

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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591501

研究課題名（和文） 癌源細胞に基づく原発性肝癌の多様性とマイクロRNA制御による新規治療法の開発

研究課題名（英文） Clinical heterogeneity brought about by tumor-initiating cells in primary liver cancer and the development of new therapeutic strategy by regulating microRNAs.

研究代表者

大塚 将之 (OHTSUKA MASAYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：90334185

研究成果の概要（和文）：

肝細胞癌の細胞マーカーについては発現が多岐にわたり、一定の傾向が見いだせなかったが、肝内胆管癌に関してはNotch2の発現が56%の症例にみられ、さらにこれらはc-Kit発現と関連がある一方、CD44の発現とは逆相関にあることが判明した。Notch2発現により予後にも違いを認め、臨床的多様性との関連も示唆された。さらに、臨床的な違いが明らかになりつつある肝内胆管癌のうちの胆管内乳頭状腫瘍については、通常の肝内胆管癌との比較でMUC1やMUC2の発現の違い、さらにそれに関連してp53についての違いを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Hepatocellular carcinomas could not be classified according to their phenotypic expression, since there were diverse patterns. In contrast, in intrahepatic cholangiocarcinomas, Notch2 was expressed in 56% of cases. Although Notch2 expression was inversely correlated with CD44 expression, this expression was significantly associated with c-Kit expression, suggesting that intrahepatic cholangiocarcinoma with positive Notch2 expression might be derived from hepatic progenitor cells. Survival among patients with positive Notch2 expression was significantly better than that among patients with negative Notch2 expression, indicating that Notch2 expression might have a connection with clinical behavior of intrahepatic cholangiocarcinomas. The expressions of MUC1 and MUC2, as well as p53, in intraductal papillary neoplasms of the bile duct were found to be different from those in conventional intrahepatic cholangiocarcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌源細胞、肝細胞癌、肝内胆管癌、組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景

肝臓の発生過程において重要な、肝細胞・胆管細胞両者に分化しうる肝幹細胞・前駆細胞が成人肝内にも存在する（組織幹細胞）ことが広く認識され、何らかの肝障害時に、特に成熟肝細胞や胆管細胞の複製が制限された時に、活性化するとされる。肝細胞癌や胆管細胞癌といった原発性肝癌の大きなリスクファクターであるB型/C型慢性ウイルス性肝炎をはじめとした慢性肝障害時にもそれら組織幹細胞の活性化が知られ、活性化した組織幹細胞を有する肝臓における発癌という観点からするとその組織幹細胞が癌化のターゲット細胞として重要な位置を占めることが示唆される。臨床的にも、肝細胞癌と胆管細胞癌の表現型が混在する混合型肝癌の存在や、ezrinやサイトケラチン19といった成熟肝細胞にはみられず、前駆細胞にみられる分子の発現を伴う肝細胞癌が存在する、あるいは胆管細胞マーカに加え肝細胞マーカも同時に発現している肝内胆管癌が存在する、という我々の研究からもその可能性が支持される。一方、近年提唱されたcancer stem cell theoryでは癌病巣を構成する細胞は基本的には不均一で、癌源細胞(tumor-initiating cells)を頂点とする階層性を有するとされる。癌源細胞の起源についてはいまだ明らかではないが、既存の組織幹細胞の遺伝子異常、形質転換により自己複製制御機構が破綻することによるという仮説が有力視されている。したがって、上述した肝幹細胞・前駆細胞を発生母地とした原発性肝癌においては、癌源細胞の存在と階層性が強く示唆される。実際、肝細胞癌細胞株のなかには自己複製能と分化能を有し、in vivo動物モデルにおいて造腫瘍性を示す少数の細胞が含まれることが示されている。しかしながら、現在までに肝細胞癌源細胞として示されている細胞の細胞マーカは、CD133⁺CD44⁺、CD90⁺CD45⁻、epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)⁺というように複数あり、この結果は癌源細胞にはsubpopulationが存在することを反映しているものと考えられる。通常の肝発生における肝幹細胞・前駆細胞は、実際には単一のものではなく、compartmentを形成しており、ある過程において、そのcompartmentのなかで、たとえばEpCAMを強く発現したり、それが失われたりする場合があるため、どの段階で癌源細胞としての形質を獲得するか、ということが癌源細胞のsubpopulationに繋がることと考えられる。また、以前より我々やLeeらが肝細胞癌の臨床的なheterogeneityは、その由来細胞によるところが大きいことを示しており、その癌源細胞subpopulationの違いが、最終的には悪性度などの臨床的

heterogeneityに繋がる可能性も考えられる。したがって、同一サンプル内で横断的にさまざまな細胞マーカの発現程度を検討し、それらがどのようなpopulationの癌源細胞に由来するものか明らかにし、臨床病理学的な検討を加えることによってそれぞれの特徴を明らかにすれば、外科切除後・肝移植後の再発予測、あるいは従来は同じ肝細胞癌とされていたものでも異なった治療方針をたてるのが可能となり、肝切除や肝移植などの適切な適応決定に役立つものと考えられる。それらに關与する候補マーカとしては肝細胞癌においてはCD133、CD44、CD90、CD45、EpCAMが癌源細胞マーカとしてすでに報告されている。一方、肝内胆管癌においては、われわれが以前より検討しているNotchレセプターが注目される。特にNotch2は肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化及び胆管maturationに重要な役割を果たしていることが明らかにされ、肝前駆細胞からの肝内胆管癌の発癌・分化にも關与していることが示唆される。さらにc-Kit、CD44は肝内胆管癌の癌現細胞マーカとしての候補として挙げられる。また、粘液形質であるMUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6なども細胞マーカとして発癌過程の違い、臨床的heterogeneityを示す分子として報告されている。

一方、現在の原発性肝癌に対する治療は外科切除、化学療法が中心であるが、外科切除しなくても多くの症例で癌再発が起り、しかも再発巣では初発巣よりも進行が早く、悪性度が高くなることがしばしば経験される。同様に化学療法を施行しても、導入当初は効果が認められるものの、次第に効果が認められなくなることもしばしば経験される。これは、そのような治療に対しても癌源細胞が残存しているためという仮説が立てられている。したがって、癌源細胞をターゲットとした何らかの治療法が癌の根治には必須である。癌源細胞を標的とした治療方法には、癌源細胞自体を排除する、癌源細胞の自己複製能を抑制し、造腫瘍性のない細胞に分化誘導させる、癌源細胞を癌源細胞として維持させるために必要なnicheを標的とする、という大きく3種の方法が考案されている。なかでも、癌源細胞の自己複製能を抑制し、造腫瘍性のない細胞に分化誘導させる方法は注目に値する。癌源細胞の自己複製能や分化のメカニズムの多くは通常の組織幹細胞のそれを踏襲しているとされており、そこに何らかの異常をきたし、癌源細胞としての形質を獲得しているものと考えられる。したがって、それらの異常をmodificationすることによって有効な治療法になりうる可能性が高い。組織幹細胞の自己複製、分化のメカニズムがすべて解明されているわけではないが、近年組織発

生において重要な役割を果たしている post-transcriptional regulators としてのマイクロ RNA が組織幹細胞に対してもその形質維持に関与していることが示されつつある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝前駆細胞から発癌したと考えられる肝細胞癌と肝内胆管癌について各種細胞マーカーを解析し、どのような population の癌源細胞に由来するものかを明らかにするとともに臨床病理学的な特徴・違いを明らかにし、臨床的な heterogeneity の解明を目指す。また、自己複製能・分化誘導制御異常といった癌源細胞における重要な形質発現におけるマイクロ RNA の発現・意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌における細胞マーカーの解析

肝細胞癌外科切除材料を用いて既に報告されている肝細胞癌源細胞の細胞マーカーである CD133、CD44、CD90、CD45、EpCAM につき市販の抗体を用いて免疫組織染色を行うとともに、real-time RT-PCR 法にて mRNA の発現状況を検討する。それらと臨床病理学的因子との関連について比較検討する。

(2) 肝内胆管癌における細胞マーカー、特に Notch2 レセプターを中心とした解析

Notch2 及びそのリガンドである Jagged1 の発現を肝内胆管癌外科切除材料より抽出した RNA を用い、cDNA を合成した後、定量的 PCR 法にて mRNA 量を検討する。また、免疫組織学的手法にてその発現をタンパクレベルで調べ、c-kit、CD44、alfa-fetoprotein などの表現形質をあわせて検討し、それぞれの特徴を解析するとともに、臨床病理学的因子との関連を調べる。さらに、外科切除後の予後・再発との関連についても検討する。

(3) 臨床的な違いがあることが明らかになりつつある肝内胆管癌のうちの胆管内乳頭状腫瘍における細胞マーカーの解析

(2) の方法とは逆の手法で、すでに臨床的に違いがあることが明らかになりつつある胆管内乳頭状腫瘍と肝内胆管癌について、粘液形質である MUC1、MUC2、MUC5AC、HGM、MUC6 について免疫組織学的手法にてその発現を解析する。また、p53 の異常についても評価し、その発癌過程の差異について検討する。

4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌における細胞マーカー、特

に Notch2 レセプターを中心とした解析

32 例の肝内胆管癌外科切除材料において Notch2 レセプターの発現を検討したところ、18 例 (56%) において発現亢進が認められた。一方、Jagged1 は 10 例 (31%) において癌細胞に発現がみられ、Notch2 陽性 18 例中 8 例が Jagged1 陽性であるのに対し、Notch2 陰性 14 例中 Jagged1 陽性例は 2 例のみであった。c-kit、CD44、alfa-fetoprotein の発現をみると、それぞれ 16 例 (50%)、14 例 (44%)、1 例 (3.1%) にその発現がみられた。c-kit の発現は Notch2 発現と有意に相関しており、c-kit が肝前駆細胞マーカーであることを考慮すると Notch2 陽性肝内胆管癌は c-kit 陽性癌源細胞が発癌起源細胞とする考えを証明する結果と考えられた。一方、CD44 の発現は Notch2 の発現とは逆相関の関係であることが見出され、CD44 陽性肝内胆管癌は c-kit 陽性癌源細胞を有する肝内胆管癌とは異なる起源をもつ、あるいは CD44 は癌源細胞のマーカーとはなりえない (CD44 の役割は多岐に渡るため) ことを示唆するものと考えられた。臨床病理学的因子との関連をみると、Notch2 陽性肝内胆管癌症例では血清中の CA19-9 値が低い症例が多く、また、有意に組織学的治癒切除例が多いことが判明した。さらに Notch2 陽性肝内胆管癌症例は Notch2 陰性例に比べ有意に外科切除後の予後が良好であることがわかり、臨床的な heterogeneity に貢献していることが明らかになった。しかしながら一方で、前述したように CD44 が癌源細胞を示すマーカーとはいえないかもしれない、という結果は、肝細胞癌において報告されている癌源細胞マーカーの発現が実際は多岐にわたり、一定の結果がなかなか得られないという結果の説明になりうるかもしれない。すなわち、報告されているマーカーは肝癌源細胞を反映していない可能性と肝癌源細胞が既存の組織幹細胞由来ではない可能性があり、これらを今後考える必要があるものと思われる。

(2) 臨床的な違いがあることが明らかになりつつある肝内胆管癌のうちの胆管内乳頭状腫瘍における細胞マーカーの解析

胆管内乳頭状腫瘍と肝内胆管癌は、膵における膵管内乳頭粘液性腫瘍と通常型膵癌との関係に類似し、臨床的にも異なる entity として提唱された。胆管内乳頭状腫瘍には粘液産生が亢進している症例とあまり産生していない症例があるが、それらを含めて粘液形質を解析した結果、通常肝内胆管癌では MUC1 が 100% 発現し、MUC2 はほとんど発現していないのに対し、粘液産生が亢進している胆管内乳頭状腫瘍では、MUC1 の発現亢進は 8 例中 3 例 (38%)、MUC2 の発現は 7 例

(88%)と有意に異なる結果が得られた。一方、粘液をあまり産生していない胆管内乳頭状腫瘍では、MUC1の発現亢進が16例中13例(81%)、MUC2の発現亢進は4例(25%)であり、粘液産生が亢進している胆管内乳頭状腫瘍と通常型の肝内胆管癌の中間程度の頻度であった。さらに、p53の異常は通常型の肝内胆管癌では70%の症例にみられるが、粘液産生が亢進している胆管内乳頭状腫瘍では1例もみられず、粘液をあまり産生していない胆管内乳頭状腫瘍では50%の症例に認められた。これらの結果は、通常型の肝内胆管癌と粘液産生が亢進している胆管内乳頭状腫瘍では表現型、臨床像、発癌過程が異なることを示唆するものである。粘液産生が亢進している胆管内乳頭状腫瘍は良性のものから悪性のものまでさまざまなスペクトラムを形成しており、発癌起源細胞が通常型の肝内胆管癌とは異なるものと考えられ、癌源細胞も異なるものと思われる。一方、粘液をあまり産生していない胆管内乳頭状腫瘍は、通常型の肝内胆管癌と粘液産生が亢進している胆管内乳頭状腫瘍とが、その発癌過程において、すなわち発癌起源細胞、癌源細胞において混在しているものと考えられ、これらを今後網羅的に解析することによって、肝内胆管癌の癌源細胞の新たなマーカーが明らかにされる可能性があり、治療にも結びつけられる可能性を有しているものと考えられる。

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30件)

- ① Akt/mTOR signaling pathway is crucial for gemcitabine resistance induced by Annexin II in pancreatic cancer cells. Kagawa S, Takano S, Yoshitomi H, Kimura F, Satoh M, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Matsushita K, Nomura F, Miyazaki M. J Surg Res 178:758-767, 2012 (査読有) DOI: 10.1016/j.jss.2012.05.065.
- ② CXCR4/CXCL12 expression profile is associated with tumor microenvironment and clinical outcome of liver metastases of colorectal cancer. Sakai N, Yoshidome H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Sakakibara M, Miyazaki M. Clin Exp Metastasis 29:101-110, 2012 (査読有) DOI: 10.1007/s10585-011-9433-5.
- ③ 「いわゆる良性腫瘍のマリグナントプログレーション」胆道系腫瘍：大型胆管・付属腺での良性腫瘍/低異型度悪性腫瘍と癌化胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB) 診断・病理 大塚

将之、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、古川勝規、吉富秀幸、竹内 男、高屋敷 吏、久保木 知、鈴木大亮、中島正之、相田俊明、宮崎 勝 肝・胆・膵 65:471-478, 2012 (査読無)

④ Similarities and differences between intraductal papillary tumors of the bile duct with and without macroscopically visible mucin secretion. Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takano S, Kondo Y, Miyazaki M. Am J Surg Pathol 35:512-521, 2011 (査読有) DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182103f36.

⑤ 「肝内胆管、胆道、膵の腫瘍分類：WHOの新たな試みを含めて」肝内胆管・胆道 IPNB：粘液産生性、非産生性を含めて 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤厚、吉富秀幸、竹内 男、古川勝規、高屋敷吏、須田浩介、久保木 知、宮崎 勝 肝・胆・膵 62:133-140, 2011 (査読無)

⑥ Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer. Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, Shida T, Mogushi K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Ishihara T, Tanaka H, Yokosuka O, Nomura F, Miyazaki M. Br J Cancer 103:223-231, 2010 (査読有) DOI: 10.1038/sj.bjc.66.5734.

⑦ 「膵癌・胆道癌の前癌病変、リスクファクターを探る」胆道癌発癌の病理学のおよび分子生物学的メカニズム 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、吉富秀幸、竹内 男、古川勝規、高屋敷 吏、須田浩介、高野重紹、久保木 知、宮崎 勝 胆と膵 31:169-175, 2010 (査読無)

[学会発表] (計15件)

- ① 粘液産生胆管腫瘍の臨床病理学的検討と治療方針 大塚将之、清水宏明、宮崎 勝 第48回日本胆道学会学術集会(東京)2012年9月21日
- ② 腫瘍形成型肝内胆管癌における Notch2 の発現とその意義 中島正之、大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、古川勝規、吉富秀幸、竹内 男、宮崎 勝 第66回日本消化器外科学会総会(名古屋)2011年7月15日
- ③ 胆管の腫瘍分類と展開：胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB)を中心に 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、宮崎 勝 第100回日本病理学会総会(東京)2011年4月30日
- ④ 粘液産生胆管腫瘍と粘液非産生性乳頭状腫瘍は胆管内乳頭状腫瘍として一つの疾患

概念にまとめられるか？ 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、吉富秀幸、古川勝規、竹内 男、高屋敷 吏、須田浩介、高野重紹、久保木 知、宮崎 勝 第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会（仙台）2010年5月27日

⑤すべての胆管内乳頭状腫瘍は膵管内乳頭粘液性腫瘍の胆管カウンターパートか？ 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、吉富秀幸、古川勝規、竹内 男、高屋敷 吏、須田浩介、高野重紹、宮崎 勝 第110回日本外科学会学術集会(名古屋)2010年4月9日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 将之 (OHTSUKA MASAYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：90334185

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156

(3) 研究分担者

清水 宏明 (SHIMIZU HIROAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：80272318

(4) 研究分担者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：60375631