

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07706

研究課題名(和文) 不規則再生肝細胞に着目した新規肝癌バイオマーカーと創薬ターゲットの開発

研究課題名(英文) Development of novel hepatocellular carcinoma biomarkers and drug targets focusing on irregularly regenerating hepatocytes.

研究代表者

山崎 元美 (YAMAZAKI, Motomi)

日本大学・医学部・PD

研究者番号：40376794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：不規則再生肝細胞と正常肝細胞に着目し、ホルマリン固定された肝癌手術標本から、それぞれの細胞をLMDで回収後、RNA-seqを行い、複数個の肝癌発症候補遺伝子を同定した。臨床データ(血液データ、組織所見、予後や累積再発率など)と関連のある遺伝子としてCDT1に着目し、さらなる解析を行った。CDT1は細胞周期において必須の遺伝子であり、今回の研究結果から、肉眼的非癌部においてCDT1が高発現している群では、生命予後が不良であり、累積再発率が高いことが明らかとなり、新たな治療標的となりうること、さらに予後予測バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したCDT1は、既に様々な癌細胞で高発現していることが報告されているが、肝癌手術標本の肉眼的正常部でCDT1の発現が高い群では、生命予後の不良、累積再発率が高いことが明らかとなった。CDT1の局在を検討したところ、肉眼的正常部にも不規則再生肝細胞においてCDT1が発現していることが分かった。また、一部の不規則再生肝細胞では、既存の腫瘍マーカーや増殖マーカーと共局在することも分かった。肝癌は慢性肝炎から数十年を経て発症することから新たな治療標的となりうること、さらに予後予測バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We focused on irregularly regenerated hepatocytes and normal hepatocytes. After LMD recovery of each cell from formalin-fixed surgical specimens of hepatocarcinoma, we performed RNA-seq to identify multiple candidate genes for hepatocarcinogenesis. Further analysis focused on CDT1 as a gene correlated with clinical data (blood data, histological findings, prognosis and cumulative recurrence rate, etc.) CDT1 is an essential gene in the cell cycle, and the results of this study showed that the group with high CDT1 expression in grossly non-cancerous areas had a poor prognosis and a high cumulative recurrence rate. The results of this study suggest that CDT1 may be a new therapeutic target and a potential prognostic biomarker.

研究分野：医学

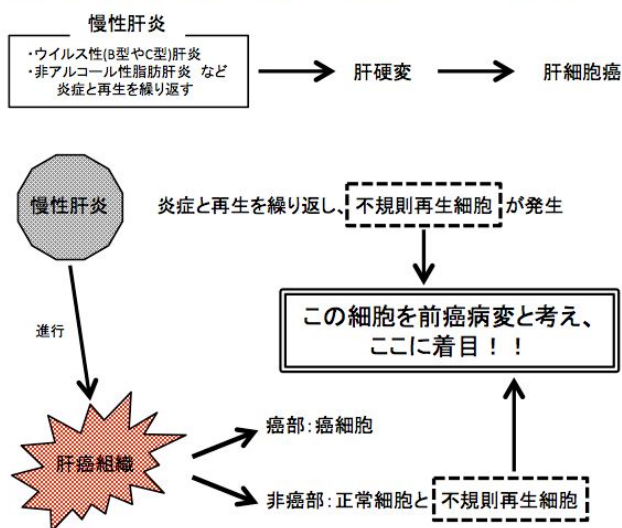
キーワード：不規則再生肝細胞 肝癌 バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦においては、高齢化に伴い癌による死亡率が年々増加しており、癌発生の予防は重要な課題の一つである。肝細胞癌(肝癌)は、慢性肝炎(B型肝炎、C型肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎など)から、炎症と再生を繰り返し、肝硬変を経て発症するものが多く、5年相対生存率は30%、10年では16%と予後不良である。肝癌は慢性肝炎から約20~30年の歳月をかけ、炎症と再生を繰り返すことで様々な遺伝子に変異が入り、蓄積することで発癌リスクがあがると考えられているが、未だに予防や予後診断に有効な確立された臨床マーカーはない。代表者らの教室では、以前より肝癌発生の背景因子として、肝細胞不規則再生の程度が重要であることを報告している(Hepatology, 2000)。そこで、肝癌組織中の不規則再生細胞と慢性肝炎時の不規則再生細胞に着目し、この細胞を前癌病変と捉え、今までとは異なる視点からのアプローチが肝炎から肝癌への新たなバイオマーカーと治療標的の開発につながると考えた(図1)。すでに、肝癌手術切除標本の同一切片から癌細胞と非癌部不規則再生細胞をレーザーマイクロダイセクション(LMD; Laser microdissection)で回収し、次世代シーケンサー(NGS; Next generation sequencer)で網羅的な遺伝子解析の1つであるRNA sequence (RNA-seq)を行い、肝癌の発症に関与していると考えられる24個の遺伝子を同定している。さらに3つの遺伝子で、臨床データ(血液データ、組織所見、予後や累積再発率など)と相関していることが分かった(現在、投稿中)。既存の研究と異なった視点である不規則再生細胞に着目することで見いだした肝癌発症候補遺伝子は、肝癌の予防・抑制・治療に貢献すると考えた。

図1 不規則再生細胞制御による予防および治療戦略



2. 研究の目的

本研究の最終目的は、不規則再生細胞に着目して絞り込んだ肝癌発症候補遺伝子が慢性肝炎から肝癌までの新たなバイオマーカーや治療標的となりうるかを明らかにすることである。すでに、肝癌手術標本100人分の癌部と非癌部において、LMDを用いたRNA-seqの結果から24個の肝癌発症候補遺伝子を同定し、その中から3つの肝癌発症候補遺伝子が臨床データ(血液データ、組織所見、予後や累積再発率など)と相関があることを明らかとした。本研究では、不規則再生細胞を前癌病変と考える独自性の高い研究であり、既存の研究とは異なる視点から絞り込んだ24個の肝癌発症候補遺伝子の発現を慢性肝炎の肝生検組織で検討し、慢性肝炎から肝癌に進行するものと、肝癌に進行しないものとを区別出来るバイオマーカーとしての可能性について検討する。また、絞り込んだ肝癌発症候補遺伝子に関して、分化度の異なる肝癌細胞株を用いて、強制発現あるいは遺伝子抑制系を確立し機能解析も行う。不規則再生細胞の研究の多くは2000年以前の報告が多く、近年の分子生物学的手法の1つであるNGSでRNA-seqを行った報告は今のところなく、創造性の高い研究であると考えた。

3. 研究の方法

ホルマリン固定した肝癌手術標本からパラフィン切片を作製し、レーザーマイクロダイセクション(LMD; Laser microdissection)で異形肝細胞と正常肝細胞を回収し、RNAを抽出し、遺伝子の網羅的解析(AmpliSeq)を行った。臨床データ(血液データ、組織所見、生命予後や累積再発率など)と相関がある肝癌発症関連遺伝子を複数個絞り込み、そのうちの1つであるCDT1に着目し、新たに56人分の正常肝組織と肝癌組織でCDT1の遺伝子発現をqPCRで検討した。

タンパクレベルでの局在を免疫組織化学染色で検討した。また、既存の増殖マーカーや腫瘍マーカーとの共局在を蛍光免疫組織化学染色で検討した。

CDT1の発現に着目し、新たに4症例から正常肝細胞・異形肝細胞・肝癌細胞をLMDで回収し、次世代シーケンサー(NGS; Next generation sequencer)を用いた網羅的な遺伝子解析の1つであるRNA sequence (RNA-seq)で検討を行い、CDT1関連肝癌発症遺伝子を絞り込んだ。

分化度の異なる肝癌細胞株を用いて、siRNAでCDT1を抑制した時に変動する遺伝子をRNA-seqで解析し、タンパクレベルでの変動や細胞増殖についても解析を行った。

4. 研究成果

CDT1は、細胞周期において必須の遺伝子であり、既に様々な癌細胞で高発現していることが報告されている。今回、肉眼的正常肝組織においてCDT1が高発現している群では、予後が不良であり、累積再発率が高いことが明らかとなった。今回の検討に用いた検体は、HCV感染から数十年を経て、肝硬変から肝癌を発症したものである。組織学的観察を行ったところ、肉眼的には正常であっても、不規則再生肝細胞が存在しており、CDT1を高発現していることが分かった。

連続切片で HE と CDT1 の免疫組織化学染色を行い、不規則再生肝細胞と CDT1 発現の関係をスコア化し、不規則再生肝細胞との関連を明らかとした。

また、既存の増殖マーカーや腫瘍マーカーとの関係を検討するために、蛍光免疫組織で局在の検討を行ったところ、CDT1 陽性細胞の一部で増殖マーカーの一つである Ki-67 と共局在することが分かった。肝臓癌において、Ki-67 の検討は少なく、この結果から、CDT1 は肝臓癌において新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

CDT1 陽性細胞に着目し、新たに 4 症例から正常肝細胞・異形肝細胞・肝臓癌細胞で RNA-seq を行い、CDT1 関連肝臓癌発症遺伝子 13 個について検討を行っている。

分化度の異なる肝臓癌細胞株における CDT1 の発現を qPCR で検討したところ、正常肝組織と比べて、CDT1 の高発現が確認された。ウエスタンブロットでも CDT1 タンパクの発現を確認した。siRNA で CDT1 を抑制することで、遺伝子及びタンパクレベルでの抑制確認を行った。同時に、RNA-seq を行い、CDT1 関連肝臓癌発症遺伝子を絞り込んでいる。

これらの結果の一部を scientific reports(2022(8, 20508))に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mitsuhiko Moriyama, Tatsuo Kanda, Yutaka Midorikawa, Hiroshi Matsumura, Ryota Masuzaki, Hitomi Nakamura, Masahiro Ogawa, Shunichi Matsuoka, Toshikatu Shibata, Motomi Yamazaki, Kazumichi Kuroda, Hisashi Nakayama, Tokio Higaki, Kazunori Kanemaru, Toshio Miki, Masahiko Sugitani, Tadatoshi Takayama	4. 巻 12
2. 論文標題 The proliferation of atypical hepatocytes and CDT1 expression in noncancerous tissue are associated with the postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 scientific reports	6. 最初と最後の頁 20208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25201-6.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	森山 光彦 (MORIYAMA Mitsuhiko) (50191060)	日本大学・医学部・客員教授 (32665)	
研究分担者	黒田 和道 (KURODA Kazumichi) (50215109)	日本大学・医学部・研究員 (32665)	

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