



Histological diagnosis of polyploidy discriminates an aggressive subset of hepatocellular carcinomas with poor prognosis

松浦, 敬憲

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8872号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490097>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Histological diagnosis of polyploidy discriminates an aggressive
subset of hepatocellular carcinomas with poor prognosis

多倍体細胞の組織学的診断による予後不良かつ高悪性度の
肝細胞癌サブセットの識別

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻消化器内科学 児玉 裕三教授)

松浦 敬憲

「背景」

全ゲノム重複（多倍体化）は、癌において染色体不安定性を惹起し、異数体の形成といった遺伝的多様性が導かれることにより癌の増殖を促進すると考えられている。近年進歩した次世代シーケンサーを用いた癌種横断的大規模ゲノム解析において、肝細胞癌（HCC）において約 34%が多倍体化をきたしていることがわかってきたが、その詳細な意義はいまだ明らかにされていない。我々は、染色体の倍化を組織切片上で評価することによって、多倍体肝細胞癌の臨床病理学的特徴を明らかにし、多倍体肝細胞癌を識別するサロゲートマーカーを同定することを目的として本研究を行った。

「方法」

当院で 2017 年から 2021 年までに肝切除術を行った HCC56 例を対象に、パラフィン包埋ホルマリン固定病理標本（FFPE）を使った多色 fluorescence in situ hybridization（FISH）法による染色体解析を行い肝癌の倍数性を評価した。同定した多倍体肝癌と 2 倍体肝癌の臨床情報、組織学的所見を比較し、多倍体肝癌の臨床病理学的特徴を検討した。さらにヒト肝癌細胞株 Huh7 を用いた RNA シーケンス解析により多倍体肝癌のマーカー候補分子を同定し、同分子の多倍体肝癌でのタンパク発現を免疫染色により検証した。

「結果」

まず、7 番、11 番、16 番染色体のセントロソーム領域を標識するプローベを用いて、染色体 FISH（multicolored fluorescence in situ hybridization）を行った（Fig.1a）。蛍光顕微鏡観察下に 1 細胞ごとに dot で示される各染色体の本数を算出し、4 本以上の染色体を持った細胞が多数を占める検体を多倍体肝細胞癌（Polyploid cancer）とし、それ以外の検体を（Near-diploid cancer）とした（Fig.1b）。その結果、多倍体肝細胞癌は 56 例中 20 例であった（Table.1）。

次に、多倍体肝細胞癌の臨床的特徴を探索することとした。検体の臨床情報、背景肝疾患の原因、生化学検査所見を収集したところ、主腫瘍径に差はみられないものの多倍体肝細胞癌において血清 AFP 値が有意に高値であった（Table.1）。背景肝疾患や線維化の程度には明らかな傾向が見られなかった。また、生存解析をおこなったところ全生存期間（Overall survival）は多倍体肝細胞癌で有意に短く、無再発生存期間（Disease free survival）においても有意差はないものの同様の傾向が見られた。異常のことから、肝細胞癌においても多倍体化は予後不良因子であることが明らかとなった。

この結果の妥当性を検証すべく、イメージサイトメトリの手法を用いて、肝細胞の核のサイズと DAPI 染色の強度を確認した。HNF4 α 陽性、Ki-67 陰性の肝細胞を二重蛍光染色で抽出したところ、核のサイズ、DAPI の強度ともに有意に多倍体肝細胞癌で大きいことが分かった。多倍体癌はその DNA 量を反映して核が大きいことが言われており、これに矛盾しない結果であった（Fig.S1）。

さらに興味深いことに、多倍体肝細胞癌では周囲の細胞と比較して極端に大きな核を持っ

た細胞が見られた。これらは、既報 (Was H, et al. *Semin Cancer Biol.* 2022, Moein S, et al. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020) で報告されている PGCC (Polyploid Giant Cancer Cell) に合致すると考えられ、染色体 FISH においてもより多くの染色体を持っていた。通常の核のサイズに比して 3 倍以上のものを PGCC としてその数を算出した所、多倍体肝細胞癌では、二倍体肝細胞癌に比して有意に多くの PGCC を持っていることが分かった (Fig.2b)。さらに検討を進めたところ、多倍体肝細胞癌は免疫組織化学における特徴として、AFP が有意に高発現し (Fig.2d)、細胞質分裂のマーカーである pHH3 染色でも優位に高発現を示した (Fig.2e)。さらに、高悪性度の病理組織構造として認識される MTM-HCC (macro-trabecular massive HCC) が多倍体肝細胞癌では優位に高頻度であることも明らかとなった。一方で、T 細胞マーカーである CD3 には発現の差が見られなかった。これらのことから、多倍体肝細胞癌が、これまでの HCC の分子病理学的サブタイプとは異なる新たな高悪性度の phenotype であることが示唆された。

さらに多倍体肝細胞癌の特徴を探索するために、我々はヒト肝細胞癌細胞株である Huh7 を用いて、二倍体細胞と多倍体細胞での発現比較、解析をおこなうこととした。細胞周期を可視化する Fucci を導入した細胞において G1 期のみを抽出し (Fig.3a)、RNA シークエンス解析を行った (Fig.3b)。その結果、既報での癌腫横断的な多倍体癌のバルク RNA シークエンス解析における高発現遺伝子 (Quinton RJ, et al. *Nature.* 2021) や、増殖活性の高い肝細胞癌において高発現するもの (Chiang DY, et al. *Cancer Res.* 2008) と共通する DEGs (differentially expressed genes) が同定された (Fig.3e)。

我々はその中で特に発現の高かった 3 遺伝子について、前述の肝細胞癌切除検体を用いて免疫組織化学でタンパクレベルでの評価を行った。その結果、anaphase-promoting complex/cyclosome の構成要素で、ユビキチン E2 結合蛋白である UBE2C と、セントロソームの成熟や紡錘体の形成に関わる AURKA (Aurora kinase A) が、多倍体肝細胞癌で有意に高発現していることがわかった (Fig.4a-c)。これらの分子は、染色体分離や細胞質分裂における調節因子であり、肝細胞癌における多倍体化に関わる重要なマーカーである可能性が示唆された。

これまでに我々が同定した多倍体肝細胞癌の特徴である PGCC と、UBE2C 高発現の 2 要素を用いてスコアリングシステム (PUB score; PGCC/UBE2C) を作成した所、多倍体肝細胞癌を 75%の感度、92%の特異度を持って判別でき、スコア 2 においては有意に予後不良であることが分かった (Fig.4e)。

PGCC はその特徴的な核の形態を持ち合わせる一方で、未だその生物学的特性は明らかとなっておらず、既報において細胞老化や幹細胞としての特徴を示唆するものもあるが、意見の一致をみない。我々は PGCC に富む 5 症例を抽出し、AFP、UBE2C、AURKA、TOP2A、Ki-67、p21、IL6 など様々な免疫染色態度を評価したが、いずれの分子においても共通した染色態度を見出すことはできず (Fig.5)、さらに解析例を集積して検討を行っていく必要がある。

「考察」

本研究では、肝細胞癌における多倍体化の頻度を染色体 FISH を用いて評価した。ゲノム解析における多倍体化（Whole Genome Duplication）の頻度と染色体 FISH による多倍体化診断の頻度は同程度であり、1 細胞ごとの染色体評価は腫瘍の多様な表現型をよく捉えていると考えられる。また、イメージサイトメトリーで得られた多倍体癌の核染の強度の強さ・核のサイズの増大は、含有する DNA 量が多倍体では多いことを裏付けている。本手法は、臨床検体を用いて肝細胞癌の多倍体化を判定するうえで、有用であると考えられた。

また、多倍体肝細胞癌における臨床病理学的特徴を様々な観点から検討したところ、肝細胞癌における多倍体化という事象が、既存のサブグループとは異なる新たな高悪性度の予後不良集団を捉えている可能性を確認できた。そして、トランスクリプトーム解析を行うことで、多倍体肝細胞癌のサロゲートマーカーとなり得る分子を判別することができた。さらに、臨床検体を用いた免疫染色により、多倍体肝癌を効率的に診断できる可能性を見出すことができた。

「結語」

我々は本研究で多倍体肝細胞癌の臨床病理学的特徴を探索し、高悪性度のサブグループを形成することを報告した。様々な癌種においても多倍体化が癌進展の重要な事象であると考えられていることから、多倍体は高悪性度癌における有望な治療標的となりうる可能性を秘めている。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3367 号	氏 名	松浦 敬憲
論文題目 Title of Dissertation	多倍体細胞の組織学的診断による予後不良かつ高悪性度の肝細胞癌サブセットの識別 Histological diagnosis of polyploidy discriminates an aggressive subset of hepatocellular carcinomas with poor prognosis		
審査委員 Examiner	主 査 仁田 亮 Chief Examiner 副 査 青井 貴之 Vice-examiner 副 査 久保 亮治 Vice-examiner		

（要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度）

「背景」

全ゲノム重複（多倍体化）は、癌において染色体不安定性を惹起し、遺伝的多様性が導かれることにより癌の増殖を促進すると考えられている。近年進歩した癌種横断的大規模ゲノム解析において、肝細胞癌（HCC）では約 34%が多倍体化をきたしていることがわかってきたが、その詳細な意義は未だ明らかではない。我々は、染色体の倍化を組織切片上で評価し、多倍体肝細胞癌の臨床病理学的特徴やサロゲートマーカーを同定することを目的として本研究を行った。

「方法」

当院で肝切除術を行った HCC 患者 56 例を対象に、パラフィン包埋ホルマリン固定病理標本を用いた fluorescence in situ hybridization（FISH）法による染色体解析を行い、肝癌の倍数性を評価した。同定した多倍体肝癌と 2 倍体肝癌の臨床病理学的特徴を比較検討した。さらにヒト肝癌細胞株 Huh7 を用いた RNA シーケンス解析により多倍体肝癌のマーカー候補分子を同定し、同分子の多倍体肝癌でのタンパク発現を免疫染色により検証した。

「結果」

7 番、11 番、16 番染色体のセントロソーム領域を標識するプローベを用いて、染色体 FISH（multicolored fluorescence in situ hybridization）を行い、コピー数評価を行った結果、多倍体肝細胞癌は 56 例中 20 例であった。多倍体肝細胞癌の臨床的特徴を探索したところ、2 倍体癌に対して血清 AFP 値が有意に高値で、全生存期間が有意に短い一方で、多倍体肝癌と 2 倍体肝癌で腫瘍径や背景肝の線維化に有意差はなかったことから、多倍体癌は悪性度の高い予後不良集団であることが示唆された。さらに、多倍体肝細胞癌では周囲の細胞と比較して極端に大きな核を持った PGCC（Polyploid Giant Cancer Cell）が多数見られ、高悪性度の肝細胞癌病理組織構造として認識される macro-trabecular massive HCC が優位に高頻度であることも明らかとなった。

次に、ヒト肝細胞癌細胞株である Huh7 を用いて、二倍体細胞と多倍体細胞での発現比較、解析を行った。細胞周期を可視化する Fucci を導入した細胞において G1 期のみを抽出し RNA シーケンス解析を行い、多倍体癌で発現の高かった遺伝子について、免疫染色によるタンパクレベルでの評価を行ったところ、ユビキチン E2 結合蛋白である UBE2C と、セントロソームの成熟や紡錘体の形成に関わる AURKA（Aurora kinase A）が、多倍体肝細胞癌で有意に高発現していた。これらの分子は、染色体分離や細胞質分裂における調節因子であり、肝細胞癌における多倍体化に関わる重要なマーカーである可能性が示唆された。

「考察」

ゲノム解析における全ゲノム重複 (Whole Genome Duplication) の頻度と染色体 FISH による多倍体化診断の頻度は同程度であり、染色体 FISH による多倍体診断法は臨床検体を用いて倍体化を判定できる有用な手法であった。また、多倍体肝細胞癌は、新たな高悪性度のサブグループであり、トランスクリプトーム解析から見出した高発現遺伝子が、臨床検体を用いた免疫染色でも多倍体肝癌のマーカー分子となる可能性を見出した。

本研究では、多倍体肝細胞癌の臨床病理学的特徴を探索し、高悪性度のサブグループを形成することを報告した。様々な癌種においても多倍体化が癌進展の重要な事象であると考えられていることから、多倍体は高悪性度癌における有望な治療標的となり得る。本研究は多倍体化と癌進展における今後の研究・臨床応用への展開へ大きく貢献するものであり、価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。