

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月19日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09337

研究課題名(和文) TLRを介した肝癌幹細胞制御とbacterial therapyへの応用

研究課題名(英文) Application for bacterial therapy through Toll-like receptor 4 on cancer stem cells

研究代表者

三浦 光一 (Miura, Kouichi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90375238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではToll-like receptor (TLR)を介して肝癌の抑制、特に癌幹細胞にフォーカスを当て検討した。まずHuh7細胞、肝細胞特異的PTEN KO (以下PTEN KO)マウス、PTEN-TLR4 double KOマウス、PTEN-TLR2 double KOマウス、DEN誘導肝癌マウスより分離したEpCAM陽性細胞(癌幹細胞)をマウスに移植したが、対照群と比較して腫瘍形成能に差は認めなかった。最後に細菌が腫瘍形成能に及ぼす影響をみるため、PTEN KOマウスにプロバイオティクスを投与した。プロバイオティクス投与マウスで腫瘍形成能が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌は多中心に発生するため、根治的治療後も再発が多く見られる。その再発を抑制できれば、肝細胞癌の予後は大きく改善できると考えられる。我々はガン幹細胞に発現するTLR、特にTLR4がこの再発を抑制できる分子になりうるか検討した。今回の研究では、少なくともTLRリガンドの源となる腸内細菌にプロバイオティクスによる介入で、肝癌が抑制できる可能性について示すことができた。それがTLR4なのかどうかは、これまでの実験では証明できていない。これまでの研究結果からTLR4がガンの制御に関わることが明らかであり、そのメカニズムを探ることは有意義な研究であったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on TLR4 and cancer stem cells in mouse models. First we isolated cancer stem cell (EpCAM-positive cells) from Huh 7 cells, PTEN KO mice, PTEN-TLR4 double KO mice, PTEN-TLR2 double KO mice, DEN-induced hepatocellular carcinoma (HCC) mice, and translated to mice. However, tumor formation was not significant compared with their controls. Finally, probiotics was administrated to PTEN KO mice. Tumor formation was suppressed by probiotics in PTEN KO mice, suggesting that gut microbiota contributes to the development of HCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌 Toll-like receptor 腸内細菌 ガン幹細胞

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は肝炎ウイルス感染や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を基盤とした慢性肝疾患に発症する。WHOによると全世界で毎年約70万人が亡くなり、癌関連死の第3位となっている。肝細胞癌の原因となるC型慢性肝炎は有効な治療薬の開発により今後患者数の減少が見込まれているが、その一方で肥満に伴うNASH発癌は増加すると推定されている。よって肝細胞癌は人類にとって今後も脅威となり続けると考えられている。また肝細胞癌の生物学的特徴として、多中心性発育を呈するため、初発病変を適切に治療できても、他部位から再発病変が出現する。また局所コントロール良好例でも遠隔転移が発見され、治療に苦渋することが多い。よって肝癌の生物学的悪性を減弱させる新たな治療法や予防法が開発できれば、格段に予後が改善すると考えられる。肝細胞癌の再発には癌幹細胞が関与している報告がされている(Chiba T et al. Hep Res 2015)。すなわち、肝硬変などの慢性肝疾患では癌幹細胞が肝内に散在し、それが時間差を置いて腫瘍性増殖を来す。よって将来癌に成長する可能性のある癌幹細胞を含めた治療戦略が必要である。

我々の教室で作成した肝細胞特異的PTEN KO(以下PTEN KO)マウス(Horie Y et al. J Clin Invest 2004)はNASHやNASH発癌モデルとして広く用いられ、長期生存マウスでは肺などへの転移も認める。ヒト肝細胞癌でも約50%でPTENが欠損する報告があることから、PTEN KOマウスはヒトNASH肝癌に近いモデルと考えられ、肝癌研究に適したモデルと考えられる。PTEN KOマウスでは腫瘍発生前から癌幹細胞が肝内に存在し、この細胞を分離して免疫不全マウスに移植すると腫瘍を形成することから(Rountree CB et al. Stem Cells 2009)、これらの細胞は肝癌治療の新たなターゲットとなりうる。我々もRountreeらの報告と同様に、癌幹細胞のマーカーを発現する細胞を肝内に確認し、特に前癌病変に相当する腫瘍ではその細胞数の増加が認められ、前癌病変内からAFP陽性細胞が出現するようになり、やがて肝細胞癌が形成されることを観察している。よって癌幹細胞をターゲットとした治療応用を研究する上でも有用なモデルである。

また私はこれまで腫瘍を取り巻く非実質細胞に発現するToll-like receptor(TLR)に注目し、それら細胞がTLRを介して炎症や線維化を悪化させ、NASH発癌を促進することを報告してきた。その研究過程でTLRが非実質細胞だけでなく、一部の癌細胞に発現することに気付いた。またこれらTLRを発現する癌細胞の多くは小型で癌幹細胞の形質を有する。またPTEN KOマウスにおいてある種のTLRが欠損すると、癌幹細胞や腫瘍数が減少し、また分化度が異なってくる腫瘍が形成され、長期生存できることも発見し、現在論文を投稿中である。これらのことからTLRが癌細胞の運命決定に重要な役割を果たしていると考えられる。また我々はこれまで肝癌と腸内細菌叢の研究を行ってきた。一方、細菌は腸内だけでなく、免疫寛容状態を利用して肝癌周囲でも増殖していることが知られている。現在、実験的治療としてこれら腫瘍周囲の細菌を利用して癌細胞を攻撃するtumor-targeting bacterial therapyが試みられている。TLRが細菌構成成分を認識する受容体であることから、TLRは癌幹細胞、免疫寛容状態、tumor-targeting bacterial therapyを考慮する上でキーとなりうる分子と考えている。

2. 研究の目的

癌の根治はその生物学的特性である再発や転移を防ぐことで導けると考えられる。我々は肝に発現するToll-like receptor(TLR)を介して炎症や線維化が悪化し、マウスでの非アルコール性脂肪性肝炎を促進させることをこれまで報告してきた。その研究過程において、一部肝癌細胞がTLRを発現し、TLR欠損により癌の生物学的特性が減弱していることに気付いた。よって癌細胞のTLRを制御することで、癌の生物学的悪性を低下させ、再発や転移を防げるのではないかと考えた。

我々はマウスを用いて以下の二点を明らかにしたいと考えている。1.癌細胞に発現するTLRが癌の生物学的悪性に影響を与えるか? 2. TLRの介入がtumor-targeting bacterial therapyの補助療法となり得るか?

我々はこれまでのdouble KO(DKO)マウスでの検討からPTEN KOマウスにおいてTLRが欠損すると癌幹細胞の減少、肝腫瘍の進展抑制、分化度の異なる腫瘍形成などを確認している。

しかし、これらの現象に癌細胞が発現する TLR が直接関与しているかどうかは不明である。そこで、肝癌細胞の cell line を用い、TLR の強制発現やノックダウン技法を用いて、TLR が癌幹細胞の分化に関与するか？反対に TLR リガンドが癌細胞に対し reprogramming を誘導し、未分化能を獲得させることができるのか？など様々な生物学的現象を検討する。また PTEN KO マウスや PTEN-TLR DKO マウスより分離した癌幹細胞の移植などにより生物学的悪性度を評価する。TLR の下流シグナルは MyD88 経路と TRIF 経路の二つに別れる。一つの仮説として、どちらかの経路が優位かによって未分化能維持や分化度が異なる腫瘍が形成される可能性がある。これら遺伝子の改変マウスと交配した実験も行い、より重要な経路を特定する。また、TLR 欠損による腫瘍抑制効果が PTEN KO マウスモデルに限定した所見なのかどうかを見るため、他の肝発癌モデルでも検証する。

腫瘍の周囲は免疫寛容の状態であり、腫瘍周囲には細菌が定着していることが以前から知られている。それら細菌は二面性を持ち、感染症の原因にも癌細胞を攻撃する側にもなる。動物実験では、それら細菌は癌細胞内に侵入し、癌細胞を死滅させることが示されている事から、これを応用した tumor-targeting bacterial therapy を開発する試みもなされている(Forbes NS Nat Rev Cancer 2010)。しかしながら免疫寛容状態を保持する限り、腫瘍と周囲の細菌は独自の共存状態を作り上げていると考える。よって、この免疫寛容を破壊することで細菌が腫瘍を攻撃しやすい環境になるにではという仮説を持っている。TLR を制御することで腫瘍周囲の免疫寛容状態が破壊され、tumor-targeting bacterial therapy の一つの breakthrough になると考えている。

3. 研究の方法

本研究ではまず癌幹細胞の移植実験により、TLR 発現が与える影響を検討する。ヒト肝癌細胞株では Huh7 cell を用いて、in vitro における TLR の強制発現またはノックダウンが与える癌幹細胞や癌の分化度に与える影響について検討する。次に PTEN KO マウスと各種 TLR 欠損マウスを交配し、double KO マウスを作成し、癌幹細胞マーカー陽性細胞の出現頻度、腫瘍の発生頻度とその病理評価、マウス生存率を検討する。最後に各種 KO マウスにプロバイオティクスを投与し、tumor-targeting bacterial therapy の補助療法となるか検討する。

実験 1. ヒト肝癌細胞株である Huh7 細胞には癌幹細胞の形質を持つ細胞を含んでいる(Yamashita et al Hepatology 2008)。我々の保有する Huh 7 細胞株でも癌幹細胞のマーカーの一つである EpCAM を用いて MACS にて分離すると、未分化な癌細胞が獲得できる。そこで、EpCAM 陽性細胞および陰性細胞をそれぞれ癌幹細胞および通常癌細胞と位置づけ、各種 TLR リガンドで刺激し、分化誘導されるか、あるいは未分化のマーカーが維持されるか検討する。また TLR の強制発現や siRNA などを用いたノックダウン技法にて TLR 作用を減弱させた場合に、それら細胞の分化度に変化が生じるか検討する。また反対に TLR 発現により細胞の reprogramming に与える影響についても検討する。またそれぞれに処理した癌細胞を免疫不全マウスに移植し、どのような分化度を持った腫瘍が形成されるか検討する。

実験 2.我々はこれまでの研究の継続で PTEN KO と TLR2KO または TLR4KO マウスとを交配し、PTEN-TLR2 double KO(DKO)マウスおよび PTEN-TLR4 DKO マウスを常時作成し、維持している。腫瘍形成前(24 週前後)、前癌病変出現時期(48 週前後)、肝細胞癌出現時期(60 週以降)で、癌幹様細胞の分布や数をさらに詳細に検討する。また stem cell marker (CD133 や EpCAM など)を用いて、FACS や MACS で分離し、そこからさらに TLR を発現する癌幹(様)細胞を分離し、それら細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍径や転移の有無を評価する。

実験 3.TLR2KO および TLR4KO マウスに発癌物質である DEN を投与し、cancer stem-like cell の数や分布、腫瘍数や分化度を WT マウスと比較する。マウスに与える食餌は脂肪性肝炎の影響を見るために、普通食投与群に加え、高脂肪食投与も行う。また腫瘍ができる週齢に達したら、EpCAM などの Cancer stem cell marker を使用し、未分化細胞を分離し、移植実験を行う。

実験 4. PTEN KO マウスでは 40 週齢以後では前癌病変である adenoma、60 週齢以後では肝細胞癌、胆管細胞癌が見られる。プロバイオティクス投与により腫瘍周囲の細菌叢や腫瘍に変化が生じるか検討する。

4. 研究成果

まず Huh7 細胞から分離した肝癌幹細胞をマウスに移植し、非幹細胞移植群と比較検討したが、腫瘍形成能に明らかな有意差は見られなかった。また Huh7 細胞の TLR4 強発現および TLR4 KD 細胞を同様に移植する実験を行ったが、両群に明らかな有意差は認めなかった。次に肝細胞特異的 PTEN KO (以下 PTEN KO) マウス、PTEN-TLR4 double KO マウス、PTEN-TLR2 double KO マウスより分離した EpCAM 陽性細胞 (癌幹細胞) をマウスに移植し、腫瘍形成能を比較したが、明らかな腫瘍形成能は認めなかった。別の肝癌モデルである DEN 投与によるモデルを作成し、そこから EpCAM 陽性細胞を分離し、マウスに移植した。マウスは WT、TLR4 KO マウス、TLR4 KO マウスを用い、それら腫瘍を形成後にそれらマウスより EpCAM 陽性細胞を分離し、マウスに移植したが、腫瘍形成能が全般的に小さく、明らかな有意差は認めなかった。最後に細菌が腫瘍形成能に及ぼす影響をみるため、PTEN KO マウスにプロバイオティクスを投与した。プロバイオティクス投与マウスで腫瘍形成能が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

三浦光一、森本直樹、磯田憲夫. 腸内細菌と TLR シグナルからみた NASH 進展のメカニズム. 日本肝臓学会, 2018 年

三浦光一、森本直樹、石岡充彬、南慎一郎、磯田憲夫、山本博徳. 腸内細菌は NASH の原因か結果か? マウス NASH モデルにおける検討-. 肝臓と糖尿病代謝研究会 (日本肝臓学会, 招待講演), 2018 年

三浦光一、森本直樹、磯田憲夫. エゼチミブにより非アルコール性脂肪性肝炎からの肝発癌抑制効果. 日本肝臓学会, 2018 年

三浦光一、森本直樹、磯田憲夫. 高コレステロール血症改善による NASH 発癌抑制効果. 日本肝臓学会, 東部会, 2018 年

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。