

平成 31 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10592

研究課題名(和文)胆管癌幹細胞の単離と新規治療標的の同定に関する研究

研究課題名(英文) Isolation of cancer stem cells of cholangiocarcinoma and identification of new therapeutic targets of cholangiocarcinoma

研究代表者

石井 隆道 (Ishii, Takamichi)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：70456789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CD90の発現は多くの癌種で予後不良因子として報告されている。肝内胆管癌におけるCD90発現の意義について検討することを本研究の目的とした。

肝内胆管癌手術検体においてCD90の発現は77例中25例でみられた。CD90発現はリンパ節転移との有意な相関関係が認められ、CD90発現は独立予後因子の一つであった。ヒト肝内胆管癌の細胞株を用いて解析したところ、分離した

CD90発現細胞はWnt/b-catenin signalingを介して上皮間葉転換関連遺伝子を高発現し高い転移能を有していた。その結果リンパ節転移のリスクが高くなり予後不良に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではCD90発現胆管癌細胞はin vitroではWnt/b-catenin signalingを介してEMT関連遺伝子を高発現し高い転移能を有しており、in vivoではリンパ節転移のリスクが高くなり予後不良に関与していた。この成果によりCD90陽性胆管細胞癌の転移メカニズムの一端が明らかされ、Wnt/b-catenin pathwayという胆管細胞癌に対する新規治療ターゲットが同定できた。このことによりCD90発現の有無によって治療戦略が異なり個別化医療へと繋がる可能性が示されたと考え、社会的意義を有すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Expression of CD90 has been reported as a poor prognostic factor in many cancer types. The purpose of this study was to investigate the significance of CD90 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma.

In the intrahepatic cholangiocarcinoma surgical specimens, the expression of CD90 was observed in 25 of 77 cases. The CD90 expression was significantly correlated with lymph node metastasis, and the CD90 expression was one of the independent prognostic factors. Analysis of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines revealed that the isolated CD90-expressing cells highly expressed epithelial-mesenchymal transition related genes via activated Wnt /b-catenin signaling, resulting in a high metastatic potential. Therefore, it is thought that the increased risk of lymph node metastasis related to poor prognosis in the CD90-expressing intrahepatic cholangiocarcinoma.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：転移能 胆管癌 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究の発展に伴い種々の性質を示す癌細胞が混在する癌組織においても自己複製能や多分化能、旺盛な腫瘍形成能を備えた幹細胞(癌幹細胞)が存在することが様々な癌において示唆されており、各癌種において同定および解析が進められている。癌幹細胞は高い浸潤能を有し腫瘍の転移や再発に関与しているとされ、画期的な治療ターゲットとして注目を集めている。特に胆管細胞癌においては、その転移を抑制することが癌治療効果を改善させることになると考えられるため、胆管癌幹細胞の同定・単離と特性解析は胆管細胞癌に対する新規治療法の開発において重要である。

我々は現在までにマウス胎仔肝から肝幹/前駆細胞を分離濃縮した上でその特性解析を行い、胎仔肝由来肝前駆細胞の *in vitro* における成熟化および未分化状態維持に関する研究を進めてきた。また、ES 細胞から肝細胞への *in vitro* での分化について研究し肝幹細胞に相当すると考えられる未分化内胚葉細胞を獲得するなど、肝幹/前駆細胞に関する知見を蓄積してきた。こうした知見を応用し肝幹/前駆細胞のマーカーである keratin 19 (K19)・alpha-fetoprotein (AFP)・CD90 に着目し肝胆膵領域の癌幹細胞の同定・単離および特性解析を進め、肝細胞癌において K19 が新規癌幹細胞マーカーであり TGFβ 受容体 1 阻害薬の新規治療標的となり得ること、胆管細胞癌において AFP 陽性細胞が癌幹細胞の性質を有することを示してきた。さらに、AFP 陽性胆管細胞癌の解析を進めた結果、予備的な解析でヒト胆管細胞癌切除標本において CD90 発現が無再発生存期間や全生存期間を有意に短縮させる因子であり、リンパ節転移と有意に相関する ( $P < 0.01$ ) ことが判明した。CD90 陽性胆管細胞癌の癌幹細胞としての特性解析を進め、その転移メカニズムを明らかにすることにより、胆管細胞癌に対する新規治療ターゲットが同定できるものと期待される。

## 2. 研究の目的

肝内胆管癌は肝原発の悪性腫瘍として肝細胞癌に次いで多い。他の多くの悪性腫瘍で新規治療が開発され予後も改善している一方で、肝内胆管癌は診断、治療ともに難しく依然として予後不良な疾患である。CD90 の発現は肝細胞癌など多くの癌種で予後不良因子として報告されている。しかし肝内胆管癌における CD90 発現に関する報告はほとんどない。そのためヒト肝内胆管癌における CD90 発現の意義について検討することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

当科において肝内胆管癌に対し切除手術が施行された 77 例の手術検体を用いて CD90 の発現を原発巣及びリンパ節転移巣に対して免疫組織学的染色を行い、臨床病理学的所見や予後との関連について検証した。さらに複数のヒト肝内胆管癌の細胞株を用いて、フローサイトメトリーで単離した CD90 陽性および陰性細胞の転移能に関する特性について検証を行った。

## 4. 研究成果

肝内胆管癌切除症例において CD90 の発現は 77 例中 25 例でみられた。臨床病理学的所見との関連においては、リンパ節転移との有意な相関関係が認められた。さらにリンパ節転移陽性と診断されたリンパ節についても CD90 で免疫染色を行ったところ、原発腫瘍で CD90 陽性細胞を認めた症例では転移リンパ節においても CD90 陽性細胞が有意に高頻度

に観察され、相関を認めた。Kaplan-Meier 分析では CD90 陽性症例は陰性症例と比較して無再発生存期間ならびに全生存期間ともに有意に予後不良であった。単変量解析および多変量解析では CD90 発現は独立予後規定因子の一つであった。

CD90 発現細胞の転移能について *in vitro* で分析を行うため 2 種類のヒト肝内胆管癌の細胞株 (RBE, SSP-25) を用いた。Wound healing assay と migration assay において、フローサイトメトリーで分離した CD90 陽性細胞は、陰性細胞と比較し有意に高い遊走能を示した。転移に関わる細胞機構とされる epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関する遺伝子発現を定量 PCR で確認したところ、CXCR4 と MMP7 の高発現を示した。CD90 陽性細胞に対し siRNA による CD90 発現のノックダウンを行うと、これらの発現は CD90 発現とともに低下することが示された。CXCR4 と MMP7 は Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway の標的遺伝子と報告されており癌の進展に重要な役割を果たしていると考えられている。CD90 陽性ならびに陰性細胞の Wnt/ $\beta$ -catenin signaling 活性について、活性化  $\beta$ -catenin の免疫染色ならびに TCF/LEF Luciferase assay で解析したところ、CD90 陽性細胞で有意に Wnt/ $\beta$ -catenin signaling 活性が上昇していた。一方で Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway の阻害薬である ICG-001 を CD90 陽性細胞に作用させると CXCR4 や MMP7 の発現が低下した。これらの結果より、CD90 陽性は Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway の活性化を通して CXCR4 や MMP7 の高発現を認めており、高い転移能を有していると考えられた。

以上の結果を総合すると、肝内胆管癌において CD90 発現細胞は *in vitro* では Wnt/ $\beta$ -catenin signaling を介して EMT 関連遺伝子を高発現し高い転移能を有していることが示され、その結果として *in vivo* ではリンパ節転移のリスクが高くなり予後不良に関与すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Yamaoka R, Ishii T, Kawai T, Yasuchika K, Miyauchi Y, Kojima H, Katayama H, Ogiso S, Fukumitsu K, Uemoto S. CD90 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with lymph node metastasis and poor prognosis. 査読あり, J Surg Oncol. 2018 118: 664-674. doi: 10.1002/jso.25192.

2. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Minami T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Fukumitsu K, Hatano E, Uemoto S. Identification of keratin 19-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma using CYFRA 21-1. 査読あり, Cancer Med. 2017, 6: 2531-2540. doi: 10.1002/cam4.1211.

3. Miyauchi Y, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Ogiso S, Minami T, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Kawai T, Yoshitoshi-Uebayashi EY, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Uemoto S. A novel three-dimensional culture system maintaining the physiological extracellular matrix of fibrotic model livers accelerates progression of hepatocellular carcinoma cells. 査読あり, Sci Rep. 2017; 29 :9827. doi: 10.1038/s41598-017-09391-y.

4. Kawai T, Yasuchika K, Seo S, Higashi T, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Nakamoto Y, Hatano E, Uemoto S.

Identification of Keratin 19-Positive Cancer Stem Cells Associating Human Hepatocellular Carcinoma Using <sup>18</sup>F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. 査読あり, Clin Cancer Res. 2017; 23: 1450-1460. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0871.

5. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Komori J, Hatano E, Kawaguchi Y, Uemoto S. SOX9 is a novel cancer stem cell marker surrogated by osteopontin in human hepatocellular carcinoma. 査読あり, Sci Rep. 2016; 6: 30489. doi: 10.1038/srep30489.

〔学会発表〕(計5件)

1. 河合隆之, 石井隆道, 安近健太郎, 川本浩史, 大島侑, 宮内雄也, 小島秀信, 小木曾聡, 福光剣, 岡島英明, 海道利実, 上本伸二. 肝移植を施行した肝細胞癌症例における癌幹細胞マーカー-keratin 19 および SOX9 発現の意義. 第 53 回日本移植学会, 2018 年 9 月.

2. 川本浩史, 河合隆之, 石井隆道, 安近健太郎, 小木曾聡, 福光剣, 岡島英明, 海道利実, 川口義弥, 上本伸二. 上皮間葉転換 (EMT) の観点から見た SOX9 陽性肝細胞癌幹細胞の臨床的および生物学的意義. 第 73 回日本消化器外科学会総会, 2018 年 7 月.

3. 肝細胞癌における keratin 19 陽性癌幹細胞を追跡するバイオマーカーとしての <sup>18</sup>F-FDG-PET および keratin 19 fragment (CYFRA 21-1)の役割. 河合隆之, 石井隆道, 安近健太郎, 小木曾聡, 片山外大, 喜多貞彦, 南貴人, 宮内雄也, 小島秀信, 山岡竜也, 福光剣, 波多野悦朗, 上本伸二. 第 118 回日本外科学会定期学術集会, 2018 年 4 月.

4. 癌幹細胞特性を持つ K19 陽性肝細胞癌の TGFβ受容体 1 阻害剤による新規治療の可能性. 安近健太郎, 河合隆之, 福光剣, 石井隆道, 上本伸二. 第 117 回日本外科学会定期学術集会, 2017 年 4 月.

5. 肝内胆管癌における CD90 の発現と予後との関係. 山岡竜也, 安近健太郎, 河合隆之, 宮内雄也, 小島秀信, 片山外大, 小木曾聡, 喜多貞彦, 石井隆道, 上本伸二. 第 71 回日本消化器外科学会総会, 2016 年 7 月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項なし.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安近 健太郎  
ローマ字氏名：YASUCHIKA, kentaro  
所属研究機関名：京都大学  
部局名：医学研究科  
職名：客員研究員  
研究者番号(8桁)：00378895

研究分担者氏名：上本 伸二  
ローマ字氏名：UEMOTO, shinji  
所属研究機関名：京都大学  
部局名：医学研究科  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：40252449

研究分担者氏名：河合 隆之  
ローマ字氏名：KAWAI, takayuki  
所属研究機関名：京都大学  
部局名：医学研究科  
職名：客員研究員  
研究者番号(8桁)：00813867

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。