

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19915

研究課題名（和文）多発性肝臓がんの全ゲノム解析による肝臓がん進化の分子機構の解明

研究課題名（英文）Whole genome sequencing analysis of multiple liver cancer nodules for determination of causal events for multi-occurrence

研究代表者

古田 繭子（Furuta, Mayuko）

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：00647183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：合計23症例の多発性肝臓がん49サンプルを用いて全ゲノムシーケンスを行った。同一症例由来の複数腫瘍間での点突然変異の共通性から、多発性と再発性の症例を高精度に識別することができた。多発性と再発性の症例はステージや性質が異なるため、特に臨床病理学的に識別困難な症例についてはその有用性が示された。さらに全ゲノムシーケンスにより同時に検出可能なゲノム構造異常やコピー数異常または変異アレル頻度のプロファイリングにより、多発再発の識別に加えてより詳細に腫瘍内不均一性や、腫瘍の進化が観察された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed whole genome and RNA sequencing analyses of 49 tumors including two extra-hepatic metastases, and one nodule-in-nodule tumor from 23 HCC patients for the discrimination between multi-centric (MC) and intrahepatic metastasis (IM). Sequencing-based molecular diagnosis using somatic single nucleotide variation information showed higher sensitivity compared to previous techniques and proved useful in cases, which showed inconsistent clinical diagnoses. In addition, whole genome sequencing offered advantages in profiling of other genetic alterations, such as structural variations, copy number alterations, and variant allele frequencies, and helped to confirm the IM/MC diagnosis. Divergent alterations between IM tumors with sorafenib treatment, long time-intervals, or tumor-in-tumor nodules indicated high intra-tumor heterogeneity, evolution, and clonal switching of liver cancers.

研究分野：分子生物学、がんゲノム

キーワード：肝がん 多発性 再発性 全ゲノムシーケンス

1. 研究開始当初の背景

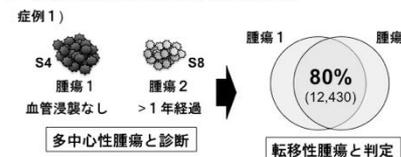
肝癌には、同時性または異時性に複数の腫瘍が形成される症例がある。それらは病理学的診断により腫瘍の分化度や病理型、血管・脈管侵襲の有無と腫瘍形成までの経過時間等により転移性腫瘍と各腫瘍の由来が異なる多中心性腫瘍に判別される。両者はその由来の違いから発見された時のステージや特性が異なり、特性に従った治療方針がその後の治療効果を左右する場合があります。転移性と多中心性腫瘍の正確な判別は

図2 肝臓の再発性/多中心性腫瘍

a 多発肝癌は由来によって特性が異なる



b 病理学的診断とWGSによる判定が異なる例



重要である (図 2a)。申請者がこれまでに WGS を行った肝癌症例の中には多中心性腫瘍と病理学的に診断された症例が複数含まれていたがその共通変異の解析結果から、必ずしも病理診断が共通変異の有無による判定と一致しない場合があった (図 2b)。従って **WGS は複数腫瘍の由来が同一かどうかを正確に判定することが可能であり、客観的な診断に有用**である。

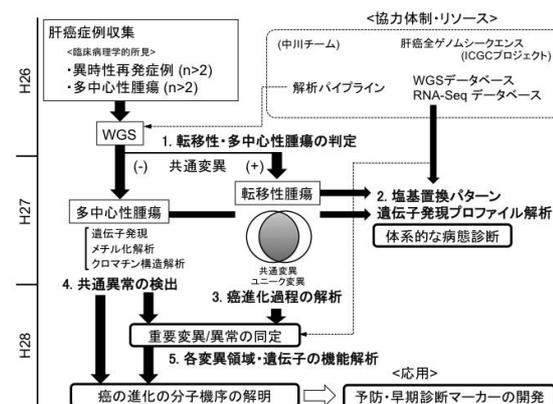
一方で、同一患者に由来し、遺伝的背景を同じくする複数腫瘍は、多数症例の共通変異解析では得られない、時間・空間的な変異獲得過程を追跡する事が可能な重要な材料となる。転移性腫瘍の情報からは多数存在するゲノム変異の中から腫瘍の進化過程の早期に起こった founder 変異と後期に獲得した progressive 変異を抽出することが可能である。また多中心性腫瘍の情報からは癌を別々に多発しやすい、癌形成の " 基盤 " が形成されていることが示唆され、より癌化の初期過程に起きる共通イベントを解明することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、同時性または異時性の多発肝臓癌について WGS を施行し、まず、**i. 点突然変異の共通性で転移性・多中心性腫瘍を正確に判定**する。病理学的診断との相違を比較検討により、正確な診断が可能な病理学的診断項目や検査方法の確立を試みる。次に多中心性/転移性を区別された症例の WGS の解析結果を、先行研究で推進してきた肝癌の変異情報と統合し、より

肝癌において頻度高く検出される重要変異遺伝子の **ii. founder / progressive 変異の選別**から、個別化診断への応用可能性の検討を行う。一方で、多中心性腫瘍については、ゲノム解析・オミックス解析の多角的統合解析により **iii. 癌化の基盤となる共通 " 異常 " を同定し、より早期の治療方法の開発や予防・診断方法の確立**につながる可能性がある。

図3 研究計画および協力体制



3. 研究の方法

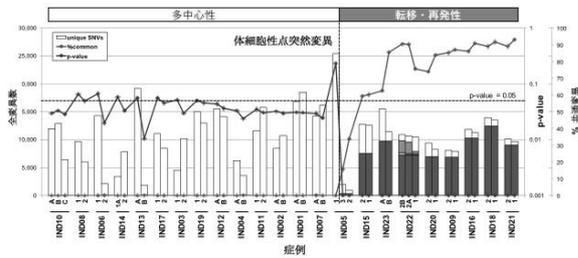
本研究では 22 症例の多発性の肝癌の全ゲノムシーケンス(WGS)を施行し、共通変異の数から多中心性腫瘍と転移性腫瘍の判定を行った。病理学的な診断と異なる症例の臨床情報比較や、変異プロファイルの解析から、より簡易かつ正確な診断方法を検討した。さらに癌細胞の由来が同一である転移性腫瘍の解析から、より初期に起きた重要なゲノム変異と転移過程で獲得した変異を抽出し、重要な変異を同定するとともに症例での癌の進化について考察した。癌細胞の由来が異なる多中心性腫瘍については、癌または背景組織に潜在する各種ゲノム変異解析に加え各種オミックス解析を施行することにより早期に癌化を運命づける共通因子の同定を試みた。各解析段階では多発腫瘍の WGS 解析には先行研究の 269 症例の肝癌 WGS データベースを利用することで効果的に多発腫瘍の特性を抽出した。

4. 研究成果

合計 23 症例由来の同時性・異時性の 49 腫瘍について全ゲノムシーケンスを施行した。同一症例の多腫瘍間の点突然変異の共通性を検討した結果、独立の症例間と同程度にほとんど共通変異を持たない症例 (<1%) と、共通変異を持つ症例 (>15%) の 2 郡に明確に別れた。全ゲノムシーケンスで検出可能な他の変異と比較した結果、前者は多発性、後者は転移性 (再発性) であることが示唆された。臨床病理学的な判定と比較すると、約 1/3 の症例に相違があ

り、この手法の方がより高精度であることが示唆された(図4)。

図4 転移・再発性/多中心性腫瘍の判別

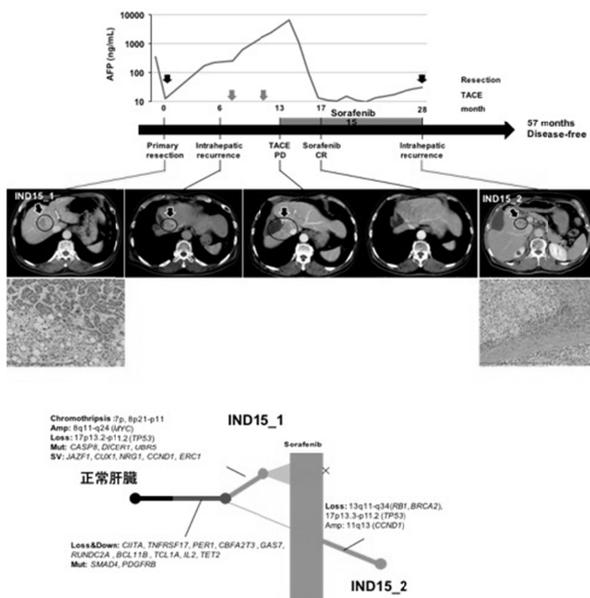


判定結果を臨床病理学的な因子と比較した結果、従来から使用されてきた因子(浸潤の有無、再発までの時間、腫瘍の大きさ、病理学的診断)は不一致であり、これらの一因子による診断は困難であることが示唆された。

転移性・多発性腫瘍の特徴を明らかにするため、塩基置換パターンと遺伝子発現パターンを解析した。その結果、背景の肝臓が同一であっても塩基置換のパターンには共通性が見られなかった。さらに多くのゲノム変異を共有する転移性腫瘍間であっても多くが似た遺伝子発現パターンを示さなかったため、遺伝子発現は時間・空間的に恒常的でないことが示唆された。

さらに、再発性と判定された症例の中には、Sorafenibなどの抗がん剤に対して感受性を示したのちに再発した症例が存在していた(図5)。この症例は臨床病理学的な相違から、多発性腫瘍と判定されていたが、共通変異が存在することから、本研究において転移性(再発性)腫瘍であることが明らかになった。治療前後の腫瘍間には共通するゲノム変異が確かに存在していたが、その割合は他の再発性腫瘍と比較して少なく、多くの固有のゲノム変異を有していた。変異アレルの存在比から、再発腫瘍の由来が肝細胞は、原発巣腫瘍に存在していたこと

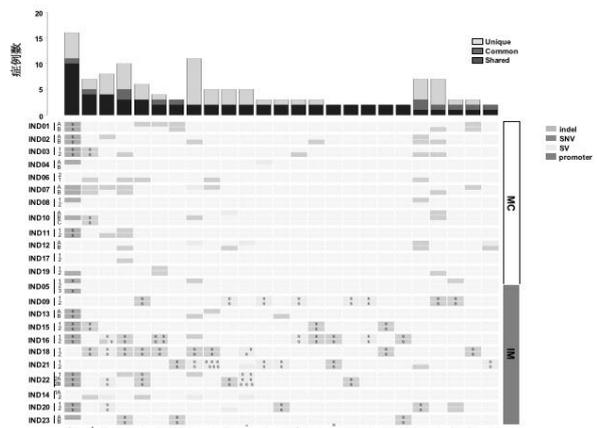
図5 Sorafenib奏功/再発症例(IND15)のがん進化



が示唆された。これらは腫瘍内不均一性を示す証拠であり、抗がん剤耐性獲得機構を明らかにする上で重要な情報が含まれている可能性が高い。

上記の様な再発腫瘍特有の変異の重要性に加え、同一変異または多中心性腫瘍間で共に変異を有する遺伝子群は、早期の癌化段階または収斂進化としてがんの形成に重要な因子を含んでいる可能性がある。我々は2症例以上の腫瘍間で共通して変異を有する遺伝子を抽出した。これらの遺伝子には既知の重要な癌関連遺伝子が含まれており、その重要性が示唆された(図6)。

図6 多中心性/転移・再発性腫瘍間共通変異遺伝子



以上の結果から本研究では、全ゲノムシーケンスを用いた多発性・転移性(再発性)の腫瘍の判別に加え、転移性(再発性)腫瘍の腫瘍間共通性の検討の必要性が示唆された。

以上の研究成果は、学術誌 Journal of Hepatology (査読あり)に掲載され、プレスリリースされた。

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 1件)

1. **Furuta M**, Ueno M, Fujimoto A, Hayami S, Yasukawa S, Kojima F, Arihiro K, Kawakami Y, Wardell CP, Shiraishi Y, Tanaka H, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Tokunaga N, Boroevich KA, Abe T, Aikata H, Ohdan H, Gotoh K, Kubo M, Tsunoda T, Miyano S, Chayama K, Yamaue H, Nakagawa H.

Whole genome sequencing discriminates hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis from multi-centric tumors.

J Hepatol. 2017 Feb ;66(2):363-373

DOI: 10.1016/j.jhep.2016.09.021. 査読あり

〔学会発表〕（計 2件）

Mayuko Furuta, Akihiro Fujimoto,
Masaki Ueno, Shinya Hayami, Yoshi-iku
Kawakami, Kunihito Gotoh, Shin-ichi Murata,
Tatsuhiko Tsunoda, Satoru Miyano, Kazuaki
Chayama, Hiroki Yamaue, and Hidewaki
Nakagawa

「肝多発性肝臓がんの全ゲノム解析による
多発性がん発生と進化の分子機構の解明」
第74回日本癌学会学術総会 2015年10月
10日、名古屋国際会議場（愛知・名古屋）

Mayuko Furuta, Akihiro Fujimoto, Yuichi
Shiraishi, Satoru Miyano, Tatsuhiko Tsunoda,
Hidewaki Nakagawa

「Whole genome sequencing (WGS) of
multi-centric tumor and multi-time point
recurrence tumor pairs for the determination of
the causal events in multi-occurrence liver
cancer tumors.」
AACR Annual Meeting 2015, April 21.
Pennsylvania Convention Center
Philadelphia (USA).

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

プレスリリース：再発性と多発性肝臓がん
のゲノム診断-肝内転移による再発か多発
性かを正確に診断-
2016年11月24日 理化学研究所

6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 繭子 (Furuta Mayuko)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・研究員
研究者番号：00647183

(2)研究協力者

中川 英刀 (Nakagawa Hidewaki)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・チームリーダー
研究者番号：50361621

藤本 明洋 (Fujimoto Akihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・副チームリーダー
研究者番号：30525853