

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20599005

研究課題名（和文） 肝発生分化メカニズムに基づいた肝癌幹細胞特異的治療法の開発

研究課題名（英文） Differentiation of liver cancer stem cells

研究代表者

山下 太郎 (YAMASHITA TARO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：90377432

研究成果の概要（和文）：

近年肝癌組織においても幹細胞様の性格を有する肝癌幹細胞の存在が明らかになり、癌治療の重要なターゲットと考えられている。本研究では、正常胎児肝において肝芽細胞を肝細胞へと分化誘導するサイトカインとして知られる Oncostatin M(OSM)が肝がん幹細胞の分化誘導に応用可能であることを同定した。OSMは肝癌幹細胞の抗癌剤抵抗性を改善することから、癌治療における有力な標的分子であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Recent evidence suggests that tumor cells possess stem cell features (cancer stem cells) to self-renew and give rise to relatively differentiated cells through asymmetric division, thereby forming heterogeneous populations. Cancer stem cells are considered to be resistant to chemotherapy and radiotherapy, which might be associated with the recurrence of the tumor after treatment. Oncostatin M (OSM) is a pleiotropic cytokine known to activate the hepatocytic differentiation program in hepatoblasts in an OSMR-specific manner. We identified that OSMR is expressed in a subset of liver cancer stem cells and OSM induces hepatocytic differentiation of these cells. OSM-mediated hepatocytic differentiation effectively suppressed HCC growth when combined with conventional chemotherapy, suggesting the utility of OSM for the treatment of liver cancer stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	0	1,800,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：腫瘍学

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：癌、発生・分化、幹細胞、マイクロレイ、発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

近年、一部の血液癌や固形癌において幹細胞様の特徴を示す癌幹細胞の存在が明らかになり、癌の転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっている可能性が示唆されている。我々や他のグループは肝幹細胞マーカー

を用いた肝細胞癌診断システムを開発、予後予測やWntシグナル阻害剤に対する薬物応答予測が可能であることを見出した。更に我々は肝幹細胞様肝細胞癌において正常幹細胞同様に自己複製能力と非対称性分裂能力を持ち、NOD/SCIDマウスで高い腫瘍造成能をもつ癌幹細胞分画の分離精製に成功、Wntシグ

ナルが自己複製や非対称制分裂の制御を行っていることを同定した。この知見は、発生分化に関わる重要なシグナルが正常細胞と同様に癌幹細胞においても保持されている可能性を示唆している。一方、どの分化誘導シグナルがどの程度癌幹細胞で保存されているのかは不明な点が多い。Oncostatin M (OSM) は IL-6 ファミリーに属するサイトカインの一つであり、胎児肝において hepatoblast を OSM receptor (OSMR) 依存的に hepatocyte へ分化することが知られている。一方、OSM が肝細胞癌に与える影響については不明であった。以上の知見から、我々は癌幹細胞特異的な治療法の開発を目指し、肝細胞系への分化誘導を行うサイトカインである OSM が肝癌幹細胞特異的に分化誘導を行うのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

肝細胞癌は世界第3の癌死亡原因であり、我が国における代表的な難治癌の一つである。肝細胞癌の難治性要因の一つに根治的治療後の高い再発率があり、近年その再発の主な原因の一つに薬剤耐性、転移能力を有する肝癌幹細胞の存在が示唆されている。本研究では、hepatoblast を hepatocyte へ分化誘導させるサイトカインの一つ、OSM が肝癌幹細胞の薬剤抵抗性を改善するかについて検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

サンプル 臨床サンプルとして、金沢大学附属病院で1999年から2007年にかけて肝切除が行われた107例の肝細胞がんおよび背景肝組織を解析に用いた。培養細胞はHuH7、HuH1細胞を用い、DMEM-10%FBS培地で培養した。また、1例のAFP陽性肝細胞がんの新鮮外科切除標本からEpCAM陽性細胞分画を分離し、免疫不全マウスへの移植実験に用いた。

免疫組織化学 ホルマリン固定標本を用いてOSMレセプター(OSMR)とEpCAMの発現を免疫組織化学で評価した。クエン酸バッファーを用いて抗原賦活を行った後に、EnVision+キット(DAKO)、抗OSMR抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗EpCAM抗体VU1D9(Merck Chemicals)で免疫染色を施行した。また、Vector-red, Vector blue (Vector Laboratory Inc.)を用いて2重染色を行った。

蛍光免疫染色 各1次抗体で適宜インキュベーション後にAlexa488またはAlexa568標識2次抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡(Keyence)で評価した。

フローサイトメーター 培養細胞および初代肝細胞がん細胞から単一細胞浮遊液を作成後、抗EpCAM抗体(Ber-EP4, DAKO)、抗アルブミン抗体(Cell Signaling Technology)、抗CK19抗体(DAKO)、抗AFP抗体(Nichirei Biosciences)およびCytofix/Cytopermキット(BD Biosciences)、FACSCaliburで解析を行った。

リアルタイムPCR 各サンプルからのTotal RNAはTrizol(Invitrogen)を用いて回収し、ABI 7900 Sequence Detection Systemを用いて解析を行った。

RNA干渉 OSMR特異的なsiRNAはAmbionから購入、Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いて細胞内への導入を行った。

アポトーシスアッセイ Annexin Vの細胞膜への結合はAnnexin V-FITC抗体(BD Biosciences)及びFACSCalibur(BD Biosciences)フローサイトメーターを用いて評価した。活性化Caspase3は抗体(Promega)を用いて免疫組織化学および蛍光免疫染色で評価した。

動物モデル 6週齢オスのNOD/SCIDマウスをCharles Riverから購入、移植モデルに使用した。腫瘍細胞はPBSに懸濁後にマトリゲルと1:1で混和し、マウスの背部皮下に移植した。合成OSM(2 µg)、5-FU(250 µg)、PBSは50 µlの溶液にして腫瘍部に直接注射した。

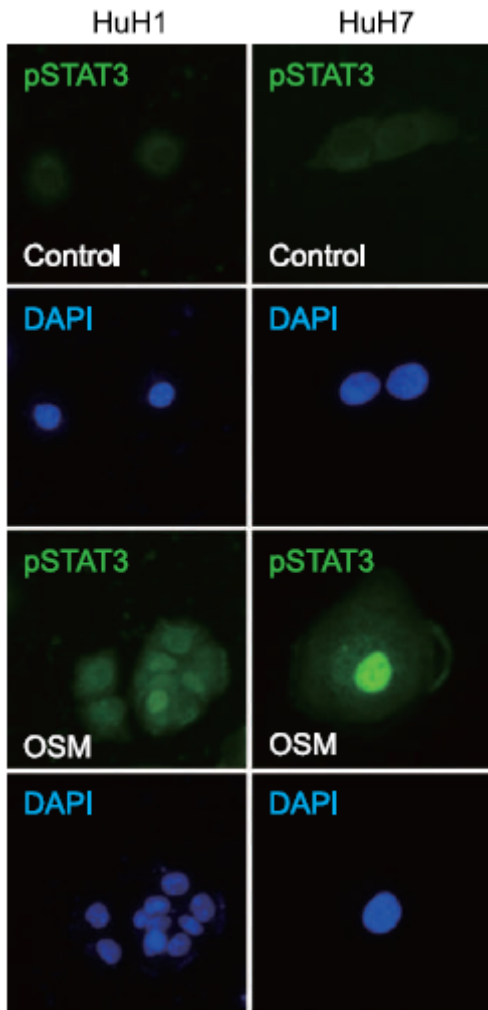
## 4. 研究成果

慢性肝炎、肝硬変および肝細胞がん組織におけるOSMRの発現について免疫組織化学を用いて解析を行ったところ、OSMR陽性細胞は慢性肝炎組織ではほとんど認められないが肝硬変組織では門脈周囲の小肝細胞様細胞に発現が認められた。また、一部の肝細胞がんでは非がん部に比し強い発現が認められ、特に間質への浸潤傾向の強い細胞で強い発現が認められた。EpCAMとOSMRの発現には統計的に有意な正の相関が認められ( $P = 0.024$ )、かつOSMR陽性肝細胞がんは統計的に有意に血清AFPの上昇( $P = 0.009$ )と組織学的な未分化性( $P < 0.0001$ )と相関した。また、有意差は認めないものの、OSMR陽性肝細胞がんは若年発症( $P = 0.052$ )と男性に多い傾向( $P = 0.058$ )が認められた。

次いで、OSMR陽性AFP陽性EpCAM陽性肝がん培養細胞株であるHuH1、HuH7に対しOSMを投与したところ、OSMRの下流のシグナル伝達因子であるSTAT3のリン酸化(図1A)とEpCAM陽性細胞の減少(図1B)、肝幹細胞マーカーの遺伝子蛋白発現低下と肝細胞分化マーカーの遺伝子蛋白発現増加が認められ

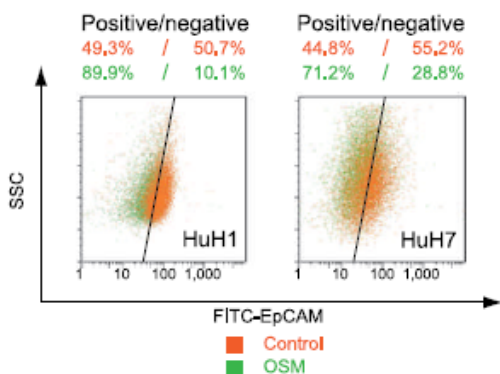
た。

図 1 A リン酸化 STAT3 の蛍光免疫染色



(Yamashita T 他 Cancer Research 2010 より引用)

図 1B OSM 投与後の EpCAM 陽性細胞数の変化 (FACS 解析)

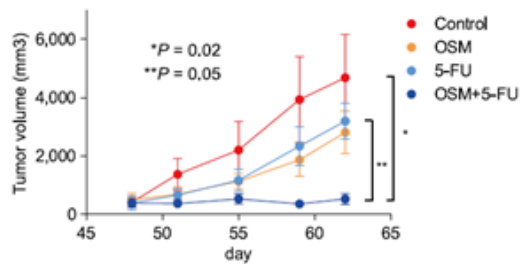


(Yamashita T 他 Cancer Research 2010 より引用)

OSM が EpCAM 陽性肝細胞がんの増殖に与える

影響をコロニー形成や Ki-67 染色で検討を行ったところ、OSM 処理によりコロニーサイズや S 期の細胞数の増加が認められた。すなわち、OSM は細胞周期が比較的遅いがん幹細胞を dormant な状態から活性化させる一方、OSM 単独では抗腫瘍効果が限られている可能性が示唆された。そこで、OSM を殺細胞性抗がん剤の一つである 5-FU と組み合わせ、抗腫瘍効果について免疫不全マウスへの皮下移植モデルで検討したところ、OSM や 5-FU の単独投与に比べ、OSM と 5-FU を同時投与した場合に最も強い抗腫瘍効果が認められた (図 2)。

図 2 NOD/SCID マウス皮下移植モデルにおける OSM と 5-FU 併用療法の抗腫瘍効果



以上の結果から、OSMR は幹細胞タイプの肝細胞がんにおける EpCAM 陽性がん幹細胞で強発現が認められ、OSM シグナル伝達系を介して肝細胞系への分化誘導と 5-FU に対する感受性を亢進させ、がん幹細胞における抗がん剤抵抗性を克服する新規治療法の発展につながると思われた。OSM は肺線維症などの病態への関与も報告されており、今後は OSM の生体への安全性などについても評価を行い、臨床への応用が可能かについて今後明らかにしたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yamashita T et al, Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. Cancer Research, 70(2010), 4687-97. 査読有り
- ② Yamashita T et al, EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Gastroenterology, 136(2009), 1012-24.

査読有り

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Signaling pathways responsible for self-renewal and differentiation in liver cancer stem cells. Japanese Cancer Association 69<sup>th</sup> Annual Meeting 2010.9.23. Osaka International Convention Center (Japan)
- ② Yamashita T, Honda M, Nio K, and Kaneko S. Oncostatin M renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. American Association for Cancer Research 101<sup>st</sup> Annual Meeting. 2010.4.21. Walter E. Washington Convention Center (USA)

〔図書〕（計 1 件）

- ① Yamashita T et al. Chapter 16. Heterogeneity of Liver Cancer Stem Cells. In: Molecular Genetics of Liver Neoplasia. Springer New York 2010, 301-317.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m-kanazawa.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 太郎 (YAMASHITA TARO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：90377432