Исследовательская статья

CrossMark

EASL JOURNAL OF HEPATOLOGY

Смешанный гепатохолангиоцеллюлярный рак: молекулярные особенности

Agrin Moeini[1,2], Daniela Sia[2], Zhongyang Zhang[3,4], Genis Camprecios[2], Ashley Stueck[2], Hui Dong[1], Robert Montal[1], Laura Torrens[1], Iris Martinez-Quetglas[1], M. Isabel Fiel[2], Ke Hao[3,4], Augusto Villanueva[2], Swan N. Thung[2], Myron E. Schwartz[2], Josep M. Llovet[1,2,5,*]

[1] Liver Cancer Translational Research Laboratory, Liver Unit, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic, CIBERehd, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; [2] Mount Sinai Liver Cancer Program, (Divisions of Liver Diseases, Hematology and Medical Oncology, Department of Pathology, Recanati Miller Transplantation Institute), Tisch Cancer Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA; [3] Department of Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA; [4] Icahn Institute for Genomics and Multiscale Biology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA; [5] Institucio Catalana de Recerca i Estudis Avancats, Barcelona, Catalonia, Spain

Актуальность и цели. Смешанный гепатохолангиоцеллюлярный рак (ГХЦР) — редкий и малоизученный тип первичного рака печени. Мы провели комплексную молекулярную оценку этого злокачественного новообразования.

Методы. Были определены профиль генной экспрессии, количество копий ДНК, секвенирование экзома с использованием фиксированных в формалине образцов, полученных от 18 пациентов со смешанным ГХЦР, что охватывает весь гистологический спектр заболевания. Также мы провели сравнительный геномный анализ, используя независимый набор образцов гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) (n = 164) и внутрипеченочной холангиокарциномы (ВПХК) (n = 149).

Результаты. Интеграционный геномный анализ ГХЦР выявил, что холангиоцеллюлярный рак (ХЦР) представляет особое образование, происходящее из клеток желчных путей, отличающееся от опухолей из стволовых клеток и опухолей классического типа. Опухоли ХЦР были положительны на нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM) (6 из 6 *vs* 1 из 12; $p < 0{,}001$), отличались хромосомной стабильностью (хромосомные аберрации в среднем 5,7 *vs* 14,1; $p = 0{,}008$), демонстрировали значительную активацию сигнального пути трансформирующего фактора роста (TGF) β и обогащение сигнатурами, связанными с воспалением и иммунным ответом ($p < 0{,}001$). Опухоли из стволовых клеток характеризовались позитивностью на фактор транскрипции SALL4 (6 из 8 *vs* 0 из 10; $p < 0{,}001$), обогащением сигнатурами опухолей из клеток-предшественниц, активацией специфических онкогенных путей (MYC и IGF) и сигнатур, связанных с неблагоприятным клиническим исходом. При классическом типе отмечена значительная корреляция в вариациях количества копий компонентов ВПХК и ГЦР, что предполагает клональное происхождение. Секвенирование экзома выявило в среднем 63 несинонимичных мутации на опухоль (2 средних драйверных мутации на опухоль). При этом наибольшему количеству мутаций подвергался ген *TP53* (6 из 21; 29 %) в опухолях ГХЦР.

Выводы. Смешанный ГХЦР представляет собой гетерогенную группу опухолей, включающую тип из стволовых клеток, для которого характерен неблагоприятный прогноз, и классический тип с общим происхождением с компонентами ГЦР и ВПХК. ХЦР стоит особняком как отдельная опухоль, происходящая из желчных путей и связанная с хромосомной стабильностью и активным сигнализированием TGF-β.

Резюме. Молекулярный анализ смешанного ГХЦР показал, что ХЦР — особый тип опухоли, происходящий из желчных путей. Она не имеет ни одного признака ГЦР.

Ключевые слова: рак печени, молекулярный подкласс, клетки-предшественницы, сигнальный путь TGF-β.

Получено 29 сентября 2016 г.; получено с поправками 21 декабря 2016 г.; принято в печать 8 января 2017 г.; доступно онлайн с 23 января 2017 г.

* Автор, ответственный за переписку. Адрес: Director, Mount Sinai Liver Cancer Program, Division of Liver Diseases, Tisch Cancer Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Madison Ave 1425, 11F-70, Box: 1123, New York, NY 10029, USA. Tel.: +1 212 6599503; fax: +1 212 849 2574.

E-mail: Josep.Llovet@mssm.edu (J.M. Llovet).

Сокращения: GSEA — анализ обогащения набора генов; CNV — вариации количества копий ДНК; EMT — переход от эпителиальных к мезенхимальным маркерам; IDH — изоцитрат дегидрогеназы; IFN — интерферон; IGF — инсулиноподобный фактор роста; IL — интерлейкин; NCAM — нейрональная молекула клеточной адгезии; SALL4 — подобный ломкому фактор транскрипции 4; TERT — обратная транскриптаза теломеразы; TGF — трансформирующий фактор роста; ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения; ВПХК — внутрипеченочная холангиокарцинома; ГЦР — гепатоцеллюлярный рак; ГХЦР — гепатохолангиоцеллюлярный рак; ХЦР — холангиоцеллюлярный рак.

Однако такой подтип смешанного ГХЦР, как опухоль из стволовых клеток, имеет агрессивный характер и плохие исходы, тогда как опухоли классического типа демонстрируют общее происхождение с компонентами как ГЦР, так и ВПХК. Патоморфологическую классификацию смешанного ГХЦР следует пересмотреть, т. к. появились новые молекулярные данные.
© 2017 European Association for the Study of the Liver.

Введение

Рак печени — вторая ведущая причина онкологической смертности; в мире ежегодно регистрируется более 850 000 новых случаев [1]. Смешанный гепатохолангиоцеллюлярный рак (ГХЦР) — редкий тип первичного рака печени, на который приходится менее 1 % всех первичных злокачественных новообразований печени [2, 3]. Диагноз основывается на гистологическом исследовании и требует тесной связи элементов гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) и внутрипеченочной холангиокарциномы (ВПХК) [2]. Ввиду редкой встречаемости и недостаточно изученных патоморфологических критериев морфологические и клинические особенности этих опухолей остаются неопределенными. Возраст пациентов, полоспецифическая заболеваемость и географическое распространение сходны с таковыми при ГЦР [2, 4, 5]; медиана общей выживаемости при ГХЦР сходна с таковой при ВПХК [3, 6–8]. На сегодня специфических рекомендаций по лечению ГХЦР нет и хирургическая резекция остается стандартом практики, когда возможно.

Гистологически смешанный ГХЦР — гетерогенная группа первичных опухолей печени. В классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2010 г. [2] они делятся на две больших категории: классический тип и тип с признаками опухоли из стволовых клеток. Классический тип характеризуется областями, типичными для ГЦР и ВПХК, с промежуточными участками, имеющими признаки обеих опухолей. Опухоли с признаками стволовых клеток делятся на типичные, промежуточные и холангиоцеллюлярный рак (ХЦР). Подтипы с признаками стволовых клеток состоят из опухолевых клеток с промежуточными гистологическими признаками между гепатоцитами и холангиоцитами. Кроме того, недавние исследования позволяют предположить наличие определенных свойств у каждого подтипа ГХЦР с признаками опухоли из стволовых клеток, учитывая их связь с различными клинико-патологическими факторами [9, 10].

В отличие от ГЦР или ВПХК характеристик всего генома смешанных опухолей ГХЦР нет. Действительно, неясно, коррелируют ли гистологические подтипы на молекулярном уровне. Определение профиля генной экспрессии в небольшой серии образцов ГХЦР позволило предположить, что ГХЦР может иметь общие характеристики с низкодифференцированными ГЦР и ВПХК с признаками опухолей из стволовых клеток [11–15]. Более того, сообщалось, что сигнальные пути WNT/β-катенин и TGF-β значительно активированы в смешанных ГХЦР по сравнению с ГЦР из клеток-предшественниц [13]. Мутационный анализ предположил общие повторяющиеся драйверные мутации в ГЦР и ГХЦР в отличие от ВПХК, такие как бóльшая частота промоторных мутаций обратной транскриптазы теломеразы (TERT) и меньшая частота мутаций KRAS и мутаций изоцитрат дегидрогеназы (IDH1/2) [14]. Однако аллелотипический анализ всего генома классической ГХЦР позволил предположить более тесную геномную близость к ВПХК, чем к ГЦР [16].

В настоящем исследовании приводится комплексная молекулярная характеристика смешанного ГХЦР, включая гистологические признаки, профиль экспрессии всего генома, полиморфизмы одиночных нуклеотидов и секвенирование всего генома. Также приводится интеграционный анализ для оценки геномного перекрытия с большим независимым набором образцов ГЦР и ВПХК. В целом интеграционный геномный анализ указывает на то, что ХЦР — отдельное образование с билиарным молекулярным профилем, низкой хромосомной стабильностью и активацией сигнального пути TGF-β и иммунных сигнальных путей. Другие смешанные опухоли могут быть разделены на два основных подкласса: подкласс из стволовых клеток, характеризующийся наличием маркера раннего предшественника (подобный ломкому фактору транскрипции 4 [SALL4]) и сигнатур более агрессивного фенотипа; классический подкласс с компонентами как ГЦР, так и ВПХК клонального происхождения. Таким образом, предлагается молекулярная классификация, охватывающая две группы внутри смешанной опухоли ГХЦР (из стволовых клеток и классической). Кроме того, данные позволяют предположить, что ХЦР стоит особняком как независимая опухоль из клеток желчных путей, не имеющая молекулярных признаков ГЦР.

Материалы и методы

Образцы тканей и извлечение нуклеиновых кислот

После одобрения исследования комитетом по биомедицинской этике проведен анализ данных 4728 пациентов, которые подвергались операциям по поводу первичного рака печени в 1994–2013 гг. в Школе медицины Икана в Маунт Синай (ГЦР 4307, 91 %; ВПХК 360, 7,7 %; смешанный ГХЦР 61, 1,3 %). Из 61 случая смешанного ГХЦР 43 были исключены вследствие: 1) предшествующего применения местной терапии (такой, как чрезартериальная химиоэмболизация); 2) недоступности образцов; 3) низкой жизнеспособности опухолевых клеток. Диагноз смешанного ГХЦР был подтвержден двумя экспертами-гепатопатологами (MIF и ST). Окончательная группа из 18 пациентов с фиксированными в парафине образцами и клиническими данными была отобрана и разделена на категории согласно последней классификации ВОЗ [2]: классические опухоли (n = 4) и опухоли из стволовых клеток (n = 14). Подгруппа опухолей из стволовых клеток включала типичную (n = 2), промежуточную (n = 6) формы рака и ХЦР (n = 6). Для получения молекулярного профиля классических смешанных опухолей была извлечена ДНК отдельно из компонентов, сходных по типу с ГЦР или с холангиокарциномой (4 пациента, 8 образцов опухолей в целом). В табл. 1 приведены основные клинико-патологические характеристики 18 пациентов, участвовавших в исследовании. Для интеграционного геномного анализа использовались молекулярные данные, ранее опубликованные нашей группой для ГЦР (n = 164) и ВПХК (n = 149) [17, 18]. Для выявления драйверных мутаций в подтипе опухолей из стволовых клеток хранилищем биоматериалов Маунт Синай (после одобрения комитета по этике) были предоставлены свежезамороженные зафиксированные опухолевые ткани и соответствующие нормальные ткани (6 пар). Подробное описание извлечения нуклеиновых кислот приведено в разд. «Дополнительные материалы».

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики когорты со смешанным ГХЦР в соответствии со смешанными молекулярными подклассами

Переменная	Всего	ХЦР	Из стволовых клеток	Классический	*p*
Пациенты, *n*	18	6	8	4	
Пол, *n*					0,376
Мужчины	14	5	7	2	
Женщины	4	1	1	2	
Возраст, лет					0,976
Медиана (диапазон)	55 (15–82)	56 (15–82)	57 (33–71)	54 (49–66)	
Этиология, *n*					0,599
Гепатит С	8	4	3	1	
Гепатит В	7	1	4	2	
ПСХ	1	0	0	1	
Другая	1	1	0	0	
Нет	1	0	1	0	
Цирроз, *n*					0,235
Отсутствует	8	1	5	2	
Присутствует	10	5	3	2	
Размер опухоли, см					0,225
Медиана (диапазон)	3,2 (0,5–13,5)	1,5 (0,5–8)	3,1 (1,0–13,5)	6,3 (2,5–9)	
Сателлитные опухоли, *n*					0,235
Отсутствуют	10	5	3	2	
Присутствуют	8	1	5	2	
Микрососудистая инвазия, *n*					0,559
Отсутствует	3	2	1	0	
Присутствует	15	4	7	4	
Макрососудистая инвазия, *n*					0,275
Отсутствует	15	4	8	3	
Присутствует	3	2	0	1	
АФП, нг/мл[a]					0,953
Медиана (диапазон)	19 (1–1573)	33 (1–1573)	18 (4–842)	114 (5–223)	
CA19-9, МЕ/мл[a]					0,461
Медиана (диапазон)	186 (8–945)	124 (8–318)	244 (8–945)	440 (20–472)	
Альбумин, г/дл[b]					0,049[c]
Медиана (диапазон)	4,1 (3,3–4,8)	4,0 (3,7–4,3)	4,5 (3,3–4,8)	4,0 (3,4–4,1)	
Билирубин, мг/дл[b]					0,104
Медиана (диапазон)	0,6 (0,3–3,4)	0,9 (0,6–1,3)	0,5 (0,3–3,4)	0,5 (0,4–0,6)	

Подкласс из стволовых клеток включает гистологические признаки стволовых клеток типичного и промежуточного подтипов.
Значение *p* отвечает статистическому анализу трех молекулярных подклассов. Для категориальных переменных использовался точный критерий вероятности Фишера; для непрерывных — критерий Краскала—Уоллиса.
АФП — α-фетопротеин; ПСХ — первичный склерозирующий холангит.
[a] Недоступен у 5 пациентов.
[b] Недоступен у 1 пациента.
[c] $p < 0,05$.

Подробности, касающиеся иммуногистохимии, определения профиля генной экспрессии всего генома, анализа по всему геному изменений количества копий ДНК, секвенирования всего экзома и статистического анализа, также можно найти в разд. «Дополнительные материалы».

Результаты

ХЦР, опухоли из стволовых клеток и классический тип как отдельные типы новообразований

Чтобы понять, представляют ли различные гистологические подтипы смешанного ГХЦР отдельные подгруппы, мы провели неконтролируемый кластеринг на основе экспрессии генов. Неконтролируемый кластеринг выявил (рис. 1; см. дополнительный рис. 1) три отдельных кластерных группы: 1) опухоли ХЦР в кластере C ($p = 0,0013$); 2) опухоли с признаками стволовых клеток в кластере D ($p = 0,0062$); 3) классические опухоли в зависимости от их компонентов (компонент ГЦР в кластерах A и B; $p = 0,024$). Кроме того, компоненты классического подтипа, подобные ВПХК, образовывали общие кластеры либо с опухолями с признаками стволовых клеток, либо с ХЦР, что позволяет предположить наличие общих молекулярных черт (рис. 1, *A*). ХЦР отличался по молекулярному профилю от других опухолей с признаками стволовых клеток, что было подтверждено интеграци-

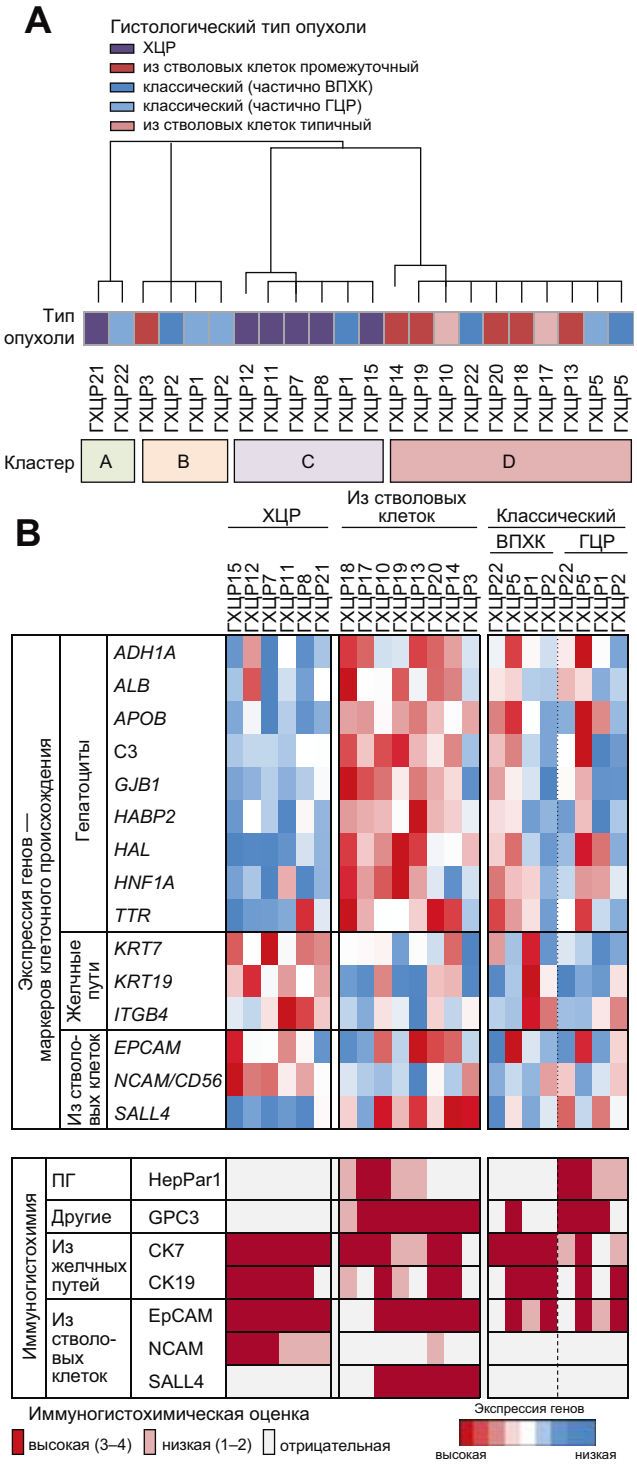

Рис. 1. Молекулярные классы смешанного ГХЦР и корреляция с гистопатологическими признаками. (*A*) Неотрицательный матриксный, основанный на факторизации кластеринг-анализ 22 образцов опухолей, полученных от 18 пациентов со смешанным ГХЦР. (*B*) Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию маркеров генного происхождения специфических клеток и данные иммунного окрашивания опухолей ГХЦР. Компоненты ВПХК и ГЦР классического подкласса анализировались отдельно.
ПГ — подобные гепатоцитам.

онным геномным анализом с независимым набором образцов с ГЦР (n = 164) и ВПХК (n = 149) (рис. 2). Опухоли ХЦР показали сильную тенденцию к образованию общих кластеров, что предполагает высокое геномное сходство среди них по сравнению с другими первичными опухолями печени (p < 0,001). Значительная геномная близость также наблюдалась у ГХЦР с признаками стволовых клеток (p < 0,001). Более того, опухоли ХЦР образовывали кластеры с ВПХК из класса пролиферации, тогда как смешанные опухоли с признаками стволовых клеток проявляли общие признаки с ГЦР из клеток-предшественниц (p < 0,001) (см. рис. 2). Анализ происхождения клеток со специфическими маркерными генами еще больше подкрепил наблюдение, что ХЦР может представлять отдельное образование. Это было показано экспрессией фенотипа желчных путей со значительной активацией специфичных для этих клеток генов (*KRT7*, *KRT19*, *ITGB4*) и деактивацией генов, связанных с гепатоцитами (*ADH1A*, *ALB*, *APOB*, *HNF1A*) (см. рис. 1) [19]. Эти данные согласовывались с профилем иммуногистохимического окрашивания (рис. 3; см. рис. 1), которое определяло опухоли ХЦР как отрицательные для маркера гепатоцитов HepPar1 (0 из 6 в ХЦР *vs* 10 из 12 в других; p = 0,015) (см. дополнительную табл. 1), но положительные для маркеров желчных путей (CK7, CK19) и, более специфично, для нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM; 6 из 6 в ХЦР *vs* 1 из 12 в других; p < 0,0001) (см. дополнительную табл. 1).

Молекулярный подкласс опухолей с признаками стволовых клеток характеризовался экспрессией маркеров как гепатоцитов, так и желчных путей (см. рис. 1, *B* и 3), а также маркера клеток раннего предшественника SALL4 (6 из 8 *vs* 0 из 10 в остальных смешанных опухолях; p = 0,0004) (см. дополнительную табл. 1). Напротив, компоненты классического подтипа, подобные ГЦР и ВПХК, демонстрировали бифенотипический профиль с одновременной экспрессией маркеров гепатоцитов и желчных путей (см. рис. 1, *B*), несмотря на их различные гистологические признаки (см. рис. 3). Сравнение экспрессии генов и оценок при иммуногистохимическом окрашивании показало существенную корреляцию по всем использованным маркерам (см. дополнительный рис. 2).

Специфический геномный профиль опухолей ХЦР был подтвержден анализом вариаций количества копий (CNV) ДНК, который выявил значительно более высокую хромосомную стабильность у ХЦР по сравнению с прочими опухолями (в среднем 5,7 изменения для ХЦР *vs* 14,1 для других; p = 0,008) (рис. 4). С другой стороны, классический подкласс и подкласс с признаками стволовых клеток показывали частые широкие хромосомные аберрации, прежде наблюдаемые для ГЦР и ВПХК. Сюда относились добавление 1q и 8q и потери 4q, 8p, 9q, 16q и 17p (см. рис. 4). Амплификации высокого уровня 11q13, несущие онкогены *CCND1* и *FGF19*, были обнаружены в 3 случаях смешанного ГХЦР (см. дополнительную табл. 2). Эти данные позволяют предположить, что смешанные опухоли ГХЦР могут быть классифицированы как два отдельных молекулярных подкласса (из стволовых клеток и классические). Опухоли ХЦР могут быть определены как отдельные образования с фенотипом желчных путей и без признаков ГЦР.

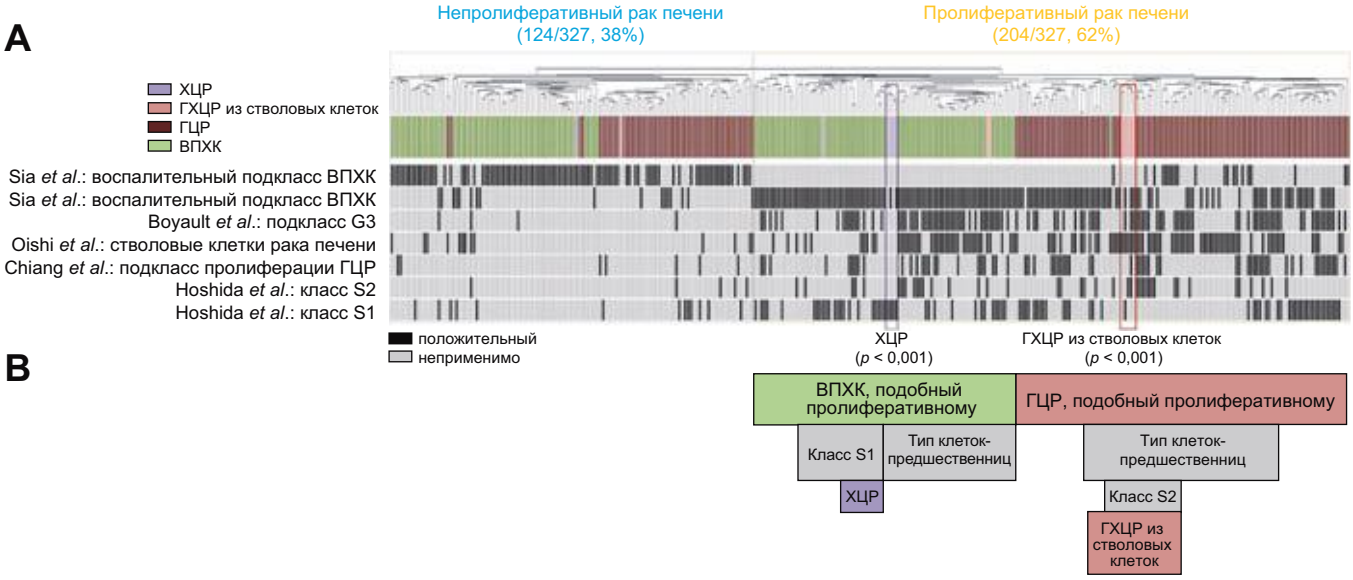

Рис. 2. Интеграционный геномный анализ ГХЦР с ГЦР и ВПХК. (*A*) Проведен неконтролируемый иерархический кластеринг-анализ генной экспрессии когорт ГХЦР (6 — подкласса ХЦР и 8 — из стволовых клеток), ГЦР (n = 164) и ВПХК (n = 149). Интеграция баз данных была основана на преобразовании Z-показателя дифференциально экспрессируемых генов в каждой независимой когорте. Использовался метод ближайшего прогнозирования для связи сигнатур генов, полученных из опухолей печени. (*B*) Схематическое представление перекрестных молекулярных профилей и геномной близости ХЦР и подкласса из стволовых клеток в смешанных опухолях с компонентами ВПХК и ГЦР соответственно на основе неконтролируемого кластеринг-анализа. Статистически значимая связь вычислялась с помощью точного критерия вероятности Фишера (p < 0,05).

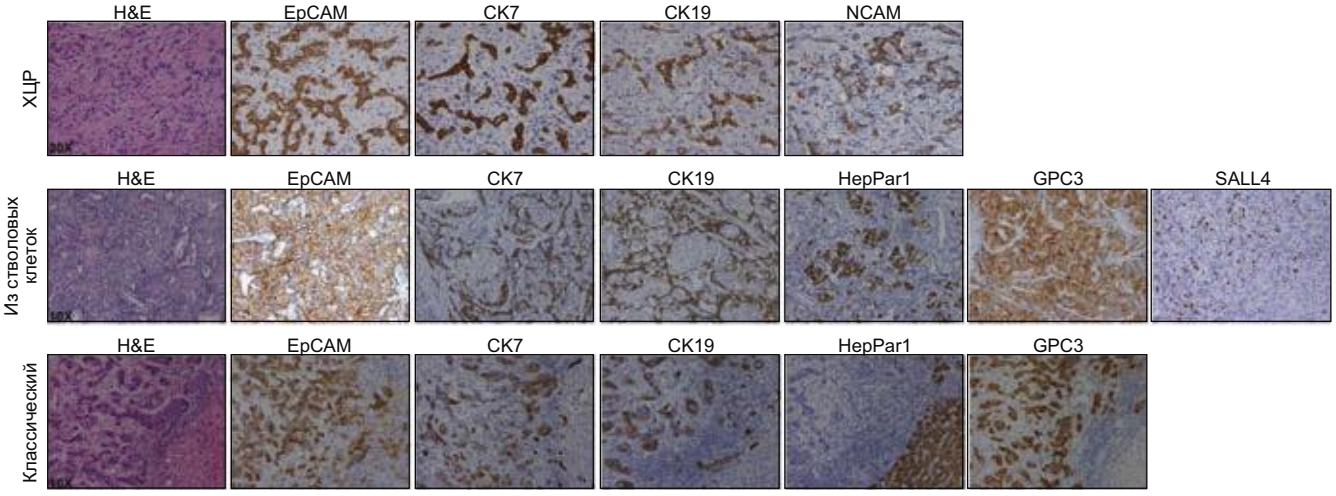

Рис. 3. Профиль иммунного окрашивания смешанных подклассов ГХЦР. Признаки репрезентативного морфологического и положительного иммуногистохимического окрашивания, наблюдаемые для каждого подкласса смешанного ГХЦР.

Подкласс ХЦР, характеризующийся активацией сигнальных путей TGF-β и путей иммунного ответа

При оценке ранее выявленных сигнатур прогностических генов при раке печени ХЦР продемонстрировал значительное обогащение подкласса S1 [20], характеризующееся сильной активацией TGF-β и поздней индуцированной сигнатурой TGF-β (рис. 5, *A*; см. дополнительную табл. 3) [21]. Более того, неконтролируемый иерархический кластеринг с независимым набором образцов ГЦР и ВПХК позволил предположить общий молекулярный профиль ХЦР и опухолей ВПХК из клеток-предшественниц (p < 0,001) (см. рис. 2). Кроме того, анализ обогащения набора генов (GSEA) канонических и характерных онкогенных путей показал, что подкласс ХЦР характеризовался активацией сигнального пути TGF-β, переходом от эпителиальных к мезенхимальным (EMT) маркерам и сигнальными путями, связанными с воспалением и иммунным ответом (TNF-α, IFN-γ, IL2/STAT5, IL6/STAT3, ответ Т-лимфоцитов) (см. дополнительную табл. 4). Имело место значитель-

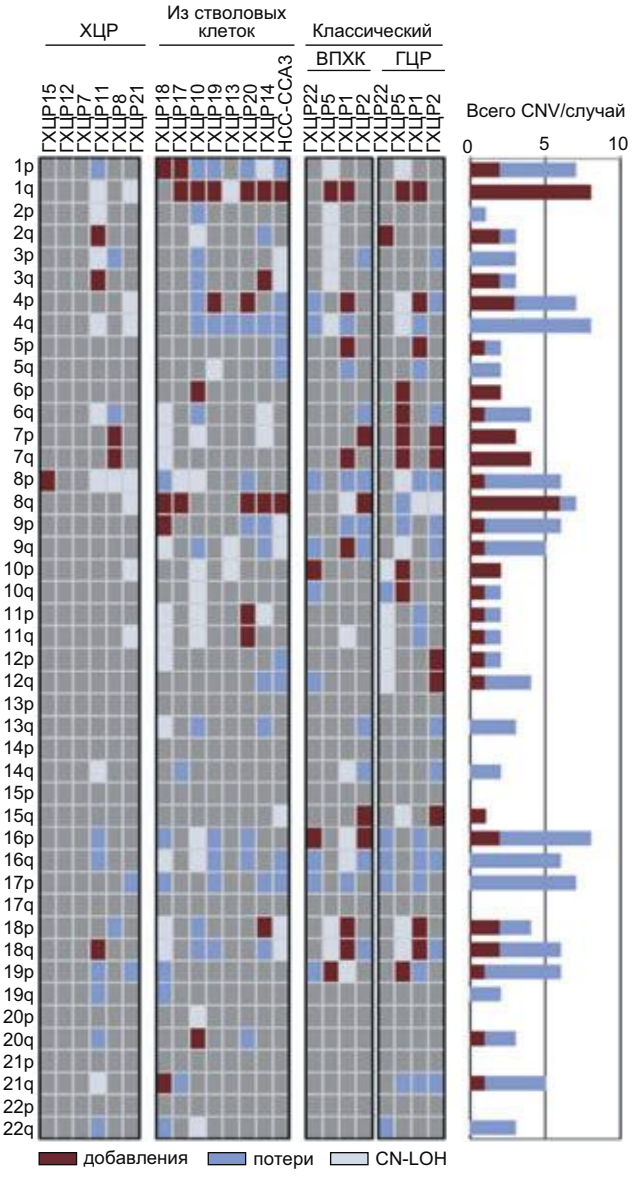

Рис. 4. Обширные хромосомные изменения, выявленные в подклассах смешанного ГХЦР. Хромосомные группы показаны в нисходящем порядке вдоль вертикальной оси. Выявленные обширные хромосомные добавления, потери и копии нейтральной потери гетерозиготности (CN-LOH) на образец опухоли выделены цветом. Компоненты ВПХК и ГЦР каждого классического случая анализировались отдельно. Столбики диаграммы означают общее количество обширных хромосомных добавлений и потерь. ХЦР продемонстрировал бóльшую хромосомную стабильность по сравнению с другими смешанными опухолями ГХЦР ($p < 0,01$, двусторонний t-критерий).

ное повышение числа иммунных клеток [22], включая Т-лимфоциты (эффекторные клетки памяти, CD8+ PD1), цитотоксических лимфоцитов, Т-хелперов 1-го типа, NK-лимфоцитов и нейтрофилов, также обнаруженных в ХЦР ($p < 0,05$) (см. рис. 5, *A*). В ХЦР были также значительно активированы специфические цитокины (*CXCL12, CCL2, CCL21*) и некоторые рецепторы цитокинов (*CXCR4, IL8RB, IL10RA, IL17RC*). Более того, анализ путей ведущих генов с нарушенной регуляцией в ХЦР (см. дополнительную табл. 5) показал, что TGF-β является основной активированной восходящей эффекторной молекулой в этих опухолях (Z-показатель > 2; $p < 0,0001$) (см. дополнительный рис. 5, *A*). Точнее, лиганд *TGFB2* был значительно активирован среди различных лигандов суперсемейства TGF-β (см. дополнительный рис. 3). Другие пути со значительно нарушенной регуляцией включали активацию *TP53* (см. дополнительный рис. 5, *A*), регуляцию контрольных точек ответа на повреждение ДНК и мутантное сигнализирование атаксии-телеангиэктазии (см. дополнительный рис. 5, *B*) соответственно. В целом TGF-β и сигнальные пути, связанные с провоспалительным ответом, были специфически активированы в ХЦР.

Подкласс с признаками стволовых клеток, связанный с фенотипом клеток-предшественниц и пролиферативными сигнальными путями

Проведена оценка доминирующих геномных признаков опухолей подкласса из стволовых клеток. GSEA положительных на SALL4 опухолей с признаками стволовых клеток показал признаки подтипов рака печени из клеток-предшественниц (стволовых клеток [12], CK19 [17], EpCAM [23]) и более агрессивного ГЦР (включая подкласс пролиферации ГЦР [24], подкласс G3 нарушения клеточного цикла [25], кластер низкой выживаемости A [26] и подкласс S2 [20]) вместе с активацией сигнального пути IGF1R [27] и NOTCH [28] (см. рис. 5, *A* и дополнительную табл. 3). Соответственно активация сигнальных путей MYC, mTORC и NOTCH была идентифицирована как основной признак, связанный с подклассом с признаками стволовых клеток (см. дополнительную табл. 6). Активация сигнального пути IGF2 была одним из ведущих нарушений сигнальных путей в этих опухолях (рис. 5, *C*; см. дополнительную табл. 7). Другой активированный ядерный узел в подклассе опухолей с признаками стволовых клеток включал гены, задействованные в клетках-предшественницах гепатоцитов (*PROX1*, *HNF1B*, *FOXA1*, *FOXA3*), что позволяет предположить более близкое гепатоцитам происхождение в отличие от билиарного фенотипа в ХЦР. Кроме того, в соответствии с экспрессией SALL4 полипотентная эмбриональная активация OCT4 была одним из ведущих активированных сигнальных путей (см. дополнительный рис. 6). В отношении профилирования CNV (см. рис. 4) наиболее частые хромосомные изменения, выявленные для ГЦР, показали тенденцию к обогащению в подклассе с признаками стволовых клеток, включая добавление 1q (6 из 8 *vs* 2 из 10), 8q (5 из 8 *vs* 1 из 10), потерю 1p (4 из 8 *vs* 1 из 10) и 4q (6 из 8 *vs* 2 из 10). Вместе взятые эти данные предполагают, что подкласс с признаками стволовых клеток имеет общие молекулярные черты с более агрессивными вариантами ГЦР из клеток-предшественниц.

Классический подкласс: компоненты ГЦР и ВПХК происходят из одного клона

Классический подкласс показал обогащение генными сигнатурами, характерными для подкласса ВПХК с небла-

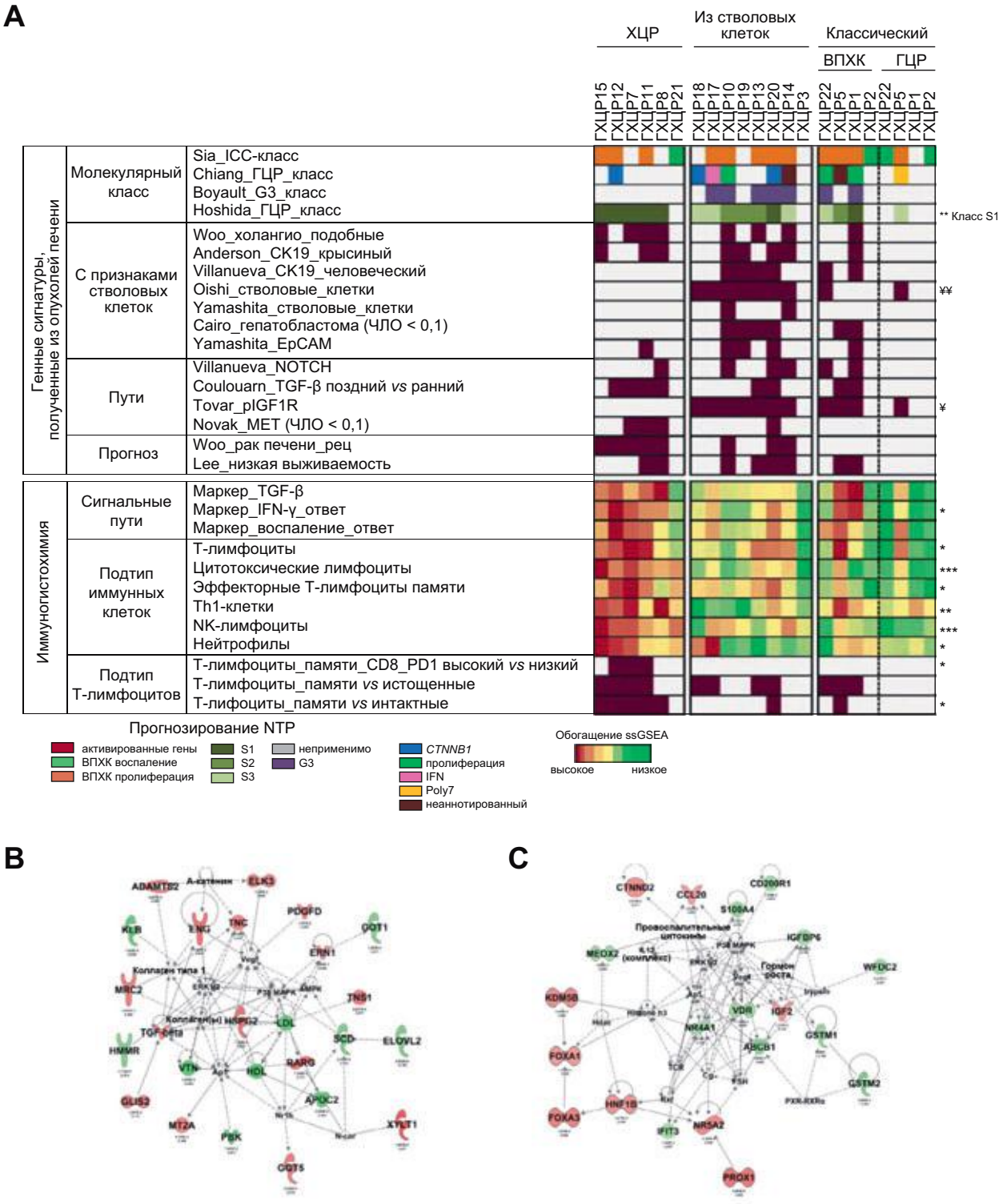

Рис. 5. Анализ генной экспрессии всего генома различных подклассов смешанного ГХЦР. (*A*) Тепловая карта, представляющая прогнозирование молекулярной классификации рака печени и генные сигнатуры (верхняя панель), иммуносвязанные генные сигнатуры для типов клеток и активированных сигнальных путей (нижняя панель). (*B*) Сетевой анализ генов с нарушением регуляции при ХЦР показал активацию путей TGF-β как один из основных активированных сигнальных узлов. (*C*) Сетевой анализ генов с нарушением регуляции в подклассе из стволовых клеток SALL4 показал активацию пути IGF2 и печеночную спецификацию клеток-предшественниц. При сетевом анализе узел символизирует ген или продукт гена, прямые или непрямые взаимодействия показаны сплошными и пунктирными линиями соответственно. Статистически значимые признаки ХЦР обозначены звездочкой (*) и в подклассе из стволовых клеток (¥), используя точный критерий вероятности Фишера для категориальных переменных и двусторонний *t*-критерий для непрерывных переменных. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Компоненты ВПХК и ГЦР каждого классического случая анализировались отдельно.
IFN — интерферон; NTP — прогнозирование ближайшего шаблона; ЧЛО — частота ложных обнаружений.

гоприятным прогнозом [29] и подкласса ГЦР с полисомией по хромосоме 7 [24]. Был проведен отдельный анализ классических компонентов ВПХК и ГЦР, обнаружено обогащение нескольких наборов генов в компоненте ВПХК. Однако ни один не достиг нашего предустановленного статистического порога для компонентов ГЦР (см. рис. 5, *A* и дополнительную табл. 3). Более того, классический компонент ВПХК, по-видимому, имел промежуточный молекулярный профиль между подклассами из стволовых клеток и ХЦР, т. к. показывал связь с сигнатурами опухолей из стволовых клеток (пролиферация ГЦР, G3, S2, кластер A, CK19, IGF1R) либо ХЦР (поздняя индуцированная сигнатура TGF-β). GSEA канонических сигнальных путей в компонентах ВПХК (см. дополнительную табл. 8) и ГЦР (см. дополнительную табл. 9) классических опухолей укрепил предположение о более агрессивном фенотипе компонента ВПХК. В ВПХК обнаружены активация сигнальных путей промитотической репликации ДНК, пролиферативные сигналы, такие как MYC и mTOR, и провоспалительные пути, такие как IFN-γ и нисходящие пути IL2/STAT5 (см. дополнительную табл. 8). Эти данные указывают на то, что компонент ВПХК классического подкласса может иметь более агрессивный молекулярный профиль внутри классических смешанных опухолей.

Анализ клональности на основе профиля CNV ГЦР-подобных и ВПХК-подобных компонентов классического ГХЦР показал значительную корреляцию (в среднем 51 %; $p < 0{,}001$) между обоими компонентами в 3 из 4 случаев (см. дополнительные рис. 7 и 8; дополнительную табл. 10). Точнее, очаговые хромосомные аберрации, несущие известные драйверные гены (добавление 11q13 и делецию 9p21), были выделены в обоих компонентах одного случая классического подтипа (см. дополнительную табл. 2 и дополнительный рис. 8). Эти данные означают, что компоненты ГЦР и ВПХК классического подтипа могут иметь общую клетку-предшественницу, которая впоследствии подвергается клональной дивергентной экспансии.

Мутационный профиль смешанного ГХЦР

Мутационный профиль смешанных опухолей ГХЦР (4 ХЦР и 2 из стволовых клеток, включая 3 перекрывающихся случая по данным анализа, описанного выше) был оценен с использованием секвенирования экзома. Соматические замены были представлены преимущественно G>A и C>T как в ХЦР, так и в опухолях из стволовых клеток (см. дополнительный рис. 9, *A*), как ранее сообщалось для ВПХК [30, 31], ГЦР [32, 33] и других опухолей [34]. В каждой смешанной опухоли ГХЦР было выявлено в среднем 63 несинонимичных мутации (диапазон 10–129) и 3 небольших вставки и делеции (инсерционно-делеционные, диапазон 1–5) (см. дополнительную табл. 11). Несинонимичные мутации включали 93 % миссенс-мутаций (в среднем 59 на опухоль, диапазон 9–115) и 7 % нонсенс-мутаций (в среднем 4 на опухоль, диапазон 1–14). В целом как ХЦР, так и опухоли из стволовых клеток содержали одинаковые доли миссенс-, нонсенс- и молчащих мутаций (рис. 6, *A*). Из несинонимичных мутаций 10 влияли на известные онкогены [35, 36] (в среднем 2 драйверных мутации на опухоль), что было подтверждено путем независимой полимеразной цепной реакции и секвенирования каждой опухоли (рис. 6, *B*; см. дополнительную табл. 12).

Мы более глубоко исследовали частоту мутаций «горячих точек», выявленных при секвенировании экзома в известных онкогенных драйверах (*BRAF*, *DNMT3A*, *IDH1*), наряду с повторяющимися мутациями, известными для ГЦР (промотор *TERT*, *CTNNB1*, *TP53*) и ВПХК (*KRAS*, *FGFR2-BICC1*, *FGFR2-PPHLN1*, *IDH2*). Наиболее частыми изменениями оказались мутации *TP53* (6/21, 29 %) независимо от подкласса (рис. 6, *C*). Мутационный профиль ХЦР включал *TP53* и *IDH1*, тогда как подкласс из стволовых клеток (промотор *TERT*, *TP53*, *AXIN1*, *BRAF*, *FGFR2-BICC1*), по-видимому, воспроизводил мутации, характерные и для ГЦР, и для ВПХК (см. рис. 6, *B* и *C*). Интересно, что наиболее частая драйверная мутация ГЦР — мутация промотора *TERT*, сочеталась с мутацией *TP53* в 2 случаях (1 — классический и 1 — из стволовых клеток, отрицательный на SALL4). Сочетанная встречаемость мутаций промотора *TERT* и *TP53* (см. рис. 6, *C*) в компонентах как ГЦР, так и ВПХК классического подкласса дополнительно поддерживала модель происхождения из единой клетки, предположенную по результатам CNV. Другие проверенные мутации (*CTNNB1*, *KRAS*, *FGFR2-PPHLN1* и *IDH2*) в нашей когорте отсутствовали. В заключение мутационный профиль ГХЦР выявил общие драйверы в типичном ГЦР и опухолях ВПХК. Однако подкласс ХЦР, по-видимому, имеет отдельный мутационный профиль по сравнению с подклассом из стволовых клеток.

Внешняя валидация отличий ХЦР и ГХЦР из стволовых клеток

Молекулярные подклассы были валидированы в общедоступной базе данных, включавшей 20 опухолей ГХЦР с описанными признаками ХЦР [13]. Основные молекулярные характеристики ХЦР, такие как его близость фенотипу желчных путей, активация TGF-β и иммунного ответа, были успешно воспроизведены (см. дополнительный рис. 10, *A*). Кроме того, 156 генных сигнатур, полученных из ХЦР (см. дополнительную табл. 13), были значительно обогащены примерно в 60 % (11 из 20) этих опухолей ХЦР. Картирование подкласса дополнительно подкрепило тот факт, что опухоли ХЦР могут иметь единственный фенотип, близкий холангиоцитарному, без признаков ГЦР (см. дополнительный рис. 10, *B*) [37]. Более того, ГХЦР из стволовых клеток имели молекулярные признаки ГЦР, но не ХЦР (см. дополнительный рис. 10, *B*), что предполагает линию дифференцировки гепатоцитов. Эти результаты подтверждают, что смешанные опухоли из стволовых клеток и ХЦР представляют отдельные молекулярные образования.

Обсуждение

ГХЦР — гетерогенная группа первичных опухолей печени. Текущая гистологическая классификация описывает два основных подтипа: классический и тип с признаками стволовых клеток. Наше исследование подтверждает би-

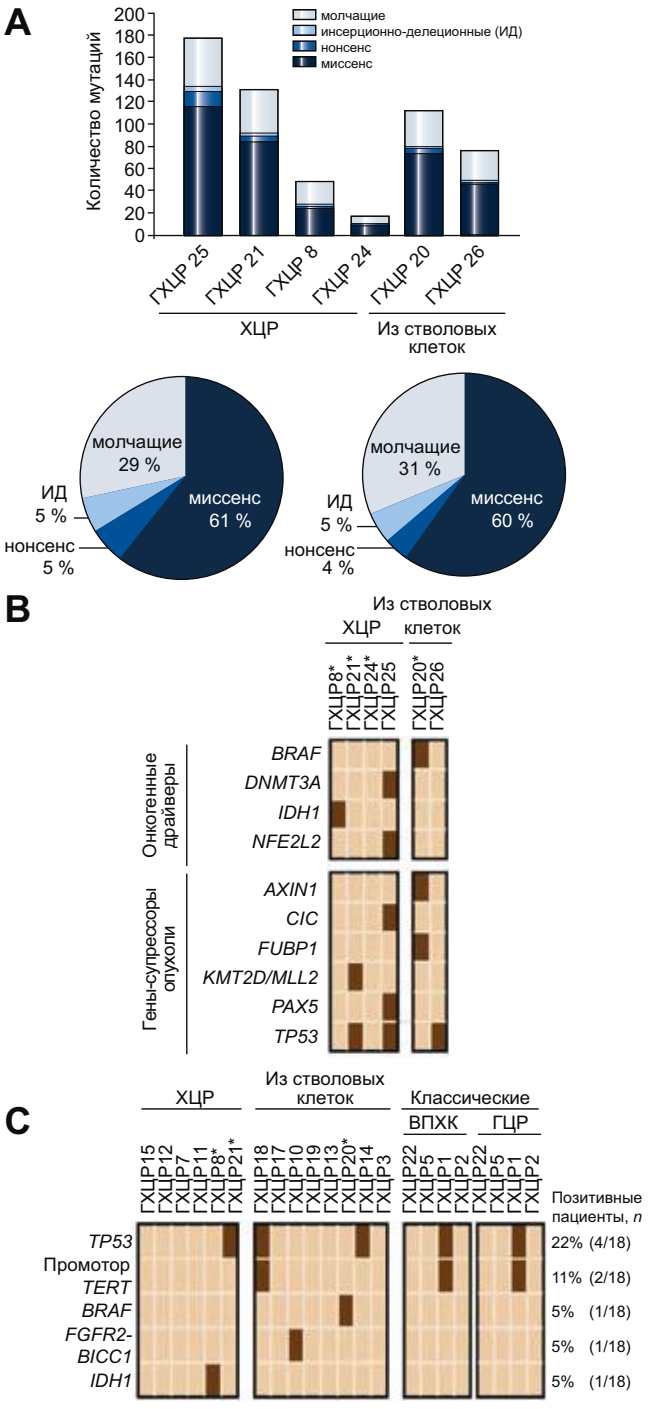

Рис. 6. Мутационный профиль смешанного ГХЦР. (*A*) Гистограмма количества мутаций в каждом образце первичной опухоли (верхняя панель) и круговая диаграмма, представляющая доли несинонимичных соматических мутаций для ХЦР и подкласса из стволовых клеток (нижняя панель). (*B*) Тепловая карта, показывающая индивидуальные мутации в известных драйверных генах рака, выявленных при секвенировании экзома. (*C*) Тепловая карта, показывающая валидацию результатов секвенирования экзома и скрининг на наиболее распространенные онкогенные мутации, выявленные для ГЦР и ВПХК в исследуемой когорте. Перекрывающиеся случаи, в которых были получены свежезамороженные и фиксированные в парафине образцы, были проанализированы отдельно путем секвенирования экзома и валидации ПЦР; они помечены звездочками.

фенотипические признаки как для опухолей из стволовых клеток, так и для классического типа и определяет ХЦР как отдельное образование из клеток желчных путей без геномных признаков ГЦР. Эти отличия были охарактеризованы на основе интеграционного геномного анализа экспрессии генов, изменений количества копий ДНК, нарушения сигнальных путей и мутационного профиля (рис. 7).

ХЦР характеризуется хромосомной стабильностью, активацией сигнальных путей TGF-β, выраженным усилением активности иммунных путей и определенными чертами билиарных опухолей. Гистологически ХЦР окружен фиброзной стромой и позитивен на иммуногистохимическое окрашивание NCAM, как описано ранее [5, 11, 38, 39]. В отличие от смешанных ГХЦР в ХЦР активированы сигнальные пути TGF-β. TGF-β — это плейотропный каскад с различными функциями в зависимости от клеточного окружения. Он проявляет проонкогенные эффекты путем усиления опухолевого роста и инвазии за счет индукции EMT, активации миофибробластов и отложения коллагена [40]. TGF-β также связан с трансформацией печеночных клеток-предшественниц в клетки, инициирующие опухоль [41], и дифференцировкой желчных путей на ранней стадии развития [42]. Опухоли ХЦР также продемонстрировали активацию связанных с EMT маркеров, деактивацию маркеров специфических генов гепатоцитов, обогащение иммунными клетками (Т-лимфоцитами, цитотоксическими лимфоцитами, Th1, NK) и сигнатуры генов, связанных с иммунным ответом. Показано, что ось CXCL12-CXCR4, которая была описана как средство хемоаттракции миелоидных и лимфоидных клеток в опухоль [43], значительно активирована в ХЦР. О сочетании Th1-лимфоцитов и цитотоксической иммунной инфильтрации также постоянно сообщается в опухолях других типов [44–46]. Неизвестно, как активация иммуносупрессивного сигнального пути TGF-β может происходить одновременно с активацией Т-лимфоцитов в одной и той же опухоли. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. Молекулярные признаки, обозначенные в этом исследовании, подтверждают, что ХЦР должен стоять отдельно как молекулярно-дифференцированный подтип внутрипеченочного рака из клеток желчных путей.

Опухоли, принадлежащие к подклассу образований из стволовых клеток, имеют совершенно другие молекулярные признаки (см. рис. 7). Во-первых, они демонстрируют обогащение сигнатурами, определяющими активацию пролиферации, такими как MYC, IGF2, mTOR и NOTCH, при этом, как и при ГЦР, плохой прогноз. Гистологически они характеризуются наличием SALL4 — раннего маркера клеток-предшественниц — в 75 % (6 из 8) случаев по сравнению с другими смешанными подклассами (ни одного случая). Реэкспрессия онкофетального фактора транскрипции SALL4 также была описана в подклассе ГЦР с признаками клеток-предшественниц и плохим прогнозом [47].

Классический подтип представляет абсолютно другое образование, поскольку объединяет черты типичных ГЦР и ВПХК. Наши данные поддерживают модель происхождения из единой клетки для этих опухолей на основе сходства в аберрациях CNV в компонентах ГЦР и ВПХК в 3 из 4 парных случаев. Эти результаты согласуются с ранее

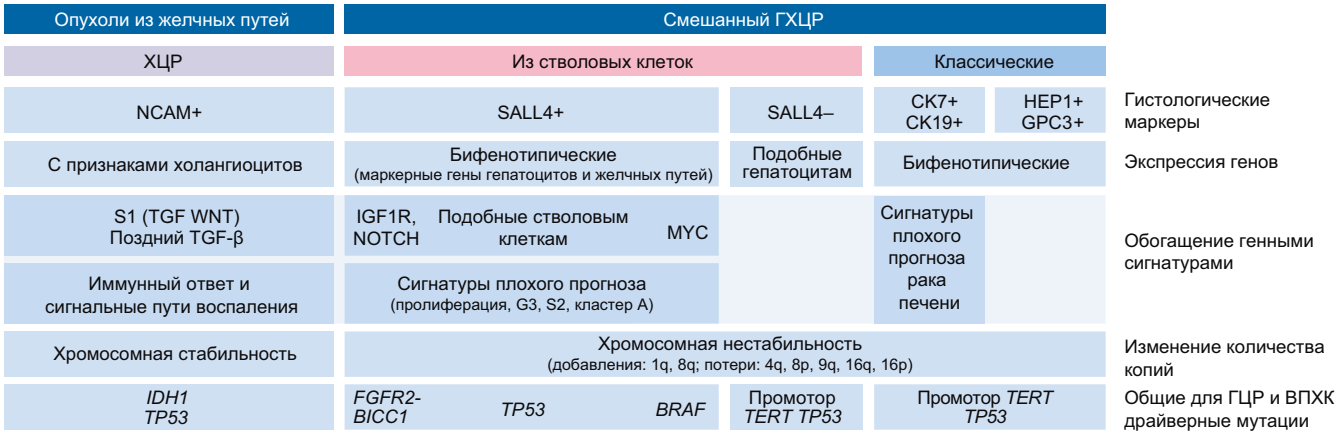

Рис. 7. Краткое описание молекулярной характеристики смешанного ГХЦР и ХЦР как отдельных образований. ХЦР объединяют только признаки желчных путей в отличие от опухолей ГЦР и ВПХК. Специфические маркеры клеточного происхождения, генные сигнатуры, полученные из опухолей печени, сигнальные пути, хромосомная стабильность и драйверные мутации показаны для каждого образования.

выявленными данными, основанными на анализе потери гетерозиготности, когда 70 % (8 из 11) изученных случаев показали значительное сходство [48]. Более того, наличие характерной области перехода между компонентами ГЦР и ВПХК с бифенотипическими чертами [2] дополнительно поддерживает процесс единого клона, при котором генетическая дивергенция внутри опухоли идет параллельно с гистологической разнородностью. Каждый компонент сохраняет геномные и биомаркерные признаки, напоминающие либо ГЦР, либо ВПХК. Точно так же данные мутационного профиля показывают общие онкогенные драйверные мутации, характерные для ГЦР или ВПХК в классическом подклассе ГХЦР. Наконец, мы не выявили активации сигнального пути WNT/β-катенин или наличия мутаций *CTNNB1* в наших классических образцах ГХЦР, что согласуется с предыдущими исследованиями [13, 16].

Изучение геномных характеристик опухолей показало возможность множественных клеток происхождения (см. дополнительный рис. 11) [49]. Смешанные опухоли ГХЦР могут иметь общего предшественника гепатоцитов, но он также может происходить из более зрелых клеток-предшественниц. Наши данные профиля генной экспрессии позволяют предположить наличие близкого к желчным путям прототипа в случаях ХЦР и бифенотипического прототипа, подобного клеткам-предшественницам, в подклассах классических опухолей и опухолей из стволовых клеток. ХЦР экспрессирует NCAM, теряет маркеры гепатоцитов и сохраняет маркеры холангиоцитов, что предполагает наличие более зрелого предшественника клеток желчных путей. Кроме того, мутация *IDH1* — известный ингибитор дифференцировки гепатоцитов и проводник образования ВПХК [19] — была обнаружена только в ХЦР. Напротив, учитывая, что подкласс из стволовых клеток был обогащен сигнатурами стволовых клеток и окрашивался положительно на SALL4, они могут происходить напрямую из клеток-предшественниц гепатоцитов или при трансдифференцировке более зрелых предшественников. Наконец, классический подтип сохраняет маркеры как ГЦР, так и ВПХК. Поскольку он, по-видимому, имеет клональную основу, исходные клетки будут достаточно зрелыми, чтобы утратить ранние маркеры предшественника (SALL4), но сохранить бифенотипические маркеры.

В заключение отметим, что это исследование предоставляет комплексную молекулярную характеристику смешанных опухолей ГХЦР. Как классический, так и подтип из стволовых клеток сохраняют компоненты ГЦР и холангиоцитов, а следовательно, подходят под определение ГЦР-ВПХК. С другой стороны, наши данные поддерживают определение ХЦР как отдельного молекулярного образования, происходящего из клеток желчных путей без признаков ГЦР. Эти результаты дают основание к пересмотру текущей патологической классификации [2] и разработке более точных терапевтических подходов.

Конфликты интересов

Авторы, принимавшие участие в исследовании, заявляют об отсутствии конфликтов интересов в отношении финансирования или написания рукописи.

Спонсоры

JML получил поддержку в виде грантов от комиссии Европейского союза «Горизонт 2020» (HEPTROMIC, № 259744; HEPCAR, № 667273-2), Министерства обороны США (CA150272P1), Фонда исследования рака Сэмюэля Уэксмана, Испанского национального института здоровья (SAF-2013-41027-R) и Испанской ассоциации по борьбе с раком (AECC). AM получила гранты от Испанского национального института здоровья (программа FPI), AECC и Испанской ассоциации по изучению печени (AEEH). DS получила поддержку в виде исследовательской стипендии в память Мари Фикэ (Фонд холангиокарциномы).
RM получил поддержку в виде гранта Рио Ортега от Испанского онкологического общества — Института здравоохранения Карла III. LT и IMQ получили спонсорскую помощь от CIBEREHD и HEPCAR соответственно. AV

получил клиническую и трансляционную премию фонда Алана Хофмана Американской ассоциации по изучению печени, а также поддержку Министерства обороны США (CA150272P3).

Вклад авторов

AM — концепция и дизайн исследования, получение данных, анализ и интерпретация данных, написание черновика рукописи, статистический анализ; DS — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, написание черновика рукописи, критический пересмотр рукописи на важное интеллектуальное содержимое, статистический анализ, руководство исследованием; ZZ — получение данных, анализ и интерпретация данных, статистический анализ; GC — получение данных, техническая поддержка; AS — анализ и интерпретация данных; HD — получение данных; RM — получение данных; LT — получение данных; IMQ — получение данных; MIF — анализ и интерпретация данных; HK — анализ и интерпретация данных; AV — концепция и дизайн исследования, написание черновика рукописи, критический пересмотр рукописи на важное интеллектуальное содержимое; SNT — концепция и дизайн исследования, получение данных, анализ и интерпретация данных; MES — концепция и дизайн исследования; JML — концепция и дизайн исследования, написание черновика рукописи, критический пересмотр рукописи на важное интеллектуальное содержимое, получение финансовой помощи, руководство исследованием.

Благодарности

Мы хотели бы поблагодарить хранилище биоматериалов Школы медицины Икана в Маунт Синай за предоставление образцов, д-ров Mireia Castillo-Martin и Yayoi Kinoshita за помощь в анализе и обработке образцов. Мы также благодарим д-ра Yujin Hoshida за поддержку и совет в отношении данных по нормализации генной экспрессии. Эта работа получила частичную поддержку за счет компьютерных ресурсов и опыта сотрудников, предоставленных Научным компьютерным центром при Школе медицины Икана в Маунт Синай.

Дополнительные материалы

Дополнительные материалы к статье представлены в англоязычном приложении на сайте http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.010.

Литература

[1] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. Nat Rev Dis Prim 2016;2:16018.
[2] Theise ND, Nakashima O, Park YN, Nakanuma Y. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyons: IARC; 2010. p. 225–227.
[3] Jarnagin WR, Weber S, Tickoo SK, Koea JB, Obiekwe S, Fong Y, et al. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: demographic, clinical, and prognostic factors. Cancer 2002;94:2040–2046.
[4] Wachtel MS, Zhang Y, Xu T, Chiriva-Internati M, Frezza EE. Combined hepatocellular cholangiocarcinomas; analysis of a large database. Clin Med Pathol 2008;1:43–47.
[5] Sempoux C, Fan C, Singh P, Obeidat K, Roayaie S, Schwartz M, et al. Cholangiolocellular carcinoma: an innocent-looking malignant liver tumor mimicking ductular reaction. Semin Liver Dis 2011;31:104–110.
[6] Lee J-H, Chung GE, Yu SJ, Hwang SY, Kim JS, Kim HY, et al. Long-term prognosis of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma after curative resection comparison with hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. J Clin Gastroenterol 2011;45:69–75.
[7] Yin X, Zhang B-H, Qiu S-J, Ren Z-G, Zhou J, Chen X-H, et al. Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features, treatment modalities, and prognosis. Ann Surg Oncol 2012;19:2869–2876.
[8] Lee W-S, Lee K-W, Heo J-S, Kim S-J, Choi S-H, Kim Y-I, et al. Comparison of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma with hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. Surg Today 2006;36:892–897.
[9] Sasaki M, Sato H, Kakuda Y, Sato Y, Choi JH, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of "subtypes with stem-cell feature" in combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. Liver Int 2015;35:1024–1035.
[10] Ikeda H, Harada K, Sato Y, Sasaki M, Yoneda N, Kitamura S, et al. Clinicopathologic significance of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma with stem cell subtype components with reference to the expression of putative stem cell markers. Am J Clin Pathol 2013;140:329–340.
[11] Komuta M, Spee B, Vander Borght S, De Vos R, Verslype C, Aerts R, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. Hepatology 2008;47:1544–1556.
[12] Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, et al. Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of mir-200c and EMT in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 2012;56:1792–1803.
[13] Coulouarn C, Cavard C, Rubbia-Brandt L, Audebourg A, Dumont F, Jacques S, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinomas exhibit progenitor features and activation of Wnt and TGFβ signaling pathways. Carcinogenesis 2012;33:1791–1796.
[14] Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, et al. Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. Nat Commun 2015;6:6120.
[15] Woo HG, Lee JH, Yoon JH, Kim CY, Lee HS, Jang JJ, et al. Identification of a cholangiocarcinoma-like gene expression trait in hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2010;70:3034–3041.
[16] Cazals-Hatem D, Rebouissou S, Bioulac-Sage P, Bluteau O, Blanche H, Franco D, et al. Clinical and molecular analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinomas. J Hepatol 2004;41:292–298.
[17] Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, Tovar V, Sia D, Alsinet C, et al. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2011;140:1501–1512 e2.
[18] Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. Gastroenterology 2013;144:829–840.
[19] Saha SK, Parachoniak CA, Ghanta KS, Fitamant J, Ross KN, Najem MS, et al. Mutant IDH inhibits HNF-4α to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. Nature 2014;513:110–114.

[20] Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, Chan JA, Brunet J-PP, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2009;69:7385–7392.
[21] Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. Hepatology 2008;47:2059–2067.
[22] Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. Immunity 2013;39:782–795.
[23] Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2008;68:1451–1461.
[24] Chiang DYY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2008;68:6779–6788.
[25] Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology 2007;45:42–52.
[26] Lee J-S, Chu I-S, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. Hepatology 2004;40:667–676.
[27] Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DYY, Sole M, et al. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and preclinical efficacy of IGF-1R blockage. J Hepatol 2010;52:550–559.
[28] Villanueva A, Alsinet C, Yanger K, Hoshida Y, Zong Y, Toffanin S, et al. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. Gastroenterology 2012;143:1660–1669 e7.
[29] Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. Gastroenterology 2012;142:1021–1031 e15.
[30] Sia D, Losic B, Moeini A, Cabellos L, Hao K, Revill K, et al. Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. Nat Commun 2015;6:6087.
[31] Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Nat Genet 2012;44:690–693.
[32] Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. Nat Genet 2015;47:505–511.
[33] Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. Nat Genet 2014;46:1267–1273.
[34] Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature 2007;446:153–158.
[35] Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. Cell 2013;153:17–37.
[36] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science 2013;339:1546–1558.
[37] Hoshida Y, Brunet J-P, Tamayo P, Golub TR, Mesirov JP. Subclass mapping: identifying common subtypes in independent disease data sets. PLoS One 2007;2 e1195.
[38] Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenbergen W, Verslype C, et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. Hepatology 2012;55:1876–1888.
[39] Akiba J, Nakashima O, Hattori S, Tanikawa K, Takenaka M, Nakayama M, et al. Clinicopathologic analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma according to the latest WHO classification. Am J Surg Pathol 2013;37:496–505.
[40] Massague J. TGFbeta in Cancer. Cell 2008;134:215–230.
[41] Wu K, Ding J, Chen C, Sun W, Ning B-F, Wen W, et al. Hepatic transforming growth factor beta gives rise to tumor-initiating cells and promotes liver cancer development. Hepatology 2012;56:2255–2267.
[42] Karkampouna S, Ten Dijke P, Dooley S, Julio MK. TGβ signaling in liver regeneration. Curr Pharm Des 2012;18:4103–4113.
[43] Chen Y, Huang Y, Reiberger T, Duyverman AM, Huang P, Samuel R, et al. Differential effects of sorafenib on liver vs. tumor fibrosis mediated by stromal-derived factor 1 alpha/C-X-C receptor type 4 axis and myeloid differentiation antigen-positive myeloid cell infiltration in mice. Hepatology 2014;59:1435–1447.
[44] Chew V, Chen J, Lee D, Loh E, Lee J, Lim KH, et al. Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. Gut 2012;61:427–438.
[45] Gao Q, Qiu S-J, Fan J, Zhou J, Wang X-Y, Xiao Y-S, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. J Clin Oncol 2007;25:2586–2593.
[46] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006;313:1960–1964.
[47] Yong KJ, Gao C, Lim JSJ, Yan B, Yang H, Dimitrov T, et al. Oncofetal gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 2013;368:2266–2276.
[48] Fujii H, Zhu XG, Matsumoto T, Inagaki M, Tokusashi Y, Miyokawa N, et al. Genetic classification of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. Hum Pathol 2000;31:1011–1017.
[49] Moeini A, Sia D, Bardeesy N, Mazzaferro V, Llovet JM. Molecular pathogenesis and targeted therapies for intrahepatic cholangiocarcinoma. Clin Cancer Res 2016;22:291–300.