

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20810

研究課題名（和文）包括的及び空間的な1細胞遺伝子解析を統合したC型肝炎由来発がん機序の解明

研究課題名（英文）Integrated analysis involving spatial transcriptomics and single-cell transcriptomics to elucidate the mechanism of hepatitis C-derived hepatocellular carcinogenesis.

研究代表者

今福 匡司 (Imafuku, Tadashi)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：10908809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス排除後の肝発がんリスクは未だに高い。その原因解明を困難にしているのは、組織内の細胞不均一性である。近年、不均一性解析として1細胞遺伝子解析が使用されるが、組織における細胞の位置情報が欠ける。本研究では、位置情報を保持した網羅的な遺伝子発現解析法である空間トランスクリプトーム解析を併用することで、肝がん進展機序の解明を目的とした。統合的な解析の結果、間質領域の細胞と隣接する肝がん細胞において病態進展に関連する遺伝子が高発現しており、これら遺伝子を高発現する肝実質細胞及びそのマーカー遺伝子も同定した。即ち、C型肝炎由来の発癌及びがん進展機構の一端を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、C型肝炎ウイルス排除後に発がんした肝臓癌組織のがん領域と正常領域の境界部に対して空間トランスクリプトーム解析を試行し、がん細胞と間質領域の細胞が隣接する領域に着目して解析することで、病態進展に関連する候補遺伝子及び前癌肝実質細胞とそのマーカー遺伝子を見出した。従って、この相互作用を阻害することで、C型肝炎からの発癌や進展を抑制できる可能性があり、新規治療法の開発に繋がると考える。

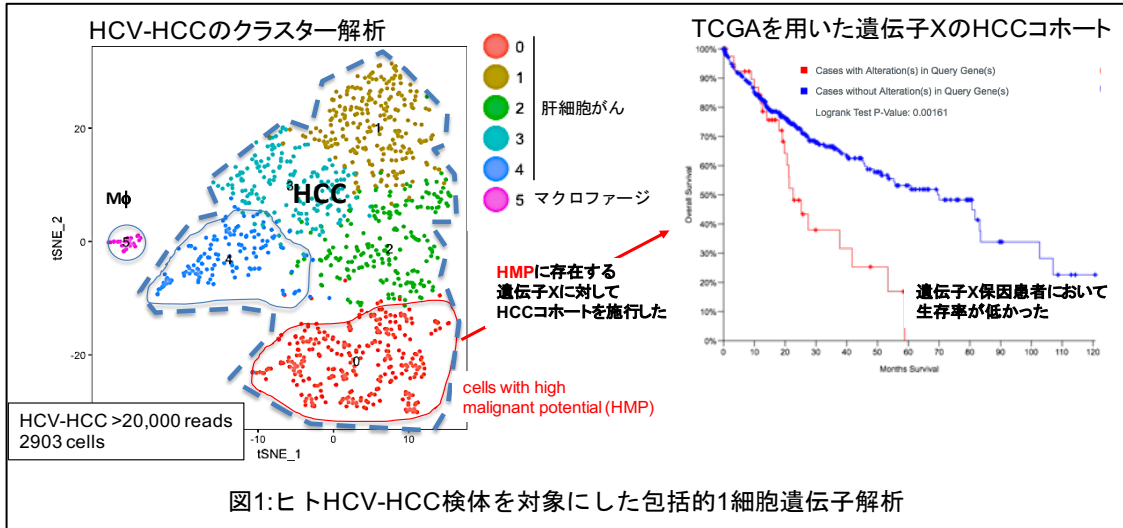
研究成果の概要（英文）：Hepatocellular carcinogenesis after hepatitis C virus elimination is still common. Cellular heterogeneity in tumor tissues makes it difficult to elucidate the mechanism of cancer pathology. Single-cell transcriptomics is a powerful tool for analyzing cellular heterogeneity, but it lacks spatial information such as the localization of cells. Recent reports have shown that spatial transcriptomics can conduct transcriptomics on intact tissue to preserve spatial information. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of cancer pathology by spatial transcriptomics and single-cell transcriptomics. This integrated analysis revealed that the genes to exacerbate cancer were highly expressed in hepatocarcinoma cells adjacent to cells in stroma area. In addition, we also identified the hepatocyte highly expressing the genes to exacerbate cancer and its marker genes. Hence, we found one aspect of the mechanism of hepatitis C-derived carcinogenesis and cancer progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：空間トランスクリプトミクス 腫瘍微小環境 C型肝炎由来肝癌 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

本邦における肝がんの患者数は約5万人と先進国の中で最も多く、C型肝炎は肝がんの原因において約7割を占める。C型肝炎治療では、近年の抗ウイルス薬開発により高率にC型肝炎ウイルスの排除が可能となったが、ウイルス排除後の肝発がんリスクは依然として課題である。その原因解明を困難にしているのは、肝炎及び肝がん組織内の細胞不均一性による複雑さである。当研究室では包括的1細胞遺伝子発現解析を用いて、ヒトC型肝炎由来肝がん組織(HCV-HCC)の微小環境中で遺伝子Xを特徴とした悪性度の高い肝細胞がん集団を同定した(図1)。一方、従来の包括的1細胞遺伝子発現解析のみでは空間的位置情報に欠ける。空間的位置情報は標的細胞と周辺細胞の細胞間相互作用の解析に重要であり、時系列的な解析によって病態進展機序の解明に貢献できる。この認識から近年、組織スライド上で遺伝子ライブラリーを合成することで、空間配置を保持したまま遺伝子解析を可能とする組織内キャプチャーベースの空間的遺伝子発現解析の手法が注目されている。



2. 研究の目的

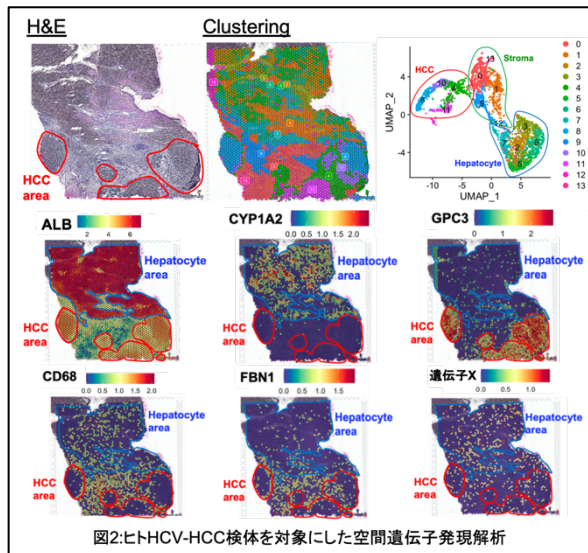
本研究では、ヒト HCV-HCC 組織検体を用いた包括的1細胞遺伝子発現解析により得られた遺伝子 X を含む悪性度の高い細胞集団に対して、空間的遺伝子発現解析を用いて時系列的に位置情報を解析し、C型肝炎由来発がん機構を解明する。

3. 研究の方法

和歌山県立医科大学倫理審査委員会にて審査承認済(承認番号 3009)「新規の single cell 解析法を用いた肝細胞がん構成細胞の遺伝解析」の протоколに基づいて肝切除術を施行し、得られたヒト HCV-HCC 組織検体を対象に 10xGenomics 社より販売されている Visium を用いて空間的遺伝子発現解析を実施し、遺伝子 X を発現する肝細胞癌(HCC)の組織中局在と周辺細胞との相互作用について解析を行った。

4. 研究成果

(1) HCV-HCC 臨床検体を用いて空間的遺伝子発現解析を施行した結果、HE 染色像で推定された HCC 領域において *AFP* や *GPC3* といった HCC 特異的な遺伝子が高発現しており、空間情報を保持した遺伝子発現解析が成功していることを確認した。また、全体のスポットのうち、HCC 領域のスポットと *CYP1A2* や *ADH1B* などの肝臓実質細胞で産生される酵素類が高発現した Hepatocyte 領域のスポットに加え、線維芽細胞(*FBNI*)やマクロファージ(*CD68*)などの遺伝子発現が高い間質(Stroma)領域にクラスター分類できた(図2)。しかし、包括的1細胞遺伝子発現解析で同定した遺伝子 X の局在を調べた結果、その発現は組織全体に散在しており、空間的情報からの解釈が難しかった(図2)。これは、Visium の mRNA をキャプチャーする1ス



ポットのサイズが直径 55um であり、1 から 10 細胞由来の mRNA を同一スポットでキャプチャーしてしまい、解像度が低いことが原因であると考えられる(図 3)。そのため、計画から一転して空間的遺伝子発現解析の情報から評価し、がん-間質相互作用に関連するターゲット遺伝子の探索を行い、包括的 1 細胞解析の結果に照らし合わせることで HCV-HCC の病態形成に重要な細胞集団及び遺伝子を同定する計画へと変更した。

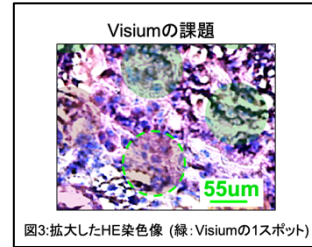


図3:拡大したHE染色像(緑:Visiumの1スポット)

(2) Visium では1 スポットあたり 1 から 10 細胞の mRNA をキャプチャーするため、HCC 領域のスポットには、HCC のみのスポットだけでなくスポットエリア内に間質領域の細胞を含んだスポットも存在する。即ち、このスポットの HCC は間質領域の細胞と隣接していると考えられる。これを利用して、HCC 領域のスポットを抽出・再クラスター化することで、間質領域の細胞と隣接する HCC スポットを特異的に解析することができると推察した。図 2 に示した HCC クラスタ(c4, c8, c10, c11)サブセットに対して、再正規化し、クラスタリングすると、図 4 に示すように 9 つのクラスターが得られた。このうち、c1 や c2, c3 のクラスターには、マクロファージマーカーである *CD68* や線維芽細胞マーカーである *FBNI* が高発現しており、これらクラスターの HCC は、間質領域の細胞と隣接しているものと推測された(図 4)。

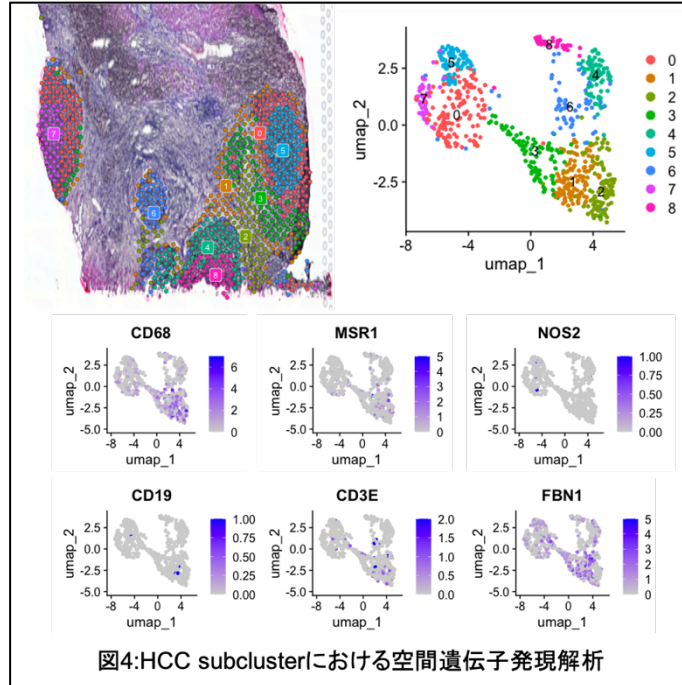


図4:HCC subclusterにおける空間遺伝子発現解析

次に、図 4 に示した 9 つの HCC 領域のサブクラスターに関して、KEGG pathway のエンリッチメント解析を行った。その結果、間質領域の細胞と隣接している 3 つのサブクラスターの内、c3 において cell cycle や p53 signaling pathway に関連する遺伝子が多いことが示された(図 5)。

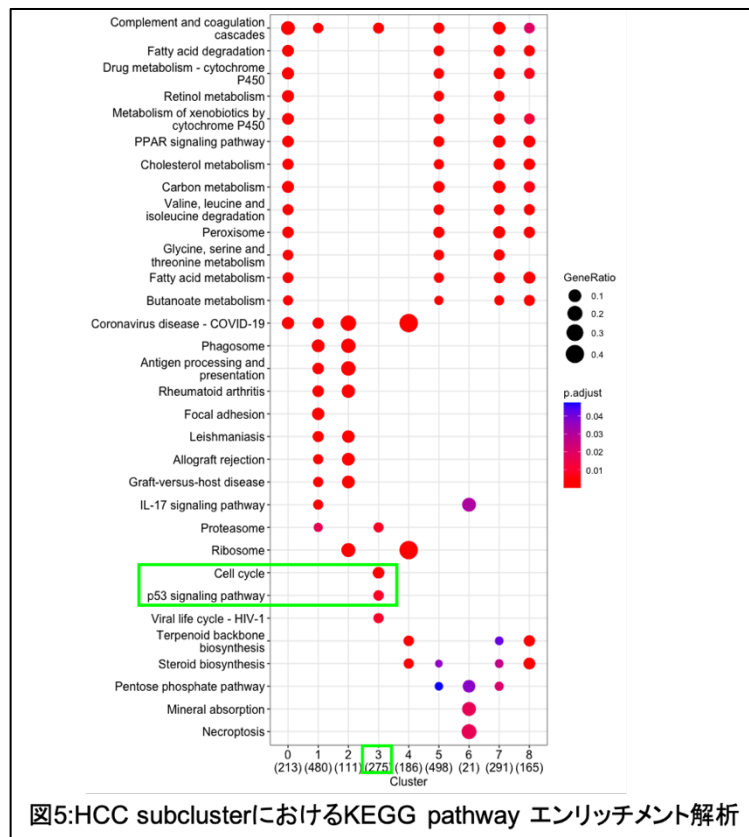


図5:HCC subclusterにおけるKEGG pathway エンリッチメント解析



また、c3に高発現する遺伝子として *SPINK1*, *MDK*, *NPW*, *TXNIP*などの遺伝子を同定した(図6)。これら遺伝子はc3に次いでc1やc2においても発現しており、間質領域の細胞との相互作用によって誘導されていると推察された。特に、*SPINK1*や*MDK*はがん細胞の増殖活性や血管新生、転移に関連することが報告されており、c3のHCCは、がん病態の進展を促進していると示唆される。

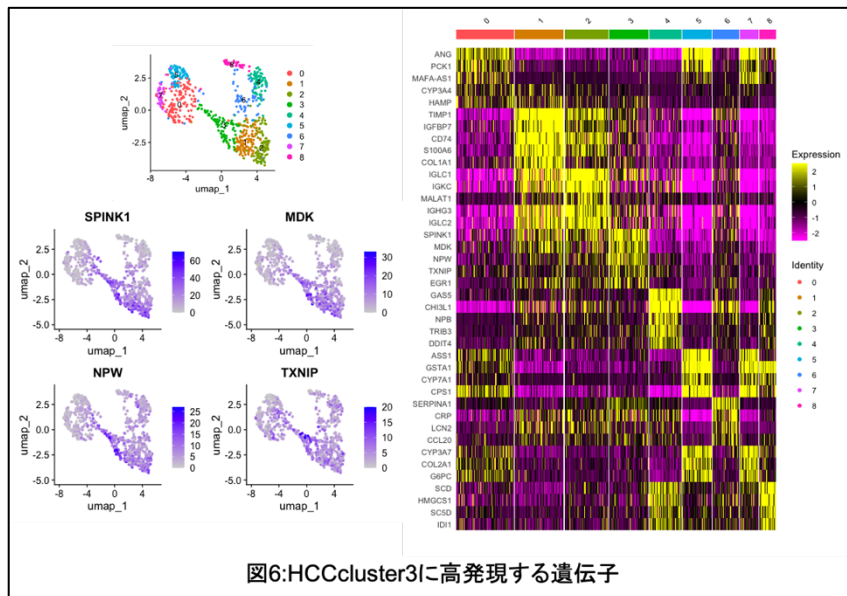


図6:HCCcluster3に高発現する遺伝子

(3)Visiumの解析では、1スポットに複数の細胞が混在するため、*SPINK1*や*MDK*の発現が間質領域細胞由来である可能性が否定できない。そこで、公開済みのHCC組織における1細胞遺伝子発現データを再解析し、*SPINK1*や*MDK*がどの細胞に発現するのかを調べた。その結果、*SPINK1*及び*MDK*は*GPC3*陽性のHCCクラスターに主に発現することが示された(図7)。従って、Visiumデータから同定した*SPINK1*及び*MDK*は、間質領域の細胞からの相互作用によりHCCで誘導されていることが示唆された。加えて、興味深いことに*SPINK1*及び*MDK*が高発現する肝実質細胞(*KRT18*陽性かつ*GPC3*陰性)クラスター18を見出した。我々はこの細胞集団が、間質領域に存在する免疫細胞や線維芽細胞などからの刺激を受けた前癌の実質細胞であると推察している。この細胞集団に特異的に高発現するマーカー遺伝子を調べた結果、*AGR2*や*PAGE2B*などいくつかの遺伝子を同定した(図7)。

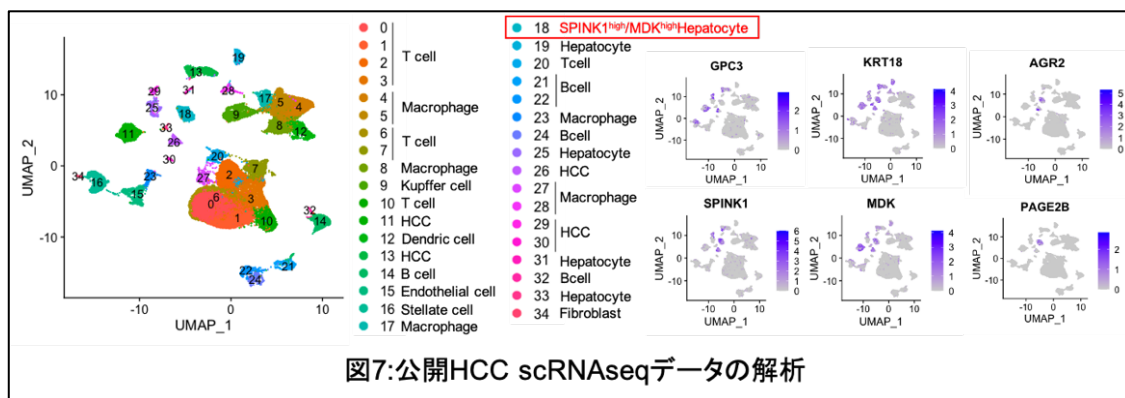


図7:公開HCC scRNAseqデータの解析

また、*AGR2*及び*PAGE2B*に関して、TCGA PanCancer Atlas Studiesの公開データを対象とした生存分析により、がん患者の予後予測を行った結果、どちらの遺伝子発現も予後不良に関連した(図8)。これら結果より、*SPINK1*及び*MDK*を高発現する肝実質細胞は前癌細胞であり、その存在が予後不良となる可能性が示唆された。

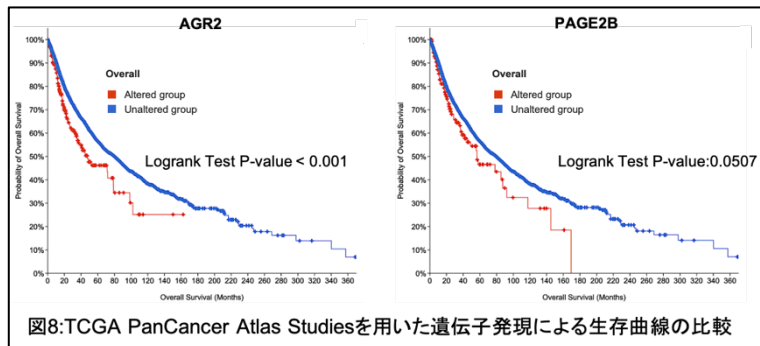


図8:TCGA PanCancer Atlas Studiesを用いた遺伝子発現による生存曲線の比較

本研究により、空間トランスクリプトーム解析を用いたがん-間質領域細胞の相互作用に着目し、がん進展に関連する候補遺伝子及び前癌肝実質細胞とそのマーカー遺伝子を見出した。研究期間中は、新型コロナウイルス対策の影響で十分に臨床検体を得ることができなかったが、現在は緩和されており、追加検体を得ることができている。今後は同定した遺伝子や細胞が他の検体でも共通しているのか、また前癌細胞の機能や癌化に着目して検討することでC型肝炎由来の発がん機構解明に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今福 匡司
2. 発表標題 C型肝炎由来肝がんを対象にした空間的トランスクリプトーム解析の一例
3. 学会等名 第49回 和歌山悪性腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今福 匡司
2. 発表標題 Diversity analysis of macrophages using spatial transcriptomics for human HCC patient
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2023 Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------