

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659593

研究課題名(和文) エピジェネティクスリセットによる革新的ヒト肝発癌メカニズム解析

研究課題名(英文) Elucidation of liver carcinogenesis mechanism by epigenetic reprogramming.

## 研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：HCC細胞株に対し山中4因子を導入したところ、約2週間後にiPS細胞様のコロニーが形成された。形成されたコロニーを顕微鏡下で取得し、独立に培養し形態観察、遺伝子発現解析、免疫不全マウスへの移植を行った。未分化マーカーおよび肝細胞マーカーの発現はHCC細胞株に比べ、肝細胞マーカーであるHNF4の発現低下と未分化マーカーであるSox2の発現上昇が見られた。しかしながら、未分化マーカーの発現はiPS細胞と比べ低かった。免疫不全マウス(NOD/scid)の精巣へ移植しテラトーマ形成の有無を検証した。すると樹立したクローンからテラトーマの形成は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：As a result of introduction of the 4 factors to the HCC cell lines, colonies of iPS cell-like is formed after about 2 weeks. The established clones were investigated by morphological observation, gene expression analysis and the transplantation into immunodeficient mice. Expression of hepatocyte marker HNF4 in comparison with HCC cell lines were decreased. And increased expression of Sox2, undifferentiated marker, was observed. However, the expression of undifferentiated markers were lower compared with iPS cells. To verify the presence or absence of teratoma formation capability, clones were transplanted into the testes of immunodeficient mice (NOD / scid). However no teratoma formation was observed from clones that were established in this study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：癌 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞作成のリプログラミング技術によって、分化した機能細胞から多能性幹細胞の状態にエピジェネティック修飾をリセットすることが可能となった。本研究ではリプログラミング技術を再生医学研究ではなく癌研究に応用するという新しい着想に基づくものである。

肝癌の大部分は肝炎ウイルスの感染により引き起こされるウイルス性肝炎に起因することが明らかとなっている。しかし、肝炎ウイルスという共通項以外、肝癌に見られる遺伝子変異は多様であり、ある責任遺伝子はわずか数%の患者での共通性しか見られない場合が多い。近年、がんにおけるエピジェネティック修飾が注目されているが、上記のことから申請者は肝癌発生・転移・再発の体系的に理解する上で、肝癌におけるエピジェネティック修飾を理解することが必須であると考えている。

### 2. 研究の目的

近年、がんにおけるエピジェネティック修飾の重要性が注目されている。肝細胞癌(HCC)は原因遺伝子が多様であり、HCC を体系的に理解し治療へとつなげるためにはエピジェネティック修飾異常に基づく発癌の理解が重要である。本研究では、HCC 臨床検体を用いて HCC を iPS 細胞化することによりエピジェネティック修飾をリセットするという革新的手法に基づき、リセットした HCC から分化誘導した肝臓系列細胞(iHCC)において腫瘍形成能が失われるか検討する。エピジェネティック修飾のリセットにより腫瘍形成能が失われる iHCC と元の HCC の間でのエピジェネティック修飾状態を網羅的に解析することで、エピジェネティクスリセットによる革新的肝発癌メカニズム解析をおこなうものである。

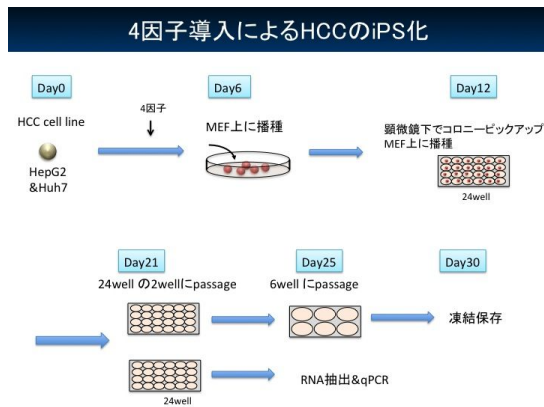
### 3. 研究の方法

本研究ではエピジェネティクスリセットによる革新的肝発癌メカニズム解析を行う。まず、臨床検体から得られた HCC を iPS 細胞化によりエピジェネティック修飾をリセットし、iPS 細胞から独自プロトコールにより肝細胞(iHCC)へ分化誘導する。このとき、エピジェネティック修飾変異により腫瘍形成能を獲得した HCC ではエピジェネティック修飾リセット後の iHCC は腫瘍形成能を失っていると想定される。腫瘍形成能を失った iHCC

を同定し、元の HCC と iHCC のエピジェネティック修飾状態を独自の微量サンプルからのエピジェネティック修飾を解析する。

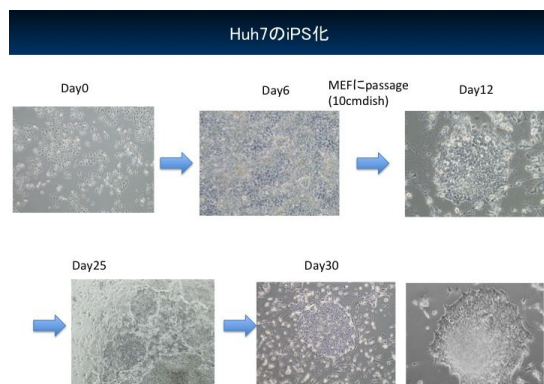
### 4. 研究成果

日本における最新のがん統計によると、がん罹患率は35年前の4倍になっており、その中で肝臓がんは2012年のがんによる死亡者数が多い部位の第5位となっている。肝細胞癌(HCC)は原因遺伝子が多様であり、HCC を体系的に理解し治療へ結びつけるためには、エピジェネティック修飾に基づく発癌の理解が重要である。



上図に概要を示した。HCC 細胞株に対し山中4因子を導入したところ、約2週間後にiPS細胞様のコロニーが形成された。形成されたコロニーを顕微鏡下で取得し、独立に培養し形態観察、遺伝子発現解析、免疫不全マウスへの移植を行った。

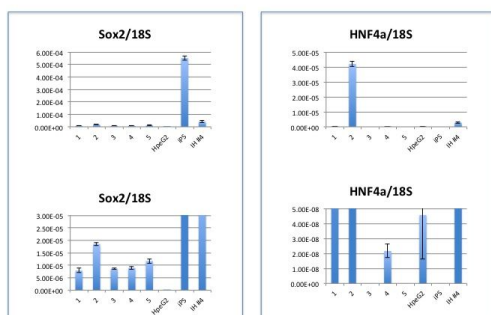
形成されたコロニーは下記図に示すような、iPS細胞様の形態を維持していた。一方、ここには示さないが、継代を経るとiPS細胞様の形態を維持できないクローンも見られた。



次に得られた複数のクローンよりRNAを抽出し、qPCRにより未分化マーカーおよび肝細胞マーカーの発現をiPS細胞およびHCC細胞株と比較した。すると、HCC細胞株に比べ、肝細胞マーカーであるHNF4の発現低下と未分

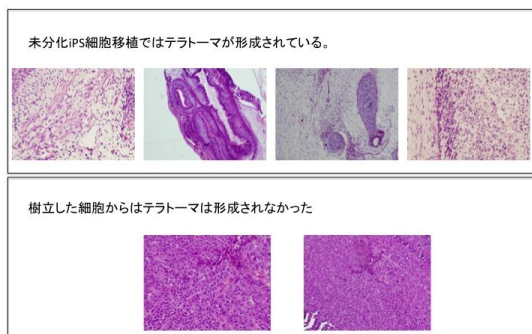
化マーカーである Sox2 の発現上昇が見られた。しかしながら、未分化マーカーの発現は iPS 細胞と比べ低かった。

未分化マーカーおよび肝細胞マーカーの発現



次に得られたクローンを免疫不全マウス (NOD/scid) の精巣へ移植しテラトーマ形成の有無を検証した。すると下図に示すように未分化 iPS 細胞からはテラトーマが形成されたものの、樹立したクローンからテラトーマの形成は見られなかった。

免疫不全マウスに移植して形成された癌組織



これらのことから、完全な未分化状態へのリプログラミングが行われなかったと考えられる。これは既存のヒト肝癌細胞株には数多くの染色体異常が報告されており、リプログラミング因子を導入後のリプログラミングに必要な因子を欠損しているか、未分化状態を維持する遺伝子が欠損している可能性が考えられた。そこで、さらにヒト肝癌細胞と共に正常細胞としてヒト線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を平行して実施した。肝癌細胞株を用いて、リプログラミング因子を導入すると HNF4 の発現低下や未分化マーカーの発現上昇が観察された。しかし、線維芽細胞を用いて作製した iPS 細胞と比べると未分化マーカーの発現が低く、完全なリプログラミングは観察されなかった。一方、線維芽細胞より樹立した iPS 細胞については肝臓系列

細胞へと分化誘導すると、肝分化マーカー遺伝子の発現およびアルブミン分泌をタンパク質レベルで検出したため、実験系に問題ないことが確認された。以上の事から、今後更に多くの幹細胞癌を対象とし特に臨床検体など長期的な培養により染色体の欠損などの異常が蓄積していない細胞を対象とした解析が必要であると考えられる。また、肝癌だけでなく、遺伝子異常が明らかとなっている膵癌や肺癌を対象とすることで、癌化に関わるエピジェネティック修飾を明らかにすることが可能となると考えられる。

## 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 13 件)

Okuda R, Sekine K, Hisamatsu D, Ueno Y, Takebe T, Zheng YW, Taniguchi H. Tropism of cancer stem cells to a specific distant organ *In Vivo* 28(3):361-5. (2014) 査読有り

Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T, Li B, Takebe T, Zhang RR, Sakurai Y, Ueno Y, Sekine K, Ishibashi N, Imajima M, Tanaka T, Taniguchi H. The CD133+CD44+ Precancerous Subpopulation of Oval Cells is a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma *Stem Cells Dev.* in press. (2014) 査読有り

Sekine K, Takebe T, Taniguchi H. Fluorescent labeling and visualization of human induced pluripotent stem cells with the use of transcription activator like effector nucleases *Transplant Proc*, 46(4):1205-7. (2014) doi: 10.1016/j.transproceed.2014.02.003 査読有り

Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Nakata S, Ouchi R, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono KI, Koseki H, Taniguchi H. Ring1B promotes hepatic stem/progenitor cell expansion via simultaneous suppression of Cdkn1a and Cdkn2a. *Hepatology*. 2014 Feb 4. doi: 10.1002/hep.27046. (2014) 査読有り

Takebe T, Koike N, Sekine K, Fujiwara R, Amiya T, Zheng YW, Taniguchi H. Engineering of human hepatic tissue with functional vascular networks.

*Organogenesis*. 10(2) . [Epub ahead of print] (2014) 査読有り

Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, Koike N, **Sekine K**, Taniguchi H  
Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols* 9, 396-409 (2014) doi: 10.1038/nprot.2014.020. 査読有り

Zheng YW, Nie YZ, Tsuchida T, Zhang RR, Aoki K, **Sekine K**, Ogawa M, Takebe T, Ueno Y, Sakakibara H, Hirahara F, Taniguchi H. Evidence of a sophisticatedly heterogeneous population of human umbilical vein endothelial cells. *Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1251-3 doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.077. 査読有り

Zhang R, Takebe T, **Sekine K**, Koike H, Zheng Y, Taniguchi H. Identification of proliferating human hepatic cells from human induced pluripotent stem cells. *Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1201-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.021. 査読有り

Tsuchida T, Zheng YW, Zhang RR, Takebe T, Ueno Y, **Sekine K**, Taniguchi H. The development of humanized liver with Rag1 knockout rats. *Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1191-3 doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.026. 査読有り

Takahashi Y, Takebe T, Enomura M, Koike N, Lee S, Nemenko JG, **Sekine K**, Lee JI, Taniguchi H. High-resolution intravital imaging for monitoring the transplanted islets in mice. *Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1166-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.089. 査読有り

Takebe T, **Sekine K**, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H  
Vascularized and functional human liver tissue from an induced pluripotent stem cell-derived organ bud transplant. *Nature* 499(7459):481-484. (2013) doi: 10.1038/nature12271. 査読有り

Tanaka H†, Tanaka S†, **Sekine K**†, Kita

S, Okamura A, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J and Taniguchi H. †equal contribution.

The generation of pancreatic  $\alpha$ -cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials* 34( 23), 5785-5791. (2013) doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.003 査読有り

Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Shiode-Fukuda Y, Yu T, **Sekine K**, Sato T, Kawano H, Aihara KI, Nakamichi Y, Watanabe T, Shindo M, Inoue K, Inoue E, Tsuji N, Hoshino M, Karsenty G, Metzger D, Chambon P, Kato S, Imai Y. Vitamin D Receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology*. 154(3):1008-1020. (2013) doi: 10.1210/en.2012-1542. 査読有り

Koike H†, Kubota K†, **Sekine K**†, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H. †equal contribution. Establishment of Automated Culture System for Induced Pluripotent Stem Cells *BMC Biotechnol.*, 12:81 (2012) doi: 10.1186/1472-6750-12-81. 査読有り

Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen YR, **Sekine K**, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T, Miyajima A. Inhibition of Stabilin-2 elevates the circulating hyaluronic acid level and prevents tumor metastasis *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109 (11) 4263-4268. (2012) doi: 10.1073/pnas.1117560109. 査読有り

**Sekine K**, Takebe T, Enomura M, Matsui C, Tanaka H, Taniguchi H. Regenerative medicine approach as an alternative treatment to islet transplantation. *Transplant Proc*, 44 (4), 1104-1106. (2012) doi:10.1016/j.transproceed.2012.03.020. 査読有り

**Sekine K**, Takebe T, Suzuki Y, Kamiya A, Nakauchi H, Taniguchi H. Highly efficient generation of definitive endoderm lineage from human induced pluripotent cells. *Transplant Proc*, 44 (4), 1127-1129. (2012) doi: 10.1016/j.transproceed.2012.03.001. 査読有り

Takebe T, **Sekine K**, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H.

Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro.

*Transplant Proc*, 44 (4) 1018-1020. (2012)  
doi: 10.1016/j.transproceed.2012.02.007.  
査読有り

Takebe T, Koike N, Sekine K, Enomura M, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H.

Generation of human vascular network in vitro.

*Transplant Proc*, 44 (4), 1130-1133. (2012)  
doi: 10.1016/j.transproceed.2012.03.039.  
査読有り

〔学会発表〕(計 10件)

久松大介、奥田 諒、関根圭輔、上野康晴、谷口英樹：膵癌幹細胞の系譜解析に向けた in vitroアッセイ系の構築 第13回日本再生医療学会総会 Mar.4-6,2014 京都

奥田諒、関根圭輔、孫略、坪井康次、谷口英樹：Pdx1 陽性細胞は高い腫瘍形成能とスフィア形成能を有する癌幹細胞である 第72回日本癌学会学術総会 Oct.3-5,2013 神奈川

関根圭輔、孫略、奥田諒、谷口英樹：膵幹/前駆細胞の膵癌幹細胞への形質転換プロセスの解析 第72回日本癌学会学術総会 Oct.3-5,2013 神奈川

星野小百合、関根圭輔、孫略、中田晋、寺崎哲也、森永総一郎、宮城洋平、遠藤格、横瀬智之、倉田昌直、上野康晴、谷口英樹：ヒト膵癌幹細胞における治療抵抗性機構の解析 第72回日本癌学会学術総会 Oct.3-5,2013 神奈川

Sekine K, Takebe T, Zhang R, Taniguchi H: Fluorescence visualization of human induced pluripotent stem cells using transcription activator-like(TAL) effector nucleases. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. Kyoto, Japan, Sep 2-6, 2013

Ueno Y, Hoshino S, Tsuchida N, Nakata S, Uchida Y, Sekine K, Zheng YW, Kurata M, Morinaga S, Miyagi Y, Yokose T, Endo I, Terasaki T, Hirano H, Taniguchi H: Targeted proteomic absolute quantification on transporters of human pancreatic cancer cells with gemcitabine-resistance. HUP0 12th annual world congress. Yokohama, Japan, Sep 14-18, 2013

奥田諒、孫略、関根圭輔、松井智栄美、坪

井康次、谷口英樹：膵癌幹細胞の in vitroアッセイ系の解析 第35回日本分子生物学会年会 Dec.11-14,2012 福岡

孫略、奥田諒、関根圭輔、盛武敬、坪井康次、谷口英樹：膵癌モデルマウスを用いた膵癌幹細胞の細胞系譜解析 第71回日本癌学会学術総会 Sep.19-21,2012 札幌

関根圭輔、孫略、奥田諒、谷口英樹：膵肝/前駆細胞の膵癌幹細胞への形質転換プロセスの解析 第71回日本癌学会学術総会 Sep.19-21,2012 札幌

Sekine K, Ishikawa M, Takebe T, Suzaki A, Kawashimo K, Matsui C, Taniguchi H: Identification of pancreatic stem/progenitor cells expressing PDX1 reside in the CD133 positive pancreatic duct. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16,2012

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：00323569

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：  
(3)連携研究者

( )

研究者番号：