

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：83504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08998

研究課題名(和文) 門脈圧亢進状態における肝脾臓器関連の解明 - 脾機能異常と肝線維化・肝発癌の関連 -

研究課題名(英文) Role of hepato-splenic interaction in portal hypertension

研究代表者

飯室 勇二 (Imuro, Yuji)

地方独立行政法人山梨県立病院機構山梨県立中央病院(がんセンター局ゲノム解析センター)・ゲノム解析センター・研究員

研究者番号：30252018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：門脈圧亢進状態での脾腫・脾臓線維化と肝線維化・肝発癌との関連の解明を目的としました。

肝硬変症例の肝組織において、脾臓摘出後に改善した線維性組織周囲への抗炎症性マクロファージの集積が確認されました。集積したマクロファージと肝線維化改善の関連を検討するため、細胞レベルでの遺伝子発現解析を試みましたが、現在までに特徴的な解析結果は得られていません。一方、脾腫を伴う肝硬変症例に発症した肝細胞癌のゲノム解析を行い、非肝硬変症例における肝細胞癌と比較し、変異遺伝子のプロファイルに差が見られるかを検討しました。こちらも現在までに特徴的な差は見出せませんでした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス肝炎治療の進歩の一方で、残存する肝線維化に起因する肝発癌の抑制、門脈圧亢進状態遷延による合併症の制御などが、重要な課題として浮上しています。これまでの検討で、腫大および線維化した脾臓が肝臓の線維化および肝発癌に関与する可能性が明らかになりつつあります。今回の研究で、脾臓摘出に伴う肝組織での細胞レベルの遺伝子発現、発症肝細胞癌での変異遺伝子の特徴などを行いました。また特徴的な変化は得られていません。今後、腫瘍内微小環境などの解析を加えて検討を行い、肝臓脾臓臓器関連の研究を行う予定です。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the relationship between splenomegaly/splenic fibrosis in a state of portal hypertension, and the development of liver fibrosis/hepatocellular carcinoma. In the liver tissues of patients with liver cirrhosis, the accumulation of anti-inflammatory macrophages around the attenuated fibrous tissue was observed after splenectomy. In order to investigate the relationship between the accumulated macrophages and the improvement of liver fibrosis, gene expression analysis at the cellular level was attempted, but no distinctive results have been obtained thus far. On the other hand, genomic analysis of hepatocellular carcinoma that developed in patients with liver cirrhosis accompanied by splenomegaly was conducted, comparing it with hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic cases, to determine whether there are differences in the profile of mutated genes. However, no distinctive differences have been found up to the present.

研究分野：肝線維化、肝発癌

キーワード：門脈圧亢進症 脾線維化 肝細胞癌 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

これまでの検討から、肝線維化機構における肝臓と脾臓の臓器相関の存在が推測され、ウイルス駆除後にも遷延する門亢症状態および肝線維化・肝発癌の制御には、同臓器相関の更なる解明が必要である。しかし、その詳細なメカニズムについては不明な点が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、肝硬変患者における肝臓および脾臓線維化のメカニズムや脾摘に伴う肝病態変化などを新たな手法を用いて解明し、肝線維化および肝発癌における脾臓の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

門脈圧亢進症を合併した肝細胞癌症例から得られた切除肝組織（非癌部）を用いて、脾摘先行症例と非脾摘症例との比較検討を行った。方法としては、各種抗体を用いた免疫組織染色および laser microdissection 法で採取した肝線維組織周囲組織を用いた遺伝子発現解析(RNA-seq)を試みた。

また、門脈圧亢進症合併肝癌症例と非合併肝癌症例から得られた肝癌組織を用いて、次世代シーケンサー（NGS）による癌ゲノム解析を行い、両者の遺伝子変異の間に一定の差が認められるかの検討を行った。

4. 研究成果

・ヒト硬変肝における免疫組織染色：

これまでの研究で、ヒト硬変肝において、脾摘による線維化改善現象を確認しているが、脾摘後の硬変肝組織における各種細胞の動態変化を検討した。特徴的所見として、肝線維化改善過程において、脾摘後に抗炎症性 M2 マクロファージ（CD163+ M ϕ ）が肝臓に集積する現象が確認された。同マクロファージが集積した近傍の肝線維化は著明に改善していた。

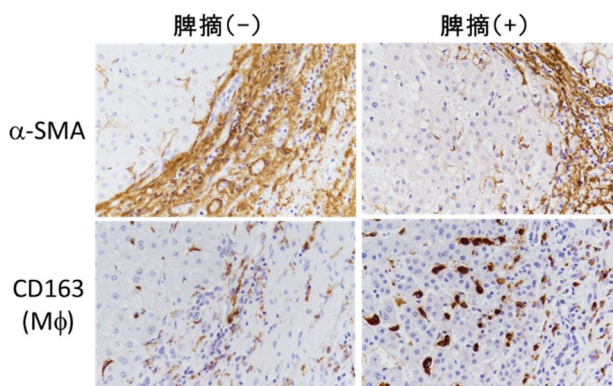


図1. 脾摘後の肝線維組織周囲へのM2マクロファージの集積

・肝組織を用いた遺伝子発現の検討：

前述の肝線維化組織周辺での現象を遺伝子発現レベルで解析する目的で、同領域を laser microdissection 法を用いて採取し、RNA サンプルを回収して、NGS を用いた RNA-seq を試みた。

結果としては、データの再現性が不安定であり、また脾摘症例と非脾摘症例の間で特徴的な差異が明確にできない状況であった。今後、空間トランスクリプトーム解析などの手法を用いて再検討したい。

・肝硬変合併および非合併肝細胞癌における変異遺伝子比較

それぞれの症例における肝癌組織を laser microdissection 法を用いて採取し、DNA サンプルを回収した。肝癌パネル（72 遺伝子）を In-house で作製し、NGS を用いてゲノム解析を行った。

結果として、それぞれの肝癌組織で肝癌ドライバー変異遺伝子として報告されているものが同定されたが、肝硬変合併肝癌と非合併肝癌との比較では、特徴的な遺伝子変異パターンは検出されなかった。今後の方針としては、腫瘍内微小環境に注目した空間トランスクリプトーム解析による検討を行いたい。

肝硬変症例 1			非肝硬変症例 1		
Genes	Mutation		Genes	Mutation	
NF1	p.Leu2390 Trp	43%	TP53	p.Glu171 Gly	42%
BRD7	p.Tyr455Phe	25%	ARID1A	p.Pro728fs	39%
ARID2	p.Val862fs	22%	NCOR1	p.Glu2264Asp	30%
HNRNPC	p.Asp245fs	18%	ALB	p.Phe180_Ala182del	23%
TP53	p.Lys139Asn	13%	ALB	p.Leu540_Ser541ins Ser	17%
BRD7	p.Gly43Arg	8%	ARID1A	p.Arg1446 Ter	16%
BRD7	p.Thr39Met	8%			
ALB	p.Phe180Leu	7%	非肝硬変症例 2		
HNRNPC	p.Ser260Cys	5%	Genes	Mutations	
HNRNPC	p.Gly256Arg	4%	TP53	p.Gln104Ter	45%
HNRNPC	p.Glu263Lys	4%	SMARCA2	p.Gln225dup	37%
			ALB	p.Asn154_Glu156del	20%
			ATM	p.Asn2241Lys	4%
			ARID2	p.Ser442Arg	4%
			SMARCA2	p.Gln240Pro	3%

肝硬変症例 2		
Genes	Mutation	
TP53	p.Phe270Ile	69%
KEAP1	p.Gly186Val	69%
TSC2	p.Ala555Thr	43%
ARID1A	p.His1541fs	35%
CACNA1C	p.Leu1610Val	5%

図2.肝硬変合併および非合併肝癌における遺伝子変異

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 飯室勇二、小尾俊太郎、望月仁、大山宏、弘津陽介、雨宮健司、小俣政男
2 . 発表標題 Post-SVR時代の肝癌治療におけるMinimal Invasive Hepatectomyの有用性
3 . 学会等名 第57回日本肝癌研究会
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yuji Iimuro, Atsushi Takano, Kenji Amemiya, Yosuke Hirotsu, Hitoshi Mochizuki, Shuntaro Obi, and Masao Omata
2 . 発表標題 Genetic discrimination between Multicentric Occurrence and Intrahepatic Metastasis in multifocal HCC
3 . 学会等名 APASL Oncology 2021
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yuji Iimuro, Atsushi Takano, Shuntaro Obi, Hitoshi Mochizuki, Masao Omata
2 . 発表標題 Minimal Invasive Hepatectomy in the Post-SVR Era
3 . 学会等名 APASL Oncology 2021
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yuji Iimuro1, Atsushi Takano, Kenji Amemiya, Yosuke Hirotsu, Hitoshi Mochizuki, Shuntaro Obi, and Masao Omata
2 . 発表標題 Multifocal HCCs genetically classified as Multicentric Occurrence (MO) possess better prognosis after surgery comparing to Intrahepatic Metastasis (IM)
3 . 学会等名 APASL 2022
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuji Iimuro ¹ , Atsushi Takano, Kenji Amemiya, Yosuke Hirotsu, Hitoshi Mochizuki, Shuntaro Obi, and Masao Omata
2. 発表標題 Significance of Tumor Genomic Differentiation (MC/IM) in the Treatment of Recurrent Hepatocellular Carcinoma.
3. 学会等名 APASL2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	弘津 陽介 (Hirotsu Yosuke) (10793838)	地方独立行政法人山梨県立病院機構山梨県立中央病院・ゲノム解析センター・チーフ研究員 (83504)	
研究分担者	河野 寛 (Kono Hiroshi) (40322127)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	
研究分担者	鈴村 和大 (Suzumura Kazuhiro) (50434949)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	波多野 悦朗 (Hatano Etsuro) (80359801)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------