

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03637

研究課題名(和文) がん進化による治療耐性を引き起こす肝がん幹細胞様クローンの同定

研究課題名(英文) Identification of liver cancer stem cell-like clones causing treatment resistance by cancer evolution

研究代表者

中本 安成 (Nakamoto, Yasunari)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40293352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)： 進行期肝がん患者において治療耐性を誘導するがん幹細胞様クローンを同定することを目的とした。そのために、抗がん治療中の患者末梢血から液体生検により循環腫瘍細胞(CTC)を採取し、新たなシングルセル解析法によって幹細胞性を示すCTC細胞の特徴を検討した。Atezolizumab + Bevacizumab免疫複合療法に治療耐性を示した患者において、CTCの幹細胞マーカー(SOX2, MYC, NANOG)が有意に上昇し、パスウェイ解析ではMAPKおよびTGF-シグナル経路が亢進していた。これより、肝がん患者において治療耐性を誘導するがん幹細胞様クローンの特性を考察する上で意義深い成果と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行がんの薬物治療において完治することは稀である。この原因は、腫瘍を形成するがん細胞に不均一性があるために、大部分の細胞に有効な薬剤であっても一部の細胞は抵抗性を示して生き残るためである。そして、生き残った細胞はがん幹細胞様クローンとして血液中に放出され、循環腫瘍細胞(CTC)となりがん転移を形成する。

本研究でのがん幹細胞様クローンの検出は、最新治療に抵抗性となった進行期肝がん患者の血液から独自の解析技術でCTCを採取し、遺伝子・タンパクレベルで特徴を分析した。これより、治療抵抗性の原因となるがん幹細胞様クローンの特性が明らかとなり、進行がんに対する新たな治療開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)： The aim was to identify cancer stem cell-like clones that induce treatment resistance in patients with advanced-stage hepatocellular carcinoma (HCC). To this end, circulating tumor cells (CTCs) were collected from the peripheral blood of patients undergoing anticancer treatment by liquid biopsy, and the characteristics of CTC cells showing stem cell characteristics were examined by a new single-cell analysis method. CTC stem cell markers (SOX2, MYC, NANOG) were significantly elevated and pathway analysis showed enhanced MAPK and TGF-signaling pathways in patients who were refractory to Atezolizumab + Bevacizumab immune combination therapy. Thus, it was considered to be a significant result in considering the characteristics of cancer stem cell-like clones that induce treatment resistance in HCC patients.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞がん がん幹細胞 循環腫瘍細胞 シングルセル解析 創薬シーズ

1. 研究開始当初の背景

消化器がんの中でも肝細胞がん(肝がん)の10年相対生存率は10%未満と低く、またサバイバー生存率の低値は群を抜いている。さらに、最新の治療アルゴリズムにおいて進行期以降の病変は完全に制御することが困難であり、肝がんの治療耐性の高さを如実に反映している。また、近年に実施された肝がん組織の分子病態についてのビッグデータ解析では、想定外に高い不均一性が強調され、特定の標的分子を対象とした治療開発の難しさが浮き彫りとなった(Cell 169:1327,2017)。

【がん進化を引き起こすがん幹細胞様クローン】 研究代表者らは2013-2015年度の基盤研究(B)において、肝がんが慢性炎症から多段階的にがん化するという成立から、不均一ながん細胞で形成されることを示してきた(中本他: PLoS One 2017; 山下他: Am. J. Pathol. 2016)。多様で不均一ながん細胞に特定の標的治療を行うと、一部の細胞は耐性を示して生き残ることとなる。そして、その中から上皮間葉転換(EMT)を経て<がん幹細胞様クローン>が出現すれば浸潤や転移へと進展する。本過程は、抗がん治療の刺激下においてがん細胞が新たな耐性形質を獲得したものであり、<がん進化>という概念で解釈されてきた(Cell 168:613,2017)。しかし、この進化過程にがん幹細胞様クローンがどのように関わっているのかは明らかではなかった。

【がん幹細胞様クローン同定へのアイデア】 がん幹細胞様クローンの特性として、治療耐性と転移能の高さが指摘されてきた(Cell 168:670,2017)。そこで、同クローンを探索するには、抗がん治療中に耐性を獲得して転移が生じた時点において、患者血液に浮遊する循環腫瘍細胞(CTC: circulating tumor cells)を分析するという本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

肝がん患者において治療耐性を誘導するがん幹細胞様クローンを同定するとともに制御法を開発することを目的とした。そのために、抗がん治療中の患者末梢血から液体生検によりCTCを採取し、新たなシングルセル解析法によって幹細胞性を示す単一CTC細胞の特徴を明らかにした。さらに、幹細胞性を誘導する責任遺伝子を機能的にスクリーニングした。

3. 研究の方法

(1) 肝がん患者末梢血からのCTC液体生検

- 進行肝がんに対する治療中の患者で、独自の液体生検技術を用いてCTCを採取した。
- 対象: 肝癌診療ガイドライン2017年版において、分子標的薬(Sorafenib, Lenvatinib等)や化学療法(HAIC, TACE/TAE等)の適応となる進行肝がん患者とした。
- 採血: 1ヵ月ごとの定期採血を行い、CTやMRI画像での肝内・肝外転移の出現とあわせて経時的な検討を行った。
- 液体生検: マイクロキャピティアレイ技術(特願2018-034908等)を用いて、数 μ mの微細貫通孔をもつ微小流路基板に流圧調整を行った。また別法として、細胞用フィルター(ScreenCell™)と遠心法を用いてCTCを採取した。

(2) シングルセル分子解析~がん幹細胞様クローンの選択

(1)のCTC単一細胞から得られたcDNAを用いて、次世代シーケンサーによる分子解析を行った(NGS: MiSeq™)。 a. mRNA発現解析(RNA-Seq) b. 原発巣由来の変異解析、 c. EMT・幹細胞マーカーによる細胞クローンの選択[c-1)上皮マーカー(E: EpCAM, CK8/18/19) 間葉マーカー(M: Vimentin, Twist) および白血球マーカー(CD45) の発現レベルによってCTCの上皮間葉転換(EMT)の程度を評価する。 c-2)臨床経過において、がん転移と高い相関を示すEMTマーカーの発現や、幹細胞マーカー(CD133, EpCAM, CD90等)のレベルからCTC幹細胞様クローンを選択する。] d. がん幹細胞様クローンのパイオインフォマティクスデータ解析。

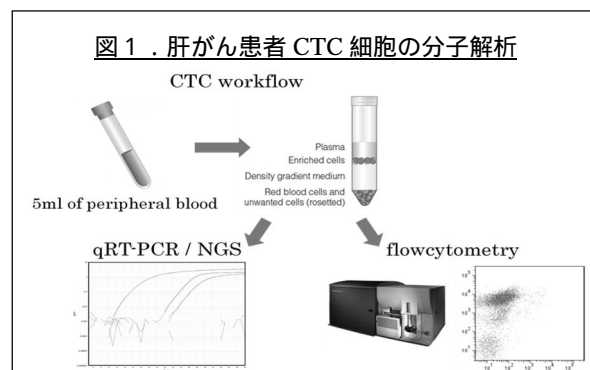
(3) がん幹細胞性を誘導する責任遺伝子の機能的スクリーニング

a. (2)において選択された責任候補遺伝子のRNA-Seqデータ(targeted RNA expression解析)に基づいて、がん進展関連遺伝子および細胞内シグナル経路等の関与を検討した。 BaseSpace Sequence Hubにて発現解析を行い、RNA-Seq Alignment Appにてバリエーション解析を行った(ともに、Illumina社) b. Bio-Plexシステム(Bio-Rad社)による血清サイトカイン解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肝がん患者末梢血からのCTC液体生検(図1)

これまで我々は患者末梢血からのCTC採取にマイクロキャピティアレイ技術を用いてきたが、システム内の微小流路基板に捕捉

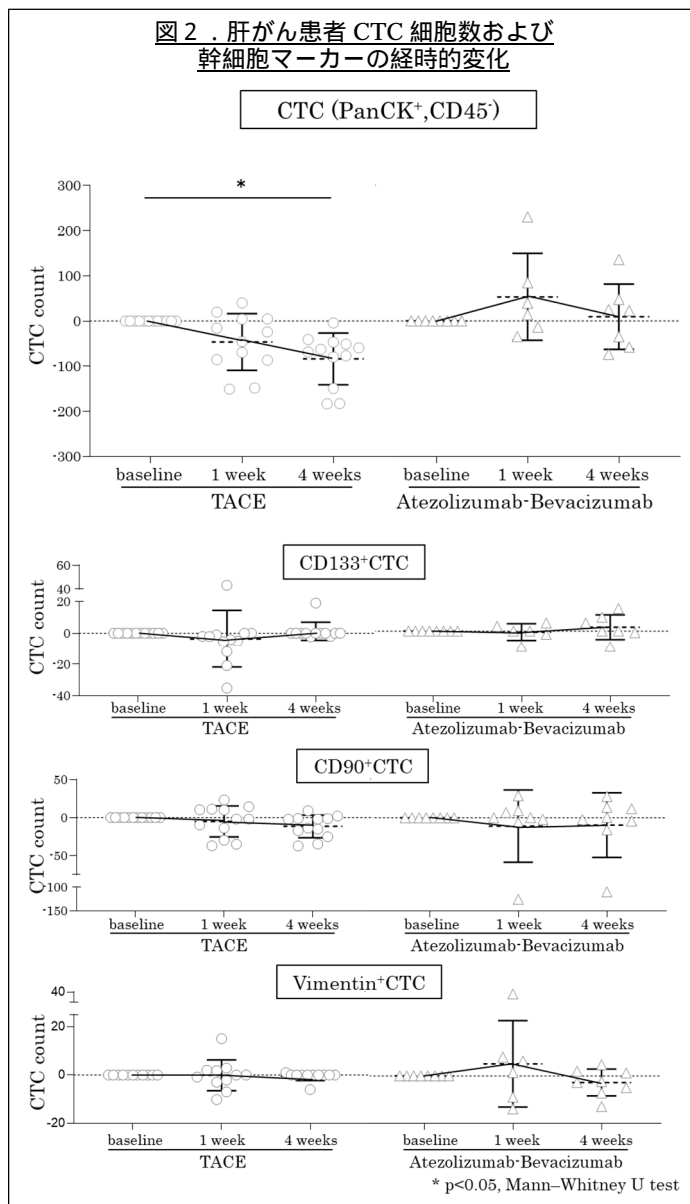


された CTC 単一細胞を回収することには難点があった。この回収過程では、Trypsin EDTA 処理や遠心法と顕微鏡下単一細胞ピッキング手法などを組み合わせたり、種々の試みを施行したが、生細胞率を保って CTC を回収することはできなかった。

そこで、新たなフィルター技術を導入して CTC の回収に取り組んだ。本法は、患者末梢血を溶血処理後に、細胞用フィルター (ScreenCell™) と遠心法を用いて CTC を回収する方法であり、さらに最先端のセルソーター技術 / 次世代シーケンサー (NGS) を組み合わせるによってシングルセルレベルで解析、分取することが可能となった。

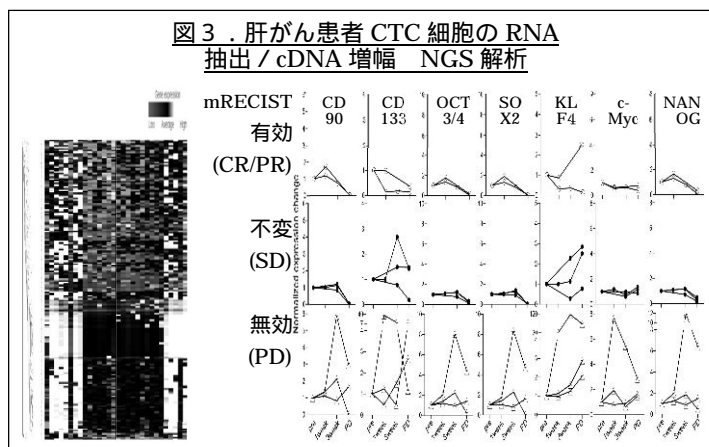
(2) シングルセル分子解析 ~ がん幹細胞様クローンの選択 (図2)

セルソーターでの解析において、多重蛍光染色を行うことにより、肝がん患者の末梢血 CTC 単一細胞の様々な特性を解析した。肝がん患者に対する各種治療 (Atezolizumab + Bevacizumab/ TACE/ Lenvatinib/ HAIC) の経過においては、進行期肝がんの治療前末梢血に認められた CK(+)/CD45(-) CTC 細胞数が有意に減少することが分かった ($P < 0.01$)。CTC サブタイプ解析においては、幹細胞マーカー (EpCAM, Vimentin, CD90, CD133) の中で CD133(+) 細胞分画が減少した。これに対して、CTC 遺伝子発現解析では、治療に伴って他の幹細胞マーカー (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, SALL4, EpCAM) の発現が上昇していた。また、Atezolizumab + Bevacizumab 免疫複合療法による治療効果が得られた PR・SD 症例で CTC 数が有意に減少し ($P < 0.05$)、細胞サブセット解析では幹細胞マーカー Vimentin(+) CTC の割合が低下した。



(3) がん幹細胞性を誘導する責任遺伝子の機能的スクリーニング (図3)

CTC 由来 RNA におけるがん進展関連遺伝子および細胞内シグナル経路について、NGS 法を用いて解析した。免疫複合療法に治療耐性を示した PD 症例において、CTC の幹細胞マーカー (SOX2, MYC, NANOG) が有意に上昇した ($P < 0.05$)。パスウェイ解析では MAPK および TGF-シグナル経路が PD 症例で有意に上昇していた ($p = 0.01$)。CTC 回収時に測定した 48 種類の血清サイトカイン解析では、PD 群でがん幹細胞性に関連する HGF や M-CSF がいずれも高値であった。



これより、進行期肝がんの治療経過に伴う CTC 幹細胞マーカーの変化から、治療抵抗性 CTC の分子細胞学的特徴が示唆され、治療耐性を誘導するがん幹細胞様クローンの特性を考察する上で意義深い成果と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Tahata Y, Hikita H, Mochida S, Kawada N, Enomoto N, Kanto T, Suda G, Nakamoto Y, Kato N, Asahina Y, Matsuura K, Terai S, Nakao K, Shimizu M, Takami T, Akuta N, Yamada R, Kodama T, Tatsumi T, Yamada T, Takehara T, et.al.	4. 巻 56(1)
2. 論文標題 Sofosbuvir plus velpatasvir treatment for hepatitis C virus in patients with decompensated cirrhosis: a Japanese real-world multicenter study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 67-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01733-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi K, Ofuji K, Hiramatsu K, Nosaka T, Naito T, Matsuda H, Endo K, Higuchi M, Ohtani M, Nemoto T, Nakamoto Y.	4. 巻 10(7)
2. 論文標題 Circulating tumor cells detected with a microcavity array predict clinical outcome in hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 2300-2309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3790.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita T, Koshikawa N, Shimakami T, Terashima T, Nakagawa M, Nio K, Horii R, Iida N, Kawaguchi K, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kitao A, Kobayashi S, Takahara S, Imai Y, Yoshimura K, Murayama T, Nakamoto Y, Yoshida E, Yoshimura T, Seiki M, Kaneko S.	4. 巻 74(2)
2. 論文標題 Serum Laminin gamma2 Monomer as a Diagnostic and Predictive Biomarker for Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 760-775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31758.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nosaka T, Naito T, Murata Y, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nishizawa T, Okamoto H, Nakamoto Y.	4. 巻 52(2)
2. 論文標題 Regulatory function of interferon-inducible 44-like for hepatitis B virus covalently closed circular DNA in primary human hepatocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 141-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13722.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tahata Y, Hikita H, Mochida S, Enomoto N, Nakamoto Y, Asahina Y, Matsuura K, Yamashita T, Kanto T, Akuta N, Terai S, Shimizu M, Sobue S, Miyaki T, Moriuchi A, Yamada R, Kodama T, Tatsumi T, Yamada T, Takehara T, et.al.	4. 巻 57(2)
2. 論文標題 Liver-related events after direct-acting antiviral therapy in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 120-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01845-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda H, Nosaka T, Akazawa Y, Saito Y, Ozaki Y, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Nakamoto Y.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Daily Usage of Proton Pump Inhibitors May Reduce the Severity of Critical Upper Gastrointestinal Bleeding in Elderly Patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 7168621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/7168621.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitahara M, Mizukoshi E, Terashima T, Nakagawa H, Horii R, Iida N, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Kaneko S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Safety and Long-Term Outcome of Intratumoral Injection of OK432-Stimulated Dendritic Cells for Hepatocellular Carcinomas After Radiofrequency Ablation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 100777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100777.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiramatsu K, Naito T, Akazawa Y, Saito Y, Nosaka T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Matsuda M, Sakai A, Nakamoto Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Bipolar-current needle-knife with a water jet function (Jet B-knife) shortens the procedure time of endoscopic submucosal dissection for colorectal tumors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Endosc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00464-020-07832-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akazawa Y, Mizuno S, Fujinami N, Suzuki T, Yoshioka Y, Ochiya T, Nakamoto Y, Nakatsura T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Usefulness of serum microRNA as a predictive marker of recurrence and prognosis in biliary tract cancer after radical surgery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42392-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murata Y, Hiramatsu K, Yoshida Y, Akazawa Y, Saito Y, Nosaka T, Ozaki Y, Hayama R, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Nemoto T, Nakamoto Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Reactivation of intraabdominal tuberculous lymphadenopathy after drug-eluting beads transcatheter arterial chemoembolization in a patient with hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 76-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-018-0894-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akazawa Y, Nobuoka D, Takahashi M, Yoshikawa T, Shimomura M, Mizuno S, Fujiwara T, Nakamoto Y, Nakatsura T.	4. 巻 110
2. 論文標題 Higher human lymphocyte antigen class I expression in early-stage cancer cells leads to high sensitivity for cytotoxic T lymphocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1842-1852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nosaka T, Naito T, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nemoto T, Nishizawa T, Okamoto H, Nakamoto Y.	4. 巻 50
2. 論文標題 Molecular signature of hepatitis B virus regulation by interferon-gamma in primary human hepatocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 292-302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13450.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Tanaka T, Murata Y, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nakamoto Y.
2. 発表標題 Baseline FIB4 Index, Albumin, and ALBI Scores Predict Hypervascularization in Preneoplastic Nodules of Hepatocellular Carcinoma after HCV Eradication.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Murata Y, Nosaka T, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nakamoto Y.
2. 発表標題 Comparison of Circulating Tumor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Treated by Atezolizumab-Bevacizumab and Transcatheter Arterial Chemoembolization.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nosaka T, Murata Y, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nakamoto Y.
2. 発表標題 Leukotrienes Derived from Tumor-Infiltrating Macrophages Promote Hepatocellular Carcinoma Progression.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiramatsu K, Nosaka T, Yamamoto A, Saito Y, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Nakamoto Y.
2. 発表標題 Morphological Analysis of M2 Tumor-Associated Macrophage Subsets in Patients with Hepatocellular Carcinoma using Machine Learning Algorithm.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yohei Midori, Katsushi Hiramatsu, Takuto Nosaka, Kazuto Takahashi, Tatsushi Naito, Kazuya Ofuji, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani and Yasunari Nakamoto.
2 . 発表標題 Analysis of Mucosa-Associated Dysbiosis Related to Portal Hypertension and Liver Fibrosis in Hepatitis C Patients.
3 . 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Hiramatsu K, Nosaka T, Saito Y, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Nakamoto Y.
2 . 発表標題 Analysis of Immune Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma after Hepatitis C Virus Eradication.
3 . 学会等名 AASLD THE LIVER MEETING 2020 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Tanaka T, Murata Y, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nakamoto Y.
2 . 発表標題 Signal Changes in Preneoplastic Nodules on DWI of Gd-E0B-DTPA MRI in Patients at Risk for Hypervascular Hepatocellular Carcinoma.
3 . 学会等名 AASLD THE LIVER MEETING 2020 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Takahashi K, Ofuji K, Hiramatsu K, Nosaka T, Naito T, Matsuda H, Ohtani M, Nakamoto Y.
2 . 発表標題 Circulating Tumor Cells Detected with Microcavity Array Predict Clinical Outcome in Patients with Hepatocellular Carcinoma.
3 . 学会等名 AASLD THE LIVER MEETING 2020 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi K, Ofuji K, Hiramatsu K, Nosaka T, Naito T, Matsuda H, Ohtani M, Nemoto T, Nakamoto Y.
2. 発表標題 Sensitive detection of circulating tumor cells in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma using a microcavity array.
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver single Topic Conference(APASL STC Tokyo 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平松 活志 (HIRAMATSU Katsushi) (30646849)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授 (13401)	
研究分担者	野阪 拓人 (NOSAKA Takuto) (70748441)	福井大学・学術研究院医学系部門・助教 (13401)	
研究分担者	山下 太郎 (YAMASHITA Taro) (90377432)	金沢大学・附属病院・准教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------