

# 十二指腸癌の臨床病理学的・分子病理学的特徴

近藤修平

新潟大学大学院医歯学総合研究科分子・診断病理学分野

(指導：味岡洋一教授)

## Mucin Phenotype and Molecular Pathological Characteristics of Duodenal Adenocarcinoma

Shuhei Kondo

*Division of Molecular and Diagnostic Pathology,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Yoichi AJIOKA)*

**キーワード**：十二指腸癌, 粘液形質, 免疫染色, 遺伝子変異, 臨床病理, 分子病理

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子・診断病理学分野

近藤修平

Reprint request to: Shuhei Kondo

Division of Molecular and Diagnostic Pathology, Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences

## 要旨

外科的切除非乳頭部十二指腸癌 44 症例 44 病変を対象に、臨床病理学的特徴と、免疫組織学的検索による粘液形質、p53 蛋白過剰発現、*KRAS*、*GNAS*、*BRAF* 遺伝子変異、CpG island methylation phenotype (CIMP)、microsatellite instability (MSI) について検索した。十二指腸は部位により Brunner 腺の存在による構造的特徴が異なり、組織発生も異なる可能性があるため、Vater 乳頭の口側 30 例と肛門側 14 例とに分けた検討を行った。Vater 乳頭口側の癌では深達度 pT4b 症例の頻度が有意に高く ( $P=0.0046$ )、分化型腺癌の頻度が有意に低く ( $P=0.041$ )、神経侵襲陽性率が有意に高かった ( $P=0.0034$ )。粘液形質の検討では、十二指腸癌の 45%が胃型、20%が胃腸混合型、5%が小腸型、14%が大腸型、16%が粘液欠失型であったが、Vater 乳頭口側の癌は肛門側の癌に比べ胃型が有意に高頻度 ( $P=0.029$ ) であった。*KRAS* 変異を 48%、*GNAS* 変異を 15%、*BRAF* 変異を 8%の症例で認めた。p53 蛋白過剰発現は 25%、CIMP+は 35%、MSI-H は 15%であった。*GNAS* 変異、*BRAF* 変異は Vater 乳頭口側の癌でのみ認められ、*GNAS* 変異症例は MUC6 発現陽性症例が多く、Vater 乳頭口側発生癌では、Brunner 腺、胃腺窩上皮化生、異所性胃粘膜などを発生母地とするものが存在すると推定された。一方 Vater 乳頭肛門側発生癌では、adenoma-carcinoma sequence による発癌も想定されたが、十二指腸癌全体でみても *BRAF* 変異、CIMP+、MSI-H の併存例はなく、大腸にみられる serrated neoplasia pathway をたどるものは極めて稀と考えられた。以上のことから、十二指腸癌は Vater 乳頭口側か肛門側かにより、組織発生や発癌機序が異なる可能性が示唆された。

## 緒言

非乳頭部十二指腸癌は稀な疾患で、消化管悪性腫瘍に占める割合は 1%未満<sup>1)</sup>であり、単一施設での多数例の集積が困難なことから、その臨床病理学的特徴、組織発生、発癌機序などについては十分には解明されていない。十二指腸は広義の小腸に含まれており、WHO 分類をはじめとする多くの成書では非乳頭部十二指腸は小腸の項目で扱われている。しかし、十二指腸は粘膜下層に Brunner 腺が存在するという組織構築成分や、胃液・胆汁酸・膵液が合流するという環境因子が、狭義の小腸である空腸・回腸とは異なる。また、Brunner 腺の局在は Vater 乳頭口側に集中しており、等しく十二指腸であっても Vater 乳頭口側と肛門側では組織構築成分が異なっており、十二指腸癌の研究も、こうした発生部位を十分に考慮して行う必要がある。

同じ腸管の癌でも、十二指腸癌や空腸・回腸癌に比べ大腸癌では、その発生に関わる遺伝子変異や細胞形質としての粘液形質の研究が大きく先行している。非遺伝性大腸癌の発生・生長には、①

Adenoma-carcinoma sequence : 腺腫を前駆病変として、*APC*、*KRAS*、*p53* 等の遺伝子の段階的変異により癌が発生・生長する<sup>2)</sup>、②Serrated neoplasia pathway: 過形成性ポリープや SSA/P (sessile serrated adenoma/polyp)等の鋸歯状病変を前駆病変として、*BRAF* 遺伝子変異、CIMP (CpG island methylation phenotype)、ミスマッチ修復遺伝子の一つである *MLH1* の機能不全による MSI-H (microsatellite instability: 遺伝子不安定性)により癌が発生・生長する<sup>3)</sup>、の2つ経路が確立されている。粘液形質については、組織特異性のあるムチンコア蛋白(胃腺窩上皮細胞に発現する MUC5AC<sup>4)</sup>、胃幽門腺細胞と十二指腸 Brunner 腺に発現する MUC6<sup>4)5)</sup>、杯細胞に発現する MUC2<sup>6)</sup>)と小腸吸収上皮刷子縁に発現する CD10<sup>7)</sup> に対する免疫染色を用いた粘液形質分類<sup>8)9)</sup>があり、それと癌の組織発生や生物学的悪性度との関連についての検討がなされてきている<sup>8)-12)</sup>。

先行する大腸癌の遺伝子変異や粘液形質研究を背景として、近年では十二指腸癌についても、*APC* 変異率<sup>13)</sup>、*BRAF* 変異率<sup>13)-15)</sup>、CIMP+の頻度<sup>14)</sup>、*GNAS* 変異率<sup>16)17)</sup>、粘液形質<sup>18)-20)</sup>等が検討されているが、十二指腸癌の発生部位に焦点を当てた系統的検討はなされてきていない。

本研究では、十二指腸癌外科切除例を用いて、発生部位を Vater 乳頭口側と肛門側とに分け、それらの臨床病理学的特徴と分子病理学的特徴(粘液形質、p53 蛋白過剰発現、*KRAS*、*GNAS*、*BRAF* 遺伝子変異、CIMP 解析、MSI 解析)を検討し、十二指腸癌の組織発生と発癌機序について考察した。

## 対象と方法

### 対象

1980 年～2018 年までに新潟大学臨床病理学分野(旧第一病理学教室)、済生会新潟病院、済生会三条病院、燕労災病院で病理診断がなされたホルマリン固定外科切除十二指腸癌 44 症例 44 病変(進行癌 42 病変、SM 浸潤癌 2 病変)を検討対象とした。十二指腸乳頭部、胃、空腸、膵臓原発が疑われる病変、家族性大腸腺腫症および臨床的にリンチ症候群が疑われる症例、炎症性腸疾患合併例、術前に放射線・化学療法が行われた症例は対象から除外した。

### 方法

対象例のパラフィンブロックを薄切し、3μm 厚の連続切片 8 枚を作製した。1 枚目の切片にはヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を行い、2 枚目以降の切片には特殊染色(ビクトリア青弾性線維染色)と免疫染色を施行した。また遺伝子検索用にパラフィンブロックから 10 μm 厚の 10 枚の連続切片を作製した。

## 1. 組織学的検索

十二指腸癌取扱い規約は現在発刊されていないため、大腸癌取扱い規約第9版<sup>21)</sup>に従い病理所見を検索した。癌の腫瘍径、肉眼型については切除検体のカラー写真と肉眼所見の記載をもとに測定、判定した。組織所見(癌の組織型、深達度、浸潤増殖様式、神経侵襲、リンパ節転移)についてはHE染色標本を用いて評価した。リンパ管侵襲は後述するD2-40免疫染色で、静脈侵襲はピクトリア靑弾性線維染色で評価した。癌周囲の胃腺窩上皮化生、異所性胃粘膜、異所性膵、Brunner腺、Brunner腺過形成/過誤腫、Brunner腺腺腫の併存の有無についても評価した。

## 2. 免疫組織化学的検索

Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI) 法(ニチレイバイオサイエンス社)にて免疫染色を施行した。一次抗体にはMUC5AC (CLH2, Novocastra)、MUC6 (CLH5, Novocastra)、MUC2 (Ccp58, Novocastra)、CD10 (56C6, Novocastra)、D2-40 (D2-40, COVANCE)、p53 (PAb1801, Termo SCIENTIFIC)を用いた。発色剤にはdiaminobenzidineを用い、核染色はヘマトキシリンで行った。

MUC5AC、MUC6、MUC2免疫染色は細胞質が茶色に染色されるものを陽性、CD10免疫染色は管腔側細胞表面が茶色に染色されるものを陽性とし、それぞれ病変の5%以上の細胞が陽性のものを発現陽性病変とした<sup>22)</sup>。p53免疫染色は核が茶色に染色されるものを陽性細胞とし、陽性細胞の分布様式をnegative: 陽性細胞なし、sporadic: 陽性細胞が散在性に存在、nested: 陽性細胞集簇が散在性に存在、diffuse: 陽性細胞がびまん性に存在、に分類して、nestedとdiffuseを蛋白過剰発現とした<sup>23)</sup>。

## 3. 粘液形質分類

MUC5AC、MUC6を胃型マーカー、MUC2、CD10を腸型マーカーとして、癌の粘液形質を胃型、胃腸混合型、腸型(小腸型と大腸型)、粘液欠失型、に分類した<sup>9)</sup>(図1)。

## 4. DNA抽出

対象症例のパラフィンブロックから薄切した10 μm厚未染標本の腫瘍部と非腫瘍部を顕微鏡観察下のマニュアル操作でマイクロダイセクションを行い、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNA抽出を行った。腫瘍部の腫瘍細胞含有率は30%以上になるようにした。

## 5. 遺伝子変異解析

*KRAS* (exon 2, 3, 4)、*BRAF* (exon 15)、*GNAS* (exon 8, 9) を、AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR にて増幅した。増幅に用いたプライマーを表 1 に示す。PCR 産物は 3%アガロースゲルで電気泳動して、増幅を確認した後、ExoSAP-IT® (Thermo Fisher Scientific) で精製、これをテンプレートとして BigDye® Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、反応産物を NucleoSEQ (TAKARA BIO INC.) で精製した後、Genetic Analyser 3500 (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンス解析を行った。

## 6. マイクロサテライト不安定性 (MSI) 解析

MSI (microsatellite instability) 解析は BAT-25、BAT-26、NR-21、NR-24、NR-27 の 5 個のマイクロサテライトマーカーを用いて既報<sup>24)</sup> の手法で行った。不安定性が 2 個以上のマーカーで確認されるものを MSI-H、1 個のマーカーのみで確認されるものを MSI-L、いずれのマーカーでも確認されないものを MSS (MSI stable) と定義した<sup>24)</sup>。

## 7. CIMP (CpG island methylator phenotype) 解析

DNA を EpiTect® Bisulfite Kit (QIAGEN) でバイサルファイト処理し、5 個の CIMP マーカー (*CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3*、*SOCS1*) とリファレンス遺伝子 *ALU* を LightCycler®96 (Roche) を使用して定量 PCR を行った。各マーカー遺伝子のプライマーとプロンプは既報のものを用いて検索した<sup>25)</sup>。定量 PCR には EpiTect®MethyLight PCR kit (QIAGEN) を用い、DNA methylation レベルを測定した。5 個のマーカー中 3 個以上で PMR (percentage of methylated reference) > 10 を呈するものを CIMP+ と定義した<sup>25) 26)</sup>。

## 統計解析

Mann-Whitney U test、 $\chi^2$ 乗検定、Fisher の直接確率法を用いて統計検定を行った。P 値 < 0.05 を有意差ありとした。統計解析は EZR version 1.54 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いた。

## 結果

### 1. 臨床病理学的特徴 (表 2, 図 2, 図 3)

十二指腸癌 44 例のうち、68% (30/44) は Vater 乳頭口側に、32% (14/44) は肛門側に存在していた。十二指腸癌全体では、平均年齢は 65 歳 (40-85 歳)、平均腫瘍径は 47 mm (12-100 mm)、64% (28/44) が男性で 36% (16/44) が女性であった。組織型は 73% (32/44) が管状腺癌 (tub1, tub2) であった。乳頭腺癌 (pap) の 4 例中 1 例は著明な鋸歯状構造を呈していた (図 2)。粘液癌 (muc) は 2 例で、癌成分は低分化腺癌非充実型と印環細胞癌が主体であった。リンパ管侵襲陽性は 23% (10/44 例)、静脈侵襲陽性は 30% (13/44 例)、神経侵襲陽性は 27% (12/44 例)、リンパ節転移陽性は 70% (28/40 例) であった。肉眼型は 2 型 (潰瘍限局型) が 82% (36/44) であった。1 型 (隆起型) 2 例中 1 例は、粘膜下腫瘍様の発育を呈していた (図 3)。

十二指腸癌の発生部位による比較では、Vater 乳頭口側発生癌は肛門側発生癌に比して①組織型で分化型腺癌 (乳頭腺癌、管状腺癌) が有意に低頻度 ( $P = 0.041$ ) で、低分化腺癌 (por1, por2) と粘液癌は Vater 乳頭口側発生癌にのみ認められ、②深達度は pT4b 症例が有意に高頻度 ( $P = 0.0046$ )、③神経侵襲陽性が有意に高頻度 ( $P = 0.0034$ ) であった。年齢、男女比、浸潤増殖様式、脈管侵襲、リンパ節転移、肉眼型、腫瘍径に有意差はなかった。

代表切片における Vater 乳頭口側発生癌と肛門側発生癌の背景組織は (口側発生癌の 1 例は組織の大部分が癌で背景組織の確認不能)、胃腺窩上皮化生 (14/29 vs. 0/14)、異所性胃粘膜 (2/29 vs. 0/14)、異所性膵 (0/29 vs. 0/14)、Brunner 腺 (29/29 vs. 11/14)、Brunner 腺過形成/過誤腫 (1/29 vs. 0/14)、Brunner 腺腺腫の併存 (0/29 vs. 0/14) であった。

### 2. 分子病理学的特徴

#### 1) 粘液形質 (表 3, 図 4, 図 5)

正常の十二指腸粘膜では、絨毛および陰窩は MUC2 (+)、CD10 (+)、MUC5AC (-)、MUC6 (-) で、Brunner 腺は MUC2 (-)、CD10 (-)、MUC5AC (-)、MUC6 (+) であった (図 4)。胃腺窩上皮化生もしくは異所性胃粘膜表層の胃腺窩上皮部分は MUC2 (-)、CD10 (-)、MUC5AC (+)、MUC6 (-) で、胃底腺部分は MUC2 (-)、CD10 (-)、MUC5AC (+)、MUC6 (+) であった。

十二指腸癌 44 例では、正常の腸上皮で発現している MUC2、CD10 発現陽性例はそれぞれ 32% (14/44)、14% (6/44) であり、胃型マーカーである MUC5AC、MUC6 発現陽性例はそれぞれ 55% (24/44)、50% (22/44) であった (表 3)。粘液形質別の頻度 (表 3) では、45% (20/44) が胃型 (図 5: A-C)、20% (9/44) が胃腸混合型 (図 5: D-F)、5% (2/44) が小腸型 (図 5: G-I)、14% (6/44) が大腸型 (図 5: J-L)、16% (7/44) が粘液欠失型であった。発生部位による比較では、

Vater 乳頭口側発生癌は肛門側発生癌に比して胃型形質マーカーである MUC5AC 発現陽性例、MUC6 発現陽性例が有意に高頻度であり (67% vs. 29%, 63% vs. 21%) (それぞれ  $P = 0.018$ 、 $P = 0.0096$ )、粘液形質では胃型が有意に高頻度であった(57% vs. 21%) ( $P = 0.029$ )。

## 2) p53 免疫染色 (表 4)

p53 蛋白過剰発現とした nested および diffuse な染色態度を示した症例は 25% (11/44) であった。癌の発生部位との間に有意な違いは認めなかった。

## 3) 遺伝子変異・CIMP・MSI 解析 (表 4)

*KRAS*、*GNAS*、*BRAF* 遺伝子変異、CIMP は 44 例中 40 例、MSI は 33 例が検索可能であった。十二指腸癌全体では、*KRAS* 変異率は 48% (19/40)、*GNAS* 変異率は 15% (6/40)、*BRAF* 変異率は 8% (3/40) であった。*KRAS* 変異のうち 68% (13/19) は codon 12 に、*GNAS* 変異は 6 例全例で codon 201 に変異が認められ、*BRAF* 変異のうち V600E 変異は 33% (1/3) であった。MSI-H 頻度は 15% (5/33 例) で、CIMP+頻度は 35% (14/40 例) であった。癌の発生部位と遺伝子変異の間に有意な関係は認めなかったが、*GNAS* 変異と *BRAF* 変異は Vater 乳頭口側発生例のみに認められた。

## 3. 分子病理学的所見の対応 (図 6)

MSI 解析が可能であったものは 33 例に過ぎなかったため、MSI 解析結果を除外し、他の分子病理学的所見の全てが検索可能であった 40 例を対象として、発生部位別 (Vater 乳頭口側と肛門側) に、それぞれの分子病理学的所見の対応を検討した。

粘液形質と遺伝子変異との対応をみると、*KRAS* 変異は粘液形質との間に一定の傾向はなく胃型、胃腸混合型、大腸型、粘液欠失型で認められ、発生部位による違いも認めなかった。*GNAS* 変異は Vater 乳頭口側発生癌にのみ認められ、5/6 が胃型、1/6 が胃腸混合型であり、小腸型、大腸型粘液形質の癌には見られなかった。*GNAS* 変異 6 例は全例が、幽門腺/Brunner 腺マーカーである MUC6 を発現していた。また、*GNAS* 変異の 67% (4/6)は *KRAS* 変異も併存していた。*BRAF* 変異も Vater 乳頭口側発生癌にのみ認められたが、粘液形質との間には一定の傾向はなく、2/3 が胃型、1/3 が大腸型であった。*KRAS* 変異と *BRAF* 変異は完全に排他的であった。p53 蛋白過剰発現と CIMP+も粘液形質との間に一定の対応関係はなく、発生部位による発現の違いも認められなかった。*BRAF* 遺伝子変異 3 例中 CIMP+であったものは 1 例のみであった。

## 考察

非乳頭部十二指腸癌は稀な疾患で、消化管悪性腫瘍に占める割合は 1%未満であり<sup>1)</sup>、本研究でも、1980 年～2018 年までの 38 年間で十二指腸癌と病理診断がなされた SM 以深浸潤癌外科切除例は 44 例に過ぎなかった。非乳頭部十二指腸癌は小腸癌の項でまとめて扱われていることが多いが、十二指腸は胃液、胆汁・膵液の合流による環境因子が空腸回腸と同様ではなく、特に Vater 乳頭口側では Brunner 腺が存在することにより組織構築成分が大きく異なっている。非乳頭部十二指腸腫瘍を Vater 乳頭の口側と肛門側に分けて粘液形質を検討している報告もあるが<sup>19)</sup>、進行癌について発生部位を分けて、臨床病理学的所見、分子病理学的所見を系統的に検索した研究はない。

非乳頭部十二指腸癌を Vater 乳頭口側（以下口側）発生と Vater 乳頭肛門側（以下肛門側）発生とに分けて検討した本研究結果では、口側発生の癌は肛門側発生に比べ深達度がより深い (pT4b) 症例が有意に多かった ( $P=0.0046$ ) (表 2)。通常内視鏡検査での発見難易度では、肛門側発生癌がより進行した状態で発見されると推定していたが、反対の結果であった。本検討は全例外科切除例であり、全て有症状で発見されている。肛門側発生癌が口側発生癌に比べ深達度がより浅い状態で発見されていた理由としては、肛門側発生癌は、症状が出現し易い膵臓に近接している面積が広いこと、が挙げられる。更に、口側では Brunner 腺が粘膜から粘膜下層に豊富に存在していることから粘膜筋板が消失もしくは菲薄・断片化しており、粘膜筋板による癌浸潤に対する防御性が低いこと、口側発生癌では低分化腺癌や粘液癌の頻度、神経浸潤陽性頻度が肛門側発生癌に比べ有意に高いこと ( $P=0.041, 0.0034$ ) (表 2) から、口側では浸潤能の高い癌の発生頻度が高い可能性があること、等が考えられる。

粘液形質の検討では口側発生腫瘍は胃型形質を有するものが多いと報告されており<sup>19) 20)</sup>、本検討でも口側発生癌は肛門側発生癌に比べ胃型が有意に高頻度であった (57% vs. 21%) ( $P=0.029$ ) (表 3)。粘液形質の連続性から癌の前駆病変を推定すると、口側発生癌の前駆病変としては、(十二指腸粘膜の固有上皮以外に)、胃型粘液形質を発現する粘膜下層の Brunner 腺 (MUC6 を発現) (図 4)、胃腺窩上皮化生、異所性胃粘膜、胃型腺腫等が想定されうる。胃腺窩上皮化生は、十二指腸粘膜に対する持続的慢性刺激や、炎症により粘膜表層がびらん・潰瘍等により消失し Brunner 腺が十二指腸内腔面に露出した際に発生すると考えられている<sup>27)</sup>。

胃腺窩上皮化生、異所性胃粘膜、胃型腺腫と十二指腸癌との関連については、形態学的検討<sup>28)</sup><sup>29)</sup>に加え、これらに共通して *GNAS* 変異や *KRAS* 変異がみられる<sup>16) 17)</sup>ことから推測されている。しかしこのことは、十二指腸癌全体に対して想定されることではなく、口側発生例に限定される可能性が高い。十二指腸癌における *GNAS* 変異の頻度は 17% と報告されている<sup>17)</sup>。本検討でも



GNAS 変異を 15% (6/40) で認めたと (表 4)、それらは全て口側発生の胃型もしくは胃腸混合型十二指腸癌であり、67% (4/6) は KRAS 変異も併存していた (図 6)。更に 1 例は粘膜下腫瘍様の発育 (図 3) を呈していることから、口側発生の胃型腺癌には Brunner 腺由来の癌も含まれていることが推測される。

GNAS 変異は膵管内乳頭粘液性腫瘍で高頻度に存在するという報告から始まり<sup>30)</sup>、大腸絨毛腺腫、虫垂粘液産生腫瘍でも高頻度に存在することが報告されたが<sup>31) 32)</sup>、十二指腸胃腺窩上皮化生の 41%、幽門腺型腺腫の 92%でも認められており<sup>16) 17)</sup>、発癌の比較的早期からみられる遺伝子変異と考えられる。本検討で十二指腸癌の背景粘膜を確認したところ、口側では胃腺窩上皮化生を 48% (14/29)、異所性胃粘膜を 7% (2/29)、Brunner 腺を 100% (29/29) で認めたのに対し、肛門側では Brunner 腺は 79% (11/14) に認められたものの、胃腺窩上皮化生は 0% (0/14)、異所性胃粘膜は 0% (0/14) であった。このことは、GNAS 変異による発癌が、口側発生の十二指腸癌に特徴的現象である可能性を支持するものと考えられる。

十二指腸癌では、家族性大腸腺腫症患者における十二指腸腺腫の発生<sup>33)</sup>や腺腫と腺癌の併存例の存在<sup>34)</sup>から、大腸の adenoma-carcinoma sequence<sup>2)</sup>と同様の組織発生が推定されていた。しかし、十二指腸腺腫の 85%以上は腸型腺腫で<sup>13) 19)</sup>、腸型腺腫の 91%が CD10 を発現、89%が APC 変異、11%が KRAS 変異を有する一方で、十二指腸癌では APC 変異が 9%と低頻度であることから、十二指腸上皮性腫瘍の多くを占める腸型腺腫の癌化は稀であるとも考えられている<sup>13)</sup>。本研究では APC 変異は解析していないが、小腸形質である CD10 発現と KRAS 遺伝子変異は口側発生癌と肛門側発生癌とで異なっていた。十二指腸癌全体での CD10 発現頻度は 14% (6/44) (表 3)であったが、発生部位を口側と肛門側に分けて検討すると、肛門側発生癌の CD10 発現頻度は 29% (4/14)であった。また、KRAS 遺伝子変異は十二指腸癌全体では 48% (19/40)であったが、口側発生が 39% (11/28)に対して肛門側発生は 67% (8/12)であり、統計的有意差はないものの、肛門側発生癌では CD10 発現率や KRAS 変異率が高い傾向があった(表 4)。更に KRAS 変異については、上述したように口側発生癌では GNAS 変異を併存したものが 4 例あったが、肛門側発生癌では GNAS 変異を併存していたものはなかった(0/8) (図 6)。これらのことから、Vater 乳頭肛門側に発生する十二指腸癌の中には、大腸と同様に(上述した胃型形質をもつ病変ではなく)腸型腺腫を前駆病変とする adenoma-carcinoma sequence による癌化機序も存在すると推定される。

本検討では CIMP+症例は十二指腸癌の 35% (14 例) に認められ、大腸癌の 18%<sup>25)</sup> に比してやや高頻度であった。CIMP+の大腸癌では、女性、近位大腸、MSI-H、BRAF 変異が高頻度にみられると報告されており、serrated neoplasia pathway の大腸癌との関連が指摘されている<sup>25) 30)</sup>。十二指腸癌のこれまでの検討では CIMP+の頻度は 27%<sup>14)</sup> と報告されているが、BRAF 変異は 0%～

9%<sup>13)-15)</sup>で、そのうち V600E 変異の頻度は 10% と大腸癌と異なり低頻度と報告されている<sup>15)</sup>。既報では、粘液形質や遺伝子異常相互の関連について不明な点が多いが、十二指腸鋸歯状病変では、CIMP+が 50%でも *BRAF* 変異は認めず、大腸鋸歯状病変とは異なる病変であるとも報告されている<sup>26)</sup>。本研究対象にも鋸歯状構造を呈した癌が 1 例あったが (図 2)、*BRAF* 変異は無かった。また、本研究でも、*BRAF* 変異率は 8% (3/40)、CIMP+は 35% (14/40)と既報の範囲内であり、口側発生癌と肛門側発生癌とで差は無く、更に *BRAF* 変異と CIMP+が併存したものは 1 例のみ (図 6) であった。MSI-H は十二指腸癌全体で 15% (5/33)で、肛門側発生 (38%, 3/8) が口側発生 (8%, 2/25)に対して頻度が高かったが (有意差なし)、*BRAF* 変異を併存しているものはなかった (データ未提示)。これらのことから、十二指腸癌については、口側・肛門側を問わず、大腸癌にみられる serrated neoplasia pathway をたどるものはほとんど無いと推定される。

本検討結果から、十二指腸癌の発生やそれに関わる遺伝子変異は、Vater 乳頭口側発生か肛門側発生かにより異なる可能性が推定されたが、検討対象の主体が進行癌であり、癌の進展にともない粘液形質や遺伝子変異にも変化が加わっている可能性も否定できない。十二指腸癌の組織発生や発生機序を解明するためには、より早期の病変 (粘膜内癌や胃型・腸型腺腫, Brunner 腺腺腫等) を対象とした検討が今後の課題であるが、発生部位 (Vater 乳頭の口側か肛門側か) 別解析が必須であること強調したい。

## 結論

進行癌を主対象として本研究では、粘液形質や *GNAS*、*KRAS* 遺伝子変異の点から、非乳頭部十二指腸癌の組織発生や発癌機序は Vater 乳頭口側発生か肛門側発生かにより異なることが推測された。Vater 乳頭口側発生癌では胃型の頻度が高く、*GNAS* 変異、*KRAS* 変異検索結果を合わせると、Brunner 腺、胃腺窩上皮化生、異所性胃粘膜などを発生母地とするものが存在し、Vater 乳頭肛門側発生癌では大腸と同様に adenoma-carcinoma sequence で発生するものが存在する可能性があるが、口側発生、肛門側発生いずれも serrated neoplasia pathway をたどるものはほとんど無いと考えられた。十二指腸癌の組織発生や発癌機序の更なる解明には、早期病変の検討が必要あるが、検討に際しては発生部位を Vater 乳頭口側か肛門側かに分けることが必須である。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科分子・診断病理学分野 味岡洋一教授に深謝いたします。また、標本作製、免疫染色、遺伝子解析等の協力頂きました同分野職員 (山口尚之、佐藤彩子、小林和恵) の皆様に深謝いたします。

## 文献

- 1) Lepage C, Bouvier A-M, Manfredi S, Dancourt V, Faivre J: Incidence and management of primary malignant small bowel cancers: a well-defined French population study. *Am J Gastroenterol* 101: 2826-2832, 2006.
- 2) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM and Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532, 1988.
- 3) Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND ed. : WHO Classification of Tumours of the Digestive System. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2010.
- 4) Machado JC, Nogueira AM, Carneiro F, Reis CA and Sobrinho-Simoes M: Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J Pathol* 190: 437-443, 2000.
- 5) Bartman AE, Buisine MP, Aubert JP, Niehans GA, Toribara NW, Kim YS, Kelly EJ, Crabtree JE and Ho SB: The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J Pathol* 186: 398-402, 1998.
- 6) Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, Ho SB, Tsuda T, Toribara NW, Gum JR and Kim YS: Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* 107: 28-36, 1994.
- 7) Endoh Y, Tamura G, Motoyama T, Ajioka Y and Watanabe H: Well-differentiated adenocarcinoma mimicking complete-type intestinal metaplasia in the stomach: *Human Pathol* 30: 826-832, 1999.
- 8) Ajioka Y, Allison LJ and Jass JR: Significance of MUC1 and MUC2 mucin expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 49: 560-564, 1996.
- 9) Yao T, Tsutsumi S, Akaiwa Y, Takata M, Nishiyama K, Kabashima A and Tsuneyoshi M: Phenotypic Expression of Colorectal Adenocarcinomas with Reference to Tumor Development and Biological Behavior. *Jpn J Cancer Res* 92: 755-761, 2001.
- 10) Takata M, Yao T, Nishiyama K, Nawata H and Tsuneyoshi M: Phenotypic alteration in malignant transformation of colonic villous tumours: with special reference to a comparison with tubular tumours. *Histopathology* 43: 332-339, 2003.

- 11) Ohji Y, Yao T, Eguchi T, Yamada T, Hirahashi M, Iida M and Tsuneyoshi M: Evaluation of the risk of liver metastasis in colorectal adenocarcinoma based on the combination of risk factors including CD10 expression: Multivariate analysis of clinicopathological and Immunohistochemical factors. *Oncol Rep* 17: 525-530, 2007.
- 12) Hirano K, Nimura S, Mizoguchi M, Hamada Y, Yamashita Y and Iwasaki H: Early colorectal carcinomas: CD10 expression, mucin phenotype, and submucosal invasion. *Pathol Int* 62: 600-611, 2012.
- 13) Ishizu K, Hashimoto T, Naka T, Yatabe Y, Kojima M, Kuwata T, Nonaka S, Oda I, Esaki M, Kudo M, Gotohda N, Yoshida T, Yoshikawa T and Sekine S: APC mutations are common in adenomas but infrequent in adenocarcinomas of the non-ampullary duodenum. *J Gastroenterol* 56: 988-998, 2021.
- 14) Fu T, Pappou EP, Guzzetta AA, Jeschke J, Kwak R, Dave P, Hooker CM, Morgan R, Baylin SB, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL and Ahuja N: CpG island methylator phenotype-positive tumors in the absence of MLH1 methylation constitute a distinct subset of duodenal. *Clin Cancer Res* 18: 4743-4752, 2012.
- 15) Schrock AB, Devoe CE, McWilliams R, Sun J, Aparicio T, Stephens PJ, Ross JS, Wilson R, Miller VA, Ali SM and Overman MJ: Genomic profiling of small-bowel adenocarcinoma. *JAMA Oncol* 3: 1546-1553, 2017.
- 16) Matsubara A, Sekine S, Kushima R, Ogawa R, Taniguchi H, Tsuda H and Kanai Y: Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum. *J Pathol* 229: 579-587, 2013.
- 17) Matsubara A, Ogawa R, Suzuki H, Oda I, Taniguchi H, Kanai Y, Kushima R and Sekine S: Activating GNAS and KRAS mutations in gastric foveolar metaplasia, gastric heterotopia, and adenocarcinoma of the duodenum. *Br J Cancer* 112: 1398-1404, 2015.
- 18) Jun SY, Eom DW, Park H, Bae YK, Jang KT, Yu E, Hong SM: Prognostic significance of CDX2 and mucin expression in small intestinal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 27: 1364-1374, 2014.
- 19) Yoshida M, Shimoda T, Abe M, Kakushima N, Kawata N, Takizawa K, Ono H and Sugino T. Clinicopathological characteristics of non-ampullary duodenal tumors and their phenotypic classification. *Pathol Int* 69: 398-406, 2019.
- 20) Ushiku T, Arnason T, Fukayama M and Lauwers GY. Extra-ampullary duodenal

adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 38: 1484-1493, 2014.

21) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 第9版, 金原出版, 東京, 2018.

22) Shiroshita H, Watanabe H, Ajioka Y, Watanabe G, Nishikura K and Kitano S: Re-evaluation of mucin phenotypes of gastric minute well differentiated-type adenocarcinomas using a series of HGM, MUC5AC, MUC6, M-GGMC, MUC2, and CD10 stains. *Pathol Int* 54: 311-321, 2004.

23) Oohashi Y, Watanabe H, Ajioka Y and Hatakeyama K: p53 immunostaining distinguishes malignant from benign lesions of the gall-bladder. *Pathol Int* 45: 58-65, 1995.

24) Søreide K, Slewa A, Stokkeland PJ, van Diermen B, Janssen EA, Søreide JA, Baak JP, Kørner H: Microsatellite instability and DNA ploidy in colorectal cancer: potential implications for patients undergoing systematic surveillance after resection. *Cancer* 115: 271-282, 2009.

25) Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass JR, Haile R and Laird PW: CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38: 787-793, 2006.

26) Rosty C, Campbell C, Clendenning M, Bettington M, Bunchanan DD and Brown IS: Do serrated neoplasms of the small intestine represent a distinct entity? Pathological findings and molecular alterations in a series of 13 cases. *Histopathology* 66: 333-342, 2015.

27) Kushima R, Manabe R, Hattori T and Borchard F: Histogenesis of gastric foveolar metaplasia following duodenal ulcer: a definite reparative lineage of Brunner's gland. *Histopathology* 35: 38-43, 1999.

28) Kushima R, Stolte M, Dirks K, Vieth M, Okabe H, Borchard F and Hattori T. Gastric-type adenocarcinoma of the duodenal second portion histogenetically associated with hyperplasia and gastric-foveolar metaplasia of Brunner's glands. *Virchows Arch* 440: 655-659, 2002.

29) Kushima R, Rütthlein HJ, Stolte M, Bamba M, Hattori T and Borchard F. 'Pyloric gland-type adenoma' arising in heterotopic gastric mucosa of the duodenum, with dysplastic progression of the gastric type. *Virchows Arch* 435: 452-457, 1999.

30) Wu J, Matthaei H, Maitra A, Aal Molin M, Wood LD, Eshleman JR, Goggins M, Canto MI, Schulick RD, Edil BH, Wolfgang CL, Klein AP, Diaz LA, Allen PJ, Schmidt CM, Kinzler KW,

Papadopoulos N, Hruban RH, Vogelstein B. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med* 3: 92ra66, 2011.

31) Yamada M, Sekine S, Ogawa R, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kanai Y. Frequent activating GNAS mutations in villous adenoma of the colorectum. *J Pathol* 228: 113-118, 2012.

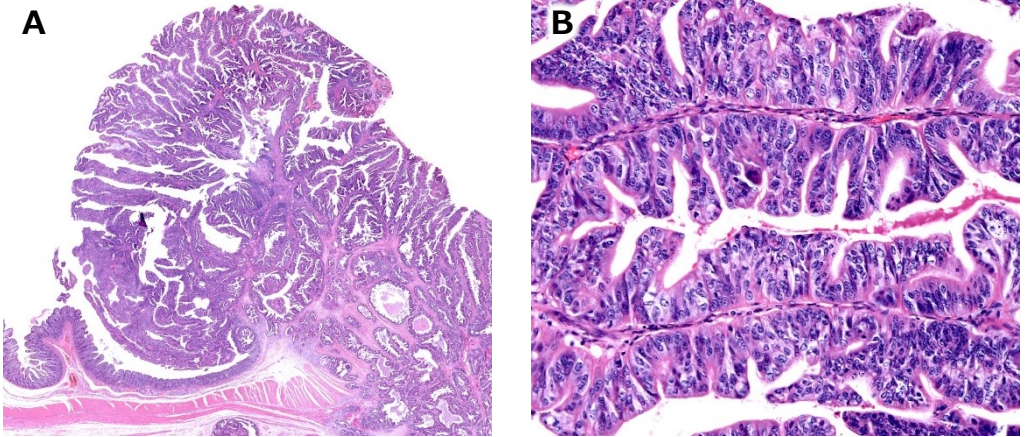
32) Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, Matsubara A, Mori T, Taniguchi H, Kushima R, Hiraoka N, Tsuta K, Tsuda H, Kanai Y. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms. *Br J Cancer* 108: 951-958, 2013.

33) Spigelman AD, Talbot IC, Penna C, Nugent KP, Phillips RKS, Costello C, DeCosse JJ and The Leeds Castle Polyposis Group (Upper Gastrointestinal Committee): Evidence for adenoma-carcinoma sequence in the duodenum of patients with familial adenomatous polyposis. *J Clin Pathol* 47: 709-710, 1994.

34) Perzin KH and Bridge MF: Adenomas of the small intestine: a clinicopathologic review of 51 cases and a study of their relationship to carcinoma. *Cancer* 48: 799-819, 1981.

		MUC5AC and/or MUC6	
		(+)	(-)
CD10 (+)	MUC2 (+)	胃腸混合型	小腸型
	MUC2 (-)	胃腸混合型	小腸型
CD10 (-)	MUC2 (+)	胃腸混合型	大腸型
	MUC2 (-)	胃型	粘液欠失型

**図1 免疫染色による粘液形質分類**

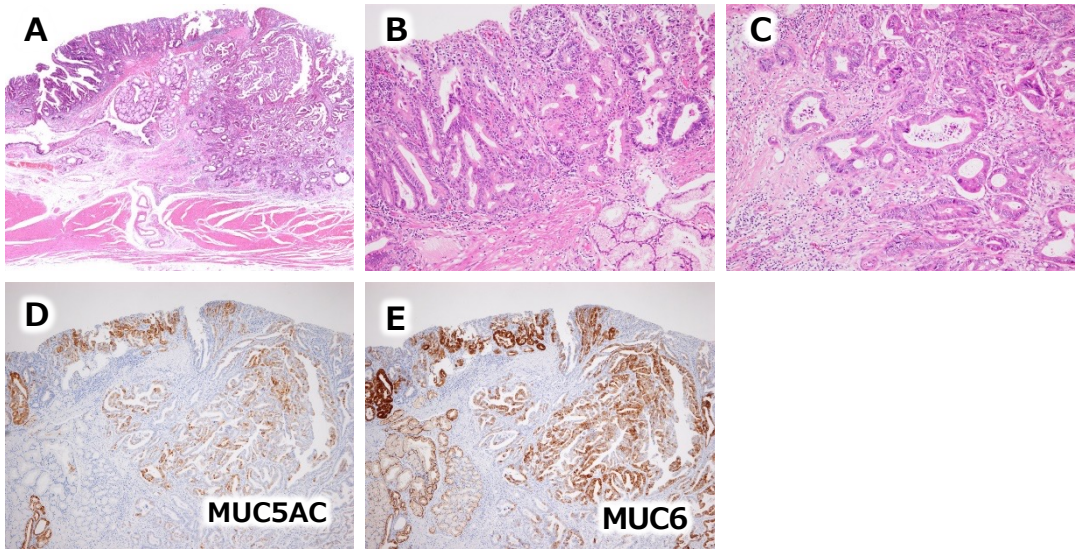


**図2 鋸歯状構造を呈した Vater乳頭肛門側の粘液欠失型十二指腸癌**

A: 弱拡大像 (HE); B: 強拡大像 (HE). 鋸歯状構造を認める.

MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10はいずれも発現陰性, KRAS変異 (+), GNAS変異 (-), BRAF変異 (-), p53蛋白過剰発現 (+), CIMP+ であった.

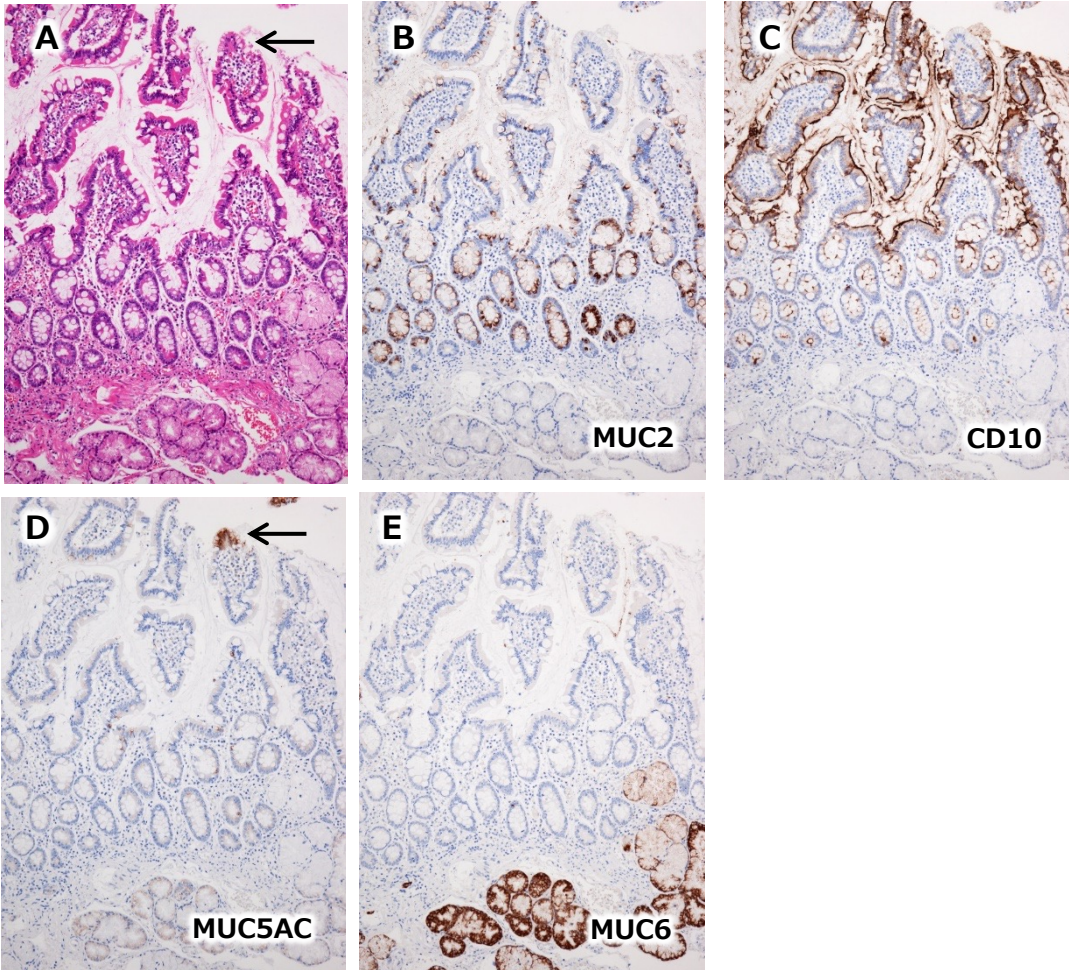




**図3 粘膜下腫瘍様発育を呈したVater乳頭口側の胃型十二指腸癌**

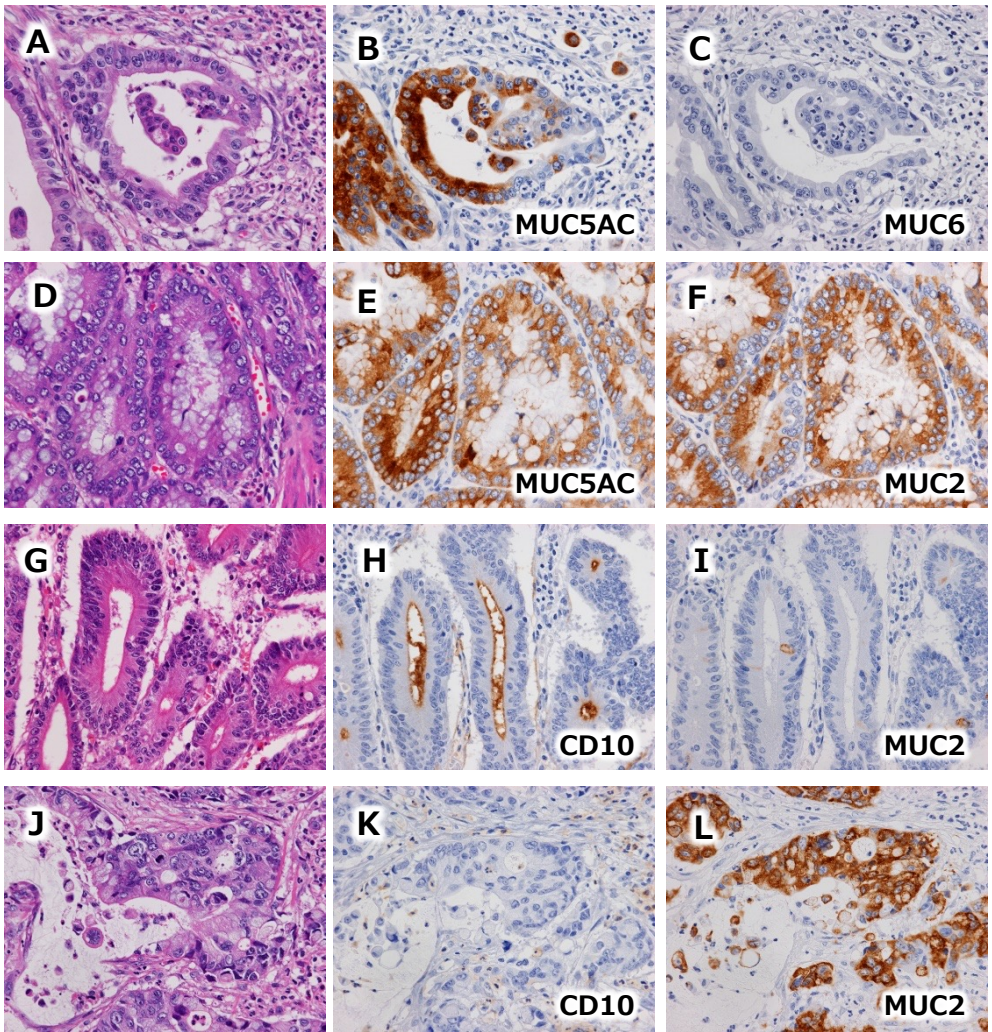
A: 表層に粘膜内病変があり、粘膜筋板の大部分が保たれているが、粘膜下層に浸潤癌成分を多量に認める (HE). B: 粘膜内病変 (HE). 管状腺癌高分化 C: 浸潤癌成分 (HE). 管状腺癌高分化～中分化 D: MUC5AC免疫染色. 粘膜内病変も浸潤癌部も発現陽性 D: MUC6免疫染色. 粘膜内病変も浸潤癌部も発現陽性.

粘膜内部、浸潤癌部いずれもMUC2, CD10は発現陰性, KRAS変異 (+), GNAS変異 (+), BRAF変異 (-), p53蛋白過剰発現 (+), CIMP+, MSS であった.



**図4 十二指腸非腫瘍粘膜の粘液形質マーカー発現**

A: 十二指腸非腫瘍粘膜 (HE). 表層は腸上皮で覆われ, 僅かに胃腺窩上皮化生を伴っている (矢印). 粘膜深部から粘膜下層には Brunner腺を認める. B: MUC2免疫染色. 陰窩および絨毛の細胞で発現陽性. C: CD10免疫染色. 陰窩細胞表面と絨毛細胞表面で発現陽性. 絨毛細胞での発現が高度. D: MUC5AC免疫染色. 陰窩, 絨毛細胞いずれも発現陰性. 胃腺窩上皮化生細胞が発現陽性 (矢印). E: MUC6免疫染色. Brunner腺で発現陽性.

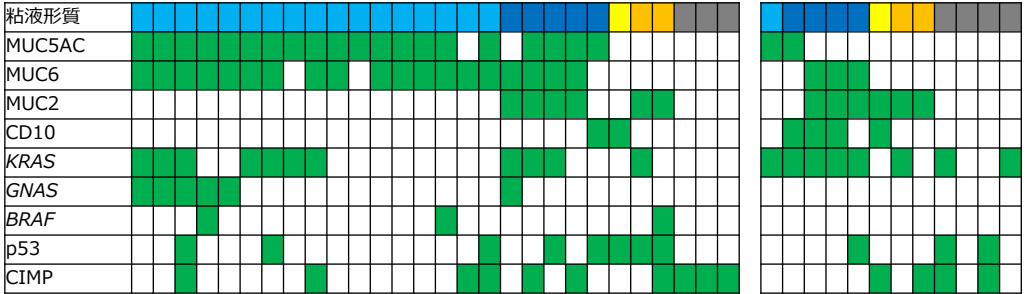


**図5 十二指腸癌の粘液形質**

A-C: 胃型; 管状腺癌高分化 (A). MUC5AC陽性 (B), MUC6陰性 (C). MUC2, CD10は陰性であった. D-F: 胃腸混合型; 少数の杯細胞を認める管状腺癌高分化 (D). MUC5AC陽性 (E), MUC2陽性 (F). G-I: 小腸型; 細胞質は均一好酸性で, 管腔表層には刷子縁がみられ管状腺癌高分化 (G). CD10陽性 (H), MUC2陰性 (I) (陽性細胞<5%) MUC5AC, MUC6は陰性であった. J-L: 大腸型; 細胞外粘液と少数の印環細胞成分を有する管状腺癌中分化 (J). CD10陰性 (K), MUC2陽性 (L). MUC5AC, MUC6は陰性であった.

Vater乳頭口側発生癌

Vater乳頭肛門側発生癌



粘液形質

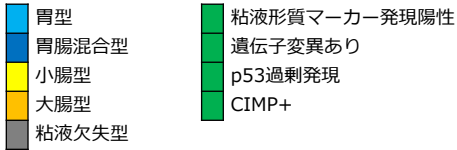


図6 分子病理学的所見の対応

表 1 PCRプライマーの塩基配列

遺伝子	Region	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>KRAS</i>	Exon 2	GCCTGCTGAAAATGACTGAA	AGAATGGTCCTGCACCAGTAA
	Exon 3	TTCCTACAGGAAGCAAGTAG	CACAAAGAAAGCCCTCCCA
	Exon 4	GGACTCTGAAGATGTACCTATGG	TCAGTGTTACTTACCTGTCTTGT
<i>BRAF</i>	Exon 15	TGTTTTCTTTACTTACTACACCTCA	AATCAGTGGAAAAATAGCCTCAA
<i>GNAS</i>	Exon 8	GGCTTTGGTGAGATCCATTGAC	TGGCTTACTGGAAGTTGACTTTG
	Exon 9	GACATTCACCCCAGTCCCTCTGG	GAACAGCCAAGCCCACAGCA

表2. 十二指腸癌の臨床病理学的特徴

	十二指腸全体		発生部位				P値*
			Vater乳頭口側		Vater乳頭肛門側		
病変数	44		30		14		
年齢 (平均±標準偏差)	65.2 ± 11.7		65.9 ± 10.2		63.7 ± 14.1		
男女比	28:16		18:12		10:4		
組織型							0.041 †
pap	4	(9%)	2	(7%)	2	(14%)	
tub1	15	(34%)	7	(23%)	8	(57%)	
tub2	17	(39%)	13	(43%)	4	(29%)	
por1	1	(2%)	1	(3%)	0	(0%)	
por2	5	(11%)	5	(17%)	0	(0%)	
muc (por2, sig)	2	(5%)	2	(7%)	0	(0%)	
深達度							0.0046§
pT1 (SM)	2	(5%)	2	(7%)	0	(0%)	
pT2 (MP)	3	(7%)	2	(7%)	1	(7%)	
pT3 (SS/A)	15	(34%)	5	(17%)	10	(71%)	
pT4a (SE)	4	(9%)	3	(10%)	1	(7%)	
pT4b (SI)	20	(45%)	18	(60%)	2	(14%)	
浸潤増殖様式							
INFa	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	
INFb	39	(89%)	26	(87%)	13	(93%)	
INFc	5	(11%)	4	(13%)	1	(7%)	
リンパ管侵襲陽性	10	(23%)	6	(20%)	4	(29%)	
静脈侵襲陽性	13	(30%)	11	(37%)	2	(14%)	
神経侵襲陽性 †	12	(29%)	12	(43%)	0	(0%)	0.0034
リンパ節転移陽性 †	28	(70%)	22	(79%)	6	(50%)	
肉眼型							
0型 (0-IIa)	2	(5%)	2	(7%)	0	(0%)	
1型	2	(5%)	1	(3%)	1	(7%)	
2型	36	(82%)	24	(80%)	12	(86%)	
3型	2	(5%)	2	(7%)	0	(0%)	
4型	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	
5型	2	(5%)	1	(3%)	1	(7%)	
腫瘍径 mm							
(平均±標準偏差)	47.1 ± 21.1		48.4 ± 22.7		44.2 ± 16.9		

P値\* : 口側 vs. 肛門側

神経侵襲陽性 † : 深達度 pT1 (SM) 癌2例は評価対象外のため母数から除いた

リンパ節転移陽性 † : 十二指腸癌の口側2例, 肛門側2例ではリンパ節郭清が未施行のため, それぞれの母数は 28例, 12例.

‡ : pap, tub1, tub2 vs. por1, por2, muc

§ : pT1-pT4a vs. pT4b

表3. 十二指腸癌の粘液形質

	発生部位						P値*
	十二指腸全体		Vater乳頭口側		Vater乳頭肛門側		
	(n = 44)		(n = 30)		(n = 14)		
MUC5AC発現陽性	24	(55%)	20	(67%)	4	(29%)	0.018
MUC6発現陽性	22	(50%)	19	(63%)	3	(21%)	0.0096
MUC2発現陽性	14	(32%)	8	(27%)	6	(43%)	0.32
CD10発現陽性	6	(14%)	2	(7%)	4	(29%)	0.07
胃型	20	(45%)	17	(57%)	3	(21%)	0.029
胃腸混合型	9	(20%)	5	(17%)	4	(29%)	0.43
腸型							
小腸型	2	(5%)	1	(3%)	1	(7%)	0.54
大腸型	6	(14%)	4	(13%)	2	(14%)	1
粘液欠失型	7	(16%)	3	(10%)	4	(29%)	0.18

P値\*: 口側 vs. 肛門側