

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02900

研究課題名(和文) 上皮、間葉系肝癌幹細胞による間質細胞リプログラミングの解明とその診断治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of stromal cell reprogramming induced by cancer stem cells

研究代表者

山下 太郎 (YAMASHITA, TARO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：90377432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌の発生維持に必須の集団である癌幹細胞について、肝癌幹細胞には上皮系、間葉系の2種類が存在し、それぞれ細胞周期シグナル、上皮間葉転換シグナル活性が異なることを見出してきた。本研究では肝癌細胞および間質細胞における遺伝子発現変化、間質細胞のリプログラミング過程をトランスクリプトーム解析で網羅的に検討した。癌関連線維芽細胞との共培養により、上皮系癌幹細胞を有する肝癌細胞株に新たに間葉系肝癌幹細胞を誘導すること、遠隔転移を促すこと、この現象に関わる転写因子としてJUNBが関わり、浸潤先端領域での上皮間葉転換細胞リプログラミングを行うこと、新たな肝がん治療標的分子候補であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌の遠隔転移は患者の予後不良につながる一方、遠隔転移プログラムを阻害する治療薬はない。我々はCD90陽性癌幹細胞が遠隔転移を起こし、その血清マーカーとしてLG2mを同定したが、治療薬候補はまだ開発できていない。本研究では上皮系癌幹細胞から間葉系癌幹細胞が出現する機序として癌関連線維芽細胞の役割を同定、その機序として腫瘍辺縁部におけるJUNBの活性化を見出し、JUNB過剰発現が遠隔転移を起こすことを同定した。本研究結果から、JUNBを標的にした薬物候補の開発が肝細胞癌の遠隔転移阻害剤として有望な可能性が示唆され、新たな癌分子標的の創出に至ったと考える。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that two distinct cancer stem cells, namely EpCAM-positive epithelial cancer stem cells and CD90-positive mesenchymal cancer stem cells, exist in human hepatocellular carcinoma. Especially, CD90-positive cancer stem cells play a fundamental role on distant organ metastasis of hepatocellular carcinoma. Here we evaluated the role of cancer associated fibroblasts on EpCAM-positive epithelial cancer stem cells. We found that the presence of cancer associated fibroblasts activated the JUNB transcription factor to induce CD90-positive mesenchymal cancer stem cells, resulted in the acquisition of metastatic capacity of EpCAM-positive epithelial cancer stem cells. Thus, our study demonstrated the novel role of JUNB on epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis, suggested that JUNB might be a good molecular target to prevent HCC metastasis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：癌幹細胞 遠隔転移 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は世界の悪性腫瘍による死因の第2位を占め、本邦でも進行癌の中央生存期間は1年未満の代表的な難治癌である。正常な臓器が幹細胞により維持されるように、申請者はこれまでに癌の発生、維持、薬剤抵抗性、遠隔転移に必須の役割を果たしていると考えられる肝癌幹細胞を同定、その多様性(上皮系、間葉系癌幹細胞)が肝癌の悪性形質に深く関わることを報告してきた¹⁻⁶⁾。さらに、上皮系癌幹細胞(細胞表面マーカーEpCAM陽性)では細胞周期シグナルの活性化⁷⁾、間葉系癌幹細胞(細胞表面マーカーCD90陽性)では細胞外基底膜成分産生亢進を伴う上皮間葉転換シグナルの活性化が生じていることを最近解明し⁸⁾、上皮系肝癌幹細胞では腫瘍増殖を、間葉系肝癌幹細胞では遠隔転移を制御しているという新たな知見を見出した^{9, 10)}。一方肝細胞癌は線維芽細胞や血管内皮細胞、免疫担当細胞など多くの間質細胞を有し、肝発癌過程の中で上皮系、間葉系肝癌幹細胞は共に、これらの間質細胞が豊富な浸潤先端領域に多く存在する。胎児期では上皮系幹細胞、間葉系幹細胞に由来する実質、間質細胞が協調して臓器形成を行う。発癌過程においても同様に癌幹細胞が間質細胞のリプログラミングを行い、胎児期の性質をもつ癌間質細胞が腫瘍形成に重要な働きを果たす可能性がある。しかしながら、性質の異なる癌幹細胞により、近接して存在する癌間質細胞も異なるリプログラミングを受けその細胞形質に多様性が存在するかは不明である。多様な癌間質細胞が存在した場合に癌の悪性度に関わるのか、血管新生や線維化、免疫チェックポイントなど標的分子の発現は異なるのか、異なる癌幹細胞によりリプログラミングを受けた肝癌間質細胞の多様性と悪性形質との関連は未解明の状態にある。また、癌関連線維芽細胞が癌幹細胞分画の増加や免疫抑制系のシグナル活性化など、癌幹細胞に対して遺伝子発現変化をもたらすという報告はあるが、リプログラミングを受けた多様な肝癌間質細胞が上皮系、間葉系の肝癌幹細胞にどのような影響を与えるのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では上皮系肝癌幹細胞が間質細胞、特に血管内皮細胞、線維芽細胞、免疫担当細胞に与える影響について、肝癌培養細胞株、患者由来ヒト肝癌細胞、間質細胞、3D共培養システムを用いた *in vitro* 解析で経時的に評価し、肝癌細胞および間質細胞における遺伝子発現変化、間質細胞のリプログラミング過程を1細胞トランスクリプトーム解析で網羅的に検討する。

3. 研究の方法

1) 肝癌幹細胞および間質細胞の共培養

肝癌外科切除標本由来 EpCAM 陽性上皮系肝癌幹細胞もしくは Huh7 細胞、肝癌外科切除標本由来 CD90 陽性間葉系肝癌幹細胞もしくは HLF 細胞を癌細胞として使用する。間質細胞としては血管内皮細胞(HUVEC)、線維芽細胞(TIG-3)、星細胞(Lx2)を用いる。細胞数は各 1×10^5 細胞を 6 well plate のフォーマットで培養を開始する。

2) 上皮系肝癌幹細胞および間質細胞のトランスクリプトーム解析

肝がん細胞と間質細胞で共培養により発現変動が認められる遺伝子群を RNA-seq で解析する。遺伝子発現変化を説明する転写因子候補についても解析する。

3) マウス皮下移植モデルを用いた、標的分子が肝細胞癌の悪性度に与える影響の検討

ヒト肝癌細胞による血管内皮細胞、線維芽細胞リプログラミングが癌悪性度に与える影響については、癌細胞および標的分子候補を6週齢オス NOD/SCID マウスに皮下移植を行い腫瘍サイズの経時的評価を行う。腫瘍サイズが 2500mm³ に達した段階で安楽死させ、肺転移の有無について評価を行う。

4. 研究成果

1) 上皮系肝癌幹細胞は星細胞や線維芽細胞の存在下では間葉系肝癌幹細胞へと上皮間葉転換を起こす。

EpCAM 陽性肝癌幹細胞(Huh1, Huh7)を GFP でラベルした細胞を作成し、線維芽細胞(TIG-3)、星細胞(Lx2)と共培養を行ったところ、驚くべきことに上皮系癌幹細胞ではほぼ認められなかった CD90 陽性間葉系癌幹細胞が著しく増加していた(図1)。CD90 をコードする Thy1 の遺伝子発現については 500 倍から 3000 倍以上と著増しており、この現象は星細胞よりは線維芽細胞でより顕著に認められた(図2)。

図1 フローサイトメーター解析

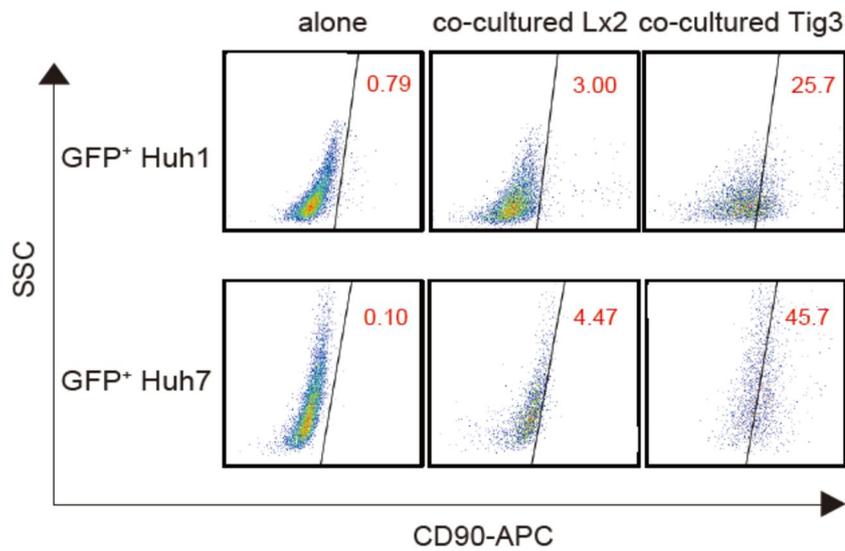
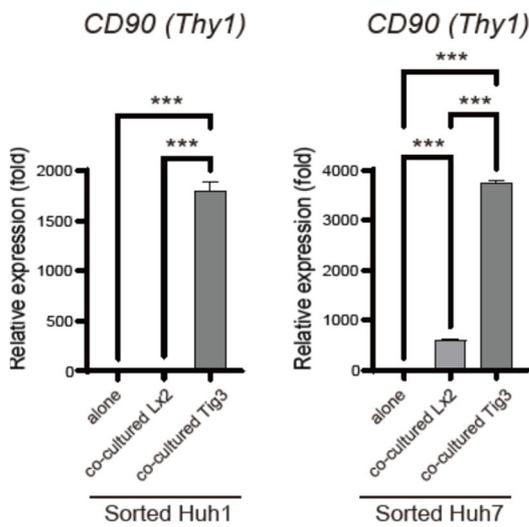


図2 qRT-PCR 解析



2) 本来遠隔転移能力を持たない上皮系癌幹細胞は線維芽細胞の存在下で遠隔転移能力を獲得する。

EpCAM 陽性肝癌幹細胞(Huh1, Huh7)を単独、もしくは線維芽細胞(TIG-3)と共に NOD/SCID マウス皮下移植を行ったところ、皮下腫瘍組織内で線維性成分の増生が認められた(図3)。さらに、Huh7 細胞単独では認められない肺転移が、Tig3 が存在することで明らかに認められた(図4)。

図3 マウス皮下腫瘍の H&E 染色

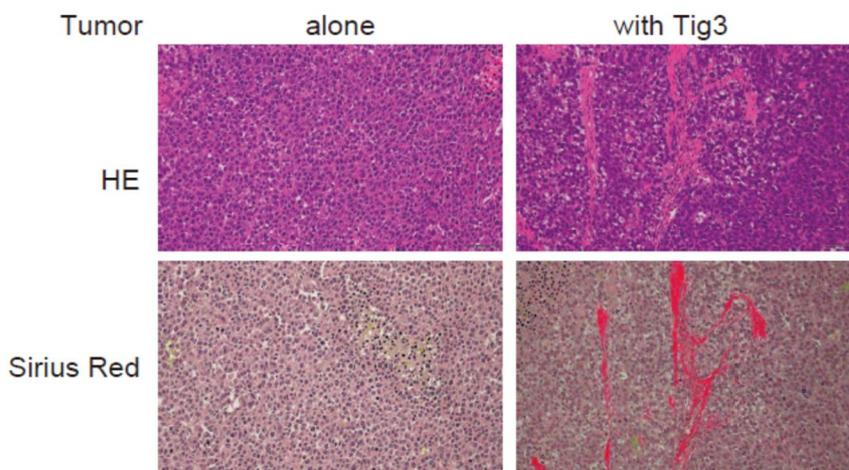
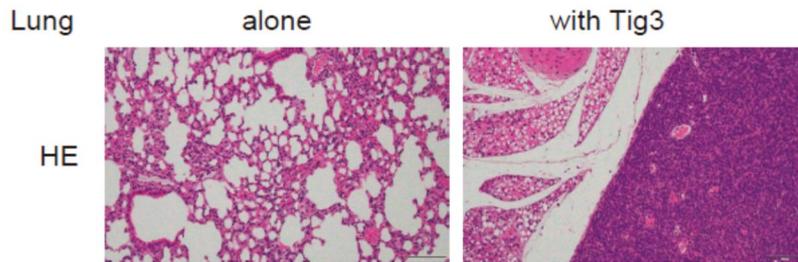
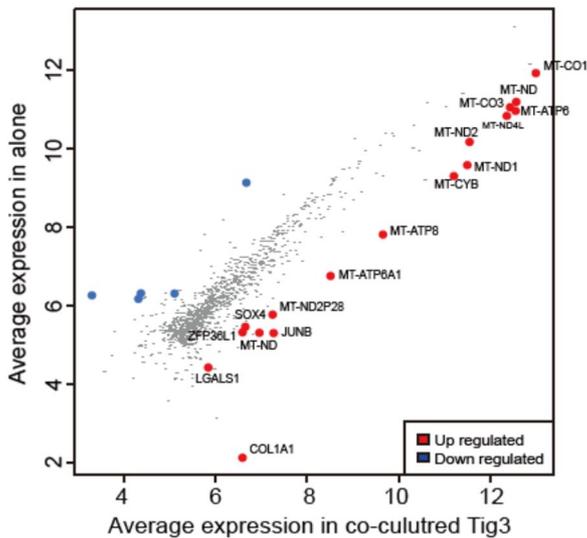


図4 マウス肺の H&E 染色



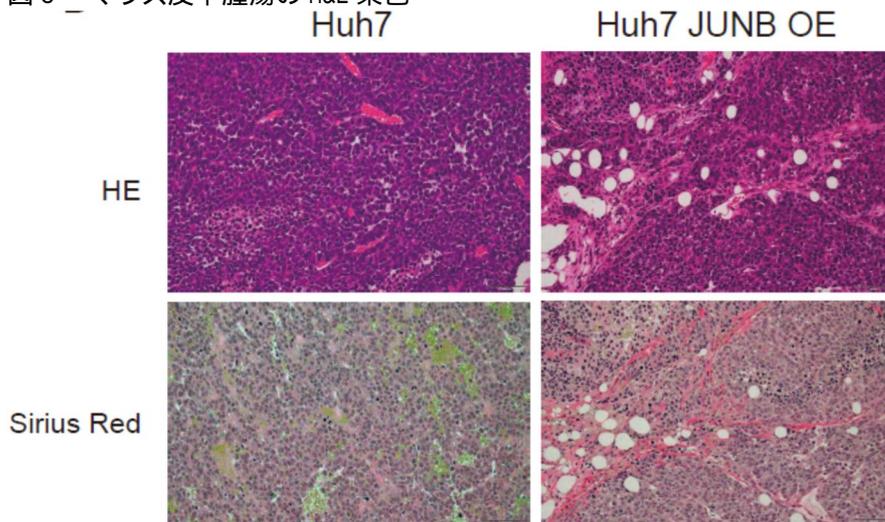
3) 線維芽細胞の存在下で上皮系肝癌幹細胞では転写因子 JUNB, SOX4 の活性化が生じる。上記の共培養で認められた上皮間葉転換プログラムの活性化に関わる新たな機序を解明するために、RNA-Seq 解析を行った。Tig3 との共培養下で起こる遺伝子発現変化として、JUNB および SOX4 を同定した (図 5)。この誘導は遺伝子発現、蛋白発現ともに再現できることを qRT-PCR 解析、Western blotting で確認した。

図 5 RNA-Seq 解析



そこで、JUNB と SOX4 の過剰発現が細胞の機能に与える変化を検討したところ、特に JUNB の過剰発現が CD90 陽性間葉系癌幹細胞を上皮系癌幹細胞から新規に出現させることを同定、細胞遊走能力やマウスでの腫瘍内線維性成分の出現 (図 6)、肺転移能力の獲得を誘導することを明らかにした。

図 6 _ マウス皮下腫瘍の H&E 染色



以上の研究成果として、肝細胞癌における上皮系癌幹細胞は線維芽細胞の存在下で JUNB が活性化し、上皮間葉転換プログラムの活性化により間葉系癌幹細胞へと細胞形質が変化、遠隔転移を誘導し患者の予後不良につながるという、新たな知見が得られた。

引用文献

1. Yamashita T, Budhu A, Forgues M, et al. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:10831-9.
2. Yamashita T, Forgues M, Wang W, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:1451-61.
3. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, et al. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:1484-97.
4. Yamashita T, Honda M, Nio K, et al. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 2010;70:4687-97.
5. Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009;136:1012-24.
6. Yamashita T, Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J Clin Invest* 2013;123:1911-8.
7. Yasukawa M, Ando Y, Yamashita T, et al. CDK1 dependent phosphorylation of hTERT contributes to cancer progression. *Nat Commun* 2020;11:1557.
8. Yamashita T, Koshikawa N, Shimakami T, et al. Serum Laminin 2 Monomer as a Diagnostic and Predictive Biomarker for Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2021;74:760-775.
9. Yamashita T, Kaneko S. Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells. *J Gastroenterol* 2014;49:1105-10.
10. Yamashita T, Kaneko S. Liver cancer stem cells: Recent progress in basic and clinical research. *Regen Ther* 2021;17:34-37.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matsuda Y, Ye J, Yamakawa K, Mukai Y, Azuma K, Wu L, Masutomi K, Yamashita T, Daigo Y, Miyagi Y, Yokose T, Oshima T, Ito H, Morinaga S, Kishida T, Minamoto T, Kojima M, Kaneko S, Haba R, Kontani K, Kanaji N, Okano K, Muto-Ishizuka M, Yokohira M, Saoo K, Imaida K, Suizu F.	4. 巻 115
2. 論文標題 Association of longer telomere length in cancer cells and cancer-associated fibroblasts with worse prognosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Natl Cancer Inst .	6. 最初と最後の頁 208-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnci/djac226.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li R, Okada H, Yamashita T, Nio K, Chen H, Li Y, Shimakami T, Takatori H, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S.	4. 巻 23
2. 論文標題 FOXM1 Is a Novel Molecular Target of AFP-Positive Hepatocellular Carcinoma Abrogated by Proteasome Inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 8305 - 8322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158305.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suda T, Yamashita T, Sunagozaka H, Okada H, Nio K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Dickkopf-1 Promotes Angiogenesis and is a Biomarker for Hepatic Stem Cell-like Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 2801-2818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052801.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chen H, Nio K, Tang H, Yamashita T, Okada H, Li Y, Doan PTB, Li R, Lv J, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S.	4. 巻 23
2. 論文標題 BMP9-ID1 Signaling Activates HIF-1 and VEGFA Expression to Promote Tumor Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 1475-1489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031475.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Y, Yamashita T, Ye J, Yasukawa M, Yamakawa K, Mukai Y, Machitani M, Daigo Y, Miyagi Y, Yokose T, Oshima T, Ito H, Morinaga S, Kishida T, Minamoto T, Yamada S, Takei J, Kaneko MK, Kojima M, Kaneko S, Masaki T, Hirata M, Haba R, Kontani K, Kanaji N, Miyatake N, Okano K, Kato Y, Masutomi K.	4. 巻 257
2. 論文標題 Phosphorylation of hTERT at threonine 249 is a novel tumor biomarker of aggressive cancer with poor prognosis in multiple organs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pathol .	6. 最初と最後の頁 172-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5876.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita T, Kaneko S.	4. 巻 17
2. 論文標題 Liver cancer stem cells: Recent progress in basic and clinical research.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 34-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita T, Koshikawa N, Shimakami T, Terashima T, Nakagawa M, Nio K, Horii R, Iida N, Kawaguchi K, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kitao A, Kobayashi S, Takahara S, Imai Y, Yoshimura K, Murayama T, Nakamoto Y, Yoshida E, Yoshimura T, Seiki M, Kaneko S.	4. 巻 74
2. 論文標題 Serum Laminin 2 Monomer as a Diagnostic and Predictive Biomarker for Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 760-775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suda T, Yamashita T, Sunagozaka H, Okada H, Nio K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Dickkopf-1 Promotes Angiogenesis and is a Biomarker for Hepatic Stem Cell-like Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 丹尾幸樹、山下太郎、金子周一
2. 発表標題 AFP陽性肝細胞癌に高発現するFOXM1を標的とした プロテアソーム阻害剤Carfilzomibの治療効果検討
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下太郎
2. 発表標題 5.Recent progress in basic and clinical research of liver cancer stem cells: correlation of liver cancer stem cells with molecular hepatocellular carcinoma subclasses
3. 学会等名 7th Asian Conference on Tumor Ablation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下太郎
2. 発表標題 Recent progress in basic and clinical research of liver cancer stem cells
3. 学会等名 APASL Oncology 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------