

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度 ～ 2011 年度

課題番号：22791278

研究課題名（和文）：肝癌幹細胞を標的とした根治的療法の開発

研究課題名（英文）：Investigation of a novel therapeutic target in liver cancer stem cells.

研究代表者：畠野 尚典 (Hatano Hisanori)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40571352

研究成果の概要（和文）：当院での HCC 切除症例 83 例のパラフィン切片を免疫染色し CD13 の発現を調べた。発現形式としては、「細胞質が染まる(40%)」・「細胞膜全体が染まる(23%)」・「毛細胆管の様に細胞間隙が染まる(100%)」といった 3 つのパターンに分類できた。一方これら発現パターンと「患者因子」・「腫瘍因子」および「予後」との関連は残念ながら見出せなかった。また全例に発現を認めた「毛細胆管様のパターン」では、癌の分化度との関連がある可能性を認めた。

研究成果の概要（英文）：In our assessment of IHC for CD13 in paraffin sections of HCC, staining patterns were categorized into three, but we couldn't find out the relationship between the CD13 expression patterns and patients' prognosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
23 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

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：(1) 肝細胞癌, (2) 胆管細胞癌, (3) 癌幹細胞, (4) 標的治療

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は、自己複製能と多分化能を有し、癌組織の階層構造の起点となる細胞である。これらの癌幹細胞を標的とすることにより癌の根治が可能であると考えられている (Nature Medicine. 2006~2009)。

癌幹細胞概念に基づく治療法は、従来の抗癌剤治療のように細胞周期が回っている細胞を標的とした薬剤や分子標的薬のように

癌の多様性(heterogeneity)に対応ができない薬剤とは異なり、癌の根源細胞である癌幹細胞を標的とすることで、癌の階層構造を消失させることにより、癌の維持を不可能にするという細胞学的な根拠に則った全く新しい癌治療法である。

われわれは、肝臓癌においては CD13+CD90-細胞が癌幹細胞様の性質を持つことを同定した。またこの結果から、CD13

が単に癌幹細胞の表面マーカーのみならず、CD13 自身が未知の機能を持ち合わせており、その機能によってCD13を発現している細胞が癌幹細胞様の性質を発現もしくは獲得しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

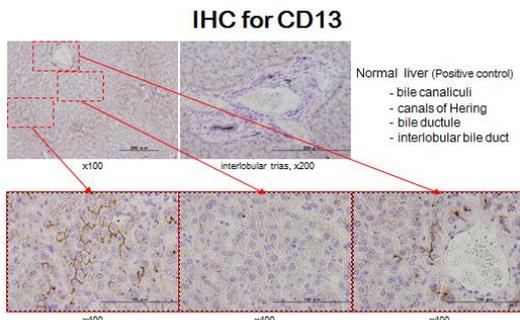
- (1) CD13 陽性細胞の腫瘍内での局在や発現様式・臨床病理学的特徴(分化度・悪性度・予後など)との関連について研究を進める。
- (2) 肝臓癌の癌幹細胞および正常肝幹細胞を分離・採取し、癌幹細胞で特に発現が亢進している遺伝子、タンパクを同定し、機能解析を行い、癌幹細胞の維持機構の解明と、癌幹細胞の標的化を行う。
- (3) ウイルス性肝障害に依存するところが大きい肝臓癌においては、肝臓癌の発生を予想することが重要となる。幹細胞における遺伝子変化をスクリーニングすることにより、肝臓癌発症の段階的なリスク分類と予想システムを構築する。

3. 研究の方法

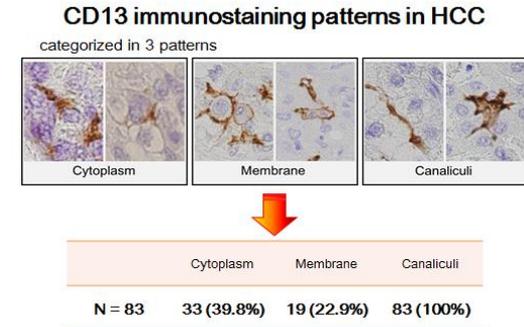
- (1) 当院での肝切除症例のパラフィン切片を免疫染色しCD13の発現を調べる。
- (2) 手術症例より、肝臓癌の癌幹細胞および正常肝幹細胞を分離・採取し、チップ解析を用いて、癌幹細胞で特に発現が亢進している遺伝子、タンパクを同定する。同定した分子の機能解析を行い、癌幹細胞の標的化が可能か(抗腫瘍効果を有するか)を、*in vivo*で検索する。
- (3) 肝障害の程度に準じた手術検体より幹細胞を分離し、幹細胞における遺伝子変化を検索する。

4. 研究成果

- (1) HCCにおけるCD13の発現を確認し、臨床病理学的特徴を明らかにするといった目的で当院での肝切除症例83例のパラフィン切片を免疫染色しCD13の発現を調べた。
 - ① 条件設定を行い、ポジティブコントロールとしては肝移植ドナーの正常肝を用いた。毛細胆管や細胆管、小葉間胆管が染色されていた。



- ② 一方HCでは、CD13の発現を「細胞質が染まるパターン(細胞質)」・「細胞膜全体が染まるパターン(細胞膜)」・「毛細胆管の様に細胞間隙が染まるパターン(毛細胆管)」といった3つのパターンに分類された。その結果、「細胞質」は40%の33例・「細胞膜」は23%の19例に発現を認め、また全例に「毛細胆管」での発現を認めた。



先ず「細胞質」と「細胞膜」に関して臨床病理学的特徴との関連を調べた。

- ③ CD13の発現パターンとクリニカルファクターとの関連では、年齢・性別・ウイルス感染や背景肝・術前TACEの有無では、有意な因子は認めなかった。

Clinical factors

	Cytoplasm			Membrane		
	Positive (n=33)	Negative (n=50)	P	Positive (n=19)	Negative (n=64)	P
Age (years)	63.0 ± 8.3	62.7 ± 12.5	0.906	62.4 ± 14.6	62.9 ± 9.8	0.875
Gender (male / female)	26 / 7	37 / 13	0.616	14 / 5	49 / 15	0.798
Primary diagnosis						
HCV (n=42)	16 (48.5%)	26 (52.0%)	0.754	8 (42.1%)	34 (53.1%)	0.398
HBV (n=28)	8 (24.2%)	15 (30.0%)	0.664	7 (36.8%)	16 (25.0%)	0.635
non-B, non-C (n=21)	9 (27.3%)	12 (24.0%)	0.680	7 (36.8%)	14 (21.9%)	0.275
Child-Pugh (A / B)	29 / 4	45 / 5	0.762	15 / 4	59 / 5	0.127
Liver damage (A / B)	22 / 11	26 / 24	0.183	10 / 9	38 / 26	0.602
Liver cirrhosis (n=42)	13 (39.4%)	20 (40.0%)	0.115	6 (31.6%)	27 (42.2%)	0.395
Preoperative TACE (n=39)	18 (54.6%)	21 (42.0%)	0.262	7 (36.8%)	32 (50.0%)	0.310

続いて、腫瘍因子との関連では、腫瘍径・個数・血管浸潤では有意差を認めなかったが、発育形式およびステージ間で有意差を認めた。分化度・腫瘍マーカー・更に再発形式においては、統計学的に有意差を認めなかった。

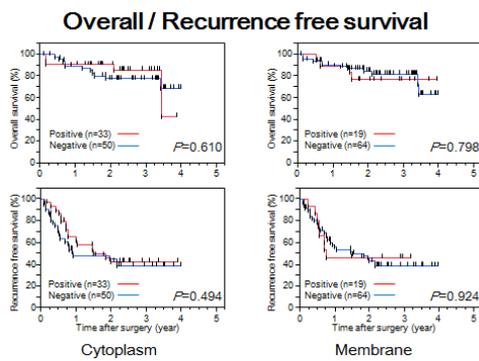
Tumor-related factors 1

	Cytoplasm			Membrane		
	Positive (n=33)	Negative (n=50)	P	Positive (n=19)	Negative (n=64)	P
Size (cm)	4.63 ± 3.41	5.23 ± 4.21	0.481	6.31 ± 5.06	4.60 ± 3.44	0.182
Number	2.42 ± 2.15	2.62 ± 2.99	0.730	3.26 ± 3.51	2.33 ± 2.36	0.287
Eg / Ig	27 / 6	48 / 2	0.033*	16 / 3	59 / 5	0.326
Fc (n=39)	24 (72.7%)	35 (70.0%)	0.788	14 (73.7%)	45 (70.3%)	0.775
Fc/inf (n=50)	22 (66.7%)	28 (56.0%)	0.433	12 (63.2%)	38 (59.4%)	0.953
Sf (n=42)	30 (90.9%)	39 (78.0%)	0.111	15 (79.0%)	54 (84.4%)	0.587
Microscopic vascular invasion (n=22)	12 (36.4%)	10 (20.0%)	0.101	4 (21.1%)	18 (28.1%)	0.533
Stage			0.019*			0.420
I (n=7)	0 (0%)	7 (14.0%)		2 (10.5%)	5 (7.8%)	
II (n=37)	16 (48.5%)	21 (42.0%)		8 (42.1%)	29 (45.3%)	
III (n=18)	6 (18.2%)	12 (24.0%)		3 (15.8%)	15 (23.4%)	
IVa (n=16)	10 (30.3%)	6 (12.0%)		3 (15.8%)	13 (20.3%)	
IVb (n=9)	1 (3.0%)	4 (8.0%)		3 (15.8%)	2 (3.1%)	

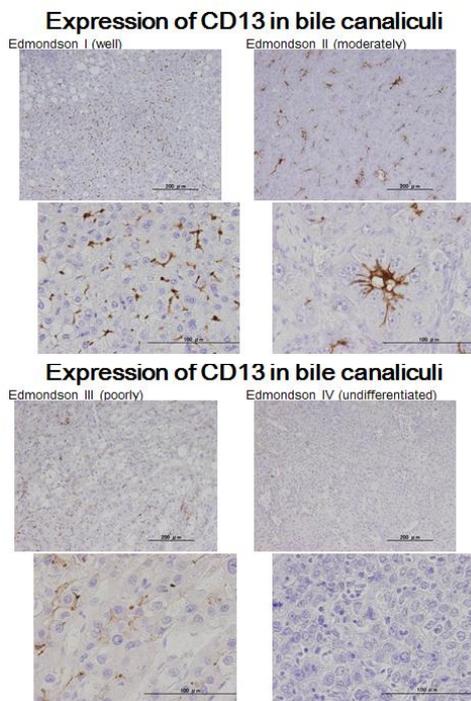
Tumor-related factors 2

	Cytoplasm			Membrane		
	Positive (n=33)	Negative (n=50)	P	Positive (n=19)	Negative (n=64)	P
Edmondson			0.849			0.898
I (n=7)	3 (9.1%)	4 (8.0%)		1 (5.3%)	6 (9.4%)	
II (n=26)	12 (36.4%)	14 (28.0%)		7 (36.8%)	19 (29.7%)	
III (n=16)	16 (48.5%)	29 (58.0%)		10 (52.6%)	35 (54.7%)	
IV (n=9)	2 (6.1%)	3 (6.0%)		1 (5.3%)	4 (6.0%)	
AFP (ng/ml)	12899 ± 67791	16716 ± 80038	0.783	28709 ± 84729	11064 ± 64860	0.402
PIVKAII (nAU/ml)	13817 ± 60550	14318 ± 36508	0.961	17063 ± 44782	13246 ± 41888	0.743
Recurrence			0.723			0.799
No rec. (n=35)	16 (48.5%)	19 (38.0%)		7 (36.8%)	28 (43.8%)	
Single (n=21)	8 (24.2%)	13 (26.0%)		4 (21.1%)	17 (26.6%)	
Multiple (n=17)	5 (15.2%)	12 (24.0%)		5 (26.3%)	12 (18.8%)	
Extrahepatic (n=10)	4 (12.2%)	6 (12.0%)		3 (15.8%)	7 (10.9%)	

④ オーバーオールサバイバルとリカレンスフリーサバイバルについても検討したが、いずれの場合も有意差は認めなかった。



⑤ また全例に発現を認めた「毛細胆管」で検討を行った。



高分化である Edmondson I では比較的細く細胞間隙が染まるが、中分化の II では比較的広く間隙が染まり pseudogland の内側で

も染色されていた。発現範囲としては I・II 共に腫瘍全範囲に渡って濃く染色されていた。更に低分化である III では腫瘍の一部で部分的に比較的淡く発現しており、未分化の IV では散発的に淡く確認されるのみであった。

⑥ 以上から、HCC のパラフィン切片における CD13 の免疫染色では、発現は 3 つのパターンに分類できたが、この発現パターンと予後との関連は残念ながら見出せなかった。また全例に発現を認めた「毛細胆管」では、癌の分化度との関連がある可能性を認めた。

(2), (3) 今後は更に詳細な検討と、癌幹細胞を更に明確に同定できるマーカーの検索を行い、全く新しい治療法の開発を目指している。また肝臓癌における幹細胞発癌を解明し、幹細胞における遺伝子変化を解析することにより、発癌リスク診断や発癌予防薬の開発に繋がるものと思われる。

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 3 件)

- ① Kim HM, Haraguchi N, Ishii H, Ohkuma M, Okano M, Mimori K, Eguchi H, Yamamoto H, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenomenon. *Annals of Surgical Oncology*. 2011 Aug 31
- ② Haraguchi N, Ishii H, Nagano H, Doki Y, Mori M. The future prospects and subject of the liver cancer stem cells study for the clinical application. *Gastroenterology*. 2011 Feb 23.
- ③ Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, Akita H, Takiuchi D, Hatano H, Nagano H, Barnard GF, Doki Y, Mori M. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest*. 2010 Sep;120(9):3326-39. doi: 10.1172/JCI42550. Epub 2010 Aug 9.

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Hisanori Hatano, Shigeru Marubashi, Naotsugu Haraguchi, Hiroshi Wada, Shogo Kobayashi, Hidetoshi Eguchi, Masahiro Tanemura, Hideshi Ishii, Koji Umeshita, Hiroaki Nagano, Yuichiro Doki, Masaki Mori.
肝細胞癌臨床検体における CD13 発現の検討
第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 04 日、名古屋市
- ② Daisuke Takiuchi, Hidetoshi Eguchi, Naotsugu Haraguchi, Hisanori Hatano, Hiroshi Wada, Shogo Kobayashi, Shigeru Marubashi, Masahiro Tanemura, Hideshi Ishii, Koji Umeshita, Hiroaki Nagano, Yuichiro Doki, Masaki Mori.
肝癌の癌幹細胞マーカーの同定と膀胱癌での検討
第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪市
- ③ 畠野 尚典, 原口 直紹, 石井 秀始, 瀧内 大輔, 和田 浩志, 小林 省吾, 丸橋 繁, 江口 英利, 武田 裕, 種村 匡弘, 永野 浩昭, 土岐 祐一郎, 森 正樹.
肝癌における癌幹細胞の分離・同定と標的治療の可能性
第 31 回癌免疫外科研究会、2010 年 5 月 21 日、大阪市
- ④ Daisuke Takiuchi, Naotsugu Haraguchi, Hisanori Hatano, Hideshi Ishii, Koji Umeshita, Hiroaki Nagano, Yuichiro Doki, Masaki Mori.
CD13 is a novel dormant cancer stem cell marker of liver and has a potency as a novel therapeutic target
The 8th Stem Cell Research Symposium、2010 年 5 月 14 日、兵庫県洲本市

〔図書〕（計 2 件）

- ① 畠野 尚典, 原口 直紹, 石井 秀始, 永野 浩昭, 土岐 祐一郎, 森正樹.
肝がん幹細胞とその治療標的化
羊土社、実験医学 vol.29 No.13 (8 月号)
2011. 総ページ数 130
- ② 畠野 尚典, 原口 直紹, 石井 秀始, 瀧内 大輔, 永野 浩昭, 土岐 祐一郎, 森正樹.
癌幹細胞の分離、培養と機能解析
メディカルレビュー社、Surgery Frontier 2010 年 6 月号 2010. 総ページ数 100

畠野 尚典 (HATANO HISANORI)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40571352

(

6. 研究組織
(1)研究代表者