

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02792

研究課題名(和文) 癌幹細胞により制御される肝癌間質細胞社会の解明

研究課題名(英文) Identification of circulating stromal/cancer cell population detected in hepatocellular carcinoma.

研究代表者

山下 太郎 (Yamashita, Taro)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：90377432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌は世界の悪性腫瘍による死因の第2位を占め、新たな診断治療法の開発が強く求められている。肝癌の悪性度を決定する要因として、申請者はこれまでに癌の発生、維持、薬剤抵抗性、遠隔転移に必須の役割を果たしていると考えられる肝癌幹細胞を同定し、その多様性が肝癌の悪性形質に深く関わることを報告してきた。本研究では肝癌組織における間質細胞の多様性に注目、特に肝癌患者の血液中に存在する細胞集団に着目、健常人、慢性肝炎、肝硬変患者では存在せず、肝癌患者においてのみ出現する細胞集団を1細胞トランスクリプトーム解析により同定した。本研究成果により、新たな肝癌の診断、治療において重要な標的分子候補が導出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は世界の悪性腫瘍による死因の第2位を占め、新たな診断治療法の開発が強く求められている。本研究では肝癌組織における間質細胞の多様性に注目、特に肝癌患者の血液中に存在する細胞集団に着目、健常人、慢性肝炎、肝硬変患者では存在せず、肝癌患者においてのみ出現する細胞集団を1細胞トランスクリプトーム解析により同定した。これらの細胞集団は肝癌の悪性度や免疫応答制御に関わる細胞集団である可能性がトランスクリプトームデータから示唆されている。今回の研究成果を応用することで新たな高悪性度肝癌の診断、治療の標的分子としての有用性を検討することが可能となり、大きな学術的、社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma is the second leading cause of cancer death worldwide. In this study, we performed the immunohistochemistry and flow cytometer analysis to identify the cellular heterogeneity of tumor as well as stromal cells. We further performed the single cell transcriptome analysis using peripheral blood mononuclear cells of hepatocellular carcinoma patients. We identified that tumor stromal cells expressing PD1 or CCR6 as well as tumor cells expressing CCL20 were mostly detected at the periphery, not the center of the tumor. We further identified the circulating cell population specifically detected in hepatocellular carcinoma patients. Interestingly, these cell population contained both tumor cells and stromal cells potentially regulating immune system. This study provides important molecular basis of circulating cells potentially be utilized for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝細胞癌 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌は世界の悪性腫瘍による死因の第2位を占め、本邦でも進行癌の中央生存期間は1年未満の代表的な難治癌であり、新たな診断治療法の開発が強く求められている。肝癌の悪性度を決定する要因として、申請者はこれまでに癌の発生、維持、薬剤抵抗性、遠隔転移に必須の役割を果たしていると考えられる肝癌幹細胞を同定し、その多様性が肝癌の悪性形質に深く関わることを報告してきた(Yamashita T, JCI 2013)。一方肝癌は線維芽細胞や血管内皮細胞、免疫担当細胞など多くの間質細胞を有し、肝発癌過程の中で癌幹細胞はこれらの間質細胞が豊富な浸潤先端領域に多く存在する。従来均一な細胞集団であると考えられた癌幹細胞に多様性が存在するように、異なる癌幹細胞に近接して存在する癌間質細胞にも多様性が存在するのか、多様な癌間質細胞が存在した場合に癌の悪性度に関わるのか、血管新生や免疫チェックポイントなど標的分子の発現は異なるのか、肝癌間質細胞の多様性とその存在部位、悪性形質との関連は未だ十分に解明されていない。また、肝癌患者の血液中に癌により教育を受けた間質細胞集団が果たして存在するか否かも不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では肝癌間質細胞社会の成り立ちを明らかにするため、肝癌組織のフローサイトメーター解析、免疫組織化学解析を行った。またヒト末梢血単核球を肝癌患者および健康人患者と比較し、シングルセルトランスクリプトーム解析を施行、遺伝子発現プロフィールを解析し、その多様性について検討した。

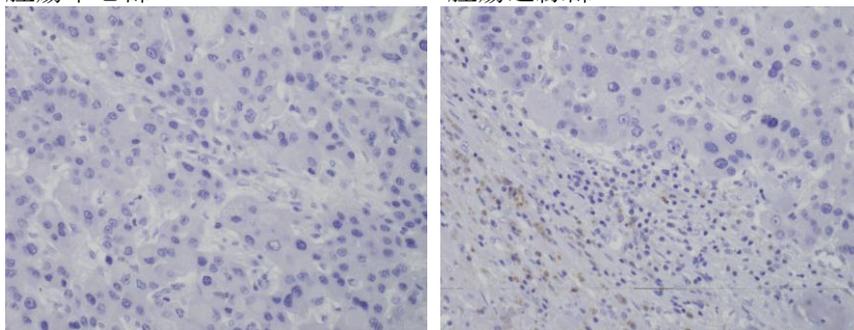
## 3. 研究の方法

肝癌組織の中心部および辺縁から腫瘍組織を採取し、コラゲナーゼ・ディスパーゼ処理を行い単一浮遊細胞液を作成、フローサイトメーター解析を行った。また、肝癌組織の免疫組織化学解析を施行、遺伝子発現パターンについてはマイクロアレイにて解析した。肝癌患者の末梢血単核球を分離し、癌患者で認められる細胞分画を分離し、遺伝子発現について解析した。

## 4. 研究成果

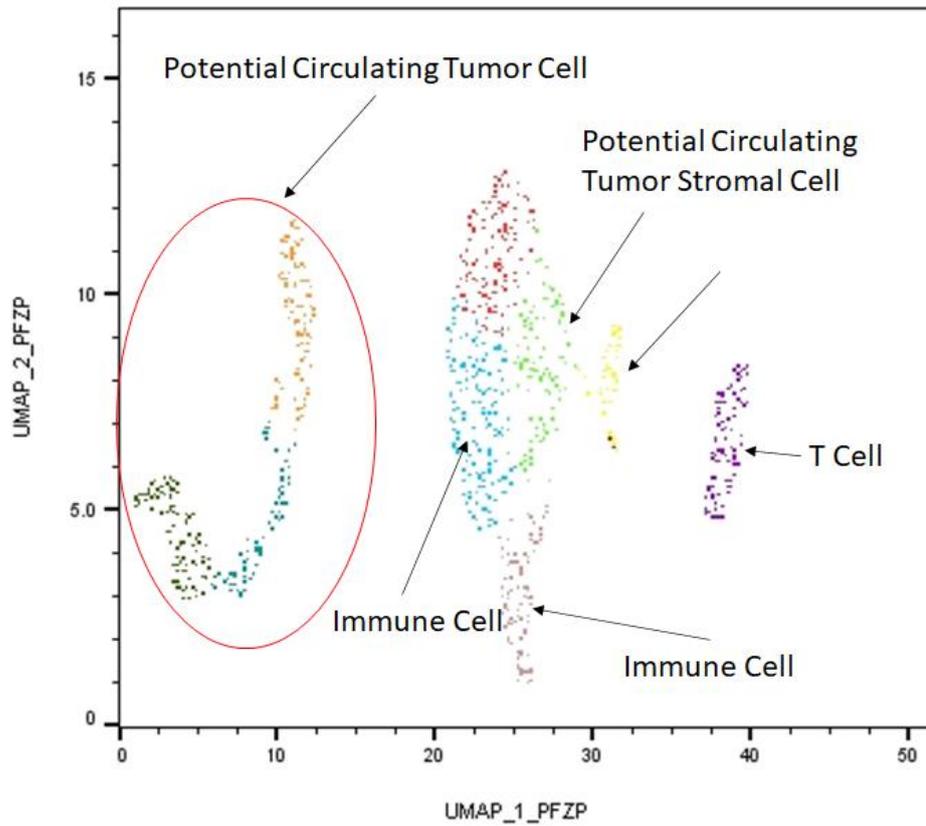
免疫組織化学およびフローサイトメーターの解析から、癌標的分子の一つである PD1 陽性細胞は腫瘍辺縁に存在すること (図1)、同様に高悪性度肝癌である EpCAM 陽性 AFP 陽性肝癌では腫瘍辺縁に CCL20 陽性癌細胞、CCR6 陽性間質細胞が存在することを同定した。

図1 PD1 陽性細胞の肝癌における局在  
腫瘍中心部 腫瘍辺縁部



そこで、癌辺縁に存在するような多様な癌細胞、間質細胞が末梢血液中に流出しているかどうか、末梢血単核球のシングルセルトランスクリプトーム解析を行った。興味深いことに、肝癌患者の末梢血単核球細胞集団において、健康人、慢性肝炎患者、肝硬変患者では認められない細胞集団が存在することを見出した (図2)。

図2 肝癌患者末梢血単核球のシングルセルトランスクリプトーム解析



遺伝子発現パターンから、一部は血液中に流出している circulating tumor cell、一部は免疫制御に関わる細胞集団である可能性が示唆された。本研究成果により、これらの細胞集団が肝癌の診断に有用である可能性、また腫瘍辺縁に存在する分子を発現していることから、肝癌治療において重要な標的分子候補である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashiba Tomomi, Yamashita Taro, et al	4. 巻 20
2. 論文標題 Inactivation of Transcriptional Repressor Capicua Confers Sorafenib Resistance in Human Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 30039-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2020.02.009	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 1. Shirasaki T, Honda M, Yamashita T, Nio K, Shimakami T, Shimizu R, et al	4. 巻 8
2. 論文標題 The osteopontin-CD44 axis in hepatic cancer stem cells regulates IFN signaling and HCV replication	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 2222-2233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-31421-6.	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 Yamashita T, et al	4. 巻 in press
2. 論文標題 Serum Laminin 2 Monomer as a Diagnostic and Predictive Biomarker for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.31758	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Suda, Taro Yamashita, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 1. Dickkopf-1 is a new molecular target for the treatment of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 AASLD Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taro Yamashita
2. 発表標題 Hepatocellular Carcinoma and Pathogenesis
3. 学会等名 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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