

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15596

研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析に基づいた肝細胞癌微少脈管侵襲診断マイクロRNAシグニチャー樹立

研究課題名（英文）A miRNA signature as a diagnostic biomarker for microvascular invasion in hepatocellular carcinoma

研究代表者

山村 謙介（Yamamura, Kensuke）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：10816507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は多国籍の国際共同研究であったが、コロナ禍の影響で予定の研究が遂行できず、まず当教室のサンプルのみを用いて、類似研究“gene signatureによる非B非C型肝細胞癌の再発予測ノモグラムの樹立”を行った。19245遺伝子から再発に関わる16遺伝子を同定した。これらの遺伝子を臨床組織でreal time PCRで定量し精練された4遺伝子（CTSL2、DKK1、MAMSTR、HLA-G）によるGene Signatureを作成し、効率よく再発を予測できた（AUC=0.82）。GSと臨床的な再発リスク因子を組み合わせ、非B非C型肝細胞癌の再発予測ノモグラムを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
システムティックかつ網羅的なバイオマーカーの探索及び検証を行うことで、NBNC-HCCの再発予測ノモグラムを樹立した。個々の患者の再発予測に有用な臨床ツールとなりうる。

研究成果の概要（英文）：We initially identified a 16-gene expression signature from a total of 19245 genes, which showed significant predictive power for recurrence free survival (RFS) in non B non C HCC patients [HR: 5.02 (3.12 - 8.08), p<0.0001]. Subsequently, using clinical training cohort, we developed a reduced and optimized 4 gene signature composed of DKK1, CTSL2, MAMSTR and HLA-G, which demonstrated as a robust model in predicting RFS (HR, 3.05; 95%CI, 1.81 - 5.14; P<0.0001). The performance of the gene signature was validated in two independent clinical cohorts (HR, 3.39; 95% CI: 1.98 - 5.79, P<0.0001 and HR, 3.44; 95%CI: 1.95 - 6.06, P<0.0001). Furthermore, a nomogram comprising our four gene signature, tumor size, number of tumors, AFP, and DCP was generated to predict the 2-year recurrence free survival in the training cohort, and it performed well in the two independent validation cohorts (concordance index: 0.73 and 0.71, respectively).

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 微少脈管侵襲 マイクロRNA バイオマーカー signature

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は比較的早期より門脈・肝静脈・胆管などの脈管に浸潤し腫瘍栓を形成する。これらの脈管侵襲は肝細胞癌の重要な予後予測因子で、その存在診断は治療戦略の構築に重要となるが、現状の画像診断では微小脈管侵襲の同定は困難である。

肝細胞癌における手術術式は、肝臓内の血流に沿って区域ごとに肝臓を切除する「系統的切除」と、区域に関係なくがんの部分を含めてくり抜くように切除する「部分切除」があるが、小型の腫瘍に対してはどちらの方法をとっても術後の生存率に差がないとの報告もあり (Marubashi et al. Br J Surg. 2015)、controversial である。このような症例で術前に脈管侵襲の存在を診断できれば、系統的切除を選択する判断材料となりうる可能性がある。一方、HCC における肝移植でも画像診断可能な脈管侵襲の有無は予後因子であり、肝移植の適応を判断するミラノ基準の一つに、“脈管侵襲がない”ことが含まれている。しかし、術前に診断できない MVI の存在も移植後の予後因子とされ、MVI のあった HCC の移植患者は MVI のなかった患者と比較して再発率が高いことが報告されている (Iguchi et al. Transplantation. 2015)。そのため患者に大きな侵襲を伴い、貴重な医療資源を用いる肝移植の領域でも、術前の MVI の予測が重要な問題となっている。このように、治療前に MVI の存在を知ることは、手術の内容のみならず HCC 全体の治療方針 (ラジオ波焼灼療法、手術、肝移植など) の決定に大きく貢献する可能性がある。この臨床的問題の観点から、術前に MVI を予測する非侵襲的な新規バイオマーカーの開発が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HCC における MVI を術前に診断するための、既存の画像診断モダリティでは診断できない非侵襲的かつ高い正確性を持った新規バイオマーカーを開発することである。

3. 研究の方法

1. 次世代シーケンサーを用いた、微小脈管侵襲を有する肝細胞癌患者特異的な miRNA の同定
熊本大学医学部消化器外科にて、2003 年～2016 年に根治切除が行われた、初発、術前未治療の HCC 患者の血清サンプル (微小脈管侵襲あり 50 人 vs なし 50 人) から Small RNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen GmbH) を用いて、total RNA の抽出を行う。抽出した RNA をライゲーションし、これをもとに cDNA を合成し、DNA ライブラリーの調整を行う。次に、次世代シーケンサー (HiSeq 4000 Systems, illumina) により、微小脈管侵襲を有する肝細胞癌患者特異的な塩基配列を決定する。さらにバイオインフォマティクス解析を用いて最も有意な micro RNA 群を同定する。

2. 臨床データとの統合解析

1. 得られた micro RNA を、リアルタイム PCR 法を用いて術前、術直後、術後 7 日で発現の変化を解析し、肝細胞癌由来の micro RNA であることを検証・確認し候補となる miRNA をさらに絞り込む。

3. miRNA signature の樹立

熊本大学消化器外科を含む、多施設国際共同研究によって集められた約 1000 例の肝細胞癌患者の術前血清を用いて、トレーニングコホートでリアルタイム PCR 法により micro RNA の発現を測定し、ロジスティック回帰解析に基づくリスクスコアリングモデルを構築し、MVI 診断のための miRNA シグニチャーを樹立する。

4. miRNA signature の検証

検証コホートにて、トレーニングコホートで樹立した miRNA シグニチャーの ROC 解析を行い、診断の正確性を検証する。さらに miRNA signature と各臨床病理学的データの多変量解析を行い、微小脈管侵襲に関わるリスク因子を抽出してスコア化し、術前に肝細胞癌の微小脈管侵襲を予測する新たなリスクモデルを構築する。さらに、対象を早期肝細胞癌症例にしぼり、樹立したシグニチャーの有用性を検証する。

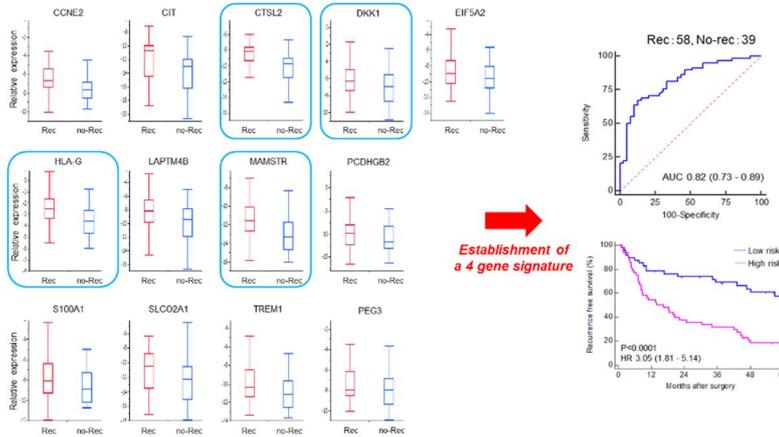
4. 研究成果

本研究は多国籍の、様々な国の HCC 患者のサンプルを用いて行う国際共同研究であったが、コロナ禍の影響で、実験・研究活動時間の短縮や効率的な研究活動の遂行が妨げられ、サンプルの収集や臨床データの収集に時間を要した。そのため、まず当教室のサンプルのみを用いて、本研究を想定した類似研究“gene signature による非 B 非 C 型肝細胞癌の再発予測ノモグラムの樹立”

を行った。

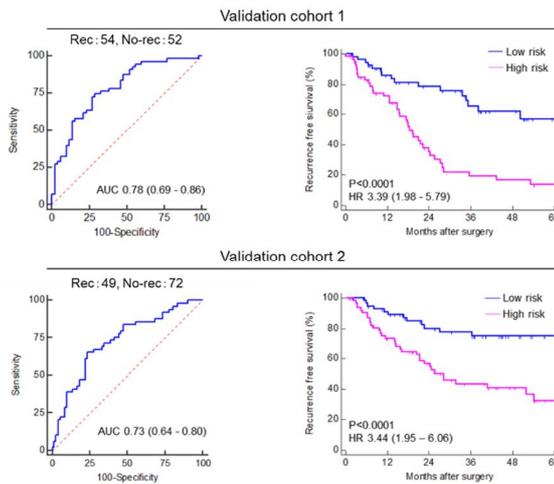
1. Public database を用いたバイオインフォマティクス解析による候補 gene の選定

ゲノムワイドなディスカバリーステップにより、19245 遺伝子の中から再発群と無再発群で発現が異なる 16 遺伝子を同定した。これらの遺伝子をトレーニングコホートの臨床組織で real time PCR を用いて定量した。次にラッソ・コックス回帰分析を行い、16 遺伝子から精練された 4 遺伝子 (CTSL2、DKK1、MAMSTR、HLA-G) による Gene Signature(GS)を作成し、効率よく再発を予測できた(AUC=0.82 [95% CI 0.73-0.89, $P < 0.0001$])。



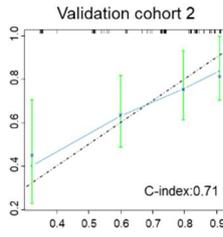
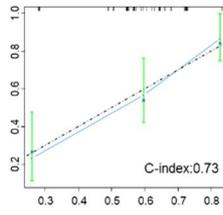
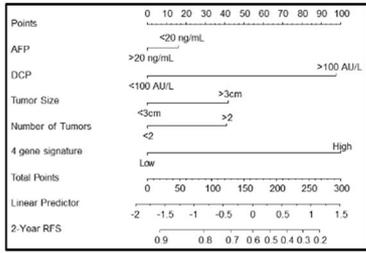
2. 臨床凍結サンプルによる miRNA の検証

この GS を独立した 2 つのコホートで検証すると、High risk group は有意に無再発生存率不良と相関した(検証コホート 1; HR 3.39, $P < 0.0001$ 、検証コホート 2, HR 3.44, $P < 0.0001$)。



2. GS を組み合わせた再発ノモグラムの樹立

さらに GS と臨床的な再発リスク因子を組み合わせ、NBNC-HCC の術後再発予測ノモグラムを樹立した。2 つの検証コホートでの、ノモグラムの concordance index はそれぞれ 0.73(検証コホート 1)および 0.71(検証コホート 2)であった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 YAMAMURA KENSUKE, BEPPU TORU, INOUE KEIJIRO, MATSUMURA KAZUKI, ODA ERI, NAGAYAMA YASUNORI, MOTOHARA TOSHIHIKO, MIYAMOTO HIDEAKI, KOMOHARA YOSHIHIRO, OKABE HIROHISA, MIYATA TATSUNORI, ISIKO TAKATOSHI	4. 巻 42
2. 論文標題 Vater Papilla-preserving Strategy for Advanced Hepatocellular Carcinoma With Excessive Bile Duct Tumor Thrombus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5663 ~ 5670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.16075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 YAMAMURA KENSUKE, BEPPU TORU, MIYATA TATSUNORI, OKABE HIROHISA, NITTA HIDETOSHI, IMAI KATSUNORI, HAYASHI HIROMITSU, AKAHOSHI SHINICHI	4. 巻 42
2. 論文標題 Conversion Surgery for Hepatocellular Carcinoma Following Molecular Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 35 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MATSUMURA KAZUKI, YAMAMURA KENSUKE, ODA ERI, AKAHOSHI SHINICHI, ISHIKO TAKATOSHI, MIYATA TATSUNORI, MIYAMOTO HIDEAKI, MOTOHARA TOSHIHIKO, SASAO AKIRA, KOMOHARA YOSHIHIRO, KAWANO HIDECHIKA, BEPPU TORU	4. 巻 42
2. 論文標題 Successful Treatment of Intrahepatic Cholangiocarcinoma With Liver/Lung Metastasis and Peritoneal Dissemination After Liver Resection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3209 ~ 3215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakisaka Tatsuhiko, Fukai Moto, Banwait Jasjit K., Kamiyama Toshiya, Orimo Tatsuya, Mitsuhashi Tomoko, Yamamura Kensuke, Toshima Takeo, Baba Hideo, Taketomi Akinobu, Goel Ajay	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomewide transcriptomic profiling identifies a gene signature for predicting recurrence in early stage hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 e405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ctm2.405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Yuma, Shimada Mitsuo, Yamamura Kensuke, Toshima Takeo, Banwait Jasjit K, Morine Yuji, Ikemoto Tetsuya, Saito Yu, Baba Hideo, Mori Masaki, Goel Ajay	4. 巻 74
2. 論文標題 A Transcriptomic Signature for Risk Stratification and Recurrence Prediction in Intrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1371 ~ 1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山村謙介
2. 発表標題 肝切除後の門脈血栓発生のリスク因子解析および治療に関する前向き検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山村謙介、別府 透、松村 和季、織田枝里、赤星慎一、林 洋光、今井克憲、馬場 秀夫
2. 発表標題 肉眼的胆管腫瘍塞栓を伴う肝細胞癌に対する治療戦略
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山村謙介
2. 発表標題 肝切除後の門脈血栓症危険因子の前向き検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------