

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07032

研究課題名(和文)混合型肝癌サブタイプの遺伝子発現解析と診断分子マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of diagnostic marker of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma subtypes by gene expression analysis

研究代表者

矢野 博久 (YANO, Hirohisa)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40220206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：混合型肝癌の一亜型の中間細胞型(INT)の組織診断に有用な分子を同定する事を目的とした。肝細胞癌(HCC)、肝内胆管癌(iCCA)、INTの組織を用いて網羅的な遺伝子解析を行い、INTにおいて特異的に発現している91個の遺伝子を同定した。その中で、Malic enzyme 1(ME1)の発現が特異的に高く、ME1陽性率はINT、HCC、iCCAでそれぞれ77%、62%、28%であった。肝細胞マーカー(HepPar-1)、胆管細胞マーカー(K7、K19)とME1の発現をスコア化することで高い感度(89%)、特異度(88%)でINTを診断することに成功した。今後多施設で診断の標準化が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

混合型肝癌の一亜型である中間細胞型(INT)は比較的稀な腫瘍で一般病理医が遭遇することが少ない。また、多彩な組織像を示すことが多く、肝病理専門医でないと正確な診断をすることがしばしば困難である。肝細胞癌、肝内胆管癌、細胆管癌などの腫瘍と治療法や予後が異なることから正確な診断が必要である。本研究では、肝細胞マーカーのHepPar-1、胆管細胞のマーカーのK7とK19そしてMalic enzyme 1の免疫染色を腫瘍に対して行い、発現をスコア化することで高い感度(88.6%)、特異度(88.0%)でINTを診断することができる事を明らかにし、INTの診断の標準化に貢献できると確信している。

研究成果の概要(英文)：Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, intermediate-cell subtype (INT) is a rare liver tumor and could even be misdiagnosed by trained liver pathologists. We aimed to identify specific diagnostic markers of INT. We compared 4,7000 gene expression between HCC, iCCA, and INT by cDNA microarray and identified 91 significantly up- or down-regulated genes. Malic enzyme 1 (ME1) was most significantly up-regulated. Histologically, the positive rates of ME1 in INT, iCCA, and HCC were 77%, 28%, and 62%, respectively. After scoring immunohistochemical expressions of HepPar-1, ME1, K7, and K19, composite score can discriminate between INT and HCC or iCCA. INT could be discriminated from iCCA with high sensitivity (89%) and high specificity (88%). This can make precise pathological diagnosis of INT in many institutes.

研究分野：肝臓病理学

キーワード：混合型肝癌 中間細胞型 免疫染色 組織診断マーカー 遺伝子発現 肝細胞癌 胆管細胞癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 混合型肝癌(cHCC-CCA)は原発性肝癌全体の約1%程度の稀な腫瘍で、原発性肝癌の90%超を占める肝細胞癌(HCC)とは治療法が異なり、予後も不良と言われているため、正確な診断が必要である。

(2) 2010年WHO分類では、cHCC-CCAは、明瞭なHCCと胆管癌(iCCA)が混在してみられる古典(C)型と肝STEM細胞像を伴う(SCF)亜型に分類され、さらにこれを典型的型、中間細胞型(INT)、細胆管型(CLC)の3群に分類されている。しかし、実際には、これら3群の組織像は同一癌結節内ではしばしば混在し、更にHCCやiCCAが併存することもある。SCF亜型の組織発生として肝幹/前駆細胞由来が疑われているが、幹/前駆細胞に特異的なマーカーが、未だ同定されていないため十分解明されていない。

(3) INTやCLCには特異的な分子マーカーが存在しないため、これらの病変と低分化型HCCやiCCAとの鑑別が、しばしば問題となり、施設間で診断基準が異なり診断に乖離が生じている。正確な診断が下されないと患者が適切な治療が受けられず不利益となり、更に、日本、そして世界の統計解析にも大きな影響を与えることとなり、正確な腫瘍の性状が把握できない。SCF亜型の分子レベルでの特徴を理解することは、臨床病理学的特徴の理解や治療に繋がると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、cHCC-CCAのSCF亜型を正確に診断するための、SCF亜型の特にINTやCLCに特異的に発現している分子を同定し、SCF診断基準の日本のみではなく全世界における標準化である。

### 3. 研究の方法

(1) HCC、iCCA、SCF亜型のINTとCLCの遺伝子発現を検討するために、外科切除されたそれぞれの腫瘍組織と非腫瘍部組織のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織からRNAを抽出した。INTやCLCに関しては、腫瘍結節内に異なる組織像が混在する場合、必要な腫瘍組織をトリミングして材料を採取した。Arcturus Paradise PLUS Reagent Systemを使用しFFPE組織切片からRNAの抽出を行った。網羅的遺伝子発現の検討には、マイクロアレイ(GeneChip 3' IVT Express Reagent kit、Affymetrix GeneChip Human X3P Array使用)を使用した。cHCC-CCAのSCF亜型に特異的な分子を同定するために、まずはそれぞれの腫瘍で癌部と非癌部の遺伝子発現を検討し、次に、腫瘍間で遺伝子発現を比較した。

(2) SCF亜型のうちINTとCLCの両者を1度に遺伝子発現解析を行うのが困難なため、SCF亜型のうちINTの遺伝子発現をまず検討した。他の腫瘍と比較し、特異的な遺伝子発現が見られた分子について、25-60例のHCC、iCCA、INTのFFPE切片を用いて免疫染色を行い発現の特異性などを検討した。

(3) 当施設で独自に樹立・維持しているHCC、iCCA、cHCC-CCAの細胞株を使用してME1の発現、機能解析(siRNA)を行い、cHCC-CCAの細胞株に関しては網羅的遺伝子解析も行った。

### 4. 研究成果

(1) HCC、iCCA、INT、CLC及びそれらの非腫瘍部肝組織の網羅的遺伝子解析により、INTの腫瘍部において特異的に発現亢進もしくは低下している91個の遺伝子を同定した。発現亢進が最も見られたのは、Malic enzyme 1 (ME1)で、carboxypeptidase D (CPD)、次いで、DNA (cytosine-5-)methyltransferase 1 (DNMT1)、DNA (cytosine-5-)methyltransferase 1 (FAM122B)等が認められた。発現が低下していたのは、MT-ND2 pseudogene 28//MTND2 (MTND2P28//ND2)などがみられた。ME1はHCCやiCCAに比較して6倍程度発現亢進が見られた。

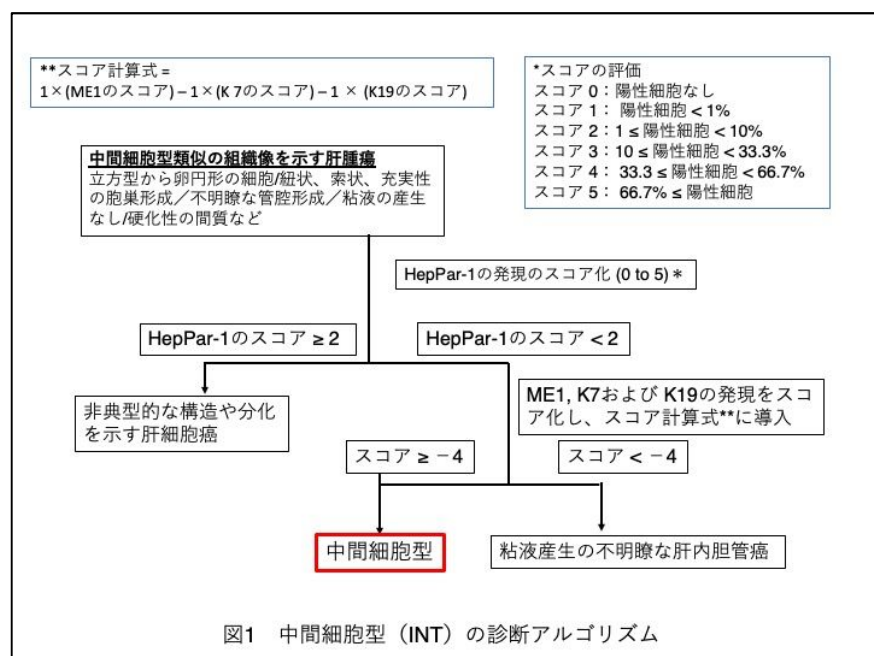


図1 中間細胞型 (INT) の診断アルゴリズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

(2)次に、最も発現が亢進している分子である ME1 の蛋白発現を INT、HCC、iCCA の組織切片の免疫染色法により検討した。その結果、ME1 陽性率は INT、HCC、iCCA でそれぞれ 77.1%、61.7%、28.0%であった。陽性細胞の割合を 0~5 の 6 段階でスコアリングを行い、既存の肝細胞マーカー (HepPar-1)、胆管細胞マーカー (K7、K19) と ME1 それぞれのスコアを組み合わせることで高い感度 (88.6%)、特異度 (88.0%) で INT を診断できることが判明した (図 1)。

(3) 遺伝子解析では CPD と DNMT1 が INT で発現亢進していたが、免疫染色では発現増加は認めなかった。一方、HCC の腫瘍部では CPD の高発現が認められ、新たな HCC の組織腫瘍マーカーとなる可能性を確認した。

(4) ME1 は HCC の分化度が低下するにつれて発現が亢進し、ME1 高発現群の HCC では無再発生存期間が短い傾向があることが判明し、ME1 は HCC の予後因子となり得ると考えられた。

(5) 当講座で保有している INT、HCC、iCCA の細胞株で Western blotting を行うと、INT、HCC では ME1 発現亢進がみられ、iCCA では亢進は認めず、遺伝子解析や免疫組織化学の結果とも一致していた。cHH-CCA の細胞株 (KMCH-1 と KMCH-2) の網羅的遺伝子解析では特異的遺伝子発現を新たに同定することはできなかった。HCC 株、INT 細胞株を用いた siRNA による ME1 のノックダウンの検討では、コントロールと比べ細胞の形態、浸潤能などに有意な差は見られなかった。

(6) CLC の診断マーカーの同定に関しては、マイクロアレイによる遺伝子発現の検討を実施し SMAD6、SNRPN、ARID2 等の遺伝子に特異的な変化が見られたため、検討を進めている。上記のように、同定した分子に関しては今後も検討を加えて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Mihara Y., Akiba J., Ogasawara S., Kondo R., Fukushima H., Itadani H., Obara H., Kakuma T., Kusano H., Naito Y., Okuda K., Nakashima O., and Yano H	4. 巻 49
2. 論文標題 Malic enzyme 1 is a potential marker of combined hepatocellular cholangiocarcinoma, subtype with stem-cell features, intermediate-cell type	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1066-1075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13365	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 2件）

1. 発表者名 三原勇太郎、秋葉純、小笠原幸子、近藤礼一郎、福嶋浩人、板谷啓、草野弘宣、内藤嘉紀、中島収、矢野博久
2. 発表標題 Malic enzyme 1 (ME1) は混合型肝癌中間細胞垂型の診断マーカーとして有用である
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirohisa Yano and Yutaro Mihara
2. 発表標題 Malic Enzyme 1 is a potential marker of intermediate cell carcinoma, a subtype of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma
3. 学会等名 The 10th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirohisa Yano, Yutaro Mihara, Jun Akiba, Sachiko Ogasawara
2. 発表標題 Malic enzyme 1 is a potential marker of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, subtypes with stem-cell features, intermediate-cell type
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of Laennec Liver Pathology Society (国際学会)
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	秋葉 純  (AKIBA Jun)  (00341305)	久留米大学・大学病院・教授   (37104)	
研究 分担者	小笠原 幸子  (OGASAWARA Sachiko)  (40258405)	久留米大学・医学部・講師   (37104)	

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