

Genomic Analysis of Intratumoral Heterogeneity in Human Hepatocellular Carcinoma Using Restriction Landmark Genomic Scanning

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8539

肝細胞癌の結節内におけるゲノム DNA の多様性の検討

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

大阪大学細胞生体工学センター

染色体構造機能研究分野 (主任: 松原謙一教授)

佐 伯 理 恵 子

進行した肝細胞癌 (肝癌) の組織学的多様性 (tumor heterogeneity) における遺伝子の変化を明らかにするために、中分化型肝癌 3 例の同一肝癌内の結節内結節とその周囲の癌組織、さらに 2 例の均一な高分化型肝癌内の 2 部位より高分子 DNA を抽出し、B型肝炎ウイルスの組み込みを検出するサザンブリットハイブリダイゼーションと、DNA を 2 次的に泳動することによりゲノム構造を解析するリストラクショナルランドマークゲノムスキャン (restriction landmark genomic scanning, RLGS) 法を用いて検討した。サザンブロットハイブリダイゼーションで B型肝炎ウイルス DNA の組み込みを検討しえた 1 例では結節内結節とその周囲の癌組織の B型肝炎ウイルスの組み込みパターンは同一で両者は単クローン由来である事が示された。RLGS パターンの比較では、均一な高分化肝癌内の場合、離れた 2 部位の RLGS パターンに差異は認められず、肝癌細胞の保有するゲノムの不均一性は証明されなかった。一方、中分化型肝癌では、非癌部との比較では 2 箇所の癌部には明らかに共通したゲノムの変化が認められたことに加え、結節内結節と周囲の癌組織の間には症例により 4 から 14 個のスポットに強度の差が検出され、ゲノム DNA 構造の相違が認められた。したがって結節内結節とその周囲の癌組織は単クローン由来でありながら、一部の DNA 構造に違いを持つ細胞集団であることが示され、肝癌の組織学的多様性は遺伝子の変化による多段階的な腫瘍進展の結果と考えられた。

Key words 肝細胞癌, 結節内結節, 多段階発癌, RLGS 法

臨床問題となる癌が形成されるまでにはイニシエーション, プロモーション, プログレッションといった多数の段階を経ることが必要であるとされている¹⁰⁾。近年, 多段階発癌におけるがん遺伝子やがん抑制遺伝子などの役割が同定され分子生物学的異常の蓄積が癌の進展, 増悪に大きく関与していることが明らかとなってきた^{3)~5)}。肝細胞癌 (肝癌) においても染色体欠失^{6)~8)}や p53 遺伝子異常^{9)~12)}といった分子生物学的異常が指摘されているものの, 多段階発癌のステップと分子生物学的異常の関連については未だ不明な点が多く残されている¹³⁾。

進行した肝癌では 1 つのがん結節の中に形態学的に異なるコンパートメント, 結節内結節 (nodule-in-nodule) が認められる¹⁴⁾¹⁵⁾。一つの肝癌内部では結節内結節もその周囲の癌組織も元来同一細胞のクローナルな増生による細胞集団であることが立証されており¹⁶⁾¹⁷⁾, この組織学的多様性 (tumor heterogeneity) は, 癌結節の発育にともない一部の癌細胞が脱分化して新たな細胞集団 (結節内結節) を形成するといった多段階的な腫瘍進展を示した結果として理解されている¹⁸⁾¹⁹⁾。多段階進展は本来同一であった遺伝子が段階的に変化を蓄積した結果であると考えられているため, 組織学的多様性が多段階進展によるも

のならば一つの肝癌内に存在する形態学的に異なった 2 部位間には遺伝子構造の変化が認められるはずである。しかし, これまでに肝癌同一結節内における組織学的多様性と遺伝子構造の変化を検討した報告は少ない。

近年開発されたゲノムスキャン法であるレストリクショナルランドマークゲノムスキャン (restriction landmark genomic scanning, RLGS) 法²⁰⁾²¹⁾は制限酵素で切断されたゲノム DNA を直接末端標識し, それを高分解能 2 次元電気泳動法で分離解析するという方法で, 一度に全ゲノム中の 2000~3000 箇所 (全ゲノムの数%) という広い範囲にわたり極めて鋭敏にゲノム DNA 構造の差異を検出できることが特徴である。RLGS 法がヒト癌のゲノム DNA 構造の解析に応用可能であることは既に立証されており²¹⁾, Nagai ら²²⁾²³⁾による RLGS を用いた肝癌とその非癌部とを比較した検討では両者にゲノム構造の差異が認められることが報告されている。

今回, 肝癌の組織学的多様性に伴うゲノム DNA 構造の変化を検討する目的で, 結節内結節とその周囲の癌組織におけるゲノム構造を RLGS 法を用いて解析した。また, 今まで既成の方法では遺伝子構造に差を検出されていない微小高分化型肝癌と

平成 5 年 12 月 16 日受付, 平成 6 年 2 月 3 日受理

Abbreviations: [α -³²P] dCTP, [³²P] deoxycytidine 5'-triphosphate; [α -³²P] dGTP, [³²P] deoxyguanosine 5'-triphosphate; bp, base pair; dCTP [α S], 2'-deoxycytidine 5'-[α -thio] triphosphate; ddATP [α S], 2',3'-dideoxyadenosine 5'-[α -thio] triphosphate; ddTTP [α S], 2',3'-dideoxythymidine 5'-[α -thio] triphosphate; dGTP [α S], 2'-deoxyguanosine 5'-[α -thio] triphosphate; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic

その背景肝についても RLGS 法を用いて解析した。

対象および方法

1. 対 象

対象は5例の患者より得られた、外科的に切除された未治療の肝癌とその背景肝である(表1)。検討材料として症例1から3においては肝癌の結節内結節とその周囲部分、さらに非癌部より2~3mm四方の小切片を速やかに切り出した。このうちの一部をホルマリン固定し、残りを凍結保存した。症例4, 5において肝癌は均一で結節内結節は認められなかったため、肝癌の中で肉眼的に明らかに隔たった2部位と非癌部より組織を摘出し症例1から3の組織と同様に処理した。

II. 方 法

1. 病理学的検討

ホルマリン固定したサンプルより病理標本を作製し、各組織の病理像の検討を行なった。

2. 高分子 DNA 抽出²⁰⁾

各サンプルを凍結した状態のままパウダー状に粉碎し150mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 1% ラウリル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 10mM Tris-HCl 溶液に懸濁後1mg/ml プロテインナーゼK (Merck, Darmstadt, Germany) で50℃, 4時間消化した。フェノールクロロホルム処理を2~3回行ない、エタノール沈殿にてDNAを抽出した。抽出されたDNAはTris-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) に溶解し、電気泳動にて数10k塩基対 (base pair, bp) 以上の分子量であることを確認後、4℃にて保存した。

3. サザンブロットハイブリダイゼーション法¹⁷⁾²⁵⁾

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) の組織DNAへの組み込みをサザンブロットハイブリダイゼーションにて検索

した。抽出したDNA 10μlを制限酵素EcoR I, Hind III またはPvu II (宝酒造, 大阪) にて完全消化後、アガロース電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンにアルカリブロットニングした。プローブはマルチプライムシステム (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) を用い、3.2kbp HBV ゲノム²⁶⁾ を [α -³²P] デオキシシチジン三リン酸 ([α -³²P] deoxycytidine 5'-triphosphate, [α -³²P] dCTP, 3000 Ci/mmol, Amersham) で標識して作製した。ハイブリダイゼーションは1M NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1×デンハルト溶液, 100μg/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液で65℃にて行なった。ハイブリダイゼーション後ニトロセルロースメンブレンをまず2×標準食塩クエン酸緩衝液 (standard saline citrate buffer, SSC), 0.1% SDS 溶液で1回、その次に0.1×SSC, 0.1% SDS 溶液で2回洗浄後、-70℃でオートラジオグラフィを行なった。

4. RLGS 法²⁰⁾²¹⁾

1) ブロッキング反応

DNA 10μg に対し、10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT), 0.33μM α -チオデオキシシチジン三リン酸 (2'-deoxycytidine 5'-[α -thio] triphosphate, dCTP [α S]), 0.33μM α -チオデオキシグアノシン三リン酸 (2'-deoxyguanosine 5'-[α -thio] triphosphate, dGTP [α S]), 33μM α -チオダイデオキシアデノシン三リン酸 (2',3'-nodideoxyadenosine 5'-[α -thio] triphosphate, ddATP [α S]), 33μM α -チオダイデオキシチミジン三リン酸 (2',3'-dideoxythymidine 5'-[α -thio] triphosphate, ddTTP [α S]) (東洋紡績, 大阪) の存在下、50μl の反応液中でDNAポリメラーゼI (宝酒造) 10単位を37℃, 30分間反応させ、DNA抽出操作に伴うニックやギャップを修復した。次いで酵素を失活させるために65℃, 30分間反応させた。

2) ランドマーク切断

上記処理したDNAを100μlの反応液中にて100単位の制限酵素Not I (宝酒造) で37℃, 1時間反応し、完全分解した。

3) ランドマーク標識

次いでDNA溶液を33μM ddATP [α S], 33μM ddTTP [α S] (東洋紡績), 0.33μM [α -³²P] dCTP, 0.33μM [α -³²P] デオキシグアノシン三リン酸 ([α -³²P] deoxyguanosine 5'-triphosphate, [α -³²P] dGTP, 6000Ci/mmol, NEN, Boston, U.S.A.) 存在下でシークエナーゼ (Sequenase) Ver.2.0 (USB, Cleveland, U.S.A.) 20単位を37℃, 30分間反応させた。その後65℃, 1時間処理して酵素を失活させ、さらに制限酵素EcoR V (宝酒造) にてDNAを切断し平均鎖長を数10kbp以下に調整した。フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿後一次元分画に用いた。

4) 一次元分画

上記より1μgのDNAをとり、50×20×0.1cmの0.8%アガロース (Seakem GTG アガロース: FMC, Rockland, U.S.A.) にて10V/cm, 17時間電気泳動を行なった。泳動緩衝液は100mM Tris-HCl, 100mM ホウ酸溶液を用いた。

5) ゲル内におけるDNA制限酵素消化

アガロース電気泳動後、DNAを含む部分を8mm幅の短冊状に切り出し緩衝液 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂) に20分間浸し、ついで1200単位の制限酵素Hinf I (宝酒

Table 1. Clinical parameters of patients

Parameter	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
Age (year)	59	70	57	68	59
Sex	M	M	M	M	M
HBs-Ag	+	—	—	—	—
HBs-Ab	—	+	—	—	—
HBc-Ab	+	+	—	—	—
HCV-Ab	—	+	+	+	+
Alcohol	—	—	—	+	+
Blood. T	—	—	—	—	—
Size (cm)	4.5	4.5	2.5	0.7	1.0
Nodule	+	+	+	—	—

HBs-Ag, HBs-Ab, HBc-Ab and HCV-Ab were measured by enzyme immuno-assays.

M, male; HBs-Ag, hepatitis B virus surface-antigen; HBs-Ab, hepatitis B virus surface-antibody; HBc-Ab, hepatitis B virus core-antibody; HCV-Ab, anti-hepatitis C virus antibody; Alcohol, history of heavy drinking; Blood T., history of blood transfusion; Size, size of tumor; Nodule, nodule-in-nodule lesion.

acid; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; H & E, hematoxylin and eosin stain; RLGS, restriction landmark genomic scanning; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, standard saline citrate; TE, tris-ethylenediaminetetraacetic acid; TBE, tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid; 肝癌, 肝細胞癌

造)にて37℃, 2時間消化した。

6) 二次元分画

5) で処理したゲルを 50×50×0.1cm の 5% ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド: ポリアクリルアミド, 29: 1) の先端に置き, 両者をアガロースで密着させた後, 8V/cm, 7時間, 二次元目の電気泳動を行なった。泳動は 50mM Tris-HCl, 50mM ホウ酸, 1mM EDTA (Tris-borate-EDTA, TBE) 緩衝液を用いた。

7) オートラジオグラム

泳動後ゲルを 35×43cm の大きさに切り揃え, 乾燥させた。次いで XAR 5 フィルム (Kodak, N. Y., U.S.A.) に増感紙 (Quanta III: Du Pont, Boston, U.S.A.) を用いて -70℃ で約 7 日間オートラジオグラムを行なった。

8) パターンの比較

各症例において RLGS パターンにおけるスポットの強度の比較を行なった。スポットの放射活性はバイオイメージングアナライザー BAS 2000 (富士写真フィルム, 神奈川) により測定した。肉眼的に最も多く見られる強度のスポット 20 個の平均活性値を 2 とし, これに対する活性比で各スポットのカウントを計算した。各スポットの強度は DNA のコピー数に比例するた

め, 二つのアリルとも Not I に感受性の場合に得られるスポットの強度は最も多く見られる 2, 一つのアリルのみ感受性の場合には 1, スポットの見られない場合は 0 となる (図 1)。実験は 2 回以上反復し, 同時に複数人の研究者によってパターンの解析を行なった。

成 績

1. 病理像²⁷⁾

症例 1 は乙型肝炎変を背景とした 4.5cm 径の肝細胞癌で被膜を有し内部に 2.5cm 径の明瞭な結節内結節を認めた。結節内結節より摘出した部分を 1A, 結節内結節の周囲の癌組織を 1B, 癌結節から明瞭に区別された非癌部を 1C とした。1A は明調細胞型の中分化型肝細胞癌で, 1B は一部に偽腺管構造が認められる明調細胞型の中分化型肝細胞癌であった (図 2)。

症例 2 は甲'型肝炎変を背景とした 4.5cm 径の肝細胞癌であった。一つの結節内結節より摘出した部分を 2A, その周囲の癌組織を 2B, 非癌部を 2C とした。2A は大型偽腺管形成を特徴とする中分化型肝細胞癌で, 2B は中型偽腺管を形成する中分化型肝細胞癌であった (図 3)。

症例 3 は甲'型肝炎変を背景とした 2.5cm 径の肝細胞癌で,

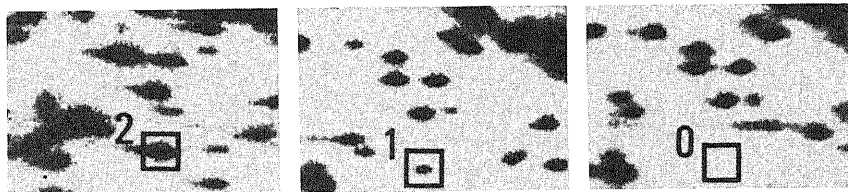


Fig. 1. Ratio of spot intensities in a restriction landmark genomic scanning profile. 2 indicates the average intensity (a spot originated from diploid genome). 1 indicates a spot originated from haploid genome. 0 indicates no spot.

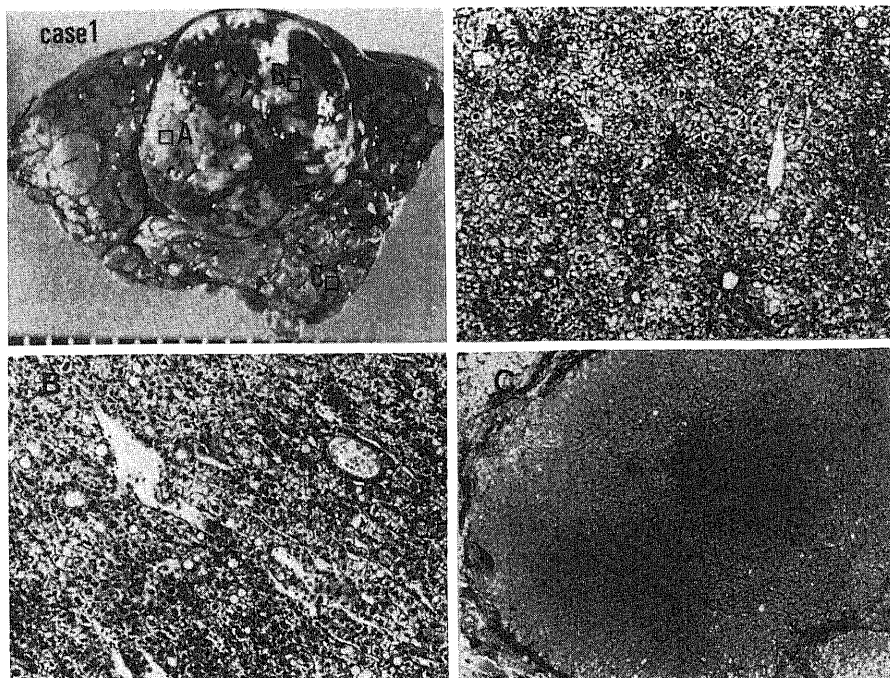


Fig. 2. Gross view (upper left) and microscopic findings (A, B and C) of hepatocellular carcinoma of case 1. Gross view shows a 40×45-mm HCC with 25×30-mm nodule-in-nodule lesion (arrowheads). Open squares (A, B and C) indicate the examined regions. Regions A and B show moderately-differentiated HCC with clear cells, and region C shows macro-nodular cirrhosis. (hematoxyline and eosine stain, A & B, ×100; C, ×50)

肉眼的に大きく3つの結節内結節に分かれていた。2つの結節よりそれぞれ摘出した部分を3Aと3B、非癌部より摘出した部分3Cとした。3A、3B共に中索状型配列を呈する中分化型肝細胞癌で、両者には明らかな組織学的差異は認められなかった

(図4)。

症例4は脂肪化の著明な前肝硬変を背景とした0.7cm径の高分化型肝細胞癌である。明らかな被膜形成は無く、内部は均一で肉眼的に結節内結節を認めなかった。肝癌の中で肉眼的に

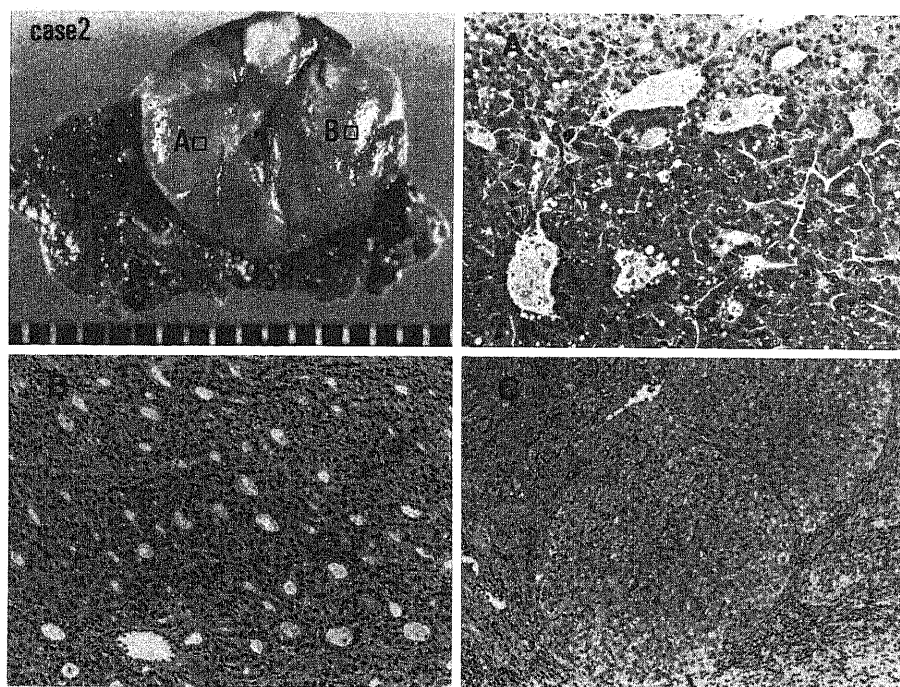


Fig. 3. Gross view (upper left) and microscopic findings (A, B and C) of hepatocellular carcinoma of case 2. Gross view shows a 45×40-mm HCC. Open squares (A, B and C) indicate the examined regions. Regions A and B show moderately-differentiated HCC with pseudo-glandular pattern, and region C shows mixed type cirrhosis. (hematoxiline and eosine stain, A & B, ×100; C, ×50)

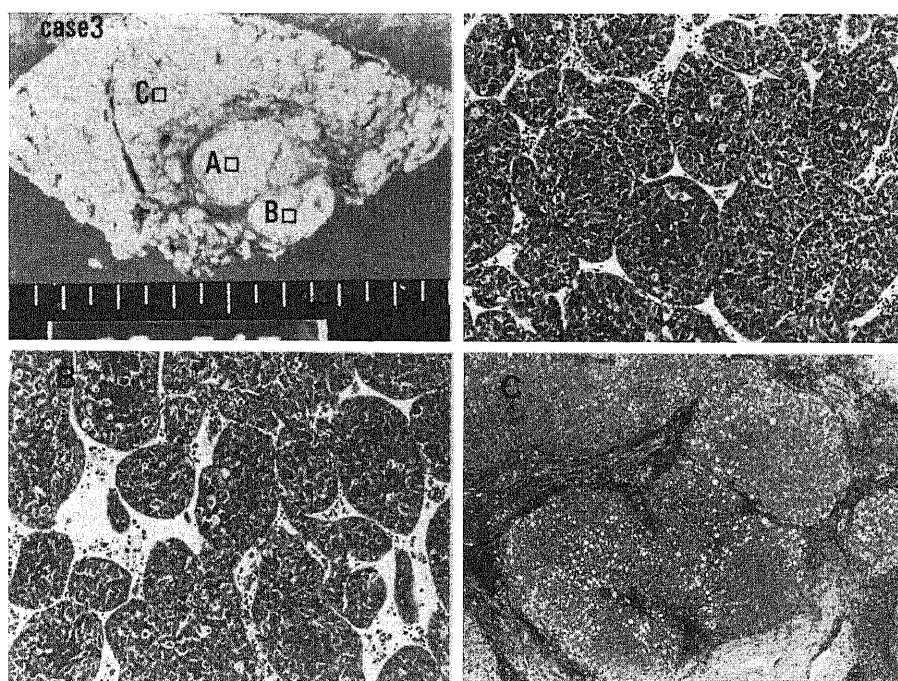


Fig. 4. Gross view (upper left) and microscopic findings (A, B and C) of hepatocellular carcinoma of case 3. Gross view shows a 25×25-mm HCC with three lobular regions. Open squares (A, B and C) indicate the examined regions. regions A and B show moderately-differentiated HCC with moderate trabecular pattern, which have no significant difference in histological findings. Region C shows mixed type cirrhosis. (hematoxiline and eosine stain, A & B, ×100; C, ×50)

隔たった2部位を摘出し4A, 4Bとした。4A, 4Bとも脂肪化の著明な高分化型肝細胞癌で、両者には明らかな組織学的差異は認められなかった(図5)。

症例5は甲'型肝硬変を背景とした1.0cm径の高分化型肝細胞癌であった。被膜形成、結節内結節は認めなかった。癌結節の中で肉眼的に隔たった2部位を摘出し5A, 5Bとした。5A, 5Bとも脂肪化の著明な高分化型肝細胞癌で、両者には明らかな組織学的差異は認められなかった(図6)。

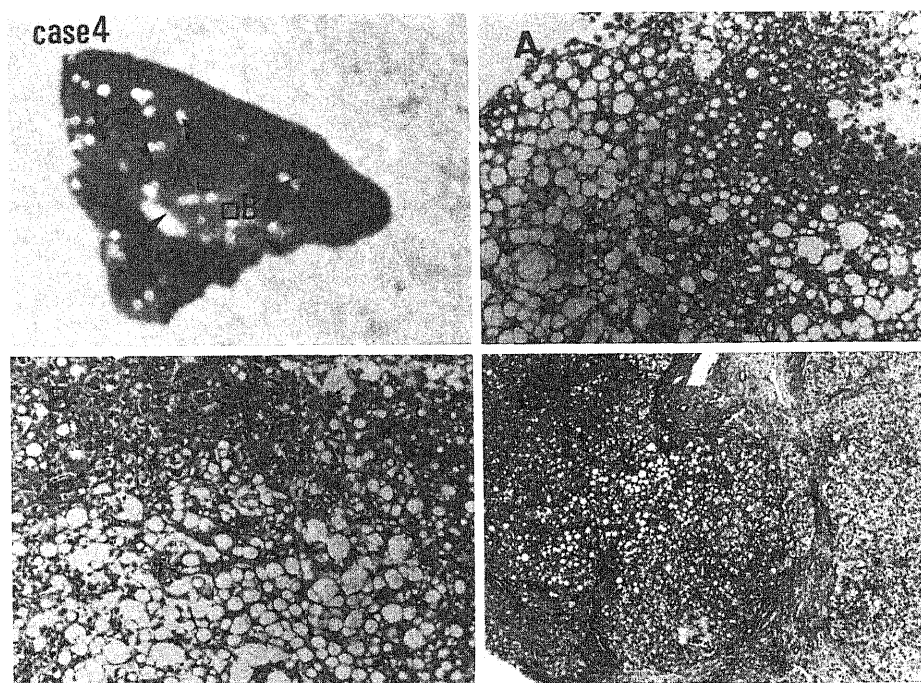


Fig. 5. Gross view (upper left) and microscopic findings (A, B and C) of hepatocellular carcinoma of case 4. Gross view shows a 7×7-mm HCC with a homogeneous surface. Open squares indicate the examined regions. Regions A and B show very well-differentiated HCC with severe fatty change of tumor cells, which have no significant difference in histological findings. Region C shows pre-cirrhosis. (hematoxiline and eosine stain, A & B, ×100; C, ×50)

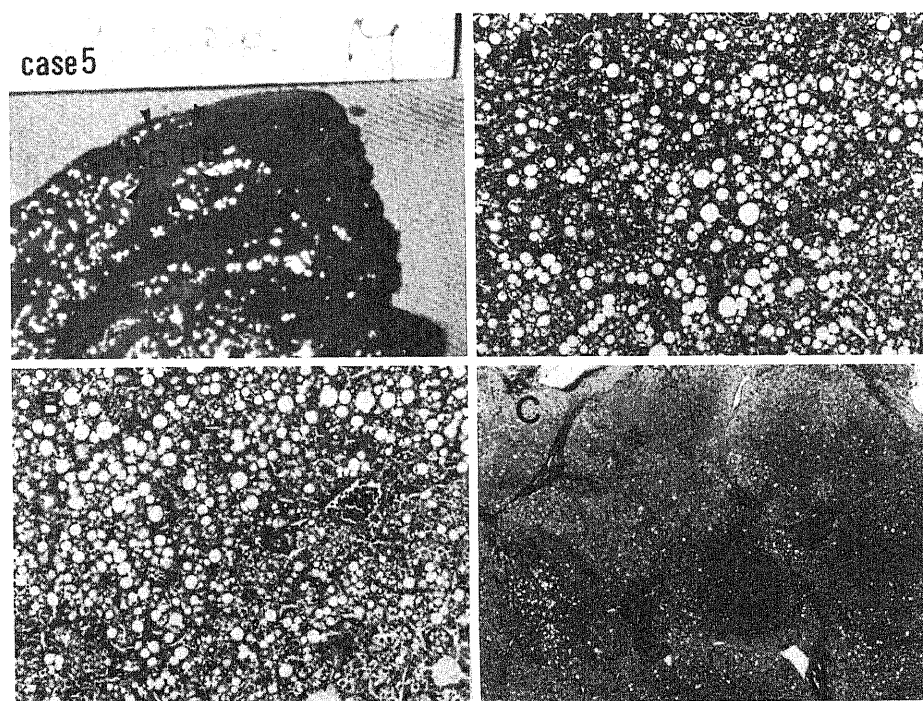


Fig. 6. Gross view (upper left) and microscopic findings (A, B and C) of hepatocellular carcinoma of case 5. Gross view shows a 10×10-mm HCC with a homogeneous surface. Open squares (A, B and C) indicate the examined regions. Regions A and B show very well-differentiated HCC with severe fatty change of tumor cells, which have no significant difference in histological findings. Region C shows mixed type cirrhosis. (hematoxiline and eosine stain, A & B, ×100; C, ×50)

なお、いずれの組織においても全有核細胞中、肝細胞もしくは肝癌細胞が80%以上を占めていた。

Ⅱ. サザンブロットハイブリダイゼーションによる HBV 組み込み様式の検討

症例1では癌部 1A, 1B 共に各制限酵素消化によって同数のバンドを認めた。またそれぞれのバンドの鎖長は 1A と 1B で同様であった。非癌部 1C においては明らかなバンドは見られ

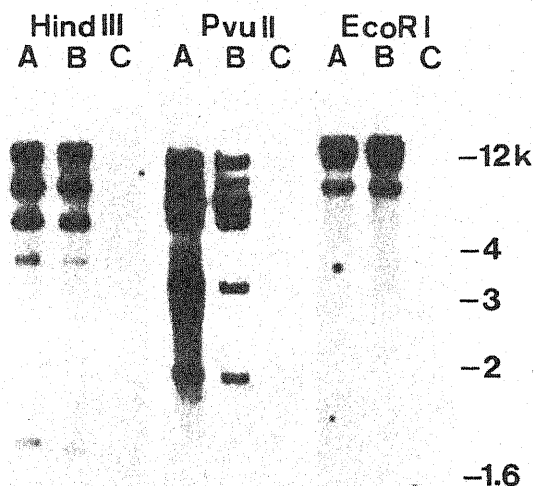


Fig. 7. Integrated pattern of HBV DNA in the genomic DNAs obtained from the nodule-in-nodule lesion (A), the surrounding lesion (B) of HCC, and the cirrhotic tissue (C) in case 1. DNA were digested with one of three restriction enzymes (Hind III, Pvu II, and EcoR I). The bands obtained in lanes A and B were identical, whereas no definite hybridized band in lane C.

なかったが薄いスメアを認めた (図7)

症例2～5では癌部、非癌部共に HBV の組み込みは認められなかった。

Ⅲ. RLGS によるゲノム DNA 構造の検討

1. 癌部 A, B と非癌部 C の RLGS パターンの比較

症例1 (図8): 画面上で比較可能な約2000個のスポットにおいて、癌部 A, B を非癌部 C と比較すると、A で55個、B で57個の強度の異なったスポットが認められた。このうち A, B 共通していたのは54個で、非癌部に対し癌部で強度の増強していたスポットは35個、減少していたスポットは19個であった。

症例2 (図9): 癌部 A, B を非癌部 C と比較すると、A で68個、B で62個の強度の異なったスポットが認められた。このうち A, B 共通していたのは56個で、非癌部に対し癌部で強度の増強をしていたスポットは36個、減少していたスポットは20個であった。

症例3 (図10): 癌部 A, B を非癌部 C と比較すると、A で57個、B で59個の強度の異なったスポットが認められた。このうち A, B 共通していたのは52個で、非癌部に対し癌部で強度の増強していたスポットは41個、減少していたスポットは11個であった。

症例4 (図11): 癌部 A, B を非癌部 C と比較すると A, B 共に強度に差の認められたスポットが6個認められ、これらは A, B で同一であった。非癌部に対し癌部で増強していたスポットは5個 (a, b, c, e, f), 減少していたスポットは1個 (d) であった (表2)。

症例5 (図12): 癌部 A, B を非癌部 C と比較すると A, B 共に強度に差の認められたスポットが3個認められ、A, B で同一であった。これらは全て非癌部に対し非癌部で増強していた (表2)。

症例Ⅰから5で総合すると強度の増強していたスポットは計72個、減少していたスポットは計35個検出された。

2. 癌部 A と B の RLGS パターンの比較

症例1 (図8): 癌部 1A と 1B の RLGS パターンを比較すると計4個のスポットに強度の違いが認められた。これらのス

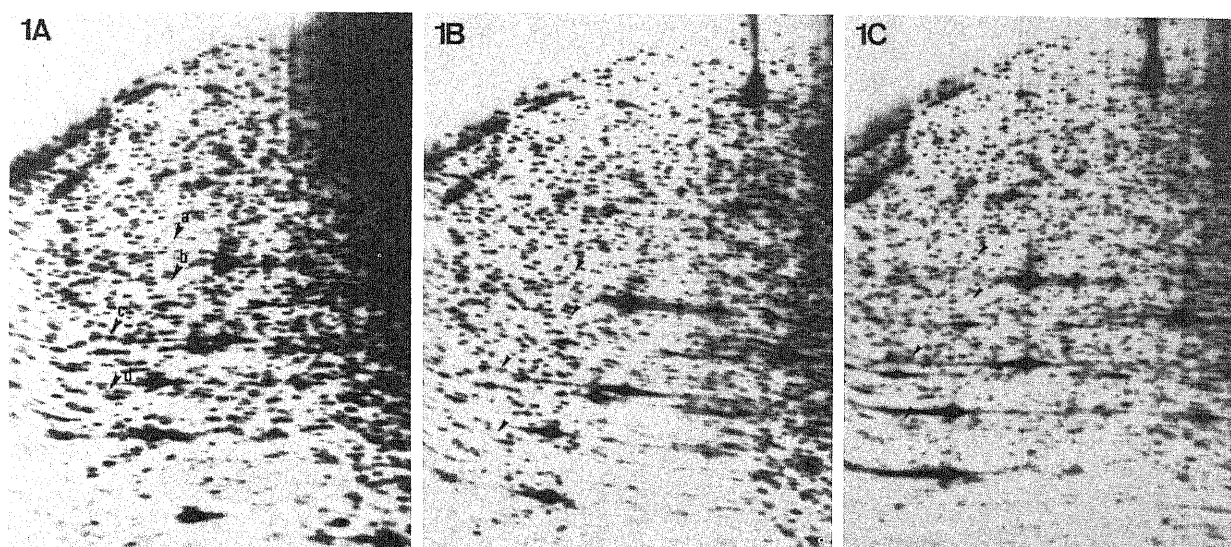


Fig. 8. RLGS profiles of regions A (1A), B (1B) and C (1C) in case 1. Arrowheads indicate spots a-d, which are different in intensity between the regions A and B.

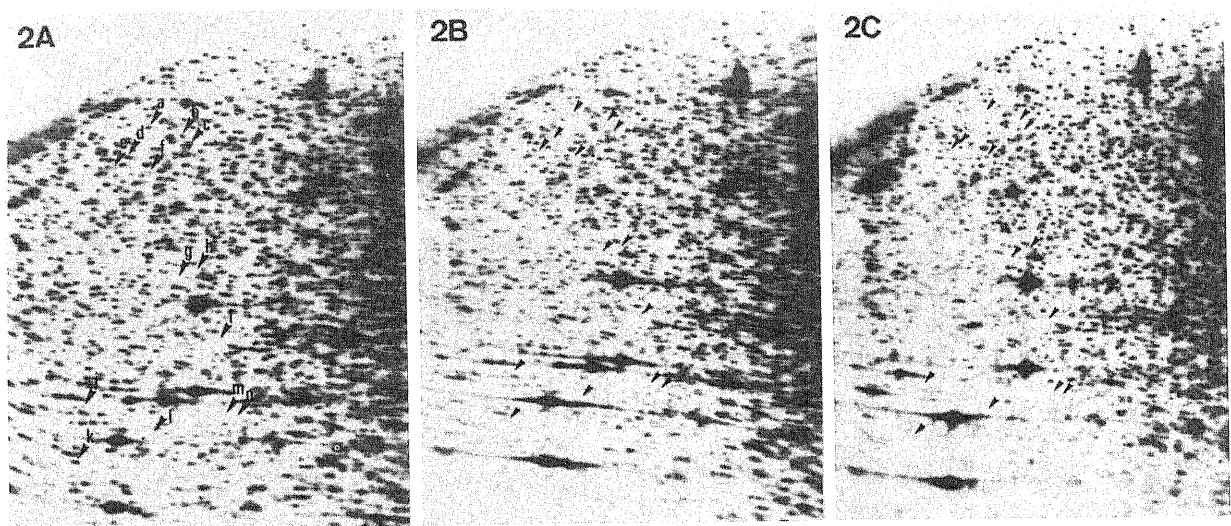


Fig. 9. RLGS profiles of regions A (2A), B (2B) and C (2C) in case 2. Arrowheads indicate spots a-n, which are different in intensity between the regions A and B.

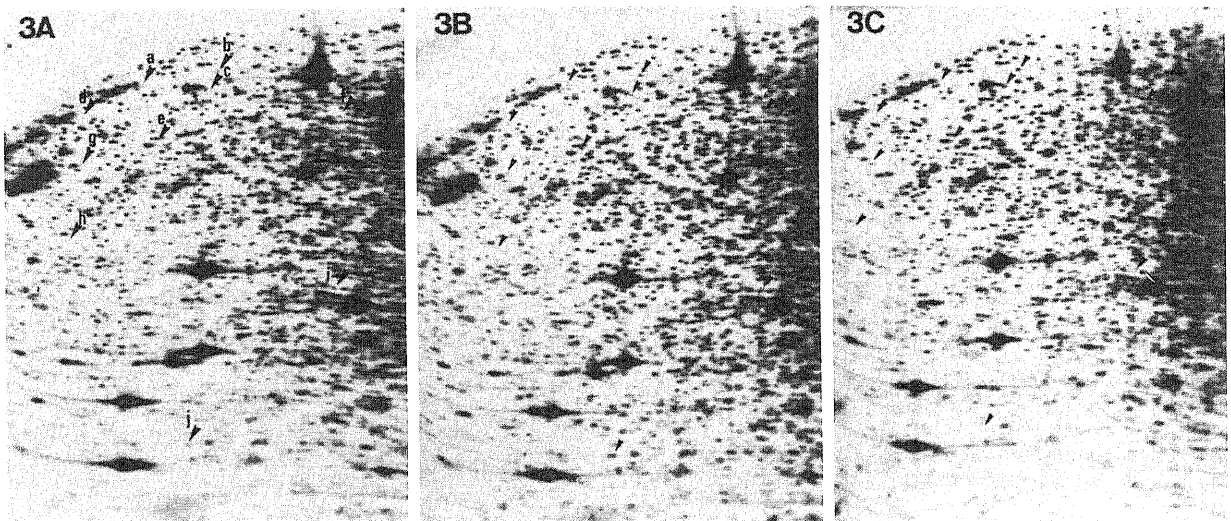


Fig. 10. RLGS profiles of regions A (3A), B (3B) and C (3C) in case 3. Arrowheads indicate spots a-j, which are different in intensity between the regions A and B.

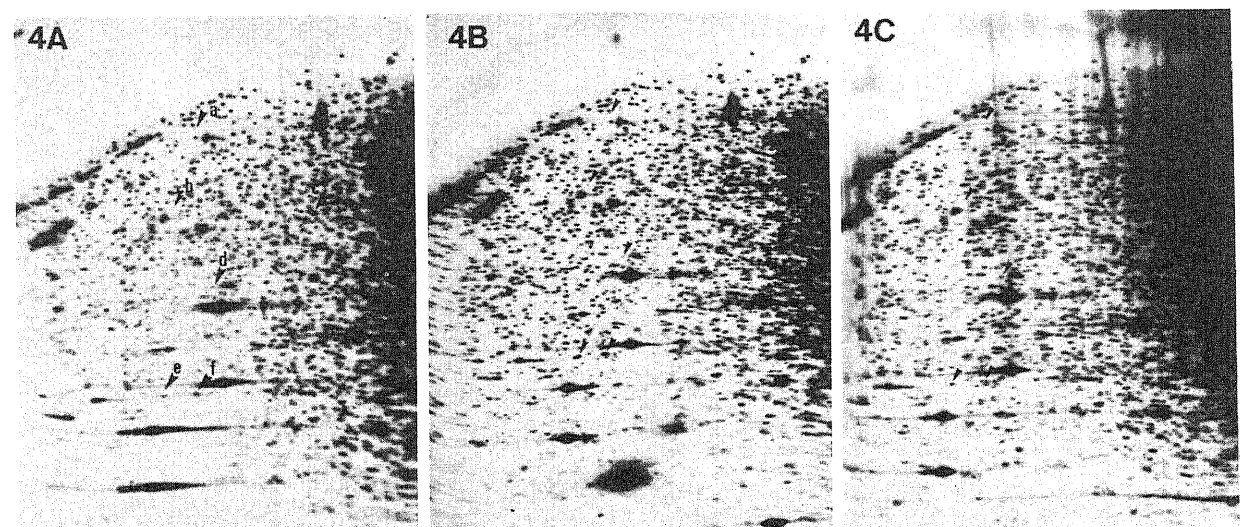


Fig. 11. RLGS profiles of regions A (4A), B (4B) and C (4C) in case 4. There is no different spot in intensity between the regions A and B. Arrowheads indicate spots a-f, which are different in intensity between cancerous (A, B) and non-cancerous regions (C).

ポット a~d のうち非癌部 1C における強度と比較して 2 から 1 に減少しているものが 1A で 1 個 (a), 1B で 1 個 (c) であった。1 から 0 に減少しているのは 1B で 1 個 (d) であった。また 1 から 2 に増強しているのは 1B の 1 個 (b) であった (表 3)。

症例 2 (図 9): 癌部 2A と 2B の RLGS パターンの比較を行ったところ, 計 14 個のスポットで強度の違いが認められた。このスポット a~n のうち非癌部 2C における強度と比較して 2 から 1 に減少しているのは 2A の 2 個 (f, n) で, 2 から 0 に減少しているのは 2B の 1 個 (f) であった。1 から 2 に増強しているスポットは 2A の 3 個 (a, b, k) で, 0 から 1 に増強しているスポットは 2A の 4 個 (e, i, j, l), 2B の 3 個 (d, g, h) であった。0 から 2 に増強しているスポットは 2A の 2 個 (c, d), 2B

Table 2. Rations of spot intensity different between cancerous regions A and B, and non-cancerous region C in cases 4 and 5

Case	Spot	Ratio of spot intensity ^{a)} in regions	
		A and B ^{b)}	C
4	a	1	0
	b	1	0
	c	6	2
	d	1	2
	e	4	2
	f	4	2
5	a	1	0
	b	1	0
	c	1	0

a) Ratio of spot intensity: 2 indicates the average intensity (diploid genome), other ratios were obtained as fold enhancement.

b) In spots presented, the ratio of spot intensity were not different between regions A and B.

Table 3. Rations of spot intensity different between cancerous regions A and B

Case	Spot	Ratio of spot intensity ^{a)} in regions		
		A	B	C
1	a	1	2	2
	b	1	2	1
	c	2	1	2
	d	1	0	1
2	a	2	1	1
	b	2	1	1
	c	2	0	0
	d	2	1	0
	e	1	0	0
	f	1	0	2
	g	0	1	0
	h	0	1	0
	i	1	2	0
	j	1	0	0
	k	2	1	1
	l	1	0	0
	m	1	2	0
	n	1	2	2
3	a	0	1	0
	b	1	2	2
	c	1	2	2
	d	1	2	0
	e	1	2	0
	f	1	2	1
	g	0	1	0
	h	0	2	0
	i	0	1	1
	j	1	2	1

a) Ratio of spot intensity: 2 indicates the average intensity (diploid genome), other ratios were obtained as fold enhancement.

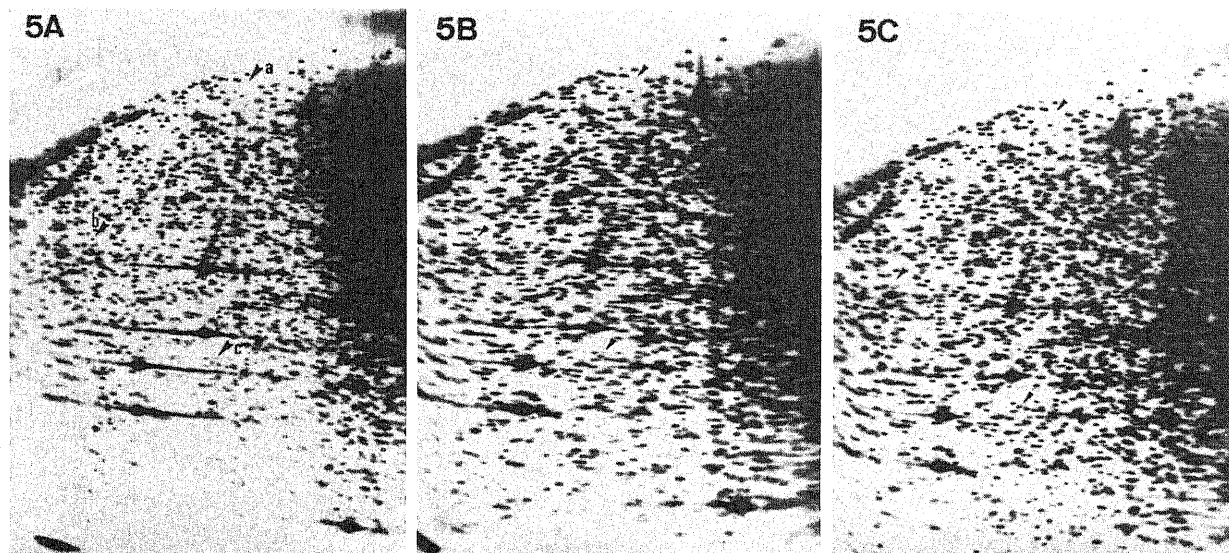


Fig. 12. RLGS profiles of regions A (5A), B (5B) and C (5C) in case 5. There is no different spot in intensity between the regions A and B. Arrowheads indicate spots a-c, which are different in intensity between cancerous (A, B) and non-cancerous regions (C).

の2個 (i, m) であった (表3)。

症例3 (図10): 同様に癌部3Aと3Bの間では計10個のスポットで強度の違いが認められた。このa~jのうち非癌部3Cにおける強度と比較して2から1に減少しているのは3Aの2個 (b, c) であり、1から0に減少しているのは3Aの1個 (i) であった。0から1に増強しているのは3Aの2個 (d, e), 3Bの2個 (a, g) であった。0から2に増強しているのは3Bの3個 (d, e, h) で、1から2に増強しているのは3Bの2個 (f, j) であった (表3)。

症例4, 5 (図11, 12): 癌部AとBのRLGSパターンを比較して強度の異なるスポットは認められなかった。

考 察

肝癌は一つの癌結節内において分化度の異なる複数の癌組織が混在することが知られているが、通常、より低分化な癌組織が結節の内側に、高分化な癌組織が外側に位置しており、腫瘍径の増大と共に分化度の低い癌組織がその面積を増して高分化組織を置換していく現象が認められる¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²⁵⁾。このような病理学的所見より肝癌の結節内結節つまり組織学的多様性 (tumor heterogeneity) は、多段階的な腫瘍進展の結果であると理解されている。

組織学的多様性の存在にもかかわらず、一つの癌結節は一つの癌細胞のクローナルな発育により形成されており、異なる結節内結節においても保有するゲノムは同一癌組織ゲノムから由来している¹⁸⁾。HBVは感染に伴い宿主肝細胞DNAにランダムに組み込まれる²⁰⁾²¹⁾が、症例1のサザンブロットハイブリダイゼーション (図7) の結果では癌部1A, 1Bに同様のバンドを認め、HBVが両者のゲノムの同じ部位に組み込まれていることが示された。また、癌部A, Bと非癌部CのRLGSパターンを比較した検討では非癌部に比べ癌部AとBで共通して変化しているスポットが多数認められた。これらの結果より、癌部AとBは組織学的に異なっているにもかかわらず元来は同一のゲノムから由来するクローナルな細胞集団であることが示された。

遺伝子の変化に基づく多段階発育によって、クローナルな細胞集団に形態学的な多様性が形成されたのであれば、元来同一であるはずのゲノム構造に変化をきたしていることが推測される。p53がん抑制遺伝子は肝癌において高頻度に点突然変異を起こしているが、高分化肝癌ではこの変異は低頻度である¹²⁾。高分化肝癌中に組織学的に悪性度の高い結節内結節を含んだ症例では結節内結節にのみp53変異が認められた²²⁾。これは何らかの原因より、より脱分化した細胞集団が結節内結節を形成し、p53変異が検出されたものと考えられる。この検討は一つの肝癌結節内部のゲノム構造の変化の可能性を立証していると思われるが、このほかに同様の検討は発表されておらず、肝癌の組織学的多様性に関する分子生物学的検討は不十分である。

DNA変化の検出には、一般に既知のDNAプローブを用いて行われるが、これは未知のDNA変化を検出することはできず、一プローブでゲノム上の一座位しか検出することができない。これに対し、RLGS法は制限酵素切断末端を標識し、二次元に展開することによりゲノムの2000~3000座位をスポットとしてスキャンする方法である。これによりゲノム構造の変化を全ゲノムの数%という広範囲にわたって鋭敏に検出可能である²⁰⁾²¹⁾。RLGS法は微細なゲノム構造の差異を検出可能で、肝癌の組織学的多様性に関する分子生物学的検討には有用であ

ると思われたため、今回の検討に用いた。

今回のRLGSの結果では、組織学的多様性のみられた症例1から3の結節内結節とその周囲の癌組織の間にRLGSパターンの違い、即ちゲノム構造の違いが認められ、両者のゲノムに変化をきたしていることが示された (図8~10)。これに対し症例4, 5は組織学的にも均一な小肝癌で、この中の2部位の比較では症例1から3のようなRLGSパターンの違いは認められなかった (図11, 12)。したがってこの変化は発癌初期の段階では比較的クローナルな細胞集団であった肝癌に、発育にともない一部のゲノムDNAに変化をきたしたサブクローナルな集団が出現した結果と考えられた。このようなサブクローナル中でより悪性の形質を有したものが出現すれば増殖し、新たな結節内結節を形成し本来の癌結節を置換していくものと思われる。今回の検討により肝癌の組織学的多様性は多段階的な腫瘍進展の結果であることが分子生物学的見地からも強く示唆された。

さらに、症例3では一つの肝癌内の組織学上は差異の見られない2部位のRLGSパターンにも違いが認められた (図10)。これにより形態学上では差のない組織間でもDNAレベルではサブクローナルな分化が起こっている場合があることが示された。

NagaiらによるRLGS法を用いた肝癌とその背景肝のゲノム構造を比較した検討²²⁾²³⁾では、複数の症例で非癌部に比し肝癌で共通して強度の増強していたスポットが5個以上、減少していたスポットが60個検出されている。今回、癌部と非癌部で強度の異なったスポットは増強が計72個、減少が計35個検出された。このうちの大半が各症例で単独に変化していたが、減少13個、増強5個のスポットが、Nagaiらの65個のうちのスポット²²⁾²³⁾にあてはまった。一方、癌部AとBで強度の異なったスポット (図8~10) には、Nagaiらのスポット²²⁾²³⁾にあてはまるものは認められなかった。肝癌を形成する上で重要と思われる遺伝子がこの65個の共通したスポットのなかに存在するとすれば、癌部AとBで異なったスポットはそれぞれの部位の独自の性質を形成するもの、あるいは適応の結果であると思われる。

RLGS法のスポットの強度はDNAのコピー数に比例するため、二つのアリルともNot Iに感受性の場合に得られるスポットの強度は最も多く見られる2となり、一つのアリルのみ感受性の場合には1、スポットの見られない場合は0となる (図1)。つまり非癌部で2であったスポットが癌部で1や0になった場合、これはこのゲノム領域において、癌化に伴い一つのアリルもしくは両方ともに欠失や挿入などの構造変化を起こしたか、メチル化などによりNot I切断部分がNot Iに非感受性になったことを表す。同様に非癌部で0であったスポットが癌部で1や2になった場合、これは非癌部では非感受性であったNot I部分が癌化にともない一つのアリルもしくは両方ともNot Iに感受性になったことを表す。結節内結節Aが、Bにさらに遺伝子異常が加わったより低分化で進行した癌細胞集団ならば、RLGSパターンで肝発癌に伴い変化するスポットは非癌部CよりC→B→Aと変化し、例えば (C, B, A=2, 1, 0) や (C, B, A=0, 0, 2) となると予想される。しかし今回検出したAとBで強度の異なったスポットはCと比較してその変化の順序はランダムで (表3)、AとBの内どちらがより進行した癌細胞集団かを同定することは困難であった。これは今回用いた症例は全て腫瘍径が大きく進行した肝癌で、結節内結節とその

周囲の組織では最初にサブクローンに枝分かれした後、既に多数の DNA 異常の蓄積をきたしていることによると思われる³³⁾。今後、より早期の肝癌を用いて検討することにより、さらに明瞭に DNA 変化のステップが追跡できると期待される。

肝癌の遺伝子異常として染色体欠失⁹⁾⁻¹¹⁾や p53 遺伝子異常⁹⁾⁻¹²⁾が指摘されているものの微小高分化型肝癌のような腫瘍形成の早い時期で起きている異常は現在までのところ検出されていない¹³⁾¹⁴⁾。今回、RLGS を用い微小高分化型肝癌とその背景肝を比較したところ両者のゲノム構造の差異がはじめて検出された (図 11, 12)。ここで検出されたスポットの大半 (症例 4 のスポット a, b, c, e, f と、症例 5 の a, b) は、症例 1 から 3 の癌部でも変化しており、またこのうち 3 個 (症例 4 の c, e, f) は Nagai らの検出した 65 のうちのスポット²²⁾²³⁾にあてはまった。したがって、これらは肝癌で早期に共通して変化するスポットの可能性が示唆された。今後これらのスポットをクローニングして行くことにより肝癌原因遺伝子の同定が期待される。

最後に、RLGS の問題点に関しては、制限酵素 Not I は、メチル化をうけた CpG サイトを切断することができないため、スポットの強度の変化はランドマーク部位の増幅、欠失の他にメチレーションの有無を反映する。このため今回検出したスポットの変化の原因が染色体の欠失や、がん遺伝子の増幅の結果ではなく、メチル化の変化である可能性がある。さらに、RLGS は既知のプロブを用いる検討とは違い、各スポットがゲノムのどの部位を反映しているのか不明である。今後は目的のスポットを直接クローニングすることにより、スポットの変化の原因や肝発癌におけるこれらのスポット変化の役割を解析することが重要である。

これまでに大腸癌等においては多段階発癌の過程における、種々の癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の変異さらに発癌初期での DNA の脱メチル化が報告されており³⁴⁾、肝癌でもこのようなステップをとることが推測されている。肝癌の発育では多くのサブクローナルな分化を繰り返し、さらに複雑な発育メカニズムを持つ事が予想されるが、今回明らかにした組織学的多様性に伴い変化するスポットを詳細に検討し、クローニング等の質的な解析を進めていくことにより、肝多段階発育の分子生物学的機構が解明される可能性が示唆される。

結 論

肝細胞癌の内部のゲノム構造の多様性について、HBV の組み込み様式を解析するサザンブロットハイブリダイゼーション法と DNA の 2 次元電気泳動法である RLGS 法を用いて検討した。中分化型肝癌 3 例の結節内結節とその周囲の癌組織、さらに 2 例の均一な高分化型肝癌内の 2 部位より DNA を抽出し検討に供した。サザンブロットハイブリダイゼーションでは結節内結節と周囲の癌組織の HBV の組み込みパターンは等しく、両者が単クローン由来であることが示された。RLGS を用いた検討では、高分化型肝癌の 2 部位には RLGS パターンの差異は検出されなかったが、中分化肝癌の結節内結節と周囲癌組織の間には RLGS パターン即ちゲノム DNA 構造の違いが認められた。結節内結節とその周囲の癌組織は単クローン由来で本来同一のゲノム構造を有していたことから、このゲノム構造の変化は腫瘍の発育にともない一部の DNA 構造に違いを持つ細胞集団が出現したためと結論された。したがって肝癌の組織学的多様性は、DNA の変化の蓄積による多段階的な腫瘍進展の結

果と思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、ご指導頂きました大阪大学細胞生体工学センター 松原謙一教授、永井尚生先生、金沢大学第一内科 小林謙一教授、鶴浦雅志講師、金子周一講師、また貴重なサンプルを提供していただきました兵庫医科大学第一内科 岡本英三教授、山中若樹講師に深謝致します。

文 献

- 1) Pitot, H. C.: Progression: The terminal stage in carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 599-607 (1989).
- 2) 榎本克彦, 中島康雄, 佐藤 均, 森 道夫: 発癌と局所因子. *Medical Immunol.*, **19**, 339-343 (1990).
- 3) Fearon, E. R. & Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767 (1990).
- 4) Hamilton, S. R.: Molecular genetics of colorectal carcinoma. *Cancer*, **70**, 1216-1221 (1992).
- 5) Vogelstein, B. & Kinzler, K. W.: The multistep nature of cancer. *Trend in Genetics*, **9**, 138-141 (1993).
- 6) Fujimori, M., Tokino, T., Hino, O., Kitagawa, T., Imamura, T., Okamoto, E., Mitsunobu, M., Ishikawa, T., Nakagawa, H., Harada, H., Yagura, M., Matsubara, K. & Nakanura, Y.: Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, **51**, 89-93 (1991).
- 7) Walker, G. J., Hayward, N. K., Falvey, S. & Cooksley, W. G. E.: Loss of somatic heterozygosity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, **51**, 4367-4370 (1991).
- 8) Takahashi, K., Kudo, J., Ishibashi, H., Hirata, Y. & Niho, Y.: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 22 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **17**, 794-799 (1993).
- 9) Bressac, B., Galvin, K. M., Liang, T. J., Isselbacher, K. J. & Wands, J. R.: Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 1973-1977 (1990).
- 10) Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J. & Harris, C. C.: Mutation hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, **350**, 427-428 (1991).
- 11) Murakami, Y., Hayashi, K. & Sekiya, T.: Detection of aberrations of the p53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by Single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res.*, **51**, 3356-3361 (1991).
- 12) Oda, T., Tsuda, H., Scarpa, A., Sakamoto, M. & Hirohashi, S.: p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, **52**, 6358-6364 (1992).
- 13) 小田竜也 津田 均, 広橋説雄: 肝細胞癌の分子生物学. 図説臨床癌シリーズ No. 3 - 肝癌 - (杉村 隆監修), 第 2 版, 20-27 頁, メジカルビュー社, 東京, 1992.
- 14) Popper, H.: Pathologic aspects of cirrhosis. A review. *Am. J. Pathol.*, **87**, 228-264 (1977).
- 15) Arakawa, M., Kage, M., Sugihara, S., Nakashima, T., Suenaga, M., & Okuda, K.: Emergence of malignant

lesions within an adenomatous hyperplastic nodule in a cirrhotic liver. Observations in five cases. *Gastroenterology*, **91**, 198-208 (1986).

16) Hirohashi, S.: Pathology and molecular mechanisms of multistage human hepatocarcinogenesis. In: C. C. Harris (ed.), *Multistage Carcinogenesis*, 1st ed., p 87-93, Japan Sci. Soc. press, Tokyo/CRC press, Boca Raton, 1992.

17) Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Terada, M. & Hasegawa, H.: Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, **95**, 1664-1666 (1988).

18) Kenmochi, K., Sugihara, S. & Kojiro, M.: Relationship of histologic grade of hepatocellular carcinoma (HCC) to tumor size, and demonstration of tumor cells of multiple different grades in single small HCC. *Liver*, **7**, 18-26 (1987).

19) 渡辺英二郎, 広橋説雄, 坂元亨宇, 長谷川博, 山崎 晋, 幕内雅敏, 森山紀之, 高安賢一: 小肝癌の新しい肉眼分類亜型—早期型内通常型—と肝癌の多段階進展に関する病理学的検討. *肝臓*, **31**, 1267-1273 (1990).

20) Hatada, I., Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Komatsubara, H. & Mukai, T.: A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9523-9527 (1991).

21) Hirotsune, S., Hatada, I., Komatsubara, H., Nagai, H., Kuma, K., Kobayakawa, K., Kawara, T., Nakagawara, A., Fujii, K., Mukai, T. & Hayashizaki, Y.: New approach for detection of amplification in cancer DNA using restriction landmark genomic scanning. *Cancer Res.*, **52**, 3642-3647 (1992).

22) Nagai, H., Hirotsune, S., Komatsubara, H., Hatada, I., Mukai, T., Hayashizaki, Y. & Matsubara, K.: Genomic analysis of human hepatocellular carcinomas using restriction landmark genomic scanning. *Cancer Detec. Prev.*, **17**, 399-404 (1993).

23) Nagai, H., Ponglikimongkol, M., Mita, E., Ohmachi, Y., Yoshikawa, H., Saeki, R., Yumoto, Y., Nakanishi, T.

& Matsubara, K.: Aberration of genomic DNA in association with human hepatocellular carcinomas detected by 2-D analysis. *Cancer Res.*, In press.

24) Blin, N. & Stafford, D. W.: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2303-2308 (1976).

25) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-507 (1975).

26) Tsurimoto, T., Fujiyama, A. & Matsubara, K.: Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 444-448 (1987).

27) 日本肝癌研究会編: 原発性肝癌取扱い規約. 第3版, 32-39頁, 金原出版, 東京, 1992.

28) 神代正道: 原発性肝癌の病理. 図説臨床癌シリーズ No. 3—肝癌—(杉村 隆監修), 第2版, 28-34頁, メジカルビュー社, 東京, 1992.

29) 杉原茂孝, 清松和光, 中島 収, 神代正道, 田中正俊, 真島康雄, 谷川久一: 肝細胞癌の形態推移についての病理学的研究—エコーガイド下細針生検組織像と同一症例剖検組織像の比較検討—. *肝臓*, **31**, (Suppl), 102 (1990).

30) Matsubara, K. & Tokino, T.: Integration of hepatitis B virus DNA and its implication for hepatocarcinogenesis. *Mol. Biol. Med.*, **7**, 243-260 (1990).

31) Nagaya, T., Nakamura, T., Tokino, T., Imai, M., Kamino, K., Yamamura, K. & Matsubara, K.: The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes and Dev.*, **1**, 773-782 (1987).

32) 広橋説雄: ヒト肝における多段階発がんの病理と分子機構. *細胞工学*, **12**, 92-96 (1993).

33) 藤田哲也: がん発生の染色体多段階変異説からみた前がん病変. *CRC*, **2**, 139-147 (1993).

Genomic Analysis of Intratumoral Heterogeneity in Human Hepatocellular Carcinoma Using Restriction Landmark Genomic Scanning Rieko Saeki, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, Suita, 552-J. J. J. Med Soc., 103, 369-380 (1994)

Key words hepatocellular carcinoma, nodule-in-nodule lesion, multi-step carcinogenesis, RLGS

Abstract

To analyze the genomic change in tumor heterogeneity of advanced hepatocellular carcinoma (HCC), this study examined nodule-in-nodule and surrounding regions from each of three moderately-differentiated HCCs, and two independent regions from each of two well-differentiated HCCs which did not demonstrate nodule-in nodule formation. High molecular weight DNA were extracted and used for Southern blot hybridization for the detection of integrated hepatitis B virus (HBV) sequences and for restriction landmark genomic scanning (RLGS) analysis, in this case by 2-dimensional DNA electrophoresis method. The Southern blot hybridization demonstrated that the pattern of HBV integration was identical in both the nodule-in-nodule and surrounding regions in one case, which indicated that these two regions had the same clonal origin. RLGS analysis showed no difference between the two well-separated regions from each of two well-differentiated HCCs, and therefore genomic heterogeneity was not detected. Nodule-in-nodule and surrounding regions from each of the three moderately-differentiated HCCs exhibited common changes in the RLGS spots compared with those of the corresponding non-tumorous region. In addition, the profile of the two cancerous regions from each of the three moderately-differentiated HCCs varied within a range of 4 to 14 spots. Genomic alteration was thus demonstrated between nodule-in-nodule and the surrounding regions, in spite of the findings that the two tumor regions had the same clonal origin. Histological heterogeneity in HCCs was indicated to be a result of multi-step progressions accompanied with genetic changes.