

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09145

研究課題名(和文) 癌幹細胞の観点から見た肝癌におけるゲノム不均一性の解明

研究課題名(英文) Genomic heterogeneity in hepatocellular carcinoma from a cancer stem cell perspective.

研究代表者

石井 隆道 (Ishii, Takamichi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70456789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肝癌の大部分は肝細胞癌(HCC)と肝内胆管癌(iCCA)であるが両者の中間的性質を有する亜分類が存在する。同一腫瘍内にHCC成分とCCA成分を持つ混合型肝癌(cHCC-CCA)や細胆管に類似する細胆管癌(CLC)である。本研究は中間的性質をもつこれらの腫瘍の臨床病理学的特徴を検討し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を目的とした。

腫瘍径の小さなcHCC-CCLはTP53変異陽性でHCCに類似したパターンを呈していた。一方CLCはCCAに類似した遺伝子変異パターンを有し臨床的にもiCCAとして再発した症例があったことから、CLCはiCCAと類似していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

稀な腫瘍型であるcHCC-CCAとCLCのゲノム解析を行い、原発性肝癌でも多くを占めるHCCやiCCAと比較検討した。cHCC-CCAで分類されていたカテゴリーはTP53変異の有無によってさらに分類され、TP53変異のある症例は小型でHCCとよく似た性質を有していた。一方、CLCはiCCAとよく似た特徴を示していた。

これらの結果からはHCCやiCCAとの類似性、相違性が判明し、稀な腫瘍型ではあるが遺伝子変異のパターンによってはHCCやiCCAに準じた治療法が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The majority of primary liver cancers are hepatocellular carcinoma (HCC) and intrahepatic cholangiocarcinoma (iCCA), but there are subclasses with characteristics intermediate between the two. There are two subtypes of hepatocarcinoma with intermediate characteristics between HCC and iCCA: combined hepatocellular-cholangiocarcinoma (cHCC-CCA), which have both HCC and CCA components in the same tumor, and cholangiolocellular carcinoma (CLC), which resemble the small bile ducts. The aim of this study was to investigate the clinicopathological characteristics of these tumors with intermediate characteristics and to analyze their genomes using next-generation sequencers.

The small-sized cHCC-CCL tumors were TP53 mutation-positive and showed a pattern similar to HCC, whereas the CLC tumors resembled CCA. On the other hand, CLC had a gene mutation pattern similar to that of CCA, and some cases recurred clinically as iCCA.

研究分野：消化器外科学

キーワード：混合型肝癌 細胆管細胞癌 癌幹細胞 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

異なる個体間だけでなく同一腫瘍においても空間的・時間的に腫瘍細胞の特性が異なることは臨床においてよく観察されることである。これらの多様性は腫瘍細胞の生存戦略の一つと考えられており、治療抵抗性を生じうる元凶と見なされている。

我々はこれまでに腫瘍内不均一性を生じせしめる成因として癌幹細胞に注目してきた。癌幹細胞は正常組織と同様に癌組織でも幹細胞を頂点とする「分化」機構が存在し多様な性質を持つ娘細胞を生じるとする仮説である。これまで胆管癌 (T.Ishii et al. Cancer Letters, 2010)、膵癌 (N.Sasaki, T.Ishii et al. Cancer Letters, 2012) および肝細胞癌 (T.Kawai, T.Ishii et al. Clinical Cancer Research, 2015) において癌幹細胞の存在を示してきた。特に肝細胞癌では肝前駆細胞・胆管上皮細胞のマーカーである K19 を発現している肝細胞癌細胞は癌幹細胞の特性を示し上皮間葉転換に関わる遺伝子を発現しているだけでなく、臨床的には K19 陰性肝細胞癌と比較して肝切除でも肝移植でも予後は極めて不良であり、K19 発現の有無は独立した予後因子として示された。さらに我々は、肝硬変の細胞外基質は正常肝のそれと比較して肝細胞癌細胞をより悪性度の高いものへと変化させることも示している (Y.Miyauchi, T.Ishii et al. 2017, Scientific Reports)。これらは癌幹細胞や細胞外微少環境に起因する細胞機能による腫瘍内不均一性のメカニズムを示したものである。

一方で近年の次世代シーケンス技術の進歩によりゲノムレベルでの不均一性が様々な腫瘍で報告されてきている。肝細胞癌においても網羅的解析が行われ、発癌や進展に重要な役割を果たすドライバー遺伝子が報告されており、ゲノム解析が進んでいる。しかしながら前述の細胞機能による不均一性とゲノム変異による不均一性との関連については解明されておらず大きな課題として残っている。

2. 研究の目的

原発性肝癌の大部分は肝細胞癌 (HCC) と肝内胆管癌 (iCCA) であるが両者の中間的性質を有する亜分類が存在する。同一腫瘍内に HCC 成分と CCA 成分とを持つ混合型肝癌 (cHCC-CCA)、細胆管に類似する細胆管癌 (CLC) である。本研究は中間的性質をもつこれらの腫瘍の臨床病理学的特徴を検討し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を目的とした。

3. 研究の方法

当科で手術を行った原発性肝癌のうち、病理学的に cHCC-CCA あるいは CLC と診断された症例を対象とした。cHCC-CCA と CLC は 2005 年から 2018 年の当院における原発性肝癌 1035 切除例 (肝移植を含む) を対象とした。ゲノム DNA は新鮮凍結標本あるいは FFPE 標本から抽出し、全エクソーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) cHCC-CCA : cHCC-CCA は 21 切除例 (再発 3 例を含む)、1.9% に認められた。9 患者において再発の病理診断がなされているが、4 患者で cHCC-CCA として、4 患者で HCC として、1 患者で CCA として再発した。遺伝子解析が可能であった症例は 13 例であった。腫瘍径 3cm 未満の

6例では全例TP53の遺伝子変異を有していたが3cm以上の7症例では1例のみであった（図

1）．腫瘍径3cm以上の腫瘍は多彩な遺伝子pathwayで変異が見られた．Mutation signature解析ではTP53変異陽性腫瘍はTからCへの変異が多く肝細胞癌に類似したパターンであった（図1）．

(2) CLC：CLCは8患者9切除例（再発1例を含む）0.87%に認められた．CLCでは肝炎ウイルスの背景は認めなかったのに対してiCCAはC型肝炎症例が有意に多かった．全生存率ではCLCの方がiCCAより予後が良い傾向にあった．再発に対して2患者で再切除が行われた．1例は肝再発で病理もCLCであり，もう一例はリンパ節転移で病理はiCCAだった．遺伝子解析が可能であった症例は8例であった．ARID1A, KRAS, IDH1, HRAS, GNAS, ARID2, ARID1Bといった胆道癌に特徴的とされているような遺伝子変異を認めた（図2）．

本研究の内容は以下の学会で発表した．

(1) 伊藤孝，石井隆道ほか．混合型肝癌の臨床病理学的特徴と外科治療．第57回日本肝癌研究会．2021年．

(2) 石井隆道ほか．肝細胞と胆管細胞との中間的性質を持つK19陽性肝細胞癌，混合型肝癌，膵胆管癌における臨床病理学的ならびにゲノム解析．第122回日本外科学会総会．2022年．

(3) 牧野健太，石井隆道ほか．当科における細胆管細胞癌と肝内胆管癌の臨床的特徴の比較検討．第44回日本肝臓学会西部会．2021年．

(4) 牧野健太，石井隆道ほか．当科における細胆管細胞癌の臨床的特徴．第57回日本肝癌研究会．2021年．



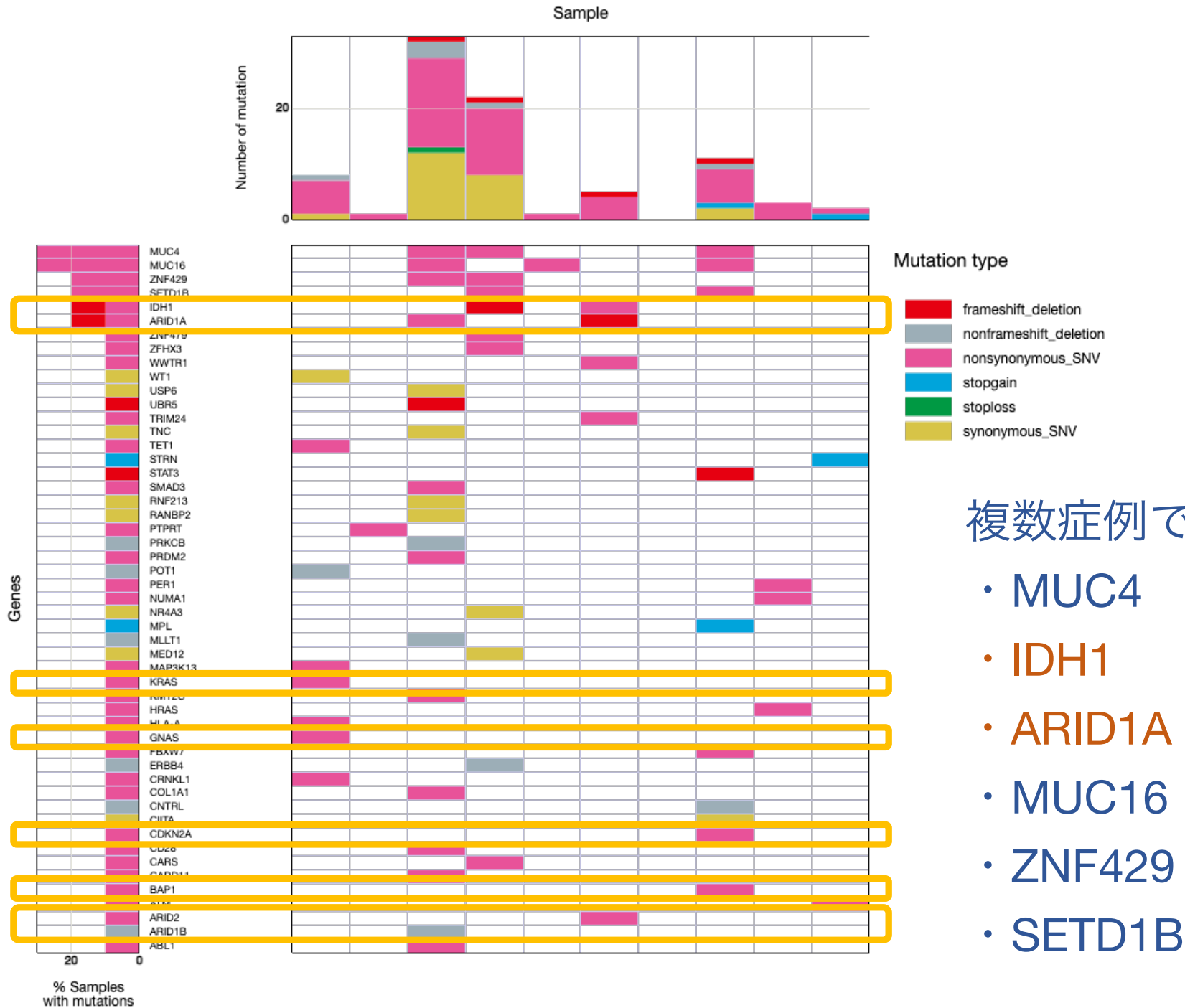
<3cm (6例)	>3cm (7例)	(fisher)
3	3	1
6	1	0.005
0	2	0.46
0	2	0.46
1	2	1
		Epigenetic
2	6	0.10
		DNA methylation
		SWI/SNF
		histone
0	4	0.07
		RAS/PI3K pathway
0	3	0.19
		Hippo/Notch pathway

TERT
p53 / cell cycle
Wnt pathway
Nrf2 / BAP1
Epigenetic
DNA methylation
SWI/SNF
histone

RAS/PI3K pathway
Hippo/Notch pathway

case	9	15	12	13	1	16	10	5	14	4	6	3	11		
	1st 2nd		1st 2nd		1st 2nd		1st 2nd		1st 2nd		1st 2nd				
age	65	73	45	48	63	57	67	45	59	49	61	81	82	74	65
sex	M	F	M	F	M	F	M	F	F	M	M	M	M	F	
background	C	NASH	B	B	C	C	NASH	ALC	B	NL	B	NL	NL	C	NL
Child-Pugh	C	B	A	A	A	A	B	C	A	A	A	A	A	B	A
AFP	85.8	2	14.2	1.7	3.6	116	2075	463	3.7	4.7	7.1	78.6	137	1517	1.7
PIVKA-2	84	26	28	19	18	15	380	17	23	1481	22480	2610	181	445	17
CEA	2.4	13.1	2.6	2.4	0.6	3.9	4.6	11.1	1.6	1.5	1.2		1.2		4.5
CA19-9	40	121	22.7	23.7	39.9	84		0.6	39.3	23.8	32.6		5.2		17.2
CHCsize	1.4	1.4	2.5	1.2	2.5	2.6	2.8	3.6	4	4	5.5	5.5	4.5	7.3	11.7
Tumor number	3	1	1	2	1	1	3	10	1	1	1	1	1	1	1
TMB	1.48	2.33	1.57	2.07	1.81	4.63	2.68	1.16	1.16	0.23	3.17	3.09	3.09	4.16	1.08
TERTpromoter															
TP53															
EP300															
CTNNB1															
APC2															
NFE2L2															
BAP1															
IDH1															
ARID1A															
ARID1B															
PBRM1															
KMT2D															
KMT2C															
SETD2															
PDGFRA															
BRCA1															
CBLB															
KDR															
STK11															
TNC															
EPHA2															
FAT4															
FAT3															
NCOR2															

■ Promoter mutation
■ Nonframeshift indel
■ Frameshift indel
■ Missense mutation
■ Nonsense mutation
■ Silent mutation



複数症例で認めた変異は

- MUC4
- IDH1
- ARID1A
- MUC16
- ZNF429
- SETD1B

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ishii Takamichi, Ito Takashi, Sumiyoshi Shinji, Ogiso Satoshi, Fukumitsu Ken, Seo Satoru, Taura Kojiro, Uemoto Shinji	4. 巻 18
2. 論文標題 Clinicopathological features and recurrence patterns of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12957-020-02099-w	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 Ito Takashi, Ishii Takamichi, Sumiyoshi Shinji, Ogiso Satoshi, Fukumitsu Ken, Ito Takashi, Yagi Shintaro, Seo Satoru, Hata Koichiro, Taura Kojiro, Uemoto Shinji	4. 巻 74
2. 論文標題 Living donor liver transplantation for combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: A case series of four patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 46～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijscr.2020.07.069	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井隆道, 伊藤孝, 若間聡史, 小木曾聡, 福光剣, 瀬尾智, 田浦康二郎, 上本伸二
2. 発表標題 初発および再発の混合型肝癌に対する治療法
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井隆道, ほか
2. 発表標題 混合型肝癌の外科切除例の検討：再発様式を中心に
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井隆道, ほか
2. 発表標題 臨床的背景から見た混合型肝癌の亜分類
3. 学会等名 第55回日本肝癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井隆道, ほか
2. 発表標題 混合型肝癌に対する外科治療法 肝移植症例や再発症例も含めた検討
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤孝, 石井隆道, ほか
2. 発表標題 混合型肝癌に対する肝移植の適応
3. 学会等名 第55回日本移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤孝, 石井隆道, ほか
2. 発表標題 混合型肝癌に対する肝移植の適応
3. 学会等名 第43回肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤孝, 石井隆道, ほか
2. 発表標題 混合型肝癌の臨床病理学的特徴と外科治療
3. 学会等名 第57回日本肝癌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井隆道, ほか
2. 発表標題 肝細胞と胆管細胞との中間的性質を持つK19陽性肝細胞癌, 混合型肝癌, 臍胆管癌における臨床病理学的ならびにゲノム解析
3. 学会等名 第122回日本外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野健太, 石井隆道, ほか
2. 発表標題 当科における細胆管細胞癌と肝内胆管癌の臨床的特徴の比較検討
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野健太, 石井隆道, ほか
2. 発表標題 当科における細胆管細胞癌の臨床的特徴
3. 学会等名 第57回日本肝癌研究会
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
研究分担者	河合 隆之 (Kawai Takayuki) (00813867)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	小木曾 聡 (Ogiso Satoshi) (10804734)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	上本 伸二 (Uemoto Shinji) (40252449)	滋賀医科大学・医学部・学長 (14202)	
研究分担者	福光 剣 (Fukumitsu Ken) (70700516)	京都大学・医学研究科・特定講師 (14301)	

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