

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791409

研究課題名(和文)胆管上皮マーカー陽性肝細胞癌細胞における癌幹細胞としての特性解析

研究課題名(英文)Characterization of hepatic cancer stem cells with biliary cell marker

研究代表者

児玉 創太 (Kodama, Sota)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：10583875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、胆管上皮マーカーであるCK19に着目し、CK19陽性細胞が癌幹細胞の性質を持つかどうかを検討した。

まず、CK19プロモーター下に蛍光蛋白EGFPを発現するプラスミドベクターを作成。これをヒト肝細胞癌細胞株に遺伝子導入した後、CK19陽性細胞及び陰性細胞をFACSにて単離し解析した。次に、CK19陽性細胞を免疫不全マウスに移植するとCK19陽性及び陰性細胞からなる腫瘍を高頻度で形成した。以上より、CK19陽性細胞が癌幹細胞の性質を有していることを示した。また、当施設で手術を施行した肝細胞癌手術検体に免疫染色を行い、CK19発現は術後早期再発の独立予後予測因子であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to determine if cytokeratin 19 (CK19), a hepatic progenitor cell marker, can be used as a CSC marker in HCC.

First, we transfected the CK19 promoter-driven enhanced green fluorescence protein gene into human HCC cell lines. Then we isolated CK19+ cells using fluorescence-activated cell sorting (FACS). Furthermore, xenotransplantation into non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice revealed that CK19+ cells could reproduce themselves, differentiate into CK19- cells, and generate larger tumors at a higher frequency in vivo. These results indicated that CK19+ HCC cells possess CSC properties. And, immunohistochemical analyses of 166 consecutive human HCC specimens resected at Kyoto University showed that CK19 expression is an independent predictor of postoperative recurrence.

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：再生医学 癌幹細胞 肝臓癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年ヒトの癌幹細胞について、白血病、乳癌、脳腫瘍、膵癌など様々な腫瘍でその存在が報告されている。癌幹細胞とは腫瘍組織中に少数存在し、正常の組織幹細胞と同様に自己複製能と多分化能をもち、さらに1個の癌幹細胞から腫瘍組織を形成することができるという高い腫瘍原性を有すると定義されている。また癌幹細胞は正常組織幹細胞と同様、長い寿命をもち、時に細胞周期から外れて休眠状態をとることができると考えられている。これらの性質により癌幹細胞は、腫瘍の再発や転移、化学療法や放射線治療に対する抵抗性についても関与すると言われている。また癌幹細胞はそれ自体が遺伝子変異を起こしやすいと考えられており、再発した腫瘍が治療前と比べてより悪性度が高く抗癌剤や放射線に抵抗性を示すことは、臨床においてしばしば経験するところである。

癌幹細胞の研究は白血病などの血液腫瘍から始まったため、フローサイトメトリーにより表面抗原を用いた表現型で細胞を選別し、それぞれの分画の性質を比較する方法が広く採用されている。固形癌においても消化酵素などを用いて癌組織をひとつひとつの細胞に分解し、血液腫瘍と同様を用いた細胞選別・解析が数多く報告されている。しかしこの方法では臨床検体において、同じ癌腫でも患者によって癌幹細胞とされる細胞が無かったり、または極端に多かったりといった結果が様々な腫瘍で報告されており、そもそも機能が不明瞭な表面抗原の組み合わせで癌幹細胞が抽出できるのかという疑問があった。

我々のグループではこれと全く違った、癌幹細胞と正常組織幹細胞との類似性に注目したアプローチでの癌幹細胞研究を行ってきた。癌幹細胞が存在すれば正常組織幹細胞と類似する性質を持つとの仮定の下に、ヒト胆管細胞癌、膵癌において、前腸内胚葉に発現するフェトプロテイン (AFP) を発現する細胞がごく少数存在することを確認し、これらが癌幹細胞の性質を持つことを実験で証明した。またこれらの癌幹細胞が特異的な情報伝達経路や薬剤輸送体を高発現していることも明らかにした。

今回我々は肝細胞癌においても癌幹細胞が組織幹細胞と同様の性質を持ち、肝の組織幹細胞と同じマーカーを発現していると仮定し実験を計画している。正常組織の肝細胞と胆管細胞は同じ前腸内胚葉から発生する。肝臓の組織幹細胞と考えられているオーバル細胞は幼若肝細胞マーカーの AFP と、胆管細胞マーカーのサイトケラチン 19 (CK19) を同時に発現しているが、成熟した肝細胞は胆管系マーカーCK19を発現しない。いっぽう肝細胞癌は通常、胆管系のマーカーであるCK19を発現しないが、腫瘍組織中に少数のCK19陽性細胞を含むものがあり、これらの

腫瘍は再発転移のリスクが高く予後不良とされている。我々はこのCK19陽性細胞が肝癌の癌幹細胞であると仮定した。

## 2. 研究の目的

原発性肝癌は転移・再発が多く予後不良な疾患である。近年注目されている癌幹細胞は癌の転移・再発のみならず、化学療法や放射線治療への抵抗性にも関与していると考えられている。本実験は肝細胞癌細胞株を用いた新たな癌幹細胞マーカーの検索および、臨床検体中の癌幹細胞の割合や、関連する遺伝子発現、情報伝達経路、薬剤輸送体の存在と、患者の予後との関連、再発・転移、抗腫瘍薬への耐性、また関連する microRNA の網羅的検索・機能解析を行うことを目的とする。本研究の知見は、肝癌治療への臨床応用が期待される有用なものであると考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト肝癌細胞株を用いた CK19 陽性細胞の単離解析

数種類のヒト肝癌細胞株 (HepG2, Hep3B, HuH7 など) に CK19 プロモーター下に蛍光蛋白 EGFP を発現するレポーターベクター (pCK19-EGFP) を遺伝子導入し、フローサイトメトリーを用いて蛍光を発する CK19 陽性細胞を抽出し、癌幹細胞の定義である自己複製能、分化能、造腫瘍性について検討を加える。具体的には、

- Single cell sort による CK19 陽性 / 陰性細胞の単離培養、
- 単離培養下における細胞分化能や自己増殖能の検討、
- CK19 陽性 / 陰性細胞における細胞増殖能、免疫不全マウスへの造腫瘍性の検討、
- 薬剤耐性遺伝子や特異的な遺伝子パスウェイ発現の有無の検討を行う。

### 2. ヒト肝癌臨床検体を用いた実験

#### 2-1. 臨床検体における CK19 陽性細胞の割合と転移・再発および予後に関する統計解析

我々の施設でホルマリン固定して保存している臨床検体を用い、癌幹細胞としての CK19 陽性細胞の割合を免疫染色により同定する。この結果と転移・再発および予後との関連を統計学的に解析する。

#### 2-2. ヒト肝癌臨床検体における肝癌幹細胞関連遺伝子のスクリーニング

我々の教室で保存している凍結検体 (腫瘍組織、正常組織) を用い、癌幹細胞関連遺伝子のスクリーニングを行う。各検体から messenger RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成した上で、候補となる遺伝子 (Cytokeratin 10 (CK10), CK19, p53, AP-1/JUN, epidermal growth factor (receptor) (EGF(R))) について RT-PCR を用いて遺伝子発現の有無を確認する。一定数の

検体で高発現が認められる遺伝子については、生存期間解析のため二次スクリーニングを行う。サンプルサイズは一次スクリーニングの結果から算出する。

#### 4. 研究成果

ヒト肝細胞癌細胞株を用いた CK19 陽性細胞の単離解析

CK19 プロモーター下に蛍光蛋白 EGFP を発現するプラスミドベクターを作成、これを 4 種類のヒト肝細胞癌細胞株 (Huh7, HLF, PLC/PRF/5, Hep3B) に遺伝子導入し安定導入株を作成した。CK19 陽性細胞および陰性細胞をフローサイトメトリーにてそれぞれ単離、各種解析を行った。Single-cell sort analysis・MTS assay・Soft agar colony formation assay を用いて、CK19 陽性細胞が癌幹細胞の性質 (自己複製能・分化能・腫瘍形成能) を有していることを示した。また NOD/SCID マウスへの異種移植実験において、CK19 陽性細胞は CK19 陽性および陰性細胞からなる径の大きい腫瘍を高頻度で形成したことから、CK19 陽性細胞が *in vivo* においても癌幹細胞の性質を有していることを示した。さらに RT-PCR による遺伝子発現解析にて、CK19 陽性細胞が EMT (上皮間葉転換) に関わる遺伝子の発現量が多いことが判明した。

ヒト肝細胞癌臨床検体を用いた CK19 陽性肝細胞癌の解析

我々の施設にて手術を施行した肝細胞癌 166 症例の手術検体に対して免疫染色を行い、CK19 発現と予後との関係を解析したところ、CK19 発現は術後早期再発の独立予後予測因子であることが判明した。また、CK19 発現は腫瘍径と有意に相関しており、旺盛な腫瘍増殖に関与している可能性が示唆された。さらに、本解析集団のうち 10 症例を選択し遺伝子発現を調査したところ、細胞株での実験結果と同様に CK19 陽性症例では EMT 関連遺伝子の発現量が有意に高いことがわかった。

上記より、CK19 陽性細胞は肝細胞癌において癌幹細胞の性質を有しており、高い腫瘍増殖能および EMT に関連しているとの結論を得た。この成果について、現在論文を投稿中である。

#### 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 0 件)

現在雑誌論文投稿中

[学会発表](計 2 件)

Takayuki Kawai, Kentaro Yasuchika, Takamichi Ishii, Hokahiro Katayama, Elena Yukie Yoshitoshi, Satoshi Ogiso, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Ken Fukumitsu and Shinji Uemoto

“CK19 and SOX9 expression in the surgical specimen of hepatocellular carcinoma as poor prognostic factors”

1st International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology (FACO)  
(Xiamen, China)

2013 年 9 月 26 日

Takayuki Kawai, Kentaro Yasuchika, Takamichi Ishii, Hokahiro Katayama, Elena Yukie Yoshitoshi, Satoshi Ogiso, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Ken Fukumitsu and Shinji Uemoto

“CK19 and SOX9 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence”

American Association for the study of Liver Diseases (AASLD) The Liver Meeting  
2013(Washington D.C. USA)

2013 年 11 月 5 日

〔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

児玉 創太 (Sota Kodama)

京都大学大学院医学研究科

肝胆膵移植外科 非常勤講師

研究者番号: 10583875

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし