

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 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23890164
 研究課題名（和文）
 質量分析を用いた肝細胞癌における癌幹細胞特異的なバイオマーカーの解明
 研究課題名（英文）
 Analysis of biomarkers specific for cancer stem cell in hepatocellular carcinoma using mass spectrometry
 研究代表者
 土居 浩一 (DOI KOICHI)
 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
 研究者番号：40608858

研究成果の概要（和文）：

肝細胞癌においてSide population(SP)細胞特異的なマーカーの同定を試みた。高分化細胞株であるPLC/PRF/5とHuH1細胞と、低分化細胞株であるHLEとHLFを用いてSP細胞およびMajor population (MP) 細胞を分離し、蛋白レベルでの発現分布を網羅的に比較すると、66kDaの高さにSP細胞でのみ共通する発現が非常に高いバンドを確認した。質量分析法で同定を試みると、AlbとTCP1の2つの蛋白が同定された。しかし、Western法ではSP細胞 >> MP細胞の発現パターンとは一致せず、同定された蛋白が目的の蛋白とは異なる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to identify the biomarker specific for side population (SP) cell in hepatocellular carcinoma. SP cells and major population (MP) cells in both well differentiated and poorly differentiated cell lines were sorted for protein expression analysis. We found 66kDa protein which is specific for SP cells. Mass spectrometric analysis showed two candidate proteins, Alb and TCP1. However, these proteins were not overexpressed in SP cells using Western blot analysis, suggesting that proteomic analysis still needs some improvements in its process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：Side population細胞、ATP-Binding Cassette トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞について：2001年に癌幹細胞(Cancer stem cell: CSC)の概念が提唱され(Reya et al. *Nature*)、急速にその研究報

告数は伸びつつあり、現在癌の分子生物学的研究において最も注目される分野である。血液癌だけでなく、固形癌においても様々な癌腫においてその存在が提唱されている。肝細

肺癌においては、CD90 (Yang et al. Cancer Cell 2008) , CD133(Stephanie et al. Gastroenterology 2007), CD44, CD13(Haraguchi et al. J Clin Invest 2010) などの癌幹細胞マーカーがこれまで報告されている。しかし、いずれのマーカーについてもその普遍性については十分とは言えず、肝細胞癌細胞株 8 株でこれらのマーカーの発現を RT-PCR で調べると、発現する細胞の割合は 25~75% 程度である。

(2) プロテオミクス：近年バイオマーカーの探索に SELDI-TOF MS (Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)、MS/MS 解析が用いられ、候補蛋白の最終的な同定作業に欠かせない modality となっている。これを用いることで、CSC に特異的なかつ普遍的なマーカーの同定を行う。

2. 研究の目的

本研究では、Side population (SP) 細胞を癌幹細胞と仮定し、細胞株を用いて SP 細胞に共通するマーカーを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌における癌幹細胞の解析法としては SP 細胞を用いた解析を行った (Haraguchi et. al. *J Clin Invest* 2010, Chiba et. al. *Cancer Res* 2008)。肝細胞癌細胞株 8 株より FACS を用いて SP 細胞を分離し、分離した細胞の蛋白を抽出した。8 対の (SP 細胞 vs Non-SP 細胞) の蛋白を SELDI-TOF MS を用いて網羅的にピーク比較解析を行った。絞り込まれたピークについては、SDS-PAGE で得られた band を切り出し、MS/MS 解析により蛋白同定作業を行った。

(2) また同時に、SP 細胞の機能的な側面を検証するため、sphere 形成能および ABC トランスポーターの発現分布を調べた。

4. 研究成果

(1) 高分化細胞株である PLC/PRF/5 と HuH1 細胞と、低分化細胞株である HLE と HLF を用いて SP 細胞および Major population (MP) 細胞を分離し、蛋白レベルでの発現分布を比較すると、66kDa の高さに SP 細胞でのみ共通する発現が非常に高いバンドを確認した。質量分析法で同定を試みると、Alb と TCP1 の 2 つの蛋白が同定された。しかし、Western 法では SP 細胞 >> MP 細胞の発現パターンとは一致せず、同定された蛋白が目的の蛋白とは異なる可能性が考えられた。

(2) 幹細胞性の代表的なアッセイである Sphere 形成能を比較すると、高分化細胞 2 株から分離した SP 細胞は非 SP 細胞と比較して、有意に高い Sphere 形成能を示したものの、

低分化細胞においては SP 細胞と非 SP 細胞間での差は認めなかった。

(3) RNA レベルでの発現分布について、Hoechst 排泄との関与が報告される ABCG2 と ABCB1 の発現パターンについて 4 株における SP 細胞と非 SP 細胞における発現を比較した。高分化細胞株においては、SP 細胞において ABCG2 と ABCB1 の発現は著明に亢進していた。一方低分化細胞株においては、SP 細胞における ABCG2、ABCB1 の発現はいずれも有意に低下しており、ABC トランスポーターの発現形式が異なることを確認した。薬剤排泄のメカニズムにこれらのトランスポーターが関与している可能性がある。しかし、低分化細胞においては SP 細胞と非 SP 細胞間の Phenotype の違いは少なく、ABC トランスポーターの発現形式も高分化細胞と逆であった。Hoechst を用いた幹細胞集団の抽出法が低分化細胞に適応できない可能性がある。

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 2 件)

1. Koichi Doi, Toru Beppu, Takatoshi Ishiko, Akira Chikamoto, Toshiro Masuda, Hideyuki Tanaka, Masatoshi Kuramoto and Hideo Baba
「Laparoscopic and thoracoscopic thermal ablation for hepatocellular carcinoma」
J Microwave Surg 30 : 225-230, 2012
査読無
URL:
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ailjmwse/2012/003000/033&name=0225-0230j&UseRID=133.95.84.91>
2. Toru Beppu, Hiromitsu Hayashi, Hirohisa Okabe, Toshiro Masuda, Kosuke Mima, Shinichi Sugiyama, Kei Horino, Ryu Otao, Akira Chikamoto, Koichi Doi, Takatoshi Ishiko, Hiroshi Takamori, Yasuyuki Yamashita, Hideo Baba
「Liver functional volumetry for portal vein embolization using a newly-developed 99mTc-galactosyl human serum albumin scintigraphy fusion system.」
J Gastroenterol 46: 938-43, 2011
査読有
DOI : 10.1007/s00535-011-0406-x.

[学会発表] (計 39 件)

1. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、林 洋光、新田英利、生田義明、中原 修、石河隆敏、高森啓史、中曾根豊、池田 理、山下康行、馬場秀夫
「シャント型脳症に対する門脈大循環分流術の治療効果の検討」
2012 年度日本消化器関連学会週間 (2012 年 10 月 12 日 兵庫県 神戸国際展示場)
2. 近本 亮、別府 透、有馬浩太、中村健一、大内繭子、岡部弘尚、今井克憲、林洋光、新田英利、中原 修、生田義明、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「肝細胞癌切除後の腫瘍マーカー変化と再発との関連」
2012 年度日本消化器関連学会週間 (2012 年 10 月 12 日 兵庫県 神戸国際会議場)
3. 今井克憲、別府 透、近本 亮、岡部弘尚、林 洋光、新田英利、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「単発小型肝細胞における初回治療としての肝切除術の治療成績と予後因子」
第 48 回日本肝癌研究会 (2012 年 7 月 21 日 石川県 ANA クラウンプラザホテル金沢)
4. 新田英利、別府 透、中川茂樹、黒木秀幸、美馬浩介、今井克憲、林 洋光、中原 修、生田義明、近本 亮、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「混合型肝癌と腫瘍形成型肝内胆管癌切除の比較検討」
第 48 回日本肝癌研究会 (2012 年 7 月 20 日 石川県 ANA クラウンプラザホテル金沢)
5. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、林 洋光、新田英利、生田義明、中原 修、甲斐田剛圭、清住雄希、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「肝切除における SSI 発生因子の解析と対策」
第 67 回日本消化器外科学会 (2012 年 7 月 19 日 富山県 富山国際会議場)
6. 岡部弘尚、別府 透、林 洋光、土居浩一、今井克憲、新田英利、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「SPECT-CT fusion system を用いた機能的肝切除率の臨床的意義」
第 67 回日本消化器外科学会 (2012 年 7 月 19 日 富山県 富山第一ホテル)
7. 林 洋光、別府 透、土居浩一、中村健一、大内繭子、今井克憲、新田英利、近本 亮、石河隆敏、馬場秀夫
「肝硬変に伴う脾機能亢進症に対する脾体積理論に基づいた治療戦略-PSE」
第 67 回日本消化器外科学会 (2012 年 7 月 19 日 富山県 富山第一ホテル)
8. 別府 透、近本 亮、土居浩一、林 洋光、新田英利、今井克憲、生田義明、高森啓史、石河隆敏、馬場秀夫
「化学・分子標的治療後の肝癌・大腸癌肝転移に対する外科手術のポイント」
第 66 回手術手技研究会 (2012 年 5 月 26 日 福岡県、ホテルニューオータニ博多)
9. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、林 洋光、新田英利、生田義明、中原 修、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「高齢者小肝細胞癌における鏡視下ラジオ波凝固療法的安全性の評価」
第 24 回日本肝胆膵外科学会 (2012 年 5 月 24 日 大阪市 大阪国際会議場)
10. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、新田英利、生田義明、中原 修、甲斐田剛圭、清住雄希、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「肝癌治療における門脈即戦術および門脈結紮術の工夫とその評価」
第 112 回日本外科学会 (2012 年 4 月 13 日 千葉県 幕張メッセ国際会議場)
11. 別府 透、近本 亮、土居浩一、今井克憲、新田英利、岡部和利、増田稔郎、岡部弘尚、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「肝細胞癌治療における門脈塞栓術の多角的効果」
第 112 回日本外科学会 (2012 年 4 月 13 日 千葉県 幕張メッセ国際会議場)
12. 今井克憲、別府 透、近本 亮、清住雄希、甲斐田剛圭、新田英利、生田義明、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「腫瘍径 2cm 以上は小型肝細胞癌 (3cm) に対するラジオ波凝固療法における再発予後規定因子である。」
第 112 回日本外科学会 (2012 年 4 月 13 日 千葉県 幕張メッセ国際会議場)
13. 新田英利 別府 透、甲斐田剛圭、清住雄希、中川茂樹、黒木秀幸、美馬浩介、岡部弘尚、今井克憲、中原 修、生田義明、近本 亮、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「当院における混合型肝癌 22 例の検討」
第 112 回日本外科学会 (2012 年 4 月 13 日 千葉県 幕張メッセ国際会議場)
14. 美馬浩介、岡部弘尚、石本崇胤、中川茂樹、黒木秀幸、今井克憲、新田英利、生田義明、近本 亮、土居浩一、高森啓史、別府 透、馬場秀夫
「肝細胞癌における癌幹細胞マーカー CD44 の上皮間葉形質転換 (EMT) への関与」
第 112 回日本外科学会 (2012 年 4 月 13 日 千葉県 幕張メッセ国際会議場)

15. 土居浩一、緒方健一、平野祐一、工藤啓介、成田泰子、大地哲史、馬場秀夫
「急性汎発性腹膜炎における周術期血清乳酸値測定の意義」
第111回日本外科学会（2011年 東日本大震災のため紙上発表）
16. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、林 洋光、新田英利、増田稔郎、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「脾機能亢進症に対する用手補助下脾臓摘除術の検討」
第24回日本内視鏡外科学会（2011年12月8日 大阪府 大阪国際会議場）
17. 新田英利、別府 透、土居浩一、中川茂樹、美馬浩介、岡部弘尚、甲斐田剛圭、清住雄希、東 孝暁、今井克憲、中原 修、生田義明、近本 亮、高森啓史、馬場秀夫
「高度脈管侵襲陽性肝細胞癌に対する術後予防肝動注療法について」
第49回日本癌治療学会学術集会（2011年10月28日 愛知県 名古屋国際会議場）
18. 近本 亮、別府 透、甲斐田 剛圭、清住雄希、新田英利、今井克憲、中原 修、生田義明、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「S2, S3 肝細胞癌の再発形式および予後の解析」
第49回日本癌治療学会学術集会（2011年10月28日 愛知県 名古屋国際会議場）
19. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、新田英利、生田義明、中原 修、甲石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「肝癌治療における門脈結紮術の有用性」
第49回日本癌治療学会（2011年10月28日 愛知県 名古屋国際会議場）
20. 今井克憲、別府 透、土居浩一、近本 亮、石河隆敏、新田英利、岡部弘尚、美馬 浩介、東 孝暁、甲斐田剛圭、清住雄希、中原 修、生田義明、高森啓史、馬場秀夫
「EPS10-2, 単発小型肝細胞癌の初回切除例における微小脈管侵襲、肝内転移の予測因子」
第49回日本癌治療学会学術集会（2011年10月27日 愛知県 名古屋国際会議場）
21. 別府 透、近本 亮、増田稔郎、美馬浩介、岡部弘尚、阿部真也、今井克憲、岡部和利、杉山眞一、富安真二郎、土居浩二、高森啓史、石河隆敏、馬場秀夫
「脈管侵襲陽性・進行肝細胞癌の資料戦略-肝切除、IVR、放射線治療からソラフェニブの時代へ」
2011年度日本消化器関連学会週間（2011年10月23日 福岡県 西鉄グランドホテル）
22. 今井克憲、別府 透、近本 亮、美馬浩介、岡部弘尚、増田稔郎、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「肝細胞癌治療における内視鏡下治療（肝切除・局所凝固療法）の意義」
2011年度日本消化器関連学会週間（2011年10月23日 福岡県 西鉄グランドホテル）
23. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、林 洋光、新田英利、生田義明、中原 修、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「高齢者小肝細胞癌における鏡視下ラジオ波凝固療法の安全性の評価」
2011年度日本消化器関連学会週間（2011年10月22日 福岡県 西鉄グランドホテル）
24. 土居浩一、別府 透、近本 亮、今井克憲、林 洋光、新田英利、生田義明、中原 修、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫
「脾機能亢進症における治療選択基準の検討」
第18回日本門脈圧亢進症学会（2011年9月16日 福岡県 マリンメッセ福岡）
25. 今井克憲、別府 透、土居浩一、石河隆敏、近本 亮、新田英利、中原 修、生田義明、高森啓史、池田 理、山下康行、馬場秀夫
「肝性脳症に対する門脈大循環分流術の検討」
第18回日本門脈圧亢進症学会総会（2011年9月15日 福岡県 マリンメッセ福岡）
26. 土居浩一、緒方健一、平野祐一、工藤啓介、成田泰子、大地哲史、馬場秀夫
「急性汎発性腹膜炎における周術期血清乳酸値測定による予後判定の検討」
第66回日本消化器外科学会（2011年7月23日 愛知県 名古屋国際会議場）
- 〔図書〕（計2件）
1. 土居浩一、別府 透、近本 亮、美馬浩介、岡部弘尚、今井克憲、林 洋光、新田英利、坂本快郎、宮本裕士、渡邊雅之、石河隆敏、馬場秀夫
医学書院 「切除不能大腸癌肝転移に対する conversion therapy」
臨床外科 67巻第1号 46-53 2012年
2. 中村健一、高森啓史、中原 修、生田義明、黒木秀幸、中川茂樹、美馬浩介、岡部弘尚、新田英利、今井克憲、近本 亮、土居浩一、石河隆敏、別府 透、猪山賢一、馬場秀夫
癌と化学療法社 「播種性骨髄癌症を呈した腓尾部癌の1例」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 浩一 (DOI KOICHI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40608858