

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590841

研究課題名（和文） 肝癌幹細胞に対する癌免疫治療とその分子機構の解析

研究課題名（英文） Immunological analysis of liver cancer stem cells and immunotherapy

研究代表者

巽 智秀（TATSUMI TOMOHIDE）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20397699

研究成果の概要（和文）：肝癌幹細胞の免疫学的解析を行った。癌幹細胞マーカーである CD133 陽性肝癌細胞は、MMP-2 や ADAM9 の活性が高いために浸潤能や VEGF 産生能が高くかつ NK 活性に抵抗性であった。また血清 FGF-2 の発現は慢性肝疾患の進展で低下傾向を示し、FGF-2 により肝癌細胞の NK 活性に対する感受性が増大した。さらに  $\alpha$ -fetoprotein は樹状細胞の IL-12 産生を制御することで NK 細胞活性化を抑制することを示した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the immunological property of liver cancer stem cells (CSC). CD133+ CSC cells express higher MMP-2 and ADAM9 which resulted in increasing the ability of invasion, the production of VEGF and decreasing NK sensitivity of the liver CSC. FGF-2 enhances the NK sensitivity of HCC cells and serum FGF-2 levels decrease along the progression of chronic liver disease.  $\alpha$ -fetoprotein inhibited the production of interleukin-12 of dendritic cells which resulted in the inhibition of activation of NK cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：肝癌、癌幹細胞、癌免疫

## 1. 研究開始当初の背景

日本における肝癌による死亡は、年間約 3 万 5 千人程度であり、日本における肝炎ウイルス感染率の高さから今後さらなる増加が予想されている。現在まで肝癌に対して手術療法、放射線療法、ラジオ波治療、化学療法など様々な治療法が集学的に行われ、その予後は改善してきている。しかしながら依然再発症例も多く、既存の治療法が適応外の患者

に対する新たな治療法の開発が必要である。癌幹細胞は強い自己複製能と癌形成能を有し、癌組織中数%以下存在し、癌組織を構成する大部分の細胞は癌幹細胞が生み出した限定された増殖能力を有する癌前駆細胞と、分裂能力を失った癌細胞であることが明らかとなっている。さらに癌幹細胞は抗癌剤や放射線療法にも抵抗性を示し、癌再発の原因細胞であることが報告されている。癌に対す

る免疫療法の臨床試験は既に数多く報告されているが、その効果は従来の治療法を凌駕するものではなく、いまだに癌の治療法として確立した免疫治療は少ない。この一因として、癌形成において最も重要な役割を果たす癌幹細胞の免疫学的特徴は明らかとなっていないことが挙げられる。現在まで癌幹細胞を標的とした癌免疫治療法の確立はいまだなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究においては、肝癌に対する新たな癌免疫治療の開発を目的として肝癌幹細胞の免疫学的特徴を明らかにするとともに、肝癌幹細胞を標的とした癌免疫治療法の開発を目的とした。(1)肝癌幹細胞の先天免疫細胞に対する感受性とその分子機構の解析(2)肝癌幹細胞のニッチ関連分子による、肝癌幹細胞の分化機構の解析と、ニッチ関連分子を用いた肝癌幹細胞を標的とした肝先天免疫治療法の基礎的検討(3)肝癌細胞及び肝癌幹細胞より産生される $\alpha$ -fetoprotein(AFP)によるNK細胞活性化抑制の分子機構解析。以上を目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

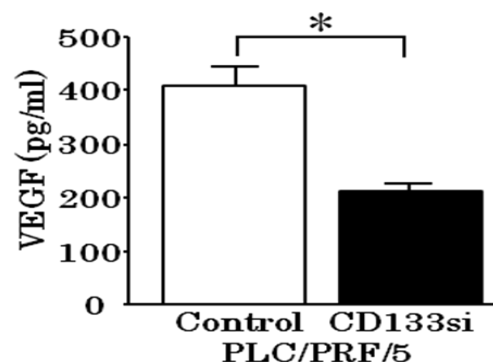
(1)肝癌幹細胞の先天免疫細胞に対する感受性とその分子機構の解析：CD133分子は肝細胞癌(HCC)においても癌幹細胞のマーカーとして同定されている。しかしながら、CD133陽性HCC細胞の生物学的特性は不明な点が多い。本研究ではヒトHCC細胞におけるCD133分子とmetalloproteinaseの発現の意義を検討した。PLC/PRF/5細胞(CD133強発現細胞)は、siRNAにてCD133の発現をノックダウン(CD133KD)した。Huh7細胞(CD133中等度発現細胞)は、CD133陽性細胞(CD133(+))と陰性細胞(CD133(-))をマイクロビーズ法にて分離した。各HCC細胞の各種metalloproteinaseの発現をリアルタイムPCR及びウエスタンブロッティングにて検討した。細胞浸潤能をtranswellを用いたInvasion assayにて、血管新生因子であるVEGF産生能をELISA法にて検討した。またNK細胞の細胞傷害活性に対する感受性をクロムリリース法にて評価した。

(2)慢性肝疾患進展におけるfibroblast growth factor-2(FGF-2)の意義とNK活性との関連:HCCを含めた慢性肝疾患組織のFGF-2発現を免疫組織化学にて検討した。健常者24例、慢性肝炎80例、肝硬変84例、HCC112例の血清サンプルを用いてFGF-2の測定をELISA法にて測定した。また肝癌細胞株HepG2とPLC/PRF/5にFGF-2を添加し、MHC class I-related chain A(MICA)の発現及びNK細胞の細胞傷害性に対する感受性の変化を検討した。

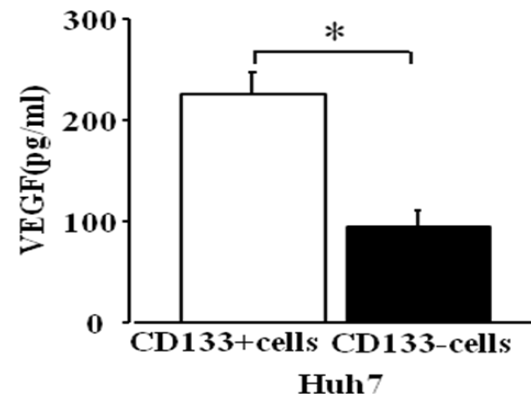
(3) $\alpha$ -fetoprotein(AFP)によるNK細胞活性化抑制の分子機構解析:NK細胞を健康成人末梢血単核球より単離し、AFP蛋白の存在下で培養後、その細胞傷害活性をクロムリリース法にて検討した。次に樹状細胞(DC)を健康成人の末梢血単核球より誘導し、AFP蛋白の存在下でNK細胞と共培養させた後、NK細胞の細胞傷害活性をクロムリリース法にて検討した。またAFP添加によるDC機能の変化を評価した。さらに肝細胞癌症例59例の末梢血単核球からNK細胞を単離し、細胞表面活性化分子であるNKG2Dの発現を検討した。

## 4. 研究成果

(1)肝癌幹細胞の先天免疫細胞に対する感受性とその分子機構の解析：CD133KD-PLC/PRF/5細胞では、各種metalloproteinaseのうちMMP-2とADAM9の発現がcontrol-PLC/PRF/5細胞に比し有意に低下していた。MMP-2関連の細胞浸潤能及びVEGF産生能はCD133KD-PLC/PRF/5細胞では有意に低下していた。(下図)

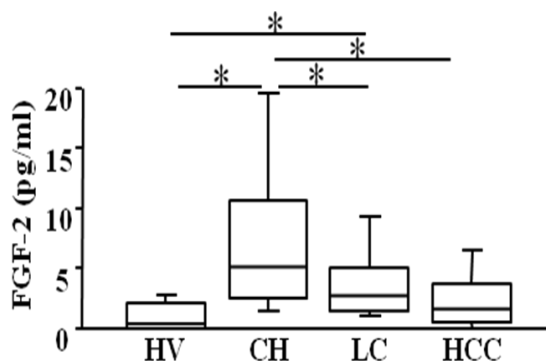


またADAM9関連の膜結合型MICAの発現は、CD133KD-PLC/PRF/5細胞の方がcontrol-PLC/PRF/5細胞に比して強くかつNK細胞に対する感受性も高かった。Huh7細胞においてもCD133(-)Huh7細胞のMMP-2およびADAM9の発現は、CD133(+)Huh7細胞に比して有意に低かった。CD133(-)Huh7細胞はCD133(+)Huh7細胞に比して細胞浸潤能及びVEGF産生能が低く(下図)。



さらに CD133(-)Huh7 細胞の方が膜結合型 MICA の発現が強かつ NK 細胞に対する感受性も高く、PLC/PRF/5 細胞の結果と同様であった。CD133 陽性 HCC 細胞は MMP-2 及び ADAM9 活性が高く、結果的に HCC の腫瘍形成に有利な特性を有していた。以上より CD133 陽性 HCC 細胞は metalloproteinase の制御により悪性の形質を示すことが明らかとなった。

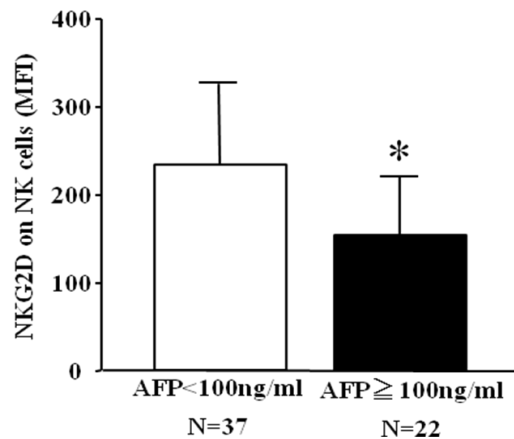
(2) 慢性肝疾患進展における fibroblast growth factor-2 (FGF-2) の意義と NK 活性との関連：免疫組織化学の結果、FGF-2 の発現は正常肝組織では認めなかったが、慢性肝炎では肝細胞が強く染色され、肝硬変、HCC と病態が進展するにつれて FGF-2 の発現は低下した。



血清 FGF-2 濃度は慢性肝炎群が健常者群・肝硬変群・HCC 群のいずれに対しても有意に高かったが、肝硬変・HCC と病態の進展に伴い FGF-2 濃度の低下を認めた(上図)。FGF-2 添加後の HepG2 及び PLC/PRF/5 細胞上の MICA の発現はいずれも増加した。またいずれの肝癌細胞においても FGF-2 の添加により NK 細胞の細胞傷害活性が亢進した。HCC 発癌前後の血清 FGF-2 濃度は有意に発癌後低下していた。肝硬変患者 84 例を FGF-2 濃度高値群 (> 1.8pg/ml, 40 例) と低値群 (≤ 1.8pg/ml, 44 例) に分けると、FGF-2 低値群では高値群に比して HCC 発癌率が有意に高かった。FGF-2 は MICA の発現を誘導することで、肝癌細胞の NK 細胞に対する感受性が高めた。また慢性肝疾患における FGF-2 の低下が肝発癌リスクを上昇させることが明らかとなった。

(3)  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) による NK 細胞活性化抑制の分子機構解析：AFP 蛋白存在下で NK 細胞を培養しても、NK 細胞の細胞傷害活性に変化を認めなかった。AFP 蛋白存在下で DC と NK 細胞を共培養した場合、NK 細胞の細胞傷害活性は、control 群に比べて AFP 群で明らかな減弱が認められた。Transwell-membrane を用いた検討でも、AFP 群で細胞傷害活性の低下が認められたことから、DC より分泌される液性因子が重要であることが明らかとなった。ELISA 法を用いて DC のサイトカイン産生能を検討すると、IL-12 産生は AFP 群にて

control 群に比して有意な低下を認めた。AFP 添加 DC に IL-12 を加えて NK 細胞と共培養すると、control 群と同等まで NK 細胞の細胞傷害活性は回復した。肝細胞癌症例 59 例を AFP 高値群 (AFP ≥ 100ng/ml) と AFP 低値 (AFP < 100ng/ml) に分けて NK 細胞の NKG2D の発現を比較すると、AFP 高値群では AFP 低値群に比して NKG2D の発現が有意に低下していた(下図)。



AFP 蛋白は DC を介した NK 細胞の活性化を抑制し、その主な原因として DC からの IL-12 産生を抑制する事が示唆された。また臨床症例の検討から、長期に AFP 蛋白に曝露されると、NK 細胞活性を低下させる可能性が考えられた。以上の結果より AFP 産生は腫瘍免疫回避機構である可能性が示唆された。

## 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 25 件)

1. Tsunematsu H, Tatsumi T(2 番目), Takehara T(11 番目) (他 8 名) Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 130: 356-364, 2012(査読有)
2. Yamamoto M, Tatsumi T(2 番目), Takehara T(10 番目) (他 7 名)  $\alpha$ -fetoprotein impairs activation of NK cells by inhibiting the function of dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 165: 211-219, 2011(査読有)
3. Hikita H, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(8 番目) (他 12 名) Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology* 54: 240-251, 2011(査読有)
4. Ishida H, Tatsumi T(2 番目), Takehara T(11 番目) (他 8 名) Alternations in

- microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: Involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via PI3 kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 92-97, 2011(査読有)
5. Kodama T, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(10 番目)(他 18 名) Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 121: 3343-3356, 2011(査読有)
  6. Kodama T, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(9 番目)(他 10 名) BH3-only activator proteins Bid and Bim are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency. *J Bio Chem* 286(16): 13905-13913, 2011(査読有)
  7. Shigekawa M, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(9 番目)(他 10 名) Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 406: 614-620, 2011(査読有)
  8. Tatsumi T(1 番目), Takehara T(2 番目)(他 7 名)  $\alpha$ -galactosylceramide activates antitumor immunity against liver tumor. *Hepatol Res* 41: 160-169, 2011(査読有)
  9. Inoue Y, Tatsumi T(14 番目), Takehara T(18 番目)(他 16 名) Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin. *J Med Virol* 83: 419-427, 2011(査読有)
  10. Tatsumi T(1 番目), Takehara T(2 番目)(他 8 名) Hepatitis C virus-specific CD8+ T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 41: 30-38, 2011(査読有)
  11. Hikita H, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(9 番目)(他 11 名) The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52: 1310-1321, 2010(査読有)
  12. Miyagi T, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(10 番目)(他 11 名) Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. *J Gastroenterol* 45: 1247-1254, 2010(査読有)
  13. Miyagi T, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(7 番目)(他 7 名) Altered interferon- $\alpha$ -signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 53: 424-430, 2010(査読有)
  14. Ohkawa K, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(3 番目)(他 8 名) Alterations in hepatitis B virus nucleotide sequences in a chronic virus carrier from immunotolerant to immunoactive phase. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 574-580, 2010(査読有)
  15. Ohkawa K, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(14 番目)(他 13 名) Fatal exacerbation of type B chronic hepatitis triggered by changes in relaxed circular viral DNA synthesis and virion secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 87-93, 2010(査読有)
  16. Kohga K, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(3 番目)(他 4 名) Sorafenib inhibits the shedding of major histocompatibility complex class I-related chain A on hepatocellular carcinoma cells by down-regulating a disintegrin and metalloproteinase 9. *Hepatology* 51: 1264-1273, 2010(査読有)
  17. Kodama T, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(8 番目)(他 11 名) Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 138: 2487-2498, 2010(査読有)
  18. Kohga K, Tatsumi T(2 番目), Takehara T(3 番目)(他 6 名) Expression of CD133 confers malignant potential by regulating metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52: 872-879, 2010(査読有)
  19. Yamaguchi S, Tatsumi T(2 番目), Takehara T(3 番目)(他 9 名) EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles elicits antitumor effect against mouse liver tumor. *Cancer Immunol Immunother* 59: 759-767, 2010(査読有)
  20. Sakamori R, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(3 番目)(他 5 名) STAT3 signaling within hepatocyte is required for anemia of inflammation in vivo. *J Gastroenterology* 45: 244-248, 2010(査読有)

21. Shimizu S, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(7 番目)(他 10 名) The let7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52: 698-704, 2010 (査読有)
22. Kohga K, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(3 番目)(他 6 名) Anticancer chemotherapy inhibits MHC Class I-related chain A ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 69: 8050-8057, 2009 (査読有)
23. Hikita H, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(7 番目)(他 12 名) BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology* 50: 1972-1980, 2009 (査読有)
24. Hikita H, Takehara T(2 番目), Tatsumi T(14 番目)(他 12 名) Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult liver. *Hepatology* 50:1217-1226, 2009 (査読有)
25. Sasakawa A, Tatsumi T(2 番目), Takehara T(3 番目)(他 6 名) Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in  $\alpha$ -galactosylceramide treatment. *J Hepatol* 50: 1155-1162, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

1. Shimizu S, Tatsumi T, Takehara T(他 9 名) Multi-kinase inhibitor sorafenib induces autophagy which confers anti-cancer drug resistance to human hepatoma cells 2011 年 11 月 8 日 第 62 回米国肝臓学会 米国サンフランシスコ
2. Nawa T, Tatsumi T, Takehara T(他 9 名) Interferon- $\alpha$  suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via PKC pathway 2011 年 11 月 7 日 第 62 回米国肝臓学会 米国サンフランシスコ
3. 疋田隼人、巽 智秀、竹原徹郎 持続的な肝細胞アポトーシスは肝発癌を誘導する 2011 年 10 月 21 日 JDDW2011(第 19 回日本消化器関連学会週間、第 53 回消化器病学会大会、第 15 回肝臓学会大会、第 9 回消化器外科学会大会、第 82 回消化器内視鏡学会総会) 福岡県福岡市
4. 明田寛史、巽 智秀、竹原徹郎(他 17 名) 疎水化ポリ  $\gamma$ -グルタミン酸ナノ粒子の癌抗原ペプチドワクチンにおけるアジュバントとしての有用性 2011 年 10 月 21 日 JDDW2011(第 19 回日本消化器関連学会週間、第 15 回肝臓学会大会) 福岡県福岡市
5. 名和誉敏、巽 智秀、竹原徹郎(他 4 名) IFN $\alpha$  は B 型肝炎ウイルスのエンハンサー 2 の転写活性を阻害する 2011 年 10 月 20 日 JDDW2011(第 19 回日本消化器関連学会週間、第 15 回肝臓学会大会) 福岡県福岡市
6. 小玉尚宏、竹原徹郎、巽 智秀(他 10 名) 肝細胞における p53 の活性化は肝に線維化を誘導する 2011 年 6 月 3 日 第 47 回肝臓学会総会 東京
7. 疋田隼人、巽 智秀、竹原徹郎(他 9 名) Bak/Bax ダブルノックアウトマウスにおける Fas の活性化はカスパーゼ依存的な遅発性肝細胞死を誘導する 2011 年 6 月 3 日 第 47 回肝臓学会総会 東京
8. 巽 智秀、竹原徹郎(他 1 名) 炎症性サイトカイン Interleukin-1 $\beta$  は肝細胞癌の先天免疫回避に関与する 2011 年 6 月 2 日 第 47 回肝臓学会総会 東京
9. 巽 智秀、竹原徹郎(他 6 名) C 型慢性肝炎の PEG-IFN/RBV 併用治療における治療効果と C 型肝炎ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)免疫反応の関連 2011 年 6 月 2 日 第 47 回肝臓学会総会 東京
10. Kodama T, Takehara T, Tatsumi T, (他 10 名) A crucial role of hepatocyte p53 in liver fibrogenesis 2011 年 5 月 11 日 DDW2011/AGA/AASLD 米国シカゴ
11. Hosui A, Takehara T, Tatsumi T(他 9 名) The role of IFN-STAT1 signal

- transduction on inhibition of HCC development 2010年10月30日 第61回米国肝臓学会 米国ボストン
12. 巽 智秀、竹原徹郎(他1名) CD133陽性肝癌細胞の metalloproteinase による制御 JDDW2010(第18回日本消化器関連学会週間、第52回消化器病学会大会) 2010年10月14日 神奈川県横浜市
  13. 小玉尚宏、竹原徹郎、巽 智秀(他8名) 血小板による肝線維化抑制機構の解明 JDDW2010(第18回日本消化器関連学会週間、第52回消化器病学会大会) 2010年10月14日 神奈川県横浜市
  14. 巽 智秀、竹原徹郎(他7名) CD133陽性肝細胞癌は metalloproteinase を制御しその生存に有利な環境を作る 2010年9月23日 第69回癌学会総会 大阪府大阪市
  15. 甲賀啓介、巽 智秀、竹原徹郎(他6名) Sorafenib は肝細胞癌の ADAM9 は抑制することで MICA の shedding を制御する 2010年9月21日 第69回癌学会総会 大阪府大阪市
  16. 山本政司、巽 智秀、竹原徹郎(他7名)  $\alpha$ -fetoproteinによる先天免疫活性化抑制機構の解析 2010年5月27日 第46回肝臓学会総会 山形県山形市
  17. Kohga K, Tatsumi T, Takehara T(他4名) Anti-cancer chemotherapy enhances NK sensitivity by inhibiting MICA ectodomain shedding in human hepatocellular carcinoma 2009年12月4日 第39回日本免疫学会 大阪府大阪市
  18. Yamamoto M, Tatsumi T, Takehara T(他4名)  $\alpha$ -fetoprotein impairs NK activity by inhibiting dendritic cell function 2009年12月3日 第39回日本免疫学会 大阪府大阪市
  19. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, (他4名) Interferon- $\alpha$ -signaling in natural killer cells is impaired in chronic hepatitis C virus infection 2009年11月2日 第60回米国肝臓学会 米国ボストン
  20. 甲賀啓介、竹原徹郎、巽 智秀(他12名) 肝細胞癌における NK 活性化レセプターリガンド MICA 分泌(shedding)の分子機構 2009年6月4日 第45回肝臓学会総会 兵庫県神戸市
  21. 小玉尚宏、竹原徹郎、巽 智秀(他10名) 血小板減少は胆汁鬱滞性肝障害における肝繊維化を増悪させる 2009年6月4日 第45回肝臓学会総会 兵庫県神戸市
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
巽 智秀 (TATSUMI TOMOHIDE)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20397699
  - (2)研究分担者  
竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：70335355
  - (3)連携研究者  
なし