

## 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 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790341

研究課題名（和文）肝ステム細胞に関連した肝線維化進展機序の分子病理学的研究

研究課題名（英文）Research of liver fibrosis associated with liver stem cells

研究代表者

池田 博子（IKEDA HIROKO）

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：10447675

研究成果の概要（和文）：ラットやマウスなどの動物研究では Delta-like protein (DLK)-1 が肝プロジェニター/ステム細胞に発現していると報告されており、一方で肝線維化に関連することが知られている肝星細胞での DLK1 発現が文献的に報告されている。ヒト肝組織における DLK1 発現を分子病理学的に解析した。その結果、DLK1 はステム細胞関連と推察される腫瘍で発現しており、DLK1 が肝癌ステム細胞のマーカーとなりうる分子であることを解明した。

研究成果の概要（英文）：The expression of Delta-like protein (DLK)-1 in hepatic progenitor/stem cell has been known in animal experiments, whereas the upregulation of DLK1 in hepatic stellate cells has been reported and implied relation to fibrosis. I examined the expression of DLK1 in human tissue. As results, The expression of DLK1 was demonstrated in liver cancer associated with stem-cell origin. It was suggested that DLK1 could be cancer stem-cell marker of the liver.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：肝病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肝線維化, ステム細胞, 病理

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌の多くは肝硬変を背景とする多段階発癌過程が想定されている。一般的に肝線維化は非可逆的とされているが、ラットを用いた検討では肝ステム細胞移植による肝線維化改善が報告された(Chang YJ., et al. Life sci 2009, Moriya K., et al. Int J Exp Pathol 2008)。一方で肝ステム細胞が肝線維化促進作用を有するという相反する報告があり

(Wang P., et al. Liver Int 2009, Syn WK., et al. Gastroenterology 2009)、肝線維化とステム細胞との関係について、一定の見解は得られていない。ラットやマウスなどの動物研究では Delta-like protein (DLK)-1 が肝プロジェニター/ステム細胞に発現していると報告されており、肝線維化に関連することが知られている肝星細胞での DLK1 発現が文献で報告された。ヒト肝組織における肝ステム細胞

胞の特異的マーカーは同定されておらず、線維化における幹細胞の関与についても不明である。従って、ヒトにおける肝線維化と幹細胞との関係について、DLK1を中心に検討する着想に至った。

## 2. 研究の目的

ヒト肝組織における肝幹細胞マーカーとしては NCAM/CD56, EpCAM, CD133 が推察されているが、少なくとも組織標本上、特異的ではなく、ヒトでの肝幹細胞の同定法は確立されていない。DLK1 と肝幹細胞との関連性を明らかとすることを目指した。また、肝星細胞における DLK1 発現や DLK1 発現量と慢性肝炎の病期との相関について検討し、DLK1 発現と肝線維化との関係を明確にすることを目指した。

## 3. 研究の方法

ヒト肝組織での DLK1 発現や DLK1 発現細胞の特性を調べるために、以下の検討を計画した。

(1)ヒト肝組織における DLK1 発現を免疫組織学的に検討し、肝幹細胞における DLK1 発現の有無を調べる。

(2)DLK1 発現細胞の特性を調べるために、NCAM/CD56, EpCAM, CD133 など推定上の肝幹細胞関連分子との二重免疫染色を施行する。

(3)ヒト肝培養細胞を用いて、DLK1 陽性細胞の増殖活性、幹細胞性、自己複製能、線維化関連分子の発現を調べる。

(4)ヒト肝組織から抽出した RNA を用いて、慢性肝炎の病期と DLK1 発現量を PCR にて検討する。

(5)ヒト肝組織における肝星細胞での DLK1 発現を免疫組織学的に調べる。

(6)ヒト培養肝星細胞における DLK1 発現を分子細胞学的に検討し、DLK1 陽性細胞をフローサイトメトリーまたは磁気細胞分離法で分離し、DLK1 陽性細胞における線維化関連分子の発現や TGFβ などのサイトカインに対する反応性を調べる。

## 4. 研究成果

ヒト肝組織での DLK1 発現を免疫組織学的に検討した。胎児肝では DLK1 は hepatoblast に発現していた。胎齢 8 週以降は次第に発現が減弱し、成人肝では DLK1 の発現はまったく見られなかった。肝硬変を含む慢性肝炎でも DLK1 の明らかな陽性所見は見られなかった。

一方、肝細胞癌や胆管細胞癌などの一部で DLK1 陽性症例があり、特に幹細胞亜型に分類される混合型肝臓癌での DLK1 陽性頻度が高かった (図 1)。

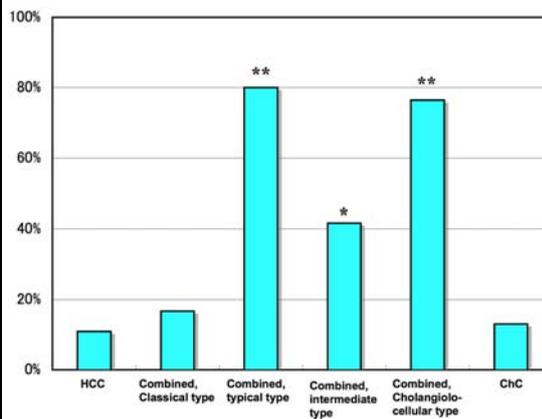


図 1 肝腫瘍における DLK1 発現頻度。HCC;Hepatocellular carcinoma, ChC;Cholangiocarcinoma.

図 1 に示すように、混合型肝臓癌のうち、幹細胞亜型に含まれる typical subtype, intermediate-cell subtype, cholangiolocellular subtype では DLK1 発現頻度は肝細胞癌と比較して有意に高く、typical subtype と cholangiolocellular subtype では胆管細胞癌や classical type の混合型肝臓癌と比較しても有意に DLK1 発現頻度が高かった。

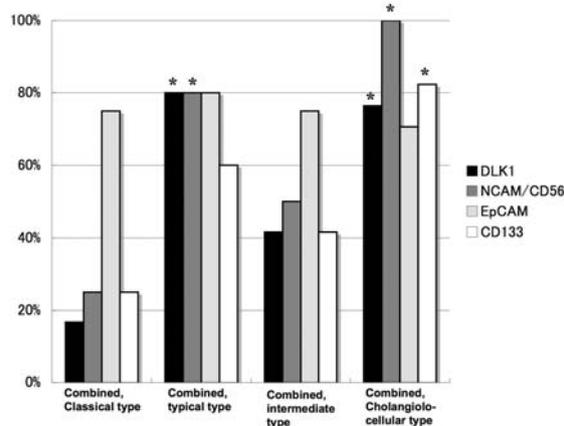


図 2 混合型肝臓癌における DLK1 発現。

図 2 では免疫染色による DLK1 発現をスコア化した (スコア 0+;0%, スコア 1+;<5%, スコア 2+;6-50%, スコア 3+;>50%)。混合型肝臓癌のうち、classical type はスコア 0 とスコア 1+のみであるのに対し、幹細胞亜型に含まれる typical subtype, intermediate-cell subtype, cholangiolocellular subtype ではスコア 3+症例が含まれている。

肝細胞癌ではスコア化した DLK1 発現は肝細胞癌マーカーである oncofetal protein の AFP や Glypican-3 と統計学的に相関していた。

一方、混合型肝癌のうち、intermediate-cell subtype では EpCAM, cholangiolocellular subtype では NCAM/CD56 と正の相関を示したが、DLK1 と EpCAM または NCAM/CD56 発現細胞は局在が異なる傾向を示した。

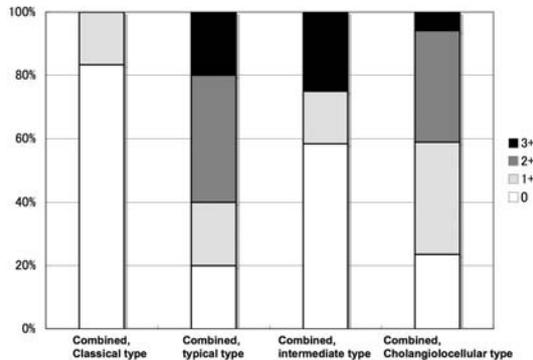


図3 混合型肝癌における肝stem細胞関連因子の発現頻度

図3に示すように、混合型肝癌の typical subtype では classical type と比較して、DLK1 と NCAM/CD56 が有意に発現頻度が高く、cholangiolocellular type では DLK1, NCAM/CD56, CD133 の有意な発現亢進がみられた。NCAM/CD56 は cholangiolocellular type では全例陽性であった。

以上より、DLK1 は胎児期 hepatoblast に発現し、成人肝で陰性化する分子で、肝腫瘍で発現の認められる oncofetal protein の一つであることが判明した。肝腫瘍では特に混合型肝癌で分子病理学的に肝stem細胞由来と推察される腫瘍群が示唆されており、2010年に改訂されたWHO分類では混合型肝癌stem細胞亜型として、typical subtype, intermediate-cell subtype, cholangiolocellular subtype の亜分類が提唱された。これらのstem細胞亜型では肝stem細胞関連分子と報告されているNCAM/CD56やCD133の発現頻度が有意に高く、DLK1もstem細胞亜型で有意な高発現を示した。当初は文献的にDLK1は非腫瘍性肝組織での線維化に関連するstem細胞マーカーの可能性があると考え、研究を開始したが、DLK1は肝stem細胞由来と推察される腫瘍群に発現しており、肝癌stem細胞マーカーとなりうる可能性が本研究によって示唆された。

癌stem細胞は自己複製能や分化能を有する細胞と考えられており、腫瘍の発生、進展、転移、再発、治療抵抗性に重要な役割を果たしていると考えられている。現在までに肝癌における癌stem細胞マーカーは同定されておらず、DLK1は有力な肝癌stem細胞

マーカーとして期待される。

今後は培養系や in vitro での実験系で DLK1 陽性腫瘍細胞をフリーサイトや磁気分離法で単離し、DLK1 陽性細胞の自己複製能、分化能、増殖能、浸潤能、治療反応性などを検討し、癌stem細胞としての特質の有無を明らかとしたい。

## 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 Ikeda H, Nakanuma Y, (他7名).  $\alpha$ -Fetoprotein-producing gastric carcinoma and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma show similar morphology but different histogenesis with respect to SALL4 expression. *Hum Pathol* 2012 (in press). (査読有り)  
DOI:10.1016/j.humpath.2011.11.022
- ② Igarashi S, Ikeda H, (他6名). Bile duct expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 in perihilar cholangiocarcinogenesis. *Histopathology* 2012 (in press) (査読有り)  
DOI:10.1111/j.1365-2559.2012.04218.x
- ③ Yoneda N, Ikeda H, (他8名). Epidermal growth factor induces cytokeratin 19 expression accompanied by increased growth abilities in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2011;91:262-72. (査読有り)  
DOI:10.1038/labinvest.2010.161
- ④ Xu J, Ikeda H, (他6名). Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in chronic advanced liver disease and the cholangiocarcinomatous component of hepatocellular cholangiocarcinoma share

common phenotypes and  
cholangiocarcinogenesis.  
Histopathology 2011;59:1090-9. (査読あり)  
DOI:10.1111/j.1365-2559.2011.04058.x

[学会発表] (計4件)

- ① 池田博子, 他. 混合型肝癌における Delta-like protein (DLK)-1 発現の免疫組織学的検討. 『日本病理学会総会』 No. P2-AM-29. 京王プラザホテル (東京). 2012年4月27日.
- ② 池田博子, 他. 混合型肝癌の新 WHO 分類と肝ステム細胞関連分子発現に関する病理学的検討. 『日本肝臓学会総会』 No. 0-168. グランパシフィック (東京). 2011年6月8日.
- ③ 池田博子, 他. 表層進展を示す胆管癌の病理組織学的検討. 『日本病理学会総会』 No. 3-I-30. パシフィコ横浜 (神奈川). 2011年4月28日.
- ④ 池田博子, 他. AFP 産生胃癌と混合型肝癌における肝ステム細胞および胚細胞系ステム細胞関連分子発現の検討. 『日本病理学会総会』 No. 1-E-8. パシフィコ横浜 (神奈川). 2011年4月27日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 博子 (IKEDA HIROKO)  
金沢大学・附属病院・准教授  
研究者番号: 10447675

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし