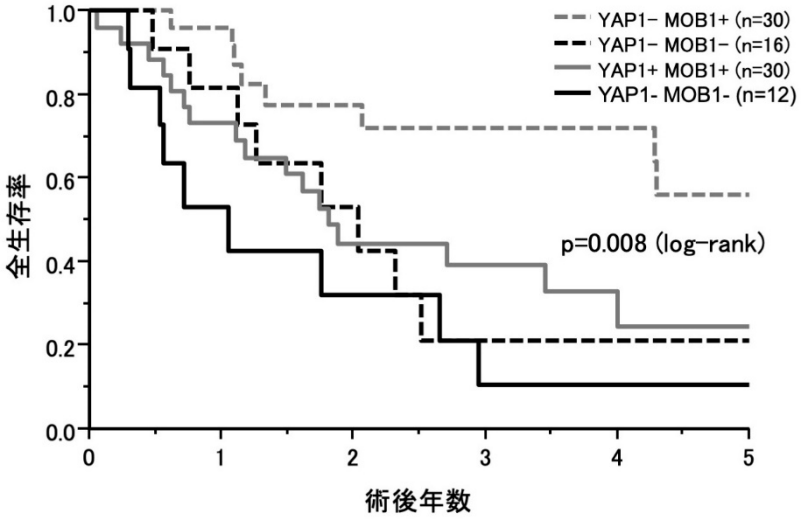
81　胆管癌のゲノム・エピゲノム解析と新規分子治療の探索	杉町　圭史

【目的】肝内胆管癌は早期に転移を来すことから診断・治療が困難な難治性悪性腫瘍である。Hippo シグナル伝達系は細胞増殖、アポトーシスのみならず細胞分化にも重要な役割を果たすことから、癌の発生・進展における役割が注目を浴びている。Hippo シグナルのノックアウトマウスでは腫瘤形成型肝内胆管癌が多く発生するという知見を得られているため、肝内胆管癌における Hippo 経路異常の解析は、新たなバイオマーカーや新規分指標的治療の確立につながると考え本研究を計画した。本研究の目的は肝内胆管癌における Hippo シグナル伝達分子の発現異常を検討し、その機能を解析することにより、Hippo 経路分子の胆管発癌への関わりや、疾患予後との関連を解明し、新たな肝内胆管癌治療の発展へつなげることである。

【方法】88 例の肝内胆管癌切除症例の切除病理標本、臨床病理学的所見、治療内容、治療反応性・予後の情報を集積した。Hippo シグナル分子の重要経路である YAP1、MOB1、TGFβ2、SMAD2 にて免疫組織学的染色を行った。さらに肝内胆管癌切除 10 症例の切除標本より、各症例癌部 3〜9 ヶ所、非癌部 1 ヶ所、合計 74 検体より腫瘍組織を三次元的に採取した。全エクソンのシークエンシングを行い、塩基変化（遺伝子変異、コピー数変化）を同定した。

【結果】YAP1 の核内異常発現は 28 例（31.8%）に認められ、MOB1 の発現低下が 42 例（47.7%）にみられた。YAP1 強発現群は低発現群と比較して有意に術後生存率が低く、MOB1 低発現群は高発現群と比較して有意に術後生存率が低かった。YAP1 発現高・低と MOB1 発現高・低によって 4 群に分けてサブグループ解析を行ったところ、YAP1 低発現かつ MOB1 高発現群は他の 3 群と比較して有意に術後生存率が高いことが示され、YAP1 強発現や MOB1 低発現があれば予後は不良であり、Hippo シグナル構成分子の異常が一つでもあれば重要な予後因子となることが示された。また YAP1 の核内高発現は有意に TGFβ経路の核内転写因子である SMAD2 と核内発現が相関しており、両者の相互的な働きが示唆された。肝内胆管癌の multiregional sampling によるエクソームシークエンスによって症例内や症例間での遺伝的不均一性・多様性が見られることがわかった。

肝内胆管癌における YAP1 と MOB1 の発現と予後の関連



81. 胆管癌のゲノム・エピゲノム解析と新規分子治療の探索

杉町　圭史

国立病院機構 九州がんセンター 肝胆膵外科

Key words：肝内胆管癌，Hippo シグナル，免疫組織化学染色，TGF-beta

緒　言

胆管癌（肝内・肝門部・遠位胆管癌）はその発症率や死亡率が近年世界的に増加している。中でも肝内胆管癌は黄疸などの症状を来しにくく、早期に転移を来すことから診断・治療が極めて困難な悪性腫瘍である。唯一根治が期待できる肝切除ができた場合で 5 年生存率が約 40%、切除できなかった場合は 10%以下と極めて予後が悪い。また、抗腫瘍薬や放射線療法の感受性も低く、難治性高悪性度の癌である。近年、消化器癌の領域においては新規開発された様々な分子標的治療薬が臨床応用され高い抗腫瘍効果を示しているが、胆管癌に効果が証明された薬剤は未だ存在せず新規治療法の開発が切望されている。

次世代シークエンサーによるゲノム解析の進歩に伴い、胆管癌を含む胆道癌においても大規模な遺伝子変異の解析が報告されるようになり、変異頻度が高い遺伝子として BAP1ARID1A、PBRM1、IDH1、2 等が明らかになってきた［1］。しかし、いまだ胆管癌においてコンセンサスが得られたバイオマーカーや有用な標的治療の対象となりうる分子は未だ明らかになっていない。今回、肝内胆管癌における細胞接着感受性喪失機構の因子の一つである Hippo シグナルに着目した。Hippo 経路は器官サイズなどを規定する重要なシグナル伝達系である［2］。Hippo シグナル経路の中核は、MST、LATS、MOB1 のキナーゼカスケードによって構成されており、これら活性化したキナーゼは下流の YAP1／TAZ をリン酸化し、YAP1 の核移行を阻害し、細胞増殖に対し負に働く。逆に、Hippo 経路が抑制されることによって細胞が増殖することとなり癌化に関わると考えられる。肝細胞で YAP1 を過剰発現させると肝細胞や未熟胆管細胞の過形成のために肝腫大、幹細胞・未分化胆管細胞系への分化、肝・胆管発がんを来す。このように Hippo 経路は肝・胆管癌発生に重要な役割を果たすことが示唆されている。Hippo シグナル伝達系は細胞増殖、アポトーシスのみならず細胞分化にも重要な役割を果たすことから、癌の発生・進展における役割が注目を浴びている。

Hippo シグナルのうち Mob1 は、大腸癌、メラノーマ、乳癌など様々な悪性腫瘍で欠損していることが知られており、がん抑制遺伝子として機能すると考えられている。我々は、Mob1 の Conditional KO マウスを作製したところ Yap 過剰発現の肝細胞癌ではなく腫瘤形成型肝内胆管癌が多く発生するという知見を得た［3］。したがって、肝内胆管癌における Hippo 経路異常の解析は、新たなバイオマーカーや新規分指標的治療の確立につながると考え本研究を計画した。本研究の目的は肝内胆管癌における Hippo シグナル伝達分子の発現異常を検討し、その機能を解析することにより、Hippo 経路分子の胆管発癌への関わりや、疾患予後との関連を解明し、新たな肝内胆管癌治療の発展へつなげることである。

方　法

1. 胆管癌のサンプリング

肝内胆管癌は原発性肝癌の 10%以下であり、さらに切除可能な症例が少ないため大規模の症例集積が困難な癌腫である。我々は 88 例の肝内胆管癌切除症例の切除病理標本、臨床病理学的所見、治療内容、治療反応性・予後の情報を集積した。

2. 免疫組織学的染色

88 例の肝内胆管癌切除症例の切除病理標本、臨床病理学的所見、治療内容、治療反応性・予後の情報を集積した。例の腫瘤形成型肝内胆管癌切除標本を用いて Hippo シグナル分子の重要経路である抗 Yap 抗体（Sigma-Aldrich）、抗 Mob1 抗体（Cell Signaling Technology）、抗 TGF β 2 抗体（Invitrogen）、抗 SMAD2 抗体（Santa Cruz）にて免疫組織学的染色を行った。また肝内胆管癌との比較対象として肝細胞癌、混合型肝癌、非癌肝細胞、非癌胆管細胞においても評価を行った。各タンパクの発現強度、核内発現の有無を詳細に検討してスコアリングし、臨床病理学的因子などとの相関を解析した。

3. ゲノム解析

肝内胆管癌切除 10 症例の切除新鮮標本より、各症例癌部複数箇所 3～9 ヶ所、非癌部 1 ヶ所、合計 74 検体より組織を三次元的に採取した。Laser microdissection の手法を用いて確実に腫瘍成分のみを採取し、DNA を抽出した。次世代シークエンサーを使用して、全エクソンのシークエンシングを行い、塩基変化（遺伝子変異、コピー数変化）を同定した。遺伝子変異、コピー数多型データを網羅的かつ統合的に解析した。

結　果

1. 肝内胆管癌における YAP1 の発現異常

肝内胆管癌 88 例で YAP1 核内強発現を評価した。YAP1 の核内異常発現は 28 例（31.8%）に認められた（図 1）。YAP1 強発現群は低発現群と比較して有意に術後生存率が低いことが分かった（p = 0.017）（図 2）。

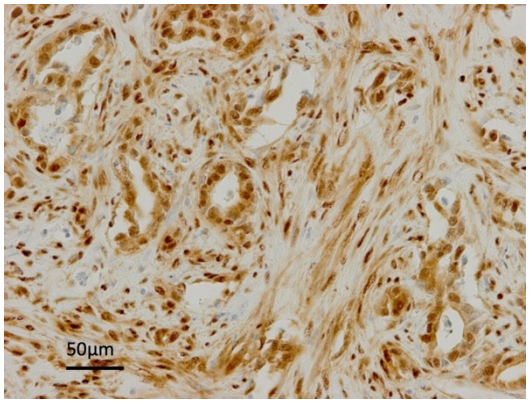


図 1. 肝内胆管癌における YAP1 核内異常発現

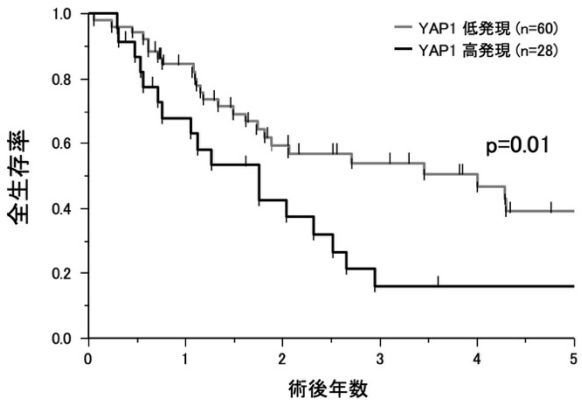


図 2. YAP1 発現と予後の相関

抗 YAP1 抗体による免疫組織学的染色にて癌細胞で核内異常発現が見られる。(log-rank 検定)

2. 肝内胆管癌における MOB1 の発現異常

肝内胆管癌 88 症例において MOB1 の発現低下が 42 例（47.7%）にみられた。MOB1 低発現群は高発現群と比較して有意に術後生存率が低かった（図 3）。

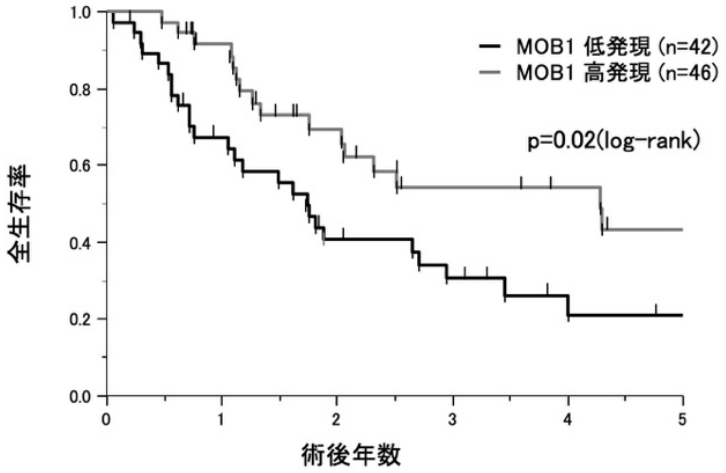


図 3. 肝内胆管癌における MOB1 発現と予後の相関

MOB1 発現と YAP1 発現の有意に相関はなかった。次に YAP1 発現高・低と MOB1 発現高・低によって 4 群に分けてサブグループ解析を行った。YAP1 低発現かつ MOB1 高発現群は他の 3 群と比較して有意に術後生存率が高いことが示された（図 4）。これらの結果により YAP1 強発現や MOB1 低発現があれば予後は不良であり、Hippo シグナル構成分子の異常が一つでもあれば重要な予後因子となることが示された。

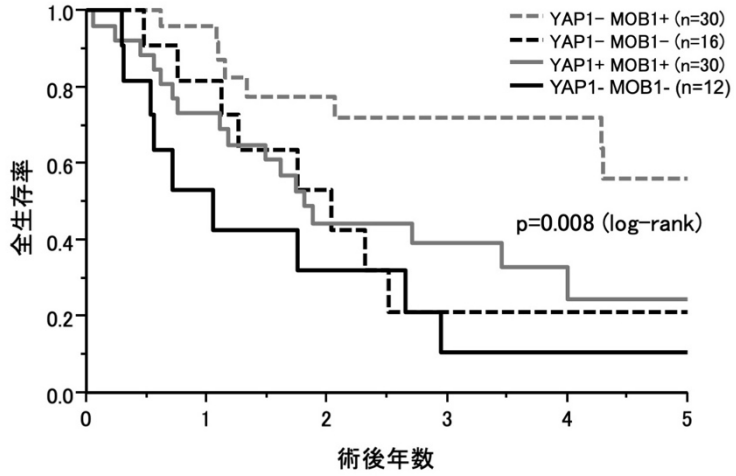


図 4. YAP1 / MOB1 発現によるサブグループと予後の相関

YAP1 陰性かつ MOB1 陽性のグループは有意に予後が良好だった。

3. Hippo シグナル経路と TGFβ シグナル経路の関係

TGFβ と TGFβ レセプターが結合すると SMAD 経路が活性化され核内シグナル伝達が起こることがわかっている。YAP1 の核内移行により核内で SMAD 経路が活性化されることが示されているため、今回 TGFβ2 と SMAD2 タンパク発現を肝内胆管癌において検討した。TGFβ2 タンパク高発現は 34 症例（38.6%）、SMAD2 タンパク高発現は 47 症例（57.4%）にみられた。TGFβ2 と SMAD2 の発現は有意な正相関がみられた。SMAD2 高発現群では有意にリンパ節転移が多かった（$p = 0.014$）。TGFβ2 と SMAD2 の発現と予後の相関はなかった。YAP の核内高発現は有意に TGFβ 経路の核内転写因子である SMAD2 と核内発現が相関しており、両者の相互的な働きが示唆された（図 5）。

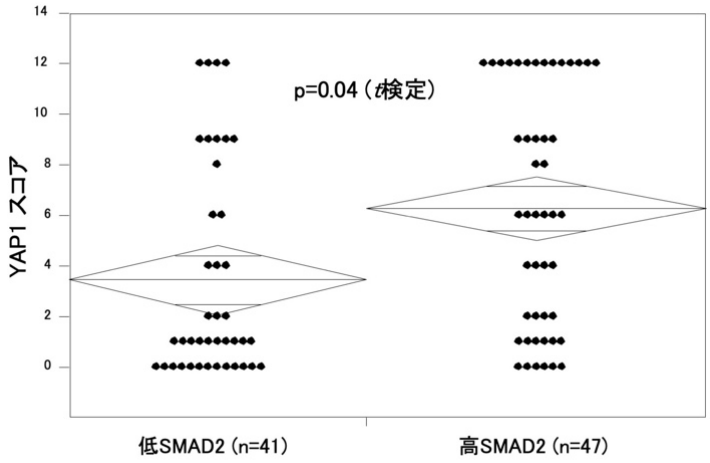


図 5. 肝内胆管癌における YAP1 と SMAD2 の発現相関
YAP1 発現スコアは SMAD2 高発現群で有意に高値だった。

5. 肝内胆管癌の multiregional sampling によるエクソームシークエンスの結果

肝内胆管癌 10 症例それぞれの複数箇所より DNA を抽出し全エクソンのシークエンスを行い遺伝子変異の解析を行った。各症例内でのサンプル間での全て共通した変異（Founder 変異）が 53%（range 24～74%）、複数箇所で共通した変異（Shared 変異）が 18%（range 5～40%）、1 箇所のみでみられる変異（Unique 変異）が 29%（range 6～54%）見られた（図 6）。これらの結果から症例内や症例間での遺伝的不均一性・多様性が見られることがわかった。

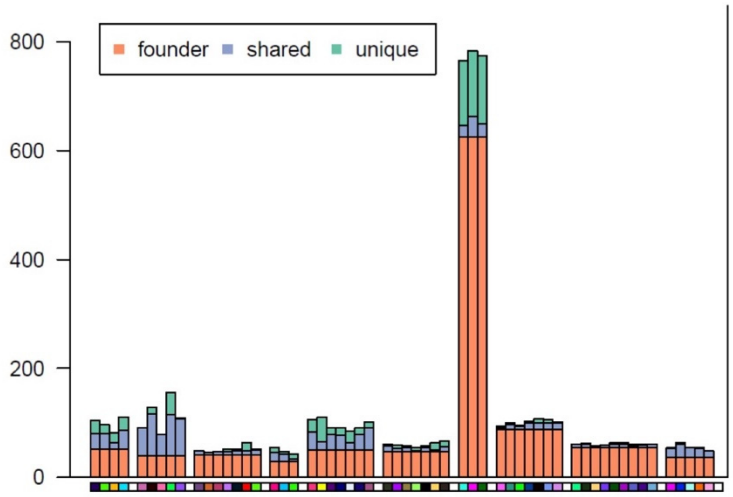


図 6. 肝内胆管癌における遺伝子変異解析
肝内胆管癌 10 症例における遺伝子変異の分布。
腫瘍内および腫瘍間の heterogeneity が見られる。

さらにゲノムのコピー数変化を解析したところ遺伝子変異と同様に症例内・症例間の遺伝的不均一性・多様性があることが明らかになった（図 7）。



図 7. 肝内胆管癌のコピー数変化の解析
コピー数変異にも腫瘍間、腫瘍内の多様性見られる。

考　察

ヒトやマウスの研究成果により Hippo 経路は肝癌の発生、中でも癌の幹細胞性、胆管系譜分化に重要な役割を果たすことが示唆されてきた。これまでにノックアウトマウスや臨床検体の解析によって肝癌や肝内胆管癌の発生と進展に Hippo シグナル経路が重要な役割を果たしていることが明らかされており、Hippo シグナルは有望な治療標的と考えられている。Hippo シグナル構成因子の中でも YAP1 と TAZ は転写共役因子として転写因子の活性を調節する重要な分子であり、治療標的として精力的に研究されている。これまでに、YAP1/TAZ を抑制する方法として、1. YAP1／TAZ のリン酸化によってその核内移行を抑制する方法、2. YAP1／TAZ と TEAD の結合を抑制し転写活性を抑制する方法、3. Src ファミリーキナーゼの阻害による YAP1 の核内移行を阻害する方法、などが報告されている。今回の我々の研究結果により肝内胆管癌における Hippo シグナルの重要性が明らかになった［4］。腫瘤形成型肝内胆管癌に対する治療標的は現状ではまったく確立されていないため、今回の研究を継続することで今後の Hippo シグナルを標的とした新たな分子標的治療の開発をする上での非常に重要な基礎的研究となると期待される。また本実験で行ったゲノム解析については、今後はエピゲノム変化やタンパク発現変化も含めた統合解析を行っていくことが次の研究課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学病院別府病院外科の三森功士教授、北川彰洋先生、神戸大学大学院医学研究院分子細胞生物学分野の鈴木聡教授である。

文　献

1) Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. Nat Genet. 2013 Dec;45(12):1470-1473. doi: 10.1038/ng.2813. PMID: 24185509

2) Zhao B, Guan KL. Hippo pathway key to ploidy checkpoint. Cell. 2014 Aug 14;158(4):695-696. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.041. PMID: 25126776

3) Nishio M, Sugimachi K, Goto H, et al. Dysregulated YAP1/TAZ and TGF-ß signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jan 5;113(1):E71-80. doi: 10.1073/pnas.1517188113. PMID: 26699479

4) Sugimachi K, Nishio M, Aishima S, et al. Altered Expression of Hippo Signaling Pathway Molecules in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. Oncology. 2017;93(1):67-74. doi: 10.1159/000463390. PMID: 28448997