

令和元年6月14日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17003

研究課題名(和文)肝芽腫組織からの幹細胞様細胞の単離と分化誘導モデルの作成

研究課題名(英文) Isolation of stem-cell-like cells and establishment of differentiation-inducing model from hepatoblastoma

研究代表者

磯野 香織 (Kaori, Isono)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10756258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2例の肝芽腫組織サンプル、及び樹立肝芽腫細胞HepG2を用いて、非接着性のsphere形成細胞を分離し、約1年に渡る継続培養に成功した。また、sphere細胞と分化誘導後の性質の違いが、腫瘍細胞のどのような分化状態の変化に起因するかを検討した結果、sphere細胞への血清刺激による分化誘導にて、collagen IVコーティングプレートへの顕著な接着性、単層で増殖性の形態変化、及び肝細胞マーカーが発現誘導されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫組織サンプルからがん幹細胞様非接着性sphere形成細胞を分離し、長期培養に成功した報告はこれまでなく、学術的意義の高いものである。また、肝芽腫がん幹細胞に特徴的な分子プロファイリングが今後さらに進み、特異的な治療標的を明らかにできれば、治療薬や治療法の開発に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in isolation of non-adherent sphere-forming cell subpopulations and prolonged culture for about one year using patient-derived hepatoblastoma tissue and established hepatoblastoma cell line HepG2. We investigated whether the difference of sphere-forming cells subpopulations with cancer stem cell like properties and differentiation-inducing cells by serum stimulation is attributed to the variation of differentional state, therefore adhesion to collagen coated plate, single layer proliferation, and hepatocyte molecular marker were induced.

研究分野：小児外科

キーワード：肝芽腫 がん幹細胞 Sphere形成能 分化誘導モデル 動物移植モデル 分子発現プロファイリング

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

1. 研究開始当初の背景

肝芽腫は小児特有の肝悪性腫瘍であり、4歳未満の小児における肝悪性腫瘍では約90%と大部分を占める。病因として、 β -catenin/ Wnt シグナルの異常が関与していることが明らかとなっている。また、低出生体重児に有意に多く発生することが知られている。病期分類としては、治療前の腫瘍進展度による PRETEXT (Pre-treatment Extent of Disease) 分類が用いられている(表)。組織型については、腫瘍細胞の分化度によりその予後は大きく異なり、ほとんどの細胞が高度に分化した純胎児型(pure fetal type)では予後良好であるが、分化度の低い未分化小細胞型は、極めて予後不良である。治療においては、完全摘出率と生存率の相関が報告されており、治療の根幹は外科的完全切除である。肝芽腫の治療成績は集学的な治療により向上し、遠隔転移や肝外浸潤のない PRETEXT I - III において、5年生存率は約90%と良好である。しかし、遠隔転移のない PRETEXT IV で60%前後、遠隔転移のある PRETEXT IV では40%と、切除不能な肝芽腫の予後は未だ不良である。

がん幹細胞は、2006年の American Association for Cancer Research において、「腫瘍内に存在し、自己複製能と腫瘍組織を構成する様々な系統のがん細胞を産生する能力を併せもつ細胞」と定義され、近年、数々の悪性腫瘍でその存在が報告されている。がん幹細胞の特性としては、高い造腫瘍能、高い薬剤耐性能、sphere 形成能などが知られており、がんの難治化、転移、再発の原因と考えられ、治療標的として注目されている。これまで、肝芽腫においてもがん幹細胞の存在が報告されている。

2. 研究の目的

肝芽腫におけるがん幹細胞の存在と性状を明らかにし、治療標的となる分子群を同定することを目的とした。すなわち、(1) 手術時に採取した肝芽腫組織サンプルから、幹細胞性 sphere 形成能を有する細胞群を単離、クローン化を検討する。(2) 単離した sphere 形成細胞において、無血清培地から分化刺激因子を含む培地に培養環境を変更することで、分化誘導を行うことができる細胞モデルシステムを構築する。(3) 分化誘導時に、細胞形態の経時的変化を観察、種々の分子マーカーの発現様式の変動解析を行い、肝芽腫がん幹細胞に特異的な性状の解明、治療標的となる分子群の同定を目指す。

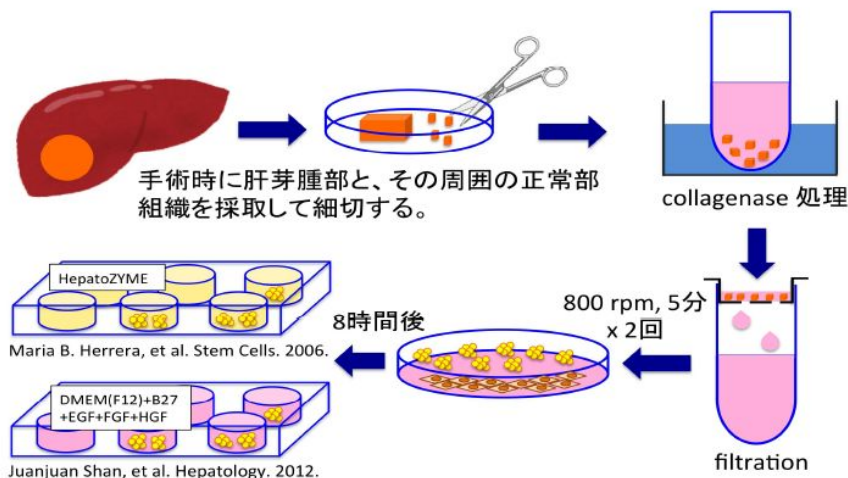
3. 研究の方法

(1) 幹細胞性 sphere 形成能を有する細胞群の単離

手術時に摘出した組織サンプルのうち、肝芽腫部とその周囲の正常部の組織を細切し、コラゲナーゼ処理後に70 μ mのセルストレーナーでフィルトレーションした濾液を播種して、8時間後に浮遊細胞を回収して再度播種し、幹細胞性 sphere 形成能を有する細胞群の単離を行った。

また、幹細胞に最適化した無血清培地を用いた長期継続培養を試みた。過去の報告(Herrera et al. Stem Cells 2006、Shan et al. Hepatology 2012)を参考にし、DMEM/F12に2% B27, 2mM glutamine, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL FGFを添加した培地を用いて4-5日に1回程度の継代を繰り返した。なお、細胞分散は1% Trypsin、accumaxを使用した。さらに、樹立肝芽腫細胞株であるHepG2とHuH6においても、上記同様の方法を用いて sphere 形成および長期継続培養を試みた。

(肝芽腫組織からの sphere 細胞の分離)



(2) 分化誘導モデルの作成と解析

幹細胞に最適化した無血清培地から分化刺激因子(血清や、HGF などの各種 growth factor)を含む培地や、細胞外マトリックスをコーティングしたプレート上など、培養環境を変更することで、分化誘導を行うことができる細胞モデルシステムを構築し、その際の細胞形態の経時的变化の観察、および免疫染色や Western Blotting により、種々の分子マーカーの発現様式の変動を解析した。

(3) 分子発現プロファイリングの作成

樹立肝芽腫細胞 HepG2 と HepG2 由来の sphere 細胞の性質の違いを、Western Blotting や免疫染色によるマーカーの発現を通して解析した。

- ・肝細胞マーカー (HNF4 等)
- ・肝前駆細胞マーカー (CK19 等)
- ・肝/癌/幹細胞マーカー分子群 (CD44, Oct3/4, EpCAM, SOX2 等)

(4) 動物移植モデルの検討

肝芽腫組織サンプルから分離した sphere 細胞を用いる前に、HepG2 と、HepG2 由来の幹細胞性 sphere 細胞で条件検討を行った。生後 6 週相当の雌 BALB/c ノドマウス同一個体の左右前肢付け根付近に、HepG2 と HepG2 由来 sphere 細胞をそれぞれ皮下注射し、その造腫瘍能を比較することで、sphere 細胞のがん幹細胞としての可能性を検証した。なお、細胞数は 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 個とし、各群 3 匹ずつとした。

さらに、組織学的評価として、HNF4 や AFP などの肝細胞マーカーを指標に形成された皮下腫瘍の起源を明らかにするとともに、EpCAM、CD133、CD44 などのがん幹細胞マーカーを指標に、がん幹細胞に裏付けされた造腫瘍能の評価を行う。

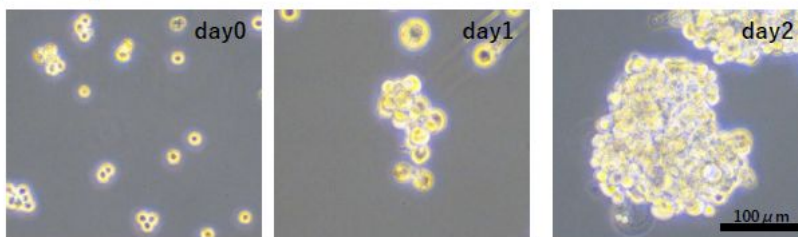
4. 研究成果

(1) 幹細胞性 sphere 形成能を有する細胞群の単離

2 例の肝芽腫組織サンプルを、肝芽腫部とその周囲の正常部の組織から採取し、幹細胞様細胞の分離法および長期培養条件の検討を行っている。既に、幹細胞に最適化した無血清培地を用いて、肝芽腫部から 3 種類、正常部から 2 種類の高接着性の sphere 形成細胞を分離し、約 5 ヶ月から 1 年に渡る継続培養に成功しているが、今後も適宜症例数を増やし、クローン化を検討していく。

また、樹立肝芽腫細胞 HepG2 および HuH6 のうち、HepG2 に関しては、DMEM/F12 に 2% B27, 2mM glutamine, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL FGF を添加した培地を利用し、sphere 形成細胞の作製に成功し、さらに約 1 年にわたる長期継続継代に成功した。HuH6 に関しては、sphere 形成細胞の作製には成功したが、3 回程度の継代にとどまっており、長期にわたる継続継代にはまだ成功していない。

HepG2 sphere formation



(2) 分化誘導モデルの作成と解析

分離した sphere 形成細胞の一部には、分化刺激因子によって collagen IV コーティングプレートに顕著な接着性が誘導され、その周囲には多様な形態を示す細胞群の単層性の増殖を認めた。これらの増殖した細胞群は免疫染色で HNF4 陽性であり、肝芽腫由来の細胞であることを確認した。又、Western Blotting によって、分化刺激後の sphere 形成細胞群は、HNF4、AFP などの肝細胞マーカーの発現が上昇することが確認され、未分化な状態から、肝細胞系譜への分化誘導が起こっている可能性が考えられた。

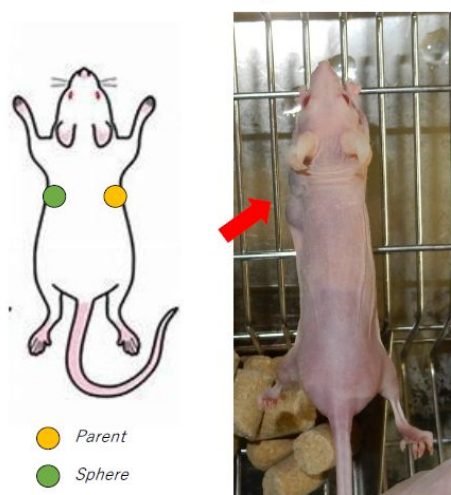
(3) 分子発現プロファイリングの作成

Sphere 形成細胞の分子発現プロファイルに関しては、成人肝細胞癌におけるがん幹細胞マーカーとして報告 (Yamashita et al. Hepatology 2013) されている EpCAM が強陽性となったこと

が特徴的な所見であった。また、その他のがん幹細胞マーカーである SOX2 や Oct3/4 も弱陽性であることが確認された。一方、CD44 などのがん幹細胞マーカーは陰性であった。さらに上記の如く、分化誘導に伴う上記分子マーカーの発現様式の変動を認めた。

(4) 動物移植モデルの検討

皮下注後 2 カ月において、sphere 細胞群においては、 5×10^5 個のグループでは 3 匹/3 匹、 2×10^5 個のグループでは 1 匹/3 匹の割合で腫瘍形成を認めたのに対し、parent 細胞群ではどの細胞数のグループにおいても腫瘍形成を認めず、造腫瘍能が sphere 細胞において高まっている可能性が示唆された。今後、形成された皮下腫瘍の組織学的評価を予定している。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Isono K, Ohya Y, Lee KJ, Hashimoto S, Kadohisa M, Sakisaka M, Uto K, Hayashida S, Yamamoto H, Yamamoto H, Sugawara Y, Inomata Y.

Pretransplant trends in α -ftoprotein levels as a predictor after living donor liver transplantation for unresectable hepatoblastoma: A single-institution experience

Pediatr Transplant. Aug;22(5):e-13221.(2018)

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

門久政司 (Kadohisa Masashi, 熊本大学大学院 医学教育部 博士課程 3 年)

荒木令江 (Araki Norie, 熊本大学大学院 医学教育部・医学部腫瘍医学分野 准教授)

日比泰造 (Hibi Taizo, 熊本大学大学院生命科学研究部 小児外科学・移植外科学分野 教授)