

DOI:10.18027 / 2224-5057-2017-7-3-71-80

Фиброламеллярная карцинома как отдельный подтип гепатоцеллюлярного рака: молекулярно-генетические особенности, диагностика, перспективы лечения

Д. А. Шавочкина¹, И. Ф. Кустова¹, Н. Л. Лазаревич^{1,2}¹ НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России² Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

Резюме: Фиброламеллярная карцинома (ФЛК) описана в 1956 г. как отдельный подтип гепатоцеллюлярного рака (ГЦР), диагностируемый у молодых пациентов, не имеющих хронических заболеваний печени. Морфологически ФЛК характеризуется как ГЦР с крупными клетками, большими ядрами и наличием в строме ламеллярных коллагеновых волокон, образующих разветвленную сеть. Механизмы, определяющие развитие ФЛК при отсутствии значимых факторов риска, долгое время оставались неизвестными. Высокопроизводительные методы исследования транскриптома позволили описать уникальный профиль экспрессии генов при ФЛК, определить основные сигнальные пути, активированные в опухолевых клетках, такие как mTOR, FGFR и EGFR сигнальные каскады, которые могут рассматриваться как потенциальные терапевтические мишени для лечения этого типа опухолей. При полнотранскриптомном анализе в подавляющем большинстве образцов ФЛК был впервые выявлен химерный транскрипт DNAJB1-PRKACA, который образуется в результате слияния двух генов при делеции участка 19 хромосомы. Эта перестройка является драйверным событием для возникновения ФЛК и определяет ускорение пролиферации, повышение клоногенного потенциала и увеличение популяции опухолевых стволовых клеток. Слитный транскрипт специфичен для ФЛК и может быть выявлен рядом клинических лабораторных методов, что открывает возможность для его использования в качестве маркера для дифференциальной диагностики этого типа опухолей. Поскольку слитный белок DNAJB1-PRKACA обладает киназной активностью, он рассматривается как перспективная мишень для разработки таргетных препаратов, способных ингибировать эту функцию. Анализ транскриптомных нарушений в ФЛК позволил описать прогностическую сигнатуру из 8 генов, высокий уровень экспрессии которых коррелирует с плохой выживаемостью пациентов после хирургического лечения.

В представленном обзоре суммированы современные сведения о молекулярном патогенезе ФЛК и открывающихся на их основе возможностях для диагностики и разработки новых схем терапии.

Ключевые слова: фиброламеллярная карцинома, гепатоцеллюлярный рак, слитные гены

Введение

Гепатоцеллюлярный рак (ГЦР) – одна из самых распространенных форм опухолей, которая развивается из основных клеток печени, гепатоцитов [1]. Факторами риска, способствующими развитию этого заболевания, являются хронические инфекции вирусами гепатитов В и С, цирроз печени, хронические алкогольные отравления, воздействие химических канцерогенов. Для ГЦР характерна высокая агрессивность течения и устойчивость к существующим схемам химиотерапии. При исследовании молекулярных механизмов гепатоканцерогенеза были выявлены генетические и эпигенетические изменения в регуляции экспрессии ключевых онкогенов и генов-супрессоров, таких как p53, β-катенин, семейство рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), а также нарушения активности сигнальных каскадов рецепторов факторов роста: PI3K/mTOR, MAPK, RAS, Wnt/β-катенин и Hippo [1, 2, 3].

Анализ изменения транскрипционных профилей генов при гепатоканцерогенезе позволил предложить несколько вариантов классификации молекулярных

подклассов ГЦР, которые могут быть использованы для выбора оптимальной терапевтической стратегии и предсказания отдаленных результатов лечения пациентов [3, 4, 5]. Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что по морфологическому строению, клиническим характеристикам, а также спектру генетических и эпигенетических нарушений, лежащих в основе злокачественной трансформации, ГЦР представляет собой крайне гетерогенный класс опухолей, выбор тактики лечения которых должен учитывать индивидуальные характеристики конкретной опухоли [2].

Фиброламеллярная карцинома (ФЛК) представляет собой вариант ГЦР, который выявляется преимущественно у детей, подростков и молодых взрослых (до 30–35 лет), неотягощенных другими заболеваниями, увеличивающими риск возникновения ГЦР (инфекции вирусами гепатитов В и С, цирроз). ФЛК была впервые описана Хью Эдмондсоном [6] в 1956 г. как отдельный подтип первичного рака печени. По приблизительным оценкам, ФЛК составляют около 5% всех

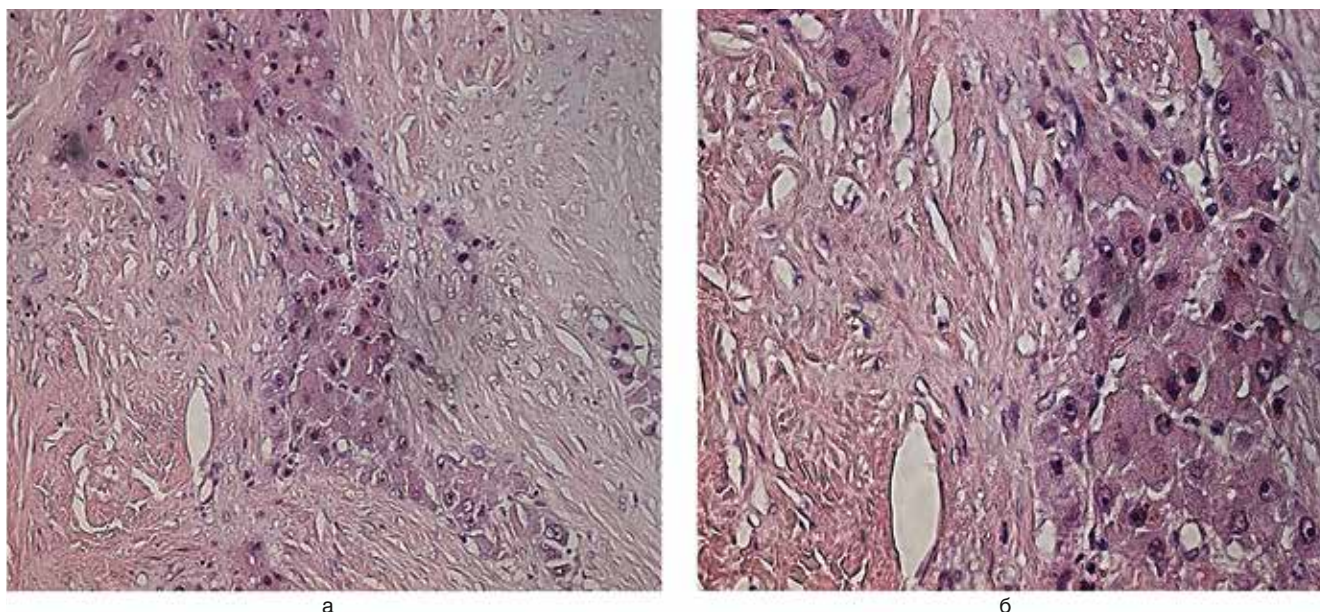


Рисунок 1. Представлен типичный случай фиброламеллярной карциномы: а – гистология ФлК (x200). Четко видны разрастания ламеллярного фиброза, окружающие видоизмененные опухолевые клетки; б – гистология ФлК (x400). Видоизмененные полигональные клетки опухоли

случаев ГЦР, варьируя от менее 1% до 8% в зависимости от исследованной популяции и дизайна исследования [7]. Клиническая картина проявляется симптомами, характерными для первичного рака печени: абдоминальная боль, асциты, гепатомегалия, обструктивная желтуха. В отличие от «классического» ГЦР, при котором часто наблюдаются цирротические изменения архитектуры ткани, ФлК характеризуется разрастанием тонких ламеллярных пластинок, состоящих из коллагеновых волокон, пронизывающих структуру ткани печени (ламеллярный фиброз) [7].

В течение многих лет предпринимались попытки идентифицировать надежные маркеры для выявления и дифференциальной диагностики ФлК и определить причину возникновения опухолей у молодых пациентов. В 2014 г. при проведении полнотранскриптомного анализа образцов ФлК был открыт химерный транскрипт DNAJB1-PRKACA, который образуется в результате делеции участка 19 хромосомы размером 400 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и приводит к слиянию двух генов [8]. Эта перестройка изменяет биологические свойства исходных белков, является ключевым генетическим нарушением при формировании ФлК и может рассматриваться в качестве перспективной мишени для разработки таргетных препаратов для терапии этой формы опухолей.

В настоящем обзоре мы рассмотрим основные результаты исследований, проведенных в последние годы в области патогенеза ФлК, молекулярной диагностики, перспективах направленной терапии этой разновидности опухолей печени.

ФлК как подтип ГЦР

1. Этиология ФлК

Этиология фиброламеллярной карциномы до сих пор остается неясной. В отличие от классического гепатоцеллюлярного рака, возникновение ФлК не ассоциировано с инфекциями вирусами гепатитов В или С, действием гепатоканцерогенов, метаболическими нарушениями или другими хроническими заболеваниями печени. В литературе описаны единичные случаи развития ФлК на фоне вирусных инфекций, но они представляются случайными, поскольку не подтверждаются на представительных выборках [9, 10].

2. Патоморфология и микроскопия ФлК

Фиброламеллярные карциномы представляют собой скопление больших полигональных эозинофильных клеток с четко выраженным везикулярным ядром, окруженных обильными разрастаниями ламеллярного фиброза (рис. 1). Коллагеновые волокна в большинстве случаев располагаются параллельными тяжами, в метастазирующих опухолях коллагеновые волокна могут быть расположены бессистемно (так называемые «спутанные волокна») [7, 10]. По сравнению с ГЦР фиброламеллярные карциномы обладают повышенной способностью к метастазированию в региональные лимфатические узлы. [11].

3. Дифференциальная диагностика ФлК

Фиброламеллярные карциномы экспрессируют маркеры гепато- и холангиоцитарной дифференцировки. Полученные к настоящему времени данные о клеточном

происхождении этого типа опухолей неоднозначны. Предполагается, что ФЛК представляет собой подтип ГЦР, развивающийся из бипотентных гепатоцитарных клеток-предшественников, способных дифференцироваться в гепатоциты или холангиоциты, в то время как ГЦР возникает из клеток гепатоцитарного происхождения [4].

Сходство ФЛК с другими опухолями печени подтверждается экспрессией специфического маркера гепатоцитов – HerPar1. Некоторые ФЛК характеризуются синтезом цитокератинов 8 и 18 (белки промежуточных филаментов цитоскелета, экспрессирующиеся в гепатоцитах). Окрашивание на глипикан-3 (GPC3, гепаран-сульфат протеогликан), гиперэкспрессирующийся в ГЦР, выявляется в 17–59% случаев [10, 12]. В большинстве фиброламеллярных опухолей не синтезируется альфа-фетопrotein (АФП) – основной белок эмбриональной сыворотки крови, являющийся наиболее значимым клиническим маркером ГЦР [13].

Для дифференциальной диагностики ФЛК от ГЦР используются гликопротеин CD68, локализующийся на поверхности моноцитов и макрофагов, и CEA (Carcinoembryonic antigen, раково-эмбриональный антиген), экспрессирующийся в клетках внутривенных желчных протоков и на каналькулярной мембране гепатоцитов.

В то же время фиброламеллярные карциномы экспрессируют дифференцировочные маркеры клеток желчных протоков – ЕМА (эпителиально-мембранный антиген), цитокератин 7 и в редких случаях цитокератин 19 (5–25%) [14]. В ФЛК часто выявляется синтез EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) – мембранно-локализованного гликопротеина, являющегося опухолевым антигеном и маркирующего стволовые клетки-предшественники различных тканей, в том числе и печени [15, 16].

Для того чтобы максимально достоверно дифференцировать ФЛК от других типов опухолей печени, в настоящее время предлагается использовать набор маркеров, включающий HerPar-1, CK7, ЕМА и CD68 [10, 9, 17].

4. Прогноз

К настоящему времени единственным эффективным способом лечения пациентов с ФЛК остается хирургическая гемигепатэктомия. В литературе нет единого мнения относительно продолжительности жизни пациентов с ФЛК после хирургического лечения. Выживаемость пациентов с ФЛК выше, чем у пациентов с ГЦР, возникшим на фоне цирротического повреждения печени. Однако это не относится к случаям, не ассоциированным с действием основных факторов риска, приводящих к возникновению ГЦР. Считается, что более высокая выживаемость пациентов с ФЛК по сравнению с пациентами, страдающими гепатоцеллюлярным раком, связана с молодым возрастом и отсутствием значимых патологий печени. С другой стороны, среди ФЛК встречаются высокоагрессивные, быстро метастазирующие опу-

холи, приводящие к летальному исходу в течение одного года даже после радикальной резекции [18, 19].

Стоит отметить тот факт, что ФЛК, также как и ГЦР, характеризуется высокой устойчивостью к действию традиционных химиотерапевтических препаратов [7, 11].

В связи с описанными клиническими особенностями ФЛК важное значение приобретает разработка подходов для раннего выявления, способов дифференциальной диагностики ФЛК от ГЦР и других форм опухолей, поиск эффективных схем терапии и потенциальных мишеней, специфических для этой формы ГЦР. Важнейшим условием для достижения этих целей является глубокое изучение молекулярных механизмов канцерогенеза ФЛК.

Изменения профиля экспрессии генов в процессе канцерогенеза ФЛК

Поскольку фиброламеллярная карцинома является подтипом ГЦР, первые исследования закономерностей экспрессии генов при ФЛК были направлены на анализ особенностей экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнальных каскадов, нарушение активности которых ассоциировано с развитием ГЦР. Так, при исследовании образцов ФЛК методом гибридизации с микрочипами Kannangai и соавторы [20] описали гиперэкспрессию генов, кодирующих компоненты RAS, MAPK и PI3K сигнальных каскадов. Кроме того, исследователи подтвердили описанную ранее гиперэкспрессию рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [21].

Функциональная активация или гиперэкспрессия онкогенов является одним из ключевых этапов опухолевой трансформации. Для ФЛК характерна гиперэкспрессия онкогенов, участвующих в регуляции клеточного цикла: циклина E1 (функционирует в качестве регуляторной субъединицы CDK2, активация которой необходима для перехода из G1 в S фазу клеточного цикла), циклинзависимой киназы CDK6 (играет ключевую роль при движении по клеточному циклу, участвует в фосфорилировании белка pRB) и E2F3 (транскрипционный фактор, напрямую взаимодействующий с опухолевым супрессором pRb и регулирующий экспрессию генов, вовлеченных в координацию клеточного цикла), гиперэкспрессия которых описана для нескольких типов эпителиальных опухолей, включая ГЦР [22, 23].

В 2015 г. Riehle и соавторы исследовали возможную роль белков mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) и FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) в формировании ФЛК. Активация сигнальных каскадов, в которых участвуют mTOR и FGFR, характерна для первичного рака печени. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к FGFR1 и иммуноблоттинг с антителами на фосфорилированную форму mTORC1 позволили описать существенное повышение экспрессии рецептора фактора роста фибробластов и активацию сигнального пути mTORC1

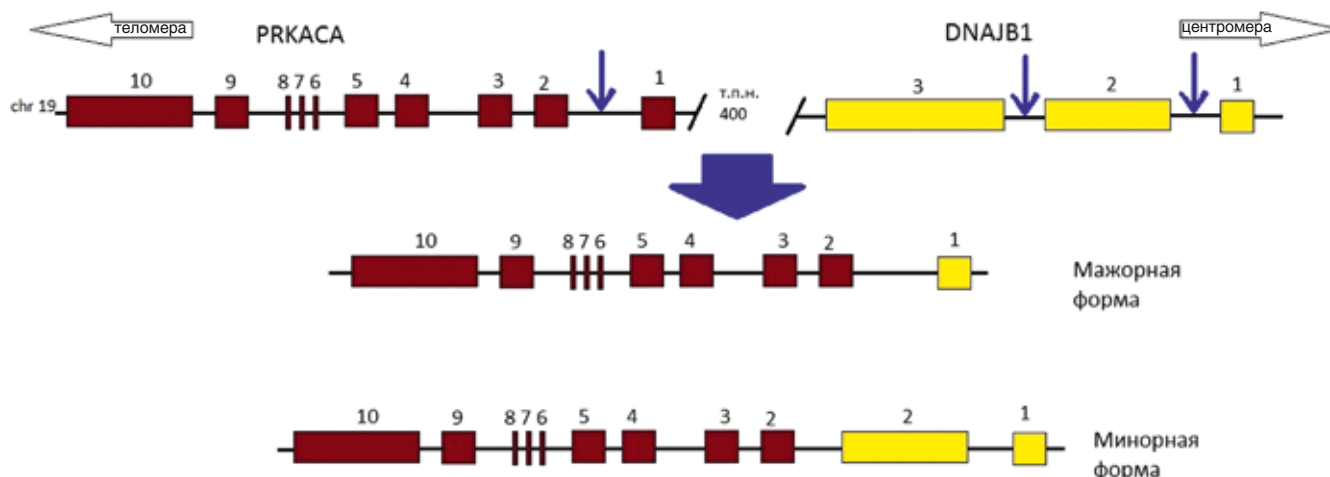


Рисунок 2. Схема образования мажорного и минорного вариантов слитного гена DNAJB1-PRKACA. Стрелками обозначены области, в которых происходят разрывы ДНК, приводящие к транслокации

в ФЛК по сравнению с неопухолевой тканью печени и другими подтипами ГЦР [24]. На основании этих данных авторы предлагают рассмотреть mTORC1 и FGFR1 в качестве новых мишеней для таргетной терапии с использованием комбинации клинически одобренных препаратов – эверолимуса (ингибитор mTOR-зависимого сигнального каскада) и бриваниба/пазопаниба (ингибиторы FGFR).

Развитие технологий массового параллельного секвенирования (NGS) позволило существенно расширить представления о специфическом профиле изменения экспрессии генов в ФЛК. Одно из первых исследований по анализу транскриптома ФЛК подтвердило закономерности, описанные ранее, – гиперактивацию сигнальных каскадов RAS, MAPK, PI3K, EGFR, mTOR [25].

ФЛК характеризуются наличием ламеллярного фиброза, волокна которого состоят преимущественно из коллагена. Simon и соавторы [25] продемонстрировали значительное увеличение экспрессии генов, кодирующих коллагены различных типов, в том числе тех классов, которые ассоциированы с канцерогенезом. Кроме того, было выявлено повышение экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в межклеточных взаимодействиях: коннексины (GJC1 и GJA5), альфа субъединицы интегринов, компоненты адгезионных контактов, например кадгерин 13, гиперэкспрессия которого была ранее описана при ГЦР.

В 2015 г. из асцита, полученного от пациента с неоперабельной метастазирующей опухолью, Oikawa и соавторы [26] получили перевиваемую культуру ФЛК. При транскриптомном анализе различных пассажей перевиваемой культуры, первичных ФЛК, а также линий hBTSC (стволовые клетки биллиарного дерева человека), hHrSCs (стволовые клетки печени человека) и hHBs (гепатобласты) было обнаружено, что перевиваемая линия характеризуется постоянным паттерном экспрессии генов, сходным с профилями первичных ФЛК, а также стволовых клеток биллиарного дерева. Эти результаты указывают на то,

что опухолевые клетки ФЛК происходят из общих клеток-предшественников печени и поджелудочной железы. Исследование туморогенности перевиваемой линии ФЛК при подкожной инъекции опухолевых клеток бестимусным мышам продемонстрировало обогащенность этой культуры стволовыми опухолевыми клетками – прививочная доза в 100 клеток приводила к развитию опухолей. Иммуногистохимическое окрашивание клеток перевиваемой линии и образцов первичных ФЛК на маркеры стволовых клеток, а также клеток-предшественников различных типов (SOX9, SOX17, PDX1, OCT4, SALL4 и SHH) подтвердила экспрессию маркеров стволовых клеток эндодермы и плюрипотентных стволовых клеток. Возможно, именно с этим связана высокая устойчивость ФЛК к существующим способам лекарственной и радиотерапии [26].

Ключевым событием в исследовании профиля экспрессии генов фиброламеллярной карциномы стало выявление хромосомной перестройки, приводящей к возникновению слитного гена DNAJB1-PRKCA, специфического исключительно для этого типа опухолей.

Химерный ген DNAJB1-PRKCA в ФЛК

В 2014 г. группой Honeuman при полнотранскриптомном анализе образцов ФЛК был впервые описан слитный транскрипт DNAJB1-PRKCA, исследование которого позволило взглянуть на проблему онкогенеза ФЛК в новом свете [8].

При анализе образцов 11 пациентов с ФЛК, в которые входили участки неопухолевой ткани, первичные опухоли, метастазы и опухоли, возникшие после удаления первичного очага, в 100% опухолевых образцов был выявлен новый слитный транскрипт DNAJB1-PRKCA, тогда как в нормальной ткани печени такая последовательность не обнаруживалась [8].

Было установлено, что слитный транскрипт является продуктом химерного гена DNAJB1-PRKCA, образующегося в результате делеции участка 19 хромосомы размером 400 т. п. н., при которой утрачиваются последние экзоны гена DNAJB1, несколько промежуточных генов и первый экзон гена PRKACA. Формирующийся в результате такой перестройки слитный транскрипт в большинстве опухолей содержит 1 экзон гена DNAJB1 и 2–10 экзоны гена PRKACA (рис. 2). В некоторых образцах ФЛК выявлен также более длинный минорный транскрипт, включающий часть 2 экзона гена DNAJB1 [8].

Ген DNAJB1 локализован в хромосомном локусе 19q13.2, кодирует белок теплового шока Hsp40, кофактор шаперона Hsp70, участвующий в котрансляционном сворачивании белков и протеолитической деградации убиквитинилированных белков. В норме шапероны Hsp40 и Hsp70 локализованы в цитоплазме, но в ответ на стресс транслоцируются в ядро и ядрышки, функция шаперонов в ядре не ясна [27].

Ген PRKACA локализован в локусе 19q13.1 и кодирует каталитическую субъединицу протеинкиназы А (ПКА). В неактивном состоянии ПКА состоит из четырех субъединиц – двух каталитических и двух регуляторных. В присутствии молекул цАМФ, которые связываются с регуляторными субъединицами, происходит диссоциация комплекса и высвобождение активной каталитической субъединицы. Активированная протеинкиназа А фосфорилирует специфические белки по серину и треонину, в результате чего изменяются конформация и активность фосфорилированных белков. Инактивация ПКА происходит по принципу отрицательной обратной связи: один из субстратов, активируемых киназой, фосфодиэстераза, превращает цАМФ в АМФ, снижая концентрацию цАМФ, что приводит к связыванию регуляторных субъединиц с каталитическими [28]. ПКА фосфорилирует широкий спектр субстратов в клетке, участвуя таким образом в регуляции активности транскрипционных факторов MYC, CREB, CREM, AP2, SRF, Sp1, активации Wnt-сигнального пути, метаболизме углеводов и липидов и биогенезе митохондрий. ПКА обнаруживается у большинства животных. В гепатоцитах ПКА играет важную роль в метаболизме глюкозы – ингибирует гликолиз и синтез гликогена и активирует глюконеогенез (процесс образования молекул глюкозы из других органических соединений, например из свободных аминокислот, глицерина) и гликогенолиз (биохимическая реакция расщепления гликогена до глюкозы).

Нарушения функции ПКА при канцерогенезе

Соматическая мутация, приводящая к аминокислотной замене L205R в белке PRKACA, связана с развитием синдрома Кушинга (синдром гиперкортицизма – объединяет группу заболеваний, при которых происходит длительное хроническое воздействие на организм гормонов коры

надпочечников). В результате мутации каталитическая субъединица ПКА теряет возможность связываться с регуляторной субъединицей, что обуславливает увеличение киназной активности и независимость от внешних сигналов (цАМФ). Эти нарушения приводят к изменению регуляции экспрессии многих генов, в том числе повышению экспрессии кортизола. Таким образом, изменение активности ПКА – это ключевой механизм при формировании таких патологических состояний, как аденома гипофиза, гиперплазия или опухоли коры надпочечников, являющихся причинами развития синдрома Кушинга [29, 30].

Нарушение активности ПКА может быть связано также с мутациями гена регуляторной субъединицы PRKARIA, расположенного в локусе 17q23-q24. Такие мутации часто приводят к развитию синдрома Карни – редкого наследственного заболевания с аутосомно-доминантным типом наследования, для которого характерно образование множественных опухолей у детей. Мутация снижает функциональную активность регуляторной субъединицы ПКА, что также приводит к повышению секреции кортизола и развитию опухолей [31].

При образовании химерного белка DNAJB1-PRKACA в ФЛК не происходит изменения активности ПКА, слитный белок полностью сохраняет способность к фосфорилированию [29, 32, 8]. Согласно данным транскриптомного секвенирования, уровень экспрессии химерного транскрипта в ФЛК значительно превышает уровень экспрессии неповрежденного PRKACA, поскольку при транслокации ген PRKACA попадает под контроль более сильного промотора гена DNAJB1 [8]. В отличие от мутированного варианта PRKACA (L205R), возникающего при гиперкортицизме, химерный белок DNAJB1-PRKACA в ФЛК не утрачивает способность связываться с регуляторной субъединицей и отвечать на стимуляцию цАМФ [29, 32]. Экзогенная экспрессия химерного гена в клеточных линиях ГЦР приводит к повышению скорости пролиферации и способности клеток образовывать колонии [33]. Делеция гомологичного делетируемому в ФЛК человека участка генома у мышей или экзогенная экспрессия химерного белка DNAJB1-PRKACA вызывают формирование опухолей печени с морфологическими и молекулярно-генетическими характеристиками, аналогичными ФЛК [34].

Таким образом, образующийся при ФЛК химерный белок DNAJB1-PRKACA обладает киназной активностью и выраженными онкогенными свойствами. Это свидетельствует о том, что данное генетическое нарушение является драйвером злокачественной трансформации при ФЛК.

Хромосомная перестройка DNAJB1-PRKACA – специфический маркер ФЛК

Слитный транскрипт DNAJB1-PRKACA специфичен для ФЛК и не выявляется в других типах опухолей печени или в стромальных клетках ФЛК [27, 35]

В работе Graham с соавторами при исследовании 106 образцов опухолей печени (26 образцов ФЛК, включая метастазы, 25 случаев классического ГЦР, а также образцы гепатоцеллюлярной аденомы, холангиокарциномы, гепатобластомы) экспрессия DNAJB1-PRKACA в клинических образцах ФЛК была подтверждена тремя независимыми методами. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с праймерами к последовательностям 1 экзона гена DNAJB1 и 2 экзона гена PRKACA химерный транскрипт успешно выявлялся во всех случаях ФЛК, но не обнаруживался в других первичных опухолях печени и нормальных тканях. При анализе хромосомных перестроек методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на парафиновых срезах во всех образцах ФЛК гетерозиготная потеря участка гена PRKACA была выявлена в опухолевых, но не в стромальных клетках. В образцах скirrosного подтипа ГЦР, которые морфологически близки ФЛК и могут быть ошибочно диагностированы, хромосомных перестроек не наблюдалось. При РНК-гибридизации *in situ* на парафиновых срезах (RNA-ISH) с зондами к химерному транскрипту или нативному PRKACA экспрессия транскрипта DNAJB1-PRKACA выявлялась только в опухолевых клетках в образцах ФЛК. В нормальных гепатоцитах, лимфоцитах и клетках эндотелия наблюдалась экспрессия мРНК PRKACA [27]. Эти результаты демонстрируют высокую специфичность слитного транскрипта DNAJB1-PRKACA для клеток ФЛК и открывают возможность для использования описанных методов в дифференциальной диагностике ГЦР, в том числе с использованием гистологических препаратов.

При анализе данных полнотранскриптомного секвенирования из базы TCGA (The Cancer Genome Atlas) было проведено сравнение около 9100 образцов опухолей 30 различных этиологий и также подтверждена специфичность химерного транскрипта DNAJB1-PRKACA для ФЛК [35].

Транскриптомные маркеры ФЛК

На основании анализа транскриптомных данных из базы TCGA была предложена сигнатура из 16 генов, с высокой степенью точности позволяющая дифференцировать ФЛК от других типов опухолей печени и стволовых клеток биллиарного дерева. Авторами было выявлено несколько длинных некодирующих РНК (lincRNA), дифференциально экспрессирующихся в ФЛК по сравнению с другими типами ГЦР и холангиокарциномой. Экспрессия одной из lincRNA, LINC00473, регулируется PKA и может служить маркером нарушений цАМФ-зависимой сигнализации в клетке. Гиперэкспрессия LINC00473 наблюдается при немелкоклеточном раке легкого и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом течения заболевания. В ФЛК уровень экспрессии LINC00473 также повышен.

Предполагается, что lincRNAs могут быть вовлечены в патогенез ФЛК [35].

В фиброламеллярной карциноме практически не встречаются мутации или метилирование гена p53 [36], однако при транскриптомном анализе ФЛК выявлены нарушения p53-зависимой регуляции экспрессии генов. Sorenson с соавторами было описано повышение уровня экспрессии 17 генов, репрессируемых p53, что указывает на инактивацию или снижение активности p53 в ФЛК [37]. Некоторые из гиперэкспрессированных в ФЛК p53-зависимых генов, такие как CDC20 и AURKA, могут рассматриваться как потенциальные мишени для направленной терапии. При исследовании хромосомных перестроек в геноме 26 пациентов были обнаружены делеции в генах, кодирующих микро-РНК, подавляющих экспрессию гена IGF2BP1 (белок, связывающий мРНК инсулиноподобного фактора роста 2, 1), что может приводить к многократному увеличению экспрессии продукта этого гена. Белок IGF2BP1 регулирует трансляцию IGF2 и известен как проопухолевый фактор, гиперэкспрессия которого оказывает антиапоптотический эффект в клетках ГЦР, опухолей поджелудочной железы, молочной железы и колоректального рака [37].

Опухоли, отличающиеся профилем экспрессии генов, могут по-разному отвечать на терапию или иметь разный прогноз течения заболевания. Для ФЛК было предложено несколько вариантов классификаций на подтипы с различными паттернами экспрессии генов.

В 2014 г. Malouf и соавторы описали два подтипа ФЛК: истинный и смешанный. На основании данных транскриптомного профилирования с использованием микрочипов авторы установили, что в истинных ФЛК значительно гиперэкспрессированы такие гены, как PCSK1 (прогормон конвертаза 1), DNER (Delta And Notch-Like Epidermal Growth Factor-Related Receptor, активатор NOTCH1 сигнального каскада), NTS (нейротензин) и CALCA (Calcitonin Related Polypeptide Alpha), продукты которых являются маркерами нейроэндокринной дифференцировки [38].

В 2015 г. Cornella и соавторы провели мутационный анализ и транскриптомное профилирование клинических образцов ФЛК и описали уникальный генетический профиль ФЛК. Суммируя опубликованные ранее данные об экспрессии генов в ФЛК и собственные результаты, авторы выделили 3 молекулярных подкласса этого подтипа опухолей:

1. Пролиферирующий подкласс (51% ФЛК) – опухоли, в которых нарушена экспрессия генов, регулирующих пролиферацию и mTOR-зависимую сигнализацию.
2. Воспалительный подкласс (26% ФЛК) – в опухолях нарушена экспрессия генов, отвечающих за воспаление и продукцию цитокинов;
3. Неаннотированный подкласс (23% ФЛК) – сигнатура экспрессии генов, ранее не описанная для опухолей печени.

Паттерн экспрессии нейроэндокринных маркеров, описанный Malouf и соавторами, характерен для всех трех подклассов.

В этой работе образование химерного транскрипта DNAJB1-PRKCA было подтверждено в 80% случаев ФЛК. При мутационном анализе в ФЛК не было выявлено нарушений в генах TP53, CTNNB1, ARID1A, EGFR, BRAF, KRAS, IDH1, IDH2, наиболее характерных для опухолей печени; частота других хромосомных aberrаций также оказалась довольно низкой. Исключение составил ген BRCA2, мутации в котором описаны у 4,2% пациентов с ФЛК [39].

Факторы прогноза и мишени для направленной терапии ФЛК

ФЛК, как и классический ГЦР, характеризуются высокой устойчивостью к действию традиционных химиотерапевтических препаратов, поэтому основные надежды в развитии методов терапии этого типа опухолей связывают с таргетными препаратами.

Поскольку разделение ФЛК на три молекулярных подкласса не выявило значимой взаимосвязи между набором дифференциально экспрессирующихся генов и выживаемостью пациентов с ФЛК, Cornella и соавторы предложили использовать в качестве фактора прогноза после хирургического лечения сигнатуру из 8 генов (PEAR1, KRTAP, KLRD1, OSBPL8, RPL32, SLC26A11, RGS11 и RAPGEF1). Суммарный уровень экспрессии предложенных генов может быть преобразован в количественную величину (Mortality index, Индекс смертности), которая повышается пропорционально риску летального исхода в первые 12 месяцев после резекции опухоли. Кроме того, основываясь на данных о гиперактивации сигнального пути mTOR и повышении уровня экспрессии гена EGFR, авторы рассматривают возможность использования для таргетной терапии ФЛК ингибиторы mTOR-зависимой сигнализации (эверолимус, темсиролиму), а также ингибиторы рецепторов EGF (гефитиниб, цетуксимаб). К сожалению, результаты клинического исследования NCT 01642186 продемонстрировали отсутствие эффективности эверолимуса при лечении больных с неоперабельной формой ФЛК [40]. Стоит отметить, что в небольшом проценте ФЛК выявлены мутации в гене BRCA2, продукт которого вовлечен в репарацию повреждений ДНК. В настоящее время для лечения опухолей яичников и молочной железы с мутациями в гене BRCA2 используют таргетную терапию с помощью PARP-ингибиторов, блокируя единственный путь репарации ДНК и индуцируя апоптоз в опухолевых клетках. Авторы предлагают рассмотреть возможность терапии ФЛК с мутациями в BRCA2 с помощью PARP-ингибиторов [39].

Специфический для ФЛК и выявляемый в подавляющем большинстве случаев продукт слитного гена DNAJB1-PRKCA, обладающий киназной активностью и отсутствующий в нормальных клетках, рассматривается большинством авторов как перспективная мишень для создания таргетного препарата для терапии ФЛК.

К настоящему времени данных о разработке и испытаниях такого ингибитора в литературе не представлено, однако успешный опыт создания и эффективного использования специфических киназных ингибиторов для терапии лейкозов и опухолей легкого, а также разработка клеточных и *in vivo* экспериментальных моделей ФЛК [26, 34] позволяет надеяться на появление такого препарата в недалеком будущем.

Заключение

Таким образом, результаты клинических, гистологических и молекулярно-генетических исследований позволяют выделить ФЛК в отдельный подтип гепатоцеллюлярного рака. ФЛК характеризуется не только особой морфологической структурой, но и уникальным спектром генетических нарушений, вовлеченных сигнальных каскадов, синтезом специфических маркеров. Эти характеристики, безусловно, влияют и на клинические особенности течения опухолевого процесса, и на выбор оптимальной тактики лечения.

Образование химерного гена DNAJB1-PRKCA является ранним событием гепатоканцерогенеза, приводящим к развитию ФЛК. Возможно, делеция происходит в стволовых клетках биллиарного дерева – предшественниках гепатоцитов. В результате этого формируется специфический профиль молекулярных нарушений опухоли, в котором сравнительно невысока доля других мутаций, но значительно изменен спектр экспрессии генов – подавлена активность опухолевого супрессора p53, гиперэкспрессированы гены, кодирующие маркеры нейроэндокринной дифференцировки, эффекторы ключевых про-опухолевых сигнальных каскадов RAS, MAPK, PI3K, EGFR, mTOR и регуляторы клеточного цикла. Слитный белок DNAJB1-PRKCA обладает полноценной киназной активностью и может вызывать значительные изменения в регуляции экспрессии генов, поскольку субстратами PKA являются, помимо прочего, различные транскрипционные факторы. Особый молекулярный профиль ФЛК определяет и другие свойства – морфологические особенности, устойчивость к терапии. Являясь ключевым драйвером развития опухоли, химерный белок DNAJB1-PRKCA может быть использован для дифференциальной диагностики ФЛК, поскольку высоко специфичен для конкретного типа опухолей и выявляется методами, рутинно адаптируемыми для клинической практики. Согласно данным опубликованных исследований [34, 35] и результатам, полученным в нашей лаборатории, выявление слитного транскрипта позволяет повысить точность дифференциальной диагностики ФЛК в архивных образцах, по данным морфологического анализа ранее не отнесенных к этой категории опухолей. Представляется перспективным исследование экспрессии микроРНК и длинных некодирующих РНК, поскольку эти

молекулы играют важную роль во многих биологических процессах, в том числе при опухолевой трансформации. Можно ожидать, что дальнейшее изучение свойств слитного белка DNAJB1-PRKCA и анализ роли связанных с ним

путей внутриклеточной сигнализации в патогенезе ФЛК позволит разработать специфический таргетный препарат или эффективные терапевтические комбинации для лечения этой формы злокачественных новообразований.

Информация об авторах:

Дарья А. Шавочкина, к. б. н., научный сотрудник лаборатории механизмов прогрессии эпителиальных опухолей отдела иммунохимии НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, e-mail: darya.shavochkina@gmail.com

Инна Ф. Кустова, к. б. н., научный сотрудник лаборатории иммунохимии отдела иммунохимии НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, e-mail: innaku74@gmail.com

Наталья Л. Лазаревич, д. б. н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, e-mail: lazarevich.nl@gmail.com

DOI:10.18027 / 2224-5057-2017-7-3-71-80

For citation: Shavochkina D. A., Kustova I. F., Lazarevich N. L. Fibrolamellar carcinoma as a distinct subtype of hepatocellular carcinoma: molecular genetics features, diagnostics and treatment prospects. Malignant Tumours 2017; 3: 71–80. (In Russ.)

Fibrolamellar carcinoma as a distinct subtype of hepatocellular carcinoma: molecular genetics features, diagnostics and treatment prospects

D. A. Shavochkina¹, I. F. Kustova¹, N. L. Lazarevich^{1,2}

¹ Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin NMRCO, Ministry of Health of the Russian Federation

² Department of Biology, Moscow State University

Abstract: Fibrolamellar carcinoma (FLC) was described in 1956 as a separate subtype of hepatocellular carcinoma (HCC) that affects young adults without underlying liver diseases. Morphologically FLC is characterized as HCC with large cells, gross nucleus and fibrous collagen bands organized into branched net. The mechanisms of FLC development in the absence of major risk factors remained obscured for a considerable amount of time.

High-throughput transcriptomic analysis allowed to describe the unique profile of gene expression in FLC and to define the main signaling pathways activated in tumor cells which include mTOR, FGFR и EGFR cascades which can be accounted as potential therapeutic targets for this type of tumors.

Whole transcriptome sequencing allowed to identify in the majority of FLC samples the new chimeric transcript DNAJB1-PRKACA which appears due to deletion of the part of chromosome 19 which leads to fusion of two genes. This translocation appears to be driving event in FLC development that governs increase of proliferation, colony formation and tumor stem cells population. Fusion transcript is specific for FLC and can be identified through the number of clinical laboratory methods. It opens the opportunity for use of that fusion in differential diagnostics as FLC marker. Due to kinase activity of DNAJB1-PRKACA protein, it is considered to be prospective target for the development of therapeutic compounds which can inhibit this function. Analysis of transcriptome aberrations in FLC allowed to specify the prognostic signature of 8 genes whose overexpression correlates with poor patient survival after the surgery. In this review we have summarized recent data on FLC molecular pathogenesis and possibilities for the development of new methods for diagnosis and treatment based on these findings.

Keywords: Fibrolamellar Carcinoma, Hepatocellular Carcinoma, fusion genes

Information about the authors

Darya A. Shavochkina, PhD, Researcher, Department of Immunochemistry, Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin NMRCO, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: darya.shavochkina@gmail.com

Inna F. Kustova, PhD, Researcher, Department of Immunochemistry, Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin NMRCO, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: innaku74@gmail.com

Natalia L. Lazarevich, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Immunochemistry, Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin NMRCO, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: lazarevich.nl@gmail.com

Литература • References

1. Llovet J. M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. et al. Hepatocellular carcinoma, *Nature Reviews Disease Primers*, 2016, Vol. 2, p. 16018.
2. Лазаревич Н. Л., Кривцова О. М., Сквородникова П. А. Молекулярно-генетические особенности клинического прогноза ГЦР // Злокачественные опухоли. 2016. Т. 4 (1), С. 40–45. [Lazarevich N. L., Krivtsova O. M., Skovorodnikova P. A. Molekulyarno-geneticheskie osobennosti klinicheskogo prognoza GTsR, *Zlokachestvennyye opukholi*, 2016, Vol. 4 (1), pp. 40–45 (In Russ.)].
3. Zucman-Rossi J., Villanueva A., Nault J.-C., Llovet J. M. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology*, 2015, Vol. 149 (5), pp. 1226–1239.
4. Lee J. S., Heo J., Libbrecht L. et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells, *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12 (4), pp. 410–416.
5. Hoshida Y., Nijman S. M., Kobayashi M. et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69 (18), pp. 7385–7392.
6. Edmondson H. A. Differential diagnosis of tumors and tumor-like lesions of the liver in infancy and childhood, *Am. J. Dis. Child.*, 1956, Vol. 91, pp. 168–186.
7. Torbenson M. S. Review of the Clinicopathologic Features of Fibrolamellar Carcinoma, *Adv. Anat. Pathol.*, 2007, Vol. 14, pp. 217–223.
8. Honeyman J. N., Simon E. P., Robine N. et al. Detection of a Recurrent DNAJB1-PRKACA Chimeric Transcript in Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma, *Science*, 2014, Vol. 343, p. 1010.
9. Sergi C. M. Hepatocellular Carcinoma, Fibrolamellar Variant: Diagnostic Pathologic Criteria and Molecular Pathology Update, A Primer, *Diagnostics*, 2015, Vol. 6 (1), pii: E3.
10. Torbenson M. S. Morphologic Subtypes of Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterol. Clin. N. Am.*, 2017, Vol. 46, pp. 365–391.
11. Serg C. M. Fibrolamellar Carcinoma: A Distinct Variant of Hepatocellular Carcinoma That Is Still Surrounded by Unveils Mysteries, *J. Cancer Ther.*, 2014, Vol. 5, pp. 1325–1331.
12. Ward S. C., Huang J., Tickoo S. K. et al. Fibrolamellar carcinoma of the liver exhibits immunohistochemical evidence of both hepatocyte and bile duct differentiation, *Mod. Pathol.*, 2010, Vol. 23, pp. 1180–1190.
13. Abelev G. I., Eraiser T. L. Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors, *Semin. Cancer Biol.*, 1999, Vol. 9 (2), pp. 95–107.
14. Torbenson M. Fibrolamellar carcinoma: 2012 update, *Scientifica (Cairo)*, 2012, Vol. 2012, 743790.
15. de Boer C. J., van Krieken J. H. J. M., Janssen-van Rhijn C. M., Litvinov S. V. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver, *J. Pathol.*, 1999, Vol. 188, pp. 201–206.
16. Gires O. EpCAM in hepatocytes and their progenitors, *J. Hepatol.*, 2012, Vol. 56 (2), pp. 490–492.
17. Graham R. P., Torbenson M. S. Fibrolamellar carcinoma: A histologically unique tumor with unique molecular findings, *Semin. Diagn. Pathol.*, 2017, Vol. 34 (2), pp. 146–152.
18. Eggert T., McGlynn K. A., Duffy A. et al. Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in the USA, 2000–2010: A detailed report on frequency, treatment and outcome based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *United European Gastroenterol. J.*, 2013, Vol. 1 (5), pp. 351–357.
19. Mayo S. C., Mavros M. N., Nathan H. et al. Treatment and prognosis of patients with fibrolamellar hepatocellular carcinoma: a national perspective. *J. Am. Coll. Surg.*, 2014, Vol. 218 (2), pp. 196–205.
20. Kannangai R., Vivekanandan P., Martinez-Murillo F., Choti M., Torbenson M. Fibrolamellar carcinomas show overexpression of genes in the RAS, MAPK, PIK3, and xenobiotic degradation pathways, *Hum. Pathol.*, 2007, Vol. 38 (4), pp. 639–644.

21. Buckley A. F., Burgart L. J., Kakar S. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in fibrolamellar hepatocellular carcinoma, *Hum. Pathol.*, 2006, Vol. 37, pp. 410–414.
22. Andrechek E. R. HER2/Neu tumorigenesis and metastasis is regulated by E2F activator transcription factors, *Oncogene*, 2015, Vol. 34 (2), pp. 217–225.
23. Oeggerli M., Schraml P., Ruiz C. et al. E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer, *Oncogene*, 2006, Vol. 25 (49), pp. 6538–6543.
24. Riehle K. J., Yeh M. M., Yu J. J. et al. mTORC1 and FGFR1 signaling in fibrolamellar hepatocellular carcinoma, *Mod. Pathol.*, 2015, Vol. 28, pp. 103–110.
25. Simon E. P., Freije C. A., Farbe B. A. et al. Transcriptomic characterization of fibrolamellar hepatocellular carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015, Vol. 112 (44), E5916–E5925.
26. Oikawa T., Wauthier E., Dinh T. A. et al. Model of fibrolamellar hepatocellular carcinomas reveals striking enrichment in cancer stem cells, *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, p. 8070.
27. Graham R. P., Jin L., Knutson D. L. et al. DNAJB1-PRKACA is specific for fibrolamellar carcinoma, *Modern Pathology*, 2015, Vol. 28 (6), pp. 822–829.
28. Kim C., Xuong N. H., Taylor S. S. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1alpha) subunits of PKA, *Science*, 2005, Vol. 307 (5710), pp. 690–696.
29. Cheung J., Ginter C., Cassidy M. et al. Structural insights into mis-regulation of protein kinase A in human tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015, Vol. 112 (5), pp. 1374–1379.
30. Cao Y., He M., Gao Z. et al. Activating hotspot L205R mutation in PRKACA and adrenal Cushing's syndrome, *Science*, 2014, Vol. 344 (6186), pp. 913–917.
31. Kirschner L. S., Carney J. A., Pack S. D. et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex, *Nat. Genet.*, 2000, Vol. 26, pp. 89–92.
32. Riggle K. M., Riehle K. J., Kenerson H. L. et al. Enhanced cAMP-stimulated protein kinase A activity in human fibrolamellar hepatocellular carcinoma, *Pediatr. Res.*, 2016, Vol. 80 (1), pp. 110–118.
33. Xu L., Hazard F. K., Zmoos A. F. et al. Genomic analysis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma, *Hum. Mol. Genet.*, 2014, pii: ddu418.
34. Kastenhuber E. R., Lalazar G., Tschaharganeh D. F. et al. DNAJB1-PRKACA fusion kinase drives tumorigenesis and interacts with β -catenin and the liver regenerative response, 2017, bioRxiv 192104, <http://dx.doi.org/10.1101/192104>.
35. Dinh T. A., Vitucci E. C., Wauthier E. et al. Comprehensive analysis of The Cancer Genome Atlas reveals a unique gene and non-coding RNA signature of fibrolamellar carcinoma, *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 44653.
36. Torbenson M., Kannangai R., Abraham S. et al. Concurrent evaluation of p53, beta-catenin, and alpha-fetoprotein expression in human hepatocellular carcinoma, *Am. J. Clin. Pathol.*, 2004, Vol. 122 (3), pp. 377–382.
37. Sorenson E. C., Khanin R., Bamboat Z. M. et al. Genome and transcriptome profiling of fibrolamellar hepatocellular carcinoma demonstrates p53 and IGF2BP1 dysregulation, *PLoS One*, 2017, Vol. 12 (5), e0176562.
38. Malouf G. G., Job S., Paradis V. et al. Transcriptional profiling of pure fibrolamellar hepatocellular carcinoma reveals an endocrine signature, *Hepatology*, 2014, Vol. 59 (6), pp. 2228–2237.
39. Cornella H., Alsinet C., Sayols S. et al. Unique genomic profile of fibrolamellar hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 2015, Vol. 148 (4), 806–818. e10.
40. Abou-Alfa G. K., Mayer R. J., Cosgrove D. et al. Randomized phase II study of everolimus (E), leuprolide + letrozole (LL), and E + LL (ELL) in patients (pts) with unresectable fibrolamellar carcinoma (FLC), *Journal of Clinical Oncology*, 2015, Vol. 33, 15, suppl, e15149-e15149.