

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790634

研究課題名（和文）人肝幹前駆細胞の理解に基づく肝再生医療、肝癌治療を目指した基盤作成とその発展

研究課題名（英文）A study of liver regeneration and new treatment of hepatocellular carcinoma based on the understanding of hepatic stem/progenitor cells for building a base and development.

研究代表者土屋 淳紀（TSUCHIYA ATSUNORI）

新潟大学医歯学総合病院 医員

研究者番号：70464005

研究成果の概要（和文）：本研究にて我々が明らかにしたことは以下の二つである。ひとつは肝幹前駆細胞の産生する stromal cell derived factor-1 (SDF-1)が肝障害時に肝再生に関し肝再生を推進する方向に働くことを SDF-1 のレセプター CXCR4 をノックアウトしたマウスに肝障害を与え解析することで明らかにした。更に、我々は肝細胞癌の一部に肝幹前駆細胞マーカー NCAM を発現するものを発見し、その予後が悪いことを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we got the following two conclusions. One is that by using knockout mice of CXCR4, the receptor of SDF-1, we elucidated that SDF-1 that is produced by hepatic stem/progenitor cells is important during liver regeneration. The other is that we firstly detected hepatocellular carcinoma (HCC) with hepatic stem/progenitor cell marker NCAM and revealed that prognosis of these NCAM-positive HCC was very poor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：肝再生、肝細胞癌、SDF-1、NCAM

1. 研究開始当初の背景

我々は、肝幹細胞の理解に基づき新たな再生医療、肝細胞癌治療ができないかを考えた。今回は二つの実験を主に行なった。以下二つの実験をそれぞれ実験(A) 実験(B)とする。

2. 研究の目的

（実験 A）今回はマウスを用いた肝幹前駆細胞が産生する stromal cell derived factor-1 が肝再生を促進する方向に働くのか、負の方

向に働くのかを確認することとした。これを確認する目的はもし、SDF-1 が肝再生を促進する方向で働いているのであれば、肝障害中は SDF-1 を分解する物質が肝臓には多いが SDF-1 を薬剤などで分解から守れば、再生が促進される可能性があるからである。

（実験 B）今回我々は、肝幹前駆細胞マーカーとして知られる neural cell adhesion molecule (NCAM)が一部の肝細胞癌に発現

していることを確認した。その肝細胞癌が臨床的には通常の肝細胞癌と比べて予後がどうか、また血清にての診断の可能性はどうか調べることにした。

3. 研究の方法

(実験 A)

我々は肝幹前駆細胞が産生する SDF-1 のレセプターの CXCR4 の conditional knock out マウスである MxCre-CXCR4f/-マウスに肝障害を起こす薬剤である CC14 を投与し、肝障害の程度、肝再生がどのように変わるかを確認した。我々はコントロールマウスとして MxCre-CXCR4f/+マウスを用い、血清肝酵素である ALT、ALP、肝線維化の程度、肝線維化の原因になる stellate cell のマーカー、各種 MMP など解析していった。

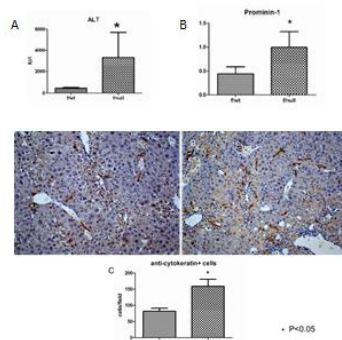
(実験 B)

我々は肝細胞癌切除症例を用いて、切除肝細胞癌中にどのくらいの頻度で NCAM 陽性肝細胞癌があるのかを確かめた。その後肝細胞癌患者などの血清を調べ NCAM が血清に切り出された際に生じる soluble NCAM の濃度を ELISA 法にて測定し予後との関連を解析した。そして NCAM を発現する肝細胞癌の cell line を用いて、NCAM 陽性が NCAM 陰性細胞と比べてどのような特徴を持つか、どのような NCAM の isoform を持つのか調べた。

4. 研究成果

(実験 A)

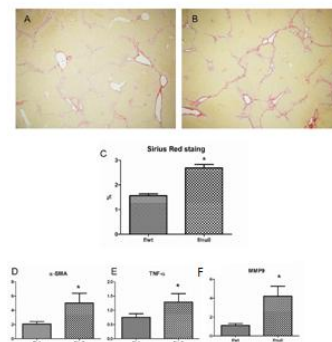
我々は 10 匹の MxCre-CXCR4f/-マウスと 12 匹の MxCre-CXCR4f/+マウスを用いて実験を行なった。10 匹の MxCre-CXCR4f/-マウスのうち 5 匹が特に knock out が効果的になされていたために、最終的には MxCre-CXCR4f/-マウス群ではこれら 5 匹のマウスを用いて行なった。その結果 MxCre-CXCR4f/-マウス群では肝障害時の逸脱酵素である ALT が上昇しており、また肝幹前駆細胞の数も増えており、特に幹細胞マーカーでも未熟と考えられる Prominin-1 が Real-time PCR にて優位に高かった。



(図 1) 上 A ; 血清 ALT 値。上 B; Prominin-1 の Real-time PCR 結果。下 A、B ; MxCre-CXCR4f/+マウス及び MxCre-CXCR4f/-マウスの anti-cytokeratin 抗体 (胆管及び肝幹前駆細胞を染めることができる) による免疫染色。下 C ; anti-cytokeratin 陽性細胞数のカウント。

さらに肝障害の進行によって起きる線維化の程度を比べてみた。

MxCre-CXCR4f/-マウスと MxCre-CXCR4f/+マウスの組織をそれぞれシリウスレッド染色を行い、染まった線維の割合を調べたところ、線維化の程度でも MxCre-CXCR4f/-マウス群が優位に高かった。これを裏づけるべく Real-time PCR にて肝線維化に密接に関わる肝星細胞マーカーの α SMA や TNF- α 、そして代表的な MMP、TIMP 群を調べたところ、 α SMA や TNF- α そして MMP-9 が MxCre-CXCR4f/-マウス群では優位に高かった。上記結果は MxCre-CXCR4f/-マウス群にて線維化が進行していた事実と矛盾しないものであると考えられた。



(図 2) A, B ; シリウスレッド染色。C ; シリウスレッド染色陽性エリア (線維のエリア) の測定。D-F ; Real-time PCR の結果。

上記の結果は MxCre-CXCR4f/-マウス群では障害を強く受けやすく、また線維化も強くおきることを表している。つまり肝幹前駆細胞が産生する SDF-1 は肝臓の再生に促進する方向に働くことが言えると考えられた。このことは、肝障害中に多く存在する SDF-1 を分解する物質を薬剤などで分解から守れば、SDF-1 が効果的に働けば再生が促進される可能性がある。実際このような薬剤は存在しているので今後検討をしていきたいと考えている。

(実験 B)

手術にて切除された肝細胞癌 60 症例を解析したところ NCAM 陽性肝細胞癌は 5 例 (約

8.3%)に見られた。これらの5例に関し予後を調べたがそれらは良いものではなかった。5例と少数で断定的なことは言えなかったが予後は悪い可能性があるのではないかと推定された。そこで今度は手術をしないでもNCAM陽性肝細胞癌が診断出来るかどうかの可能性を検討するため肝細胞癌患者血清を用いて soluble NCAM の測定を行うこととした。

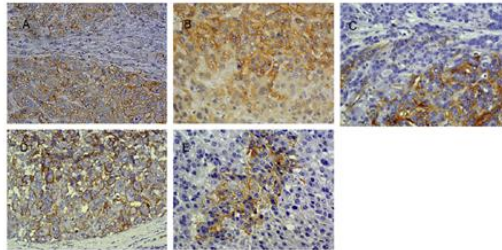


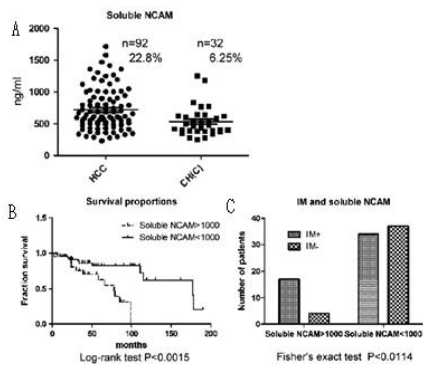
Table 3
Clinical characteristics of the patients with NCAM-HCC.

Case	Age	Sex	Diagnosis	Tumor lesion and size	Degree of differentiation	NCAM+ cells (%)	AFP	PIVKA	Pre-operative remarks	Pathological portal vein invasion	Survival time
1	78	M	HCC	56-5	mod	<5	35	20	Post portal vein recanalization	+	71 days dead
2	70	M	HCC, HCV	55, 20 mm	mod	<5	103	24	Post SH (SHV), SMNCS 1.a, Post SH	-	30 months alive
3	73	M	HCC, HCV	56-2	mod	<5	105	ND	Post SH	+	80 days dead
4	60	M	HCC, HBV	56, 10 mm	mod	<5	548	ND	SH, Lamivudine, Entecavir, Lamivudine + Adjuvant	+	14 months dead
5	75	M	HCC, HBV	56, 55 mm	mod	<5	373	465		-	20 months alive

NCAM: non-9 (HBV) non-4 (HCV); mod: moderately differentiated hepatocellular carcinoma, SHV: sustained virological response, SMNCS: systemic malaise and immunopromotion, SH: shunt.

(図3)5例のNCAM陽性肝細胞癌(上図)とその臨床経過(上表)

肝細胞癌患者血清を調べたところ、肝細胞癌症例の一部で soluble NCAM が非常に高くなっていることが分かった。soluble NCAM 高値群と低値群とを比べたところ高値群ではその予後が非常に悪いことが分かった。また、soluble NCAM 高値群では優位に肝内転移(IM)が高くなっていることが判明した。



(図4)A;患者のSoluble NCAM濃度の測定。肝細胞癌(HCC)患者軍ではC型肝炎例(に比べ高い濃度の群があることがわかる。B;肝細胞癌患者でSoluble NCAM高値群と低値群を比べると高値群の予後が悪かった。C;Soluble NCAMと肝内転移(IM)との関連性。Soluble NCAM高値群では肝内転移が優位に高かった。

そのほかにも、NCAM陽性細胞を含むの肝細胞

癌の cell line を解析したところ、NCAM陽性細胞は陰性細胞に比べ浸潤能や増殖能が高いことが分かった。また、その cell line ではNCAMには isoformが3つあるが主に140kDaのNCAMがNCAMを構成する主体であることも推定できた。

今後、なぜNCAM陽性肝細胞癌は予後が悪いのかという点に付いても検討を始めており、現在その可能性のある分子を同定し、検証していく作業をしている。我々の研究は肝細胞癌の中でも予後の悪い群を同定し、治療を目指すものである。原因分子の同定は治療につながる可能性を含んでおりまたそこには幹細胞研究との共通点もあり、非常に興味深くこのテーマを今後も継続していきたいと考えている。

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3件)

1) Increased susceptibility to severe chronic liver damage in CXCR4 conditional knock-out mice.

Tsuchiya A, Imai M, Kamimura H, Takamura M, Yamagiwa S, Sugiyama T, Nomoto M, Heike T, Nagasawa T, Nakahata T, Aoyagi Y

Dig Dis Sci (in print)

2) Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence.

Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y.

J. Hepatol 2012 Feb;56(2):381-8.

3) Hepatocellular carcinoma with progenitor cell features distinguishable by the hepatic stem/progenitor cell marker NCAM.

Tsuchiya A, Kamimura H, Tamura Y,
Takamura M, Yamagiwa S, Suda T, Nomoto
M, Aoyagi Y.

Cancer Lett 2011 Oct 1;309(1):95-103.

〔学会発表〕（計 1 件）

1) JDDW2010

肝幹前駆細胞マーカーNCAM を用いた
HCC with progenitor cell features の血清
診断及び治療への応用の可能性

発表年月日；2010 年 10 月 14 日

発表場所；横浜

土屋淳紀、野本実、青柳豊

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 淳紀 (TSUCHIYA ATSUNORI)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：70644005

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

