

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08796

研究課題名(和文)胆道癌の全ゲノム解析による化学療法抵抗性に関する遺伝子変異の探索と機能解析

研究課題名(英文)Whole genome sequencing concerning the chemoresistance of bile duct cancer

研究代表者

水野 隆史(MIZUNO, Takashi)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90444413

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)：胆道癌切除検体6例の全ゲノム解析により、体細胞変異は平均53,705個、体細胞構造変異は平均22,832個、コピー数変異は平均109個の領域で確認された。体細胞変異ではSNVが85.02%、体細胞構造変異ではDELが76.50%を占め、コピー数変異では数十万bpの増幅が複数の症例で認められた。臨床情報との関連解析では、血管転移がないサンプルで遺伝子変異が高度に蓄積する傾向が見られ、統計学的有意差は得られなかったが、複数の遺伝子で群間の変異蓄積頻度に差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌は予後不良な癌種であり、有効な治療法や予後予測因子の乏しいのが現状である。本研究は、胆道癌の全ゲノム解析を行うことで、体細胞変異、体細胞構造変異、コピー数変異解析を行い、変異種別の特徴を明らかにした。また、臨床情報との関連解析により、血管転移の有無と遺伝子変異の蓄積傾向に関連があることを明らかにした。また新たなbiomarkerおよび治療の標的の可能性のある遺伝子を複数同定している。これらの結果は、胆道癌の発癌メカニズムの解明や新たな治療法の開発につながる可能性があり、学術的・社会的に意義のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Whole-genome sequencing analysis of six cholangiocarcinoma specimens demonstrated an average of 53,705 somatic mutations, 22,832 somatic structural variations, and copy number variations in 109 regions. SNVs counted for 85.02% of the somatic mutations, while DELs comprised 76.50% of the somatic structural variations. Copy number variations showed amplifications spanning several hundred thousand base pairs in some cases. Gene mutations accumulated at a higher frequency in samples without vascular invasion compared to those with vascular invasion. Although no statistically significant differences were obtained, variations in mutation accumulations between groups were observed in several genes.

研究分野：消化器外科

キーワード：全ゲノム解析 胆管癌 化学療法抵抗性

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は、肝細胞から分泌された胆汁が十二指腸に流出するまでの全排泄経路である胆道（肝内胆管、肝外胆管（肝門部・遠位胆管）、胆嚢、十二指腸乳頭部）に発生する癌の総称である。胆道癌は胆汁排泄経路を構成する組織上皮である胆道上皮から発生するという共通性を持つものの、胆道癌では発生部位によって、ゲノム背景や遺伝子変異の heterogeneity の強いことが報告されている[1]。またクラスター解析では遺伝子変異により生存予後の異なる可能性も報告されている[2]。この遺伝子変異の heterogeneity が、胆道癌の発癌・悪性化・治療抵抗性における多様なメカニズムに関与していると考えられる。

近年の外科治療の進歩による切除率の向上と薬物治療の進歩により[3-6]、複数の治療法の組み合わせにより予後を向上させる multidisciplinary approach が注目されている。しかし、各治療による治療効果は一定したものではなく、各々の治療や使用される薬剤の治療効果を正確に予測する有効な biomarker はいまだ存在していない。

また、胆道癌における多様な遺伝子変異の存在は治療の標的となる actionable な遺伝子変異が多岐にわたることを示している。

遺伝子変異に基づいた個別化治療や精密医療が期待されているが、希少癌である胆道癌に関しては、癌治療に結びつく actionable な遺伝子変異の探索も不十分である。

胆道癌切除検体による全ゲノム解析を行うことにより、胆道癌の癌化・悪性化・治療抵抗性に関わる新規の actionable な遺伝子変異を同定し、新たな biomarker および治療の標的の開発が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胆道癌切除検体による全ゲノム解析を行うことにより、胆道癌の癌化・悪性化・治療抵抗性に関わる新規の actionable な遺伝子変異を同定し、新たな biomarker および治療の標的を明らかにすることである。

3. 研究の方法

【対象患者】

名古屋大学医学部附属病院において、胆管癌患者 6 例の血液および切除された胆管癌組織を採取した。

【DNA 抽出と全ゲノム解析】

癌部の新鮮凍結標本と血液標本から次世代シーケンサー用の DNA および Total RNA を抽出・定量した。DNA・RNA 品質は Qubit フルオロメーター (Thermo Fisher Scientific) と Bioanalyzer (Agilent) で評価し、血液標本からの DNA をリファレンス (正常) とした。二重鎖 DNA ライブラリ作製後、NovaSeq6000 (Illumina) により全ゲノム解析を行なった。クオリティコントロール後、リードをヒトリファレンスゲノム hg38 へとマッピングを行ない、フィルタリングとして、GATK FilterMutectCalls を用いて、germline、slippage、normal artifact、position、FAIL より、変異の要約統計を算出した。

【体細胞変異解析】

全ゲノム解析で得られた血液および癌組織の BAM ファイルとリファレンスゲノム配列から、

GATK Mutect2 を用いて体細胞変異を検出した。検出された変異に対して、GATK Filter Mutect Calls を用いて変異のフィルタリングを行った。この結果を参考にし、これ以降の解析では、Filter Mutect Calls のフィルタ基準のうち、germline、slippage、normal artifact、position、FAIL に該当しない変異のみを用いた。

【体細胞構造変異解析】

血液および癌組織の BAM ファイルとリファレンスゲノム配列から、DELLY の call 機能を用いて腫瘍特異的な体細胞構造変異の検出を行った。テロメアやセントロメア、Y 染色体の PAR、ミトコンドリアなど解析に適さない領域は解析対象領域から除外した。検出された体細胞構造変異を総数および変異種別：DEL(deletion)、INV(inversion)、INS(insertion)、DUP(tandem duplication)、BND(breakend、染色体間転座)ごとに集計した。

【コピー数変異解析】

血液および癌組織の BAM ファイルとリファレンスゲノム配列から、Control-FREEC を用いて腫瘍組織特異的なコピー数変異の検出を行った。設定はすべて WGS 推奨値を用いた。検出コピー数変異の最小値は 10,000 bp、偽陽性が検出されやすいテロメア・セントロメア領域(50,000 bp)は検出を行わない設定を用いた。コピー数変異の数で集計すると過大評価してしまう可能性があるため、変異数のみでなくコピー数変異の領域長での集計を行った。

【変異アノテーション】

snpEff を用いて遺伝子変異のアノテーション行ない、変異の種類別：INDEL(short insertion or deletion)、MNV(multiple nucleotide variant)、SNV(single nucleotide variant)の集計を行った。その後、Snpsift を用いて、複数のデータベースより変異の ID や頻度情報のアノテーションを行った。データベースとして、dbSNP、Human Genetic Variation Database、ClinVar、ESP6500、gnomAD、PROVEAN precomputed scores、SIFT precomputed scores を用いた。さらに、GDC Portal に登録されている Bile duct cancer 患者の変異・遺伝子情報とのアノテーションを行った。

【臨床情報に基づく新たな biomarker および治療の標的の探索】

検出された体細胞変異のうち、mild filter を通過した変異を用いて oncoplot を作成した。VCF ファイルの変換には vcf2maf、oncoplot の作成には maftools を使用した。各臨床情報（リンパ節転移の有無(l)、血管転移の有無(v)、胆管内乳頭状腫瘍(IPNB)）で分けられる群について、群間における変異蓄積頻度に差がある遺伝子の探索を行い、oncoplot 作成およびフィッシャーの正確確率検定を行った。

4 . 研究成果

【体細胞変異】

体細胞変異個数は、43,812 から 64,634 で、各症例平均 53,705 個検出された。Filter rate は 33.06 から 39.59% の範囲で 35.79%であった（右表）。

	変異個数	Filter rate
症例A	58,578	38.67%
症例B	47,421	34.64%
症例C	43,812	33.59%
症例D	56,644	35.21%
症例E	51,138	33.06%
症例F	64,634	39.59%

【体細胞構造変異】

構造変異数は 18692 から 27577 で、平均 22832 個の構造変異が確認された。構造変異種ごとの平均個数は DEL 9413 個、INV 2322 個、INS 838 個、DUP3717 個、BND 6543 個であった。PASS 判定の構造変異は平均 9296 個であった（下表）。

	Total		DEL		INV		INS		DUP		BND	
	ALL	PASS	ALL	PASS	ALL	PASS	ALL	PASS	ALL	PASS	ALL	PASS
症例A	18,692	9,360	9,303	6,525	2,248	616	861	857	3,515	782	2,765	580
症例B	21,704	8,630	8,952	6,023	2,308	538	785	780	3,575	728	6,084	561
症例C	27,577	9,824	9,880	6,814	2,381	593	900	898	3,833	850	10,583	669
症例D	23,516	9,396	9,542	6,542	2,395	573	822	815	3,894	807	6,863	659
症例E	22,833	9,270	9,311	6,553	2,207	572	821	819	3,544	712	6,950	614
症例F	22,672	9,298	9,491	6,429	2,390	603	836	833	3,942	808	6,013	625

GDC Portal に登録されている Bile duct cancer 患者において検出されたタンパク質をコードしている遺伝子 320 個上の体細胞構造変異の抽出の結果、Total で 180 から 256 で平均 221 個、DEL は 88 から 108 で平均 101 個、INV は 49 から 88 で平均 67 個、INS は 5 から 15 で平均 11 個、DUP は 27 から 48 で平均 36 個、BND は 5 から 7 で平均 5 個であった。68.75%が我々の結果と一致した。

【コピー数変異】

Control-FREEC を用いてコピー数変化を解析した結果、コピー数変化数は 37 から 265 箇所、平均 109 個の領域でコピー数変化を確認した。

またコピー数変異の領域長での検討で、各症例でのコピー数の増加は、22,404,167bp から 790,561,141bp で、減少は 30,000bp から 670,287,019bp であった。

コピー数の大きな変化が確認された領域を可視化した結果、数十万 bp におよぶ増幅が複数の症例で確認された。特に症例 A の 7 番染色体全体、症例 B の 2 番染色体 1 億 bp 以上の領域などが該当した。

【変異アノテーション】

変異の種類別集計により、INDEL は 5399 から 7918 で平均 6232 個、MNV は 1582 から 2009 で平均 1778 個、SNV は 36474 から 54717 で平均 45694 個であった。多くの症例で SNV の割合が高く、83.25%から 85.52%で平均 85.02%であった（下表）。

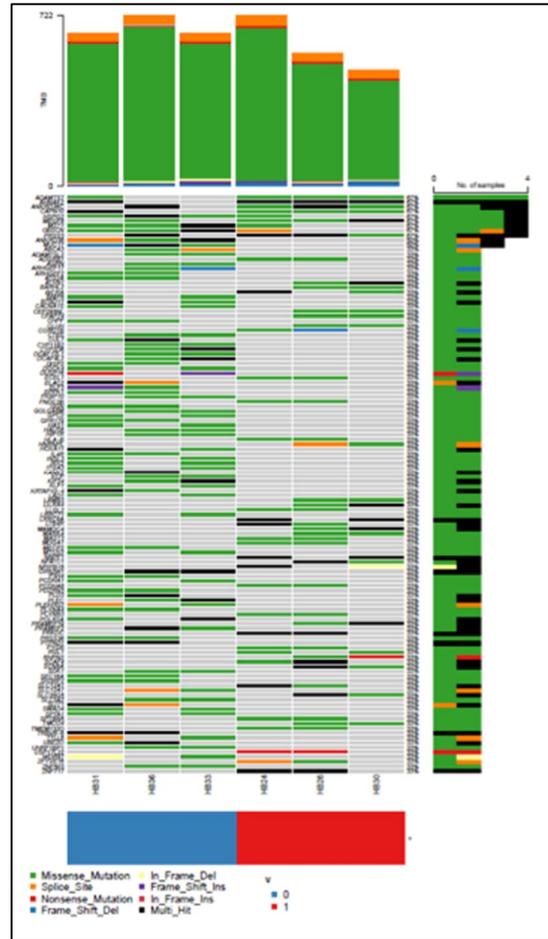
	症例A	症例B	症例C	症例D	症例E	症例F
INDEL	6,472	5,399	5,565	5,986	6,051	7,918
MNV	2,009	1,652	1,773	1,655	1,582	1,999
SNV	50,097	40,370	36,474	49,003	43,505	54,717

TCGA には胆道癌に関して 331 個の変異、321 個の遺伝子の情報が登録されていたが、これら 331 個の変異に我々の同定した変異（INDEL、MNV、SNV）に共通するものを認めなかった。

【臨床情報に基づく新たな biomarker および治療の標的の探索】

患者の臨床情報と関連する遺伝子および変異傾向を明らかにするため、臨床情報と合わせて可視化を行った。リンパ節転移の有無により、変異が蓄積している特異的遺伝子を認めなかった。血管転移の有無と蓄積した遺伝子変異傾向の関連の可視化により血管転移がないサンプルにおいて、遺伝子変異がより高度に蓄積している傾向を認めた（右図）。胆管内乳頭状腫瘍の有無（IPNB）と蓄積した遺伝子変異傾向の関連の可視化により、胆管内乳頭状腫瘍の有無により、変異が蓄積している特異的遺伝子を認めなかった。

サンプル総数が少なくフィッシャーの正確確率検定には本来適さないため、p値は考慮せず、群間の変異蓄積頻度の差0.60以上の遺伝子について検討し、ADAMTS7、AHNAK2、CAPN10を含む複数の遺伝子を抽出した。



<引用文献>

- Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH et al. Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017; 7: 1116-1135.
- Nakamura H, Arai Y, Totoki Y et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 2015; 47: 1003-1010.
- Mizuno T, Ebata T, Nagino M. Advanced hilar cholangiocarcinoma: An aggressive surgical approach for the treatment of advanced hilar cholangiocarcinoma: Perioperative management, extended procedures, and multidisciplinary approaches. *Surg Oncol* 2020; 33: 201-206.
- Mizuno T, Ebata T, Yokoyama Y et al. Adjuvant gemcitabine monotherapy for resectable perihilar cholangiocarcinoma with lymph node involvement: a propensity score matching analysis. *Surg Today* 2017; 47: 182-192.
- Seita K, Ebata T, Mizuno T et al. Phase 2 Trial of Adjuvant Chemotherapy With S - 1 for Node-Positive Biliary Tract Cancer (N-SOG 09). *Ann Surg Oncol* 2020; 27: 2348-2356.
- Valle J, Wasan H, Palmer DH et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1273-1281.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	江畑 智希 (EBATA Tomoki) (60362258)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	横山 幸浩 (YOKOYAMA Yukihiro) (80378091)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	
研究分担者	國料 俊男 (KOKURYO Toshio) (60378023)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	
研究分担者	山口 淳平 (YAMAGUCHI Junpei) (00566987)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	

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