

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790951
 研究課題名 (和文) 癌遺伝子調節発現マウスを用いた発癌モデルにおける肝臓癌幹細胞の同定及び特性解析
 研究課題名 (英文) Identification and characterization of hepatic cancer stem cells using oncogene-regulatory expressing transgenic mice
 研究代表者
 石井 隆道 (ISHII TAKAMICHI)
 京都大学・再生医科学研究所・研究員
 研究者番号：70456789

研究成果の概要 (和文)：

癌幹細胞は正常組織幹細胞と共通の性質を多く持つため組織幹細胞に由来するとも考えられている。今回我々は肝前駆細胞のマーカーである alpha-fetoprotein (AFP) に注目し、胆管癌の細胞株において AFP 産生細胞が癌幹細胞の性質を持つことを検討した。5つの胆管癌由来細胞株 (HuCCT1, OZ, RBE, SSP25, TFK1) を検討した。ヒト AFP エンハンサー/プロモーター下に EGFP を発現するベクターを導入し、EGFP 蛍光の有無によりフローサイトメトリーで分離し、両者を比較したところ、RBE のみ AFP 及び EGFP の発現を認めた。AFP-EGFP 陽性細胞は自己増殖能と二分化能を有することが示され、造腫瘍性も有していた。また、Notch シグナルが幹細胞性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、癌幹細胞の起源を検索するため、癌遺伝子調節発現マウス (cMyc-ER マウス) を作成することに成功した。このマウスの胎仔肝細胞からのみ旺盛に増殖する細胞株を得られたことから、幹細胞が癌化することによって癌幹細胞が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Recent stem cell biology has revealed that various tumors contain cancer stem cells (CSCs) and that CSCs have self-renewal activities and multipotencies, which display a hierarchy in tumor tissues. This study aimed to demonstrate that alpha-fetoprotein (AFP)-producing cells in cholangiocarcinomas (CC) possessed CSC-like properties. The transgene vector that contained enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the human AFP enhancer/promoter was transfected into human CC cell lines. The AFP-EGFP-positive cells in RBE had self-renewal activity, differentiation ability, and tumorigenicity. The Notch signaling pathway was suggested to play an important role to maintain the stemness of the AFP-EGFP-positive cells. In addition, in order to explore the origin of CSCs, we successfully generated oncogene-regulatory expressing transgenic mice. One cell line was obtained from only fetal hepatocytes derived from the transgenic mice, thus suggesting that CSCs were generated from transformed stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学・癌幹細胞・肝細胞癌・胆管細胞癌

1. 研究開始当初の背景

癌組織はヘテロな細胞集団であり、特に外科手術や抗腫瘍薬などの治療の過程において再発・転移巣はそもそもの原発巣と性質を異にすることもよく経験する。近年の幹細胞生物学の発展により、癌組織にも幹細胞が存在し(癌幹細胞)、正常組織に見られるような細胞の階層性があることが示されている。癌幹細胞は癌組織内にごく少数存在し、正常幹細胞と同様に自己複製能と限られた分化を行うものと考えられ、これまで白血病、脳腫瘍、乳癌、大腸癌、肝細胞癌などで癌幹細胞の存在が証明されている。癌幹細胞は正常幹細胞と類似した性質を持つが、とくに薬剤に対して強い耐性を持つという類似性も示されている。このことから、治療の経過中に腫瘍が縮小しても、癌幹細胞が少数でも存在していれば異なる性質を持つ癌娘細胞へと分化し再発をすると考えられている。すなわち癌幹細胞は癌治療の新たな標的として注目をされている。癌幹細胞の性質やその維持メカニズムの解明は、癌生物学のみならず、癌治療の発展にも大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

(1) 癌幹細胞と組織幹細胞とは多くの共通点を持つことから、仮に胆管癌において癌幹細胞が存在するならば肝幹細胞／前駆細胞と共通のマーカー発現をしていることが予想された。そこで我々は肝幹細胞／前駆細胞の代表的なマーカーであるAFPに注目し、複数の胆管癌細胞株を用いてAFP産生胆管癌細胞が癌幹細胞の性質を持つことを、自己複製能・分化能・腫瘍形成能に注目して検討した。

(2) 癌遺伝子調節発現型トランスジェニックマウスを作出し、成体由来の成熟肝細胞及び胎児由来の肝前駆細胞において癌遺伝子を発現させることにより成熟肝細胞及び肝前駆細胞に由来する肝癌細胞を作製した。このモデルにより、①*in vitro* においてはいずれの細胞種に由来する肝癌細胞で癌幹細胞の特徴を有するか、②*in vivo* においてはそれぞれの肝癌細胞を同系野生型マウスに移植し、成熟肝細胞由来及び肝前駆細胞由来肝癌細胞との間で腫瘍形成能に差があるか、③さらに移植により両細胞種とも腫瘍を形成するのであれば、その腫瘍の組織型と移植癌細胞の由来との間に関連性を認めるか、

の3点を検討し明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトAFP enhancer/promoter 下にEGFPを発現するプラスミドベクターを作成し、これを5種類のヒト胆管癌細胞株に遺伝子導入した。安定導入株を得られたのち、AFP産生細胞と非産生細胞とをフローサイトメトリーで分離培養し、両者の特徴を比較検討した。とくに癌幹細胞の特徴である、自己複製能および分化能を検討するために単一の細胞を96ウェル培養プレート上で培養するsingle cell culture assayを行った。また、免疫不全マウスにAFP産生／非産生細胞を移植することによって造腫瘍性の比較を行った。

(2) 肝細胞癌で比較的高頻度に見られる癌遺伝子 c-Myc に注目し、この遺伝子とインフレーションでエストロゲンレセプターエレメント (ER) を結合させたベクター (cMyc-ER) を作製した。このcMyc-ER プラスミドを用いて、トランスジェニックマウス (cMycER マウス) を作製した。このマウスの成体肝臓より肝細胞、胎仔肝臓より肝前駆細胞を分離・獲得し、各々の細胞にタモキシフェンを加えることにより癌遺伝子を発現させ、その増殖能・悪性度・分化能などについて両者で比較検討した。

4. 研究成果

(1) ヒトAFP エンハンサー／プロモーター下にEGFPを発現するベクターを導入し、EGFP蛍光の有無によりフローサイトメトリーで分離し、両者を比較したところ、RBEのみAFP及びEGFPの発現を認めた。AFP-EGFP陽性細胞は陰性細胞と比べて高い増殖活性を示した。シングルセルソートでは、単一のEGFP陽性細胞からはEGFP陽性および陰性細胞が得られ自己増殖能と二分化能を有することが示された。RT-PCRではEGFP陽性細胞にのみNotch1が発現していた。Notchシグナル阻害剤の投与によりEGFP陽性細胞の増殖活性が低下しEGFP陽性細胞の割合も減少した。さらに、肝内胆管癌の切除検体においても、一部の組織においてAFPで染色されることが示された。以上より、我々はAFPを指標にすることによって胆管癌における癌幹細胞の存在を初めて示すことに成功した。さらに幹細胞性の維持にNotch1シグナルが関与していることが示唆され、新たな治療の標的と

なる可能性を有する。

(2)cMycER マウスを交配し、ホモ接合体マウスを得ることができた。この成体マウスおよび胎仔マウスより肝細胞を分離し、エストロゲンアゴニストであるタモキシフェンを添加しながら培養を継続したところ、胎仔マウス肝臓由来の細胞からのみ旺盛に増殖する細胞株を得ることができた。未だ、その増殖能や腫瘍原性などの特性解析は終了していないものの、今後において、このマウスは肝臓のみならず他臓器における癌幹細胞の起源を検索するのに有用なシステムであると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Takamichi Ishij, Kentaro Yasuchika, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Iwao Ikai, Shinji Uemoto Alpha-fetoprotein producing cells act as cancer progenitor cells in human cholangiocarcinoma, 査読有り, Cancer Lett. 2010 Aug 1;294(1):25-34. Epub 2010 Feb 10.

[学会発表] (計 5 件)

①Takamichi Ishij, Naoya Sasaki, Kentaro Yasuchika, Ryo Kamimura, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Ryuichiro Doi, Iwao Ikai, Shinji Uemoto “ALPHA-FETOPROTEIN-PRODUCING CELLS ACT AS CANCER STEM CELLS IN HUMAN PANCREATIC CANCER” 7th International society of stem cell research (Barcelona, Spain), 2009 年7月 8 日

②Takamichi Ishij, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Sayuri Konishi, Masatoshi Kajiwara, Ryo Kamimura, Naoya Sasaki, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Iwao Ikai, Shinji Uemoto “ALPHA-FETOPROTEIN PRODUCING CELLS AS A CANDIDATE FOR CANCER STEM CELLS OF CHOLANGIOCELLULAR CARCINOMA” 4th Academic Surgical congress (Fort Meyers, USA) 2009 年 2 月 5 日

③石井隆道, 安近健太郎, 末盛博文, 中辻憲夫, 猪飼伊和夫, 上本伸二「胆管癌においてAFP産生細胞は癌幹細胞の特徴を持つ」第63回日本消化器外科学会総会(札幌) 2008 年7月16日

④Takamichi Ishij, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji,

Iwao Ikai, Shinji Uemoto

“ALPHA-FETOPROTEIN PRODUCING CELLS AS A CANDIDATE FOR CANCER STEM CELLS OF CHOLANGIOCELLULAR CARCINOMAS”

43th ESAL (Milan, Italy) 2008 年 4 月 24 日

⑤石井隆道, 安近健太郎, 福光剣, 末盛博文, 中辻憲夫, 猪飼伊和夫, 上本伸二「胆管癌における癌幹細胞としてのAFP産生細胞」第7回日本再生医療学会(名古屋) 2008 年 3 月 14 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 隆道 (ISHII TAKAMICHI)
京都大学・再生医科学研究所・研究員
研究者番号:70456789

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし