

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10574

研究課題名(和文)肝細胞癌転移抑制に向けた、癌幹細胞特性を示す独自誘導 Sphere 細胞の標的分子解析

研究課題名(英文) Analysis of the induced cancer stem-like sphere cells-specific molecules to prevent the metastatic properties of hepatocellular carcinoma

研究代表者

恒富 亮一 (TSUNEDOMI, Ryouichi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10420514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝がんにおいて、肝内転移による術後早期再発は予後不良の一因である。がん幹細胞(CSC)は転移や治療抵抗性に重要と考えられている。本研究は、癌の進展に伴って発生すると考えられる転移性のCSCに対するマーカーやその性質を明らかとし、癌の転移・再発を抑制する新たな戦略をもたらすものである。

本研究から、早期肝内再発群および肝がんCancer stem-like sphere cells (CSLCs) に共通して有意な発現亢進を示す遺伝子群を同定した。この内の一つの遺伝子は、Sphere形成能、抗癌剤耐性能、転移能、免疫逃避機構への影響が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、がん幹細胞特性、特に治療抵抗性及び転移能に関与する遺伝子としてRAB3Bを同定した。また、本研究における大量調製可能な誘導がん幹細胞が、免疫逃避機構も備えることが新たに明らかとなり、がん幹細胞を標的としたさらなる免疫療法の開発への展開が可能となった。本研究は、がんの予後不良の主因とも言える術後再発を抑制するための意義ある成果をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) are thought to play important roles in carcinogenesis, recurrence, metastasis, and therapy-resistance. We have successfully induced cancer stem-like sphere cells (CSLCs) from hepatoma cell lines using a unique medium. Our induced CSLCs showed characteristic phenotypes of CSCs such as chemo- and immune-resistances. As a result of integrated analysis with RNA-seq, a RAB3B was identified as an up-regulated gene in both CSLCs in vitro and poor prognostic HCCs in vivo. Cells harboring mono-allelic RAB3B knock-out showed altered sphere formation and significantly lower chemoresistance compared to those of parental cells. The mono-allelic RAB3B knock-out cells also showed decreased PD-1 ligands in sphere induction medium than those in cells cultured with normal medium. Therefore, the up-regulation of RAB3B may play important roles in CSLCs.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は多中心性発癌に加えて、肝内転移によって再発率の高い予後不良な癌種である。癌転移は古典的モデルに加えて、転移形成を担う細胞が早い段階に独立して存在すると提唱されている (Gray JW, Cancer Cell, 2003)。近年、上皮間葉系移行 (EMT) や癌幹細胞 (CSC) が転移・再発に重要と考えられている。CSC は抗癌剤・放射線治療に対する抵抗性を有しており、癌の根治のためには CSC を標的にした治療法が必要であり、CSC のマーカー探索や機能解析が盛んに行われている。HCC においても、細胞株から色素排出能の高い side-population (SP) 画分や、CD133 等を CSC マーカーとして分離が行われている。乳癌においては、EMT を起こした癌細胞が CSC 様の表現型を示すことが報告され、CSCs 自身の heterogeneity や分化した癌細胞から CSCs への plasticity (可塑性) に対する認識が広まってきた。

本研究代表者は、HCC の転移・再発に関して研究を進めてきている。その中で、HCC 術後早期再発と CSC の抗癌剤耐性機構とも関連する ABC トランスポーター発現とが関連することを見出し、進展 (脱分化) した HCC の中に転移・再発に重要な CSC が存在すると考えるに至った。これまでの HCC からの CSC の分離は、高分化型由来細胞株では成されてきたが、高い転移・浸潤能を示す低分化型由来細胞株には CSC はほとんど含まれないとされてきた。本研究代表者らは、しかしながら、前述の plasticity に基づき低分化型 HCC 由来細胞株から CSC 表現型の一つである浮遊細胞塊 (Sphere) 形成能を有する CSC 様細胞の独自誘導に成功した。この CSC 様 sphere 細胞は、従来の癌細胞の階層性の頂点に位置する癌の発生に重要な CSC とは別に、癌の進展に伴って発生する転移・再発に寄与する CSC と考え研究を進めている。

### 2. 研究の目的

本研究は、予後不良な肝細胞癌を対象として、癌幹細胞 (CSC) を誘導・解析することで、肝内転移による再発の抑制に結びつける。本研究では、高い転移・浸潤能を有する低分化型由来の細胞株から独自に誘導した CSC 表現型を示す浮遊細胞塊 (Sphere) を解析する。CSC としての顕著な表現型を示す独自の Sphere 細胞を解析し、その後に臨床サンプルでの validation を行い、肝細胞癌術後肝内転移抑制のコンセプトを得る。特に、CSC 特異的バイオマーカーから、癌免疫療法や抗体・核酸医薬の候補分子を同定し、コンセプトを得る。

### 3. 研究の方法

これまでに、神経生存因子を含むことを特徴とする培地を用いて誘導した肝がん Cancer stem-like sphere cells (CSLCs) が、マウス経門脈的肝転移能および in vitro での種々の抗がん剤に対する耐性を親株と比較して亢進することを確認してきた。肝細胞癌術後肝内転移抑制のコンセプトを得るために、肝癌予後不良臨床サンプルと CSLCs を統合解析することで、肝がん予後改善のための標的遺伝子の探索を行った。

肝転移能は免疫不全マウスへの脾臓注入による経門脈的肝転移モデルにより評価した。抗癌剤感受性は MTS アッセイにより評価した。発現解析には RT real-time PCR 及びフローサイトメトリーを用いた。網羅的発現解析には RNA-seq、DNA チップ及び iTRAQ-coupled 2D-LC-MS/MS を用いた。臨床サンプルとして、術後 1 年以内再発症例術後 2 年以上無再発症例及び術後 5 年以上無再発症例からの凍結摘出標本を用いた。遺伝子ノックダウンは特異的 siRNA の移入によって行い、遺伝子ノックアウト株の作製にはゲノム編集を用いた。

### 4. 研究成果

RNA-seq 解析から、早期肝内再発群および CSLCs に共通して有意な発現亢進を示す遺伝子群を同定した。この内の一つの RAB3B 遺伝子は、ノックダウンおよび片アレルノックアウトによって、Sphere 形成不全や、5-FU、SAHA、ドキシソルピシン、ドセタキセル、イリノテカンにおける耐性の減弱が見られた。一方、シスプラチン、カルボプラチン耐性においては片アレルノックアウトによる影響は見られなかった。上記遺伝子ノックアウトにおける抗癌剤耐性減弱は、該遺伝子の発現ベクター移入によって回復された。さらに、上記遺伝子ノックアウトは、抗がん剤耐性機構と関連する薬剤排出トランスポーターの発現や細胞周期への影響が観察された。経門脈的肝転移能を免疫不全マウス脾注にて検討したところ、上記遺伝子ノックアウトによって、転移能亢進が示されなくなった。また、本研究により誘導した CSLCs における免疫逃避機構の亢進を示唆する結果が示され、上述の遺伝子ノックアウトは免疫逃避機構にも影響を示した。

がん幹細胞特性、特に治療抵抗性及び転移能に関与する遺伝子として RAB3B を同定した。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文] (計 1 1 件)

Usui Tatsuya, Sakurai Masashi, Umata Koji, Elbadawy Mohamed, Ohama Takashi, Yamawaki Hideyuki, Hazama Shoichi, Takenouchi Hiroko, Nakajima Masao, Tsunedomi Ryouichi, Suzuki Nobuaki, Nagano Hiroaki, Sato Koichi, Kaneda Masahiro, Sasaki Kazuaki. Hedgehog Signals Mediate Anti-Cancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Colorectal Cancer Organoid Culture. International Journal of Molecular Sciences, 2018; 19: E1098.

査読有り、doi: 10.3390/ijms19041098.

Kanekiyo Sinsuke, Hazama Shoichi, Takenouchi Hiroko, Nakajima Masao, Shindo Yoshitaro, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Tomochika Shinobu, Tsunedomi Ryouichi, Tokuhisa Yoshiaki, Iida Michihisa, Sakamoto Kazuhiko, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Yamamoto Shigeru, Yoshino Shigefumi, Okuno Kiyotaka, Udaka Keiko, Kawakami Yutaka, Matsueda Satoko, Ito Kyogo, Nagano Hiroaki. IgG response to MHC class I epitope peptides is a quantitative predictive biomarker in the early course of treatment of colorectal cancer using therapeutic peptides. *Oncology Reports*, 2018; 39: 2385-92. 査読有り、doi: 10.3892/or.2018.6288.

- ③ Nishiyama Mitsuo, Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Hashimoto Noriaki, Matsukuma Satoshi, Ogihara Hiroyuki, Kanekiyo Shinsuke, Iida Michihisa, Sakamoto Kazuhiko, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Yamamoto Shigeru, Yoshino Shigefumi, Ueno Tomio, Hamamoto Yoshihiko, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki. Metastatic ability and the epithelial-mesenchymal transition in induced cancer stem-like hepatoma cells. *Cancer Science*, 2018; 109: 1101-9. 査読有り、doi: 10.1111/cas.13527.
- ④ Tanaka Hironori, Hazama Shoichi, Iida Michihisa, Tsunedomi Ryouichi, Takenouchi Hiroko, Nakajima Masao, Tokumitsu Yukio, Kanekiyo Shinsuke, Shindo Yoshitaro, Tomochika Shinobu, Tokuhisa Yoshihiro, Sakamoto Kazuhiko, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Yamamoto Shigeru, Yoshino Shigefumi, Ueno Tomio, Hamamoto Yoshihiko, Fujita Yusuke, Tanaka Hiroaki, Tahara Ko, Shimizu Ryoichi, Okuno Kiyotaka, Fujita Koji, Kuroda Masahiko, Nakamura Yusuke, Nagano Hiroaki. miR-125b-1 and miR-378a are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer. *Cancer Science*, 2017; 108: 2229-38. 査読有り、doi: 10.1111/cas.13390.
- ⑤ Shindo Yoshitaro, Hazama Shoichi, Nakamura Yusuke, Inoue Yuka, Kanekiyo Shinsuke, Suzuki Nobuaki, Takenouchi Hiroko, Tsunedomi Ryouichi, Nakajima Masao, Ueno Tomio, Takeda Shigeru, Yoshino Shigefumi, Okuno Kiyotaka, Fujita Yusuke, Hamamoto Yoshihiko, Kawakami Yutaka, Oka Masaaki, Nagano Hiroaki. miR-196b, miR-378a and miR-486 are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment in colorectal cancer. *Oncology Letters*, 2017; 14: 1355-62. 査読有り、doi: 10.3892/ol.2017.6303.  
Tsunedomi Ryouichi, Hazama Shoichi, Okayama Naoko, Oka Masaaki, Nagano Hiroaki. Rapid and sensitive detection of UGT1A1 polymorphisms associated with irinotecan toxicity by a novel DNA microarray. *Cancer Science*, 2017; 108: 1504-9. 査読有り、doi: 10.1111/cas.13272.
- ⑦ Inoue Yuka, Hazama Shoichi, Tokumitsu Yukio, Kanekiyo Shinsuke, Tomochika Shinobu, Tsunedomi Ryouichi, Tokuhisa Yoshihiro, Iida Michihisa, Sakamoto Kazuhiko, Takeda Shigeru, Ueno Tomio, Yoshino Shigefumi, Nagano Hiroaki. Cetuximab strongly enhances immune cell infiltration into liver metastatic sites in colorectal cancer. *Cancer Science*, 2017; 108: 455-60. 査読有り、doi: 10.1111/cas.13162.
- ⑧ Kijima Taiki, Hazama Shoichi, Tsunedomi Ryouichi, Tanaka Hironori, Takenouchi Hiroko, Kanekiyo Shinsuke, Inoue Yuka, Nakashima Masao, Iida Michihisa, Sakamoto Kazuhiko, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ueno Tomio, Yamamoto Shigeru, Yoshino Shigefumi, Okuno Kiyotaka, Nagano Hiroaki. MicroRNA-6826 and -6875 in plasma are valuable non-invasive biomarkers that predict the efficacy of vaccine treatment against metastatic colorectal cancer. *Oncology Reports*, 2017; 37: 23-30. 査読有り、doi: 10.3892/or.2016.5267.  
Usui Tatsuya, Sakurai Masashi, Enjoji Shuhei, Kawasaki Hideyoshi, Umata Koji, Ohama Takashi, Fujiwara Nobuyuki, Yabe Ryotaro, Tsuji Shunya, Yamawaki Hideyuki, Hazama Shoichi, Takenouchi Hiroko, Nakajima Masao, Tsunedomi Ryouichi, Suzuki Nobuaki, Nagano Hiroaki, Sato Koichi. Establishment of a Novel Model for Anticancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Culture of Tumor Microenvironment. *Stem Cells International*, 2016; 2016: 7053872. 査読有り、doi: 10.1155/2016/7053872  
Kitahara Masahiro, Hazama Shoichi, Tsunedomi Ryouichi, Takenouchi Hiroko, Kanekiyo Shinsuke, Inoue Yuka, Nakajima Masao, Tomochika Shinobu, Tokuhisa Yoshihiro, Iida Michihisa, Sakamoto Kazuhiko, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ueno Tomio, Yamamoto Shigeru, Yoshino Shigefumi, Nagano Hiroaki. Prediction of the efficacy of immunotherapy by measuring the integrity of cell-free DNA in plasma in colorectal cancer. *Cancer Science*, 2016; 107: 1825-9. 査読有り、doi: 10.1111/cas.13085.  
Matsukuma Satoshi, Yoshimura Kiyoshi, Ueno Tomio, Oga Atsunori, Inoue Moeko, Watanabe Yusaku, Kuramasu Atsuo, Fuse Masanori, Tsunedomi Ryouichi, Nagaoka Satoshi, Eguchi Hidetoshi, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Maeda Noriko, Tokuhisa Yoshihiro, Kawano Reo, Furuya-Kondo Tomoko, Itoh Hiroshi, Yoshino Shigefumi, Hazama Shoichi, Oka Masaaki, Nagano Hiroaki. Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells. *Cancer Science*, 2016; 107: 1599-609. 査読有り、doi: 10.1111/cas.13061.

〔学会発表〕(計 21 件)

- 恒富亮一：がん幹細胞様細胞と臨床サンプルとの統合解析により同定されたがん幹細胞関連遺伝子；第 26 回日本消化器関連学会週間、2018 年
- 恒富亮一：Identification of responsible genes for evasion of immune surveillance in induced cancer stem-like cells；第 56 回日本癌治療学会学術集会、2018 年
- ③恒富亮一：RAB3B gene was identified as a gene involved in chemoresistance of induced cancer stem-like sphere cells；第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年
- ④恒富亮一：RAB3B was identified as a gene involved in characteristics of induced cancer stem-like sphere cells；23rd World Congress on Advances in Oncology and 22nd International Symposium on Molecular Medicine (国際学会)、2018 年
- ⑤恒富亮一：誘導癌幹細胞における免疫逃避機構の検討；第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年
- 恒富亮一：がん幹細胞様細胞における CD44 isoforms 発現；第 6 回がん代謝研究会、2018 年
- ⑦恒富亮一：癌幹細胞様特性を示す Sphere 細胞における抗癌剤耐性に関与する遺伝子の同定；第 28 回日本消化器癌発生学会総会、2017 年
- ⑧恒富亮一：RESPONSIBLE GENES FOR CHARACTERISTICS OF THE INDUCED CANCER STEM-LIKE SPHERE CELLS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA；25th United European Gastroenterology Week (国際学会)、2017 年
- 恒富亮一：癌幹細胞様細胞における抗癌剤耐性に影響を及ぼす遺伝子の同定；第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017 年
- 松隈 聡：膵癌幹細胞の新たな表面マーカー-calreticulin の同定；第 25 回日本消化器関連学会週間、2017 年
- 松隈 聡：膵癌幹細胞様細胞に高発現した分子の同定と解析；第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
- 恒富亮一：Identification of genes involved in chemoresistance of induced cancer stem-like sphere cells；第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
- 恒富亮一：肝転移能亢進を示す肝細胞癌幹細胞様細胞の特性；第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年
- 松井洋人：肝細胞癌 (HCC) に対する術後補助療法としての HSP70-mRNA 導入樹状細胞療法 I/II 相試験；第 29 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2016 年
- 松隈 聡：Calreticulin highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells is a prognostic factor for pancreatic cancer；第 75 回日本癌学会学術総会、2017 年
- 恒富亮一：Metastatic potentials and expressions of CD44 isoforms in hepatocellular carcinoma stem-like sphere cells；第 75 回日本癌学会学術総会、2017 年
- 松隈 聡：膵癌幹細胞様細胞に高発現する分子の同定と同分子の臨床的意義に関する検討；第 27 回日本消化器癌発生学会総会、2017 年
- 恒富亮一：肝転移能亢進を示す癌幹細胞様細胞における CD44 isoforms の発現；第 27 回日本消化器癌発生学会総会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：癌細胞における免疫チェックポイント因子の発現抑制剤及び癌治療用医薬組成物

発明者：恒富亮一、永野浩昭

権利者：国立大学法人山口大学

種類：特許

番号：特願 2018-173611

出願年：2018 年

国内外の別：国内

名称：癌幹細胞における薬物耐性の低減剤、癌幹細胞における転移能の抑制剤及び癌の転移性再発リスクを予測する方法

発明者：恒富亮一、永野浩昭

権利者：国立大学法人山口大学

種類：特許

番号：、特願 2018-153470

出願年：2018 年

国内外の別：国内

名称：癌幹細胞における薬物耐性の低減剤及び癌の転移性再発リスクを予測する方法

発明者：恒富亮一、永野浩昭  
権利者：国立大学法人山口大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-157349  
出願年：2017 年  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
なし

6 . 研究組織  
研究分担者、研究協力者なし

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。