

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290045

研究課題名(和文) 肝癌幹細胞維持および悪性化に関わるシグナル分子の解析

研究課題名(英文) Analysis of signaling pathways for liver cancer stem cell maintenance

研究代表者

前田 慎(MAEDA, Shin)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40415956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では肝癌によって毎年約3.5万人が死亡しており、難治進行癌に対する治療法はいまだ確立せずに予後は悪い。癌部の多くの割合を占める分化した癌細胞に対する治療では十分ではなく、治療抵抗性や転移、再発の原因として幹細胞の特異的な形質を理解する必要がある。本研究では新たな肝臓癌マウスモデルの作成、肝癌幹細胞培養による細胞株の樹立、癌幹細胞変化のメカニズムとしての上皮-間葉転換の解析を行い、肝癌幹細胞をターゲットとする治療開発へ向けた基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：About 35,000 people every year have died of liver cancer in our country, and treatment for the advanced cancer has not been established yet. Treatment for the differentiated cancer cells is not enough and it's necessary to understand a peculiar character of a stem cell as the cause of the treatment resistance and the recurrence. In this study, we have made a liver cancer mouse model, established a cell line by a liver cancer 3D culture and analyzed a relationship between epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. These findings may provide the fundamental materials and technique for development of therapies for cancer stem cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝臓癌

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では肝臓によって毎年約 3.5 万人が死亡しており、肝炎ウイルス対策などの一次予防の確立や癌治療法の進歩によってその死亡者数はやっと減少に転じた。しかしながら、ウイルス駆除後の発癌症例も近年多くみられ、さらに難治進行癌に対する治療法はいまだ確立せず予後は悪い。肝臓はウイルス感染をはじめとする慢性炎症を基に発生すること、また肝臓という臓器は自己再生能力が高いという特異性があり、その分子基盤は他臓器とは異なる特殊性を有している。このような特殊性から、他臓器で解析が行われている発癌メカニズムは容易には適応できないと考える。おそらくそれ故に、化学療法や分子標的治療の開発が遅れている。

1994 年に血液癌幹細胞が同定して以来 (Lapidot T et al. Nature 1994;367:645-648)、消化器癌においても**癌幹細胞**の存在が明らかとなってきた。癌幹細胞は癌細胞の中で、幹細胞の性質をもつ細胞であり、**自己複製と多分化能**という重要な性質を持つ細胞とされ、少数の癌幹細胞を起源として癌細胞が供給されると考えられている。したがって、癌幹細胞を治療標的とすることは有望な治療法となりうる。申請者らは、肝発癌モデルを用いて、主に炎症・酸化ストレスを介したシグナル伝達、すなわち転写因子である NF- $\kappa$ B 経路やストレス応答 MAPK の JNK、p38 経路の発癌への関与について研究してきた。これらの結果から、肝臓治療における新たな分子ターゲットの提言を行ってきたが、近年の癌幹細胞の存在を示唆する多くの検討によって、癌部の多くの割合を占める分化した癌細胞に対する治療を中心とした考え方ではなく、治療抵抗性や転移、再発の原因として幹細胞の特異的な形質を理解する必要があると考えた。癌幹細胞は正常組織幹細胞の制御が不能となり増殖性となった可能性、あるいはやや分

化した前駆細胞が自己複製能を獲得した可能性など考えられる。さらに、完全に分化した細胞が前駆細胞や幹細胞の性質を獲得した可能性も考えられる。肝臓における癌幹細胞の起源は未だ不明であるが、大きく 2 つの可能性が示されている。1 つは分化した肝細胞に由来の可能性であるが、分化した肝細胞が脱分化して幹細胞様の形質を発現することとなり、ほとんどの細胞が増殖可能であると考えられている肝臓における特殊な形質に由来する。一方で肝障害などにより門脈域に出現するオーバル細胞などの幼弱細胞が肝臓の前駆細胞である可能性が考えられている。以上の背景において、本研究では**肝臓癌幹細胞の同定**およびその**維持、悪性化の分子機構**の解明を目的とする。まず、細胞起源を出来る限り明らかな動物モデルを確立または使用し、機能的なアッセイ系を用いた癌幹細胞の同定を試みる。

## 2. 研究の目的

- (1) 肝臓癌幹細胞の分離と腫瘍形成能の検討  
成熟肝細胞および肝前駆細胞に由来すると考えられる肝臓癌マウスモデルを構築し、肝臓癌幹細胞を分離、腫瘍形成能の有無を明らかにする。分離した細胞を用いて遺伝子変異および epigenetic な変化を網羅的に解析し、新たな幹細胞マーカーを提言する。
- (2) 肝臓における EMT と幹細胞化の検討  
上記で分離した細胞に EMT を惹起する因子を発現または抑制する操作を行うことにより、その増殖および悪性化への影響を明らかにする。その因子については肝臓癌モデルマウスとその因子の遺伝子改変マウスを用いることによって、*in vivo*における解析を行う。
- (3) 腫瘍微小環境における炎症・線維芽細胞浸潤と幹細胞化の検討  
炎症や線維化による肝臓癌幹細胞への影響を分離した細胞にさまざまなサイトカインなどを添加することによって明らかにする。関連シ

ゲナルの遺伝子改変マウスをモデルマウスと交配することによって、その発癌への影響を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 成熟肝細胞および肝前駆細胞由来の肝癌マウスモデルの構築

肝癌、特に肝細胞癌の発生の検討において、その由来細胞によって発癌メカニズムは異なると考えられ、モデル動物の構築をするにあたり考慮が必要である。肝細胞癌の発生は成熟肝細胞か肝前駆細胞の可能性があると考えられている。肝癌を確実に発生させる diethylnitrosamine (DEN) モデル (Maeda S et al. Cell 2005;121:977-90) はその発生過程や病理学的検討によって、成熟肝細胞に由来する癌である可能性が高いとされる。一方で、オーバル細胞をはじめとする肝前駆細胞に由来する発癌モデルはほとんど報告がない。我々はこれまでの解析によって、癌遺伝子 k-ras を肝細胞に発現可能な alb-cre マウスによって発現させると、肝細胞癌が発生することを検討する。近年マウスに 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine (DDC) を投与することによって、CK-19, SOX9, CD44, EpCAM などが陽性のオーバル細胞を含む前駆細胞を誘導する系が確立された。本研究では、CK-19 陽性細胞にエストロゲン投与によって cre リコンビナーゼを発現するマウス (CK-19 cre ERT) と cre リコンビナーゼによって k-ras 発現可能な LSL-k-ras マウスを交配させたマウスを作成する。このマウスに DDC によって肝幹細胞を誘導し、その後エストロゲン投与によってこの細胞に k-ras を発現させ腫瘍を発生させるモデルを構築する。

#### (2) 肝癌幹細胞の分離

癌幹細胞の分離を行なう上で腫瘍塊となっている場合は多くの分化した癌細胞や間質の混在があるとされ、癌幹細胞の性質を調べるの

は困難と考える。したがって、癌化の初期段階の細胞から癌幹細胞を分離することが合理的である。そこで、上記のモデルにおいて、腫瘍が肉眼的に検可能になる以前に肝臓をコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を採取し、マトリゲルを用いて3次元培養を行なう。DEN 発癌は投与後3ヶ月以降に小さな foci が認められるようになることから、本研究では DEN 投与後3ヶ月後の肝臓から細胞を分離する。3次元培養で培養した細胞を免疫不全マウスの皮下、または肝切除/肝障害を惹起させたマウスの脾臓から注入し、その腫瘍形成能について検討する。腫瘍が形成された場合、元の細胞群に癌幹細胞が含まれていることを示し、sphere 細胞に対する遺伝子導入やサイトカイン・ストレス刺激による幹細胞への影響を検討することが可能となる。次に、形成された腫瘍から細胞を分離培養する。この培養には3次元培養にて sphere formation を形成させる群、一般の培養 dish にて培養する群を作成する。

#### (3) 肝癌における EMT と幹細胞化の検討

癌幹細胞を維持および悪性化に関わるメカニズムとして上皮-間葉転換 (EMT) が重要であるとの報告は注目すべきものであるが、詳細解析は行なわれていない。In vivo における働きを解析するために、EMT の鍵となる因子である E-cadherin に注目する。その全身ノックアウトマウスは胎生致死のため、肝臓内における特異的 knockout マウスを作成し、上記の肝癌モデルを用いた検討を行なう。肝細胞特異的カドヘリンノックアウトマウスについては作成済みであり DEN モデルを開始している。まず、これらのマウスの腫瘍形成能、すなわち腫瘍数、大きさ、転移の有無などの解析し、さらに、病理組織学的検討や幹細胞マーカーの発現解析などにより、EMT と幹細胞の維持、悪性化の評価を行なう。また、In vitro 検討として、正常マウスの癌組織より sphere 培養行ない、レトロウイルス等を用い

た E-cadherin ノックダウンによる sphere 形成能や移植実験による腫瘍形成能を検討する。ヒト癌細胞を用いた、E-cadherin ノックダウン細胞を樹立し、同様の検討も行なう。

#### 4. 研究成果

(1) 癌遺伝子の変異型 kras 発現させた alb-cre/ LSL-Kras<sup>G12D</sup> にて肝臓癌モデルを構築した。一方で、CK19-creERT を用いた腫瘍モデルの作成は肝臓内における腫瘍形成はされなかった。CK19 陽性細胞からの発癌モデルについては下記のごとく E-cadherin ノックアウトマウスを用いた検討を行った。

(2) 肝臓癌を確実に発生させる diethylnitrosamine モデルを用いて、肉眼的に観察可能になる以前に採取した肝臓細胞を 3 次元培養した。この細胞は 3 次元で増殖し、継代、凍結保存も可能であった。またそれらの細胞は、AFP 陽性、HNF4a 陽性であり免疫不全マウスに移植すると、腫瘍が形成された。すなわち肝臓癌幹細胞様細胞であると考えられた。さらにこれらオルガノイド内には CK19 陽性細胞も含有しており、分化することのできるよう幼若な腫瘍幹細胞である可能性が示唆された。

(3) E-カドヘリン機能の低下または欠損が肝臓癌を含む様々な癌の進行および予後不良に、特に上皮 間葉転換 (EMT) を介して、関係していることが報告されている。肝臓特異的 E-カドヘリンノックアウトマウス (E-cad KO) を作成した。このマウスは生後 10 週目ごろより自然発生的に門脈域を中心とした炎症が出現、週齢とともに線維化が進展し、硬化性胆管炎様の病理所見を示した。蛍光ラベルされたウルソデオキシコール酸を用いた検討では E-カドヘリンの欠損によって毛細胆管のネットワークが障害されていた。マイクロアレイの解析では E-cad KO において幹細胞マーカーである CD44 や Sox9 の発現増加

が認められ、免疫染色による検討で、門脈域に出現した肝前駆様細胞にこれらが発現していることが明らかとなった。E-cad KO は低率ではあるものの、肝臓癌が自然発生した。次に E-カドヘリンの発癌への影響を、肝臓特異的に変異型 Kras を発現するマウスおよび化学発癌剤であるジエチルニトロサミンを用いた 2 つの発癌モデルにて検討した。どちらのモデルにおいても E-cad KO ではコントロールと比して、腫瘍数、腫瘍径増加が観察された。さらに、E-cad KO の腫瘍の一部では CD44, Sox9 などの幹細胞マーカーの発現増加および上皮 間葉転換 (EMT) が観察された。

#### 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 10 件)

1. Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. *Sci Rep*. 2016 Apr 1;6:23899. doi: 10.1038/srep23899. PubMed PMID: 27032374. (査読あり)
2. Sue S, Shibata W, Kameta E, Sato T, Ishii Y, Kaneko H, Miwa H, Sasaki T, Tamura T, Kondo M, Maeda S. Intestine-specific homeobox (ISX) induces intestinal metaplasia and cell proliferation to contribute to gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol*. 2016 Feb 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26872890. (査読あり)
3. Sakitani K, Hirata Y, Hikiba Y, Hayakawa Y, Ihara S, Suzuki H, Suzuki N, Serizawa T, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakagawa H, Tateishi K, Maeda S, Ikenoue T, Kawazu S,

Koike K. Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. *BMC Cancer*. 2015 Oct 24;15:795. doi: 10.1186/s12885-015-1789-5. PubMed PMID: 26496833; PubMed Central PMCID: PMC4620020. ( 査読あり )

4. Sue S, Shibata W, Maeda S. Helicobacter pylori-Induced Signaling Pathways Contribute to Intestinal Metaplasia and Gastric Carcinogenesis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:737621. doi:10.1155/2015/737621. Epub 2015 May 10. Review. PubMed PMID: 26064948; PubMed Central PMCID: PMC4441984. ( 査読あり )

5. Suzuki N, Murata-Kamiya N, Yanagiya K, Suda W, Hattori M, Kanda H, Bingo A, Fujii Y, Maeda S, Koike K, Hatakeyama M. Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the Helicobacter pylori CagA oncoprotein. *Sci Rep*. 2015 May 6;5:10024. doi: 10.1038/srep10024. PubMed PMID: 25944120; PubMed Central PMCID: PMC4421872. ( 査読あり )

6. Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 21;111(3):1090-5. doi: 10.1073/pnas.1322731111. Epub 2014 Jan 6. PubMed PMID: 24395807; PubMed Central PMCID: PMC3903249. ( 査読あり )

7. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba

Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81. doi:10.1093/carcin/bgt343. Epub 2013 Oct 15. PubMed PMID: 24130164. ( 査読あり )

8. Hayakawa Y, Hirata Y, Kinoshita H, Sakitani K, Nakagawa H, Nakata W, Takahashi R, Sakamoto K, Maeda S, Koike K. Differential roles of ASK1 and TAK1 in Helicobacter pylori-induced cellular responses. *Infect Immun*. 2013 Dec;81(12):4551-60. doi:10.1128/IAI.00914-13. Epub 2013 Sep 30. PubMed PMID: 24082073; PubMed Central PMCID: PMC3837986. ( 査読あり )

9. Kinoshita H, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hayakawa Y, Takahashi R, Nakata W, Sakitani K, Serizawa T, Hikiba Y, Akanuma M, Shibata W, Maeda S, Koike K. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. *PLoS One*. 2013 Apr 12;8(4):e60914. doi:10.1371/journal.pone.0060914. Print 2013. PubMed PMID: 23593346; PubMed Central PMCID: PMC3625204. ( 査読あり )

10. Takahashi R, Hirata Y, Sakitani K, Nakata W, Kinoshita H, Hayakawa Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hikiba Y, Ijichi H, Moses HL, Maeda S, Koike K. Therapeutic effect of c-Jun N-terminal kinase inhibition on pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2013 Mar;104(3):337-44. doi: 10.1111/cas.12080. Epub 2013 Jan 24. PubMed PMID: 23237571. ( 査読あり )

〔学会発表〕(計 9件)

1. 亀田英里, 杉森一哉, 前田愼: 胆膵疾患診療における EUS の新たな展開 EUS-FNA 検体を用いた次世代シーケンサーによる膵腫瘍の遺伝子診断. 胆膵疾患診療における EUS の新たな展開. 第 23 回 JDDW2015 ワークショップ, グランドプリンスホテル新高輪 (東京都品川区), 2015, 10.9.
2. 守屋聡, 沼田和司, 中馬誠, 福田浩之, 近藤正晃, 野崎昭人, 前田愼: 次世代シーケンサーを用いた非 B 非 C 肝細胞癌の網羅的遺伝子解析, グランドプリンスホテル新高輪 (東京都品川区), 2015.10.8.
3. Shibata W, Kinoshita H, Sato T, Ishii Y, Sue S, Kameta E, Maeda S: Overexpression of HER2 Converted the KRAS-Driven PanIN Lesions to LPMC Phenotype. Digestive Disease Week 2015, Washington DC, 2015, 5.21.
4. Sue S, Shibata W, Kameta E, Ishii Y, Sato T, Maeda S: Roles of Intestine Specific Homeobox (ISX) for Gastric Carcinogenesis and Cancer Growth. Digestive Disease Week 2015, Washington DC, U.S.A. 2015, 5.21.
5. Kameta E, Sugimori K, Kaneko T, Ishii T, Miwa H, Sato T, Ishii Y, Sue S, Shibata W, Maeda S: Diagnosis of pancreatic lesions collected by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration using next-generation sequencing. Digestive Disease Week 2015. Washington DC, U.S.A. 2015, 5.20.
6. Ishii Y, Shibata W, Sato T, Kameta E, Sue S, Maeda S: Activation of STAT3 signaling contributed to Helicobacter associated gastric epithelial proliferation and inflammation in Vivo. Digestive Disease Week 2015. Washington DC, U.S.A. 2015, 5.20.
7. 須江聡一郎, 芝田渉, 石井泰明, 佐藤健,

- 稲垣尚子, 亀田英里, 三輪治生, 守屋聡, 佐々木智彦, 桐越博之, 稲森正彦, 前田愼: H. Pylori による ISX の活性化は腸上皮化生を引き起こし、胃癌の増殖に関与する. 第 101 回日本消化器病学会総会 一般演題, 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2015, 4.24.
8. 芝田渉, 須江聡一郎, 石井泰明, 佐藤健, 亀田英里, 佐々木智彦, 守屋聡, 三輪治生, 稲垣尚子, 前田愼: Her2 過剰発現は MAPK 経路活性化を介して膵 IPMC 発生に関与する. 第 101 回日本消化器病学会総会 一般演題 (プレナリーセッション), 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2015, 4.25.
  9. 佐藤健, 石井泰明, 須江聡一郎, 前田愼: 膵癌微小環境における c-Jun N-terminal kinase (JNK) の役割. 第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014.9.27.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 愼 (MAEDA, Shin)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 40415956

### (2) 研究分担者

大塚 基之 (OTSUKA, Motoyuki)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90518945

芝田 渉 (SHIBATA, Wataru)  
横浜市立大学・先端医科学研究センター  
・  
准教授  
研究者番号: 00435819

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: