

令和元年6月17日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18304

研究課題名(和文)人工細胞膜の再生医療への応用に向けた腫瘍原性肝幹細胞の選択的排除機構の解明

研究課題名(英文) Selective elimination of tumorigenic hepatic stem cells using hybrid liposomes for application of regenerative medicine

研究代表者

古水 雄志 (KOMIZU, Yuji)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：80735829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療では、細胞培養の過程で未分化細胞や形質転換細胞が存在した場合、細胞を生体内に移植後に異常増殖して腫瘍形成(がん化)のリスクが生じる。そのため、腫瘍原性幹細胞を排除する方法の確立は、安全な再生医療ためには必要不可欠である。これまでに正常胎児肝細胞を酪酸ナトリウム(SB)処理することで肝芽細胞へ誘導が可能であり、その培養過程で腫瘍原性肝幹細胞の出現が確認されている。本研究では正常細胞に影響を与えず、がん細胞へ特異的に細胞死を起こすハイブリッドリポソーム(HL)を用いて、肝芽細胞中に出現する腫瘍原性肝幹細胞を選択的に排除することが分かった。今後、再生医療の分野への貢献が期待できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、幹細胞の培養研究は主に幹細胞の分化能力の維持に焦点が絞られ、幹細胞の形質転換(がん化)防止とリスク評価に関してはほとんど検討が行われてこなかった。そこで、本研究課題では、肝幹細胞の一種である肝芽細胞を用いて、ナノ粒子であるHLによる細胞レベルでの悪性形質転換(がん化)の防止についての研究成果を得ることができた。本研究結果により、幹細胞を安全に培養できる新しい培養プロセスが構築できるものと期待される。今後、iPSやES細胞、他の体性幹細胞に対する再生医療に向けた応用が予想される。

研究成果の概要(英文)：It is very important to eliminate the tumorigenic stem cells selectively included in iPS cells, ES cells and somatic stem cells for regenerative medicine, because the tumorigenic stem cells have a risk of tumorigenesis after the cell transplantation. The tumorigenic stem cells has been appeared in the hepatoblasts, a kind of hepatic stem cells, which induced from the normal human fetal hepatocytes by treatment with sodium butyrate (SB). Hybrid liposomes (HL) selectively accumulated to membranes of tumor cells and have high inhibitory effects on the growth of tumor cells. Therefore, we investigated the application of HL to selective elimination of the tumorigenic stem cells in the human hepatoblasts. The results suggest that the tumorigenic hepatic stem cells could be eliminated by the treatment with HL. In future, HL treatment of the stem cells would be a useful culture method for quality control of the stem cells to reduce a risk of tumorigenesis after the cell transplantation.

研究分野：医用生体工学

キーワード：リポソーム 腫瘍原性肝幹細胞 がん化 安全性評価 再生医療 形質転換細胞 肝芽細胞 肝幹細胞

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

## 1. 研究開始当初の背景

近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や胚性幹細胞 (ES 細胞) などの万能細胞 (体性幹細胞) の研究によって注目を集めている再生医療では、幹細胞を生体外で増殖させた後に、体内への細胞移植によって治療を行うことが考えられている。しかし、この際、もし未分化な細胞や、形質転換 (がん化) を引き起こした細胞が混入した場合、細胞移植した後に、生体内で異常増殖して腫瘍を形成するリスクがある。これを未然に防ぐためには、正常幹細胞と形質転換幹細胞を識別して、形質転換幹細胞を選択的に排除する方法の開発が必要である。

松下らは、これまでに、肝幹細胞の一種である肝芽細胞が含まれるヒト胎児肝 (Hc) 細胞を三次元的に集塊化 (スフェロイド形成化) させることで、肝特異的機能の発現 (再分化) を制御できることを示し、人工肝臓作成への基礎研究を進めてきた (Matsushita et al., Cytotechnology 42, 57(2003); Matsushita et al., J. Oral. Tissue. Engin. 4, 25 (2006))。さらに、未分化の細胞集団である Hc 細胞から、肝芽細胞を効率よく誘導する条件の検討を行ってきた (Kiyota et al., Biol. Pharm. Bull., 30, 2308 (2007))。その結果、酪酸ナトリウム (SB) 処理することで、肝芽細胞が誘導されることを発見した。しかし、その際、SB 濃度依存的に、肝腫瘍マーカーである異常プロトロンビン (PIVKA-II) の分泌量の増大が認められ、形質転換の可能性が示唆された。この肝幹細胞の形質転換 (がん化) を防ぐ方法の開発が急務であった。

一方、上岡らは世界に先駆け 1985 年にベシクル分子とミセル分子から成る人工細胞膜 (ハイブリッドリポソーム: HL) を創製し (Ueoka et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 2185 (1985))、抗がん剤を含まない HL 自身ががん細胞膜に特異的に蓄積した後 (図 1) アポトーシス誘導型の細胞死を示すことを発見した (Matsumoto et al., Int. J. Cancer, 115, 377 (2005))。さらに、動物実験レベルでは顕著な延命効果を報告し、臨床応用ではリンパ腫瘍の患者への高い安全性、延命効果及び腫瘍縮小効果を得ており、すでに国内で十数例の臨床試験が実施されている (Ueoka et al., Curr. Pharm. Des., 17, 1709 (2011))。

## 2. 研究の目的

先行研究として、Hc 細胞の SB 処理によって、肝芽細胞を誘導する際に出現する形質転換細胞は、がん遺伝子である c-fos mRNA を発現し、さらに、腫瘍原性の指標である軟寒天中のコロニー形成する性質を有していることが示された (Oshikata et al., 薬学雑誌, 131, 757(2011))。興味深いことに、この肝芽細胞の誘導時に、0.33mM の HL を 96 時間処理することで、コロニー形成数が有意に低下することを報告しており、HL による形質転換細胞の除去の可能性が示唆された。そこで、本研究では、HL の処理条件の最適化や形質転換肝幹細胞の除去の機構を *in vitro* で検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) HL の調製

HL (DMPC/10 mol% C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>) は、リン脂質として、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) 及びミセル分子として、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>) を秤量し、5% グルコース溶液中で超音波照射を行い、孔径 0.22µm フィルターで濾過滅菌したものをを用いた。

### (2) 使用した細胞

細胞は、DS ファーマバイオメディカル(株)より購入した、正常ヒト胎児肝細胞 (Hc 細胞) を 8 継代 (Hc8P) まで培養して実験に用いた。これを 1mM 酪酸ナトリウム (Sodium Butyrate: SB)

を用いて肝芽細胞へ誘導を行った。

### (3) *in vitro*での肝芽細胞誘導およびHLによる形質転換肝幹細胞除去とその機構の解明

#### HLの細胞増殖抑制試験

ヒト胎児由来肝(Hc)細胞に対するHLの細胞増殖への影響をトリパンブルー染色剤を用いた色素排除法および酵素活性測定法(WST-8アッセイ法)により検討した。

#### 肝芽細胞誘導率の解析(フローサイトメトリー)

酪酸ナトリウム(SB)1mMをヒト胎児由来肝(Hc)細胞に8日間処理することで肝幹細胞の一種である肝芽細胞を誘導することを報告している(*Biol. Pharm. Bull.*, 30, 2308 (2007))。そこで、Hc細胞に含まれる肝芽細胞の割合を、肝芽細胞マーカであるEpCAMおよびICAMの抗体を用いた蛍光免疫染色により、陽性細胞を指標としたフローサイトメトリーを行った。

#### 形質転換細胞の評価(軟寒天コロニー形成法など)

形質転換の評価法として、がん化細胞の特徴の一つである足場非依存的な増殖能を指標とした軟寒天コロニー形成法を既存論文に従い実施する(*薬学雑誌*, 131, 757(2011))。軟寒天培地中のコロニーの観察は、Calcein-AMにより生細胞を染色し、imageJによる画像解析を行った。画像解析を用いたコロニー計数では、コロニーの定義(5700 $\mu\text{m}^2$ 以上)を満たすものを計数した。

## 4. 研究成果

### (1) SB処理による肝芽細胞への誘導

SB処理したHc細胞に対する肝芽細胞への誘導確認を行うため、肝芽細胞マーカとして、EpCAMおよびICAMのフローサイトメトリー解析を行った。その結果、EpCAMおよびICAMが陽性を示す細胞の割合は、1mM SBでHc細胞を処理すると、SB未処理と比べ、約18倍増加し、肝幹細胞の一種である肝芽細胞への誘導を示した。

### (2) SB及びHL処理がHc細胞の細胞増殖に与える影響

SB処理により肝芽細胞へ誘導すると、細胞数は、未処理(Control)と比べて約半分になった。さらに、HL処理することで細胞数は減少する傾向を示した。

### (3) HL処理による腫瘍原性肝幹細胞の排除

#### 軟寒天コロニー形成試験

HLの腫瘍原性肝幹細胞の排除について、軟寒天コロニー形成法により評価した。結果を図1に示す。SB処理したHc細胞(SB)は、SB未処理のHc細胞(Cont.)と比べ、コロニー数が有意に増大し、造腫瘍性が認められた。HLは、SB処理したHc細胞に対して、コロニー数を顕著に抑制した。特に1.0mM HLで48時間前処理した条件ではコロニー数が0個であった。このことから、HLは、SB処理により誘導された腫瘍原性肝幹細胞を排除する効果があることが示された。さらに、HL処理後の生存細胞を継代培養した後、腫瘍原性について評価したところ、SB処理したHc細胞と比べ、コロニー数が有意に抑制され、HLの腫瘍原性細胞の除去効果が継代培養後も維持されていることを示している。

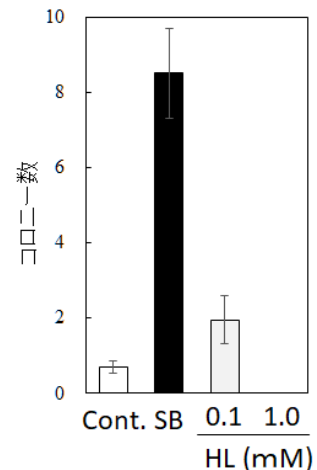


図1 HLの腫瘍原性肝幹細胞の排除

#### 細胞表面ビメンチン(Cell-Surface Vimentin: CSV)の発現

近年、がん細胞と細胞表面ビメンチン(CSV)の発現レベルの関係性が報告されている。そこで、腫瘍原性の評価法として、細胞表面ビメンチン(CSV)のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、SB処理したHc細胞のCSVの発現は、SB未処理のControlと比べ有意に増加し、腫

瘍原性肝幹細胞の出現が示された。さらに、HL は、SB 処理した Hc 細胞（腫瘍原性肝幹細胞）に対して、CSV の発現率を有意に抑制した。この結果からも、HL の腫瘍原性肝幹細胞の除去効果が示された。

#### (4) HL の肝機能(CYP3A4 活性)に与える影響

HL 処理後の生存細胞を継代培養した後、肝機能（CYP3A4 活性）について評価したところ、SB 処理した Hc 細胞と比べ、CYP3A4 活性が増加する傾向を示し、肝機能には影響しないことが示された。

#### (5) 腫瘍原性肝幹細胞の排除機構の解明

##### 蛍光脂質含有 HL の腫瘍原性肝幹細胞への融合蓄積

これまでの研究により、HL は正常細胞とがん細胞の膜流動性の違いを認識し、大きな膜流動性をもつがん細胞膜に選択的に融合・蓄積することでアポトーシス誘導型の細胞死を起こすことが判明している。本研究では、正常細胞である Hc（正常肝臓細胞）に対して、SB を処理することで、腫瘍原性肝幹細胞（悪性形質転換細胞）が出現することから、HL が正常肝臓細胞と悪性形質転換した細胞の識別が可能かどうかを検討した。そこで蛍光脂質含有 HL(HL/NBDPC)を用い、SB 処理した Hc 細胞（腫瘍原性肝幹細胞）と未処理の Hc 細胞（Control）への蛍光蓄積について、フローサイトメトリー解析を行った。蛍光脂質含有 HL の蛍光蓄積は、Control ではほとんど蓄積が起きなかったことに対して、SB 処理した Hc 細胞では、細胞あたりの蛍光強度が顕著に強くなっており、Control と比較して 8 倍以上の蛍光蓄積を示した。HL は、正常肝臓細胞と比べ、腫瘍原性肝幹細胞に選択的に蓄積しやすいことが明らかとなった。

##### 腫瘍原性肝幹細胞の細胞膜流動性

SB 処理した Hc 細胞の細胞膜流動性は、Control (SB 未処理)と比較して、有意に増大することが示された。さらに、SB 処理による細胞膜流動性を示す *P* 値は、先行研究で示された肝臓がん細胞(HepG2)と近い値を示しており、SB 処理した細胞膜流動性へ変化することが示された。これらの結果は、HL による形質転換細胞（腫瘍原性肝幹細胞）の排除機構には、膜流動性が関与する可能性が示された。HL は、正常肝臓細胞と比べ、細胞膜流動性がより高い腫瘍原性肝幹細胞に、選択的に蓄積し、形質転換細胞の細胞増殖を抑制したものと考えられる。

#### (6) まとめ

本研究は、再生医療における腫瘍原性幹細胞(幹細胞の腫瘍化)を排除するために、種々のがん細胞に対して顕著な増殖抑制効果を示す HL を用いて検討した。注目すべき知見として、(a)SB 処理により EpCAM および ICAM 陽性を示す細胞が増大することから肝芽細胞へ誘導された。(b)HL 処理により軟寒天培地中で増殖可能な腫瘍原性肝幹細胞が排除され、特に HL 1.0 mM で 48 時間処理すると完全に排除が可能であることが分かった。(c)HL 処理後の細胞を継代し、SB 処理を再度行っても腫瘍原性肝幹細胞の再出現を抑制可能であることが明らかとなった。(d)HL 処理した細胞を継代して、肝機能(CYP3A4 活性)を評価したところ、肝機能には影響しないことが示された。(e)HL が腫瘍原性肝幹細胞を排除するメカニズムは、SB 処理による細胞膜流動性の増大に起因する可能性が示された。以上の結果より、HL は正常な機能を有する肝幹細胞を残存させ、腫瘍原性肝幹細胞を選択的に排除できるナノ医療素材であることが示唆された。今後、iPS や ES 細胞、他の体性幹細胞に対する形質転換の防止への展開が予想され、再生医療の分野への貢献が期待できると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- K. Inamura, Y. Komizu, M. Yamakuchi, S. Ishida, Y. Matsumoto, T. Matsushita, Inhibitory effect of hybrid liposomes on the growth of liver cancer stem cells, 査読有、Biochem Biophys Res Commun, 509 巻、2019、268 - 274  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.118
- K. Inamura, K. Emoto, H. Ichihara, K. Sasaki, T. Iwasa, R. Kojima, M. Kawabe, Y. Komizu, Y. Matsumoto, T. Matsushita, Evaluation of an In vitro Approach to the Prediction of In vivo Effects on Multidrug Resistance in Human Hepatoma Cells, 査読有、J Carcinog Mutagen, 9 巻、2018、1000318  
DOI: 10.4172/2157-2518.1000318
- T. Mizutami, T. Ishii, Y. Komizu, T. Iwasa, M. Kawabe, N. Togawa, S. Ishida, T. Matsushita, Maintenance of viability and functional expression of cryopreserved human hepatocytes using silicate fiber-based three-dimensional scaffold, Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 査読有、22 巻、2017、101 - 106  
DOI: 10.11232/aatex.22.101
- T. Mizutami, Y. Ohta, M. Nakamura, Y. Komizu, T. Iwasa, K. Sasaki, R. Watanabe, M. Kawabe, T. Matsushita, Induction of drug resistance in human hepatoma cells cultured on a silicate fiber-based 3D scaffold, Adv Biochem Biotechnol, 査読有、2017 巻、2017、112
- T. Ishii, H. Saito, Y. Komizu, R. Tomoshige, T. Matsushita, Effects of macroporous hydroxyapatite carriers on the growth and function of human hepatoblasts derived from fetal hepatocytes, J Biosci Bioeng, 査読有、122 巻、2016、240 - 245  
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.012

[学会発表](計 18 件)

- 我那覇 一冴、稲村 恒亮、古水 雄志、石田 誠一、松本 陽子、松下 琢、肝臓がん幹細胞を標的とした新規ナノ粒子の有効性に関する検討、第 18 回日本再生医療学会総会、2019
- 陳野 莉子、稲村 恒亮、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢、ハイブリッドリポソームを用いた腫瘍原性幹細胞の選択的排除に関する研究、第 18 回日本再生医療学会総会、2019
- 柄本 和実、井野川 人姿、古水 雄志、友重 竜一、松下 琢、ハイドロキシアパタイト担体上におけるヒト骨芽細胞の分化誘導に関する研究、第 18 回日本再生医療学会総会、2019
- 古水 雄志、坂田 望、中村 茉耶、水民 敬浩、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、石田 誠一、松下 琢、三次元培養担体 Cellbed を用いた HepG2 細胞の胆汁排泄機能の再現、シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来、2019
- Y. Komizu, K. Inamura, S. Ishida, Y. Matsumoto, T. Matsushita, Hybrid nanoparticles accumulate in and inhibit the growth of liver cancer stem cells, ASCB /EMBO 2018 Meeting, 2018
- 稲村 恒亮、柄本 和実、市原 英明、佐々木皓平、岩佐卓哉、小島理恵、川部雅章、古水雄志、松本 陽子、松下 琢、薬剤耐性克服薬のヒト肝がん細胞に関する in vivo 効果予測のための三次元培養を用いた in vitro アプローチの評価、日本動物実験代替法学会第 31 回大会、2018
- 柄本 和実、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、石田 誠一、松下 琢、三次元培養担体 Cellbed を用いたヒト凍結肝細胞の機能発現および維持培養に関する研究、日本動物実験代替法学会第 31 回大会、2018
- 陳野 莉子、稲村 恒亮、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢、ハイブリッドリポソームによる腫瘍原性肝幹細胞の選択的排除、日本動物実験代替法学会第 31 回大会、2018
- 古水 雄志、市原 英明、佐々木 皓平、松本 陽子、松下 琢、三次元培養担体を用いた in vitro における薬剤耐性克服現象の再現と in vivo との相関性検証、第 77 回日本癌学会学術総会、2018
- Y. Komizu, K. Inamura, S. Ishida, Y. Matsumoto, T. Matsushita, Hybrid nanoparticles inhibited the growth of liver cancer stem cells, 5th TERMIS World Congress 2018, 2018
- 稲村 恒亮、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢、ハイブリッドリポソームを用いた腫瘍原性幹細胞の選択的排除に関する研究、第 17 回日本再生医療学会総会、2018
- 古水 雄志、稲村 恒亮、柄本 和実、水民 敬浩、市原 英明、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、渡邊 理恵、川部 雅章、松本 陽子、松下 琢、三次元培養担体を用いた in vitro における薬剤耐性克服現象の再現と in vivo との相関性検証、シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来、2018
- 古水 雄志、ハイブリッドリポソームのヒト肝臓がん幹細胞に対する増殖抑制効果、CBI 学会 2017 年大会、2017
- T. Matsushita, T. Mizutami, H. Nagasaki, T. Ishii, Y. Komizu, T. Iwasa, M. Kawabe, S. Ishida, Maintenance of viability and functional expression of cryopreserved human hepatocytes using silicate fiber-based three-dimensional scaffold, The 10th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 2017
- 稲村 恒亮、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢、ハイブリッドリポソームを用いた腫瘍原性幹細胞の選択的排除に関する研究、第 16 回日本再生医療学会総会、2017

古水 雄志、中村 茉耶、大田 裕也、水民 敬浩、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、渡邊 理恵、川部 雅章、松下 琢、三次元培養担体 Cellbed を用いた肝臓がん細胞の薬剤耐性現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用、シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来、2017

K. Inamura, Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, T. Matsushita, Selective elimination of tumorigenic hepatic stem cells using hybrid liposomes, 17th International Biotechnology Symposium (IBS) 2016、2016

T. Mizutami, Y. Ohta, Y. Komizu, T. Matsushita, Screening of the drugs to overcome drug resistance of human hepatoma HepG2 cells by using three-dimensional culture、17<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium (IBS) 2016、2016

〔その他〕

ホームページ等

研究業績 (<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=yfdbyyosgys>)

## 6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名： 松下 琢

ローマ字氏名：(MATSUSHITA, taku)