

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590994

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスと腫瘍ニッチ関連分子による肝癌幹細胞制御機構の解析

研究課題名(英文) Role of HCV and periostin on the regulation of liver cancer stem cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まずHCV subgenomic repliconを発現させたHCV-FL細胞を用い、HCV-FL細胞では肝癌幹細胞分画が増加し、HCVにより肝癌幹細胞の割合を増加させることを初めて示した。さらに癌幹細胞分画にHCV core蛋白を発現させたところ、幹細胞分画の増加とSphere形成能が増加した。また癌幹細胞分画増加は、HIF-1の誘導を介する機構であることを見出した。次に、Periostin KOマウスを用いて肝硬変モデル、肝癌モデルを作成した。periostin KOマウスでは肝線維化が抑制され、DENによる肝腫瘍形成が抑制された。現在、肝癌幹細胞に対する機能解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：The aims of the study are to investigate the role of HCV virus on the liver cancer stem cell (CSC) biology; and to investigate the role of periostin on the liver carcinogenesis. The novel findings of the manuscript include: 1) CD133+/SP subpopulation is a distinct CSC population in Huh7 cells; 2) transduction of HCV full-length replicon or HCV core protein expands CSC population and augments CSC properties through two different mechanisms including (a) HCV induced expansion of CSC population through potentiation of self-renewal capacity and (b) transition from non-CSC CD133-/SP cells to CSC CD133+/SP cells; 3) HCV-mediated expansion of CSC population and augmentation of CSC properties are mediated by HIF-1 stabilization; 4) periostin KO mice did not develop CCL4-induced liver fibrosis as compared with WT mice; and 5) periostin KO mice did not develop DEN-induced liver tumors.

研究分野：消化器内科

キーワード：癌幹細胞 HCV Periostin

1. 研究開始当初の背景

癌においては、自己複製能に限られた範囲での分化能を有する癌幹細胞(cancer stem cell)と呼ばれる分画が存在し、腫瘍形成能、抗癌剤や放射線に対する抵抗性、転移に重要な役割を果たすと考えられる。HCV感染は、本邦において慢性肝炎、肝硬変、そして肝癌の主要な原因であるが、HCV感染の癌幹細胞に対する役割は明らかではない。ウイルス側因子に加えて、宿主側の因子として肝線維化が重要である。申請者はこれまで、肝線維化のメカニズム、特に肝星細胞の活性化、増殖における細胞内シグナルの伝達経路およびその活性化、増殖調節機構に関する研究を行ってきたが、肝臓においては肝在位の肝星細胞が腫瘍浸潤筋線維芽細胞のソースであると考え、平成21年度、22年度の科研費若手研究(B)において、肝癌ニッチとして肝線維化に重要な肝星細胞に注目し、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。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。また、種々の液性因子が腫瘍ニッチにおける肝幹細胞分画に関与すると考えられるが、なかでも細胞外マトリックス蛋白Periostinは重要な因子と考えられる。Periostinは90kDaの分泌蛋白で、細胞外マトリックスと相互作用し、傷害心の創傷治癒や心筋再生に関与するという報告がある(Kuhn et al. Nature Med 13(8), 2007)。さらに、癌においても、Periostinが癌間質に発現し癌細胞の増殖に関与する(Bao et al. Cancer Cell 5, 2004)という報告がある。なかでも、膵星細胞由来のPeriostinが膵癌細胞の増殖を促進するという報告(Erkan et al. Gastroenterology 132, 2007)があるが、肝癌に対するPeriostinの役割についてはいまだ未解明である。そこで、申請者のこれまでの検討も踏まえ、肝星細胞由来のPeriostinが肝癌の増殖や、癌幹細胞のstemness維持に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

1. の背景をもとに、本申請研究では、まずHCVウイルス感染に注目し、癌幹細胞の自己複製能、未分化維持能・腫瘍形成能・アポトーシス抵抗性といったstemness維持機構に対するHCVの役割の解明を目指す。さらに腫瘍ニッチや線維化に重要な因子Periostin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Periostin関与を次の2つについて検討するものである。

(1)【検討1 .C型肝炎ウイルス持続感染培養肝癌細胞株を用いたHCVウイルスによる癌幹細胞の制御機構の検討】

HCVウイルス subgenomic replicon を発現するHuh-FL肝癌細胞株、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、HCV感染に伴う癌幹細胞分画の変化とその分子機構について検討を行う。さ

らに、インターフェロンを投与し、インターフェロンによるウイルスゲノム排除により、癌幹細胞分画が変化するか検討する。さらに、HCV replicon 発現するHuh-FL細胞より分離した癌幹細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能促進の有無を検討する。

(2)【検討2 .細胞外マトリックス液性分子Periostinによる癌幹細胞に対する機能解析】

Periostin(*postn*)ノックアウトマウスを用いて肝癌モデルを作成する。Periostin(*postn*)ノックアウトマウス由来の腫瘍浸潤筋線維芽細胞あるいは活性化肝星細胞の分離培養を行い、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。また、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

(1)【検討1 .C型肝炎ウイルス持続感染培養肝癌細胞株を用いたHCVウイルスによる癌幹細胞の制御機構の検討】

肝癌細胞株Huh7を用いて、CD133、Side Population(SP)など幹細胞マーカーの発現を検討し、腫瘍形成能、未分化維持能、抗癌剤耐性能を検討した。次に、HCV subgenomic replicon を発現するHuh-FL細胞、さらにHCV-core蛋白を発現するアデノウイルスを用いて、HCV感染に伴う癌幹細胞分画の変化とその分子機構について検討を行った。

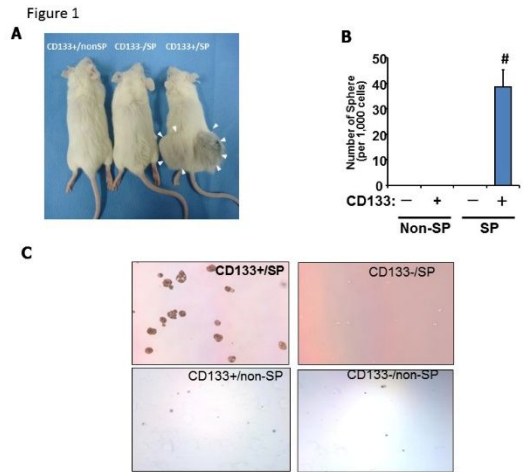
(2)【検討2 .細胞外マトリックス液性分子Periostinによる癌幹細胞に対する機能解析】

Periostinノックアウトマウスを用いて肝癌モデルを作成し、Periostinによる肝発癌の有無を検討する。ノックアウトマウス由来の腫瘍浸潤筋線維芽細胞を分離培養し肝癌をはじめとする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した。

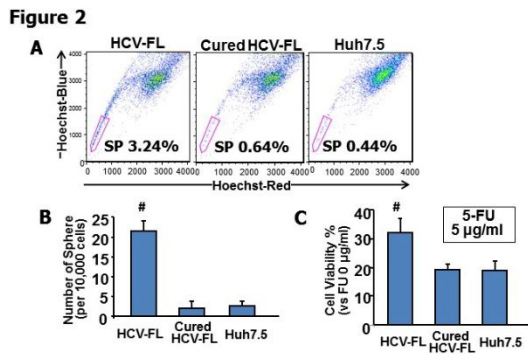
4. 研究成果

(1)【検討1 .C型肝炎ウイルス持続感染培養肝癌細胞株を用いたHCVウイルスによる癌幹細胞の制御機構の検討】

肝癌細胞株Huh7を用いて、上記マーカーを含めた幹細胞マーカーの発現を検討し、腫瘍形成能、未分化維持能、抗癌剤耐性能を検討したところ、CD133陽性Side Population (SP)細胞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(Figure 1)。

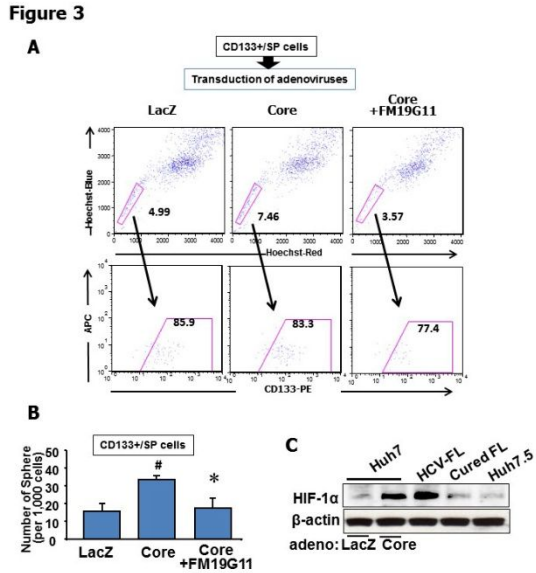


次に高HCV 複製感受性株Huh7.5細胞、Huh7.5細胞にHCV subgenomic repliconを発現させたHCV-FL細胞を用いてHCV ウイルスによる肝癌幹細胞の制御機構の検討を行った。SP分画の割合を検討したところ、HCV-FL細胞ではHCVゲノムを有さないHuh7.5細胞に比べてSP分画が増加した。HCV-FL細胞からインターフェロンを使ってHCVゲノムを除去したCured HCV-FL細胞ではSP分画がHuh7.5細胞と同等まで減少し、HCV ウイルスにより肝癌幹細胞の割合を増加させることを初めて示した (Figure 2)。



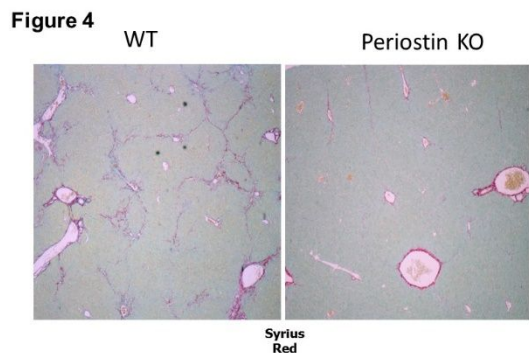
さらに HCV によるウイルス増殖や肝発癌に重要とされる HCV-core 蛋白を発現するアデノウイルスを Huh7 細胞に感染導入し、CD133、SP などの癌幹細胞マーカーの発現変化を解析したところ、Lac-Z 発現アデノウイルス感染に比べ、SP 細胞分画の変化、Sphere 形成能が増加した。さらに CD133 陽性 SP 細胞分画に HCV-core を発現するアデノウイルスを感染導入したところ、SP 細胞分画が増加し、Sphere 形成能も増加した (Figure 3A, 3B)。この癌幹細胞分画の増加のメカニズムに重要な分子について検討をおこなった。Huh7 細胞に HCV-core 蛋白の導入、あるいは、HCV-FL 細胞で Hypoxia-inducible factor 1 (HIF 1) の発現が誘導された (Figure 3C)。そこで、HIF 1 阻害剤 FM19G11 を用いて検討し

たところ、CD133 陽性 SP 細胞分画に HCV-core を導入により増加する SP 細胞分画、および Sphere 形成能は FM19G11 によって阻害された (Figure 3A, 3B)。以上から、HCV ウイルス感染による癌幹細胞分画の増加は、HIF 1 の誘導を介する機構であることを見出した。上記について現在論文投稿中である。

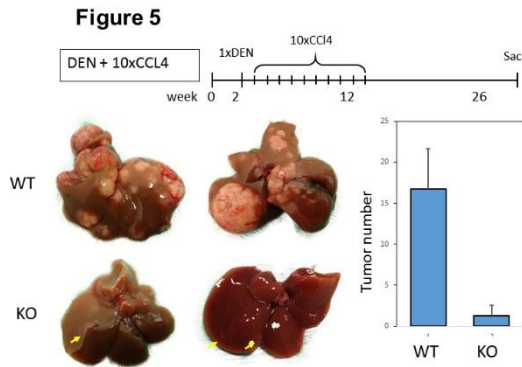


(2) 【検討 2 . 細胞外マトリックス液性分子 Periostin による肝癌幹細胞に対する機能解析】

periostin は細胞外マトリックス蛋白であり、肝線維化のメカニズムにも関与することが推測されるため、四塩化炭素によるマウス肝硬変モデルを作成し、periostin による線維化の変化を検討したところ、Periostin ノックアウトマウスでは線維化が抑制された (Figure 4)



次に、DEN(diethylnitrosamine)誘発肝癌モデルを用いて肝癌を作成し、腫瘍数、腫瘍径等について野生型マウスとの比較をおこなった。野生型では DEN により肝癌が多発したものの、ノックアウトマウスでは腫瘍形成が有意に抑制された (Figure 5)。



以上から、Periostin は肝線維化、肝発癌に重要な分子であることがわかった。肝線維化モデルの病理組織の免疫染色による検討では、活性化肝星細胞マーカーの SMA と Periostin の発現が一致しており、肝星細胞による Periostin の発現が重要であると考えられた。

Periostinは90kDaの分泌蛋白で、細胞外マトリックスと相互作用し、傷害心の創傷治癒や心筋再生に関与するという報告がある(Kuhn et al. Nature Med 13(8), 2007)。さらに、癌においても、Periostinが癌間質に発現し癌細胞の増殖に関与する(Bao et al. Cancer Cell 5, 2004)という報告がある。なかでも、肝星細胞由来のPeriostinが肝癌細胞の増殖を促進するという報告(Erkan et al. Gastroenterology 132, 2007)があるが、肝癌に対するPeriostinの役割についてはいまだ未解明である。そこで、肝星細胞由来のPeriostinが肝癌の増殖や、肝癌幹細胞のstemness維持に関与する可能性が考えられ、検討を続けている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Masayuki Adachi, Hiromasa Takaishi, Hajime Higuchi, and Toshifumi Hibi. Hepatitis C virus core protein increases the cancer stem cell-like populations in Hepatocellular Carcinoma Cell Line via hypoxia inducible factors. Annual Meeting of American Association of the Study of Liver Diseases (AASLD) 2012年11月 米国ボストン

〔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〕
特になし

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