

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860505

研究課題名(和文) マルチオミクス解析に基づく肝癌幹細胞を標的とした新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells based on the multi-omics data.

研究代表者

坂部 友彦 (Sakabe, Tomohiko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50639747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝細胞癌患者予後と密接に相関を示す肝癌幹細胞マーカーとしてCD44を見出した。また、肝癌幹細胞と肝癌細胞間での網羅的な遺伝子発現/miRNA発現解析を実施した。これらのデータを用いた統合解析の結果、cell adhesion molecule、apoptosis、ABC transportersなどに関わる遺伝子、miRNA群が変動しており、肝細胞癌患者における悪性度の進展にCD44陽性肝癌幹細胞が関与していることが示唆された。さらに、CD44陽性肝癌幹細胞で高発現していたDKK1、miR-137は肝細胞癌患者予後と関連を示し、独立した予後予測因子となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, CD44 was found as a liver cancer stem cell marker associated with overall survival in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). Furthermore, comparison of the gene and miRNA expression profiles between CD44-positive and CD44-negative HuH7 cells was performed. As a result of miRNA targeted pathway analysis of microarray data, pathway associated with the entire set of miRNA and mRNA including cell adhesion molecule, apoptosis, and ABC transporters in CD44-positive cells were different from those in CD44-negative cells, suggesting that CD44-positive liver cancer stem cell may associated with malignant progression in HCC patients. Additionally, DKK1 and miR-137, which were upregulated in CD44-positive liver cancer stem cell, were associated with poor prognosis of HCC patients and were an independent prognostic factor.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：癌幹細胞 miRNA 予後予測因子

1. 研究開始当初の背景

近年のがんの疾患概念として、がん細胞集団には、高い自己複製能と多分化能を併せ持ったがん幹細胞が存在しており、このがん幹細胞を頂点としたヒエラルキーが構築されていることが一般的になっている。さらに、がん幹細胞は通常のがん細胞と比較して細胞増殖能や抗癌剤や放射線などの治療に対する抵抗性が高い為、治療後のがん幹細胞の残存が再発や転移を引き起こす為、がん幹細胞はがん患者予後と密接に関連していると考えられている。肝細胞癌においてもがん幹細胞の存在は確認されており、CD133、EpCAM、CD13、CD44、CD90などの主に肝前駆/幹細胞で発現している細胞表面抗原を指標にした肝癌幹細胞の同定が行われている (Lee TK, et al. *Liver Int.* 2009;29:955-65, Liu LL, et al. *Stem Cells Dev.* 2011;20:2023-30)。さらに、肝細胞癌患者の血中を循環するCD45-/CD90+/CD44+肝癌幹細胞の割合は、再発率と有意な相関を示すことが報告されている (Fan ST, et al. *Ann Surg.* 2011;254:569-576)。これらのことから、肝細胞癌における癌幹細胞の排除は、肝癌患者の長期予後改善において極めて重要な課題であり、肝癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必要であると考えられる。

一方で、現在のところ臨床応用された肝癌幹細胞を標的とした治療薬は無い。また、肝細胞癌における肝癌幹細胞の発生メカニズムや、どのような細胞が起源になっているかなどについては未だ明らかになっていない。さらに、前述の通り、肝癌幹細胞の分取には様々な細胞表面抗原を用いた検討が行われており、複数の肝癌幹細胞が同定されているが、どの抗原を発現している肝癌幹細胞を標的にするのが臨床的に有用かについては、未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、肝癌幹細胞を標的とした治療法開発、予後予測法開発を実施するために、臨床的に有用な肝癌幹細胞マーカーを同定すると共に、肝前駆/幹細胞と肝癌幹細胞、肝癌細胞と肝癌幹細胞の網羅的な比較を行うことで、肝癌幹細胞の起源や発生メカニズムを解明し、また肝癌幹細胞に特異的な因子を見出すことで、新規治療薬、診断薬に応用可能な肝癌幹細胞特異的な分子標的を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 肝障害モデルマウス、肝発癌モデルマウスの樹立

0.1% 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydroxylidene (DDC)食をマウスに対して4週間与えることで肝障害誘導モデルを樹立した。また、Diethylnitrosamineを20 mg/kg ずつマウス腹腔内に単回投与して肝発癌モデルの樹立を試みた。

(2) 肝細胞癌患者手術検体

2001年から2011年までに鳥取大学医学部附属病院で外科切除術を施行された肝細胞癌患者99例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを免疫組織化学染色に使用した。また、1998年から2008年までに京都大学医学部附属病院で外科切除術を施行された肝細胞癌患者110例の癌部から抽出されたtotal RNAを用いてReal-time PCRによるmiRNA発現解析を実施した。

(3) 手術検体での肝癌幹細胞マーカー発現

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから薄切した切片を用いて、肝癌部におけるCD13、EpCAM、CD44、CD44 variant 9の発現を確認した。染色サンプルは、陽性群(細胞膜陽性)と陰性群(発現なし/細胞質陽性)に分類し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

(4) 細胞培養

ヒト肝癌細胞株HuH7は10% FBS添加DMEM培地で培養、継代した。ヒト正常肝細胞(hNHeps)はコラーゲンIコート培養皿上でHCM BulletKitを用いて培養した。

(5) 細胞における遺伝子/miRNA/タンパク質発現解析

細胞、組織における遺伝子発現、miRNA発現はReal-time PCR法によって解析した。また、HuH7細胞、hNHeps細胞から抽出したtotal RNAは、3D-Gene human mRNA oligo chip (東レ)及び3D-Gene human miRNA oligo chip (東レ)を用いたcDNAマイクロアレイ、miRNAマイクロアレイにも使用した。また、各細胞におけるCD44及びEpCAM発現は、フローサイトメトリー解析によって確認した。

(6) 細胞増殖能、スフェア形成能評価

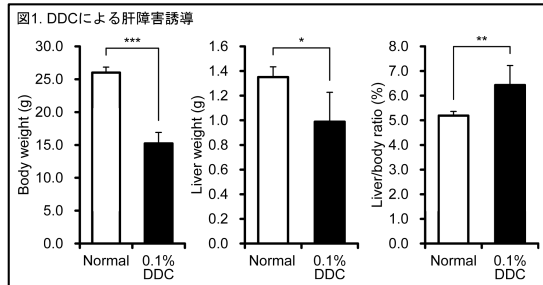
肝癌細胞と肝癌幹細胞における細胞増殖能はCell Counting Kit-8によるWST assayを用いて評価した。また、スフェア形成能については、細胞を低接着表面プレートに播種し、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、1×B27添加DMEM/F12培地で1週間培養し、100 µm以上のスフェアを計測することで評価した。

4. 研究成果

(1) 肝障害/肝発癌モデルマウス

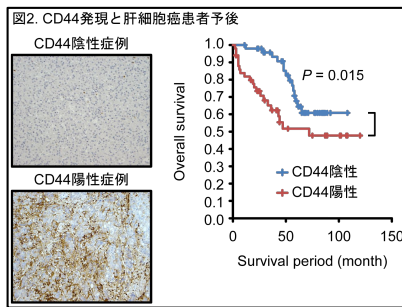
DDC投与群及びコントロール群において、肝再生の指標とされる肝/体重比を比較した結果、DDC投与群において肝/体重比の有意な増加が認められ、肝障害モデルとして有用であることが示唆された(図1)。また、このモデルを用いて肝障害を誘導した肝臓内におけるEpCAM陽性肝幹/前駆細胞、CD44陽性肝幹/前駆細胞の割合を解析した結果、それぞれ0.1%ほどの非常に稀な細胞集団として存在していることが明らかとなった。DEN投与に

よる肝発癌モデルでは、肝臓内での発癌が認められず、肝発癌モデルとしてDENの複数回投与や遺伝子改変肝発癌モデルの使用、発癌のライブイメージングによるモニタリングが可能な実験系を用いる必要があると考えられた。



(2) 肝癌幹細胞マーカー発現の臨床病理学的意義

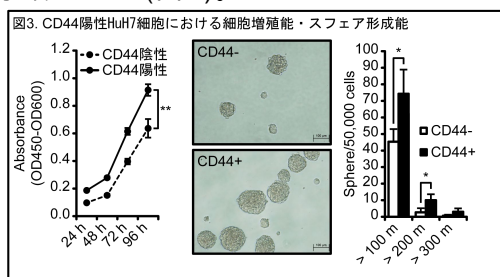
肝細胞癌患者における4種類の肝癌幹細胞マーカー発現と臨床病理学的因子との関連について検討した。



免疫組織化学染色と統計解析の結果、癌部におけるEpCAM、CD13、CD44 variant 9発現は生存期間との有意な相関を示さなかったが、CD44発現は生存期間と相関を示し、CD44陽性患者は陰性患者と比較して、全生存期間が有意に短いことが明らかとなった(図2)。これらの結果から、肝細胞癌患者におけるCD44発現は、患者生存期間と相関を示す臨床病理学的にも重要な肝癌幹細胞マーカーであることが示唆された。

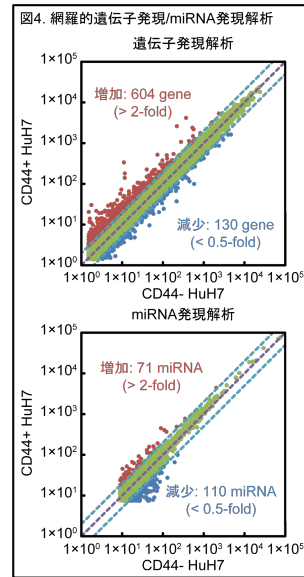
(3) CD44陽性肝癌幹細胞における網羅的遺伝子/miRNA発現解析

HuH7細胞においてCD44発現が癌幹細胞の分取に有用であるかを確認する為、HuH7細胞をCD44陽性とCD44陰性に分けて、細胞増殖能、スフェア形成能の評価を行った。検討の結果、CD44陽性HuH7細胞は陰性細胞と比較して細胞増殖能、スフェア形成能が共に高く、癌幹細胞としての性質を有していることが示唆された(図3)。

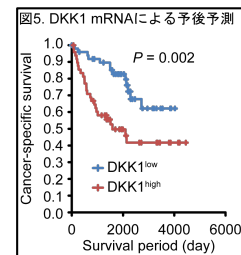


さらに、肝癌幹細胞特異的な因子を同定するために、CD44陽性HuH7細胞、CD44陰性HuH7

細胞、hNheps細胞から抽出したtotal RNAを用いて網羅的な遺伝子発現、miRNA発現解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、CD44陽性HuH7細胞では陰性HuH7細胞と比較して、604遺伝子/71miRNAが2倍以上増加しており、130遺伝子/110miRNAが0.5倍以下に減少していた(図4)。

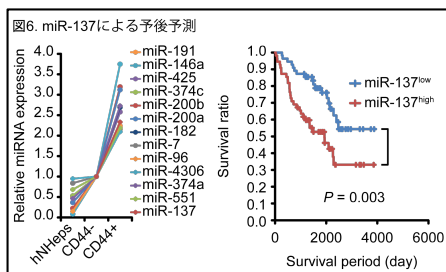


また、CD44陽性HuH7細胞で2倍以上増加していた604遺伝子を用いてパスウェイ解析を行った結果、CD44陽性HuH7細胞では、Glutathione metabolism、Matrix metalloproteinases、Irinotecan pathwayなどのシグナル経路が増加しており、CD44陽性HuH7細胞において癌幹細胞で特徴的なreactive oxygen species (ROS)や抗癌剤抵抗性、浸潤能や転移能に関するシグナル経路が亢進していることが示唆された。さらに、DNAマイクロアレイ、miRNAマイクロアレイの結果を用いて、DIANA-mirPathによる統合解析を行ったところ、CD44陽性HuH7細胞では、ECM-receptor interaction、cell adhesion molecule、focal adhesion、apoptosis、ABC transporters、tight junctionに関わる遺伝子、miRNA群が変動しており、これらの結果から肝細胞癌患者における悪性度の進展にCD44陽性肝癌幹細胞が関与していることが示唆された。これら遺伝子の中で、肝癌患者癌部におけるDKK1 mRNA発現は癌特異的な生存期間と有意な相関を示し、独立した予後予測因子であることが明らかとなった。



(4) 肝癌幹細胞関連miRNAを用いた癌患者予後予測

肝細胞癌患者の予後予測に有用なmiRNAを探索するた



めに、CD44陽性HuH7細胞で発現が2倍以上増加していた71miRNAのうち、癌の進展に伴って発現が亢進していくmiRNA(hNheps <

CD44 陰性 < CD44 陽性)を抽出した (図6左)。このうち、miR-137 について 110 例の肝細胞癌患者の癌部における発現を real-time PCR で測定し、生存期間、背景因子との関連を検討した結果、miR-137 高発現患者は、低発現患者と比較して有意に全生存期間が短く、多変量解析においても miR-137 が独立した予後予測因子であることが明かとなった (図 6 右)。また、miR-137 高発現患者は、肝静脈、肝動脈、門脈、胆管などの脈管への腫瘍の浸潤が有意に多いことから、miR-137 が肝細胞癌の浸潤などの悪性度に関与していることが示唆された。

以上の結果より、miR-137 や DKK1 のような肝癌幹細胞から同定した遺伝子、miRNA は、肝癌幹細胞を標的とした新規治療法、診断法開発のターゲットとして有用であることが示された。

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)

1. Tomohiko Sakabe, Junya Azumi, Yoshihisa Umekita, Kan Toriguchi, Etsuro Hatano, Yasuaki Hirooka, Goshi Shiota. Prognostic relevance of miR-137 in patients with hepatocellular carcinoma. Liver Int. 査読有り, vol. 37, 2017, page. 271-279.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 坂部 友彦、安積 遵哉、汐田 剛史、CD44 陽性肝癌幹細胞関連 miRNA を用いた肝細胞癌患者予後予測因子の探索、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19 日、米子全日空ホテル (鳥取県米子市)
2. 坂部 友彦、安積 遵哉、汐田 剛史、CD44 陽性肝幹細胞の mRNA/miRNA 発現解析と臨床的意義、第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21 日、ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)

〔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

坂部 友彦 (SAKABE, Tomohiko)
鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50639747

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()