

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 24 年度～平成 24 年度

課題番号：24659606

 研究課題名（和文） 肝癌に対する新規治療開拓を目指した肝癌幹細胞の単離と
発癌過程の細胞生物学的検討

 研究課題名（英文） Identification and characterization of hepatic cancer stem cells and
cell biological investigation of oncologic process for developing new treatment of HCC

研究代表者

上本伸二 (Uemoto Shinji)

京都大学大学院医学研究科 肝胆膵移植外科 教授

研究者番号：40252449

研究成果の概要（和文）：

今回我々は、肝癌発癌メカニズムを細胞生物学的に解明することを目指して、遺伝子改変発癌モデルマウスを用いて肝癌幹細胞の起源を解明するとともに、発癌過程における遺伝子発現変化を検証する実験を行った。

まず、CAG promoter 制御下に発現する発癌遺伝子の一種であるヒト c-Myc と ER の融合蛋白を発現する遺伝子改変マウスを作成することに成功した。作成した遺伝子改変マウス胎仔から我々がすでに確立した cell aggregate 法により胎仔肝前駆細胞を採取すると共に、成体マウスから成熟肝細胞を採取した。遺伝子改変マウスの繁殖に難渋したため現時点では十分なサンプル数を獲得しえておらず、その増加に努めている。

今後は、各分化段階の肝細胞（前駆細胞・成熟肝細胞）に対してタモキシフェン投与を行い種々の発癌段階の細胞を獲得する予定である。

研究成果の概要（英文）：

We investigated to the origin of CSCs and the oncogenic process of HCC.

First, we successfully generated oncogene-regulatory expressing transgenic mice which express the fusion protein of c-Myc and ER. We isolated fetal hepatic progenitor cells from the transgenic fetal mice by the method of cell aggregate which we established previously. And then, we isolated adult hepatocytes from adult transgenic mice.

However, it is difficult for us to breed the transgenic mice, so we actually cannot use a needed amount of samples.

We are trying to breed and increase the transgenic mice.

After that, we will expose hepatocytes at each stage of differentiation to Tamoxifen and acquire cancer cells at several stages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：再生医学，癌幹細胞，肝臓癌

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の治療においては肝切除術・ラジオ波焼灼療法・肝動脈塞栓化学療法などの有効な治療法が存在するが、これらの治療法が適応とならない進行肝細胞癌も決して少なく

ない。このような進行肝細胞癌には肝動脈注入化学療法や全身化学療法が施行されている。これまでの臨床研究の結果、low dose FP療法(低用量 5-FU/CDDP 肝動注療法)や 5-FU/IFN 療法などの肝細胞癌に治療効果が

認められるいくつかの肝動注療法のプロトコールが存在することに加え、癌細胞増殖の分子メカニズムを踏まえた新しい分子標的治療薬も保険適応となり治療選択肢は増加しつつある。しかし、乳癌や大腸癌などに対する化学療法と比較すると未だその奏功率は低く、細胞生物学的特性を踏まえた肝細胞癌に対する新規治療法の開発は重要な課題となっている。

肝細胞癌はその多くが肝炎ウイルス感染により惹起される肝細胞への遺伝子変異の蓄積により、種々の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の機能異常が招来された結果、発癌してることが明らかとなってきている。遺伝子異常の発生メカニズムは突然変異や欠失などの直接的な遺伝子変異のほか、**epigenetic modulation** の関与なども示唆されており、複雑な過程を背景としていられる。さらに、発癌時にはひとつの癌細胞のクローナルな増殖により一つの病巣が構成されはじめると考えられる肝細胞癌も他の固形癌と同様に多くの癌細胞が集簇して構成されている **heterogenous** な細胞集団である。つまり、癌細胞の増殖過程や上記のような治療経過中に **heterogeneity** が形成されるような腫瘍細胞の性質変化が生じてくることが想定される。こうした発癌メカニズムの複雑さや腫瘍構成細胞の **heterogeneity** を反映して、基礎研究においては高い治療効果が認められる抗腫瘍薬を使用しているにもかかわらず、実臨床においては化学療法における治療効果は個々の症例により異なるだけでなく、同一症例の治療経過中にも治療効果が変化してくる。さらに、実際の切除標本の肉眼形態における **nodule in nodule** 型や混合型肝癌の存在は、腫瘍構成細胞の **heterogeneity** を具現していると考えられる。近年の細胞生物学の進歩により、腫瘍構成細胞の **heterogeneity** 形成の一因として、古くから概念として提唱されていた癌幹細胞の存在が白血病などの血液疾患をはじめ、最近では乳癌や脳腫瘍といった固形癌においても癌幹細胞の存在が実証されてはじめていいる。肝細胞癌においても腫瘍構成細胞の中に自己複製能と多分化能を有することで定義される幹細胞（癌幹細胞）が存在し、その増殖過程において性質の異なる細胞集団を派生させながら腫瘍を形成するとも考えられる。癌細胞と正常細胞との類似点・相違点の解析は安全な新規治療法の確立に非常に重要な知見を与える。旺盛な増殖力と自己複製能、さらに自己と異なる細胞を派生させる（多分化能）といった癌幹細胞の性質は、これまで幹細胞生物学の上で同定されてきた幹細胞の性質と類似していることから、癌の発生母地である各組織に存在する組織性幹細胞の同定・単離の知見を踏まえて癌幹細胞の同定・単離を行う必要がある。

現在、肝細胞癌幹細胞の発生母地が正常肝組織を構成している肝幹細胞が癌化したものか、もしくは最終分化した肝細胞を起源として発生するのかなど不明な点が多く、肝癌幹細胞を単離しその特性解析を行うことにより肝癌幹細胞の治療戦略構築に重要な情報が得られるものと推定される。

2. 研究の目的

本研究は、肝癌に対する新規治療開拓を目指して、遺伝子改変発癌モデルマウスを用いて肝癌幹細胞の起源を解明するとともに、発癌過程における遺伝子発現変化を検証して発癌メカニズムを細胞生物学的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 遺伝子改変マウスの作成

A. 発現プラスミドの作成

発癌遺伝子の一種であるヒト c-Myc 遺伝子の全長 cDNA を RT-PCR によりクローニングする。PCR 産物は pGEM-T ベクターに組み込む。クローニングしたヒト c-Myc 遺伝子 ORF の開始コドン (ATG) の上流に XhoI/EcoRI 制限酵素サイトを設けておくとともに、停止コドンを取り除き XhoI 制限酵素サイトを設ける。pCreERT2 プラスミドを pBSSK(-) プラスミドに ligation する (pBSSK(-)-ER)。上記のヒト c-Myc 遺伝子を含んだ pGEM-T ベクターの XhoI fragment を上記の pBSSK(-)-ER に ligation したのち、その EcoRI fragment (c-MycER fragment) を EcoRI 処理した pCAG/PGKneo ベクターに挿入する。こうして in-frame につながったヒト c-Myc 遺伝子とエストロゲンレセプター遺伝子 (ER) を CAG promoter 制御下に発現することが可能となり、ヒト c-Myc と ER の融合蛋白を発現するプラスミドコンストラクトを作成する。同様にして発癌過程における epigenetic control に働いているヒト Bmi1 遺伝子の発現プラスミドも作成する。

B. 遺伝子改変マウスの作成

上記プラスミドを用いて遺伝子改変マウスを作成する。作成した遺伝子改変マウスは back cross によりホモ個体・ヘテロ個体の同定を行う。作成されたマウス個体から肝細胞を含め種々の細胞を採取し、in vitro にてタモキシフェン (4-OHT) を投与し、RT-PCR により c-Myc, Bmi-1 の遺伝子発現を確認するとともに、核移行を免疫染色により確認する。

2. 遺伝子改変マウス由来肝細胞における発癌ポテンシャルの比較

A. In vitro での分化段階別発癌ポテンシャルの比較

上記により作成した遺伝子改変マウス胎仔から我々がすでに確立した cell aggregate

法により胎仔肝前駆細胞を採取するとともに、成体マウスから成熟肝細胞を採取する。こうして分化段階の異なる肝細胞に対して in vitro にてタモキシフェン (4-OHT) 投与し、Brd-U 染色や PCNA 染色により増殖活性の変化を定性的に観察するとともに、MTT assay により定量的にも評価するとともにフローサイトメーターにより cell cycle analysis を行う。さらに、免疫不全マウスの皮下にそれぞれ細胞移植することにより腫瘍形成能の評価を行う。

一方、我々が先行研究において同定した細胞膜貫通型糖蛋白 (gp38) の発現のほか、CD49f, Thy1 発現を指標として、胎仔肝前駆細胞分画中に含まれる肝幹細胞をフローサイトメーターにて単離することが可能となっていることから、単離した肝幹細胞に対しても同様にして発癌能を比較する。こうして種々の分化段階の肝細胞における発癌ポテンシャルを比較することにより肝細胞癌の発生母地を検証する。

B. In vivo での発生段階別発癌ポテンシャルの比較

遺伝子改変マウス上記と並行して遺伝子改変マウス個体 (胎仔・成体) にタモキシフェン (4-OHT) を長期投与し、経時的に肝臓組織を採取することで生体内での発癌を組織学的に検証する。

4. 研究成果

発癌遺伝子の一種であるヒト c-Myc 遺伝子の全長 cDNA を RT-PCR によりクローニングし、CAG promoter 制御下に発現するヒト c-Myc と ER の融合蛋白を発現するプラスミドコンストラクトを作成した。このプラスミドを用いて遺伝子改変マウスを作成することに成功した。作成した遺伝子改変マウスは back cross によりホモ個体・ヘテロ個体の同定を行った。作成されたマウス個体から肝細胞を含め種々の細胞を採取し in vitro にてタモキシフェン (4-OHT) を投与し RT-PCR により c-Myc の遺伝子発現を確認すると共に、核移行を免疫染色により確認する予定である。作成した遺伝子改変マウス胎仔から我々がすでに確立した cell aggregate 法により胎仔肝前駆細胞を採取すると共に、成体マウスから成熟肝細胞を採取した。遺伝子改変マウスの繁殖に難渋したため現時点では十分なサンプル数を獲得しえておらず、その増加に努めている。今後、分化段階の異なる肝細胞に対して in vitro にてタモキシフェン (4-OHT) を投与し増殖活性の変化を評価し、フローサイトメーターにより cell cycle analysis を行う予定である。また、免疫不全マウスの皮下に細胞移植し腫瘍形成能の評価する予定である。

上記遺伝子改変マウスから採取する各分化

段階の肝細胞 (肝幹細胞・前駆細胞・成熟肝細胞) に対してタモキシフェン投与量・投与期間を調節することで前癌病変細胞から発癌過程の進んだ肝細胞癌まで種々の発癌段階の細胞を獲得する。獲得した各段階の発癌細胞に対し、microRNA(miRNA) を採取し、mRAP (miRNA amplification profiling) 法などにより miRNA 発現プロファイリングを行う。以上の予定に関しては、遺伝子改変マウスの安定供給が確立する次年度の課題として実施予定である。

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 1 件)

Kamimura R, Ishii T, Sasaki N, Kajiwara M, Machimoto T, Saito M, Kohno K, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Yasuchika K, Uemoto S. Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage. *Cell Transplant.* 2012;21(11):2351-62. doi: 10.3727/096368912X636957

[学会発表] (計 2 件)

上村 良、石井 隆道、佐々木 直也、梶原 正俊、福光 剣、齊藤 美知子、河野 憲二、猪飼 伊和夫、安近 健太郎、上本 伸二、
「致死性肝障害モデルマウスに対する分化段階の異なる肝細胞移植の検討」
第 38 回日本急性肝不全研究会 (金沢) 2012 年 6 月 6 日

喜多貞彦、石井隆道、小木曾 聡、片山外大、河合隆之、安田勝太郎、上村 良、梶原正俊、波多野悦朗、落合孝広、上本伸二

「大量肝切除後の急性肝不全に対する、肝細胞自家移植を用いた治療戦略」
第 39 回日本臓器保存生物医学会 (福島) 2012 年 11 月 17 日

[図書] (計 1 件)

Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Iwao Ikai “Hepatic differentiation of embryonic stem cells by murine fetal liver mesenchymal cells”

Springer 2013

[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
特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・医学（系）研究科・教授
研究者番号：40252449

(2) 研究分担者

石井 隆道 (ISHII TAKAMICHI)
京都大学・医学（系）研究科・助教
研究者番号：70456789

(3) 連携研究者

なし