

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07653

研究課題名(和文) 包括的1細胞遺伝子解析技術の肝細胞腺腫の早期診断へ適用

研究課題名(英文) Application of Comprehensive Single-cell Analysis Technology for Early Diagnosis of Hepatocellular Adenomas

研究代表者

岩淵 禎弘 (Iwabuchi, Sadahiro)

和歌山県立医科大学・医学部・先端医学研究所・講師

研究者番号：80597922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞腺腫はまれな良性腫瘍であり日本国内では10万人に1人程度である。肝細胞腺腫から肝細胞癌への移行は統計学的に4.7-10%であり、診断医が両者の見分けがつかない場合は肝細胞癌疑いとして肝切除が実施される。肝細胞腺腫に特徴的な遺伝子マーカーが見つければ、侵襲的な手術をせずに適切な保存療法が選択される。本成果では新鮮な肝細胞腺腫、肝細胞癌組織を数症例分散し、個々の1細胞における遺伝子発現解析結果を比較して新たな肝細胞腺腫マーカーPLA2G2Aなどを同定した。また肝細胞腺腫と診断された過去の症例のパラフィン包埋された固定標本に対して、PLA2G2A抗体による染色を実施して検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状は造影MRI診断などから腫瘍サイズが5cm以上と大きい場合、肝細胞腺腫疑いと診断されても肝生検をせずに肝細胞癌へのリスクがある10%程度の可能性を考慮して肝切除が優先される。悪性度の低い肝細胞腺腫であれば、肝切除を回避して亜型毎の温存治療(経口避妊薬の場合は中止など)も提示でき、肝切除対象のケースでも根治するためにHCCリスクへの予防遺伝子治療などに期待できる。

今後は本研究成果で見出した新規HCAマーカー候補を新たに診断されるHCA疑い症例に対して遺伝子発現解析や免疫組織化学的染色などで更に詳細に調べることで、再検証する。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular adenoma (HCA) is a rare benign tumor and statistically associated with a 4.7-10% conversion to hepatocellular carcinoma (HCC). If the diagnosing physician is unable to distinguish between them, a liver resection is performed as if the patient was suspected of having HCC. Therefore, the new biomarkers characteristic of HCA are needed to choose appropriate conservative therapy without invasive surgery.

In this study, we performed single-cell analysis for fresh HCA and HCC tissues to identify new HCA markers such as PLA2G2A. In addition, paraffin-embedded fixed specimens of previous cases diagnosed as HCA were stained with PLA2G2A antibody for validation. Thus, these genes might be the candidate for new biomarkers of HCA.

研究分野：1細胞遺伝子発現解析、腫瘍免疫、神経科学

キーワード：肝細胞腺腫 肝細胞癌 1細胞遺伝子発現解析 PLA2G2A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞腺腫(Hepatocellular Adenoma: HCA)はまれな良性腫瘍であり日本国内では 10 万人に 1 人程度である。海外における報告では、HCA 患者は症状がなく大半は発見されず、約 85%が蛋白同化ホルモン、経口避妊薬を服用している若い女性に発症し、HCA が徐々に増大して腹部の痛みまたは破裂による腹腔内に出血で自覚する。近年は脂肪肝や糖尿病からも発症するケースが認められている。HCA から肝細胞癌(Hepatocellular Carcinoma: HCC)への移行は統計学的に 4.7-10%であり、HCA と HCC の見分けがつかない場合は HCC 疑いとして肝切除が実施される。2010 年の新 WHO 分類により肝細胞の遺伝子変異と免疫組織科学的所見より 5 つの亜型に分類され、その 1 つは HCA 典型像ではない造影 MRI 画像であり、特定の遺伝子に絞った組織染色でも HCA と HCC との区別が難しい不確定型の亜型 HCA 症例が存在する。自覚症状が始める早期に HCA の判別ができれば、HCC へ移行する前に適切な処置で HCA は完治可能である。HCA の新たな亜型の定義と HCC 悪性度との関連、これまでは肝細胞における HCA 診断基準だけであったが微小環境内に存在する他の細胞でも HCA と HCC との差別化ができれば、HCA の診断基準の確度が上がり、肝切除による患者負担が激減するが、これを解決するには包括的 1 細胞遺伝子解析が有用となる。

2. 研究の目的

包括的 1 細胞遺伝子解析手法を用いて亜型の異なる数症例の HCA における共通な細胞集団の同定とすべての HCA に強発現する遺伝子候補を探索する。また HCC におけるシングルセル解析結果と比較し、これまでに蓄積されている病理組織切片を用いた免疫染色を実施することで、新しい HCA 独自のバイオマーカーを探索する。また HCA から多種多様な HCC に移行する細胞集団を特定させることで、良性腫瘍から悪性腫瘍へ変貌するメカニズム解明の一端を目指し、HCA 亜型毎の治療法を提言できる遺伝子候補ライブラリを作製する。

3. 研究の方法

各種組織に対する 1 細胞遺伝子発現解析、免疫組織化学的染色、遺伝子発現解析(RNA-seq)を以下の手順で実施した。

- (1)手術当日の新鮮な HCA 疑いまたは HCC 検体組織を常法に従って 1 細胞化する。
- (2)Nx1-seq などの 1 細胞遺伝子解析デバイスにてシーケンス用ライブラリを作製する。
- (3)各種サンプルにおけるシーケンスデータに対して tSNE 解析等を用いて組織構成細胞集団を同定する。また HCA 組織単独および背景肝、HCC 組織と合わせてクラスタリングして HCA 特徴的な細胞集団を同定する。各種細胞の同定には、これまでに報告されているデータベースを用いる。HCA 細胞集団に関しては、炎症性 HCA 型の既知のマーカーである *SAA1/SAA2*、*CRP* 遺伝子発現動態などを調べる。
- (4)同定した HCA 細胞集団において、背景肝や他の HCC 組織に対する 1 細胞解析結果と照らし合わせ、*PLA2G2A* をはじめとする従来の HCA 診断に利用されていない新規の遺伝子群および他の疾患と区別化できる遺伝子群を抜粋する。抗体が市販されている場合は、免疫組織化学的染色により特異性などを調べる。
- (5)過去にパラフィン包埋されて固定された HCA 組織を他大学等含めて入手し、RNA-seq を行い *PLA2G2A* 遺伝子発現の確認および HCC 組織の RNA-seq と比較し、HCA 特異的な Gene Ontology 解析などを行う。

4. 研究成果

新鮮な HCA 手術検体は研究期間内に 3 症例入手することはできなかった。金沢大学と和歌山県立医科大学で連携したが、患者数が稀である点の他に、新型コロナウイルス感染症により肝手術数が一定期間、減少したことも原因であった。一方、新鮮 HCC 検体、パラフィン包埋固定された HCA 検体は目標数症例、入手できた。

まず 1 細胞遺伝子発現解析に関しては、(1)HCA 単独解析、(2)2 つの正常肝組織、3 つの非 B 非 C 型肝炎ウイルス性 HCC、2 つの B 型肝炎ウイルス性 HCC を用いて詳細な比較検討を行った。

(1) HCA 単独解析(1 細胞遺伝子発現解析)

これまでに報告がない HCA 症例に対する 1 細胞遺伝子発現解析より、本法における解析では 8 個の細胞集団(4 つのマクロファージ、2 つの肝細胞集団、1 つの T 細胞、血管内皮細胞)に分けられた(図 1A、B)。

HCA 細胞集団に関しては、既知の HCA マーカーである SAA1/SAA2、CRP 発現が高い細胞集団とした(C)。2 つの HCA 細胞集団(クラスター #5 と #8)における遺伝子発現動態の相違(図 1D、E)および HCA 細胞集団のみを再度、クラスター解析を行って HCA 特異的な遺伝子発現動態を調べた(図 1F)。HCA 細胞集団には *TFR2*、*COX6A1*、*LAP3* などの発現が高い細胞集団が存在したが、それら遺伝子群の組織全体における発現分布に特徴は認められなかった。したがって、HCA 単独解析では、HCA 細胞集団の特徴的な遺伝子群(T 細胞、血管内皮細胞などには発現しない)を選別することは難しかった。

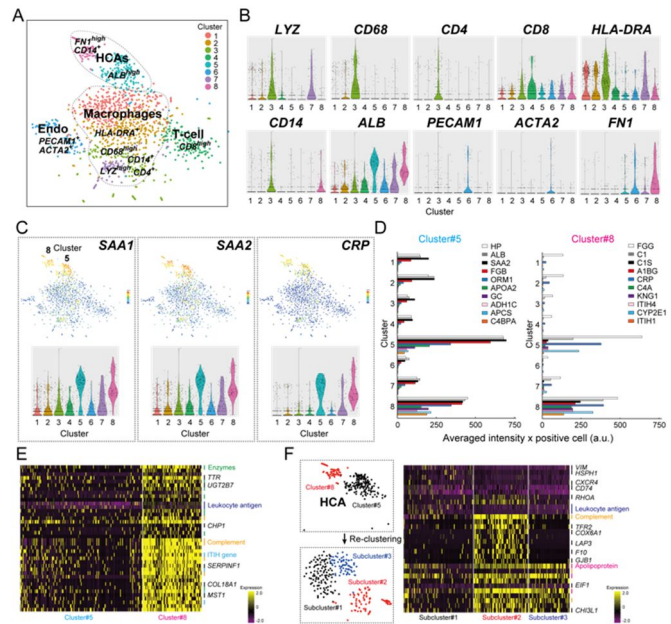


図 1: HCA 単独 1 細胞遺伝子発現解析結果

(2)HCC 関連組織との比較

た 3 つの HCC 組織における 1 細胞遺伝子発現解析データと HCA 組織 1 細胞解析データを網羅的に解析した結果、19 個の細胞集団に分けられた(図 2A、B)。がん細胞集団が 5 つに分けられており、それぞれの HCC 組織由来の多様性を示すものであった。クラスター #15 と #18 で HCA 特異的なマーカー発現が強く、そのクラスターを特徴付ける遺伝子群として、*PLA2G2A*、*APOA4* などが見つかった(図 2C~F)。また両クラスターにおける *PLA2G2A* 遺伝子と相関して発現している遺伝子を検討した結果、クラスター #15 は *ALB*、*SAA1*、*SAA2* など従来の HCA マーカーであり、クラスター #18 は *TAGLN2* など線維化組織に関連するマーカーであっ

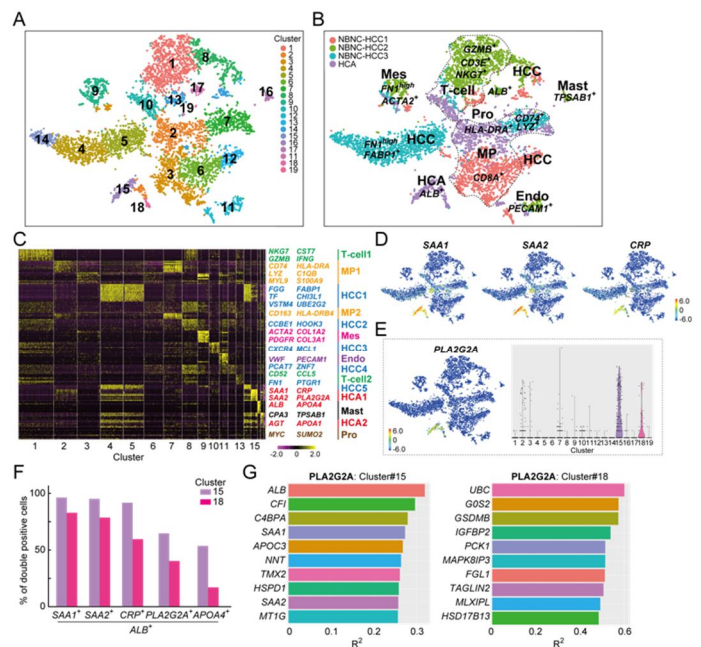


図 2: 3 つの HCC 組織における 1 細胞遺伝子発現解析と比較

た。また2症例の背景肝、2症例のB型肝炎ウイルス性HCCにおける1細胞遺伝子発現解析データと比較したが、*PLA2G2A*はHCA細胞集団特異的に発現していることが判明した。以上より、HCA単独1細胞解析では見出せなかった、*PLA2G2A*など新たなHCA特異的マーカー候補がHCC検体と比較することで検出でき、このHCA症例は亜型分類に則り、「高分化型HCCではなく*HIF1A*不活性化かつI-HCA型で*PLA2G2A*遺伝子発現が高い症例」であることが判明した。

(3)免疫組織化学的染色およびRNA-seqによる検証

市販されている*PLA2G2A*抗体を用いて、4症例の背景肝、5症例のHCA、6症例のHCC症例に対して免疫組織化学的染色を検討した。その結果、HCA症例における肝細胞およびマクロファージ様細胞で*PLA2G2A*陽性反応が強く認められた。しかし各施設による検体処理法(固定方法、固定時間など)の違いにより、統一した不活化処理条件を見出すのが難しく、背景肝やB型肝炎由来HCC組織の一部でも*PLA2G2A*陽性細胞が認められたが、それらはHCAでの染色パターンとは異なっていた。現在、染色条件(不活化処理の最適化)を含めて詳細な検討を重ねており、将来的に病理医が*PLA2G2A*抗体を用いてHCAとHCCの区別化が可能になるか、要継続検討項目である。

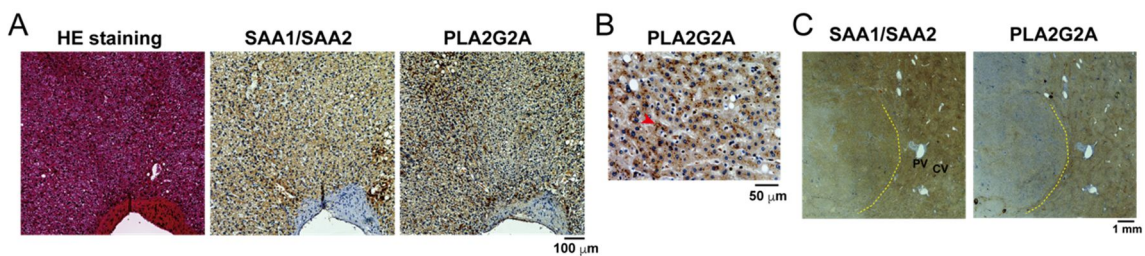


図3: HCA組織における免疫組織化学的染色の結果。(A) 同組織内におけるHE、SAA1/SAA2、*PLA2G2A*染色。(B) *PLA2G2A*染色拡大図。(C) SAA1/SAA2染色では病理医によるHCA組織境界線(黄色点線)と明確に分かれなかったが、*PLA2G2A*染色ではHCA組織側のみ強発現していた。

また過去にHCAと診断されたパラフィン包埋組織2検体からRNAを抽出し、RNA-seqを実施した。*PLA2G2A*発現はSAA1/SAA2と同様、HCA組織で強発現していたが、背景肝やC型肝炎ウイルス由来HCC組織でも微量の*PLA2G2A*遺伝子発現は認めた。またHuman Cell AtlasによるHCC患者生存率と*PLA2G2A*発現に相関はなく、少なくとも*PLA2G2A*を強発現する亜型HCAはHCCへのリスクが低い可能性が示唆されるが、より統計学的な評価が必要となる。

現状は造影MRI診断などから腫瘍サイズが5cm以上と大きい場合、HCA疑いと診断されても肝生検をせずにHCCへのリスクがある10%程度の可能性を考慮して肝切除が優先される。今後、今回認められた新規HCAマーカー候補を稀なHCA症例に対して遺伝子発現解析や免疫組織化学的染色などで詳細に調べることで、肝切除を回避して亜型毎の温存治療(経口避妊薬の場合は中止など)も提示でき、肝切除対象のケースでも根治するためにHCCリスクへの予防遺伝子治療などに期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩淵 禎弘, 川口 和紀, 本多 政夫, 橋本 真一
2. 発表標題 肝細胞腺腫の新たな亜型の同定
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩淵 禎弘, 橋本 真一
2. 発表標題 肝細胞がんおよび肝細胞腺腫内微小環境におけるマクロファージの1細胞遺伝子解析
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩淵 禎弘, 橋本 真一
2. 発表標題 ヒトC型肝炎ウイルス由来肝細胞がんに対する包括的1細胞遺伝子解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩淵 禎弘, 川口 和紀, 本多 政夫, 山下 太郎, 山下 竜也, 金子 周一, 橋本 真一
2. 発表標題 シングルセル解析による肝腺腫のバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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	本多 政夫 (Honda Masao) (00272980)	金沢大学・保健学系・教授 (13301)	

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