

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17038

研究課題名(和文)肝細胞不均一性に着目した慢性肝疾患の病態進行と発がん機構の解明

研究課題名(英文)The study of hepatocyte heterogeneity in chronic liver disease progression and oncogenesis

研究代表者

山添 太士(Yamazoe, Taiji)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター・肝疾患研究部 上級研究員

研究者番号：20736219

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)：本研究では、肝細胞のヘテロ不均一性(heterogeneity)に着目し、肝細胞癌患者の切除肝標本の非癌部ならびに癌部を解析し、染色体量(ploidy)の変化と慢性肝障害の進行や発癌との関連を解明することで、その病態進行の機序を明らかにすることを目的とする。染色体量の指標として画像解析にて肝細胞の位置特異的な核の大きさを測定し、遺伝子発現解析としてシングルセルRNAseqと空間的トランスクリプトーム解析(VISIUM)を行った。ヒト由来手術サンプルを用いたため、RNA品質にばらつきがあり解析症例の蓄積、また解析技術の改善が望まれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年急速に発達しているシーケンス技術を応用したシングルセルRNAseq解析や空間的トランスクリプトーム解析により、以前は解析できなかった生理下あるいは病態下における1細胞の挙動を解析することが可能となり、次々と新しい知見が得られている。その一方で、これらの新しい技術の遂行には一定の経験が必要である。今回、遺伝子発現量解析をヒト由来試料で行うための改善点と注意点が明らかとなった。今後、解析プラットフォームも改善されており、ますます重要な解析方法となるため、解析経験と結果の共有が重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of study is to reveal the relationship between the change of hepatocyte heterogeneity through liver disease progression and liver carcinogenesis. The hepatocytes shows the heterogeneity in terms of liver function and its morphology. In this study, we focused the ploidy as the DNA amount and gene expression in single cell levels. Utilized the liver resection samples, the size of nucleus in hepatocyte are measured by using the liver section with DAPI stain, and the gene expressions are measured by RNAseq. We used the VISIUM for spatial genomics and found the considerable variation in RNA quality, which makes difficult to obtain the differentially expressed genes (DEGs). This indicates the spatial genomics needs the good amount of sample size and the improvement of platform.

研究分野：肝疾患

キーワード：細胞核画像解析 慢性肝疾患 空間的遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代謝の中心臓器である肝臓の主要構成細胞である肝細胞は、組織学的に小葉構造を形成し、この解剖学的な位置(zonation)により異なる肝機能を分担するという heterogeneity があることが知られている。慢性肝障害における病態の主座も解剖学的特徴を有すること（ウイルス性肝炎における門脈領域優位な免疫細胞浸潤・線維化、アルコール性肝障害の中心静脈領域優位な脂肪沈着など）が知られており、これまで多くの研究が zonation を中心になされてきた。一方で、肝細胞は正常組織内においても核が二つ以上存在する二核肝細胞が混在し、単核あるいは二核のそれぞれの核においても通常より多い染色体量を持つ多倍体性という点でも heterogeneity を示す。以前より肝細胞の多倍体化は成熟化の過程であり、複数の相同染色体を持つことは遺伝子異常に対する冗長性に貢献し、癌化過程に耐性を示すと考えられてきた。一方で、通常の染色体量をもつ単核性の二倍体の肝細胞は分裂能を有する幼若な肝細胞とみなされている。最近の研究により、この多倍体化は肝再生時には可逆性であること、非アルコール性脂肪性肝炎において多倍体化肝細胞が減少し、癌細胞では異数性染色体が増加するという染色体不安定性が示され、染色体量の肝再生および発がんにおける重要性が認識されたものの、その機能や制御分子機構は未だ明らかでない。加えて、障害と再生が繰り返し行われるヒト慢性肝障害肝細胞の染色体量の変化と zonation との関連性も詳細な検討がない。

2. 研究の目的

肝細胞の heterogeneity に着目した新規解析法を用いて、患者由来の病理組織の zonation と ploidy の関係を疾患横断的に解析し()さらには癌部非癌部という時間縦断的に解析する()ことにより、その病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

肝細胞の ploidy に heterogeneity が存在することは古くから知られていたにも関わらず、これまで深く研究されていなかった理由の一つとして研究手法の困難さが挙げられる。染色体量を細胞個別に測定する方法は、核酸量を反映する DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)などの蛍光色素を Flow cytometer あるいは光学顕微鏡にて評価する方法が一般的である。しかしながら、Flow cytometry では high through-put である反面、分離細胞を使用するため解剖学的な位置情報が得られなくなる。一方、薄切切片(4 μm)による顕微鏡解析では形態変化や解剖学的な位置情報が得られるものの、比較的大きな細胞である肝細胞では正確な核酸量の評価が困難である点と through-put が悪いといった欠点があった。

本研究では、厚切切片(400 μm)を組織透明化(Ce3D 法)し共焦点顕微鏡下に 3D 画像(z-stack 画像)を取得後、独自に確立したコンピューターによる自動解析法をこの試料調製方法に最適化させることで、形態学的な情報を得ながら、核酸量の評価に対する正確性と through-put を改善させた。これまでマウスを用いていたため、患者標本を使用した慢性肝疾患横断的な heterogeneity のランドスケープの作成に関して、解析法の最適化を行った後に解析する。

また、近年のシングルセル解析によって zonation による肝細胞機能の heterogeneity が詳細に検討されている。シングルセル解析の gene expression signature から zonation を類推することが可能であると考えられる。そこで、flow cytometry による染色体量(2 倍体、4 倍体、8 倍体、それ以上)ごとの細胞分取後にシングルセル解析を行うことで ploidy と zonation の関係を評価できる。シングルセル解析を用いた関連する分子機構の解明に関して、解析前の準備として細胞分取法の条件検討とシングルセル解析法のパイプラインに関して検討を行う。検討後、マウスの疾患モデルである脂肪性肝障害モデル(research diet 社 D09100310 給餌)を用いて各 ploidy を分取しシングルセル解析を行う。

4. 研究成果

画像解析法をマウス用からヒト臨床サンプル用に改変した。マウスサンプルと同様に、凍結標本の厚切り切片を作成し、核染色(DAPI)、細胞膜染色(Phalloidin)、肝細胞マーカー(HNF4)免疫染色を行い、組織透明化した後、共焦点顕微鏡にて 3 次元構築し、肝細胞の染色体量や解剖学的な位置(門脈と中心静脈との距離)を測定することを予定していたが、各疾患群を通して充分量の新鮮凍結標本を得ることが困難であった。

そこでパラフィン標本を用いることにした。このため、使用抗体や抗原賦活化の最適化が必要となったが、概ね解析法を確立し、転移性肝癌切除標本をコントロールとし、非アルコール性脂肪性肝疾患患者の非癌部をそれぞれ 5 例ずつ解析した。非アルコール性脂肪性肝障害症例 5 例

の検討から、解析項目の一部にはコントロールに比べて有意な変化があったものの、多くはその傾向をみとめるにとどまった。事後分析(post hoc)を行い適切なサンプルサイズを決定したのち、必要な解析数を蓄積していく必要があると考えられた。

また、シングルセル解析を行うためにヒトおよびマウス肝を用いた Flow cytometry 法を行い染色体量の変化を測定した。使用した染色は Propidium iodide (PI)、DAPI、Acridine orange (AO)、Hoechst 33258、Hoechst 33342 をそれぞれ用いた。慢性肝障害における肝細胞は通常の肝細胞に比べ自家蛍光が高いため、これらの肝細胞でも同様に評価可能かを検討した。Hoechst 33258、Hoechst 33342 を用いた染色方法により DNA 量の推定が可能であることがわかったものの、脂肪性肝障害モデル (research diet 社 D09100310 給餌) では細胞分取時に細胞膜が破壊され容易に脱核してしまうことがわかった。これは DAPI および Hoechst 染色により生細胞における細胞膜通過性の違いすなわち DAPI は死細胞のみ膜透過性があり、Hoechst はどちらも生死に関わらず膜透過性があるが、障害肝由来の肝細胞ではどちらの染色でも陽性となった。分取方法を、Collagenase を基礎とするものから、Dispase や Liberase (Roche 社) などを試したが改善しなかった。また、既報にて肝細胞特に障害肝モデルをシングルセル解析している事例を検討すると、脱核したと思われるクラスターが出現する、比較的機械刺激に寛容な細胞が選択的に濃縮される、肝細胞以外の非実質細胞が代わりに多く出現するなどの不具合があるように思われた。このため、空間遺伝子解析法である VISIUM を施行することとした。4 例の非アルコール性脂肪性肝疾患の非癌部の新鮮凍結切片を用いた VISIUM を施行した。ヒト由来手術標本の新鮮凍結切片を用いたが、遺伝子品質にばらつきが大きいことがわかった。このため遺伝子品質の良いものから順に解析した。通常の t-SNE 解析に加えて、組織切片上で門脈域の線維化をランドマークとして遺伝子解析スポットの各距離を変数として clustering を行なったが特徴的な遺伝子群は見出せなかった。今回、ヒト由来手術標本の新鮮凍結切片を用いたが、遺伝子品質にばらつきが大きい点と各遺伝子解析領域が細胞よりも大きいという VISIUM 特有の解像度の問題があった。代替法としてパラフィン包埋検体を用いた VISIUM や解像度を上げた VISIUM HD を用いると改善される可能性があると考えられた。これらパラフィンサンプルを中心とした固定標本を用いた遺伝子解析はプローブを用いたハイブリダイゼーションを応用したもので、ポリ A テールを補足した後に逆転写産物をシークエンスする方法ではない。このため解析がプローブセットに依存するデメリットがあるものの、RNA の分解したサンプルでも比較的冗長に解析できる長所がある。現在、空間遺伝子解析のプラットフォームである VISIUM の他、シングルセル解析においても Flex の名で利用可能となった。一方で、ATAC シークエンス解析に関しては開発されていない。今回のマウス肝障害モデルにおける細胞調整の困難さは固定標本を使用することで改善される可能性があると考えられる。

本研究では当初、マウスで行っていた方法をヒトサンプルで施行したことで新たな問題が出現し、多くのトラブルシューティングが必要になった。肝細胞のシングルセルや分取を行う際には組織消化における肝細胞特性の変化がアーチファクトとして加わる点に留意する必要がある。ヒト特に肝切除手術は長時間にわたり阻血操作や受動操作などの手術検体の状態が変化し、その後の保存状態にも影響するため VISIUM などの空間遺伝子解析法ではサンプル間の Batch 除去法がうまくいかないことがあり、同一解析空間内でそれぞれを評価するサンプル内の位置特異的な遺伝子発現変化解析に向いている。このことより、空間遺伝子解析においては同一解析領域に比較・評価したい部位がそれぞれ過不足なく存在する必要がある。また、固定標本を使用する遺伝子発現解析法のプラットフォームが充実してきつつあり、今後はこういった解析方法により困難な解析が可能となると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawai H., Osawa Y., Tsunoda T., Matsuda M., Okawara M., Sakamoto Y., Shimagaki T., Tsutsui Y., Yoshida Y., Yoshikawa S., Doi H., Mori T., Yamazoe T., Yoshio S., Okamura T., Sugiyama M., Okuzaki D., Komatsu H., Inui A., Yanaga K., Ikegami T., Kanto T.	4. 巻 53
2. 論文標題 Peripheral dominant liver fibrosis and tumor distribution in a mouse model of congestive hepatopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 370～376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mino Masaaki, Kakazu Eiji, Sano Akitoshi, Katsuyama Hisayuki, Hakoshima Mariko, Yanai Hidekatsu, Aoki Yoshihiko, Imamura Masatoshi, Yamazoe Taiji, Mori Taizo, Yoshio Sachiyo, Inoue Jun, Masamune Atsushi, Kanto Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and pioglitazone on FIB 4 index in metabolic associated fatty liver disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamauchi Reika, Ito Takanori, Yoshio Sachiyo, Yamamoto Takafumi, Mizuno Kazuyuki, Ishigami Masatoshi, Kawashima Hiroki, Yasuda Satoshi, Shimose Shigeo, Iwamoto Hideki, Yamazoe Taiji, Mori Taizo, Kakazu Eiji, Kawaguchi Takumi, Toyoda Hidenori, Kanto Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Serum osteopontin predicts the response to atezolizumab plus bevacizumab in patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-023-01985-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai H, Osawa Y, Matsuda M, Tsunoda T, Yanagida K, Hishikawa D, Okawara M, Sakamoto Y, Shimagaki T, Tsutsui Y, Yoshida Y, Yoshikawa S, Hashi K, Doi H, Mori T, Yamazoe T, Yoshio S, Sugiyama M, Okuzaki D, Komatsu H, Inui A, Tamura-Nakano M, Oyama C, Shindou H, Kusano H, Kage M, Ikegami T, Yanaga K, Kanto T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sphingosine 1 phosphate promotes tumor development and liver fibrosis in mouse model of congestive hepatopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.32256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maddipati R, et. al	4. 巻 12
2. 論文標題 <i>MYC</i> Levels Regulate Metastatic Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 542 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-20-1826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osawa Yosuke, Kawai Hironari, Tsunoda Tomoyuki, Komatsu Haruki, Okawara Miku, Tsutsui Yuriko, Yoshida Yuichi, Yoshikawa Shiori, Mori Taizo, Yamazoe Taiji, Yoshio Sachiyo, Oide Takashi, Inui Ayano, Kanto Tatsuya	4. 巻 5
2. 論文標題 Cluster of Differentiation 44 Promotes Liver Fibrosis and Serves as a Biomarker in Congestive Hepatopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 1437 ~ 1447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Norgard RJ, Pitarresi JR, Maddipati R, Aiello-Couzo NM, Balli D, Li J, Yamazoe T, Wengyn MD, Millstein ID, Folkert IW, Rosario-Berrios DN, Kim IK, Bassett JB, Payne R, Berry CT, Feng X, Sun K, Cioffi M, Chakraborty P, Jolly MK, Gutkind JS, Lyden D, Freedman BD, Foskett JK, Rustgi AK, Stanger BZ.	4. 巻 22
2. 論文標題 Calcium signaling induces a partial EMT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202051872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuichi, Yoshio Sachiyo, Yamazoe Taiji, Mori Taizo, Tsustui Yuriko, Kawai Hironari, Yoshikawa Shiori, Fukuhara Takasuke, Okamoto Toru, Ono Yoshihiro, Takahashi Yu, Hashida Ryuki, Kawaguchi Takumi, Taketomi Akinobu, Kanto Tatsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Phenotypic Characterization by Single-Cell Mass Cytometry of Human Intrahepatic and Peripheral NK Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1495 ~ 1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10061495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshio Sachiyo, Shimagaki Tomonari, Hashida Ryuki, Kawaguchi Takumi, Tsutsui Yuriko, Sakamoto Yuzuru, Yoshida Yuichi, Kawai Hironari, Yoshikawa Shiori, Yamazoe Taiji, Mori Taizo, Osawa Yosuke, Itoh Shinji, Fukai Moto, Yoshizumi Tomoharu, Taketomi Akinobu, Mori Masaki, Kanto Tatsuya	4. 巻 51
2. 論文標題 Myostatin as a fibroblast activating factor impacts on postoperative outcome in patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 803 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tang Q., Efe G., Chiarella A., Leung J., Chen M., Yamazoe T., Su Z., Pitarresi J., Li J., Islam M., Karakasheva T., Klein-Szanto A., Pan S., Hu J., Natsugoe S., Gu W., Stanger B., Wong K., Diehl A., Bass A., Nakagawa H., Murphy M., Rustgi A.	4. 巻 35
2. 論文標題 Mutant p53 regulates Survivin to foster lung metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 528 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.340505.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Osawa Yosuke, Yoshio Sachiyo, Aoki Yoshihiko, Korenaga Masaaki, Imamura Masatoshi, Oide Takashi, Okawara Miku, Kawai Hironari, Tsutsui Yuriko, Yoshida Yuichi, Yoshikawa Shiori, Mori Taizo, Yamazoe Taiji, Kanto Tatsuya	4. 巻 21
2. 論文標題 Blood angiopoietin-2 predicts liver angiogenesis and fibrosis in hepatitis C patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-021-01633-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazoe Taiji, Mori Taizo, Yoshio Sachiyo, Kanto Tatsuya	4. 巻 2
2. 論文標題 Hepatocyte ploidy and pathological mutations in hepatocellular carcinoma: impact on oncogenesis and therapeutics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Global Health & Medicine	6. 最初と最後の頁 273 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35772/ghm.2020.01089	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Shiori, Yoshio Sachiyo, Yoshida Yuichi, Tsutsui Yuriko, Kawai Hironari, Yamazoe Taiji, Mori Taizo, Osawa Yosuke, Sugiyama Masaya, Iwamoto Masashi, Watashi Koichi, Kawaguchi Takumi, Akita Tomoyuki, Tanaka Junko, Kikuchi Yoshimi, Mizokami Masashi, Oka Shinichi, Kanto Tatsuya, Gatanaga Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of Immune Reconstitution-Induced Hepatic Flare on Hepatitis B Surface Antigen Loss in Hepatitis B Virus/Human Immunodeficiency Virus-1 Coinfected Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiaa662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuan Salina, Natesan Ramakrishnan, Sanchez-Rivera Francisco J., Li Jinyang, Bhanu Natarajan V., Yamazoe Taiji, Lin Jeffrey H., Merrell Allyson J., Sela Yogev, Thomas Stacy K., Jiang Yanqing, Plesset Jacqueline B., Miller Emma M., Shi Junwei, Garcia Benjamin A., Lowe Scott W., Asangani Irfan A., Stanger Ben Z.	4. 巻 10
2. 論文標題 Global Regulation of the Histone Mark H3K36me2 Underlies Epithelial Plasticity and Metastatic Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 854 ~ 871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-19-1299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山添太士、由雄祥代、考藤達哉
2. 発表標題 HBV持続感染者の肝炎増悪期の末梢血単核細胞を用いたシングルセル解析
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山添太士、吉田祐一、筒井由梨子、河合裕成、吉川詩織、森泰三、由雄祥代、大澤陽介、考藤達哉
2. 発表標題 肝がん合併非アルコール性脂肪肝炎(NASH)における肝細胞倍体性変化の検討
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山添太士、考藤達哉	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学図書出版	5. 総ページ数 90
3. 書名 肝臓クリニカルアップデート	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------