

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07722

研究課題名(和文) 肝細胞癌における腫瘍内不均一性の定量的評価による病態の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular pathology based on quantitative evaluation of intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma

研究代表者

坂井 和子 (Sakai, Kazuko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20580559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド塩基多型アレイから得られたコピー数変動及びB-アレル頻度に基づいたClonal composition数(CC数)を腫瘍内不均一性の指標とし、肝細胞癌(HCC)組織におけるCC数の多寡による腫瘍内不均一性を有する腫瘍の分子病態を解明することを目的とした。切除可能な肝細胞癌の腫瘍組織検体36例を解析した結果、腫瘍内不均一性の高いpoly-CC腫瘍と均質なmono-CC腫瘍に分類された。Poly-CC腫瘍を有する患者はMono-CC腫瘍の患者に比べて有意に無再発生存期間が不良であり、細胞周期関連経路の遺伝子に富み、より活発な細胞増殖を示すことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌における腫瘍の不均一性を数値化し、腫瘍内不均一性の高いpoly-CC腫瘍が術後再発と関連することを明らかにした。コピー数変動及びB-アレル頻度に基づいたClonal composition数による腫瘍内不均一性の指標は、細胞周期関連経路の活性化を伴う増殖性の特徴と関連し、肝細胞癌の分子病態の新たな知見が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Tumor heterogeneity based on copy number variations is associated with the evolution of cancer and its clinical grade. Clonal composition (CC) represents the number of clones based on the distribution of B-allele frequency (BAF) obtained from a genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) array. A higher CC number represents a high degree of heterogeneity. Somatic mutations, total transcriptome, and copy number variation were analyzed in patients with resectable HCC. The samples were classified the heterogeneous tumors as poly-CC (n=26) and the homogeneous tumors as mono-CC (n=8). The patients with poly-CC had a higher rate of early recurrence and a significantly shorter recurrence-free survival period than the mono-CC patients. A transcriptome analysis showed that cell cycle-related pathways were enriched in the poly-CC tumors compared with the mono-CC tumors. Poly-CC HCC is highly proliferative and has a high risk of early recurrence.

研究分野：医学

キーワード：肝細胞癌 腫瘍内不均一性 遺伝子異常

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織を構成するがん細胞は均一な集団ではなく、がんの多様性・不均一性 (heterogeneity) が存在することが知られており、病理組織学的に分化度や組織型に違いによる不均一性を評価する研究が行われてきた。腫瘍が多様性を有することにより、薬物療法への治療抵抗性の獲得や再発の原因となり、癌治療における解決すべき課題のひとつである。腫瘍内不均一性の病態および生物学的特性を理解することにより、腫瘍内不均一性を有する腫瘍の薬物療法に対する治療抵抗性の克服へつなげることができる。腫瘍内不均一性の研究は、次世代シーケンサー等の遺伝子解析技術の発展により、遺伝子変異を含むゲノム異常の観点からの解明が試みられている。中でも、肺がん、腎細胞がん患者の手術時の切除検体を用い、腫瘍組織検体の複数の部位の全エクソン解析を行い、腫瘍内不均一性とがんの進展との関連が明らかになりつつある。次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析によるアプローチは、遺伝子変異、コピー数変化、および染色体の構造変化といったがんのゲノム異常を網羅的に捉えることができる。一方、がん細胞では、ゲノム不安定性により、遺伝子変異だけでなく、DNA コピー数の増加 (遺伝子増幅) や欠損が生じているが、コピー数欠損領域においては、均質な腫瘍細胞 (単一クローン) の場合の B アレル頻度は一定であることが想定される。これまでの研究により、腫瘍組織検体から得られる全ゲノム領域のコピー数変動と各遺伝子領域における一塩基多型データである B アレル頻度の分布に注目し、コピー数欠損の領域における B アレル頻度パターンから、Clonal Composition として腫瘍内クローン数を推定するアルゴリズムを構築してきた。肝細胞がんは、世界規模の全ゲノム解析プロジェクトの成果から、発がんに関わる様々な遺伝子異常が見出されたが、肺腺がんにおける *EGFR* 遺伝子変異や *ALK* 融合遺伝子のように Actionability があり強力なドライバー遺伝子変異は少ないことが明らかになっている。本研究は、腫瘍内不均一性の多寡と肝細胞がんの臨床病理学的特徴及びその予後の関連に着目し、腫瘍の多様性を構成する病態の解明を目的とした。

2. 研究の目的

肝細胞がんの腫瘍内のコピー数異常と B アレル頻度データから腫瘍内不均一性を評価し、腫瘍内不均一性の多寡による肝細胞がんの臨床的、病理組織学的特徴との関連から、腫瘍内不均一性の病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞がん腫瘍組織検体の腫瘍内不均一性の評価

近畿大学医学部及び関西医科大学の倫理委員会に承認された研究実施計画書に基づき、肝細胞がん患者の腫瘍組織検体を収集し、核酸 (DNA, RNA) を抽出した。ゲノムワイドコピー数測定は、OncoScan CNV Assay (Affymetrix 社) を用い、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix 社) でスキャンした。スキャンデータは、OncoScan Console software 1.3 (Affymetrix 社) により正規化を行い、数値化されたコピー数データ及び B アレル頻度データを用いて、Onco Clone Composition program (Sakai K. et al, Cancer Lett. 2017) により Clonal Composition 値を算出し、Clonal Composition 数を推定した。

(2) 肝細胞がん腫瘍組織検体の遺伝子変異及び遺伝子発現の評価

肝細胞がん患者の腫瘍組織検体を用いて、409 種の癌関連遺伝子の遺伝子変異測定 (Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel, Thermo Fisher Scientific 社) 及び全遺伝子発現測定 (Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Assay, Thermo Fisher Scientific 社) を行った。遺伝子変異のシーケンスデータは、Torrent Suite ver. 5.10 program (Thermo Fisher Scientific) で解析し、体細胞遺伝子変異を抽出した。遺伝子発現のシーケンスデータは、AmpliSeqRNA plugin (Thermo Fisher Scientific) を用いて正規化した。遺伝子発現データのエンリッチメント解析として Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析を行った。

(3) 肝細胞がんにおける腫瘍内不均一性の多寡と臨床病態の関連解析

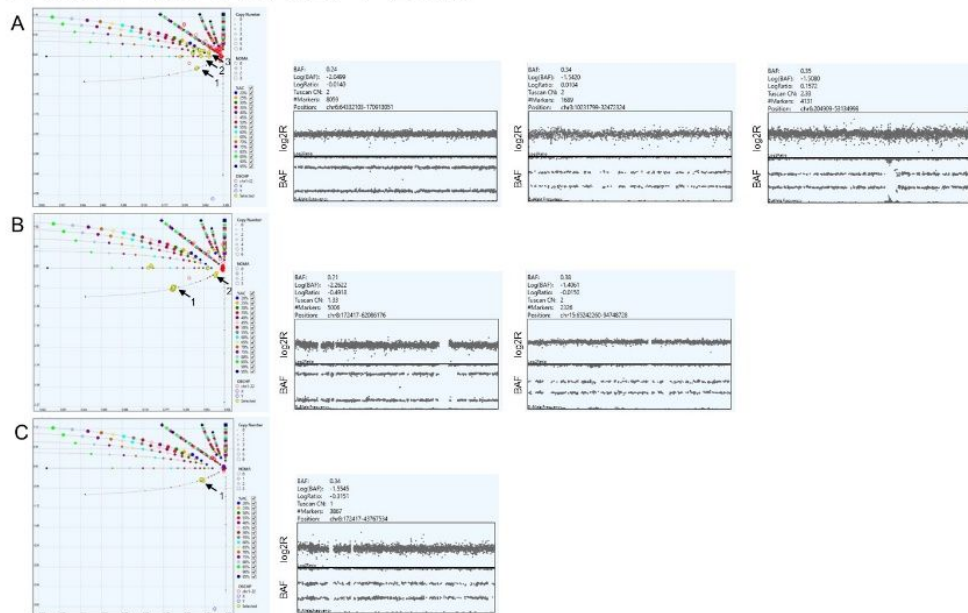
肝細胞がんにおいて Clonal Composition の多寡と関連する臨床病態及び遺伝子変異プロファイル、遺伝子発現プロファイルの解析を行った。統計解析には、JMP ver. 14.2 (SAS 社) 及び Prism ver. 8.4 (GraphPad 社) を用いた。

4. 研究成果

(1) 肝細胞がん腫瘍組織検体の腫瘍内不均一性の評価

関西医科大学で肝細胞がんと診断された 36 例の腫瘍組織検体を用いて、ゲノムワイドコピー数測定 (OncoScan CNV Assay) を行った。コピー数欠損領域における B アレル頻度の分布から、Clonal composition (CC) 数を算出し、腫瘍内不均一性の評価を行った。図 1 に、代表的な CC 数の解析結果として CC 数が 3 (A)、2 (B)、1 (C) の結果を示す。この結果から、肝細胞がんの腫瘍組織検体の CC 数は、平均 1.0 ± 0.8 (range, 0 - 3) となり、polyclonal 腫瘍である Poly-CC 腫瘍 (CC = 1) と monoclonal 腫瘍である Mono-CC 腫瘍 (CC=0) に分類された。

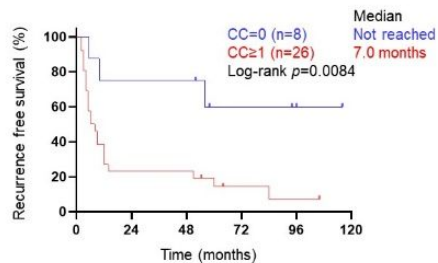
図1. 肝細胞がん検体における腫瘍内不均一性の評価



(2) 肝細胞がんにおける腫瘍内不均一性の多寡と臨床病態の関連解析

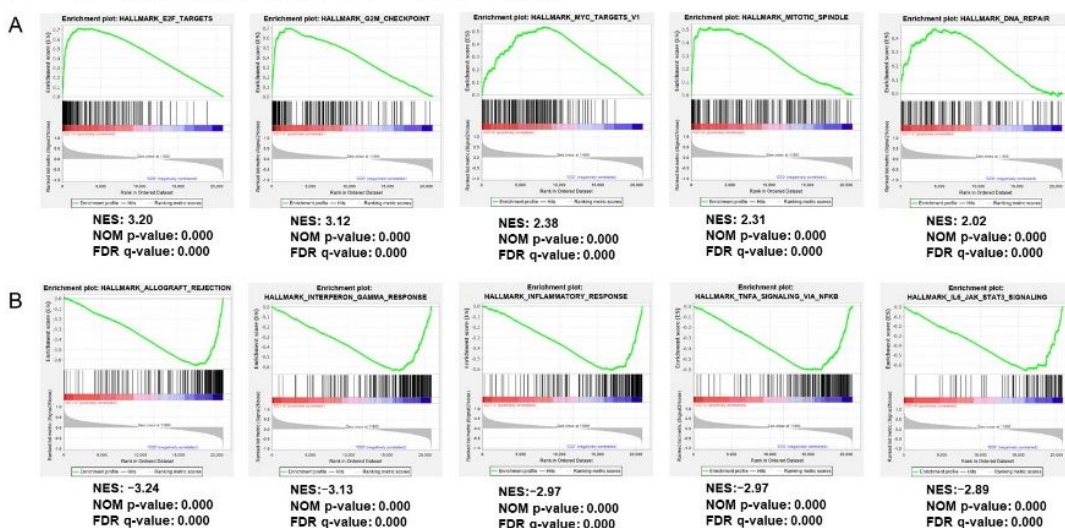
肝細胞がん患者の臨床病理学的特徴とCC数との関連を解析した結果、Poly-CC腫瘍を有する患者はMono-CC腫瘍の患者に比べて有意に無再発生存期間が不良であることが明らかになった(図2)。

図2. 肝細胞がん検体のCC数の多寡による無再発生存期間の比較



Poly-CC群とMono-CC群の分子病態の差異を遺伝子発現解析及び遺伝子変異解析から検討した。遺伝子発現情報のエンリッチメント解析の結果、Poly-CC腫瘍はMono-CC腫瘍と比較して細胞周期関連経路が濃縮された(図3A)。一方、Mono-CC群は、免疫応答やサイトカインに関連する経路が濃縮された(図3B)。これらの結果は、Poly-CC腫瘍はMono-CC腫瘍に比べて細胞周期関連経路の遺伝子に富み、より活発な細胞増殖を示すことが明らかとなった。遺伝子変異解析の結果、有意に相関のある非同義変異は認められなかった。肝細胞癌で高頻度に検出されるCTNNB1遺伝子変異は、有意ではないもののMono-CC群で高い傾向が認められた。Mono-CC群は、IL6-JAK-STATシグナルの亢進もしくはCTNNB1遺伝子変異を介したWnt-カテナンシグナル伝達経路によって特徴づけられることが示唆された。

図3. Poly-CC腫瘍の遺伝子発現量によるエンリッチメント解析



これらの結果は、肝細胞がんにおけるPoly-CC腫瘍の分子病態解析の報告として、論文に投稿した。(Kaibori M, Sakai K, Nishio K. et al, Patients with polyclonal hepatocellular carcinoma are at a high risk of early recurrence and have a poor recurrence-free survival period. Hepatol Int. 2022 16(1):135-147.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaibori M, Sakai K, Matsushima H, Kosaka H, Matsui K, De Velasco MA, Sekimoto M, Nishio K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Patients with polyclonal hepatocellular carcinoma are at a high risk of early recurrence and have a poor recurrence-free survival period	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatol Int.	6. 最初と最後の頁 135-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12072-021-10278-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西尾 和人, 海堀 昌樹, 坂井 和子, 松島 英之, 小坂 久, 松井 康輔, 関本 貢嗣
2. 発表標題 Patients with polyclonal hepatocellular carcinoma are at a high risk of early recurrence
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西尾 和人 (Nishio Kazuto) (10208134)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	
研究分担者	海堀 昌樹 (Kaibori Masaki) (30333199)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------