

平成21年5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590402

研究課題名（和文） 肝幹細胞／前駆細胞の動態から肝発癌機構を捉える

研究課題名（英文） Studies on roles of liver stem/progenitor cells in hepatocarcinogenesis

研究代表者

傳田 阿由美 (DENDA AYUMI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90110858

研究成果の概要： 癌の増殖の本体は「癌幹細胞」にある。「癌幹細胞」は「幹細胞／前駆細胞」に由来するのか？本研究では、肝臓の「肝幹細胞／前駆細胞」とされる oval cell の関与するラット肝発癌モデルを用い、早期の前癌性病変が「肝幹細胞／前駆細胞」に由来し得るか検索した。その結果（1）oval cell に発現する幹細胞マーカーThy-1, EpCAM, c-kit, CD34, CD133 の各発現細胞が oval cell の増生から前癌性病変の発生に至る過程に関与する事を免疫組織学的に示した。（2）全身緑色蛍光を発するラットに肝発癌処置を行い増生した oval cell を含む細胞から磁気細胞分離法にて分離した Thy-1, EpCAM の各発現細胞を無蛍光の野生型ラット肝に移植すると緑色蛍光を持つ前癌性病変が発生した。これは Thy-1 または EpCAM 発現「肝幹細胞／前駆細胞」が肝前癌性病変を発生し得る事を示す最初の報告である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理

キーワード：幹細胞／前駆細胞、ラット肝発癌、oval cell、Thy-1、EpCAM、GST-P 陽性巣、移植

1. 研究開始当初の背景

（1）各臓器組織には「(組織)幹細胞」が存在し、各組織構成細胞を産生し補充する。「幹細胞」は「ニッチ」という微小環境にて不均等分裂を行い、一方は幹細胞自身を自己複製し、他方は分化していく娘細胞を産生する。近年癌は、この幹細胞に由来して自己複製能を保持し癌増殖の本体である「癌幹細胞」と分化して種々の形質を示す娘細胞とから成る階層的細胞集団であり、従って癌の治療には「癌幹細胞」の本体・特性を見据えた「癌幹細胞」駆逐の新たな戦略が必要とされている。急性骨髄性白血病研究から得られた「癌幹細胞」の存在は、今や脳・乳腺・前立腺・肺・頭頸部・大腸・膵・肝の各固形癌組織でも確認されつつある。しかし、各固形癌

細胞」と分化して種々の形質を示す娘細胞とから成る階層的細胞集団であり、従って癌の治療には「癌幹細胞」の本体・特性を見据えた「癌幹細胞」駆逐の新たな戦略が必要とされている。急性骨髄性白血病研究から得られた「癌幹細胞」の存在は、今や脳・乳腺・前立腺・肺・頭頸部・大腸・膵・肝の各固形癌組織でも確認されつつある。しかし、各固形癌

において「癌幹細胞」は何の細胞に由来しどのように発生するのかは全く不明であり、この解明には動物実験を用いた prospective な手法が必要とされ、また近年の幹細胞研究で培われた新たな知見と手法によりこのような研究は可能となっている。

(2) 肝には二つの肝再生機構がある。第一は成熟肝細胞自体が分裂増殖するもの、第二は成熟肝細胞の増殖阻害下にて dormant に存在する「肝幹細胞/前駆細胞 (oval cell など)」が出現し増殖分化するものである。肝細胞癌も実験モデルに依存して「(成熟)肝細胞」由来と「肝幹細胞/前駆細胞」由来があるとされ、Resistant hepatocyte (RH) ラット肝発癌モデルは後者に属する。即ち RH モデルでは N-nitrosodiethylamine (DEN) で initiate 後 2-acetylaminofluorene (2-AAF) 投与による成熟肝細胞増殖阻害下に肝部分切除 (PH) または CC14 投与による肝再生刺激を与えると oval cell が増殖し、前癌性病変・腺腫・肝細胞癌が発生する。また DEN 処置を省くと oval cell のみが増殖する。しかしながら oval cell がどのように発癌に関与するのかは全く不明である。

(3) 現在、肝細胞と胆管上皮細胞の両方向への分化能を有する「肝幹細胞/前駆細胞」として、①マウス胎仔肝から細胞表面マーカー c-Met+ CD49f+/Low CD29+ c-kit- CD45- TER119- を有する細胞、②2-AAF/CC14 または 2-AAF/PH 処置成熟ラット肝からの oval cell (c-kit+, CD34+, Thy-1+) (骨髄由来との指摘もある)、③成熟ラット肝から小型肝細胞、などが分離されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「肝幹細胞/前駆細胞」の関与する RH ラット肝発癌モデルを用い、prospective な手法により、肝細胞癌の「癌幹細胞」は「肝幹細胞/前駆細胞 (oval cell など)」に由来するか否かを明らかにすることにある。2007~2008 年度は肝細胞癌発生に至る過程の早期に発生する病変である肝前癌性病変[胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性巣]が「肝幹細胞/前駆細胞 (oval cell など)」に由来し得るか否かを以下の二つの観点より検索する。

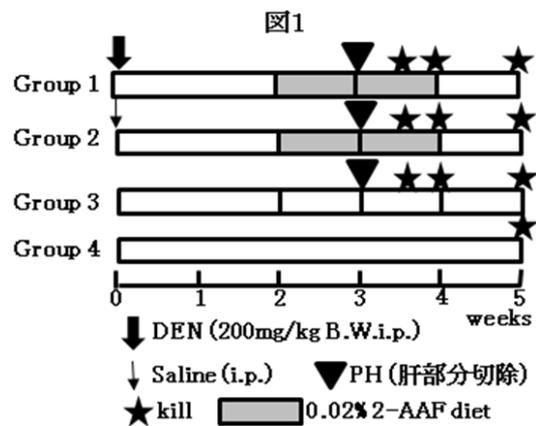
(1) oval cell に発現するとされる種々の幹細胞マーカーを用い、共焦点顕微鏡による免疫蛍光組織化学的解析により、「肝幹細胞/前駆細胞 (oval cell)」→前癌性病変の発生に至る過程でのその発現動態を追跡し、病変発生に commit する幹細胞マーカーを探索する。

(2) Enhanced green fluorescent protein 遺伝子導入 (EGFP-TG) ラット肝を用い、RH モデルで initiate した「肝幹細胞/前駆細胞 (oval cell)」から種々の幹細胞マーカー発現細胞を分離して野生型ラット肝に移植し、EGFP を指標に前癌性病変を発生せしめる幹細胞マーカーを探索する。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞マーカー発現動態の免疫組織化学的解析:

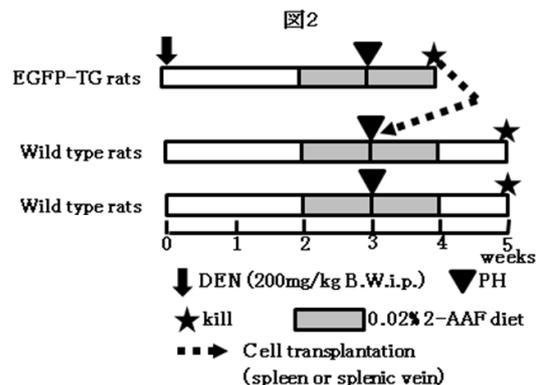
① 5 週齢 F344 雄ラットを用い、下図 1 のプロトコールにより実験を行った。



② 上図 1 の各時点における肝凍結切片と種々の一次抗体、Alexa Fluor 系二次抗体、また核染色には DAPI を用い、共焦点顕微鏡による免疫蛍光組織化学的解析により、GST-P 陽性巣と merge しつつ幹細胞マーカー Thy-1, c-kit, CD34, EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), CD133 の発現動態を追跡した。

(2) 「肝幹細胞/前駆細胞 (oval cell など)」を移植したラット肝での前癌性病変発生の追跡:

① donor として EGFP-TG また recipient として野生型の各ラット (いずれも 8~10 週齢 F344 系雄) を用い下図 2 のプロトコールにより実験を行った。



②上図2のEGFP-TGラット肝から、基本的にYawsenらの方法に準じてcollagenaseによる経門脈的還流、pronase E処理、Optiprep存在下での遠心による純化等により oval cellを含む肝非実質細胞を得、更に磁気細胞分離法(FlowComp Flexi, Dynabeads)によりThy-1, c-kit, EpCAMの各発現細胞を分離して、その各 $2\sim 8 \times 10^6$ 個を上図2の肝部分切除直後の野生型ラット肝に経脾または経脾静脈的に移植した。

③上図2の5週目における野生型ラット肝の凍結切片と抗GFPおよび抗GST-P抗体、またAlexa Fluor系二次抗体を用い、共焦点顕微鏡による免疫蛍光組織化学的解析により、GFP陽性のGST-P陽性巣を検索した。

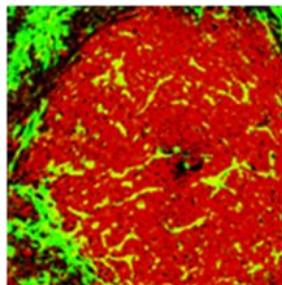
4. 研究成果

(1) 幹細胞マーカーThy-1, EpCAM, c-kit, CD34の発現動態の免疫組織化学的解析：

①Oval cellの一部はThy-1, EpCAM, CD34またはc-kitを発現する：上図1、Group2の5週ではoval cellの増生が見られ、増生細胞の一部のpopulationに、Thy-1, EpCAM, CD34またはc-kitの各発現が見られた。最近なされている「oval cellはheterogeneousな細胞集団」との指摘に符合する。またEpCAM, CD34, c-kitの各陽性細胞はoval様であったが、Thy-1陽性細胞は一部oval様であるも大部分はmesenchymal様で、desmin陽性・肝細胞分化マーカーHNF4 α 陰性であった。Petersen, BEらはoval cellのマーカーとしてThy-1を用いているが、Thy-1陽性細胞は間葉系細胞であり、oval cellではないとの指摘もある。

②Thy-1発現細胞は前癌性病変の発生と進展に深く関与する可能性がある：上図1、Group1の3.5週の早期に散見される ~ 20 個ほどの細胞からなるGST-P陽性細胞の集簇はThy-1を発現し、更に4週の早期に散見される(図3)また5週で多発するいわゆる前癌性GST-P陽性巣の全てにおいて、mesenchymal様のThy-1発現細胞が、陽性巣周囲のoval cellを含む細胞浸潤領域のみならず、陽性巣の内部深くまた特に辺縁に多く存在していた。

図3
Thy-1(Green), GST-P(Red)



この所見はThy-1発現細胞がGST-P陽性巣の発生と進展に深く関与することを示唆する。その関与機構として④「Thy-1発現細胞→GST-P陽性肝細胞への分化」、または⑤「GST-P陽性肝細胞の増殖にThy-1発現細胞がニッチとして機能する」などが推測され、未だ国内外においてなされていないこのような観点からの今後の研究は意義深いものとなろう。

③EpCAM, c-kit, CD34の発現動態：上図1、Group1の4週で散見され、また5週で多発する前癌性GST-P陽性巣の全てにおいて、陽性巣周囲のoval cellを含む浸潤細胞がEpCAM, CD34またはc-kitを高頻度に発現していた。GST-P陽性巣内では、その内部深くまた特に辺縁にて、GST-P陽性肝細胞および散在するoval様細胞がEpCAMを高頻度に発現し、またc-kitもその発現頻度はやや低いものの同様の発現を示した。CD34では、GST-P陽性巣内でCD34発現oval様細胞が低頻度ながら散在していた。これらの所見はEpCAM, c-kit, CD34発現細胞がいずれもGST-P陽性巣の発生と進展に何らかの関与をする事を示唆する。「これらの発現細胞→GST-P陽性肝細胞への分化」があるのか今後更なる研究が必要である。

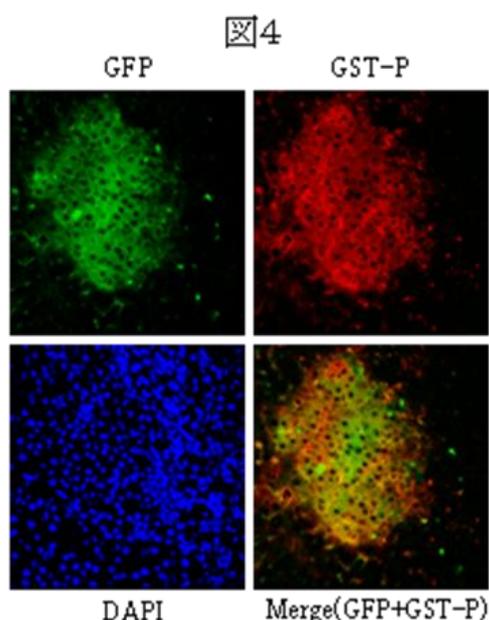
(2) 幹細胞マーカーCD133の発現動態の免疫組織化学的解析：①上図1、Group2の5週におけるoval cell増生巣では、そのごく一部がCD133を発現し、その染色像はoval様または血管内皮様で、常にThy-1発現細胞と併存していた。②上図1、Group1の4週で散見され、また5週で多発する前癌性GST-P陽性巣では、陽性巣周囲のoval cellを含む細胞浸潤領域でのCD133発現細胞は上記の他の幹細胞マーカーに比し少なく、oval様または血管内皮様で、やはり常にThy-1発現細胞と併存していた。陽性巣内ではCD133を発現するGST-P陽性肝細胞が特に辺縁に散在した。最近CD133はヒト肝細胞癌の「癌幹細胞」マーカーであるとの報告がなされており、CD133発現細胞が前癌性病変の発生と進展に関与するか否か、今後更に検索する必要がある。

(3) 移植した「肝幹細胞/前駆細胞(oval cellなど)」からの肝前癌性病変の発生：

①用いた実験プロトコルの意義：上図2にてdonorとしてDEN+2-AAF+PH処置を行ったEGFP-TGラット4週の肝からoval cellを含む肝非実質細胞を分離し、更に磁気細胞分離法によりThy-1, EpCAM, c-kitの各発現細胞を分離した。この4週では、少数のGST-P陽性巣が散見されるもoval cellが強く増生する。またrecipientとして、2-AAF+PHの処置を行いPH直後の野生型ラット肝に移植し

た。この処置により oval cell の選択的増殖を可能にする微少環境を創出できる。また GST-P 陽性巣が多発する 5 週にて病変の発生を検索した。

②EpCAM, Thy-1 発現「肝幹細胞／前駆細胞 (oval cell など)」は移植肝にて GST-P 陽性巣を発生せしめる： 残存肝 4 葉から各 1 枚、また特に右前葉からは 2～3 枚の凍結切片を作製し GFP 陽性の GST-P 陽性巣を検索した。その結果、Thy-1 発現細胞を移植した 7 匹中 5 匹に 1～3 個の (図 4)、また EpCAM では 2 匹中 2 匹に 2～4 個の GFP 陽性の前癌性 GST-P 陽性巣が発生した。しかし c-kit では 3 匹の移植実験を行ったが同病変の発生を見なかった。また発生した GST-P 陽性巣は辺縁不整のものが多く、限局性というより浸潤性増殖を示唆した。



④実験結果の意義： 今回の実験結果は、heterogeneous な細胞集団とされる oval cell を含む肝非実質細胞の中で EpCAM または Thy-1 を発現する細胞が前癌性とされる GST-P 陽性巣を発生せしめる事を示す国内外において最初の報告である。しかし病変の発生個数は少なく、RH ラット肝発癌モデルの 5 週では GST-P 陽性巣が多発することを考える時、今後更に以下の追求が必要である。①発生した病変は更に腺腫・肝細胞癌へと進展し得るのか？即ち、RH モデルの 5 週で多発する GST-P 陽性巣の大部分はいわゆる「リモデリング」して正常肝細胞となってしまう、ごく一部のみが腺腫・肝細胞癌へと進展するが、今回発生した病変はこの真の病変であるのか？②移植により病変を発生せしめ得る細胞の発現マーカーを更に詳細に絞り込む必要がある。今後のこのような観点からの研究は、癌

幹細胞は「肝幹細胞／前駆細胞 (oval cell など)」に由来するか否かを prospective に明らかにし得る国内外において最初のものとなる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 傳田阿由美、幹細胞マーカー発現 oval cell はラット肝前癌性病変の発生に關与する、第 67 回日本癌学会、平成 20 年 10 月 28 日、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

傳田 阿由美 (DENDA AYUMI)

奈良県立医科大学・分子病理・講師

研究者番号： 90110858