

- cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 133 : 937–950, 2007
- 2) Shimada M, Sugimoto K, Iwahashi S et al : CD133 expression is a potential prognostic indicator in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol* 45 : 896–902, 2010
  - 3) Wang M, Xiao J, Shen M et al : Isolation and characterization of tumorigenic extrahepatic cholangiocarcinoma cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 128 : 72–81, 2011
  - 4) Gradilone A, Gazzaniga P, Raimondi C et al : Comment on: isolation and characterization of tumorigenic extrahepatic cholangiocarcinoma cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 128 : 1997–1998, 2011
  - 5) Gouw AS, Clouston AD, Theise ND : Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* 54 : 1853–1863, 2011
  - 6) Nakanuma Y : A novel approach to biliary tract pathology based on similarities to pancreatic counterparts: is the biliary tract an incomplete pancreas? *Pathol Int* 60 : 419–429, 2010
  - 7) Carpino G, Cardinale V, Onori P et al : Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *J Anat* 220 : 186–199, 2012
  - 8) Cardinale V, Wang Y, Carpino G et al : Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology* 54 : 2159–2172, 2011
  - 9) Sutton ME, Op den Dries S, Koster MH et al : Regeneration of human extrahepatic biliary epithelium: the peribiliary glands as progenitor cell compartment. *Liver Int* 32 : 554–559, 2012
  - 10) Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T et al : Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 38 : 552–570, 1997
  - 11) Nakanuma Y, Zen Y, Portman BC : Diseases of the bile ducts. In: *MacSween's Pathology of the Liver* (Eds. Burt A, Portman B, Ferrell L) Churchill Livingstone 6th ed., Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 2011, pp491–562
  - 12) Turner R, Lozoya O, Wang Y et al : Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* 53 : 1035–1045, 2011
  - 13) Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V et al : Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology*, 2012 (in press)
  - 14) Igarashi S, Matsubara T, Harada K et al : Bile duct expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 in perihilar cholangiocarcinogenesis. *Histopathology*, 2012 (in press)
  - 15) Terada T, Nakanuma Y, Kakita A : Pathologic observations of intrahepatic peribiliary glands in 1000 consecutive autopsy livers. *Heterotopic pancreas in the liver*. *Gastroenterology* 98 : 1333–1337, 1990
  - 16) Terada T, Nakanuma Y : Immunohistochemical demonstration of pancreatic alpha-amylase and trypsin in intrahepatic bile ducts and peribiliary glands. *Hepatology* 14 : 1129–1135, 1991
  - 17) Terada T, Nakanuma Y : Pathological observations of intrahepatic peribiliary glands in 1,000 consecutive autopsy livers. II. A possible source of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 12 : 92–97, 1990
  - 18) Cardinale V, Wang Y, Carpino G et al : Mucin-producing cholangiocarcinoma might derive from biliary tree stem/progenitor cells located in peribiliary glands. *Hepatology*, 2012 (in press)
  - 19) Zen Y, Fujii T, Itatsu K et al : Biliary papillary tumors share pathological features with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hepatology* 44 : 1333–1343, 2006
  - 20) Nakanuma Y, Sato Y : Cystic and papillary neoplasm involving peribiliary glands: A biliary counterpart of branch-type IPMN? *Hepatology*, 2012 (in press)
  - 21) Nakanishi Y, Nakanuma Y, Ohara M et al : Intraductal papillary neoplasm arising from peribiliary glands connecting with the inferior branch of the bile duct of the anterior segment of the liver. *Pathol Int* 61 : 773–777, 2011
  - 22) Kozaka K, Sasaki M, Fujii T et al : A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'. *Histopathology* 51 : 390–400, 2007
  - 23) Yoshikawa S, Zen Y, Fujii T et al : Characterization of CD133+ parenchymal cells in the liver: histology and culture. *World J Gastroenterol* 15 :

- 4896-4906, 2009
- 24) Mizrak D, Brittan M, Alison MR : CD133: molecule of the moment. J Pathol 214 : 3-9, 2008
- 25) Fan L, He F, Liu H et al : CD133: a potential indicator for differentiation and prognosis of human cholangiocarcinoma. BMC Cancer 11 : 320, 2011
- 26) Paniz Mondolfi AE, Slova D et al : Mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC) of the gallbladder: a possible stem cell tumor? Pathol Int 61 : 608-614, 2011
- 27) Harada K, Sato Y, Ikeda H et al : Clinicopathologic study of mixed adenoneuroendocrine carcinomas of hepatobiliary organs. Virchows Arch 460 : 281-289, 2012

\* \* \*

## 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 : BiIN) 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 BilIN, IPNB の後期に出現することが知られている<sup>5)</sup>。私どもの検討でも BilIN 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。

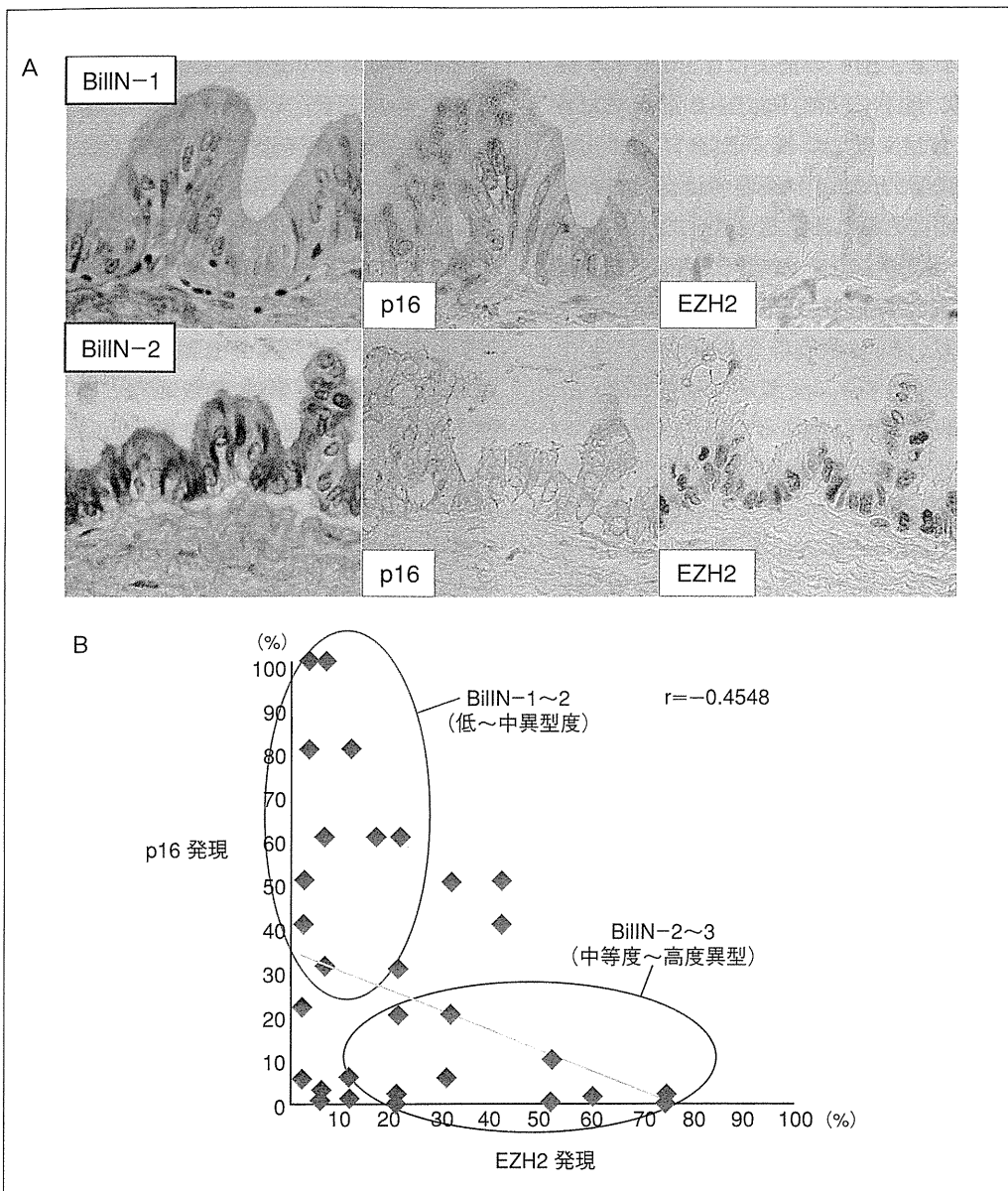
#### <EZH2>

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 BilIN の早期段階では p16 の発現亢進がしばしば見られる（図 1）。BilIN 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 BilIN-1, BilIN-2, BilIN-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 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 不活性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ると考えている (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 IPNB 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piteop/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>。

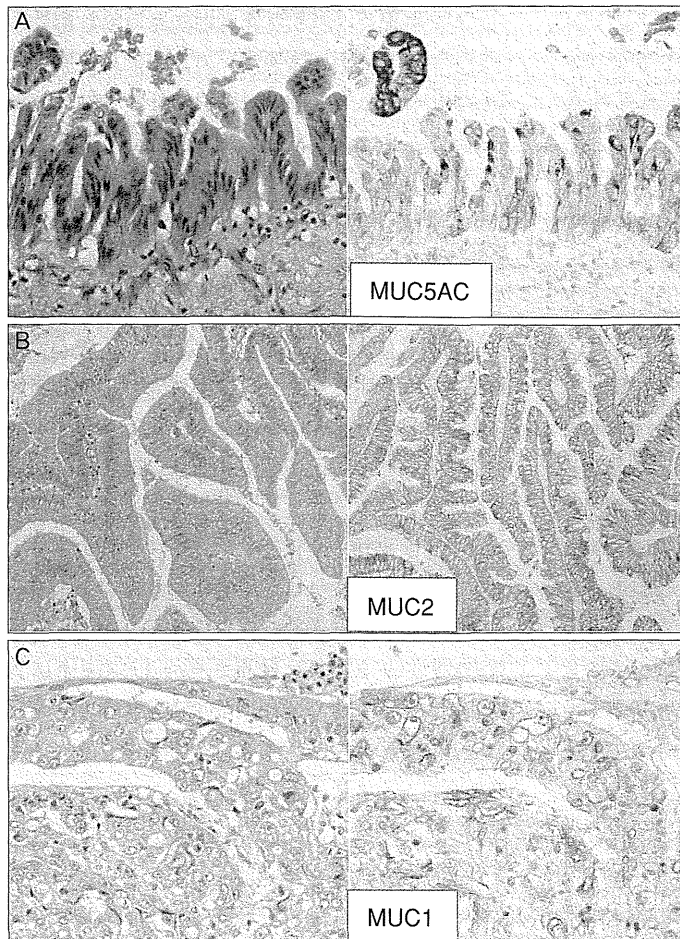
## 1. 胆管腫瘍

胆管癌の発癌過程では、BiIIN 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>。BiIIN 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（BiIN）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、BiIN 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 pancreaticobiliary 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

## &lt;総 説&gt;

## 胆石と胆嚢がん

正田 純一<sup>1)</sup> 川本 徹<sup>2)</sup>

要旨：胆石の既往が胆嚢がんのリスクを高めることが以前より知られている。胆嚢がんは他の癌腫と比較して発生数が少ないことより、その疫学研究はあまり進んでおらず、要因の解明も不十分である。本総説では、胆石と胆嚢がんとの関連性について、海外より報告された疫学研究の meta-analysis の解析結果と、本邦で行われた大規模住民集団の追跡研究である「多目的コホート研究」の検討結果を紹介する。また、胆石の自然史（転帰）についても言及する。無症候性胆石に対する予防的な胆嚢摘出術を施行することは胆嚢がんによる死亡を含めた上で生命予後の改善は認められないとのコンセンサスが得られている。すべての無症候性胆石が胆嚢がんの高危険群ではない。今後は高危険群を絞り込むために、胆石の保有に関連した慢性炎症と持続性の胆道上皮障害の存在を正確に反映するようなバイオマーカーの探索とその開発が望まれる。

索引用語： 胆石 胆嚢がん 疫学調査 自然史 ガイドライン

## はじめに

近年の我が国では人口の高齢化や食生活の欧米化などにより成人の胆石保有率は増加し、さらに、腹部超音波検査が人間ドックや検診、あるいは一般外来におけるスクリーニング検査に導入されたことより、胆石が発見される機会が多くなってきている。このように発見された胆石の大部分は無症候性胆石である。一方、胆石と胆嚢がんの関連性については以前より何度となく繰り返し議論がなされてきた<sup>1)2)</sup>。胆石の保有と胆嚢がんの発生の疫学調査、無症候性結石の自然史（転帰）に関するエビデンスを十分に理解し、無症候性胆石を含む胆石症への日常臨床における対応手順を検討することは重要である。本稿では、胆嚢がんの疫学と危険因子、胆石の自然史、診療ガイドラインにおける無症候性胆石の対応手順について概説したい。

## 胆嚢がんの疫学と危険因子

世界的に胆嚢がんは比較的少ない癌腫であるが、本邦は中南米や東欧と並び、胆道がんの発生率と死亡率は高いことが報告されている<sup>3)</sup>。すなわち、胆道がんには

は地域集積性がある。また、圧倒的に女性に多く、性別による発生頻度に違いが認められる。本邦では、胆道がん、すなわち、胆嚢がん・肝外胆管がんの死亡率が確実に上昇しており、厚生労働省による人口動態調査<sup>4)</sup>の報告によれば、本邦における 2006 年の胆嚢がん、胆管がん、乳頭部がんによる死亡者数は総数 16,855 人(男 7,942 人、女 8,913 人)である<sup>4)</sup>。本邦における胆嚢および胆管がんの発生率は、人口 10 万人に対し 10 数人であり国際的に比べても高い<sup>4)</sup>。今後、胆嚢および胆管がんは増加し、特に女性では、約 10 年後には、胃がんや乳がんを抜き、臓器別の癌死亡率では 5 番目に高いがん腫になると予想されている<sup>4)</sup>。胆嚢がんは女性に多く、男女比は 1:2 から 1:5 である<sup>4)</sup>。また、胆嚢がん症例の 8~9 割に胆石が認められている<sup>4)</sup>。

本邦における胆道がんの疫学調査では、国立がんセンターが施行した日本人の大規模住民集団の前向き追跡研究である「多目的コホート研究 (Japan Public Health Center-Based Prospective Study)」における報告が利用出来る<sup>5)</sup>。JPHC Study とは生活習慣とがん・脳卒中・心筋梗塞などの成人病との関係を解明するために、各保健所において 40~69 歳の男女約 13 万人を 1990 年と 1993 年から 2004 年までの追跡調査を行い、その解析結果を日本人の生活習慣病予防に役立てるための研究である。JPHC Study の中では、胆道がんのリスク要因を、胆石症の既往歴と肥満指数 (BMI) に焦点を当てて解

<sup>1)</sup> 筑波大学医学医療系スポーツ医学/同附属病院消化器内科

<sup>2)</sup> 東京女子医科大学消化器外科

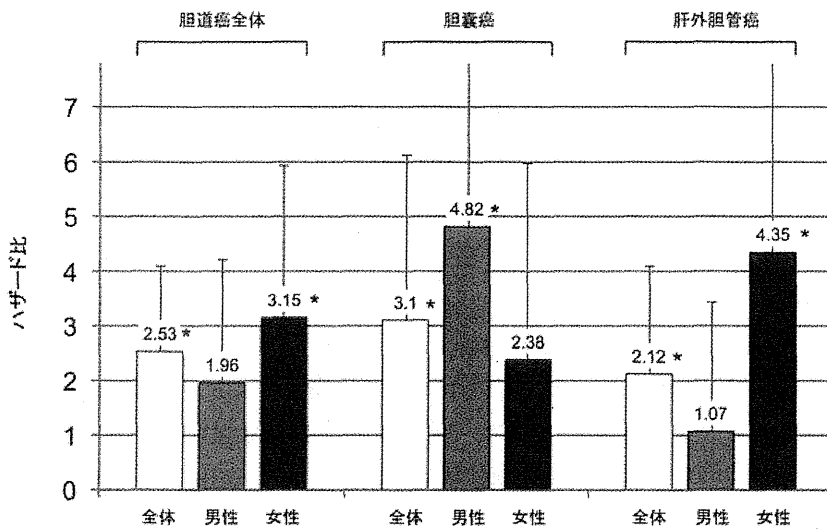


図1 胆石の既往と胆道がん(胆嚢がんと肝外胆管がん)調整因子として性、年齢、地域、喫煙、飲酒量、糖尿病既往歴、肥満度 \*統計学的に有意差あり ( $P < 0.05$ )  
(井上真奈美 胆と睪 2010 ; 31 : 177-179 より引用 一部改変)

析している。すなわち、研究開始時に施行した身長、体重、既往歴、喫煙や飲酒、食生活、運動などの生活習慣についてのアンケート調査の結果を用いて、胆石の既往の有無や体形によるグループ分けを行い、胆道がんにかかるリスクとの関連性を調べている。約11年の追跡期間に235人(男性129人、女性106人)が胆道がん(胆嚢がん、肝外胆管がん)に罹患した。部位別には、胆嚢がんが93人(男性30人、女性63人)、肝外胆管がんが142人(男性99人、女性43人)であった。部位別では、胆嚢がんは女性に多く、肝外胆管がんは男性に多かった。今回の解析結果より、胆石の既往のあるグループでは、既往のないグループに比較して、胆嚢がんのリスクが3.1倍、肝外胆管がんのリスクが2.1倍であった(図1)。胆石の既往による部位別のリスクを男女別に見ると、男性では胆嚢がんだけで、女性ではどちらの癌腫でも関連が見られたが、特に肝外胆管がんリスクが高いという結果であった(図1)。一方、肥満指数、糖尿病の既往、喫煙習慣、飲酒習慣は胆道がんリスクとの関連はなかった。本研究の成果により、胆石の既往が胆道がんのリスクとなることが確認されている。

胆嚢がんが胆石あるいは慢性胆嚢炎に合併することが多いこと<sup>6)7)</sup>、組織化学では胆嚢がんの周囲非癌部粘膜上皮には化生性あるいは異形成性変化を伴う慢性胆道炎が存在することより、また、実験的に胆道上皮に

炎症を生じさせると、過形成あるいは異形成性の病理学的な変化をきたし、細胞の増殖能が亢進することより、胆嚢がんの発癌機構には、胆道上皮の慢性炎症が危険因子であることが以前より指摘されている。このように胆嚢がんの発癌のリスクファクターとして胆嚢上皮の慢性的持続的性の刺激や炎症の病態が存在することが予測されている。炎症病態のもとでは、tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthetase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), epidermal growth factor (EGF) 受容体, erbB2 受容体, myeloid cell leukemia protein 1 (Mcl-1) 等の分子間の相互関係(図2)が活発になる<sup>8)~10)</sup>。すなわち、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ はiNOSを発現誘導し、過剰に産生されたNOにより酸化ストレスによる胆管上皮の障害が発生する。DNA damageの増加やDNA repairの抑制により遺伝子変異が促進される結果となる<sup>11)</sup>。また、誘導されたiNOSや胆汁中の酸化ステロールであるoxysterolsはCOX-2を誘導し、その結果、アラキドン酸代謝の活性化によるプロスタグランジンE2(PGE2)の産生の増加が生じ、癌細胞の増殖が加速する一方で、その生存期間も延長する。さらに、PGE2や胆汁酸はEGF受容体のtransactivationを引き起こし、COX-2の誘導やMcl-1(抗アポトーシス蛋白)の分解を阻止することでアポトーシスを抑制する。COX-2の発現異常は、胆石を有する胆嚢の病的上皮<sup>12)</sup>と同様に、膵胆管合

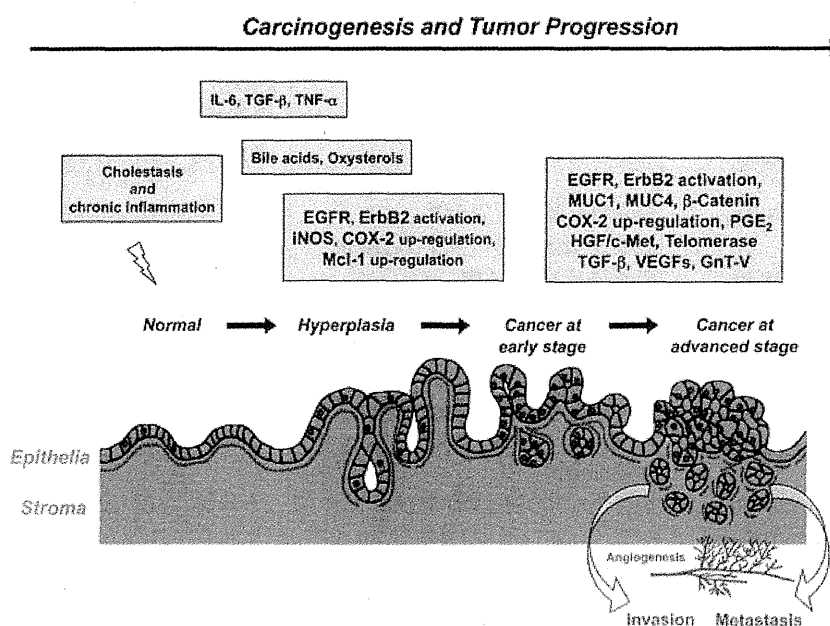


図2 胆道上皮からの発癌メカニズム

流異常症<sup>13)</sup>や細菌感染(腸チフスやヘリコバクター属)にも認められることより、慢性炎症の病態における胆嚢からの発がん機序には、原因には因らず、COX-2経路の活性化など共通部分が存在すると考えられる。

Randiらは胆嚢がんの危険因子に関するmeta-analysisの結果を報告している<sup>14)</sup>。胆石症から発症する胆嚢がんに関するrandomized control trial(RCT)は存在せず、cohort study<sup>6)15)16)</sup>やcase-control study<sup>17)~23)</sup>が存在するのみである。Meta-analysisの結果より、主要な危険因子には、胆石、良性胆嚢疾患の既往歴(主に胆石症)、良性胆嚢疾患の家族歴、肥満、多産婦、胆嚢の慢性感染症(チフス菌、パラチフス菌、ヘリコバクター属)が含まれている。経口避妊薬の使用が胆石形成のリスクを高めることが知られているが<sup>24)25)</sup>、胆嚢がんのリスクではないと報告している<sup>14)</sup>。Meta-analysisの結果を総括すると、胆嚢がんの発生に至る経路は広範囲にわたるが、主たる経路は胆石形成とその結果生じる胆嚢炎であるとしている。さらに本発がん経路は男性よりは女性において作用すると考えられる。

詳細には、胆石と胆嚢がんの発生に関して、Randiらは3つのcohort study<sup>6)15)16)</sup>と7つのcase-control study<sup>17)~23)</sup>よりmeta-analysisがなされている(表1)。胆石保有者の相対危険度は、これらstudyすべてを含めた場合では4.9、cohort studyのみでは2.2、case-control studyのみでは7.1であると報告している<sup>14)</sup>。Cohort

studyのうち、Maringhiniらは胆石が以前に指摘された2,583例の平均20年後の予後調査をretrospectiveに追跡し、胆石既往例における胆嚢がんの相対危険度は一般人口の2.8倍であると報告している<sup>15)</sup>。さらに、女性における発がん率は男性の約4倍であると報告している。Chowらは胆嚢結石を温存した17,715例、胆嚢摘出を行った42,461例の総計60,176例を4~16年間追跡し、胆嚢結石の温存例における相対危険度が3.6倍であったと報告している<sup>16)</sup>。Case-control studyではいずれにおいても、胆嚢がん症例と非胆嚢がん症例の比較により、それぞれにおける胆石保有率の観点より、胆石と胆嚢がんの発生に関連性を報告している<sup>17)~23)</sup>。

Randiらの解析結果を考案すると、胆石の保有と胆嚢がんの発生には関連性があることは考慮すべきである。一般人口に対して種々の因子(年齢、性別など)をmatchingさせた解析ではあるが、胆嚢がんの発生頻度が低いこと、また、解析された相対危険度も10倍以下の報告が殆どであることより、胆石の保有と胆嚢がんの発生には関連性はあるが、強い因果関係が存在するとの結論に至ることは出来ないであろう。

### 胆石の自然史は？

胆嚢がんは有病率の低い癌腫ではあるが、先に述べたように胆石と胆嚢がんには関連性が指摘されてきたことより、日常臨床において無症候性胆石は経過観察

表 1 胆嚢胆石と胆嚢がん発症の関連性に関するエビデンス

報告者 (年)	研究デザイン	対象と症例数	追跡または調査期間	発がんの相対危険度 (95% CI)
Maringhini (1987)	cohort study	胆嚢結石 2,583 例	20 年間	2.8 (0.9-6.6) 男性 8.3 (1.0-30.0), 女性 2.0 (0.4-5.7)
Chow (1999)	cohort study	胆嚢結石温存 17,715 例 胆嚢摘後 42,461 例 合計 60,176 例	4 ~ 16 年間	3.6 (2.6-4.9)
Yagyu (2004)	cohort study	胆嚢結石 113,394 例	11 年間	男性 1.2 (0.3-4.7), 女性 1.1 (0.4-2.9)
Lowenfels (1985)	case-control study	胆嚢がん 131 例と非胆嚢がん 2,399 例	6 ~ 20 年間	Non-Indians 4.4 (2.6-7.3) Indians 20.9 (8.1-54.0)
Nervi (1988)	case-control study	14,768 例の剖検例	9 年間	7.0 (5.9-8.3)
WHO (1989)	case-control study	胆嚢がん 58 例と非胆嚢がん 355 例	7 年間	2.3 (1.2-4.4)
Kato (1989)	case-control study	胆嚢がん 109 例, 胆管がん 84 例, 対照 386 例	4 年間	34.4 (4.5-266.0)
Zatonski (1997)	case-control study	胆嚢がん 196 例と非胆嚢がん 1,515 例	5 年間	4.4 (2.6-7.5)
Okamoto (1999)	case-control study	対照 194,767 例, 胆嚢結石 7,985 例	7 年間	10.8 (4.1-28.4)
Khan (1999)	case-control study	胆嚢がん 69 例, 対照 138 例	14 年間	26.6 (7.0-101.4), 女性 28.9 (4.7-173.0)

(伊佐山浩通 肝・胆・膵疾患治療のエビデンス 2007 ; 177-178 より引用 一部改変)

表 2 無症候性胆石の転帰に関するエビデンス

報告者 (年度)	対象	症例数	観察期間 (年)	急性胆嚢炎	重篤な合併症 (%)			
					顕著な黄疸	胆管炎	膵炎	胆嚢がん
Comfort (1948)	無症状胆石	112	15	0	0	0	0	0
Lund (1960)	無症状胆石	95	13	?	1	0	0	0
Gracie (1982)	無症状胆石	123	11	2	0	0	1	0
McSherry (1987)	無症状胆石	135	5	3	0	0	0	0
Friedman (1989)	無症状胆石	123	7	4	2	2	0	0
Thistle (1984)	無症状胆石 有症状胆石	305	2	3	0	0	0	0

(正田純一 肝・胆・膵疾患治療のエビデンス 2007 ; 174-176 より引用 一部改変)

で良いかどうか、方針に迷う場面は少なからず存在する。そこで、過去に行われたエビデンスレベルの高い臨床研究(表 2)を参照しつつ、無症候性胆石の自然史(転帰)について検討した。

無症候性胆石の転帰に関するエビデンスについて代表的な論文を表 2<sup>26)~31)</sup>に示す。Thistle ら<sup>31)</sup>は、無症候性胆石を含む 305 名の胆石症(胆嚢結石症)患者を無治療にて 2 年間追跡したところ、追跡調査前の 1 年間に胆道痙攣を経験した有症状患者では、2 年間に 69% の患者において症状の再燃を認めたが、一方、調査前に胆道痙攣を経験しなかった無症状患者では、31% のみ症状が出現したと報告している。また、Friedman ら<sup>30)</sup>は、123 名の無症候性結石の患者を 5 年間にわたり経過観察している。その結果、急性胆嚢炎などの重症合併症の発生頻度は 4% であったと報告している。さ

らに、合併症の発生に関しては、男性よりも女性に、やせた患者よりも肥満した患者に多く、経過観察期間が長期にわたるほど合併症の発生頻度は低下してくると報告している。表 2 のいずれの報告についても、無症候性胆石の経過観察の期間における重篤な合併症の頻度は数パーセントと非常に低く、また、胆嚢がんの発生を認めた症例は存在しなかったことが示されている。

本邦における無症候性胆石からの胆嚢がんの発症は 2-3 例 (0-0.5%) であったと報告されている<sup>32)~35)</sup>。このように国内外からの報告を合わせると、無症候性胆石保有者における胆嚢がんの発生は稀であると解釈できる。

## 「診療ガイドライン」の無症候性胆石における胆嚢がん発生の対応手順

胆嚢がんの疫学、無症候性胆石の転帰に関するエビデンスレベルの高い臨床研究を参照しながら、「胆道癌診療ガイドライン」<sup>36)</sup>と「胆石診療ガイドライン」<sup>37)</sup>の2つの診療ガイドラインにおいて無症候性胆石における胆嚢がん発生の対応手順が示されている。いずれのガイドラインにおいても、無症候性胆石に対して胆嚢摘出術を勧める根拠は不十分であるとして、胆嚢がん発生に対応するための予防的胆嚢摘出術は推奨されない。無症候性胆石は十分胆嚢を評価できる状況下では肝機能障害の発生、胆嚢がん合併の可能性を考慮した検査をしながら経過観察することが推奨されている。

対応手順に関するまとめとして、胆嚢がんの発生頻度はきわめて低い。また、Fendrickらのdecision analysis modelを用いた検討<sup>38)</sup>において、無症候性胆石に対する予防的な胆嚢摘出術を施行することは胆嚢がんによる死亡を含めた上で生命予後の改善は認められていない。現在のところ、胆嚢がんの高危険群、大胆石(3 cm以上)<sup>39)</sup>や陶磁器様胆嚢<sup>40)</sup>などの胆嚢がんの高危険群を除外すると、無症候性胆石に対する外科的介入による胆嚢がんの予防効果は得られないと結論することが出来る。

すべての無症候性胆石が胆嚢がんの高危険群ではない。今後は高危険群を絞り込むために、胆石の保有、それによる慢性炎症と持続性の胆道上皮障害の存在を正確に反映するようなバイオマーカーの探索とその開発が望まれる。

## 文 献

- 1) Sheth S, et al. Primary gallbladder cancer: recognition of risk factors and the role of prophylactic cholecystectomy. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1402—1410
- 2) Hsing AW, et al. Family history of gallstones and the risk of biliary tract cancer and gallstones: a population-based study in Shanghai, China. *Int J Cancer* 2007; 121: 832—838
- 3) Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No.5, version 2.0. Lyon: IARC press, 2004
- 4) 厚生労働省大臣官房統計情報部：人口動態統計。厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/t>

- oukei/saikin/index.html
- 5) Ishiguro S, Inoue M, Kurahashi N, et al. Risk factors of biliary tract cancer in a large-scale population-based cohort study in Japan (JPHC study); with special focus on cholelithiasis, body mass index, and their effect modification. *Cancer Causes Control* 2008; 19: 33—41
  - 6) Yagyu K, Lin Y, Obata Y, et al; JACC Study Group. Bowel movement frequency, medical history and the risk of gallbladder cancer death: A cohort study in Japan. *Cancer Sci* 2004; 95: 674—678
  - 7) Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Munoz N, et al. Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin* 2008; 51: 349—364
  - 8) 正田純一. 胆道癌の発癌・進展過程における分子メカニズムと分子標的治療の可能性について. *胆道* 2009; 23: 762—774
  - 9) 正田純一. 胆道癌発生の分子機序. *Annual Review 消化器* 2011. 東京：中外医学社, 2010: 293—299
  - 10) Shoda J, Kawamoto T, Yamamoto M. Gallbladder Cancer—Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. In: Aiello CV, ed. *Gallbladder Cancer*. New York: NOVA Science Publishers, 2011, In press
  - 11) Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, et al. Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. *Nitric Oxide* 2004; 11: 175—183
  - 12) Marketa H, et al. Expression of COX-2 is associated with p53 accumulation in premalignant and malignant gallbladder lesions. *Eur J Gastroenterol & Hepatol* 2008; 20: 732—739
  - 13) Wu GS, et al. Bile from a patient with anomalous pancreaticobiliary ductal union promotes the proliferation of human cholangiocarcinoma cells via COX-2 pathway. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1094—1097
  - 14) Randi G, Franceschi S, Vecchia CL. Gallbladder cancer world wide: Geographical distribution and risk factors. *Int J Cancer* 2006; 118: 1591—1602
  - 15) Maringhini A, Moreau JA, Melton LJ III, et al. Gallstones, gallbladder cancer, and other gastrointestinal malignancies. An epidemiologic study in Rochester, Minnesota. *Ann Intern Med* 1987; 107: 30—35
  - 16) Chow WH, Johansen C, Gridley G, et al. Gallstones, cholecystectomy and risk of cancers of the liver, biliary tract and pancreas. *Br J Cancer* 1999; 79: 640—644

- 17) Lowenfels AB, Walker AM, Althaus DP, et al. Gallstone growth, size, and risk of gallbladder cancer: an interracial study. *Int J Epidemiol* 1989; 18: 50—54
- 18) Nervi F, Duarte I, Gomez G, et al. Frequency of gallbladder cancer in Chile, a high-risk area. *Int J Cancer* 1988; 41: 657—660
- 19) WHO. Combined oral contraceptives and gallbladder cancer. The WHO collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives. *Int J Epidemiol* 1989; 18: 309—314
- 20) Kato K, Akai S, Tominaga S, et al. A case-control study of biliary tract cancer in Niigata Prefecture, Japan. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 932—938
- 21) Zatonski WA, Lowenfels AB, Boyle P, et al. Epidemiologic aspects of gallbladder cancer: a case-control study of the SEARCH Program of the International Agency for Research on Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1132—1138
- 22) Okamoto M, Okamoto H, Kitahara F, et al. Ultrasonographic evidence of association of polyps and stones with gallbladder cancer. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 446—450
- 23) Khan ZR, Neugut AI, Ahsan H, et al. Risk factors for biliary tract cancers. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 149—152
- 24) Novacek G. Gender and gallstone disease. *Wien Med Wochenschr* 2006; 156: 527—533
- 25) Grodstein F, Colditz GA, Hunter DJ, et al. A prospective study of symptomatic gallstones in women: relation with oral contraceptives and other risk factors. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 207—214
- 26) Comfort MW, Gray HK, et al. The silent gallstone: a ten to twenty year follow-up study of 112 cases. *Ann Surg* 1948; 128: 931—937
- 27) Lund J. Surgical indications in cholelithiasis: prophylactic cholecystectomy elucidated on the basis of long-term follow up on 526 nonoperated cases. *Ann Surg* 1960; 151: 153—161
- 28) Gracie WA, Ransohoff DF. The natural history of silent gallstones: the innocent gallstone is not a myth. *N Eng J Med* 1982; 302: 798—800
- 29) McSherry CK, Ferstenberg H, Calhoun WF, et al. The natural history of diagnosed gallstone disease in symptomatic and asymptomatic patients. *Ann Surg* 1987; 202: 59—63
- 30) Friedman GD, Raviola CA, Fireman B. Prognosis of gallstones with mild or no symptoms: 25 years of follow-up in a health maintenance organization. *J Clin Epidemiology* 1989; 42: 127—136
- 31) Thistle JL, Cleary PA, Lachin JM, et al. The national history of cholelithiasis: the National Cooperative Gallstone Study. *Ann Intern Med* 1984; 101: 171—175
- 32) 和田浩一, 和田孝次, 今村敏郎. 無症状胆石の自然経過. *日本臨床* 1993 ; 7 : 1737—1743
- 33) 阿部朝美, 杉浦信之, 積田玲子, ほか. 無症状胆石の自然史に基づく治療法の選択. *胆と膵* 1998 ; 19 : 283—286
- 34) 乾 和郎, 中澤三郎, 芳野純治, ほか. 無症状胆石と胆嚢癌に関する臨床的検討. *胆と膵* 1998 ; 19 : 283—286
- 35) 竹内文康, 堀口祐爾, 今井英夫, ほか. 無症状胆石の取り扱いとその転帰. *胆と膵* 1998 ; 19 : 297—301
- 36) 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. 東京 : 医学図書出版, 2007
- 37) 日本消化器病学会. 胆石症診療ガイドライン. 南江堂, 2009
- 38) Fendrick AM, Gleeson SP, Cabana MD, et al. Asymptomatic gallstones revisited. Is there a role for laparoscopic cholecystectomy? *Arch Fam Med* 1993; 2: 959—968
- 39) Lowenfels AB, Walker AM, Althaus DP, et al. Gallstone growth, size, and risk of gallbladder cancer: an interracial study. *Int J Epidemiol* 1989; 18: 50—54
- 40) Stephen AE, Berger D. Carcinoma in the porcelain gallbladder: A relationship revisited. *Surgery* 2001; 129: 699—703



## Gallbladder Cancer and Gallstone

Junichi Shoda<sup>1)</sup>, Toru Kawamoto<sup>2)</sup>

Gallbladder cancer is a relatively rare neoplasm that differs from other cancers of the digestive tract. Therefore, the epidemiology has not well progressed and the risk factors have not been fully elucidated. With respect to the association between gallbladder cancer and gallstones, this review article introduced the data on the meta-analysis of the published findings that were conducted abroad, and those on the results of the Japan Public Health Center-Based Prospective Study, an epidemiological study based on the prospective follow-up of a large number of the Japanese population that has recently been reported from the Ministry of Health, Welfare, and Labor. This review also refers to the natural history of gallstone disease. There has been a consensus that a prophylactic cholecystectomy for subjects with asymptomatic gallstones does not improve their survival outcome throughout a decreased number of mortality, because of gallbladder cancer. It may not be true that all subjects with asymptomatic gallstones carry a high risk of gallbladder cancer. In the future, in order to focus attention on the high risk subjects, exploration and development of useful biomarkers is desired for the detection of gallstone-associated chronic inflammation and persistent biliary epithelial injury, which in turn are closely related to gallbladder carcinogenesis.

*JJBA 2012; 26: 205—211*

---

<sup>1)</sup> Field of Basic Sports Medicine, Sports Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba (Ibaraki)

<sup>2)</sup> Department of Surgery, Institute of Gastroenterology, Tokyo Women's Medical University (Tokyo)

**Key Words:** gallstone disease, gallbladder cancer, epidemiology, natural history, guidelines

# Novel Function of Niemann-Pick C1-Like 1 as a Negative Regulator of Niemann-Pick C2 Protein

Yoshihide Yamanashi,<sup>1,2\*</sup> Tappei Takada,<sup>1,\*</sup> Jun-Ichi Shoda,<sup>3</sup> and Hiroshi Suzuki<sup>1</sup>

The hepatic expression of Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), which is a key molecule in intestinal cholesterol absorption, is high in humans. In addition to NPC1L1, Niemann-Pick C2 (NPC2), a secretory cholesterol-binding protein involved in intracellular cholesterol trafficking and the stimulation of biliary cholesterol secretion, is also expressed in the liver. In this study, we examined the molecular interaction and functional association between NPC1L1 and NPC2. *In vitro* studies with adenovirus-based or plasmid-mediated gene transfer systems revealed that NPC1L1 negatively regulated the protein expression and secretion of NPC2 without affecting the level of NPC2 messenger RNA. Experiments with small interfering RNA against NPC1L1 confirmed the endogenous association of these proteins. In addition, endocytosed NPC2 could compensate for the reduction of NPC2 in NPC1L1-overexpressing cells, and this demonstrated that the posttranscriptional regulation of NPC2 was dependent on a novel ability of NPC1L1 to inhibit the maturation of NPC2 and accelerate the degradation of NPC2 during its maturation. Furthermore, to confirm the physiological relevance of NPC1L1-mediated regulation, we analyzed human liver specimens and found a negative correlation between the protein levels of hepatic NPC1L1 and hepatic NPC2. **Conclusion:** NPC1L1 down-regulates the expression and secretion of NPC2 by inhibiting its maturation and accelerating its degradation. NPC2 functions as a regulator of intracellular cholesterol trafficking and biliary cholesterol secretion; therefore, in addition to its role in cholesterol re-uptake from the bile by hepatocytes, hepatic NPC1L1 may control cholesterol homeostasis via the down-regulation of NPC2. (HEPATOLOGY 2012;55:953-964)

Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) is a key protein involved in intestinal cholesterol absorption.<sup>1,2</sup> In most animal species, NPC1L1 is highly expressed in the proximal intestine (where dietary cholesterol is absorbed).<sup>1,3-5</sup> In humans, it has been reported that NPC1L1 is highly expressed in the liver in addition to the intestine.<sup>1,3</sup> *In vivo* studies of mice expressing human NPC1L1 from a liver-specific promoter have revealed that hepatic NPC1L1 may be involved in cholesterol reabsorption from the bile by hepatocytes.<sup>6</sup> On the basis of these findings, NPC1L1 is believed to play critical

roles in cholesterol uptake in the intestine and in re-uptake in the liver.

NPC1L1 was originally identified as a homolog of Niemann-Pick C1 (NPC1)<sup>7</sup>; mutations of the latter result in the acquisition of NPC disease, which is a neurovisceral disorder characterized by an accumulation of free cholesterol within endosomes and lysosomes.<sup>8,9</sup> In addition to mutations in the NPC1 gene, mutations in the NPC2 gene also cause an accumulation of cholesterol in late endosomes and lysosomes and can result in the development of NPC disease in some patients.<sup>10</sup> NPC2 is a small secretory protein that is widely

*Abbreviations:* ABC, adenosine triphosphate-binding cassette; Ad-GFP, green fluorescent protein-expressing adenovirus; Ad-NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1-expressing adenovirus; Ad-NPC1L1-HA, Niemann-Pick C1-like 1/HA tag-expressing adenovirus; Ad-NPC2-Myc-His, Niemann-Pick C2/c-Myc tag/6 × histidine tag-expressing adenovirus; CHO-K1, Chinese hamster ovary K1; Endo H, endoglycosidase H; ER, endoplasmic reticulum; GM2AP, GM2 ganglioside activator protein; HMW, higher molecular weight; IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate; LMW, lower molecular weight; LXR, liver X receptor; MGI32, N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal; MOI, multiplicity of infection; mRNA, messenger RNA; NgBR, Nogo-B receptor; NPC, Niemann-Pick C; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1; NS, not significant; PCR, polymerase chain reaction; PNGase F, peptide N-glycosidase F; R<sub>s</sub>, Spearman's rank correlation coefficient; siControl, control small interfering RNA; siNPC1L1, small interfering RNA targeted against Niemann-Pick C1-like 1; WT, wild type.

From the Departments of <sup>1</sup>Pharmacy and <sup>2</sup>Pharmacology and Pharmacokinetics, University of Tokyo Hospital, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; and <sup>3</sup>Division of Sports Medicine, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Tsukuba University, Ibaraki, Japan.

Received May 20, 2011; accepted October 8, 2011.

This work was supported by grants from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology and by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas for the High-Definition Physiology project (22136015).

\*These authors contributed equally to this work.

expressed in the body and specifically binds unesterified sterols with nanomolar affinity.<sup>11</sup> Recent studies have revealed that NPC2 can transfer its bound cholesterol to NPC1 in late endosomes and lysosomes to facilitate intracellular cholesterol trafficking.<sup>12,13</sup>

In addition to its role as a regulator of intracellular cholesterol trafficking, NPC2 may contribute to whole-body cholesterol homeostasis. Klein et al.<sup>14</sup> found that NPC2 is expressed in the liver and secreted into the bile in both mice and humans. Moreover, in a recent study,<sup>15</sup> we found that biliary NPC2 positively regulates biliary cholesterol secretion by stimulating cholesterol efflux, which is mediated by a heterodimer of adenosine triphosphate-binding cassette G5 (ABCG5) and ABCG8, a cholesterol exporter expressed in the liver.<sup>16</sup> Physiologically, the amount of cholesterol secreted into the bile each day is similar to the amounts synthesized in the liver and absorbed from the intestine,<sup>17</sup> and this suggests the importance of biliary cholesterol in cholesterol homeostasis. The biliary secretion of NPC2 is, therefore, thought to be important in the maintenance of the whole-body cholesterol level.

Although it has been shown that NPC2 cooperates with NPC1<sup>12,13</sup> and ABCG5/ABCG8,<sup>15</sup> the functional interaction between NPC1L1 and NPC2 has not yet been clarified. Although it has been demonstrated that secreted NPC2 has little effect on NPC1L1-mediated cholesterol uptake,<sup>15,18</sup> considering the fact that NPC1L1 is expressed in intracellular compartments besides the plasma membrane,<sup>3</sup> we have hypothesized that there may be an intracellular interaction between NPC1L1 and NPC2.

In this article, we show that NPC1L1 interacts with NPC2 during the maturation of NPC2. In addition, the results of *in vitro* assays with NPC1L1-overexpressing cells or cells in which NPC1L1 was knocked down with small interfering RNA as well as analyses with human liver specimens indicate that NPC1L1 downregulates the protein expression and secretion of NPC2 by inhibiting its maturation and by accelerating its degradation during the maturation process. These findings demonstrate a novel function of NPC1L1 as a negative regulator of NPC2 in addition to its role as a cholesterol (re-)uptake transporter.

## Materials and Methods

**Construction of Expression Vectors and Recombinant Adenoviruses.** The expression vector for c-terminally HA-tagged human NPC1L1 complementary DNA (NPC1L1-HA) was constructed as reported previously.<sup>(2,19,20)</sup> The expression vectors for c-terminally c-myc- and 6 x histidine-tagged human NPC2 complementary DNA (NPC2-Myc-His) and human GM2 ganglioside activator protein complementary DNA (GM2AP-Myc-His) were constructed as described in the supporting information.

Recombinant adenoviruses expressing each complementary DNA [Niemann-Pick C1-like 1-expressing adenovirus (Ad-NPC1L1), Niemann-Pick C1-like 1/HA tag-expressing adenovirus (Ad-NPC1L1-HA) and Niemann-Pick C2/c-myc tag/6 x histidine tag-expressing adenovirus (Ad-NPC2-Myc-His)] were prepared with the Adeno-X Tet-Off 1 expressing system (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions and were purified by cesium chloride gradient centrifugation. A tetracycline-responsive transcriptional activator-expressing adenovirus and a green fluorescent protein-expressing adenovirus (Ad-GFP)<sup>21</sup> were purified with the same method. The titer of each purified virus (plaque-forming units per milliliter) was determined with the Adeno-X rapid titer kit (Takara Bio), and the multiplicity of infection (MOI) was determined by the normalization of the virus titer to the cell count in each experiment.

**Immunoblot Analyses.** Immunoblot analyses were performed as described in the supporting information.

**Metabolic Labeling of NPC2.** Chinese hamster ovary K1 (CHO-K1) cells infected with the indicated adenoviruses were first incubated in methionine/cysteine-free minimal essential medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) for 30 minutes. The cells were then incubated in a labeling medium containing a 100 mCi/mL [<sup>35</sup>S]methionine/cysteine cell labeling mix (PerkinElmer, Waltham, MA) and were collected at the indicated times. The cells were lysed with a radio immunoprecipitation assay buffer (0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5% deoxycholate, and 1% Nonidet P-40) and immunoprecipitated with 1  $\mu$ g of a mouse anti-Myc antibody (Roche Applied Science,

Address reprint requests to: Tappei Takada, Ph.D., Department of Pharmacy, University of Tokyo Hospital, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan 113-8655. E-mail: tappei-tyk@umin.ac.jp; fax: +81-3-3816-6159.

Copyright © 2011 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.24772

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Indianapolis, IN), as described in the supporting information. The immunoprecipitates were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and exposed to a super-resolution phosphor imager (PerkinElmer). The radioactivity was detected with a Cyclone phosphor imager (Packard, Haverhill, MA).

**Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR).** To determine the messenger RNA (mRNA) levels of NPC2 and NPC1L1, quantitative real-time PCR was performed as described in the supporting information.

**Immunohistochemical Staining.** Immunohistochemical staining with HepG2 cells was performed as described in the supporting information.

**Cholesterol Staining.** For the detection of free intracellular cholesterol, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with filipin according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemicals). The relative intensity of filipin staining in intracellular compartments was quantified by the division of the intensity above the low threshold by the number of total pixels.<sup>22,23</sup>

**Collection of Human Liver Specimens.** All experiments involving human specimens were conducted according to a study protocol approved by the institutional review board of the University of Tokyo and Tsukuba University after informed consent was obtained from all subjects. Tumor tissue and surrounding tissue appearing to be grossly normal were obtained from nine liver cancer patients upon surgical resection. The tumor-adjacent normal tissue specimens were used for immunoblot analyses to determine the protein levels of NPC1L1 and NPC2 and for quantitative real-time PCR to determine the mRNA levels of these genes.

## Results

**NPC2 Coimmunoprecipitates With NPC1L1.** To examine the interaction between NPC1L1 and NPC2, we performed a coimmunoprecipitation assay. As shown in Fig. 1, NPC2 in the total cell lysate was detected at approximately 20 to 26 kDa, as reported previously.<sup>24</sup> The lower molecular weight (LMW) form of NPC2 (20 kDa) coimmunoprecipitated with NPC1L1 (HA, Fig. 1). Conversely, NPC1L1 coimmunoprecipitated with NPC2 (Myc, Fig. 1). These results suggest that NPC1L1 can interact with LMW NPC2.

**NPC1L1 Down-Regulates the Protein Expression of NPC2.** The expression of NPC2 and particularly its higher molecular weight (HMW) forms, which are detected at approximately 26 kDa,<sup>24</sup> was markedly reduced by the coexpression of NPC1L1 in adenovirus-based experiments (input, Fig. 1). This reduction in the

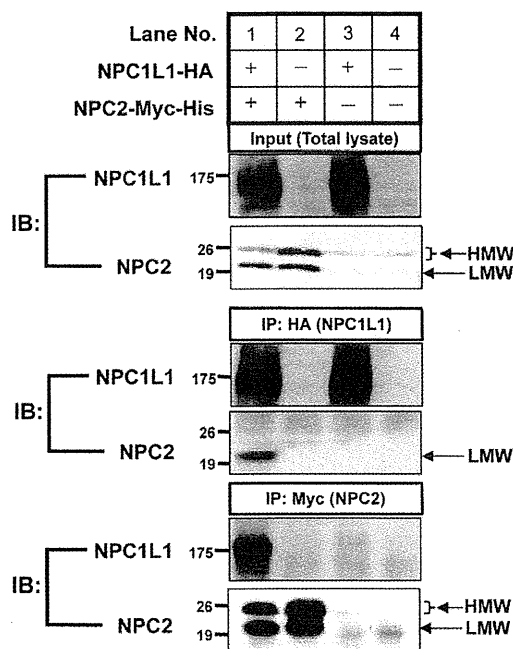


Fig. 1. Molecular association between NPC1L1 and NPC2. CHO-K1 cells were infected with Ad-NPC2-Myc-His, Ad-NPC1L1-HA, and Ad-GFP (the control) at 5 MOI. Twenty-four hours after infection, the cells were harvested, and a coimmunoprecipitation assay was performed as described in the supporting information. Anti-HA IPs, anti-Myc IPs, and the total lysate (the input) were subjected to IB analysis with an anti-HA antibody (to detect NPC1L1-HA) and an anti-His antibody (to detect NPC2-Myc-His). Abbreviations: IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate.

NPC2 protein level was also observed in plasmid-based experiments (lanes 2 and 3, Fig. 2A), although the expression level of NPC2 mRNA was not altered by the coexpression of NPC1L1 (Fig. 2B). Because the expression of endogenous NPC1, endogenous cathepsin D (Fig. 2A), and exogenous GM2AP (Supporting Fig. 1), which are also lysosomal proteins, was hardly affected by the coexpression of NPC1L1, the reduction in the NPC2 protein level did not likely result from a nonspecific effect of NPC1L1 on lysosomal protein expression.

**Maturation and Secretion of NPC2 Protein Are Inhibited by the Coexpression of NPC1L1.** A detailed analysis of the molecular association between NPC1L1 and NPC2 was performed. As shown in Fig. 2C, the expression of intracellular HMW NPC2 was dramatically reduced as the expression of NPC1L1 increased. In addition, the ratio of cellular LMW NPC2 to cellular HMW NPC2 was elevated by the increase in the expression of NPC1L1. Furthermore, because it had been reported that NPC2 is secreted extracellularly,<sup>24,25</sup> we also analyzed the effect of NPC1L1 on NPC2 secretion. As shown in Fig. 2C, the amount of NPC2 secreted into media was decreased by NPC1L1