

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790466

研究課題名（和文） 肝細胞癌における Cancer stem cell と抗癌剤耐性

研究課題名（英文） Liver Cancer stem cells and chemotherapeutic resistance

研究代表者 小暮 高之 (Kogure Takayuki)

東北大学・病院・医員

研究者番号：70400330

## 研究成果の概要：

細胞表面に存在する ABCG2 と呼ばれる分子をマーカーとして用いることにより、肝細胞癌においてその一部に高い腫瘍形成能をもつ細胞が存在することが明らかになった。この細胞は、他の細胞と比べて抗癌剤に耐性を示し、遺伝子発現パターンも異なることが明らかになった。肝細胞癌の抗癌剤治療における耐性出現のメカニズムの解明や抗癌剤耐性を克服し得る新しい治療法の開発につながる成果が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝細胞癌、癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における肝癌の死亡者数は年間3万人を超える。高度進行肝癌の治療オプションは化学療法のみであり、近年、肝動注リザーバーを用いた化学療法が一定の効果を挙げているが満足のものではない。

(2) 腫瘍の発生には、多段階発癌説がこれまで長く支持されてきたが、近年、幹細胞が腫瘍を産

生するとの考えが提唱されている。一方で、クローナルな細胞集団と考えられていた腫瘍にも、正常組織における幹細胞のように、非常に高い増殖能を有し、asymmetric に分裂する一群が存在することが、種々の癌種で報告された。これらは、cancer stem cell と呼ばれ、腫瘍を形成する細胞集団のヒエラルキーの上位に位置し、自己複製能と分化能を持つと考えられている。

(3) ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2)は、ヒト乳癌細胞株より同定された ABC transporter の一つであり、乳癌の抗癌剤感受性と関連することが報告された。我々は、肝細胞癌に ABCG2 を発現する cancer stem cell が存在し、化学療法耐性の主要な役割を担うと仮説し、抗癌剤耐性を克服するためには、cancer stem cell をターゲットとした治療が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト肝癌細胞株において、ABCG2 を発現し、cancer stem cell として振舞う細胞群が存在し、これらが他の細胞群と比較して、抗癌剤耐性であることを明らかにすることをお目的とした。また、cancer stem cell の遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにし、治療ターゲットとなり得る分子を検索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)肝癌におけるABCG2発現の検討

①肝細胞癌患者の切除標本にて、ABCG2陽性細胞の頻度とその分布を免疫染色にて検討した。  
②ヒト肝癌細胞株 (Huh7, HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5, Li-7) におけるABCG2の発現を蛍光免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。フローサイトメトリーを用いてABCG2陽性細胞の頻度を検討した。

(2) 高速セルソーターを用いて、ヒト肝癌細胞株のABCG2陽性細胞を分離し、経時的に陽性細胞の頻度の変化を検討した。

### (3) ABCG2陽性細胞における細胞増殖能、遊走能の検討

分離したABCG2発現細胞を用いて、増殖能 (MTS assay)、遊走能 (Boyden chamberを用いた migration assay) を検討した。

### (4) ABCG2陽性細胞の抗癌剤感受性の検討

分離したABCG2陽性細胞を用いて、細胞増殖

に対するdoxorubicin, cisplatinの影響を検討した。

### (5) 腫瘍形成能の検討

免疫不全マウス皮下移植モデルを用いて ABCG2陽性細胞の腫瘍形成能を検討した。

### (6) ABCG2陽性細胞の遺伝子プロファイルの検討

分離した ABCG2 陽性細胞より mRNA を抽出し、ABCG2 陰性細胞をコントロールとして発現プロファイルを検討した。

## 4. 研究成果

### (1)肝癌組織、細胞株におけるABCG2発現

ヒト肝癌組織の高分化型、中分化型、低分化型肝癌すべてにおいて、一部の細胞に ABCG2 陽性細胞を認めた。陽性細胞の頻度は、分化度の低下に伴い低下し、染色性は高分化で淡く染まり、分化度が低下するにつれ、染色性が濃くなる傾向を呈した。背景肝では胆管に発現を認めた (図 1)。肝癌細胞株の蛍光免疫染色では、細胞膜に ABCG2 を発現する細胞がごく一部に認められ、Immunoblot でもその発現が確認された (図 2)。フローサイトメトリーの検討で、ABCG2 陽性細胞の頻度は 0.7%から 6.8%であった (図 3)。

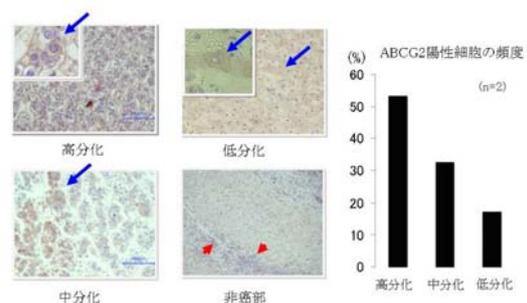


図1 ヒト肝細胞癌組織におけるABCG2の発現

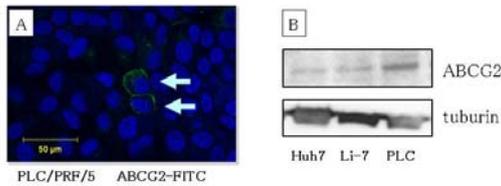


図2 肝癌細胞株におけるABCG2の発現

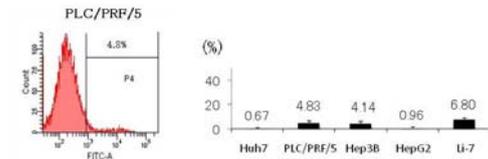


図3 各種肝癌細胞株におけるABCG2陽性細胞の頻度

(2) ABCG2 陽性画分の経時的変化

セルソーターで分離した直後の濃縮された ABCG2 陽性細胞画分を約 2 週間培養すると、ABCG2 陽性細胞の頻度は、約数%程度と分離濃縮前と同程度の頻度に復した(図 4)。

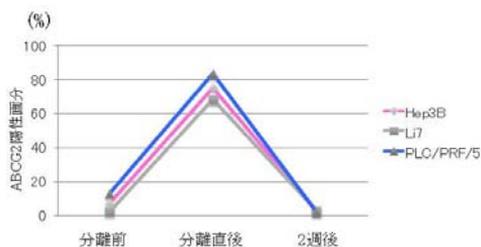


図4 肝癌細胞株におけるABCG2陽性細胞の経時的変化

(3) ABCG2陽性細胞における増殖能、遊走能

分離した陽性細胞の増殖を約 2 週間の培養し、経時的に計測したところ、4 種の細胞株(Huh7, Li7, PLC/PRF/5, Hep3B)の検討では、ABCG2 陰性画分と比較して有意な増殖の差を認めなかった(図 5A)。8  $\mu$  M pore インサートの migration chamber を用いた遊走能の検討では、ABCG2 陽性画分が高い遊走能を示した(図 5B)。

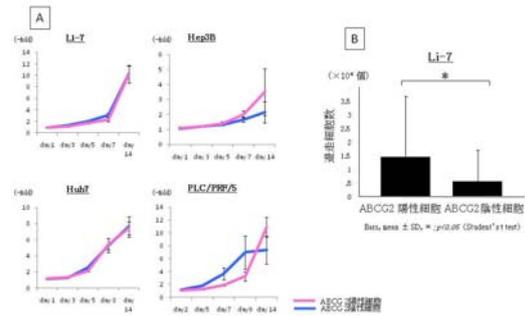


図5 各種肝癌細胞株におけるABCG2陽性細胞の増殖能(A)、遊走能(B)

(4) ABCG2 陽性細胞の抗癌剤感受性

ABCG2 陽性細胞は、陰性細胞に比べて doxorubicin, cisplatin に抵抗性を示した(図 6)。

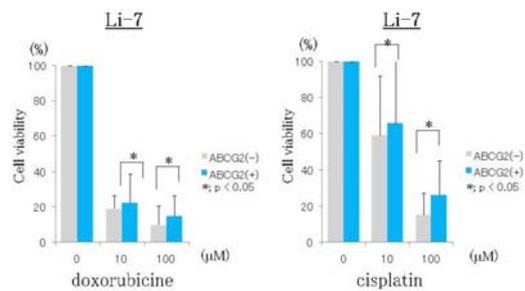


図6 ABCG2陽性細胞の抗癌剤感受性

(5) 腫瘍形成能

PLC/PRF/5 を分離し免疫不全マウスに皮下接種後5週間観察し、腫瘍形成の有無を検討したところ、ABCG2 陽性画分では、 $1 \times 10^3$  から  $1 \times 10^5$  まで、腫瘍の形成を認めた。陰性画分では5週の時点では腫瘍形成認めなかった(表 1、図 7)。



図7 ABCG2陽性細胞の腫瘍形成能

表1 ABCG2陽性細胞の腫瘍形成能

PLC/PRF/5 接種細胞数(個)	腫瘍形成(個)	
	ABCG2 陰性	ABCG2 陽性
$1 \times 10^5$	0/3	3/3
$1 \times 10^4$	0/3	1/3
$1 \times 10^3$	0/1	1/1

免疫不全マウスにABCG2陽性細胞を皮下接種後、5週観察し、腫瘍形成を検討した。

(6) ABCG2 陽性細胞の遺伝子プロファイル

cDNA micro array (GeneChip, Affymetrix 社)を用いて ABCG2 陽性細胞の mRNA 発現を網羅的に検討したところ、図 8 の如く、陰性細胞に比

