関しては各施設でのばらつきが多いという現状を踏まえ、ガイドラインの作成方法としては、本疾患に関わる医療従事者が抱くことが多いと考えられる臨床上の疑問点を明確化するため、クリニカルクエスチョンの形式に従った。

具体的には、まず、過去20年間の胆道癌に関する論文を網羅的に検索することで、英文1,325件、和文2,233件を抽出し、これらの文献を参考にしながら委員会での討議を経てクリニカルクエスチョンの案を決定した。そして、おのおののクリニカルクエスチョンの解説を各委員会により作成、これを作成委員の全体会議により校正しながら、各クエスチョンに対する推奨、推奨度を決定していった。また、診断、治療の概略を全体的に見渡すことができるよう、おのおののアルゴリズムを作成した。このような課程を経て作成した最終案を4名の評価委員による評価、および2回の公聴会の開催を通し修正し、最終的な出版に向けた校正を10名の出版委員を中心に行い、2007年の出版に至った¹⁾。

II. 胆道癌診療ガイドラインの特徴と現況

本ガイドラインは、本邦の胆道癌診療に関わる医師を中心とした医療従事者を対象に作成した。特に、本疾患の専門家だけでなく、初期診断の段階から診療に当たるであろう多くの関係者の判断に参考になるようにクリニカルクエスチョンを設定するよう心がけた。

その内容としては、胆道癌の治療において外科切除がもっとも中心的な役割を果たしていることから、全36題のクリニカルクエスチョンの中で半数に当たる18題が外科診療に関するものとなった。また、本邦の医療事情に合わせて、欧米ではあまり一般的でない術前減黄処置、術前門脈塞栓術にも言及した。加えて、外科治療の適応など、欧米(特に米国)とやや考え方が異なるとされる点についても、できる限り詳細に検

討し、本邦での実臨床を考えた構成になるよう心がけた。

このようなわが国の考え方を広く発信する目的で、本ガイドライン英語版を作成し、公開した⁴⁻¹⁰⁾。本疾患の罹患率が高いとされるわが国からこのような情報を発信することは、国際的な影響を強く及ぼすと考えられ、その重要度が増していくことは確実である。

このように作成されたガイドラインを広く普及させ、本疾患に関わる医療関係者の啓蒙を進めることは、本疾患の治療成績向上に欠かすことができない。この目的のため、出版物以外に、インターネット上で、日本癌治療学会(<http://www.jsco-cpg.jp/>)や日本医療機能評価機構が作成している医療サービスMinds(<http://minds.jcqh.or.jp/>)のホームページ上で、本ガイドライン簡易版の閲覧が誰でもできるよう公開されており、本ガイドラインの普及に大きな役割を果たしている。

一方、本ガイドラインは医療従事者を対象として作られており、患者サイドに立った表記がなされていないという欠点がある。そこで、前述のMindsの協力により一般向けガイドライン解説を作成し、同ホームページ上での公開をすでに開始している。

このような努力により本ガイドラインは高い評価をいただいております。現在、その目的を達しつつあると考えられている。

III. 改訂に向けた問題点—ガイドライン利用アンケート調査結果を中心に—

2007年に本ガイドラインが出版されてからすでに3年が経過していることから、改訂作業を開始している。改訂に向け、より利用者が使いやすいように、現在のガイドラインの評価すべき点や改善すべき点を明らかにする必要がある。そこで、胆道癌診療ガイドライン利用アンケートを実施し、これらの問題点を明らかにしようと試みた。

アンケートは、胆道癌診療に関わる人が多い利用者を中心に意見を拾い上げたいと考え、日本胆道学会員を対象とした。2010年6月時点での学会員2,354名に郵送にて記名式アンケートを行った。2010年8月31日まで456名より回答を得て(回答率19.4%)、これらを解析した。

回答者の背景を図1に示す。回答は外科系医師からが65.1%と多かった。施設の種類をみると、癌拠点病院からの回答がやや多いものの、大学病院や癌専門病院と一般病院の割合がほぼ同等で幅広い医療機関から

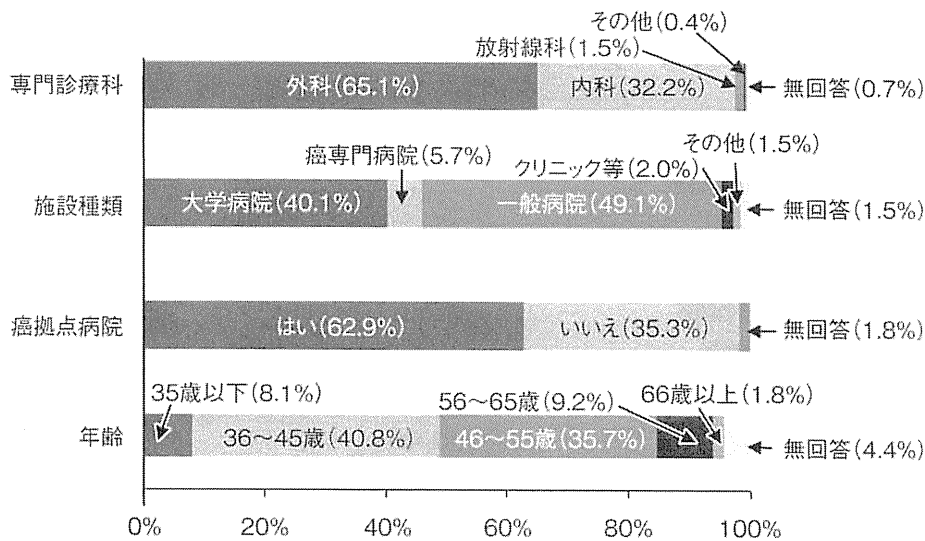


図1 回答者背景

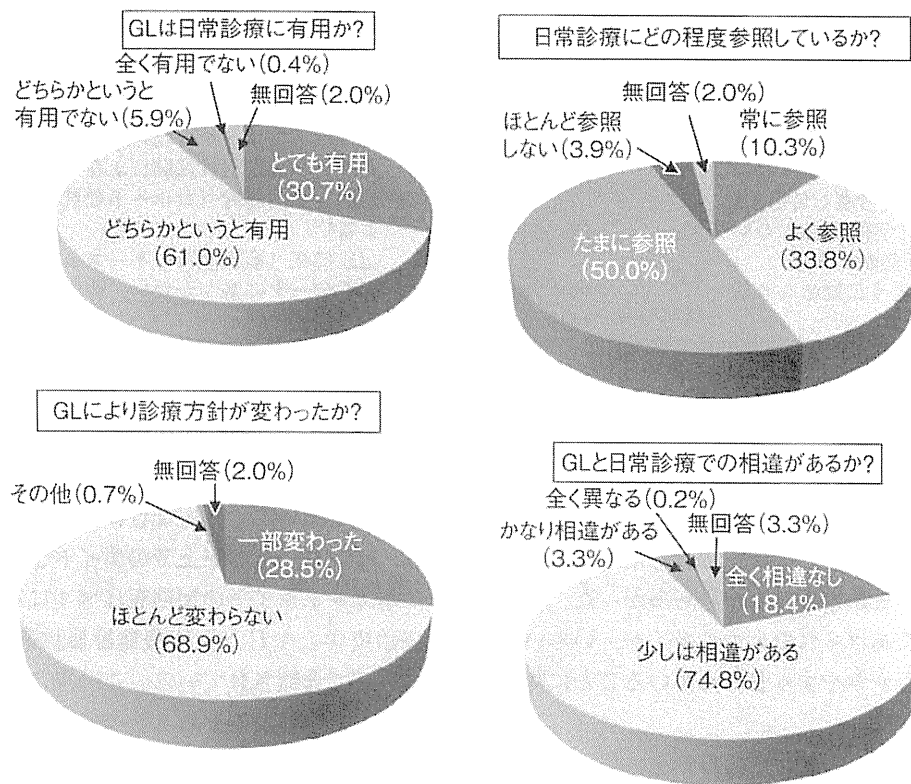


図2 ガイドラインの利用状況と日常診療への影響

の回答が集積されたと考えられた。また、年齢も本疾患の診療の中心をなすと考えられる36歳から55歳までの医師からの回答が7割を超えており、ガイドライン作成時に想定した利用対象者に合致していた。

1. ガイドラインの利用状況と日常診療への影響(図2)

まず、ガイドラインが日常の診療にどのような影響を与えているかを検討した。ガイドラインが日常診療に有用かどうかの質問に対しては、とても有用、どち

らかという有用をあわせると9割以上となり、また、4割以上の回答者が頻りに参照しており、ガイドラインが有効に利用されていると考えてよいと思われた。しかし、一方で、ガイドラインにより診療方針が変わったかという質問に対しては約7割がほとんど変わらないとしており、また、約8割がガイドラインの内容が日常診療と相違があると感じていることがわかり、本疾患に対する診療が施設間で多少異なっている

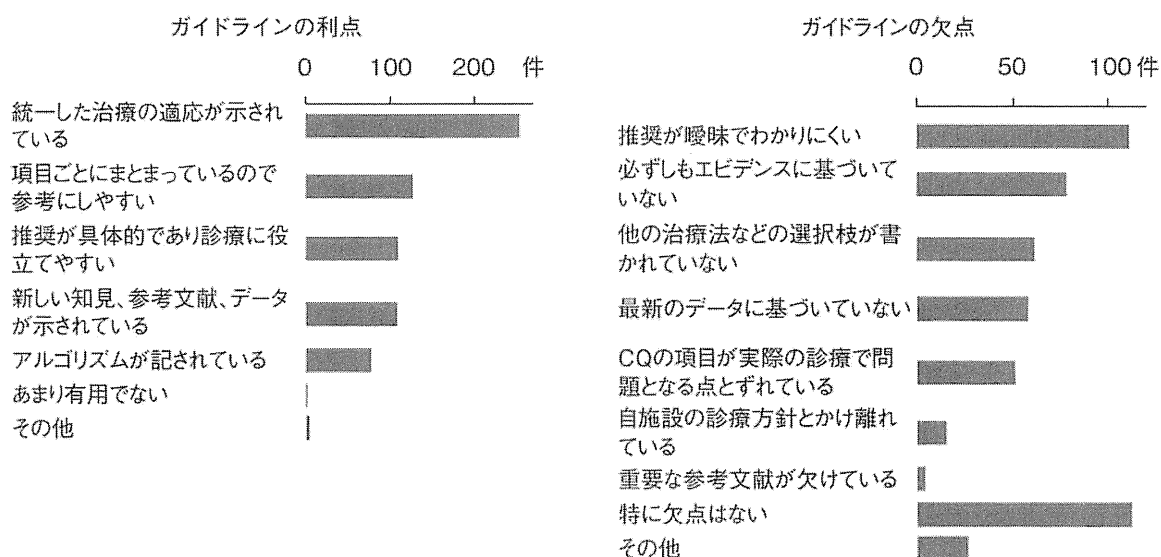


図 3 胆道癌診療ガイドラインの利点と欠点

表 1 推奨度とエビデンスレベル (参考文献 1 より引用改変)

推奨度	該当 CQ 数	エビデンスレベル
A: 行うよう強く勧められる	(0)	レベル I システマティック・レビュー/メタアナリシス
B: 行うよう勧められる	(15)	レベル II 一つ以上のランダム化比較試験による
C1: 高いレベルの科学的根拠はないが、 行うことを考慮してもよい	(19)	レベル III 非ランダム化比較試験による
C2: 十分な科学的根拠がないので、 明確な推奨が出来ない	(3)	レベル IV 分析疫学的研究 (コホート研究や症例対象研究による)
D: 行わないように勧められる	(0)	レベル V 記述研究 (症例報告やケースシリーズ) による
推奨無し	(4)	レベル VI 患者データに基づかない、専門委員会や専門家個人の意見

実情を示しているものと考えられた。

2. ガイドラインの利点と欠点 (図 3)

次に、具体的なガイドラインのよい面と悪い面について質問した。利点としては統一された治療の適応が示されていることをあげる回答が最も多かった。そのほかに利点としてあげられたものの多くが、いろいろなエビデンスをわかりやすくまとめていることに関連していた。

一方、特に欠点はないという回答が多い反面、推奨が曖昧でわかりにくい、必ずしもエビデンスに基づいていない、最新のデータに基づいていないなどを欠点としてあげる回答が目立ち、本疾患の診療に関する高いレベルのエビデンスが少ないことに起因する点が多く指摘された。

本ガイドラインは表 1 に示すように、ピックアップされたエビデンスのレベルを判断し、そのレベルに従い、各クリニカルクエスチョンに対する推奨、およびその推奨度を A, B, C1, C2, D の 5 段階に分類している。しかし、レベルの高いエビデンスが少ない状況を反映してか、表に示すように、推奨度の中で約半数

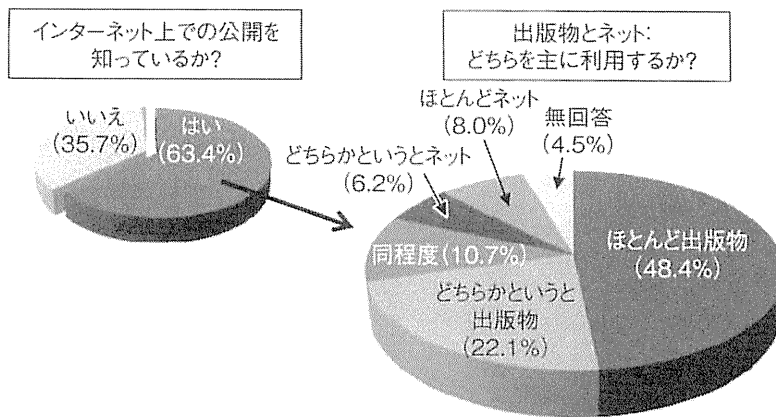
が C1 に分類されており、各クリニカルクエスチョンに対し、明確な推奨ができておらず、この点で利用者が不満を招いている可能性が示唆された。

3. インターネット上でのガイドラインの公開 (図 4)

本ガイドラインの簡略版は図 4 に示すように、日本癌治療学会や日本医療機能評価機構 Minds のホームページで公開されている。この点について、インターネット上での公開を約 2/3 の回答者が知っていた。公開を知っていた回答者の中で、出版物とインターネットのどちらを主に利用するかを訪ねたところ、ほとんど出版物を利用する、または、どちらかという出版物を利用するとの回答が約 7 割を締め、紙媒体の使いやすさが支持されていた。今後も、出版物を中心に作成し、その要旨をインターネットで簡便に閲覧できるようにする現在のスタイルを踏襲することが、多くの利用者に対し有用と考えられた。

4. 欧米のガイドラインとの比較

胆道癌に関しては、いくつかのガイドラインが欧米の諸団体からも発行されている。代表的なものとしては英国の British Association for the Study of the



ホームページ (組織名)	アドレス
がん診療ガイドライン(日本癌治療学会)	http://www.jsco-cpg.jp
医療情報サービスMinds (日本医療機能評価機構)	http://minds.jcqh.or.jp
がん情報サービス(国立がんセンターがん対策情報センター)	http://ganjoho.jp (上記へのリンクのみ)

図 4 胆道癌診療ガイドラインのインターネット上での公開

Liver (BASL) が中心となり作成されたもの¹¹⁾、米国の National Cancer Institute が提供する Physician Data Query (NCI PDQ)^{15,16)} (先端医療振興財団による翻訳版の公開有り)、National Comprehensive Cancer Network (NCCN) がまとめた Clinical practice guideline in oncology¹⁷⁾ があげられる。

そこで、これらの欧米のガイドラインと本ガイドラインのどちらが有用かについて質問したところ、79.9%の回答者が本邦の方が有用であるとし、同等との回答が 16.9%、欧米のガイドラインが有用との回答が 3.2%であったのに比較して、圧倒的に本邦のガイドラインが支持された。その理由として、欧米と本邦の医療に対する考え方、医療事情の違いをあげるものが多かった。加えて、本邦のガイドラインの方がより具体的できめ細かい内容であるとの意見もあった。一方、欧米のガイドラインの利点として、アルゴリズムがはっきりしていて、より簡潔で推奨が明確であることをあげる意見が多かった。また、インターネット上の公開を利用した頻繁な更新が行われている点を評価する意見もあった。

5. ガイドライン改定に向けた課題 (図 5)

次にガイドライン改定に関する問題についての質問を行った。まず、初版出版から改訂までの期間として適切なものほどの質問に対しては、4~5年との意見が半数を占め、2~3年との回答をあわせるとほとんどとなり、少なくとも5年以内の改訂を望む声が多かった。また、欧米のガイドラインのようにインターネットを利用して部分的にでも頻繁な改訂を望む意見があった。

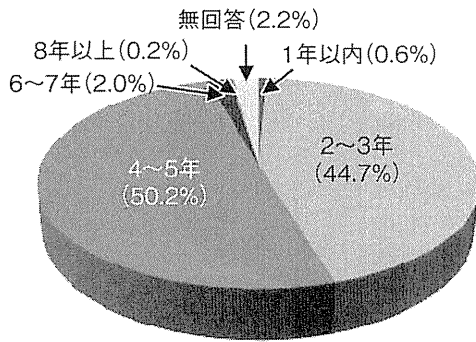
前述のように本ガイドラインは外科 14 名、内科 3 名、放射線科 1 名、計 18 名の委員によって作成されたが、この構成について適切との回答は約 4 割にとどまり、内科、放射線科の割合を増やした方がよいとの意見が半数以上を占めた。その他、これまで参加していない病理医、緩和ケア医、薬剤師、患者団体代表、医療経済学者など種々の専門領域からの参加を希望する意見がみられた。加えて、作成委員については固定せず、改訂ごとに適当数を交代することにより、新しい意見を積極的に取り入れやすい状況を作る方がよいとの意見があった。

IV. 改訂に向けた課題

このようなアンケート調査の結果を踏まえ、改訂に向けた課題としては以下があげられる。

推奨、推奨度についての意見が多く寄せられた。本疾患の診療に対するレベルの高いエビデンスが圧倒的に不足しているのが現状である。そのため、推奨度としてはインパクトの低い CI、すなわち、“高いレベルの科学的根拠はないが、行うことを考慮してもよい”が多くなっている。このため、推奨がはっきりしないことに対する不満の意見が認められた。ただ、一方で、一般的に行われているという理由だけで、エビデンスレベルを無視して推奨度を決定すると、ガイドラインが本来あるべき、Evidence based の精神からは大きく逸脱してしまう可能性もあり、一部の専門家の意見のみが強調されてしまう危険性もはらんでいる。このため、作成委員の総意の元に明らかに推奨される項目に

ガイドライン改定時期として
適当な間隔は？



作成、評価委員の構成は適切か？

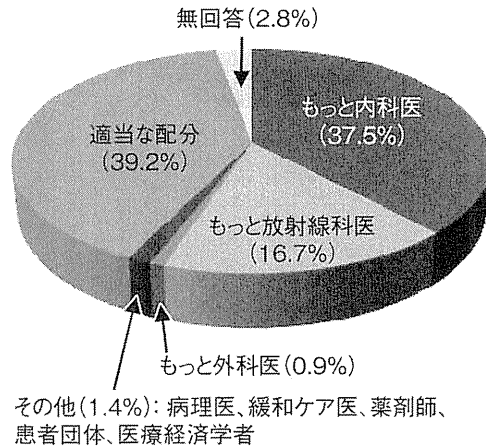


図 5 ガイドライン改訂作業に関する問題

対しては推奨度を上げることに、よりわかりやすいものにするには許容されると思われるが、そのためには後述のように作成委員の構成の適切さなどの条件が整っている必要がある。また、エビデンスレベルは、無作為割り付けをしているかどうかなど、試験の形態のみで決定されるため、実際は高いエビデンスレベルのものでも、その試験のデザインなどに問題があり、その結果を素直に受け入れることができないものも存在する。このようなことから、GRADE system など、近年はエビデンスの形態だけでなく、その内容にまで踏み込んでエビデンスレベルを決定する方法もあり、一考に値すると思われる。

また、クリニカルクエスチョン自体も新たなものを取り入れながら、その時代に合ったものにしていく必要がある。そのために、アンケートなどのように広く意見を拾い上げる仕組みを持つ必要があると同時に、作成委員も改訂のたびに一定の人数を入れ替え、新しい意見を組み込んでいく必要がある。

作成委員の構成に関しては、本邦では、本疾患の治療の中心が外科切除になることが多いことを反映し、作成委員 18 名中 14 名が外科医であった。医療事情の違いがあるので、一概に比較することはできないものの、2009 年の NCCN ガイドラインのパネルメンバーは外科医が多いものの、その数は 28 名中 11 名 (39%) であり、一方で、腫瘍内科医、内科医をあわせると 9 名 (32%) と、本邦よりその比率は多い。アンケート調査の意見でも内科医や放射線科医を増やす方がよいとの意見もあり、今後の課題であると思われる。

改訂の時期に関しては、5 年以内との意見が圧倒的

であり、その期待に応える必要がある。また、新しい重要なエビデンスが出た時点で、インターネットを使用するなどして適宜、改訂をするという意見も寄せられた。

胆道癌は依然、治療成績も十分ではなく、今後、よりよい診断、治療方法を求め、進歩していく必要がある。そのためにもガイドラインの記載で満足することなく、われわれは、既存の診断、治療方法を超越新しい方法を生み出していかなければならない。そのためにも学会主導の新たな臨床試験などを通し、しっかりとしたエビデンスの構築を行っていく必要がある。一方で、今までの視点と違った新しい考え方の芽をつぶさずに育てていくことも重要である。

まとめ

胆道癌診療ガイドラインの利用状況などの現況と、利用アンケート調査の結果を中心に、改訂に向けた課題を検討した。今後、これらの問題点を踏まえ、よりよいガイドラインの改訂に向けて努力していく必要がある。

参考文献

- 1) 胆道癌診療ガイドライン作成出版委員会編：エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン，第1版，医学図書出版，2007.
- 2) Field MJ, Lohr KN, eds : Institute of Medicine. Clinical practice guidelines : Directions for a new program, National Academy Press, Washington D. C., 1990.
- 3) 平田公一, 沖田憲司, 成田 茜, ほか : 最近のがん診療ガイドラインの動向. 臨外 65 : 17-28, 2010.
- 4) Takada T : Clinical practice guidelines for the management of biliary tract and ampullary carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 1, 2008.
- 5) Takada T, Miyazaki M, Miyakawa S, et al. : Purpose, use and preparation of clinical practice guidelines for the management of biliary tract and ampullary carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 2-6, 2008.
- 6) Miyakawa S, Ishihara S, Takada T, et al. : Flowcharts for the management of biliary tract and ampullary carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 7-14, 2008.
- 7) Miyazaki M, Takada T, Miyakawa S, et al. : Risk factors for biliary tract and ampullary carcinomas and prophylactic surgery for these factors. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 15-24, 2008.
- 8) Nagino M, Takada T, Miyazaki M, et al. : Preoperative biliary drainage for biliary tract and ampullary carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 25-30, 2008.
- 9) Tsukada K, Takada T, Miyazaki M, et al. : Diagnosis for biliary tract and ampullary carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 31-40, 2008.
- 10) Kondo S, Takada T, Miyazaki M, et al. : Guidelines for the management of biliary tract and ampullary carcinomas : surgical treatment. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 41-54, 2008.
- 11) Furuse J, Takada T, Miyazaki M, et al. : Guidelines for chemotherapy of biliary tract and ampullary carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 55-62, 2008.
- 12) Saito H, Takada T, Miyazaki M, et al. : Radiation therapy and photodynamic therapy for biliary tract and ampullary carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 63-68, 2008.
- 13) Tsuyuguchi T, Takada T, Miyazaki M, et al. : Stenting and interventional radiology for obstructive jaundice in patients with unresectable biliary tract carcinomas. J Hepatobiliary Pancreat Surg 15 : 69-73, 2008.
- 14) Khan SA, Davidson BR, Goldin R, et al. : Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma : consensus document. Gut (Suppl VI) : vi1-vi9, 2002.
- 15) National Cancer Institute : Extra bile duct cancer treatment (PDQ®). <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/bileduct/healthprofessional>
- 16) National Cancer Institute : Gallbladder cancer treatment (PDQ®). <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/gallbladder/healthprofessional/>
- 17) National comprehensive cancer network : NCCN Clinical practice guidelines in oncology™ Hepatobiliary cancers. V. 2.2010 <http://www.nccn.org>

* * *

Ⅲ. 胆・膵疾患

胆 嚢 癌

よしとみひでゆき¹⁾ きむらふみお²⁾ みやざき まさる³⁾
吉富秀幸¹⁾，木村文夫²⁾，宮崎 勝³⁾

¹⁾千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科学，
²⁾同 准教授，³⁾同 教授

ガイドラインの現況

胆嚢癌は未だ予後不良の疾患であるが，その診断，治療は独自の経験に基づいた診療が行われることが多く，施設間でのばらつきが大きいのが現状である。このような背景のもと，旧日本胆道外科研究会から日本肝胆膵外科学会が事業を引き継ぎ，胆管癌，十二指腸乳頭部癌も含めた胆道癌に対する本邦初の診療ガイドラインが2007年に発行された¹⁾。本ガイドラインは，クリニカルクエスチョン方式を採用し，臨床現場で問題になる疑問点に対し，推奨，推奨度，解説を加えて本疾患に関わる医療従事者の一助になるように作成されている。また，その簡略版が日本癌治療学会 (<http://www.jsco-cpg.jp/>) や日本医療機能評価機構 Minds (<http://minds.jcqh.or.jp/>) のホームページ上で公開されている。レベルの高いエビデンスが少ない本疾患を診療するうえで，世界をリードする本邦の専門家が初めてその指針を示した意義は大きく，加えて英文発表も行っており²⁾，本ガイドラインは高く評価されている。

どういう疾患・病態か



胆管・胆嚢癌は地域集積性があり，世界中でも日本をはじめとした東アジア，インドは罹患者数が多い。本邦における年間罹患者数は約18,000人とされ，その中でも胆嚢癌は特に女性に多いという特徴を持つ。膵・胆管合流異常は胆嚢癌を含む胆管癌の極めて高い危険因子である。また，胆嚢癌には胆石症を合併する頻度が高く，危険因子とする報告もある。しかし，胆石症の長期観察の結果では，その有無により胆嚢癌発生頻度に差がないとの報告も多く，本症が胆嚢癌のリスクファクターであるかどうかははっきりしていない。

初発症状としては右上腹部痛，悪心嘔吐を多く認めるものの，本疾患に特異的な症状は少ない。また，無症状で発見される症例も罹患者数の約1/3をしめる。

胆嚢癌は胆嚢の解剖学的な特徴のため，進展すると肝臓や肝動脈，門脈といった脈管への浸潤をきたしやすく，それにより，治療方針が大きく異なってくる。また，遠隔転移をきたしやすく，進行癌では依然，予後不良の疾患である。一方で，ステージⅠ症例の外科切除後5年生存率は約90%と良好であり，早期発見が治療成績の向上に重要である。

治療に必要な検査と診断



前述のように，胆道癌ではその進行度，浸潤範囲により治療方針が大きく異なる。そのため，壁進達度，浸潤範囲，遠隔転移の有無をできるだけ正確に診断することが重要となる。また，胆嚢腺筋症や黄色肉芽腫性胆嚢炎等の良性疾患との鑑別が困難なことも多く，経験を持った専門医が診断に関わることが必

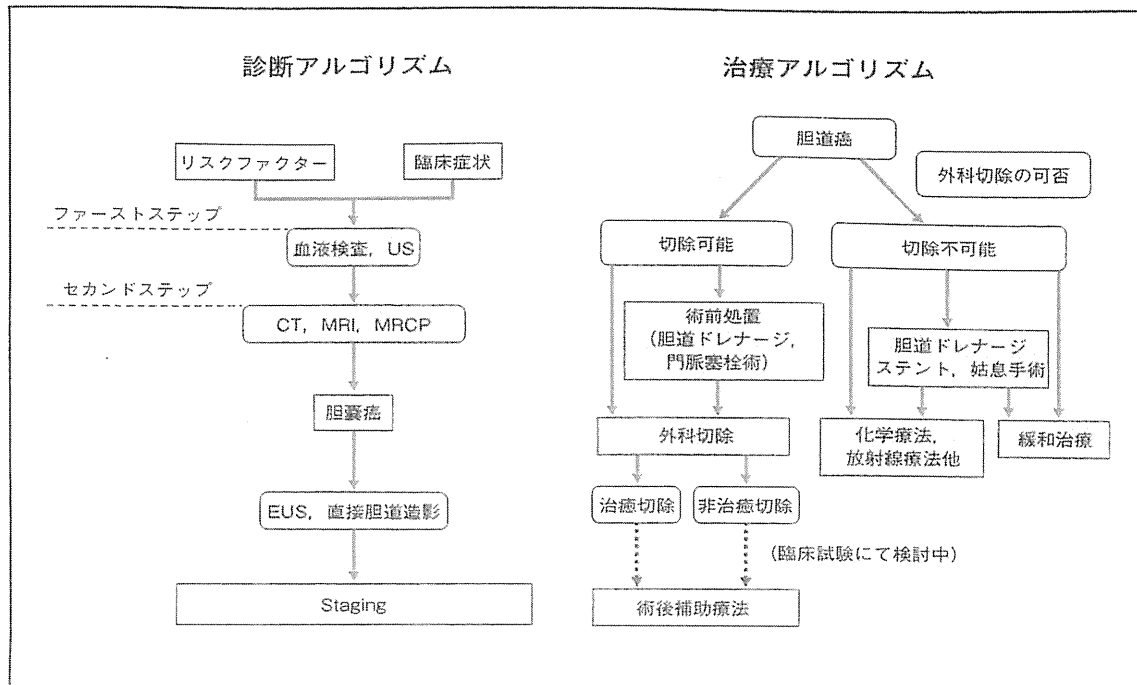


図1 診療アルゴリズム (文献1:胆道癌診療ガイドライン作成出版委員会, 2007を参照して作成)

要である。

診断のファーストステップは血液検査と腹部超音波検査である。ただ、血液検査では特異的な所見はなく、補助的な役割となる。一方、腹部超音波検査は胆嚢癌症例の50%以上を腫瘍として描出することができるとされ、その簡便性、非侵襲性から、まず施行すべき検査である。

進展度診断にはCT、超音波内視鏡(EUS)が有効である。特に近年、multi detector row CT (MDCT) の進歩が著しく、これによる造影CTは、遠隔転移診断だけでなく、肝直接浸潤や、血管、胆管への浸潤範囲の診断に大いに役立つ。EUSは良性疾患との鑑別における感度が95%前後と高く、また、壁進展度診断においては、他の検査と比較し最も正診率が高い検査であり、本疾患の診断に欠かすことができない。これらの検査に加え、MRI、MRCPは胆道閉塞、胆管浸潤の部

位や隣・胆管合流異常の合併の有無の診断に有効である。診断アルゴリズムを図1に示す。

治療の実際



胆嚢癌に対しては外科切除が唯一、治癒を見込める治療法であり、本疾患の治療の根幹をなす。よって、可能であれば積極的に外科切除を行う。切除不能症例に対しては化学療法を行うことが一般的である。放射線治療は胆嚢癌に対しては報告が少なく、その臨床的意義は定まっていない。以下に、外科切除、化学療法の詳細について解説する。

1 外科切除

a) 適応

胆嚢癌に対する外科切除は、ごく初期の症例を除き、肝切除を伴うことが多く、心肺機能を含む全身状態がmajor surgeryに耐術可能かどうかを慎重に判断する必要がある。そ