

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890179  
 研究課題名（和文） 小型肝細胞と癌幹細胞における遺伝子発現の比較検討とがん形成能を担う遺伝子の探索  
 研究課題名（英文） Gene expression analysis in small hepatocytes and cancer stem cells for searching cancer related genes.

## 研究代表者

大栄 秀和 (OOE HIDEKAZU)  
 札幌医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90452979

## 研究成果の概要（和文）：

ラット肝癌細胞株7系統における癌幹細胞マーカー遺伝子 CD24, CD34, CD44, CD133 などの発現を検討した。共通して発現していた CD44 は、肝細胞の前駆細胞である小型肝細胞に特異的に発現しているが、腫瘍形成能は無い。遺伝子発現制御機序を検討するためにレンチウイルス感染による小型肝細胞への遺伝子導入法を確立した。Follistatin 遺伝子の発現を抑制すると、小型肝細胞の増殖が阻害された。

## 研究成果の概要（英文）：

Expression of hepatic stem cell markers such as CD24, CD34, CD44, CD133, was examined in 7 cell lines derived from rat hepatocellular carcinomas. Although CD44 was commonly expressed in all the cell lines, it is also expressed in hepatic progenitor cells, small hepatocytes (SHs), which possess no ability to form tumors. To investigate the regulatory mechanism of the gene expression, the method of gene transduction to rat SHs by lentivirus infection was established. Knockdown of Follistatin in SHs by shRNA resulted in the growth inhibition.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：分子病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：再生医学・癌・癌幹細胞・肝再生・小型肝細胞

## 1. 研究開始当初の背景

小型肝細胞は、私が所属する研究室の三高が成熟ラット肝細胞中に見出した細胞で、増殖能力の高い一群の肝前駆細胞である。小型肝細胞は肝細胞としての機能がある程度持つ

ており、肝非実質細胞と共培養することにより成熟化し、類肝組織を形成することができる(Mitaka et al, Hepatology, 1999)。組織化した小型肝細胞は、肝特異的転写因子である HNF3, 4, 6 や C/EBPα を発現し、成熟肝細胞

に近い分化機能を有するようになる。また、基底膜成分を含む Matrigel で処理することによっても成熟化を誘導することができる (Sugimoto et al, J Cell Biochem, 2002)。加えて重要な薬物代謝酵素である Cytochrome P450 についても、その発現や活性、薬剤投与による誘導が確認されており、長期間にわたる培養後でも酵素活性を有していることがわかっている (Miyamoto et al, J Gastroenterol Hepatol, 2005)。また、培養小型肝細胞のコロニーを採取し、長期間凍結保存することが可能であり (Ikeda et al, J Hepatol, 2002)、1 年以上凍結保存しても小型肝細胞は増殖能力を失わず、CYP 活性も保持している (Ooe et al, Drug Metab Dispos, 2006)。さらに重要なことは、ラットだけではなくヒト肝臓中にも小型肝細胞が存在し、ラットと同様に増殖し、コロニーを形成することである (Sasaki et al, Cell Transplant, 2008)。多くの肝細胞特異的遺伝子や薬物代謝酵素遺伝子を発現していることを確認している。従って、これらの特徴を有する小型肝細胞は、薬物代謝研究の *in vitro* 実験系に用いる細胞として非常に有用であると考えられる。

これまで DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、小型肝細胞特異的遺伝子が同定されているが、それらのなかには CD44, CD24, CD133 といった癌幹細胞のマーカーとしてよく知られている遺伝子が含まれていた。癌幹細胞は、腫瘍組織を形成する細胞のうち、自己複製能と多分化能を示し、多数のがん細胞を作り出す特定の細胞群である。1997 年に白血病細胞中に含まれる CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞が癌幹細胞であることが証明され、その後も固形がんである乳がん (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>ESA<sup>+</sup>; Al-Hajj et al, PNAS, 2003) や脳腫瘍 (CD133<sup>+</sup>; Singh et al, Cancer Res, 2003) などにおいても報告されている。癌幹細胞はごく少数の細胞からでもがん組織を形成できるため、がん治療のターゲットとして近年研究が盛んに行われている。癌幹細胞は、正常組織中に存在する幹細胞 (前駆細胞) に遺伝子変異が蓄積し形質転換することでできると考えられているが、その証明は充分になされていない。また、がん組織において癌幹細胞が幹細胞的に振舞うのかどうか充分には分かっていない。

小型肝細胞は正常肝組織中に存在し、高い増殖能力と肝分化能を有する細胞である。CD44, CD133 といった癌幹細胞に特徴的なマーカー遺伝子を発現しているが、小型肝細胞は癌幹細胞とは異なる性質を示す。例えば、小型肝細胞は *in vitro* で高い増殖能を示すが、

不死化することはない。また、小型肝細胞は肝障害モデルラットの肝臓中に出現するが、肝障害から回復すると肝臓中から消失するし、小型肝細胞を別のラットに移植しても、癌幹細胞のような腫瘍形成はみられない。このことから、小型肝細胞と癌幹細胞の間には何からの違いがあり、それらによってがん形成能の有無が決まっていると考えられる。

私は、正常肝組織に存在する前駆細胞である小型肝細胞と、癌幹細胞の遺伝子発現にいくつかの共通点があることを見出している。本研究はこの知見をもとに、小型肝細胞と癌幹細胞の遺伝子発現における共通点および相違点を詳細に解析することで、小型肝細胞と癌幹細胞の性質の違いの原因を明らかにすることを目的としている。

## 2. 研究の目的

本研究室において、小型肝細胞特異的遺伝子として CD44 が同定されており (Kon J, et al, J Hepatol, 2006)、また DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、CD24, CD133 も高い発現を示すことが分かっている。これらの遺伝子はいくつかのがん組織における癌幹細胞特異的マーカーとして報告されている。しかし、CD24, CD133 が小型肝細胞においてタンパク質レベルで高発現をしているかどうか十分な解析はまだなされていない。また、ESA (Epithelial Specific Antigen) や Sca-1 (Stem cell antigen-1) 等の癌幹細胞マーカーについては、小型肝細胞における発現の有無は知られていない。さらに、癌幹細胞と小型肝細胞の性質の違いの原因となっている因子についても不明である。

本研究では、小型肝細胞と癌幹細胞の遺伝子発現における共通点と相違点を明らかにすることを目的とする。癌幹細胞で高発現すると報告がある遺伝子について、小型肝細胞においてタンパク質レベルでの発現をか明らかにし、その発現機序やシグナル伝達などについて解析する。またわれわれは、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行っている過程で多数の小型肝細胞特異的遺伝子を見出している。本研究においてはこれらの遺伝子について、HepG2 や HLE といった肝癌細胞株での発現を解析する。以上のような実験を行なうことで、小型肝細胞と癌幹細胞の遺伝子発現の比較を行い、その共通点や相違点について検討を行う。さらにその相違点の中から、癌幹細胞のがん形成能に必要となる遺伝子の候補を選び、実際に小型肝細胞に導入することで、小型肝細胞が癌幹細胞としての性質を獲得するかどうか解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞の分離と培養

①小型肝細胞 (Small Hepatocyte; SH) の単離 : 雄 F344 ラット (200~250 g) の肝臓から二段階肝灌流法を用いて細胞を分離した。50xg, 1 分の低速遠心後の上清から小型肝細胞を得た。DMEM に 10% FBS、10 mM nicotinamide、10 ng/ml EGF、1 mM ascorbic acid 2P などを加えた培地にて培養した。

#### ②ラット肝癌細胞株の培養 :

Morris 5123D-TC, RLC-18, RLC-27 は理化学研究所バイオリソースセンターから、dRLh-84, FAA-HTC1, WB-F344 はヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。TM143 は当研究室の三高から供与を受けた。細胞株は FBS を含む培地を用いて、37°C, 5%CO<sub>2</sub>にて培養を行った。

#### (2) 遺伝子発現解析

##### ①RT-PCR :

採取した直後のラット成熟肝細胞、培養 7 日目のラット小型肝細胞、および肝癌細胞株から RNA を抽出し、解析を行った。oligo dT primer を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。cDNA に対し、各遺伝子特異的な primer を用いて PCR 反応を行い、電気泳動によって増幅した DNA 断片を検出した。

##### ②リアルタイム PCR :

RT-PCR と同様のサンプルを用いた。ランダム primer を用いて逆転写反応を行い、各遺伝子に対応する TaqMan Gene Expression assay (Applied Biosystems) を用いて PCR 反応を行い、cDNA 量を測定した。

#### (3) 免疫染色

培養 2 日目のラット成熟肝細胞、培養 7 日目のラット小型肝細胞、および肝癌細胞株を EtOH で固定し、免疫染色を行った。200 倍に希釈した一次抗体に反応させた後に、Alexa488-conjugated anti-mouse IgG (rabbit) または Alexa594-conjugated anti-rabbit IgG (goat) により検出を行った。一次抗体として、anti-CD44 (mouse), anti-CK19 (rabbit), anti-D6.1A (rabbit), anti-CD24 (goat), anti-CD133 (rabbit) を使用した。

#### (4) 遺伝子導入 :

レンチウイルスを用いて遺伝子導入実験を行った。レンチウイルスベクターを 293T cell にトランスフェクションし、培養上清中よりレンチウイルス回収した。HeLa cell を用いた力価測定によりウイルス濃度を測定し、ラット小型肝細胞に 0~50 MOI になるよう加え 7 日間培養を行い、感染効率を測定した。

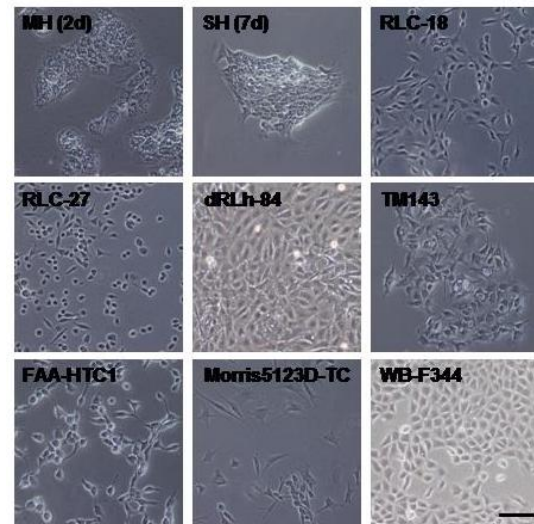
Follistatin 遺伝子のノックダウン実験のためにラット Follistatin に対する shRNA 配列を設計し、ウイルスベクターの H1 プロモーター下流に挿入した。レンチウイルスベクターを 293T cell にトランスフェクションし、培養上清からレンチウイルスを回収した。小型肝細胞の播種後 3 時間にレンチウイルスを 50 MOI の濃度で感染させ、7 日間培養を行った後に解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット肝癌細胞株における癌幹細胞マーカーの発現検討

ラット肝癌細胞株 Morris 5123D-TC, RLC-18, RLC-27, dRLh-84, FAA-HTC1, WB-F344, TM143 の 7 株とラット小型肝細胞及び成熟肝細胞との比較検討を行った。形態学的には、図 1 で示すように、dRLh-84, WB-F344, TM143 は上皮様のコロニー形成をするが、Morris 5123D-TC, RLC-18, RLC-27, FAA-HTC1 は紡錘状又は球状で細胞間の接着の弱い細胞であった。

図 1 ラット肝癌細胞株の位相差顕微鏡写真

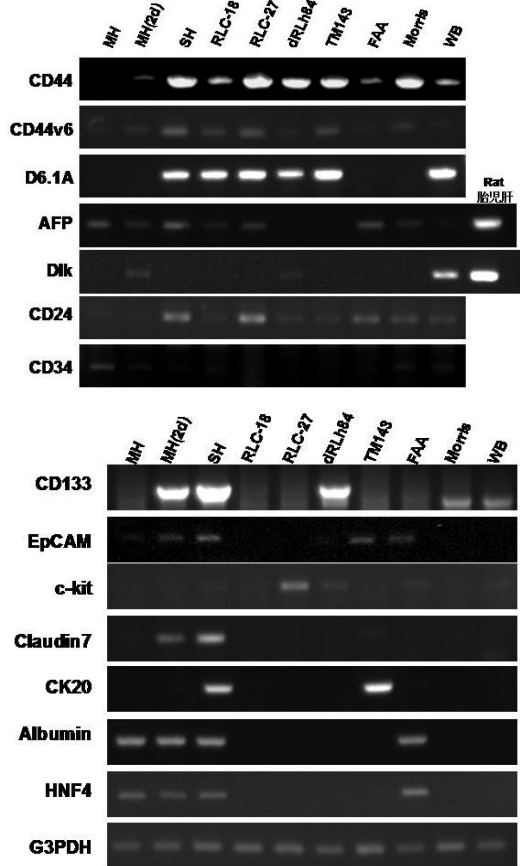


Bar, 100  $\mu$ m

様々な組織の癌幹細胞に特異的に発現していると報告されている遺伝子 (Dlk, CD24, CD34, CD133, EpCAM, c-kit, Claudin7, CK20) 及び小型肝細胞マーカー遺伝子 (CD44s, CD44v6, D6.1A)、肝細胞マーカー遺伝子 (AFP, Albumin, HNF4) の発現を RT-PCR によって解析した (図 2)。肝細胞機能を有する肝細胞株は FAA のみで、RLC-18/27, Morris5123D-TC に AFP の弱い発現がみられた。CD44 は、小型肝細胞及び全ての肝細胞株で発現がみられた。小型肝細胞が成熟化する過程で一

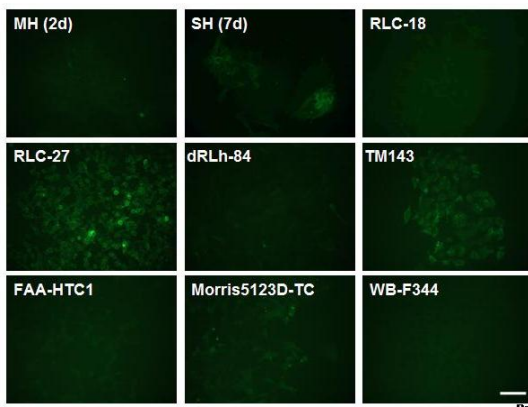
時的に発現がみられるCD44v6はFAA及びWBを除く肝癌細胞株に弱い発現を認めたが、他のマーカー遺伝子の発現は、細胞株により異なり、共通して発現の認められたものは無かった。

図2 ラット肝癌細胞株の遺伝子発現解析 (RT-PCR)



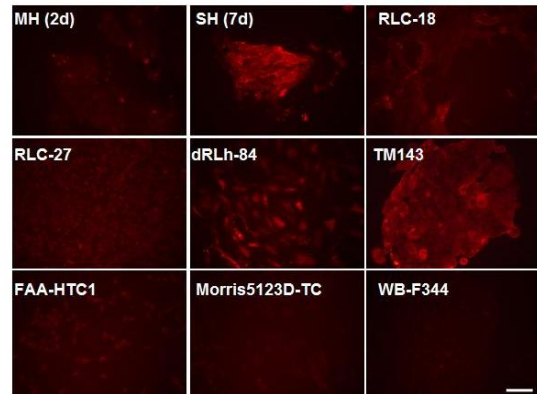
次にタンパク質発現について検討した。図3及び図4は、陽性所見がはっきり認められたCD44, D6.1Aの免疫染色写真である。

図3 ラット肝癌細胞株におけるCD44蛋白質の発現



Bar, 100 μm

図4 ラット肝癌細胞株におけるD6.1A蛋白質の発現



Bar, 100 μm

タンパク質発現は、遺伝子発現とほぼ関連していたが、CD24, CD133のタンパク質発現は全ての細胞で陽性所見がみられなかったことから、抗体の問題の可能性もあることから再検討する予定である。検討した細胞の遺伝子発現と蛋白質発現をまとめたのが表1である。

表1 ラット肝癌細胞株における遺伝子及びタンパク質発現解析まとめ

cell	CD44		D6.1A		CK19		CD24		CD133		EpCAM		Specific Marker
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	
SH	++	+	++	+	+	+	+	+	+	-	+	-	CK20, Claudin7
RLC-18	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
RLC-27	+	+	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-	c-kit
dRLh-84	+	-	+	±	-	-	-	-	+	-	-	-	Thy1
TM143	+	+	++	++	++	++	-	-	-	-	+	-	CK20
FAA-HTC1	±	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	
Morris	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
WB-F344	±	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Dlk

Realtime-PCR法を用いてそれぞれの遺伝子の発現を検討した。小型肝細胞の発現量を1として、相対評価したものを表2で示す。

表2 ラット肝癌細胞株の遺伝子発現解析

Sample Name	CD44	D6.1A	CK19	EpCAM	Thy1	HNF4a
MH	0.004	0.001	0.003	0.062	0.619	1.215
MH (2d cultured)	0.016	0.001	0.005	0.224	0.038	0.268
SH (7d cultured)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
RLC-18	0.042	0.801	0.006	0	0	0
RLC-27	0.446	4.233	0.005	0	0	0.010
dRLh-84	0.235	0.351	0.003	0.005	24.215	0
TM143	0.226	6.531	45.406	0.163	0.002	0.324
FAA-HTC1	0.021	0	0.004	0.107	0	0.371
Morris	0.333	0	0.001	0.001	0.213	0
WB-F344	0.041	7.584	0.005	0	0	0

RealtimePCRの結果は、RT-PCRの結果と若干異なり、TM143にもHNF4aが発現しており、肝細胞機能を有していることがわかった。

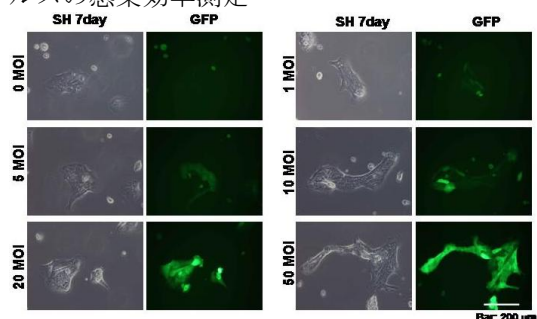
RLC-27, TM143, WB-F34 において D6.1A が著明に発現していること、dRLh-84 に Thy1 の強い発現がみられることがわかった。

小型肝細胞特異的遺伝子として同定した CD44 は、検討した肝癌細胞株全てで発現していた。これまでに報告のある CD133 や CD24, EpCAM などの癌幹細胞マーカー遺伝子は、細胞株により発現が異なり、全く発現していない細胞株が多かった。小型肝細胞は不死化できず、腫瘍形成能を持たない正常細胞であるにもかかわらず、肝癌細胞株と共通する遺伝子発現があることは重要な知見である。本研究助成期間内に制御機序の違いを解明することはできなかったが、CD44 遺伝子の発現制御機序に絞って今後研究を進めることにより、癌細胞の増殖制御方法を見出し、新たな癌治療法の開発に繋がりたいと考えている。

## (2) 細胞に遺伝子を導入する方法の検討

初代培養細胞は、一般的に細胞株より遺伝子導入効率が悪いことが知られている。小型肝細胞への遺伝子導入を効率よく行える方法を開発できれば、肝癌細胞株への遺伝子導入も容易に行えることが予想できるので、初代培養したラット小型肝細胞への遺伝子導入法の検討を行った。細胞に遺伝子を導入する方法は、導入効率の高さ及び導入遺伝子の安定性の観点から、レンチウイルスを用いることとした。ウイルスベクターを入手し、感染した細胞に GFP が発現するようなコンストラクトを構築してウイルス粒子を作成し、実際にラット小型肝細胞に遺伝子導入が可能であることを確かめた。

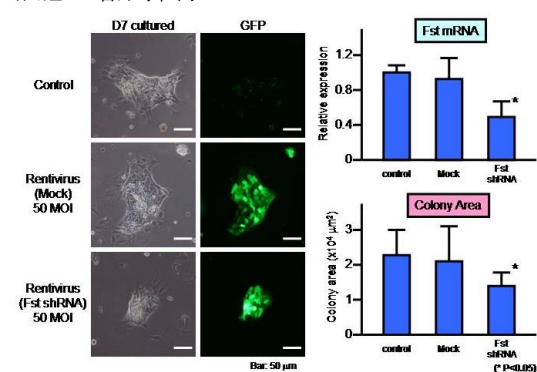
図5 ラット小型肝細胞に対するレンチウイルスの感染効率測定



ラット小型肝細胞への感染効率を測定した結果が図5である。10 MOI の量で 48 時間感染させると 90% 以上の細胞に遺

伝子を導入可能であることがわかり、20 MOI 以上でほぼ 100% の細胞が感染した。確実に遺伝子を導入するために、以後の実験を 50 MOI で行った。

図6 Follistatin shRNA 導入による小型肝細胞の増殖抑制



ラット小型肝細胞の持つ機能に対する遺伝子発現抑制を検討することにより、遺伝子の導入効果を検討することとした。小型肝細胞は、Follistatin (FST) を分泌し、ActivinA の発現が抑制されている。ActivinA の持つ増殖抑制作用に対して FST が阻害活性をもつことで小型肝細胞の強い増殖活性が維持していることが予想できるので、FST に対する shRNA を作成し、培養した小型肝細胞に感染させた。FST に対する shRNA の感染により小型肝細胞の FST mRNA 発現は有意に低下し、増殖が抑制されることが明らかになった。これにより、レンチウイルス感染による遺伝子発現抑制実験を行える条件が整った。FST 遺伝子発現抑制の結果は、小型肝細胞の増殖制御機序に関する論文としてまとめ、現在投稿中である (Ooe H, et al. Proliferation of Rat Small Hepatocytes Depends on Follistatin Expression, submitting)。

## 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4件)

1. Mitaka T, Ooe H. Drug Metabolism Reviews focusing on drug transporter interactions in the liver: Characterization of hepatic-organoid cultures. Drug Metab Rev, in press (査読あり)
2. Kon J, Ichinohe N, Ooe H, Chen Q, Sasaki K, Mitaka T. Thy1-positive cells have bipotential ability to differentiate into hepatocytes and biliary epithelial

- cells in galactosamine-induced rat liver regeneration. Am J Pathol, 175(6): 2362-2371 (2009) (査読あり)
3. Ooe H, Kon J, Oshima J, Mitaka T. Thyroid hormone is necessary for expression of constitutive androstane receptor in rat hepatocytes. Drug Metabol Dispos (2009) 37:1963-1969. (査読あり)
  4. 市戸義久、今純子、大栄秀和、三高俊広. 肝臓における幹細胞. 肝胆膵, 59巻4号、573-580 (2009) (査読なし)

[学会発表] (計10件)

1. 市戸義久、大栄秀和、中村幸雄、今純子、三高俊広。「Thy1 陽性未分化肝幹細胞の分化機序の解析」(口演)第9回日本再生医療学会総会、2010年3月18日、広島市、抄録p196
2. 大栄秀和、陳其潔、今純子、三高俊広。「ラット小型肝細胞の増殖における Follistatin/Activin の役割」(口演)第89回北海道医学大会腫瘍系分科会 2009年9月19日 札幌市
3. 市戸義久、今純子、大栄秀和、中村幸雄、三高俊広。「Thy1/CD44 両陽性肝前駆細胞の分化機序の解析」(口演)第89回北海道医学大会腫瘍系分科会、2009年9月19日、札幌市
4. 市戸義久、今純子、大栄秀和、中村幸雄、三高俊広。「Thy1/CD44 両陽性肝前駆細胞の分化機序の解析」(口演:優秀演題賞)、第16回肝細胞研究会、2009年6月27日、山形市、抄録p67
5. 市戸義久、今純子、大栄秀和、中村幸雄、三高俊広。「Thy1/CD44 両陽性肝前駆細胞の分化機序の解析」(ポスター)、第45回日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸、肝臓、50巻 Supplement(1), A340.
6. 大栄秀和、市戸義久、三高俊広。ラット小型肝細胞の増殖機序の解析 第45回日本肝臓学会総会 2009年6月4日 神戸市 第45回日本肝臓学会総会
7. 市戸義久、今純子、大栄秀和、中村幸雄、三高俊広。「肝前駆細胞の分化機序の解析」第98回日本病理学会総会、2009年5月2日、京都、日本病理学会会誌、第98巻第一号、P235
8. 市戸義久、今純子、大栄秀和、中村幸雄、三高俊広。「Thy1/CD44 両陽性肝前駆細胞の分化機序の解析」(口演) 第8回日本再生医療学会総会、2009年3月5日、東京、日本再生医療学会雑誌、vol. 8, suppl 2009, p147
9. 市戸義久、今純子、大栄秀和、三高俊広。「肝障害モデルラットにおける Ova1 細胞の分化機構の解析」(口演) 第88回北海道医学大会病理系分科会、2008年9月20日、札幌市
10. 大栄秀和、陳其潔、今純子、市戸義久、三高俊広。「ラット肝前駆細胞の成熟化による肝細胞機能遺伝子及び増殖関連遺伝子の発現変動解析」(口演)第88回北海道医学大会腫瘍系分科会、2008年9月6日、旭川市

[図書] (計0件)

6. 研究組織
  - (1) 研究代表者
 

大栄 秀和 (OOE HIDEKAZU)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90452979