

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659610

研究課題名(和文)肝細胞癌における転移・再発に関する癌幹細胞の同定及び解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer stem cells related to metastasis and recurrence in hepatocellular carcinoma

研究代表者

岡 正朗 (OKA, MASA AKI)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70144946

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)：肝内転移のために再発頻度の高い肝細胞癌を対象として、肝内転移の抑制を目的とし、転移性の癌幹細胞に対するマーカーの同定を試みた。我々の開発した特殊培地によるSphere誘導系において、低分化型及び未分化型肝細胞癌由来のSK-HEP-1及びHLEから、抗癌剤耐性及び肝転移能の亢進したSphere細胞を誘導することに成功した。また、Sphere細胞における、間葉系マーカーの発現亢進、及び活性酸素除去系の亢進を確認した。さらに、複数のOmics解析の統合解析によって、新規の癌幹細胞に対するマーカー及び治療標的の候補分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：The possible existence of plasticity between cancer stem cells and their more differentiated derivative cancer cells was suggested. We successfully induced cancer stem-like sphere cells from human HCC cell lines with specified medium. Poorly differentiated HCC derived SK-HEP-1 and undifferentiated HCC derived HLE cell lines efficiently formed spheres (SK-sphere and HLE-sphere). In the presence of several anti-cancer drugs except sorafenib, the cell viability of SK-sphere and HLE-sphere were significantly higher than that of parental cells. SK-sphere showed higher HIF1A mRNA expression, more CD44 variant-positive cells, and lower ROS production compared to parental cells. Integrated analysis showed that HIF1A and its downstream genes were up-regulated in SK-sphere. Finally, we identified several new marker and therapy target candidates (mRNA, microRNA, and protein) to cancer stem cells by integrated omics analysis.

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：肝癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は多中心性発癌に加えて、肝内転移によって再発率の高い予後不良な癌種である。転移・再発の原因として、上皮間葉系移行 (EMT) や癌幹細胞 (CSCs) が重要と考えられている。乳癌においては、EMT を起こした癌細胞が CSCs 様の表現型を示すことも報告されており、従来の CSCs を頂点とする癌細胞の階層性は絶対ではなく、CSCs や分化した癌細胞からも転移性の CSCs が発生する可能性がある。また、CSCs は抗癌剤・放射線治療に対する抵抗性を有しており、癌の根治のためには CSCs を標的にした治療法が求められている。しかしながら、これまでに肝癌細胞株から分離された CSCs は高分化型由来であり、高い転移・浸潤能を示す低分化型由来からは分離されていない。そこで、転移性の CSCs を得るために、低分化型由来の肝癌細胞株から CSCs の表現型の一つ細胞浮遊塊 (Sphere) の誘導培養を試み、これを解析することとした。本研究は、低分化型由来の細胞株から得られる Cancer stem 様細胞が、転移・再発および抗癌剤耐性に重要であるとの仮説の下、新たなマーカーの同定や転移・再発の抑制方法の開発へと展開していくものである。

2. 研究の目的

肝内転移のために再発頻度の高い肝細胞癌を対象として、肝内転移の抑制を目的とする。従来の癌細胞の階層性の頂点に位置する CSCs ではなく、新たに癌の進展に伴って発生すると考えられる転移性の CSCs に対するマーカーの同定及びその機能解析を行う。高い転移・浸潤能を有する低分化型由来の細胞株から CSCs 表現型である Sphere を独自に誘導し、これを解析する。

3. 研究の方法

肝細胞癌より樹立されたヒト肝癌細胞株を当科で開発した培養液を用い培養することで Sphere 細胞を誘導した。この培養液は neural survival factor-1 を含むことを特徴とする (消化器系がん幹細胞を培養するための無血清培地、及びそれを用いた消化器系がん幹細胞の増殖方法; 特願 2012-47433)。この方法で得られた Sphere 細胞について、stemness マーカー発現、既知の CSC マーカー発現、抗癌剤耐性能、マウス腫瘍形成能、細胞周期を親株と比較した。

肝転移能は免疫不全マウスへの脾臓注入による経門脈的肝転移モデルにより評価した。抗癌剤感受性は MTS アッセイにより評価した。mRNA 発現解析には RT real-time PCR を用い、タンパク発現及び細胞周期解析にはフローサイトメトリーを用いた。また、活性酸素種生産量を DCFH から DCF への酸化反応によって測定した。

新規の CSC マーカー及び CSC 治療標的の探索として、DNA chip 解析 (mRNA, microRNA)、

iTRAQ 標識 2D LC-MS/MS 解析 (protein) を行い、これらの統合解析によって候補分子を同定した。また、パスウェイ解析には Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェアを用いた。

4. 研究成果

研究開始時の独自仮説に基づき、幹細胞用の培地を基にした特殊培地を用いることで Sphere 形成の誘導を試み、CSCs はほとんど含まれていないとされる低分化型由来肝細胞癌細胞株 (SK-HEP-1) から高効率に Sphere を誘導できることを確認した。また、未分化型肝細胞癌由来細胞株 (HLE) から Sphere 細胞の形成が確認されたが、高分化型肝細胞癌由来細胞株 (HuH-7, Hep 3B) からは、Sphere 細胞の形成は観察されなかった。

誘導された Sphere 細胞 (SK-sphere) は、元の SK-HEP-1 株と比較して、幹細胞マーカー (NANOG and LIN28A) の mRNA 発現が亢進し、ALDH1 の mRNA 発現及び活性の亢進が観察された。既知の肝細胞癌 CSC マーカーについては、これまでの高分化型肝細胞癌から単離された CSCs とは、異なるプロファイルを示した。具体的には、CD44 variant の発現は Sphere 細胞において亢進したが、CD24 の発現は低下した。また、CD133 については、親株でも Sphere でも発現がほとんど見られなかった。

SK-sphere は、免疫不全マウスへの脾臓注入実験 (経門脈的肝転移モデル) から、肝転移能の亢進を示した。SK-sphere 及び HLE-sphere は、それぞれの親株と比較して、5-FU、シスプラチンを含む種々の抗癌剤に対して有意に耐性を示した。しかしながら、ソラフェニブに対する耐性には有意な差は見られなかった。

抗癌剤耐性機構として、薬剤排出に関わる ABC トランスポーターの一つ、ABCG2 の発現を解析したところ、親株と比較して SK-sphere での発現亢進が確認された。細胞周期において、SK-sphere は親株と比べて G0/G1 期の割合の増加と P21 mRNA 発現の増加を示した。また、活性酸素除去系の亢進として HIF1 α や CD44variant の発現亢進、これに伴う細胞内活性酸素生産の低下を確認した。さらに、SK-sphere の EpCAM の減少と Vimentin の増加がタンパクレベルで確認され、上皮間葉系移行の亢進が示唆された。

続いて、CSC の網羅的遺伝子解析および蛋白解析を行った。複数の網羅的解析の統合解析によって、術後肝内再発に対する治療標的もしくは予後マーカーの候補分子を同定することが出来た。まず、親株と比較して Sphere 細胞で発現が亢進し、術後無再発症例と比較して術後再発症例において発現が高く、さらに非癌部と比較しても発現が高い、1 つの Hypoxia と関連する遺伝子を候補分子として得た。また、親株と比較して Sphere 細胞で発現が低下する microRNA を 1 つ同定した (DNA chip 解析、qPCR 解析)。さらに、

この microRNA の制御下にあると考えられる 11 の遺伝子を同定した。これら 11 の内、microRNA による制御機構として 3 遺伝子はタンパクレベルでの発現変動に比べて mRNA レベルでの発現変動が小さく翻訳レベルでの制御にあると示唆され、4 遺伝子はタンパクレベルだけでなく mRNA レベルでも発現変動が見られ mRNA の安定性における制御と示唆された。残りの 4 つはタンパクレベルでの発現変動を確認できていない。

上述の通り、有望な候補分子を複数得ることが出来、特に、統合解析から Hypoxia に関する遺伝子群の重要性が示唆された。また、高い転移・浸潤能を有する低分化型由来の細胞株からの CSCs 表現型を有する Sphere 誘導について、論文を国際専門誌に投稿中である。

今後、本研究によって得られた CSC マーカー及び CSC 治療標的分子について、validation 実験を進める。具体的には、それぞれの候補分子の臨床サンプルにおける発現レベルの解析、細胞株を用いての gain-of-function, loss-of-function による機能解析を行う。これらの結果から候補分子が CSC に対するマーカーまたは治療標的として有用かどうか検討し、治療標的として有望な分子について、免疫療法（及びそのバイオマーカー）への応用可能性を検討する。

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)

Ryouichi Tsunedomi, Masaaki Oka, 他 8 名, 10 番目. *ABCB6* mRNA and DNA methylation levels serve as useful biomarkers for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*. 査読有, 42 巻, 2013 年, 1551-1559

Ryouichi Tsunedomi, Masaaki Oka, 他 2 名, 4 番目. Susceptibility of hepatoma-derived cells to histone deacetylase inhibitors is associated with *ID2* expression. *International Journal of Oncology*. 査読有, 42 巻, 2013 年, 1159-1166

Michihisa Iida, Ryouichi Tsunedomi, Masaaki Oka, 他 8 名, 11 番目. Overexpression of the RD RNA binding protein in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 査読有, 28 巻, 2012 年, 728-734

〔学会発表〕(計 25 件)

Ryouichi Tsunedomi: CANCER-STEM CELL-LIKE SPHERE CELLS INDUCED FROM A CELL LINE DERIVED FROM POORLY-DIFFERENTIATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA EXERTS LIVER METASTATIC POTENTIAL AND

CHEMORESISTANCE ; 21st United European Gastroenterology Week (UEGW2013), 2013 年 10 月 16 日, ICC Berlin, (Berlin, The Federal Republic of GERMANY)

飯田 通久: 肝細胞癌における MCM6 の発現とその意義 ; 第 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2013), 2013 年 10 月 11 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

吉村 清: ヒト膵癌細胞株を用いた癌幹細胞が豊富な細胞集団の誘導 ; 第 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2013), 2013 年 10 月 11 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

恒富 亮一: 抗癌剤耐性を示すヒト肝細胞癌細胞株から誘導した癌幹細胞様細胞 ; 第 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2013), 2013 年 10 月 11 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

Shinsuke Kanekiyo: prediction for early intrahepatic recurrence after hepatectomy in patient with HCC based on serum methylation signature ; 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 5 日, パシフィコ横浜 (神奈川)

Michihisa Iida: Overexpression of MCM6 is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma ; 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 5 日, パシフィコ横浜 (神奈川)

Ryouichi Tsunedomi: Chemoresistance of induced cancer-stem cell-like sphere cells from a human hepatocellular carcinoma cell line ; 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜 (神奈川)

Yusaku Watanabe: Cancer stem like cells induced from human pancreatic cancer cell lines have epithelial-mesenchymal transition property ; 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜 (神奈川)

恒富 亮一: ヒト肝細胞癌細胞株から誘導した癌幹細胞様細胞の抗癌剤耐性 ; 第 24 回日本消化器癌発生学会総会, 2013 年 9 月 6 日, 金沢音楽堂 (石川)

吉村 清: ヒト膵癌幹細胞からの癌幹細胞の培養による誘導 ; 第 17 回日本がん免疫学会総会, 2013 年 7 月 5 日, ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口)

橋本 憲輝: 低分化型肝細胞癌株から誘導された癌幹細胞様細胞の解析 ; 第 17 回日本がん免疫学会総会, 2013 年 7 月 4 日, ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口)

渡邊 裕策: ヒト膵癌幹細胞を用いた癌幹細胞 rich な細胞集団の誘導とその培養液中のサイトカインの検索 ; 第 17 回日本がん免疫学会総会, 2013 年 7 月 4 日, ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口)

飯田 通久: HCV 陽性肝細胞癌における MCM6 発現の意義 ; 第 113 回日本外科学会定期学術

集会、2013年4月11日、マリンメッセ福岡 (福岡)

吉村 清：ヒト膵癌幹細胞における微環境の探索；第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日、福岡サンパレス (福岡)

恒富 亮一：2つのトランスクリプトーム解析からのHCV関連肝細胞癌予後予測；第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日、マリンメッセ福岡 (福岡)

吉村 清：ヒト膵癌細胞株からのCancer Stem Cellsの誘導；第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2012年12月13日、倉敷市芸文館 (岡山)

恒富 亮一：肝細胞癌術後肝内再発予測マーカーとしてのABCB6遺伝子；第23回日本消化器癌発生学会総会、2012年11月16日、ルネッサンスリゾートナルト (徳島)

飯田 通久：肝細胞癌におけるMCM6の発現解析；第23回日本消化器癌発生学会総会、2012年11月15日、ルネッサンスリゾートナルト (徳島)

Ryouichi Tsunedomi: RELIABLE PREDICTION OF EARLY INTRAHEPATIC RECURRENCE OF HCV-RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA AFTER SURGERY BY GENE EXPRESSIONAL PROFILING; 20th United European Gastroenterology Week (UEGW2012), 2012年10月22日、RAI 国際会議場 (Amsterdam, THE NETHERLANDS)

恒富 亮一：HCV関連肝細胞癌における予後予測；第20回日本消化器関連学会週間 (JDDW2012)、2012年10月12日、神戸国際展示場 (神戸)

①吉村 清：ヒト低分化型肝細胞癌株からの癌幹細胞の誘導の試み；第20回日本消化器関連学会週間 (JDDW2012)、2012年10月11日、ポートピアホテル (神戸)

②Ryouichi Tsunedomi: Cancer-stem cell-like sphere cells induced from a cell line derived from poorly-differentiated hepatocellular carcinoma; 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、札幌市教育文化会館 (札幌)

③Kiyoshi Yoshimura: Inducing pancreatic cancer stem cell like population by culture and the analysis of its microenvironment; 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、札幌市教育文化会館 (札幌)

④吉村 清：培養による膵癌幹細胞 Rich プロパティの誘導時の微小環境の探索；第16回日本がん免疫学会総会、2012年7月27日、北海道大学学術交流会館 (札幌)

⑤飯田 通久：血清を用いた CpG island methylator phenotype (CIMP) による予後評価への応用；第112回日本外科学会定期学術集会、2012年4月13日、幕張メッセ (千葉)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 正朗 (OKA, MASAOKI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70144946

(2) 研究分担者

恒富 亮一 (TSUNEDOMI, RYOUICHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10420514