

## 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 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591985

研究課題名（和文）肝芽腫幹細胞における特異的活性化因子の機能解析と腫瘍血管構築の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of specific activation factor and elucidation of the tumor angiogenesis in hepatoblastoma stem cells

研究代表者

藤田 恵子（FUJITA KEIKO）

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80173425

研究成果の概要（和文）：

小児癌 肝芽腫の発癌機構の解明、新たな治療法の開発促進には肝芽腫幹細胞（CSC）の同定・解析が非常に重要な課題となる。肝芽腫幹細胞を分離し、免疫不全マウスに接種する in vivo 実験を通して、肝芽腫幹細胞を同定した。また、肝芽腫細胞における CD133 の分布を検討した結果、CD133 が腫瘍細胞の接着・遊走に関与することが確認され、さらに腫瘍血管の形成にもかかわることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The identification and analysis of hepatoblastoma Cancer stem cells (CSCs) can be significantly challenging in elucidating the carcinogenic mechanism of childhood cancer and developing a prognosis for a new therapy. CSCs in hepatoblastoma cells were separated, and these cells were identified in an in vivo experiment into mice. We also examined distribution of CD133 in a human hepatoblastoma cell-line. The results suggest that CD133 membrane localization plays a role in tumor cell adhesion and migration. Furthermore, the findings imply that CD133 is involved in tumor angiogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：肝芽腫、癌幹細胞、培養、CD133、腫瘍血管、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

1994年に白血病幹細胞が発見されて以来、正常幹細胞と同様の性質を有する癌幹細胞の存在が注目されてきた。従来、癌細胞と呼ばれてきた細胞の中に癌幹細胞はわずか数%しか存在しないが、自己複製能と癌形成能があり癌を悪性化するとされ、その多様性の原因が癌幹細胞の存在であるとされた。

さらに、癌幹細胞は特別な微小環境（ニッチ）内で休眠状態となっているため、増殖する癌細胞を標的とする従来の抗癌剤や放射線療法では癌幹細胞を死滅させることができず、化学療法後、癌細胞数が激減したように見えても、癌幹細胞が残存しているのではないかと考えられていた。

表面抗原に対する特異的な抗体を用いた解析やヘキスト排出能による side population 分画抽出法により癌幹細胞の解析が行われ、固形癌における癌幹細胞に関する報告もみられた。しかしながら、小児肝臓に発生する悪性腫瘍のうちもっとも罹患頻度の高い肝芽腫における癌幹細胞の報告はなかった。小児癌の発癌機構を解明し、予後判定を実施して新たな治療法の開発を進めていく上で、肝芽腫における癌幹細胞(CSC)の分離・同定・解析が非常に重要な課題と思われた。

## 2. 研究の目的

肝芽腫に対する新たな治療法の開発をめざし、肝芽腫におけるCSCの同定・分離を試みた。

さらに、肝芽腫細胞におけるCD133の分布について調べた。未分化幹細胞のマーカーであるCD133は癌幹細胞のマーカーとしても注目され、癌幹細胞の同定に応用されている。また、腫瘍の血管新生に関しても、神経膠芽腫の癌幹細胞がCD133陽性の血管内皮細胞に分化し血管新生が生じると報告された。さら

に、非接着性の循環内皮前駆細胞はCD133を発現し、この細胞が接着性の細胞に分化するとCD133の発現が停止するとされるが、細胞接着性や細胞分化度に対するCD133の機能については不明な点が多い。そこで、肝芽腫細胞におけるCD133の発現局在を調べ、その機能的意義について考察した。

### 研究目的

- (1) 培養実験モデルを用いた肝芽腫幹細胞の分離と同定
- (2) 肝芽腫幹細胞の特異的活性化因子の検出
- (3) 癌幹細胞が関与する腫瘍血管新生因子の解明および腫瘍血管構築の形態学的解析

## 3. 研究の方法

培養実験モデルを用いて、小児癌である肝芽腫細胞における癌幹細胞の存在を明らかにするとともに、癌幹細胞と腫瘍血管形成との関係について調べた。

### (1) 肝芽腫細胞培養実験モデル作成

ヒト肝芽腫細胞株(HuH-6 clone-5, well differentiated type, JCRB0401)を使用した。細胞を10%牛胎児血清(FBS), 50 $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを含むDulbecco's modified Eagle 培地を用いて37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養し、細胞がコンフルエントになった時点で実験に供した。

### (2) 肝芽腫幹細胞のソーティング

培養細胞からCSC候補集団を分散する際の指標として、超生体染色色素であるHoechst 33342の排出能の高い集団であるside population (SP)を検出するアッセイを用いた。細胞株をトリプシン/EDTAを用いて培養フラスコより回収し、PBSで洗浄した後、HBSSで浮遊させた。トリパンブルーで細胞数をカウントし、1 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mlの濃度に調整し、

Hoechst 33342 (Sigma, MO, USA) を  $5.0 \mu\text{g/ml}$  に加え、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分染色した。遠心 ( $4^\circ\text{C}$ 、 $300\text{G}$ 、5 分) し上清を除去した後、PI (最終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ ) を含む HBSS に浮遊させ、測定まで氷上で静置した。フローサイトメーター FACS Vantage SE (BD, Tokyo, Japan) により解析した。なお、ABC transporter 阻害剤である verapamil (Sigma, MO, USA) を添加し Hoechst33342 排出を阻害し、SP 分画を消失させることにより、SP 分画の細胞を確認した。

FACS Vantage SE (BD, Tokyo, Japan) を用いて、① SP 分画細胞、② non-SP (main population: MP) 分画細胞をソーティングした。

(3) ソーティングした肝芽腫癌幹細胞の免疫不全マウスへの移植実験

ヒト肝芽腫細胞株から CSC を分離・同定するにあたり、まず、HuH-6 clone-5 細胞株が適切なモデルであるか否か調べるために、培養した細胞を NOD/SCID 免疫不全マウスの皮下に接種し ( $5 \times 10^5$  個)、生体内における腫瘍産生能を確認した。培養細胞をトリプシン/EDTA を用いて培養フラスコより回収し、PBS で洗浄後、培養液で浮遊した。氷上に静置し、十分に冷やした Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, CA, USA) と 1:1 混濁液を作製後、麻酔下で NOD/SCID マウスの皮下に接種した。

実験群として、ソーティングした SP 分画細胞を NOD/SCID マウス (計 10 匹) の左前肢基部皮下に接種し (各々  $10^4$  個)、non-SP (MP) 分画細胞を同じ NOD/SCID マウス (計 10 匹) の右前肢基部皮下に接種した (各々  $10^4$  個)。接種した細胞の調整法は腫瘍形成能を確認した際と同様に Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, CA, USA) と等量混合して行った。なお、コントロールとして培養液のみと Matrigel を混合したものを同マ

ウスの後肢基部皮下に接種した。

(4) NOD/SCID マウスに形成された腫瘍確認

実験に使用した NOD/SCID マウスは 20 週後に犠牲剖検し、腫瘍形成の有無を肉眼で確認した。形成された腫瘍をパラフィン包埋し、 $5 \mu\text{m}$  に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い組織学的に調べた。

また、腫瘍細胞の増殖能を確認するために、NOD/SCID マウスに形成された腫瘍の組織培養を行った。摘出した腫瘍を眼窩用尖刃で粥状になるまで細切し、滅菌したメッシュでろ過した後、ろ液 (細胞浮遊液) を 35mm glass base dish (IWAKI, Tokyo, Japan) に散布し  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  の条件下で培養した。

細胞が培養 dish 底面に接着、増殖した段階で Hoechst33342 の排出能を確認した。培養液を除去、洗浄後、Hoechst 33342 (Sigma, MO, USA) を終濃度  $5.0 \mu\text{g/ml}$  になるように培養 dish に加えた。 $37^\circ\text{C}$  で 30 分染色し、直ちに蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

(5) 培養肝芽腫細胞における CD133 の発現局在の観察

#### 4. 研究成果

培養実験モデルを用い、肝芽腫幹細胞の分離と同定を行った。

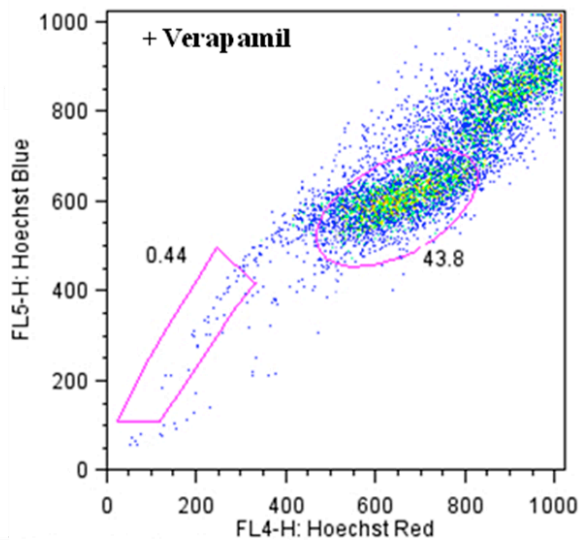
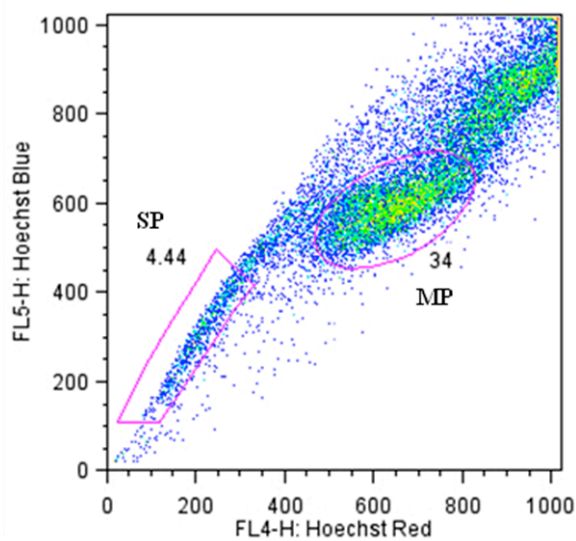
ヒト肝芽腫細胞株 (HuH-6 clone-5) から SP 分画法により CSC を分離した。SP 細胞を免疫不全マウスに移植した場合は腫瘍が形成されたが、non-SP 細胞の場合は腫瘍形成がみられず、SP 細胞は高い腫瘍形成能を有し、この細胞集団に癌幹細胞が含まれていることが示された。

In vivo 実験の結果、免疫不全マウスに接種した SP 分画細胞が自己複製したことが証明された。この結果は肝芽腫に対する CSC を標的とした新しい治療戦略に繋がると期待

される。

### 【side population 解析】

(Hayashi et al. 2011 *Pediatr Surg Int.*)



また、肝芽腫細胞におけるCD133の発現局在を電顕観察し、CD133の機能的意義について考察した。肝芽腫細胞ではCD133陽性部位は細胞膜にみられる糸状仮足および葉状仮足を含む複雑な構造を呈する部位に集中していることが明らかとなった。CD133陽性部位の局在性はCD133が肝芽腫細胞の接着・遊走に関与することを示している。

### 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2件)

① Akita M, Tanaka K, Murai N, Matsumoto S, Fujita K, Takaki T, Nishiyama H. Detection of CD133 (prominin-1) in a human hepatoblastoma cell line (HUH-6 clone-5). *Microscopy research Technique*, 査読有, (in press).

② Hayashi S, Fujita K, Matsumoto S, Akita M, Satomi A. Isolation and identification of cancer stem cells from a side population of a human hepatoblastoma cell line, HuH-6 clone-5. *Pediatric Surgery International*, 査読有, Vol. 27, 2011, pp. 9-16.

[学会発表] (計6件)

① 藤田恵子、松本幸子、藤田一正、栗崎知浩、穂田真澄、永島雅文. ヒト肝芽腫細胞におけるCD133の発現局在と機能的意義について. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013/03/29. 香川県高松市.

② 穂田真澄、松本幸子、田中嘉代子、村井則子、小松久美子、大島晋、藤田恵子. 第44回日本臨床分子形態学会総会・学術集会(ワークショップにて発表). 2012/09/28. 高知県高知市.

③ 藤田恵子、田中嘉代子、村井則子、小松久美子、松本幸子、許斐麻美、穂田真澄. 光学顕微鏡から電子顕微鏡レベルまで、同一試料のイメージング化. 第 43 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2011/09/10. 大阪市.

④ 藤田恵子、林信一、里見昭、松本幸子、大島晋、穂田真澄、永島雅文. ヒト肝芽腫細胞株における癌幹細胞の特徴. 第88回 日本生理学会大会／第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 2011/03. 東北地方太平洋沖地震のため集会は中止し、Journal of Physiological Science 誌上開催.

⑤ 藤田恵子、林信一、里見昭、松本幸子、村井則子、田中嘉代子、穂田真澄. 肝芽腫細胞における癌幹細胞の存在. 第42回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会（ワークショップにて発表）. 2010/09/24. 静岡県三島市.

⑥ 林信一、藤田恵子、松本幸子、永島雅文、穂田真澄、森村敏哉、米川浩伸、大野康治、里見昭. ヒト肝芽腫細胞株における side population の発現と癌幹細胞の分離・同定. 第 47 回 日本小児外科学会学術集会.（シンポジウムにて発表）. 2010/06/19. 愛知県名古屋市.

## 6. 研究組織

研究代表者

藤田 恵子 (FUJITA KEIKO)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80173425