

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10170

研究課題名(和文) 三次元ゲノム解析による肝内胆管癌のクローン進化と腫瘍内不均一性の解明

研究課題名(英文) Investigation of intratumoral heterogeneity in intrahepatic cholangiocarcinoma using multiregional analysis and innovative drug target discovery

研究代表者

井口 友宏 (Iguchi, Tomohiro)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・肝胆膵外科医師

研究者番号：30598959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞は無秩序に起こる遺伝子変異によりクローン進化を遂げ、多様なサブクローン集団となり(腫瘍内不均一性)、治療抵抗性となります。肝内胆管癌は抗癌剤や放射線治療の効果が低く、悪性度が高い癌として知られ、肝内胆管癌に関わる多くの遺伝子変異が研究されてきましたが、クローン進化の過程で蓄積される遺伝子変異の全貌は明らかではありません。我々は、肝内胆管癌を3次元的に捉えたゲノム解析を行い、他の癌種と同様、腫瘍内不均一性が存在していることを明らかにしました。しかし、癌の発生の鍵となる遺伝子変異は普遍的なものではなく、治療標的と考えた場合は個別に精緻な治療戦略が求められることが分かりました。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells evolve by a reiterative process of clonal expansion through the accumulations of mutations and a single cancer harbors diverse genetically distinct subclones (intra-tumor heterogeneity). As a major cause of therapeutic failure, the understanding of intra-tumor heterogeneity is clinically necessary. Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is resistant to chemotherapy and radiation and is known as high-grade cancer. There have been many molecular researches associated with ICC, however, the accumulations of mutations through the process of clonal evolution is not fully understood. We performed genomic analysis for ICC considered in three dimensions (multiregional analysis). Intra-tumor heterogeneity is found to exist in ICC as well as others. However, the genetic drivers of ICC are not universal and when considered as the therapeutic target, a personalized and elaborate gene therapy strategy is necessary.

研究分野：外科系臨床医学

キーワード：肝内胆管癌 腫瘍内不均一性 全エキソームシーケンス RNAシーケンス clonal evolution

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 肝内胆管癌の治療と予後

肝内胆管癌は原発性肝癌の10%前後を占め、肝細胞癌に続いて2番目に多い腫瘍である。その発症率や死亡率は近年世界的に増加しているが、手術以外に根治が期待できる治療法はない。しかし、切除できなかつた場合は10%にも満たないのが現状である。また、抗癌剤、放射線療法の効果も低いとされ、腫瘍学的な悪性が非常に高い癌である。近年、消化器癌の領域においては新規開発された様々な分子標的治療薬が臨床応用され、高い効果を示しているが、肝内胆管癌に効果が証明された薬剤は未だ存在せず、肝内胆管癌のゲノム解析の結果を踏まえた治療薬の開発が医学臨床現場においても切望されている。

### (2) 癌における腫瘍内heterogeneity(不均一性)

癌の治療における大きな障壁として挙げられるものに薬剤耐性や転移能の獲得があるが、近年そこには癌細胞の clonal evolution(クローン進化)により形成される腫瘍内の heterogeneity(不均一性)が強く関与していることが明らかとなってきた。膵癌、腎癌、大腸癌においては1つの腫瘍の複数の部分の遺伝子解析を行う multiregional analysis の手法を用いることで発癌初期に重要な役割を担う founder 変異遺伝子と clonal evolution の過程で蓄積する progresser 変異遺伝子を同定し、その腫瘍内 heterogeneity の一端が明らかにされた。

## 2. 研究の目的

Multiregional analysis の手法を用いて肝内胆管癌のゲノムを三次元的に解析し、その発癌そして clonal evolution の過程に関わるゲノム、エピゲノムの変化を明らかにし、さらに網羅的、統合的なマルチオミックス解析によるクローン進化によって形成された腫瘍内 heterogeneity 獲得につながる遺伝子変

化を捉え、これに焦点を当てた革新的な分子標的治療薬開発の基盤を創出する。

## 3. 研究の方法

### (1) 症例集積

術前診断で肝内胆管癌と診断された10例を対象とする。Laser microdissection の手法を用いて拡大観察を行いながら確実に腫瘍成分のみを採取し、genomic DNA、total RNA を抽出する。

### (2) シークエンシング

次世代シークエンサー Illumina HiSeq 2500 プラットフォームを使用し、網羅的な全エクソームシークエンシング、mRNA シークエンシングを行う。また PBAT 法を用いた網羅的 DNA メチル化シークエンシングを行う。

### (3) 統合的解析

全エクソームシークエンシングの結果から変異遺伝子とコピー数多型の情報を取得し、それらと mRNA 発現に関連しているか検討する。これらより得られたデータをスーパーコンピューターを用いた大規模数理学演算により網羅的かつ統合的に解析する。解析結果を基に肝内胆管癌の進化系統樹を作成する。

### (4) 創薬標的の探索と臨床的意義の検討・機能解析

多数の肝内胆管癌切除検体を用いて腫瘍内不均一性の獲得に寄与する標的遺伝子に対し、RT-qPCR による mRNA 発現解析や Western blot 法、免疫組織化学染色による蛋白発現解析を行い、予後情報を含む臨床情報との関連を検討する。胆管癌細胞株やマウスを用いて当該遺伝子の機能解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 症例集積

術前診断で肝内胆管癌と診断された10例を対象とした。患者の平均年齢は67.5歳、

男女比は4:1、平均腫瘍径は4.7cmであった。いずれの症例も病理学的に肝内胆管癌と診断された（1例のみ肝細胞癌との混合型であった）。切除標本より正常肝組織および複数箇所（複数）の腫瘍組織を三次元的に採取し、genomic DNA, total RNA を抽出した。

## (2) シークエンシング

集積した 10 症例について全エクソームシークエンシングを行った。平均 128.39 の高い Coverage のデータが得られた（図 1）。

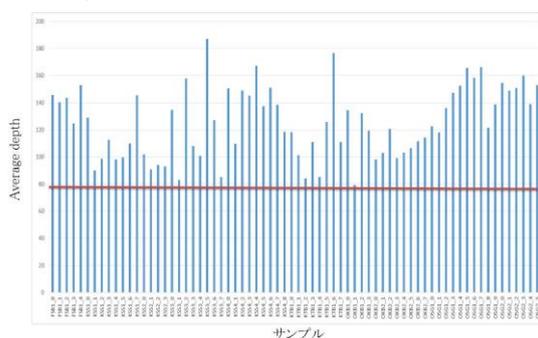


図1 coverage (全エクソームシークエンシング) 平均128.39の高いCoverageのデータが得られた。

肝内胆管癌における遺伝子変異を網羅的に同定し、こちらは、それぞれの腫瘍の Founder/Shared/Unique Mutations の Total で 4212 の遺伝子変異を同定した（図 2）。

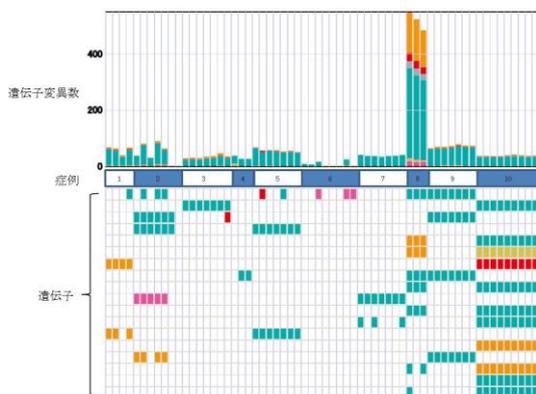


図2全エクソームシークエンシング 各サンプルにおける遺伝子変異を網羅的に同定した。

各々の症例において進化系統樹を作成し、すべての症例で trunk と branches/leaves とで構成されていること。branching の広がり = 進化の多様性は明確に認めたものの、branching evolution や parallel evolution という選択圧は認めないことを明らかにした。

一方、普遍的な driver 遺伝子についても、SMAD4 が 3/10 例、TP53 も 2/10 例と多様性を呈しており、明確な治療標的として変異を同定することは、困難であった。まさに進行癌における中立進化を体現している癌腫であり、治療標的を勘案する際には、個別に精緻な治療標的・方法が求められることを明らかにした。

また 10 症例において mRNA シークエンシングを行い（図 3）、網羅的な解析を開始したが、クラスタリングについては、現在のところ明確なものには到っていない。

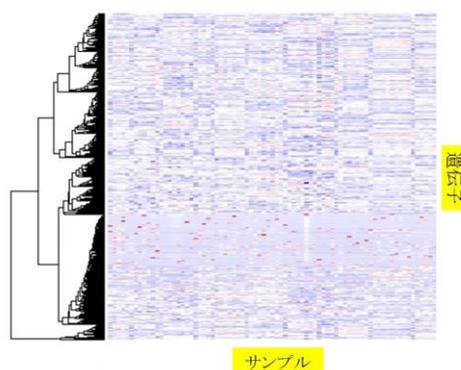


図3 mRNAシークエンシング 各サンプルにおける遺伝子発現量のheatmap

これまでの結果から肝内胆管癌においても他の癌種と同様、腫瘍内不均一性が存在していることが分かった。特に融合遺伝子に注意をしながら、鋭意解析中である。

## <引用文献>

- ①Cotran R et al. Robbins Pathologic Basis of Disease, 1999
- ②Yachida S et al. Nature 2010;467:1114-7.
- ③Ricketts CJ et. al Nat Genet, 2014;46:214-5.

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

Kitagawa A, Komatsu H et al. Intratumoral heterogeneity and process of evolution of intrahepatic cholangiocarcinoma. American Association for Cancer Research 2018

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井口 友宏 (IGUCHI, Tomohiro)  
独立行政法人国立病院機構 (九州がんセン  
ター臨床研究センター) 肝胆膵外科医師  
研究者番号 : 30598959

### (2) 研究分担者

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)  
東京大学大学院新領域創成科学研究科  
教授  
研究者番号 : 40323646

### (3) 連携研究者

宮野 悟 (MIYANO, Satoru)  
東京大学医科学研究所 教授  
研究者番号 : 50128104