

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19603

研究課題名（和文）肝内胆管がん発生母地となる肝細胞性状変化の多階層オミクス解析

研究課題名（英文）Multi-omics analysis for the change of hepatocyte property in the early stages of intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

鈴木 淳史（Suzuki, Atsushi）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30415195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝内胆管がんモデルマウスから得た肝細胞のエピゲノム状態変化や遺伝子発現変化を明らかにし、それらオミクスデータの統合的解析に成功した。また、メタボローム・リピドーム解析を行う上で必要となる組織からの肝細胞採取法を確立し、実際に肝障害を与えたマウスの肝臓を用いて解析を行うことで新たな知見を得ることができた。また、肝内胆管がんの細胞起源となる肝細胞の異常についても解析を行った結果、肝細胞が転写因子のSnailを過剰に発現することで、脂肪肝並びに肝がんを発症することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られた知見を基盤としてさらに研究を進展させることにより、肝内胆管がんの発症機構をシステムとして理解することが可能になり、肝内胆管がんの早期診断や治療法の開発につながる情報を取得できるようになると考えられる。また、本研究で得られた結果から、肝細胞におけるSnailの過剰発現が胆管上皮細胞への分化転換を阻害すると考えられることから、肝内胆管がんの発症機構を考える上で重要な知見を得ることができた。これは、肝細胞を標的とした薬剤の開発が肝内胆管がんの治療や予防において有効であることを示唆しており、今後の展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In our previous study, we found that intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) can be generated by biliary lineage cells derived from hepatocytes. However, the change of hepatocyte property in the early stages of ICC remains largely unknown. Thus, in this study, we investigated the hepatocyte properties changing in the injured liver and the effect of hepatocyte abnormality in the liver. Our multi-omics analysis revealed the change of epigenetic and metabolic states and gene expression pattern of hepatocytes after the particular injury that can induce the onset of ICC. In addition, we found that enforced Snail expression in hepatocytes is sufficient for induction of steatohepatitis and liver tumorigenesis through disruption of the biliary canaliculus and bile acid homeostasis in the liver. Our findings will be useful for uncovering the pathogenic mechanism of ICC and developing preventent and therapeutic strategies for this refractory disease.

研究分野：発生生物学、幹細胞生物学、腫瘍生物学

キーワード：肝内胆管がん 肝細胞 分化 トランスオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓に発生する悪性腫瘍の中で 2 番目に多い肝内胆管がんは、肝臓内で胆管を形成する胆管上皮細胞から発生する悪性腫瘍と定義されており、ウイルス性肝炎に起因する肝細胞がんとは異なり、その発症原因は不明で、放射線療法や化学療法による治療効果は低く、肝切除が唯一の治療法ともいえる。そのため、一般的に予後不良なケースが多く、腫瘍を完全に切除できた場合でも 5 年生存率が 40%程度、切除できなかった場合は 10%にも満たないのが現状である。このように、我々人類は肝内胆管がんを未だ理解しているとは言えず、今後の研究で肝内胆管がんの発症機構を解明し、治療の難しい肝内胆管がんを初期検診で見つけ出す方法や、これまでにない新しい概念に基づいた治療法を開発する必要がある。

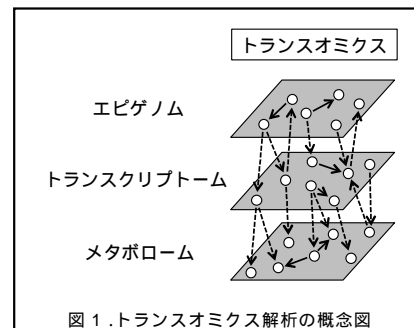
病理学的所見において、管状もしくは袋状の形態を有する偽胆管構造の増加が顕著であることが、肝内胆管がんが胆管上皮細胞に由来することを示す根拠のひとつになっている。しかしながら、この仮説を科学的に検証した例はこれまでになかった。臨床的にみて、ウイルス性肝炎により肝細胞がんを発症した患者にも肝内胆管がんがしばしば見られることから、肝内胆管がんが肝細胞の形質転換に由来する可能性も排除できない。そこで我々は、肝内胆管がんが従来の考え通りに胆管上皮細胞から生じるのか、それとも実際は肝細胞から生じる腫瘍なのかを検証すべく解析を行った。その結果、これまでの常識を覆し、肝内胆管がんが Notch シグナルを介した肝細胞の運命転換によって生じる腫瘍であることが判明した(引用文献 1)。興味深いことに、肝内胆管がんの発生母地となる肝細胞の性状変化は、薬剤投与による肝障害からわずか数日のうちに開始され、その後半年以上の月日を経て腫瘍形成に至ることも明らかとなった(引用文献 2)。これは、従来考えられている遺伝子変異を起点とした発がんよりもかなり前から肝細胞に性状変化が生じていることを示唆している。したがって、肝内胆管がんの発症機構を理解するためには、発がんプロセスの時期を大幅に前倒しし、遺伝子変異に至るかなり前に肝細胞に生じる性状変化を解明する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

肝内胆管がんの極めて初期に生じる肝細胞の異常を解析し、そのシステム的理解から肝内胆管がんの早期診断や治療法の開発につながる情報の取得を目指す。

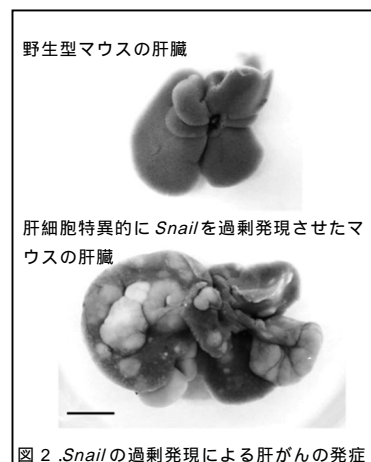
3. 研究の方法

マウスの肝内胆管がん発症モデルを用いて、肝障害誘導直後から肝細胞に生じる性状変化として「エピジェネティック変化(エピゲノミクス)」、「遺伝子発現変化(トランスクリプトミクス)」、「代謝リプログラミング(メタボロミクス)」に焦点をあてた解析を行い、得られる多階層オミクスデータの統合的解析(トランスオミクス解析)(図 1)から肝内胆管がん発症機構のシステム的理解を目指す。また、肝内胆管がんの細胞起源となる肝細胞の異常に着目し、上皮間葉転換を誘導する転写因子として知られる Snail を肝細胞で過剰発現させ、その結果生じる細胞、臓器、個体の異常を解析する。



4. 研究成果

肝内胆管がんモデルマウスから得た肝細胞のエピゲノム状態変化や遺伝子発現変化を明らかにし、それらオミクスデータの統合的解析に成功した。また、メタボローム・リポドーム解析を行う上で必要となる組織からの肝細胞採取法を確立し、実際に肝障害を与えたマウスの肝臓を用いて解析を行うことで新たな知見を得ることができた(論文投稿準備中)。また、任意の時間で肝臓や肝細胞特異的に Snail を過剰発現できるマウスを作製し、肝内胆管がんの細胞起源となる肝細胞の異常について解析を行った。その結果、当該マウスは著しい脂肪肝と肝肥大を呈し、100%の確率で肝がんを発症して死に至ることが判明した(図 2)。そこで、引き続きそのメカニズムについて解析を行ったところ、Snail は肝細胞間の密着結合(タイトジャンクション)を構成する *Cldn3* や *occludin* などの遺伝子発現を抑制するとともに、胆汁酸合成に関わる酵素の遺伝子発現も抑制することで、肝細胞間のタイトジャンクションによって形成される毛細胆管構造を破壊し、異常な胆汁酸の血中放出を促すことが判明した。その結果として、当該マウスは黄疸を呈し、胆汁酸による肝障害が続くことで脂肪肝や肝がんを発症すると考えられた(引用文献 3)。また、当該マウスでは胆管上皮細胞の分化が強く抑制されていたことから、肝細胞における Snail の過剰発現は、肝内胆管がんの初期過程において生じる肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換も阻害すると考えられた。このことから、本研究成果は、肝内胆管がんの発症機構を考える上で重要な知見となった。



<引用文献>

1. Sekiya S. and Suzuki A. Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest* 122, 3914–3918, 2012.
2. Terada M., Horisawa K., Miura S., Takashima Y., Ohkawa Y., Sekiya S., Matsuda-Ito K., Suzuki A. Kupffer cells induce Notch-mediated hepatocyte conversion in a common mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep* 6, 34691, 2016.
3. Miura S. and Suzuki A. Induction of steatohepatitis and liver tumorigenesis by enforced *Snail* expression in hepatocytes. *Am J Pathol*, in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura, S. and Suzuki, A.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Induction of steatohepatitis and liver tumorigenesis by enforced Snail expression in hepatocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	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) 10.1016/j.ajpath.2020.02.005	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 Terada, M., Kawamata, M., Kimura, R., Sekiya, S., Nagamatsu, G., Hayashi, K., Horisawa, K., Suzuki, A.	4. 巻 57
2. 論文標題 Generation of Nanog reporter mice that distinguish pluripotent stem cells from unipotent primordial germ cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 e23334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23334	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 Tan, J.L., Li, F., Yeo, J.Z., Yong, K.J., Bassal, M.A., Ng, G.H., Lee, M.Y., Leong, C.Y., Tan, H.K., Wu, C.S., Liu, B.H., Chan, T.H., Tan, Z.H., Chan, Y.S., Wang, S., Lim, Z.H., Toh, T.B., Hooi, L., Low, K.N., Ma, S., Kong, N.R., Stein, A.J., Wu, Y., Thangavelu, M.T., Suzuki, A., et al.	4. 巻 157
2. 論文標題 New high-throughput screen identifies compounds that reduce viability specifically in liver cancer cells that express high levels of SALL4 by inhibiting oxidative phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1615, 1629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2019.08.022	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 該当する
1. 著者名 Ishiuchi, T., Ohishi, H., Sato, T., Kamimura, S., Yorino, M., Abe, S., Suzuki, A., Wakayama, T., Suyama, M., Sasaki, H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Zfp281 shapes the transcriptome of trophoblast stem cells and is essential for placental development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1742, 1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.04.028	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 Yamamoto, J., Uono, M., Miura, S., Sekiya, S., Suzuki, A.	4. 巻 25
2. 論文標題 Cell aggregation culture induces functional differentiation of induced hepatocyte-like cells through activation of Hippo signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 183, 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.09.010	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 Takashima, Y., Horisawa, K., Uono, M., Ohkawa, Y., Suzuki, A.	4. 巻 109
2. 論文標題 Prolonged inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation by combinatorial expression of defined transcription factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3543, 3553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13798	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 Miura, S. and Suzuki, A.	4. 巻 60
2. 論文標題 Brief summary of the current protocols for generating intestinal organoids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 387, 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12559	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 Kawamata Masaki, Suzuki Atsushi	4. 巻 162
2. 論文標題 Cell fate modification toward the hepatic lineage by extrinsic factors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 11 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/jb/mvx028	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 Semba Yuichiro, Harada Akihito, Maehara Kazumitsu, Oki Shinya, Meno Chikara, Ueda Jun, Yamagata Kazuo, Suzuki Atsushi, Onimaru Mitsuho, Nogami Jumpei, Okada Seiji, Akashi Koichi, Ohkawa Yasuyuki	4. 巻 45
2. 論文標題 Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8758 ~ 8772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkx475	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 Miura Shizuka, Suzuki Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Generation of Mouse and Human Organoid-Forming Intestinal Progenitor Cells by Direct Lineage Reprogramming	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 456 ~ 471.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2017.08.020	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25件 (うち招待講演 15件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Horisawa, K., Miura, S., Izumi, Y., Bamba, T., Suzuki, A.
2. 発表標題 Trans-omic analysis for metabolic remodeling during liver regeneration
3. 学会等名 The 29th Hot Spring Harbor International Symposium "Cutting Edge of Technical Innovations in Trans-Omics" (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 転写因子が引き起こすエピジェネティックリモデリングと細胞運命転換
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川又理樹, 木村亮太, 鈴木淳史
2. 発表標題 CRISPR-Cas9の活性調節によるアレル選択的ゲノム編集法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴殿美弥子, 堀澤健一, 村山僚, 鈴木淳史
2. 発表標題 由来の異なる組織由来iHep細胞における遺伝子発現の比較解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによる機能性肝細胞の作出と肝再生医療
3. 学会等名 第31回JBICバイオ関連基盤技術研究会「肝疾患 (NAFLD/NASH) と肝再生医療」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲田浩気, 鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の作製
3. 学会等名 PHILOSOPHY
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki, A.
2. 発表標題 Generation of induced intestinal stem and progenitor cells by direct lineage reprogramming
3. 学会等名 The Copenhagen Bioscience Conference on Intestinal Organoids - from stem cells to metabolism and microbiome interactions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki, A.
2. 発表標題 Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages
3. 学会等名 International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages
3. 学会等名 第33回九州免疫血液研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによる腸上皮オルガノイドの作製
3. 学会等名 第18回GIリサーチフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦静、鈴木淳史
2. 発表標題 肝細胞におけるsnailの過剰発現は肝細胞癌を誘導する
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 従野雅義、堀澤健一、鈴木淳史
2. 発表標題 肝細胞へのダイレクトリプログラミングを阻害する転写因子の同定
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤那奈子、鶴殿美弥子、鈴木淳史
2. 発表標題 線維芽細胞の不均一性がiHep細胞誘導に与える影響
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 転写因子が引き起こすエピジェネティックリモデリングと細胞運命転換
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yorino, M., Horisawa, K., Suzuki, A.
2. 発表標題 Identification of transcription factors repressing direct conversion of mouse embryonic fibroblasts into induced hepatocyte-like cells
3. 学会等名 The 28th Hot Spring Harbor Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki, A.
2. 発表標題 Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages
3. 学会等名 2018 The 14th Annual Meeting of TSSCR: From Pluripotency to 3D Organoid and Personalized Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 肝臓と腸上皮組織におけるダイレトリプログラミング研究の進展
3. 学会等名 琉球医学会特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによる細胞創生と医療応用
3. 学会等名 九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki, A.
2. 発表標題 Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages
3. 学会等名 International Symposium on Epigenome 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによる肝細胞誘導の標準化
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki Atsushi
2. 発表標題 Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages
3. 学会等名 The 27th Hot Spring Harbor International Symposium “Frontiers in Stem Cell Research and Reprogramming”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦静、鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによるオルガノイド形成能を有するマウスおよびヒト腸前駆細胞の作製
3. 学会等名 新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」総括班主催「若手の会」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによる腸前駆細胞の作製
3. 学会等名 第7回Hepato-Diabetology Conference (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦静、鈴木淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによるオルガノイド形成能を有するマウスおよびヒト腸前駆細胞の作製
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ゲノム編集された細胞の製造方法	発明者 鈴木淳史、川又理樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-232946	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室ホームページ
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/orgreg/top.html>

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
研究協力者	堀澤 健一 (Horisawa Kenichi)		
研究協力者	川又 理樹 (Kawamata Masaki)		
研究協力者	三浦 静 (Miura Shizuka)		
研究協力者	大川 恭行 (Ohkawa Yasuyuki)		
研究協力者	馬場 健史 (Bamba Takeshi)		