

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K16305  
研究課題名(和文)肝細胞癌における癌幹細胞の転移メカニズム解明と新規治療標的の同定に関する研究  
研究課題名(英文)Identification of the metastatic mechanism of keratin 19 positive cancer stem cells and novel therapeutic targets in hepatocellular carcinoma  
研究代表者  
河合 隆之(Kawai, Takayuki)  
京都大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号：00813867  
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)：本研究では、難治性悪性腫瘍の1つである肝細胞癌において、これまでに我々が報告してきたkeratin 19 (K19) 陽性肝細胞癌癌幹細胞の転移・再発機構を調査した。正常肝/線維化肝由来脱細胞化肝臓を用いた肝細胞癌3次元立体培養の結果、K19陽性癌幹細胞が線維化肝において高い浸潤・転移能を示し、線維化肝からのシグナルを介したTGF $\beta$ /Smad pathwayの活性化がそのメカニズムとなっている可能性が示唆された。また、肝細胞癌検体を用いた解析の結果、K19発現は肝線維化進行度と相関があり、K19陽性肝細胞癌ではTGF $\beta$ /Smad pathwayの調節に関わる遺伝子に変異があることが判明した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、K19陽性肝細胞癌癌幹細胞が線維化肝からのシグナルを介したTGF $\beta$ /Smad pathwayの活性化により高い浸潤・転移形質を示す可能性が示唆された。また、肝細胞癌におけるK19発現は肝線維化進行度と相関しており、K19陽性肝細胞癌ではTGF $\beta$ /Smad pathwayの調節に関わる遺伝子に変異を有していた。この成果により、K19陽性肝細胞癌の転移メカニズムの一端が明らかになり、TGF $\beta$ /Smad pathwayという新規治療標的が同定された。肝細胞癌の約15%を占める特に予後不良なK19陽性症例に対する個別化治療の可能性が示されたと考えており、社会的意義を有すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most intractable malignancies worldwide. In this study, we investigated the metastatic mechanism of keratin 19 (K19) positive HCC cancer stem cells (CSCs). The results of three-dimensional culture of HCC cells using the decellularized liver derived from normal and fibrotic livers showed that K19-positive HCC-CSCs showed high invasive and metastatic potential in the decellularized fibrotic liver, suggesting that the activation of TGF $\beta$ /Smad pathway via signals from the fibrotic liver extracellular matrix may be the mechanism. In addition, analysis of HCC clinical specimens revealed that K19 expression was significantly correlated with the progression of liver fibrosis, and mutations in genes involved in the regulation of the TGF $\beta$ /Smad pathway occurred in K19-positive hepatocellular carcinoma.

研究分野：消化器外科学(肝胆膵領域の悪性腫瘍)

キーワード：肝細胞癌 癌幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は原発性肝癌の大半を占める悪性腫瘍であり、高頻度に転移・再発を来す予後不良の疾患である。このため、肝細胞癌に対する有効な治療法、特にその転移・再発を制御するような新規治療法の開発は重要な課題である。近年、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癌幹細胞の存在が明らかになってきており、各癌腫における解析が進められている。この癌幹細胞は腫瘍の転移・再発に強く関与するため、新たな治療標的として注目を集めている。肝細胞癌においては、その転移・再発を抑制することが癌治療効果を改善させることになるため、癌幹細胞の転移メカニズムを解明し新規治療標的とすることは重要である。一方、肝細胞癌は各種肝炎を基礎とした慢性肝炎～肝硬変を母地として発生することが広く知られている。癌幹細胞は肝内の微小環境から影響を受け増殖・転移していくが、こうした各種背景肝における癌幹細胞の挙動や転移メカニズムはほとんど解明されていない。

### 2. 研究の目的

これまでに我々は、肝前駆細胞のマーカーである keratin 19 (K19) に着目した肝細胞癌癌幹細胞の研究を進め、臨床応用の可能性を含め報告してきた。また、臓器の細胞成分を薬剤によって除去し細胞外基質のみを得る脱細胞化技術により獲得した脱細胞化肝臓を用いて、肝再生や癌細胞 3 次元培養に関する研究を進めてきた。本研究では、こうした研究成果を発展させ、肝細胞癌における K19 陽性癌幹細胞の転移メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、臓器の細胞成分を薬剤によって除去し細胞外基質のみを得る脱細胞化技術を用いて獲得したラット正常肝/線維化肝由来脱細胞化肝臓を用いて肝細胞癌細胞の 3 次元立体培養を行った。続いて、肝切除あるいは肝移植を行った肝細胞癌臨床検体 231 例に免疫染色を行い、K19 陽性肝細胞癌症例の臨床背景と肝線維化の関係について調査した。また、K19 陽性肝細胞癌検体の遺伝子変異を解析した。

### 4. 研究成果

ラット正常肝/線維化肝由来脱細胞化肝臓を用いて肝細胞癌細胞 (Huh7) の 3 次元立体培養において、正常肝由来脱細胞化肝臓内では、癌細胞が結節を形成するように増殖していた。一方、線維化肝由来脱細胞化肝臓内では、癌細胞は周囲へ浸潤するような増殖形態を示した (図 1)。また、癌組織における K19 陽性細胞の割合を免疫染色により検証したところ、正常肝由来脱細胞化肝臓に比べ線維化肝由来脱細胞化肝臓では、腫瘍組織内の K19 陽性細胞の割合が有意に高かった (図 2、 $P < 0.01$ )。さらに、線維化肝由来脱細胞化肝臓で培養された肝細胞癌では Ki-67 陽性細胞の割合が有意に高く ( $P < 0.01$ )、E-cadherin 発現低下や Vimentin 発現上昇といった上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) に関わるタンパク質の発現状況の変化が確認された (図 3)。これらの結果から、K19 陽性肝細胞癌癌幹細胞は正常肝に比べて線維化肝において維持されやすく、高い増殖・浸潤・転移能を示すものと考えられた。さらに、各種抗体を用いた免疫染色の結果、線維化肝からのシグナルを介した TGF $\beta$ /Smad pathway の活性化が線維

化肝由来脱細胞化肝臓における K19 陽性細胞の維持・悪性形質発現機構となっている可能性が示唆された。

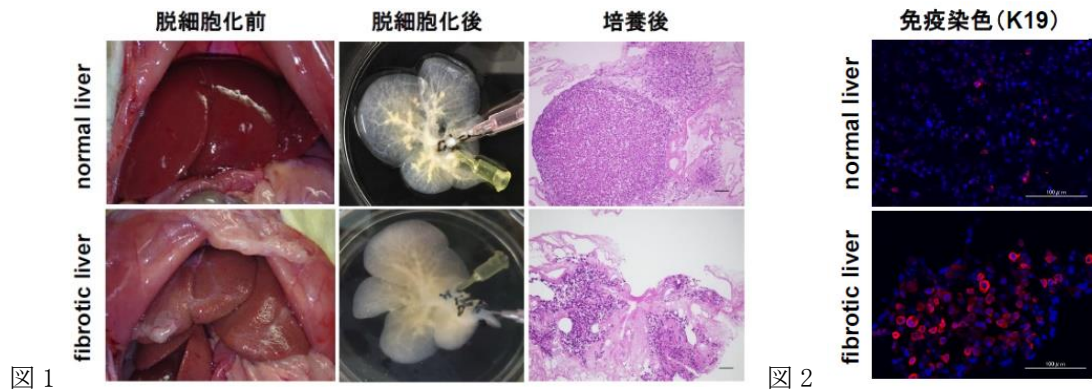


図 1

図 2

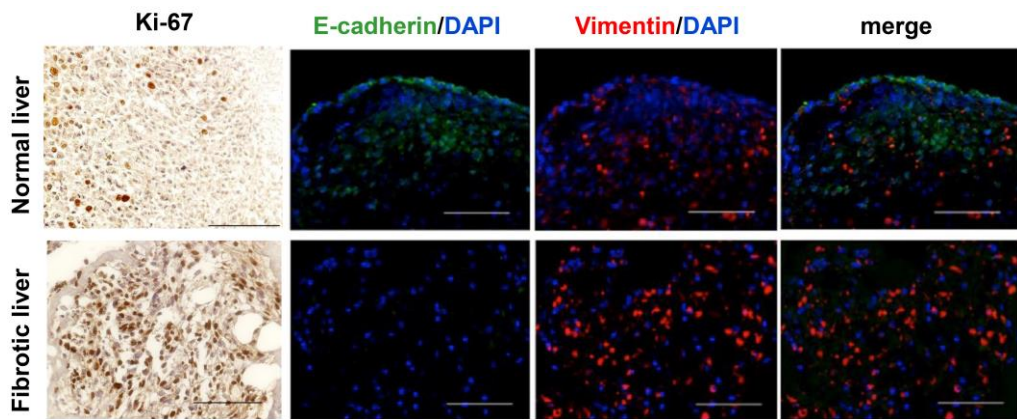


図 3

図 1: 正常肝/線維化肝由来脱細胞化肝臓を用いた肝細胞癌細胞の 3 次元立体培養

図 2: 線維化肝では K19 陽性癌幹細胞 (赤) が維持されやすい

図 3: 線維化肝では Ki-67 陽性細胞の割合が高く、EMT 形質を示す

続いて、肝切除あるいは肝移植を行った肝細胞癌臨床検体 231 例に免疫染色を行ったところ、231 例中 9 例において K19 強発現が、231 例中 16 例に K19 弱発現が確認された (図 4)。K19 発現と術後生存期間に関する解析の結果、Kaplan-Meier 曲線を用いた Log-rank 検定において K19 陽性肝細胞癌症例は陰性症例に比べて有意に無再発生存期間 ( $P < 0.01$ )・全生存期間 ( $P < 0.01$ ) が短いことが判明した。Cox-regression model による多変量解析では、K19 発現は無再発生存期間・全生存期間の両者において独立予後不良因子となることが判明した。さらに K19 発現と肝線維化の関係について Fisher の正確性検定を用いて解析したところ、K19 発現強度と肝線維化に有意な相関を認めた (図 5、 $P = 0.032$ )。一方、K19 陽性肝細胞癌検体の遺伝子変異を解析したところ、K19 陽性肝細胞癌では TGF $\beta$ /Smad pathway の調節に関わる MUC ファミリーの遺伝子に変異が生じていることが判明した。

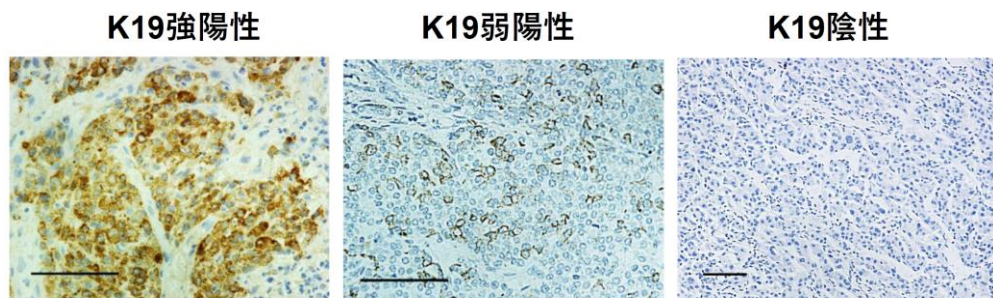


図 4

9/231 patients

16/231 patients

Scale bars: 100 μm

	K19-	K19+	K19++
F1/F2	75	8	0
F3/F4	131	8	9

**P=0.032**

図 5

図 4: K19 強発現が 9/231 例、K19 弱発現が 16/231 例に確認された

図 5: K19 発現強度と肝線維化進行度には有意な相関がある

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Brustia R, Langella S, Kawai T, Fonseca GM, Schielke A, Colli F, Resende V, Fleres F, Roulin D, Leyman P, Giacomoni A, Granger B, Fartoux L, De Carlis L, Demartines N, Sommacale D, Sanches MD, Patrono D, Detry O, Herman P, Okumura S, Ferrero A, Scatton O, Uemoto S, Perdigao F, et al.	4. 巻 46
2. 論文標題 Preoperative risk score for prediction of long-term outcomes after hepatectomy for intrahepatic cholangiocarcinoma: Report of a collaborative, international-based, external validation study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 560～571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2019.10.041	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 Minami T, Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ogiso S, Miyauchi Y, Kojima H, Kawai T, Yamaoka R, Oshima Y, Kawamoto H, Kotaka M, Yasuda K, Osafune K, Uemoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.03.002.	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 Cipriani F, Alzoubi M, Fuks D, Ratti F, Kawai T, Berardi G, Barkhatov L, Lainas P, Van der Poel M, Faoury M, Besselink MG, D'Hondt M, Dagher I, Edwin B, Troisi RI, Scatton O, Gayet B, Aldrighetti L, Abu Hilal M.	4. 巻 27(1)
2. 論文標題 Pure laparoscopic versus open hemihepatectomy: a critical assessment and realistic expectations - a propensity score-based analysis of right and left hemihepatectomies from nine European tertiary referral centers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 3-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.662.	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 Kojima H., Yasuchika K., Fukumitsu K., Ishii T., Ogiso S., Miyauchi Y., Yamaoka R., Kawai T., Katayama H., Yoshitoshi-Uebayashi E. Y., Kita S., Yasuda K., Sasaki N., Komori J., Uemoto S.	4. 巻 18
2. 論文標題 Establishment of practical recellularized liver graft for blood perfusion using primary rat hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 1351 ~ 1359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.14666	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 Yamaoka Ryoya, Ishii Takamichi, Kawai Takayuki, Yasuchika Kentaro, Miyauchi Yuya, Kojima Hidenobu, Katayama Hokahiro, Ogiso Satoshi, Fukumitsu Ken, Uemoto Shinji	4. 巻 118
2. 論文標題 CD90 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with lymph node metastasis and poor prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 664 ~ 674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.25192	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Takayuki Kawai, Takamichi Ishii, Yuya Miyauchi, Satoshi Ogiso, Ken Fukumitsu, Shinji Uemoto
2. 発表標題 Involvement of liver cirrhosis in keratin 19-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 The 14th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合隆之、奥村晋也、Claire Goumard、Florence Jeune、Eric Savier、Jean-Christophe Vaillant、上本伸二、Olivier Scatton
2. 発表標題 大腸癌肝転移に対する腹腔鏡下肝切除の腫瘍学的有用性 - 術後化学療法導入までの期間に関する検討 -
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会、東京
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 S.Okumura, C.Goumard, D.Fuks, T.Kawai, J.Danion, O.Soubrane, B.Gayet, O.Scotton
2 . 発表標題 Laparoscopic two-stage hepatectomy for bilobar colorectal liver metastases; a multiinstitutional study
3 . 学会等名 The 2nd World Congress of the International Laparoscopic Liver Society (ILLS), Tokyo (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 F.Cipriani, M.Alzoubi, D.Fuks, F.Ratti, T.Kawai, G.Berardi, L.Barkhatov, P.Lainas, M.Van Der Poel, M.Faoury, M.Besselink, M.D'hondt, I.Dagher, B.Edwin, R.I.Troisi, O.Scotton, B.Gayet, L.Aldrighetti, M.Abu Hilal
2 . 発表標題 Pure laparoscopic versus open hemihepatectomy: a critical assessment and realistic expectations. A propensity score based analysis of right and left hemihepatectomies from 9 European tertiary referral centers
3 . 学会等名 The 2nd World Congress of the International Laparoscopic Liver Society, Tokyo (ILLS) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takayuki Kawai, Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Satoru Seo, Satoshi Ogiso, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Hidenobu Kojima, Ken Fukumitsu, and Shinji Uemoto
2 . 発表標題 Identification of keratin 19-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma using 18FFDGPET and CYFRA 21-1
3 . 学会等名 The International Liver Congress (EASL) 2018, Paris, France (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 河合隆之, 石井隆道, 安近健太郎, 小木曾聡, 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
2 . 発表標題 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18F-FDGPETおよび血清keratin 19 fragment (CYFRA 21-1)の役割
3 . 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会、東京
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Kawai, Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Satoru Seo, Satoshi Ogiso, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Hidenobu Kojima, Ken Fukumitsu, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, and Shinji Uemoto
2. 発表標題 Development of precision medicine for keratin 19-positive hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference on HCC 2018, Yokohama, Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Kawai, Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Satoshi Ogiso, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Hidenobu Kojima, Ken Fukumitsu, Shinji Uemoto
2. 発表標題 Tracking keratin 19-positive cancer stem cells using CYFRA 21-1 in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 The 13th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (IHPBA) 2018, Geneva, Switzerland (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河合隆之、石井隆道、安近健太郎、川本浩史、大島侑、南貴人、宮内雄也、小島秀信、小木曾聡、福光剣、岡島英明、海道利美、上本伸二
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会、東京
4. 発表年 2018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
研究協力者	石井 隆道  (Ishii Takamichi)  (70456789)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	



6. 研究組織（つづき）

	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	福光 剣  (Fukumitsu Ken)  (70700516)	京都大学・医学研究科・特定病院助教    (14301)	
研究協力者	小木曾 聡  (Ogiso Satoshi)  (10804734)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	
研究協力者	上本 伸二  (Uemoto Shinji)  (40252449)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	

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