

平成 21 年 4 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790468

研究課題名（和文） 肝癌における癌幹細胞システムの成立・維持機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of cancer stem cell system in hepatocellular carcinoma

研究代表者

氏名（ローマ字）：千葉 哲博（CHIBA TETSUHIRO）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00381583

研究成果の概要：

肝癌における癌幹細胞システムの解明を目的とし、肝癌臨床検体からの癌幹細胞分離と、ヒト肝癌培養細胞およびマウス肝幹細胞を用いた癌幹細胞システムの検証を行った。肝癌臨床検体からは、CD133 陽性細胞、CD90 陽性細胞を検出できた。また、肝癌培養細胞から分離した side population 細胞が癌幹細胞として機能し、その腫瘍形成能が Bmi1 によって維持されていることや、Bmi1 を強制発現した肝幹細胞において、Bmi1 の主要な標的分子である *Ink4a/Arf* 遺伝子以外に、より緊密に癌化機転に寄与する分子群の存在を見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌幹細胞、肝臓癌、自己複製能、Bmi1、CD133、CD90

1. 研究開始当初の背景

白血病のみならず多くの固形腫瘍において

も、癌幹細胞の存在が相次いで報告されている。癌幹細胞は癌治療における本質的なターゲットとして認識されつつあり、癌幹細胞特異的治療法の開発は、重要かつ急務の課題と考えられる。造血器腫瘍は癌幹細胞研究における最も良いモデルとして認識されており、白血球幹細胞システムの解明が着実に進行している。一方で、肝癌を含めた固形腫瘍における癌幹細胞の成立・維持機構は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、肝癌培養細胞およびインフォームドコンセントの得られた肝癌手術サンプルから癌幹細胞画分を分離・回収し、ヒト肝癌における癌幹細胞システムの実体を把握する。さらに、純化したヒト肝癌の癌幹細胞を用いて、癌幹細胞において機能する自己複製分子群について詳細に検討する。また、*Bmi1* などの自己複製制御分子のノックアウトマウスから純化・回収した肝幹細胞の機能解析を正常および発癌の観点から行うことで、幹細胞機能と癌幹細胞システムの成立・維持機構との関連性をプロスペクティブに検証する。

3. 研究の方法

1. ヒト肝癌細胞からの癌幹細胞分離と解析
本学倫理委員会の承認の得られたヒト肝癌臨床検体に対して、CD133をはじめとする複数の幹細胞マーカーを用いて、癌幹細胞画分の検出を試みた。また、肝癌培養細胞において癌幹細胞として機能する side population (SP)細胞を分離し、*BMI1* の gain-of-function および loss-of-function assay を行い、癌幹細胞の維持機構における BMI1 の役割を検証した。
2. マウス肝幹細胞を用いた癌幹細胞システ

ム

マウスの検証
Bmi1 および *Ink4a-Arf* ノックアウトマウスを用いたコロニーアッセイ及び in vivo における癌化機転への関与を検討した。また、マイクロアレイ解析によって、肝幹細胞特異的な *Bmi1* の標的分子の検索を行った。

4. 研究成果

1. 肝癌臨床検体から効率よく死細胞、非腫瘍細胞を除去し、単細胞浮遊液の調整が容易に行えるようになった。フローサイトメトリー解析の結果、CD133 陽性細胞 (11 例中 3 例)、CD90 陽性細胞 (9 例中 6 例) が検出されたが、NOD/SCID マウスを用いた異種移植では腫瘍形成がみとめられなかった。今後は、さらに免疫不全が重篤な NOG マウス等を用いた移植の系を用いて再検討すると同時に、新たな癌幹細胞マーカーの検索を行う予定である。
2. 肝癌組織切片を用いた病理学的検討の結果、ポリコム遺伝子 BMI1 および EZH2 が高率に肝癌組織において高発現しており、BMI1 および EZH2 陽性肝癌では術後再発率が有意に高いことを明らかにした。さらに、肝癌培養細胞から分離した SP 細胞において、*BMI1* をノックダウンすると、自己複製能、腫瘍形成能を失うことから、BMI1 が肝癌の癌幹細胞維持に重要である可能性を示した。
3. *Ink4a/Arf* 遺伝子は、*Bmi1* が負に制御する重要な標的分子であるが、*Ink4a/Arf* 欠損肝幹細胞に *Bmi1* を強制発現すると初めて、肝腫瘍形成能を示すことから、肝臓における癌幹細胞システムの成立機構においては、*Ink4a/Arf* 以外の (*Bmi1* の) 標的分子が重要であることを明らかにし、マイクロアレイ解析によって複数の候補分子を同定した。

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4件)

1. Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, Yokosuka O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*, in press. 査読有
2. Taniguchi H, Chiba T. Stem cells and cancer in the liver. *Dis Markers*, 24:223-229, 2008. 査読有
3. Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Ryutarō Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 68:7742-7749, 2008. 査読有
4. Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi M, Nakano M, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology*, 133:937-950, 2007. 査読有

[学会発表](計4件)

1. 千葉哲博、横須賀収、岩間厚志 肝臓における癌幹細胞システムの成立・維持メカニズム第16回日本消化器病学会関連週間(東京都, 2008年10月1日)

2. 千葉哲博、宮城聡、横須賀収、岩間厚志 Molecular machinery in the establishment and maintenance of liver cancer stem cell system. 第67回日本癌学会総会(愛知県, 2008年10月29日)

3. Chiba T, Miyagi S, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. Investigation of cancer stem cell system in hepatocellular carcinoma. 17th APASL conference (Kyoto, Japan, 2007年3月29日)

4. 千葉哲博、宮城聡、横須賀収、岩間厚志 The polycomb gene product BMI1 is required for the tumor-initiating capacity of hepatocellular carcinoma cells. 第66回日本癌学会総会(神奈川県, 2007年10月3日)

[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：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

千葉 哲博（CHIBA TETSUHIRO）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00381583

(2)研究分担者

(3)連携研究者

岩間 厚志（IWAMA ATSUSHI）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126

宮城 聡（MIYAGI SATORU）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20400997

横須賀 収（YOKOSUKA OSAMU）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90182691