

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2023

課題番号：19KK0408

研究課題名（和文）通常型腺癌から肝様腺癌へのクローン進化過程の検証と病理診断への応用

研究課題名（英文）Analysis of the clonal evolution process from gastric adenocarcinoma to hepatoid adenocarcinoma and its application to pathological diagnosis.

研究代表者

藤倉 航平（Fujikura, Kohei）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50773751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 24ヶ月

研究成果の概要（和文）：肝様腺癌は、肝臓以外の組織に発生するが、形態的及び機能的に肝細胞癌の特徴を併せ持つ腺癌の特殊型である。胃は肝様腺癌の最好発部位で、肝転移やリンパ節転移が多く、予後は極めて悪い。研究代表者らは、外科的切除された、胃原発肝様腺癌症例を収集し、免疫染色、ドライバー遺伝子変異の同定、RNA-sequencingによる発現解析、胃癌オルガノイドの肝様分化の検討等、統合解析を行っている。本研究により、肝様分化を引き起こす要因とともに、治療標的の候補を明らかにしたい。他臓器の肝様腺癌に関しても、類似した発癌メカニズムが確認できれば、横断的な疾患概念に結びつく可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝様腺癌は胃をはじめとする様々な諸臓器で発生し、生物学的悪性度が高いことが知られている。臨床医の注目は高く、遺伝子変異、トランスクリプトーム、細胞生物学的解析を包括し、構成的に理解することは意義がある。また、欧米・アジアのいずれにおいても、肝様腺癌の発生経路に言及した報告はない。本研究成果がさらに進展すれば、病理診断の基盤構築や肝様形質に立脚した治療法が確立される可能性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hepatoid adenocarcinoma is a special type of adenocarcinoma that arises in tissues other than the liver but has both morphologic and functional features of hepatocellular carcinoma. The stomach is the most common site of hepatoid adenocarcinoma, with a high incidence of liver and lymph node metastases and a very poor prognosis. We are collecting surgically resected cases of primary hepatoid adenocarcinoma of the stomach and performing integrated analysis, including immunostaining, identification of driver gene mutations, expression analysis by RNA-sequencing, and examination of hepatoid differentiation of gastric cancer organoids. Our final goal is to identify the factors that cause hepatoid differentiation as well as candidate therapeutic targets. If similar carcinogenesis mechanisms can be identified in hepatoid adenocarcinoma of other organs, this may lead to a cross-disciplinary disease concept.

研究分野：病理診断

キーワード：肝様腺癌 遺伝子変異 次世代遺伝子解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

肝様腺癌 (hepatoid adenocarcinoma) は、Ishikura らによって提唱された腺癌の特殊型で、肝臓以外の組織に発生する、形態的及び機能的に肝細胞癌と腺癌の特徴を併せ持つ比較的稀な悪性腫瘍である (Ishikura et al, Cancer, 1985)。胃、膵臓、肺、子宮など様々な諸臓器での発生が報告されているが、胃は肝様腺癌の最好発部位で、我が国では胃癌全体の約 2-5% の頻度で認められ、欧米諸国と比較して頻度が高い (Kono et al. Dig Surg, 2002; Chang et al. Am J Gastroenterol, 1992)。α-fetoprotein (以下 AFP) の産生が高頻度で証明されることから、AFP 産生胃癌の代表的な組織型でもある。膵、肺、子宮では、さらに稀であるが、肝様腺癌として包括すると、カンサーボードに挙がり集学的治療の検討がなされる機会は少なくない。

肝様腺癌の最大の特徴は、通常型の低分化腺癌と比して生物学的悪性度が高いことで、リンパ節転移 (80%以上) や肝転移 (30%前後) が高頻度で確認される (Adachi et al, Oncology, 2003)。また肝転移巣においては、原発性肝細胞癌との鑑別が治療方針決定の鍵となるが、画像上も病理学的にも鑑別困難症例をしばしば経験する。近年、肝様腺癌では Glypican3, SALL4 などが種々の割合で陽性となると報告されていたが、これに加えて、申請者らが特異度の高い肝細胞癌側の診断マーカー BSEP と MDR3 を提唱したことで (Fujikura et al. Am J Surg Pathol, 2016) より確実な病理診断が可能となった。しかしながら、低分化症例や生検では依然として鑑別が難しく、また肝様腺癌の発癌の根本原因である遺伝的背景、発生機序、背景素因の解明、さらに生物学的悪性度に対応した治療法の確立は依然として行われていない。

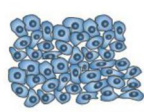
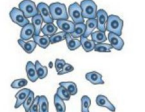
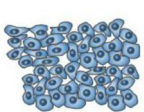
	胃癌		肝細胞癌
	肝様腺癌	通常型低分化癌	
形態模式図			
発生頻度	2-5% in Japan	95%以上	充実状、偽腺腔状等
組織型	充実状	充実状～孤在性	陽性
AFP	陽性	陰性	HBV, HCV, アルコール等
背景素因	不明	食生活、H. pylori等	TERT, CTNNB1, TP53等
遺伝子変異	未同定	TP53, CDH1, RHOA等	<40%
5年生存率	<30%	>70%	

図1 肝様腺癌の臨床病理学的特徴

### 2. 研究の目的

肝様腺癌の診断における最大の問題点は、肝細胞様分化の根本原因である遺伝子異常、遺伝子発現変移が十分に解析されておらず、分化を制御するメカニズムは依然として不明である。結果的に、病理診断の基盤構築は不十分であり、標準治療も存在しない。本申請課題では、通常型低分化胃癌や肝細胞癌と比較解析することで、肝様分化の構成的理解と病理診断への応用を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### [Step 1] 検体と臨床情報の収集

多施設から、各諸臓器の肝様腺癌の FFPE 標本を収集する。またこれらの基本的な臨床情報を収集する。

## [Step 2] 組織学的解析

切除検体の標本を全て観察し、病変の異型度と形態や転移巣との位置関係や分散性を明らかにする。

通常型腺癌が肝様細胞癌と同時性に存在する場合は、病理医の目を通して、解析範囲を策定し、比較解析を行う。

## [Step 3] 各種免疫染色

肝様腺癌の診断に関連する既存の各種マーカー（AFP、HepPar1、Arginase 等）を用いて、臨床検体を染色する。

## [Step 4] 全エクソーム解析

## [Step 5] トランスクリプトーム解析

パラフィン包埋組織からの試料採取と DNA、RNA 精製をまず行う。微小標本であれば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション、病変が比較的大きければ、チップを用いて、各腺癌病変から、NGS 解析に供する質の保たれた核酸を抽出した。NGS ライブラリーの作成は既存の方法に従う。

## [Step 6] 細胞生物学的解析

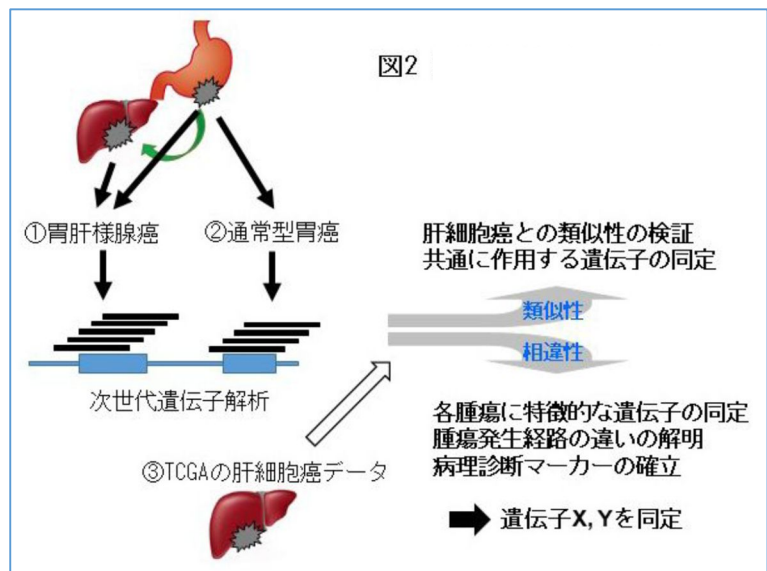
胃癌オルガノイドの維持は既存の方法に従う。培養液中に因子 X や Y を加えたうえで、分化誘導が起きたかを qPCR や免疫染色で調べる。

## [Step 7] 予後解析

遺伝子変異や遺伝子発現データ、予後に関する臨床データから、Kaplan Meier の予後曲線を算出する。

## 4. 研究成果

研究代表者は、最初に外科的切除された、胃原発肝様腺癌症例を収集し、免疫染色および臨床病理学的解析を行った。さらに、『高悪性度につながる肝細胞様形質の獲得に必要な遺伝的素因は何か？』『肝様腺癌と肝細胞癌・通常型胃癌の違いは何か？』という2つの核心的な問いに答えるには、遺伝学的解析が不可欠と判断し、次世代シーケンサーによる肝様腺癌のドライバー遺伝子の変異の同定と、RNA-sequencing



による発現解析を行った。2つの次世代シーケンサーの結果に関して統合解析を行い、肝様腺癌の分化を促す可能性のある因子 X と Y を同定した。これらの因子の機能解析を行うために、現在胃がんオルガノイドでの分化誘導実験を試みている。他臓器の肝様腺癌についても症例を収集しており、比較解析を予定している。類似した発癌メカニズムが胃にとどまらず、他の諸臓器の肝様腺癌においても働いていることが確認できれば、横断的な疾患概念に結びつく可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0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 Fujikura Kohei, Alruwail Zainab I, Haffner Michael C, Trujillo Maria A, Roberts Nicholas J, Hong Seung Mo, Macgregor Das Anne, Goggins Michael G, Roy Sujayita, Meeker Alan K, Ding Ding, Wright Michael, He Jin, Hruban Ralph H, Wood Laura D	4. 巻 254
2. 論文標題 Downregulation of 5 hydroxymethylcytosine is an early event in pancreatic tumorigenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 279 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5682	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Hosoda Waki, Felsenstein Matthus, et al.	4. 巻 70
2. 論文標題 Multiregion whole-exome sequencing of intraductal papillary mucinous neoplasms reveals frequent somatic <i>KLF4</i> mutations predominantly in low-grade regions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 928 ~ 939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-321217	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Yamashita Daisuke, Yoshida Makoto, Ishikawa Takayuki, Itoh Tomoo, Imai Yukihiro	4. 巻 74
2. 論文標題 Cytogenetic complexity and heterogeneity in intravascular lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 244 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206573	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Uesaka Kazuma	4. 巻 74
2. 論文標題 Genetic variations in the human severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor <i>ACE2</i> and serine protease <i>TMPRSS2</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 307 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206867	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Yoshida Makoto, Uesaka Kazuma	4. 巻 73
2. 論文標題 Transcriptome complexity in intravascular NK/T-cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 671 ~ 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206461	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Yamashita Daisuke, Sakamoto Ryo, Ishikawa Takayuki, Chuang Shih-Sung, Itoh Tomoo, Imai Yukihiro	4. 巻 72
2. 論文標題 Intravascular NK/T-cell lymphoma: clinicopathological and integrated molecular analysis of two cases provides a clue to disease pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 642 ~ 646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2019-205727	査読の有無 無
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0件

〔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		
米国	Johns Hopkins University		