

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15964

研究課題名（和文）全ゲノムシーケンスを軸としたオミックス解析による多段階肝発癌メカニズムの解明

研究課題名（英文）Exploration of the multi-step hepatocarcinogenesis based on the multi-omics strategy.

研究代表者

竹田 治彦（Takeda, Haruhiko）

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：40647525

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：肝癌は極めて予後不良な悪性腫瘍であり、ゲノム異常に基づく個別化医療の実践が喫緊の課題である。本研究では、前癌病変を中心に多段階発癌の各段階の組織を精細に採取し、マルチオミックス解析を行い、発癌の極初期から多段階発癌の各過程に特徴的な遺伝子異常候補を抽出し、癌化・悪性化に関わるキードライバーを同定することを目的とした。肝癌の肝切除範囲に前癌病変と考えられる小結節が含まれる症例を対象として全ゲノム解析を施行し、様々なステージの肝癌のゲノムデータと比較した。一般に治療対象外とされる前癌病変にも進行癌と同様に様々なゲノム異常が蓄積しており、変異のパターンは発癌の初期と進行期で異なることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では一般的に治療対象前と考えられる早期の肝内結節および治療対象の肝細胞癌のゲノム異常を比較検討することで、初期および進行期に獲得されるゲノム異常を全ゲノムシーケンス解析にて明らかにした。多段階肝発癌の初期および進行期の遺伝子異常について全ゲノムレベルで解析することで、多段階肝発癌メカニズムの解明に寄与するとともに、ゲノム進化過程に基づいた分子標的治療の最適化につなげる基礎的知見を得たことから、将来的なゲノム医療の発展に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Liver cancer is one of the most lethal malignancies, and genome-based personalized therapy is highly expected. In this study, we aimed to examine the candidates of the genetic alterations characteristic to each step of multistage hepatocarcinogenesis, especially in the early step of cancer development. We conducted multi-regional sampling from the premalignant small liver nodules surgically resected along with the classical hepatocellular carcinomas and examined their characteristics through the multi-omics strategy especially with the whole-genome sequencing. We detected various genetic alterations, not only single nucleotide variants but also chromosomal translocations, even in the premalignant liver nodules or early small hepatocellular carcinomas which might be out of the targets of treatment in the clinical practice to date. Phylogenetical analysis demonstrated the mutational patterns differed between the early and progressive phases of the multistage hepatocarcinogenesis.

研究分野：肝癌

キーワード：ゲノム解析 肝発癌 オミックス解析 全ゲノムシーケンス

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌はその高い再発率や多中心性発癌という発癌様式などから極めて根治困難であり、世界で最も予後不良な悪性腫瘍の一つに数えられる。現在までに様々なマルチキナーゼ阻害剤・免疫チェックポイント阻害剤等の分子標的治療薬が臨床導入され、バイオマーカーに基づく分子標的治療薬選択による個別化医療の実践が喫緊の課題となっている。

これらの薬剤は標的分子がそれぞれ異なることから、腫瘍の有する特徴的な分子機構が治療効果に関わることが想定される。これまで、国際がんゲノムコンソーシアムをはじめとする国際プロジェクトにより、肝癌の全ゲノム解析が施行され、癌の有するゲノム異常は症例によって、また腫瘍によって極めて多様で複雑であることが示された(Fujimoto et al. Nat Genet 2016)。重要なことに、全ゲノムシーケンスで示された様々な遺伝子異常は癌関連遺伝子の一塩基置換にとどまらず、転座や逆位・欠失など染色体構造異常、染色体コピー数異常、B型肝炎ウイルスDNAのヒトゲノムへの挿入といったダイナミックな変化まで及んでいる。

近年、腫瘍内多領域のゲノムプロファイリングを通じた癌の遺伝的進化を追う研究が盛んに行われ、癌が多段階に発癌・進展していく過程において、大量のゲノム・エピゲノム異常の中からどれをキードライバーとして悪性化していくのかを判別する手法が確立してきた。既に申請者らは、発癌母地に潜むゲノム異常、早期癌と進行癌が有するゲノムプロファイルと比較し、多領域全ゲノムシーケンス(WGS)解析を用いた分子系統樹解析で肝癌の多段階ゲノム蓄積過程を明らかにする手法を報告してきた(Takeda et al. J Pathol 2020)。しかし、前がん病変である異型結節の全ゲノム情報が未解明であることから、肝硬変、前癌病変から早期癌と進展する初期の変異(真のターゲットとすべき trunk 変異)については未だ解明されていない。さらに、臨床検体の解析より得られた多段階ゲノム蓄積の分子生物学的な検証はこれからの課題である。より精細な多段階ゲノム異常蓄積過程の解明が、真の個別化医療を考える上の基礎として求められている。

一方、実際に分子標的治療を受ける進行肝癌結節の全ゲノムプロファイリングと治療効果との関連についての報告は前例がない。大量のゲノム情報の中から臨床に応用可能な情報を集約し、治療効果を予測するバイオマーカーを同定する解析プラットフォームの確立と実験的な検証が真に期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝発癌過程で多段階に蓄積するゲノム・エピゲノム異常を全ゲノムレベルで解明することで、肝癌の進展メカニズムを明らかにするとともに、ゲノム情報に基づいた症例毎の治療標的の同定を最適化するプラットフォームの基礎を確立することである。前癌病変である異型結節や低悪性度の早期肝癌といった乏血肝腫瘍の全ゲノムプロファイルはいまだ報告されておらず、結節内からの多領域サンプリングを行うことで、異型結節や早期肝癌を形成する初期の変異を同定する。これまでに申請者らは早期肝癌から進行肝癌の移行期にあたる肝癌を集積して全ゲノムプロファイリングをしており、そのデータと統合して進化系統樹解析を行うことで、ゲノム異常の多段階蓄積過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍組織の精細な多領域サンプリング

肝硬変、異型結節、早期肝癌、古典的肝癌といった、多段階肝発癌の各過程の結節サンプルを既存検体・新規症例ともに集積し、サンプルのライブラリ作製を行う。この際、従来のいわゆるバルクサンプリングと異なり、病理標本と放射線画像を厳密に対比させて腫瘍内の複数個所から細かい組織採取を行う多領域サンプリングを行うことで、ゲノム情報と空間的位置情報との紐づけを行う。これにより、同一結節内で極初期に獲得された遺伝子変異情報と、サブクローンのみが有する変異情報を区別し、系統樹解析を用いた結節内の癌細胞の進化系統解析を実施する。前癌病変である異型結節や乏血早期肝癌からも多領域サンプリングを行って古典的肝癌や肝硬変の遺伝子情報と比較することで、癌化の最初に必要な重要なゲノム情報の要素を抽出する。

(2) 全ゲノムシーケンス

具体的には、Illumina社のNovaseq6000を用いたWGSを行い、全ゲノム領域にわたる一塩基置換、挿入欠失、染色体構造異常、コピー数異常、HBV-DNA組込の解析を網羅的に行う。構造異常やHBV組込については、Novaseq6000などリード長の短い従来の次世代シーケンサーでは全容解明が困難であるため、数万塩基を連続決定可能な一分子リアルタイム(SMRT)シーケンス(PacBio Sequel II: 第三世代シーケンサー)を用いてデータの補完を行う。具体的には、DNA切断点やHBVゲノムを標的としたキャプチャ法を併用してSMRTシーケンスを行うことで、転座・逆位、HBV挿入部位の前後配列の同定や、染色体破砕など大規模イベントの全容を捉える

(3) 分子系統樹解析

同一結節内で画像的進行度(あるいは病理学的分化度)の異なる領域が併存する症例においては、進行度と変異情報とを対比して系統樹解析を行い、発癌初期の変異と進行期の変異とを区別して解析する。新規取得データに加え、European Genome-Phenome Archive (EGA) や Japanese Genotype-phenotype Archive (JGA)などの公開データベースや自施設で蓄積した癌部や肝硬変のシーケンスデータも合わせて、オミックスデータの多段階蓄積過程を整理、比較解析する。

4. 研究成果

(1) 古典的肝癌および肝乏血結節のゲノム異常の比較

当院で肝癌に対して肝切除術を施行された症例の中で、切除範囲に前癌病変と考えられる小結節が含まれる症例を対象として、サンプリングを行った。画像上は造影早期相にて低吸収を示す、いわゆる乏血結節で、結節内より採取した組織を集積し、リンパ球対照で体細胞変異を抽出した。乏血結節には、一塩基置換を多数認める他、染色体転座や増幅、欠失などの染色体構造異常を複数認め、多血肝癌に進化する以前より複雑な遺伝子異常が蓄積していることが判明した。さらに、画像上類似した所見を呈する乏血結節であっても、様々な変異パターンを示しており、肝内に複数の結節を有する症例では、ゲノム異常の相違を比較解析することにより、肝内転移ないし多中心性発癌かの発癌パターンを推定することが可能であった。また、系統樹解析の結果、結節毎に早期の段階で獲得されたと考えられる染色体構造異常が同一症例の同一肝組織内の複数結節で共有されている症例が認められ、いわゆる肝内乏血性結節と言われる早期肝癌の段階で肝内転移をきたしていると推定される症例が存在した。

(2) 多段階肝発癌におけるゲノム異常獲得過程の解析

当科で取得した肝組織のゲノムデータに加え、国際がんゲノムコンソーシアムの肝癌症例お

よび、非癌部肝組織における全ゲノムシーケンス解析結果の公開データを合わせて検討した。正常肝、慢性肝炎、肝硬変、乏血結節、早期肝癌からステージ4の進行癌に進展する過程での遺伝子変異を比較したところ、染色体異常についてはステージが上がるにつれて頻度が増していくことが示唆された。また、遺伝子変異シグネチャー解析を通じて変異プロセスの解析を行ったところ、加齢や喫煙に伴って導入される一塩基置換は早期の変異に有意に高頻度で認められた一方、ミスマッチ修復異常など変異に対する修復機能の異常により固定されたと考えられる一塩基置換は進行期の変異に有意に多く認められた。このように、変異遺伝子の種類のみではなく、変異プロセスが多段階肝発癌過程において、明確に変化することが明らかとなった。

これまでに我々も報告している通り、肝細胞癌の初期に入る遺伝子変異としてはTERT関連の変異が挙げられるが、臨床的な増大速度が緩徐である乏血結節の段階では、TERTに変異を有さない結節が多く認められた。一方、内部に多血領域を伴う乏血結節を解析すると、乏血領域にはTERT関連の遺伝子変異が蓄積していることが分かり、肝発癌の初期段階において重要な意味を持つ変異である可能性が改めて示唆される結果となった。今後、症例数を重ねて本結果を検証し、遺伝子異常に基づいた個別化医療の推進に寄与するデータの蓄積を行っていくことが求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹田治彦, 上野真行, 中野重治, 三嶋眞沙子, 井口恵里子, 恵荘裕嗣, 高井淳, 波多野悦朗, 妹尾浩
2. 発表標題 肝内多発乏血結節を有する肝癌症例の 全ゲノムシーケンス解析
3. 学会等名 第27回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruhiko Takeda, Atsushi Takai, Masako Mishima, Eriko Iguchi, Etsuro Hatano, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Whole-genome sequencing analysis on the hypovascular liver tumors at the early stage of multistep hepatocarcinogenesis
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2024 (消化器病週間; 米国肝臓学会) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Haruhiko Takeda, Atsushi Takai, Masayuki Ueno, Yosuke Fujii, Shigeharu Nakano, Masako Mishima, Eriko Iguchi, Tadashi Inuzuka, Etsuro Hatano, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Whole-genome sequencing-based mutational analysis on hypovascular small hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 APASL 2024 (アジア太平洋肝臓学会) (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------