

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10675

研究課題名（和文）肝細胞癌におけるドライバー遺伝子変異と薬剤感受性関連遺伝子発現変化の探索

研究課題名（英文）Exploratory research of driver gene mutation and drug sensitivity-related genes expression changes in hepatocellular carcinoma

研究代表者

上野 昌樹（UENO, Masaki）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90405465

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）： ドライバー遺伝子群の変異と薬剤感受性関連遺伝子群との間で有意な関連性を求めることはできなかった。さらに、薬剤感受性関連遺伝子群の発現の多寡とTACE治療や分子標的治療剤などの治療効果との間でも有意な関連性を求めることはできなかった。術前に分子標的治療剤が実施された一部の症例での解析では、腫瘍周辺のCD8陽性T細胞の浸潤程度と治療効果と関連性が推察され、腫瘍自体の薬剤感受性に係る遺伝子発現のみならず、腫瘍微小環境の状態が強く治療効果に影響をおよぼしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実臨床において薬剤治療効果を推測するには、腫瘍自体の遺伝子変異や、薬物感受性関連遺伝子の発現多寡のみならず、腫瘍微小環境の状態（抗腫瘍免疫の状態や、癌関連線維芽細胞の動態）などの解析を加える必要があることが分かった。

研究成果の概要（英文）： There was no significant association between the mutations in the driver genes and expressions in drug sensitivity-related genes. Furthermore, there was no significant relation between expressions of these drug sensitivity-related genes and the therapeutic effects of TACE therapy or molecular-targeted therapies.

Regarding the therapeutic effect in some patients received molecular-targeted therapies, there was a suggestive relation between the degree of infiltration of CD8-positive T cells around the tumor and the therapeutic effect. Therefore, not only gene expression of drug sensitivity-related genes, it was suggested that the condition of the tumor microenvironment strongly affects the therapeutic effect.

研究分野：肝臓外科

キーワード：腫瘍微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで肝細胞癌の全ゲノム解析が行われ、クロマチン制御に係る多数のドライバー遺伝子変異を報告されてきた (Fujimoto A, Ueno M, Nakagawa H et al. Nature genetics 2012, 2016;). 最も高頻度であったのは TERT 遺伝子の変異であり、次いで、TP53, CTNNB1, AXIN1, ARID2 などの遺伝子変異を多く認めた。予後に係る遺伝子群としては、TP53, ARID2, PBRM1, CDKN2A などが抽出され、特に TP53 の変異は強い予後不良因子であった。このように予後に係る遺伝子変異が同定されてきたが、これまでの検討では、変異の“あり”・“なし”のみの評価で、各遺伝子の変異が、「どのように癌細胞に影響を及ぼし、どのように予後に悪影響をきたしているのか？」までの検討ができていない。

さらに、現在において、肝細胞癌において有効な(動注)抗癌剤治療のレジメが無いが、ドライバー遺伝子の変異と、これまでに報告されている各種の抗癌剤感受性関連遺伝子の発現の変動との関連性が明らかにされれば、遺伝子変異に従った肝細胞癌の個別化(動注)化学療法へと展開が可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの全ゲノムシーケンスの解析に供出した肝細胞癌症例(115 サンプル)の解析データに基づき、代表的なドライバー遺伝子群の変異をパターン化して、臨床応用可能な情報との結びつき(特に本研究では、抗癌剤感受性に関連する遺伝子群の発現変化)を明らかにし、さらに、予後への影響について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

和歌山県立医科大学第 2 外科にて手術を実施した肝細胞癌症例を対象とした。手術にて切除された組織サンプルを用いて遺伝子解析を実施し、臨床病理学的悪性度との相関性を検討した。RNA の抽出と cDNA ライブラリーの作成はキット製品により実施。薬剤感受性や癌悪性度に関連のある遺伝子群に関し網羅的に PCR 解析を実施した。リストアップされた遺伝子群と、ドライバー遺伝子群の変異・臨床病理学的悪性度・実施された薬物治療の効果との間での紐づけを行い、関連性の有りそうな遺伝子群を抽出した。

### 4. 研究成果

ドライバー遺伝子群の変異と薬剤感受性関連遺伝子群との間で有意な関連性を求めることはできなかった。更に、薬剤感受性関連遺伝子群の発現の多寡と TACE 治療や分子標的治療剤などの治療効果との間でも有意な関連性を求めることはできなかった。また分子標的治療剤の治療効果との関連性に関しても有意な因子を抽出することはできなかった。術前に分子標的治療剤が実施された一部の症例での解析では、腫瘍周辺の CD8 陽性 T 細胞の浸潤程度と治療効果と関連性が

推察され、腫瘍自体の薬剤感受性に係る遺伝子発現のみならず、腫瘍微小環境の状態が強く治療効果に影響をおよぼしていることが示唆された。また、患者の全身的な免疫状態として、リンパ球・単核球比率も薬剤治療の効果に影響を及ぼしていることが分かり、肝細胞癌における薬物治療の効果を予測するには、腫瘍自体の薬剤感受性だけでなく、むしろ、宿主の免疫応答の活性程度を考慮しないといけないことが分かった。

一方、ドライバー遺伝子群の変異と病理学的悪性度との関連性に関しては、EMTに関連する遺伝子群から、CDH1・ID2・MMP9・TCF3が悪性度との関連性のある遺伝子として抽出された。その中でもCDH1とMMP9は強い関連性を認めていた(図1)。これらの遺伝子は、TP53, CTNNB1のドライバー遺伝子異常との関連性が有意ではないが示唆されるものであった。これらの遺伝子は、病理学的脈管浸潤との有意な相関を認め、alpha fetoprotein (AFP)の血清濃度との有意な相関も認めた。これら遺伝子群の定量的発現程度と短期予後との関連性を求めたところ、各々の遺伝子が予後に関与していた。

これらを基に、予後を予測する回帰式を作成すると、 $Risk\ score = (-0.333 \times CDH1) + (-0.400 \times ID2) + (0.399 \times MMP9) + (0.387 \times TCF3)$  の回帰式が作成された。この回帰式は術後3年目までの予後と強く相関を認め、曲面下面積0.69のROC曲線が描出された(図2a)。

更には、再発形式として、Risk score 高値症例は、ミラノ基準外再発を来す頻度が多く、予後に関連する原因の一つと考えられた。ただし、5年目までの予後予測となると肝内多中心性発生に伴う再発が予後に関係してくるため、この回帰式の予後予測能は減弱された(図2b)。

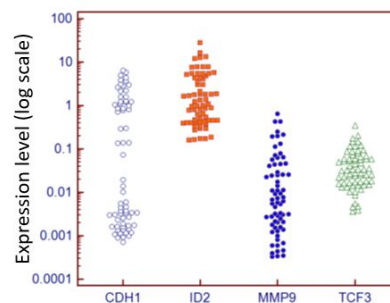


図1) EMT 関連遺伝子の発現レベル

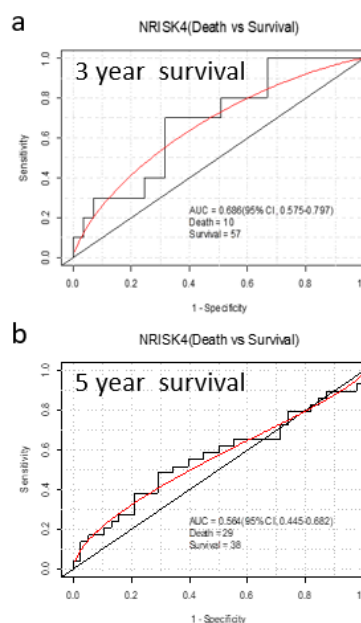


図2) 3年生存におけるROC曲線(a)と5年生存におけるROC曲線(b)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueno M, Kawai M, Park JY, Hirono S, Okada KI, Hayami S, Wang HJ, Yamaue H.	4. 巻 245
2. 論文標題 Prognostic Analysis of Hepatocellular Carcinoma With Hepatitis C Virus Infection Using Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Profiles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Surg Res.	6. 最初と最後の頁 302-308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2019.07.077.	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 Kawai M, Hirono S, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Kobayashi R, Ueno M, Hayami S, Tanioka K, Yamaue H.	4. 巻 165
2. 論文標題 Low lymphocyte monocyte ratio after neoadjuvant therapy predicts poor survival after pancreatotomy in patients with borderline resectable pancreatic cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1151-1160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2018.12.015.	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 Fujita M, Yamaguchi R, Hasegawa T, Shimada S, Arihiro K, Hayashi S, Maejima K, Nakano K, Fujimoto A, Ono A, Aikata H, Ueno M, Hayami S, Tanaka H, Miyano S, Yamaue H, Chayama K, Kakimi K, Tanaka S, Imoto S, Nakagawa H.	4. 巻 53
2. 論文標題 Classification of primary liver cancer with immunosuppression mechanisms and correlation with genomic alterations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2020.102659.	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 Wardell CP, Fujita M, Yamada T, Simbolo M, Fassan M, Karlic R, Polak P, Ueno M, Nakamura T, Nakagawa H, et al.	4. 巻 68
2. 論文標題 Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hepatol	6. 最初と最後の頁 959-969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhep.2018.01.009.	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 -

1. 著者名 Shigekawa Y, Hayami S, Ueno M, Miyamoto A, Suzuki N, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Hamamoto R, Yamaue H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Overexpression of KDM5B/JARID1B is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 34320-34335.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26144.	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 -

1. 著者名 Furuta Mayuko, Ueno Masaki, Fujimoto Akihiro, Hayami Shinya, Yamaue Hiroki, Nakagawa Hidewaki, et al	4. 巻 66
2. 論文標題 Whole genome sequencing discriminates hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis from multi-centric tumors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 363 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2016.09.021	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上野 昌樹
2. 発表標題 上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子プロファイルを用いたC型肝炎由来肝細胞癌の 予後予測の可能性
3. 学会等名 第55回日本肝癌研究会
4. 発表年 2019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	速水 晋也  (Hayai Shinya)  (00468290)	和歌山県立医科大学・医学部・講師   (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	川井 学  (Kawai Manabu)  (40398459)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授    (24701)	
研究分担者	山上 裕機  (Yamaue Hiroki)  (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・教授    (24701)	

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