

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08425

研究課題名(和文)肝細胞死により誘導される癌幹細胞化と癌悪性化のメカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of cancer stem cell formation induced by hepatocellular death

研究代表者

近藤 正晃 (KONDO, Masaaki)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：60511615

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、抗癌剤、分子標的薬等によって起こる細胞死などによって、残存する癌細胞が幹細胞化または分化転換を介して悪性化の方向に転換するという仮説のもと、さまざまな癌細胞死による癌幹細胞化について検討した。肝癌細胞株を5-FU, Lenvatinibなどを用いて、細胞死を起こさせ、その抽出液を準備した。既知の癌幹細胞マーカーであるCD44およびE-cadherinにて癌幹細胞化をモニターした。その結果、5-FU処理した抽出液を投与すると、CD44の軽度の増加が観察された。そのメカニズムについて検討を行なったところ、活性酸素(ROS)を介したASK1/JNK活性化によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療によって惹起された細胞死がその悪性化に関連するのではないかと考えている。すなわち、そのメカニズムの解明、そしてその阻害療法の提言は肝細胞癌の悪性化を阻止し、その治療オプションとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, cancers caused by various cancer cell deaths are based on the hypothesis that the remaining cancer cells are transformed into malignant cells through stem cell formation or differentiation conversion due to cell death caused by anticancer agents, molecular target drugs, etc. We examined stem cell formation. A liver cancer cell line was subjected to cell death using 5-FU, Lenvatinib, etc., and an extract thereof was prepared. Cancer stem cell formation was monitored with the known cancer stem cell markers CD44 and E-cadherin. As a result, a slight increase in CD44 was observed when the 5-FU-treated extract was administered. When the mechanism was investigated, it was suggested that ASK1 / JNK activation was mediated by active oxygen (ROS).

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 幹細胞 細胞死

1. 研究開始当初の背景

我が国では肝臓癌によって毎年約 3.5 万人が死亡しており、肝炎ウイルス対策などの一次予防の確立や癌治療法の進歩によってその死亡者数はやっとな減少に転じた。しかしながら、ウイルス駆除後の発癌症例も近年多くみられ、さらに難治進行癌に対する治療法はいまだ確立せずに予後は悪い。また食生活の欧米化に伴い、脂肪肝性肝炎患者が増加し、それに伴う肝臓癌の発生も増加している。肝臓癌はウイルス感染をはじめとする慢性炎症を基に発生すること、また肝臓という臓器は自己再生能力が高いという特異性があり、その分子基盤は他臓器とは異なる特殊性を有している。このような特殊性から、他臓器で解析が行われている発癌メカニズムは容易には適応できないと考える。

癌組織では抗癌剤の治療によってばかりではなく、局所の低酸素やストレス反応などによって、病理学的に多くの細胞死が観察される。例えば、肝臓癌組織の中央部における壊死などはその代表的なものである。細胞死の状態および誘因などによって、ネクローシス、アポトーシス、ネクロプトーシス、さらにオートファジーに分類されており、細胞死の種類によっては細胞外のさまざまな生命現象に影響を及ぼすことが示唆されている。例えば、過剰な細胞死によって炎症が惹起されることがあるが、そのメカニズムとして damage-associated molecular patterns (DAMPs) が放出され、マクロファージなどの DAMPs レセプターを介して炎症が惹起されることが示唆されている (Inoue H. Cell Death Differ;21:39-49)。これまでに動物モデルや細胞における細胞死と発癌との関連についての研究が分担者の前田を含め多く行われてきた。例えば、肝臓癌過程における肝細胞死が周囲のマクロファージ系細胞を活性化し、残存癌細胞の増殖に寄与していることが示されている (Maeda S et al. Cell 2005, Sakurai T et al. Cancer Cell 2008)。また、大腸炎症発癌においては DAMPs の 1 つである HMGB1 を抑制することにより、炎症が軽減し、腫瘍の増殖も抑制していることを報告されている (Maeda S et al. BBRC 2007)。これらの現象は細胞死によって引き起こされたシグナルによって腫瘍形成が促進したことを示している。しかしながら、これまでの研究ではその詳細なメカニズムについては明らかになっておらず、癌治療の標的の可能性についても不明である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞死を介した癌化・進展についてのメカニズムの解明を目的に、抗癌剤、分子標的薬等によって起こる細胞死、腫瘍中心部などでよくみられる血流障害による細胞死などによって、残存する癌細胞が幹細胞化または分化転換を介して悪性化の方向に転換するという仮説を立てた。臨床的には例えば不完全な抗癌剤治療がさらなる悪性化を惹起する現象や肝臓癌などでラジオ波焼灼術などの癌細胞を凝固壊死させる治療後に、残存腫瘍が急激に悪性化の一途をたどるような現象を説明できる可能性がある。さらに、そのメカニズムに関連する因子の抑制療法は新たな治療の提唱が期待される。本研究では以下の 2 点について、研究期間内に明らかにする。

- (1) さまざまな癌細胞死によって産生される因子による残存癌細胞の癌幹細胞化について、*In vitro*, *In vivo*の系を用いて明らかにする。
- (2) 細胞死が惹起する幹細胞化誘導分子、シグナル伝達、実行分子の候補をいくつか提言し、その抑制による癌幹細胞治療の可能性を示す。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞死と癌幹細胞化の検討

いくつかの肝細胞癌細胞を用いて、さまざまな細胞死を起こさせ、その抽出液を準備する。ここでは後の実験で動物モデルを用いるため、すでに樹立しているマウス肝臓癌である活性化K-Rasによって惹起された腫瘍から確立した細胞や化学発癌剤ジエチルニトロサミンによって惹起された癌から樹立した細胞を用いる。例えば癌細胞を癌組織において細胞死を惹起すると考えられる刺激である熱刺激、放射線・紫外線、低栄養、化学療法剤（5-FU, Cisplatinなど）、分子標的薬（Sorafenib, Lenvatinib）など、サイトカイン（TNF α など）により細胞死を惹起し、細胞死は様々なマーカーによりネクロシス、アポトーシス、ネクロプトーシスに分類し、その抽出物を調整する。既知の癌幹細胞マーカーであるCD44, CD133, EPCAM, Nanogなどの発現変化の検討を行う。

(2) 癌間質細胞と癌幹細胞化の検討

癌間質の癌関連線維芽細胞(CAF)および癌関連マクロファージが癌進展に重要な役割を果たしていることは周知の事実である。さまざまなストレス刺激により細胞死に陥った癌細胞はこれらの細胞に対して何らかの影響を与え、残存癌細胞の幹細胞化に寄与している可能性がある。そこで、上記と同様に細胞死を惹起した癌細胞の抽出液をCAFおよびマクロファージに添加し、刺激をした後、その上清を用いて癌細胞の幹細胞化を前述した方法により検討する。マウス肝臓癌については分離培養されたCAFの準備ができている。また、間接的な影響のみでなく、癌死細胞抽出液にて処理されたCAFを癌細胞と共培養することにより同様のアッセイを施行する。

(3) マウスモデルを用いた癌幹細胞化の検討

*In vivo*の検討をマウス移植モデルを用いた腫瘍化能解析にて行う。癌幹細胞マーカーレポーターを組み込んだ癌細胞を皮下または同所移植し、腫瘍を作成する。次に細胞死を惹起させた刺激、抗癌剤・分子標的薬投与や放射線照射をマウスに施し、癌細胞死を誘発する。癌を残存させる程度に、細胞死を起こした後、経時的に*in vivo* imaging system (IVIS)を用いて、幹細胞化の検討を行う。

(4) 細胞死誘導因子ASK1ノックアウトの解析

ストレス依存性の細胞死を起こす因子としてASK1に着目し、*In vitro*, *In vivo*における影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 癌細胞死と癌幹細胞化の検討

いくつかの肝細胞癌細胞株(HepG2, Hep3B, Huh7)に、5-FU, Lenvatinib, および熱刺激を用いて、さまざまな細胞死を起こさせ、その抽出液を準備した。既知の癌幹細胞マーカーであるCD44およびE-cadherinをマーカーに癌幹細胞化をモニターした。その結果、

ほとんどのものでは変化は観察されなかったが、5-FUにより処理した抽出液をHep3Bに投与すると、CD44の軽度の増加が観察された。一過性のCD44の増加のメカニズムについて検討を行なったところ、活性酸素(ROS)を介したASK1/JNK活性化によることが示唆された。

(2) 癌間質細胞と癌幹細胞化の検討

細胞死を惹起した癌細胞の抽出液をCAFおよびマクロファージに添加し、刺激をした後、その上清を用いて癌細胞の幹細胞化を前述した方法により検討したが、新たな知見は得られなかった。

(3) In vivo の解析のため、マウス移植モデルを用いた腫瘍化能にて行ったが、腫瘍増殖については変化がなかった。

(4) ASK1 欠損 (Ask1 $-/-$) および野生型 (Wt) マウスに、細胞死を惹起するために 5-FU 投与及び高脂肪食または通常食を 3 か月間与え、肝臓の組織学および血液検査を評価した。3 か月の投与後に 5-FU による線維化、高脂肪食による脂肪肝、線維化は観察されたが、Ask1 $-/-$ マウスと Wt マウスの間で変化がなかった。LSL-KrasG12D を用いて、同様の処理をしたが、発癌において両群間に差は観察されなかった。

今回の検討からは細胞死が癌幹細胞化を及ぼすことについては In vitro の 5-FU 処理にて観察されたが、その他の細胞死惹起の処理や、In vivo において明らかな証拠を示すことができなかった。さらなる検討を続けたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 He X, Hikiba Y, Suzuki Y, Nakamori Y, Kanemaru Y, Sugimori M, Sato T, Nozaki A, Chuma M, Maeda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 EGFR inhibition reverses resistance to lenvatinib in hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 8007-8017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12076-w	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 -

1. 著者名 Maeda S, Hikiba Y, Fujiwara H, Ikenoue T, Sue S, Sugimori M, Matsubayashi M, Kaneko H, Irie K, Sasaki T, Chuma M.	4. 巻 112
2. 論文標題 NAFLD exacerbates cholangitis and promotes cholangiocellular carcinoma in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1471-1480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14828	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	前田 慎 (Maeda Shin) (40415956)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

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