

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790685

研究課題名(和文)

腫瘍浸潤筋線維芽細胞による癌幹細胞 stemness 維持機構に関する研究

研究課題名(英文)

Role of Hepatic Stellate Cells on the Maintenance of Cancer Stem Cell in I

研究代表者

足立 雅之 (ADACHI MASAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70338028

研究成果の概要(和文):

幹細胞周囲の微小環境はニッチと呼ばれ、幹細胞の自己複製能や未分化性維持能の調節に関与している。本研究では、肝癌ニッチとして肝星細胞に注目し、癌幹細胞の自己複製能・未分化性維持機構における肝星細胞の関与を検討した。肝癌細胞株 Huh7 を用いて、CD133 陽性 SP 分画が癌幹細胞としての性質を持つ細胞集団であることを見出した。次に、活性化肝星細胞株と肝癌細胞を共培養したところ、肝癌細胞の単独培養に比べて癌幹細胞分画が増加した。Wnt シグナルが肝星細胞による肝癌細胞の stemness 維持に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文):

Cancer stem cells (CSCs) play crucial roles in cancer development and progression. The function and survival of stem cells appears to be regulated by local microenvironment or niche. However, the possible contribution of hepatic stellate cells (HSCs) to tumor-stroma interactions is totally unknown. Therefore, our aim is to investigate precise role of HSCs on interactions with tumor cells, especially with CSCs. In Huh7 cells, CD133 positive SP cells displayed CSC-like property. The SP subpopulation of Huh7 is increased after the co-culture with HSCs, suggesting that HSCs maintains self-renewal of CSCs. An increased number of CSCs was attenuated by the treatment with Wnt antagonist, suggesting that HSCs support the stemness of CSCs via Wnt signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌幹細胞、腫瘍ニッチ、肝星細胞、Wnt シグナル

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

正常組織における幹細胞は、自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞と定義されるが、近年、癌においても癌幹細胞(cancer stem cell)説が提唱され、癌幹細胞は増殖能・腫瘍形成能・アポトーシス抵抗性能を有し、通常の癌細胞と比べ、抗癌剤や放射線に対する抵抗性、増

殖、転移に重要な役割を果たしていると考えられている。したがって、癌の根治的治療には癌幹細胞をターゲットとした治療法の開発が急務である。癌幹細胞をターゲットとした治療法の開発には、1)癌幹細胞の in vivo および in vitro における同定、2)自己複製能、未分化維持機構の解明、3)アポトーシス抵抗性決定分子の同定、などの課題を含む検討が必要である。

幹細胞は自律的にその生存が維持されているのではなく、幹細胞をとりまく微小環境（細胞あるいはそれに由来する因子）が存在すると考えられる。このような微小環境は「ニッチ (niche)」と呼ばれ、幹細胞の自己複製能や未分化維持能、細胞分裂・生死までがコントロールされている。癌組織においても、多様な宿主由来の細胞が「腫瘍ニッチ」と呼ばれる腫瘍内微小環境を構成し、腫瘍の増殖・血管新生・浸潤・転移に重要な役割を担うと考えられている。腫瘍ニッチを構成する細胞の中で、腫瘍浸潤筋線維芽細胞 (tumor-associated myofibroblast) の役割は注目されている。筋線維芽細胞 (myofibroblast) は、創傷治癒過程に重要な役割を果たすが、筋線維芽細胞の過剰な増殖は、臓器線維化をきたし、発癌のリスクを高める。中でも、慢性肝疾患では、硬変肝において高い確率で肝癌が発生し、肝線維化は肝発癌機序に重要な役割を担うと考えられるが、その肝線維化には、肝星細胞 (hepatic stellate cell, HSC) が、肝障害に伴って α SMA 陽性の筋線維芽細胞に分化して肝線維化に重要な役割を果たす。

2. 研究の目的

上記の背景のもとに、本研究では、肝癌における癌幹細胞の同定、および癌細胞とニッチ間の相互作用のうち、特に腫瘍浸潤筋線維芽細胞 (tumor-associated myofibroblast) と癌幹細胞 (tumor stem cell) との相互作用に注目し、原発性肝癌および転移性肝癌の分子病態の解明や新規治療法の開発を目標とするものである。腫瘍浸潤筋線維芽細胞あるいは活性化肝星細胞と消化器癌細胞株との共培養系を確立し、共培養による癌幹細胞分画の変化を検討する。癌幹細胞はアポトーシス抵抗性を有し、抗癌剤や放射線に対する抵抗性や治療後再発の一因である。そこで上記の結果をもとに、同定した癌幹細胞 腫瘍浸潤筋線維芽細胞間の相互作用に重要な分子を同定し、この分子を阻害することにより、癌幹細胞の増殖能・腫瘍形成能・アポトーシス抵抗性を減弱させ、抗癌剤や放射線に対する治療効果の向上、増殖・転移の抑制を目指した。in vivo モデルでの検討として、癌幹細胞分画と腫瘍浸潤筋線維芽細胞を免疫不全マウスに混合移植し、腫瘍浸潤筋線維芽細胞による腫瘍形成能促進の有無、あるいは腫瘍浸潤筋線維芽細胞の腫瘍への transplantability や腫瘍組織内での localization を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 肝癌における癌幹細胞の同定と、(2) 腫瘍ニッチによる癌幹細胞の自己複製能、未分化維持能の制御についての検討を行った。

(1) 肝癌における癌幹細胞の同定

肝癌細胞株 Huh7 細胞を用いた。癌幹細胞分画の同定には、Side Population (SP) および CD133、EpCAM、CD90、CD13 などの既報マーカーを複合的に FACS ソーティングを行った。NOD/SCID マウスを用いた in vivo 腫瘍造成能、Sphere 形成能、抗癌剤耐性を検討し、癌幹細胞としての性質を持つ細胞集団の同定を行った。

(2) 腫瘍ニッチによる癌幹細胞の自己複製能、未分化維持能の制御

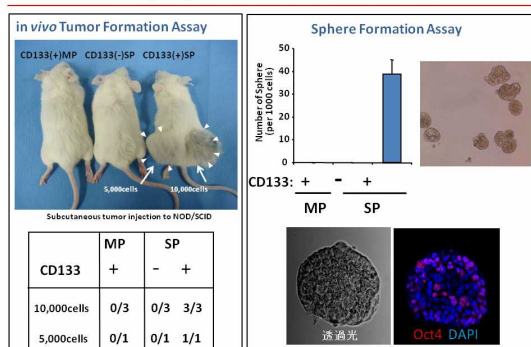
肝癌における腫瘍浸潤筋線維芽細胞 (tumor-associated myofibroblast) のソースとして、活性化肝星細胞に注目し、腫瘍ニッチ Transwell Culture Dish を用いて活性化肝星細胞株 hTERT HSC と肝癌細胞を共培養し、(1) で同定した癌幹細胞分画の変化を検討した。同定した癌幹細胞 腫瘍浸潤筋線維芽細胞間の相互作用に重要と考えられる分子を阻害し、癌幹細胞の増殖能・腫瘍形成能・アポトーシス抵抗性能の変化を検討した。これにより抗癌剤や放射線に対する治療効果の向上、増殖・転移の抑制を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝癌幹細胞分画の同定

まず、肝癌細胞株における幹細胞マーカーの同定のために肝癌細胞株 Huh7 細胞を用いて、Side Population (SP) および CD133、EpCAM、CD90、CD13 などの既報の幹細胞マーカーを用いて FACS 解析を行った。SP 分画には Total、Main Population (MP) 分画に比べて CD133 陽性細胞が多く観察された。CD133 陽性 SP、CD133 陽性 MP、CD133 陰性 SP の各細胞集団を解析したところ、CD133 陽性 SP 分画が NOD/SCID マウスへの in vivo 腫瘍造成能、Sphere 形成能、抗癌剤耐性を示し、癌幹細胞としての性質を持つ細胞集団であった (Figure 1)。

Figure 1. CD133-positive SP cells Are Tumor-initiating Cells with Stem/Progenitor Cell Features in Huh7 Cells



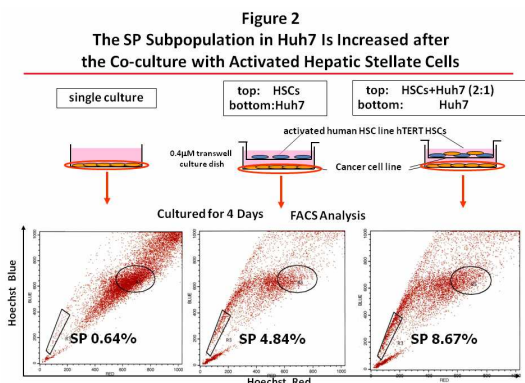
この結果により、肝癌の癌幹細胞について、既報よりもより詳細な癌幹細胞マーカーと

して CD133 陽性 SP 分画が同定された。この CD133 陽性 SP 分画は、肝癌細胞株 PLC/PRF5 細胞でも癌幹細胞の性質を持っていた。

肝癌における癌幹細胞マーカーの同定により、肝癌の疫学として重要な HCV ウイルス感染による肝癌幹細胞の役割を見出した。HCV ウイルス subgenomic replicon を発現する Huh-FL 細胞、さらに HCV-core 蛋白、HCV-NS5A 蛋白を発現するアデノウイルスを用いて検討を行ったところ、HCV により癌幹細胞分画の増加を認めた。HCV による Histone deacetylase (HDAC)活性の増加が関与しているとの知見を得ており、新規抗癌剤として注目を浴びている HDAC 阻害剤を用いた治療法を検討している。

(2) 活性化肝星細胞および腫瘍浸潤筋芽細胞における癌幹細胞の維持機構に関する検討

活性化肝星細胞株 hTERT HSC と肝癌細胞を次に、Transwell Culture Dish を用いて共培養したところ、肝癌細胞の単独培養に比べて SP 分画が増加した(Figure2)。

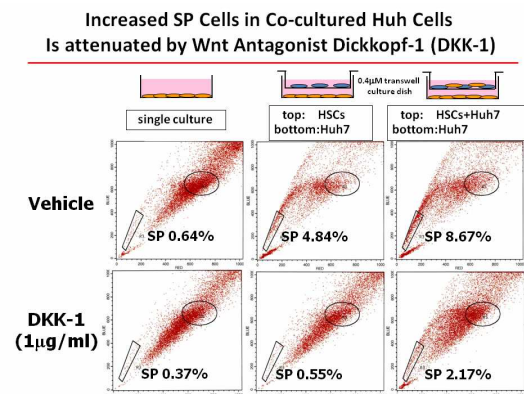


次に、SP 細胞を単離し、hTERT HSC と共培養を行った。SP 細胞は、単離培養 4 日間で SP 細胞の大部分は MP 細胞に分化するが、肝星細胞との共培養により SP 細胞数が維持された。これらの結果から、hTERT HSC との共培養により、癌幹細胞の Stemness 維持能が増強されたものと考えられた。

次に、hTERT HSC による Stemness 維持機構の分子メカニズムを検討した。肝星細胞との共培養による SP 分画の増加は Wnt antagonist DKK-1 によって阻害された。以上から、腫瘍浸潤筋線維芽細胞 (tumor-associated myofibroblast) と癌幹細胞 (tumor stem cell) との相互作用において、腫瘍浸潤筋線維芽細胞からの Wnt シグナルが肝癌細胞の stemness 維持に重要であること

が示唆された(Figure 3)。

Wnt シグナルの他にも、ケモカイン SDF-1 の阻害剤 AMD3100 が、共培養による SP 細胞分画の増加を抑制し、SDF-1/CXCL12 の重要性も示唆された。



以上の検討により肝癌幹細胞の Stemness 維持機構に活性化肝星細胞が腫瘍ニッチとして重要な役割を果たすことが示唆された。

また、腫瘍浸潤筋芽細胞による癌幹細胞の stemness 維持機構の解明は、化学療法抵抗性・転移・浸潤に重要とされる癌幹細胞の役割を解明するだけでなく、腫瘍ニッチをターゲットとした新しいがん治療戦略に道を開くものと考えられる。加えて、肝線維化に重要な肝星細胞と肝癌細胞の相互作用を検討し、相互作用に重要な分子を同定することは、慢性肝炎患、特に肝硬変患者における肝発癌防止を目的とした新しい治療戦略につながるものと考えられる。以上の研究結果は、日本癌学会および米国癌学会等にて発表し、現在論文投稿準備中である。

本研究結果により、癌幹細胞-腫瘍浸潤筋線維芽細胞間の相互作用は、癌幹細胞の増殖能・腫瘍形成能・アポトーシス抵抗性の維持に重要であると考えられる。しかし、腫瘍ニッチ細胞を単離する手法は確立されていないため、その性質は不明な点が多い。今後は、マウス肝癌モデルを利用し、腫瘍浸潤筋線維芽細胞の単離を目指し、さらなる研究を行っていく。我々は、 α SMA-RFP トランスジェニックマウスを用いて、腫瘍浸潤筋線維芽細胞を選択的に単離する方法の確立を目指している。本研究により腫瘍ニッチ環境における筋線維芽細胞の役割について多くの有用かつ新しい知見が得られるものと考えられる。

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0件)

[学会発表](計4件)

足立雅之 肝癌幹細胞分画の同定と HCV による肝癌幹細胞の制御 国際科学振興財団フォーラム第 18 回浜名湖シンポジウム 2010 年 12 月 25 日 浜松

足立雅之 他. 肝癌幹細胞の Stemness 維持機構における 肝星細胞の役割 Hepatic Stellate Cells Contribute to the Maintenance of Cancer Stem Cell in Huh7 Cells via Wnt Signaling 第 69 回 日本癌学会 2010 年 9 月 22 日 大阪

Masayuki Adachi, et al. Wnt Signalings Contribute to the Maintenance of Cancer Stem Cell-Like Populations via in Huh7 Hepatocellular Carcinoma Cell Line: Role of Hepatic Stellate Cells. Annual Meeting, American Association for Cancer Research (AACR) 2010 年 4 月 19 日 米国ワシントン DC

Masayuki Adachi, et al. Hepatic Stellate Cells Contribute to the Maintenance of Cancer Stem Cell-Like Populations via Wnt Signaling in Huh7 Hepatocellular Carcinoma Cell Line Annual Meeting, American Association For The Study Of Liver Diseases (AASLD) 2009 年 11 月 2 日 米国ボストン

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 雅之 (ADACHI MASAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 70338028

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし