

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462081

研究課題名(和文) 癌源細胞を中心とした細胞分化・脱分化によるde novo原発性肝癌とその制御

研究課題名(英文) The kinetics and modulation of tumor-initiating cells regulated by cell differentiation and dedifferentiation in de novo primary liver cancer

研究代表者

大塚 将之(Ohtsuka, Masayuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90334185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌ではgankyrinの発現増強がみられ、その発現とOct4及びOV6の発現には正の相関があり、それらの発現が高い症例は外科切除後の予後が不良であった。細胞株では、gankyrinの発現増強による変化はみられないものの、それをknockdownするとOct4の発現減弱とOV6陽性細胞数の減少がみられ、sphere形成能の減弱もみられたことから、肝内胆管癌ではgankyrinが細胞脱分化から誘導された癌源細胞の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、microRNA214がgankyrin発現を調節し、それを増強することで細胞分化が誘導されることを肝細胞癌において見出した。

研究成果の概要(英文)：In intrahepatic cholangiocarcinomas, gankyrin was highly expressed, which correlated with Oct4 and OV6 expressions. Patients with ICC expressing high levels of gankyrin, Oct4 or OV6 had significantly poor prognosis following surgical resection. Although no marked effects of gankyrin overexpression was observed, knockdown of gankyrin was associated with the decreases of Oct-4 expression and OV-6 positive cell population in vitro. Furthermore, gankyrin knockdown deteriorated sphere-forming ability. These results suggested that Gankyrin might play an important role in the maintenance of cancer cells with stem-like features that could act as tumor-initiating cells induced by cell dedifferentiation in intrahepatic cholangiocarcinoma. MicroRNA-214 regulated gankyrin expression, and transfection of microRNA214 was found to induce cell differentiation in hepatocellular carcinoma cells through downregulation of gankyrin expression.

研究分野：医歯薬系 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌源細胞 肝内胆管癌 肝細胞癌 分化・脱分化 de novo癌

1. 研究開始当初の背景

癌の発生過程を考える上で、癌細胞は正常細胞が多段階的な分子異常を蓄積することにより、形態的にはそれとともなって異型度を増していくことで生じるとされる多段階発癌機構が一般的な仮説として受け入れられている。原発性肝癌である肝細胞癌においても、high grade dysplastic nodule から早期肝細胞癌、高分化肝細胞癌へと進展し、また、肝内胆管癌においても von Meyenburg complex, 胆管性線維腺腫, 胆管腺腫からの発癌の報告がある。しかしながら、臨床の場においては、そのようないわゆる前癌病変をみることは少なく、多段階発癌機構がはたして major な発癌プロセスなのかははまだ明らかではないとともに、*de novo* 癌の存在が示唆される。

de novo 癌としては組織幹細胞の癌化ということが注目される。cancer stem cell theory における癌源細胞 (tumor-initiating cells) は、既存の組織幹細胞の遺伝子異常、形質転換によって自己複製制御機構が破綻することから発生すると仮説づけられているが、肝臓においても組織幹細胞の存在は広く認識され、劇症肝炎のような肝障害時に、特に成熟肝細胞や胆管細胞の複製が制限された状態で、活性化するとされる。病理学的には ductular reaction と呼ばれ、細胆管に類似した胆管の増生として認識されるが、それら胆管上皮様細胞は neural cell adhesion molecule (NCAM), epithelial cell adhesion molecule (EPCAM), oval cell marker antibody (OV6) など肝幹細胞あるいは前駆細胞のマーカーを多く発現しており、それが肝幹細胞・前駆細胞であることを示唆している。一方、ductular reaction は肝細胞癌や肝内胆管癌のリスクファクターである B 型/C 型肝炎ウイルス感染による慢性肝障害時や胆汁うっ滞性疾患、あるいは組織虚血の状態の際にもみられるが、これは組織幹細胞の活性化というよりもむしろ成熟肝細胞由来である可能性が指摘されている。induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) の確立によって示されたように終末分化をとげた細胞のリプログラミングによって幹細胞が誘導しうるが、*in vivo* においても成熟肝細胞の脱分化から肝細胞・胆管細胞両者に分化しうる肝前駆細胞が誘導されていることが示唆される。事実、Sun らは、gankyrin が hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 α の分解を促進することによる rat 肝細胞の脱分化から肝前駆細胞の誘導を報告し、さらに肝細胞癌細胞の癌源細胞への脱分化を示すとともに、gankyrin を down-regulation することによって肝細胞癌の癌源細胞数の低下と分化を報告している。また、Kiesslich らは胆管細胞癌において Wnt シグナルが癌細胞の脱分化を誘導することを示している。これらの事実は、原発性肝癌細胞が腫瘍内でダイナミックに分化・脱分化を繰り返し、そのバラ

スによって悪性度などの臨床的 heterogeneity を引き起こしている可能性を示唆するものと考えられる。これによれば、臨床的に肝細胞癌と胆管細胞癌の表現型が混在する混合型肝癌の存在や、ezrin やサイトケラチン 19 といった成熟肝細胞にはみられず、前駆細胞にみられる分子の発現を伴う肝細胞癌が存在する、あるいは胆管細胞マーカーに加え肝細胞マーカーも同時に発現している肝内胆管癌が存在する、という事実も説明可能である。さらに、癌源細胞自体も既存の組織幹細胞の癌化ではなく、成熟肝細胞あるいは胆管細胞の脱分化を端緒とする可能性を示唆するとともに、癌組織では一度分化した癌細胞の脱分化から癌源細胞が供給されている可能性を示唆するものである。事実、肝細胞から肝内胆管癌の発生につき実験的に示した報告がみられる。一方、原発性肝癌の癌源細胞を積極的に分化の方向へ導くメカニズムの詳細は不明であるが、脱分化シグナルが抑制されて分化する場合と既存の分化メカニズムを踏襲し分化する場合があると考えられる。肝前駆細胞の肝細胞への分化に Wnt3a が、胆管細胞への分化に Notch が重要であることが示され、また、spermatogenic immunoglobulin superfamily (SgIGSF) も肝前駆細胞からの胆管分化に重要であることが示されているが、原発性肝癌の癌源細胞の分化においても同様のメカニズムが推定される。我々も肝内胆管癌症例において Notch pathway の活性化を明らかにしている。また、そのような分化過程においては、周辺環境、niche が重要であるが、マクロファージや筋線維芽細胞の重要性が示されている。さらに、近年、post-transcriptional regulators としてのマイクロ RNA が注目されているが、マイクロ RNA のなかには細胞の未分化性の維持に拮抗して分化の方向へコミットメントする機能がある分子群があり、Silber らは、マイクロ RNA-124 あるいはマイクロ RNA-137 の過剰発現がマウス神経幹細胞や human glioblastoma 源細胞の分化を誘導することを示し、正常組織幹細胞と癌源細胞の分化誘導メカニズムの共通性および、種をこえてマイクロ RNA が保存されていることを明らかにしている。

一方、現在の原発性肝癌に対する治療は外科切除、化学療法が中心であるが、外科切除しえても多くの症例で癌再発が起こり、しかも再発巣では初発巣よりも進行が早く、悪性度が高くなることしばしば経験される。これは癌源細胞が残存、あるいは脱分化による癌源細胞のさらなる供給によると仮説立てられる。従って、癌源細胞に対して有効な何らかの治療法が必要となる。癌源細胞を標的とした治療方法には、癌源細胞自体を排除する、癌源細胞の自己複製能を抑制し、造腫瘍性のない細胞に分化誘導させる、癌源細胞を癌源細胞として維持させるために必要な niche を標的とする、という大きく 3 種の方

法が考案されているが、**癌源細胞自体を排除したとしても分化した癌細胞の脱分化により癌源細胞が供給される可能性**があり、有効な治療法になりえない可能性がある。そこで、癌源細胞の自己複製能を抑制し、分化誘導させるという方法が注目される。分化誘導シグナルや脱分化制御シグナルのノックイン・ノックダウンによって、また、分化・脱分化に関連するマイクロ RNA によって、さらには niche として重要なマクロファージや筋線維芽細胞との共存により癌源細胞を制御できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝前駆細胞あるいは原発性肝癌の分化・脱分化シグナルの発現と原発性肝癌癌源細胞の表面マーカーの発現につき、臨床検体を用いて解析することによって、その臨床的意義を解明することを目指す。さらに、癌細胞に分化誘導シグナルをノックイン、脱分化シグナルをノックダウンすることによる細胞動態の変化を解析することで、細胞分化・脱分化が癌の発生、進展にどのような関与を示すかを明らかにする。その際のマイクロ RNA の関与についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝内胆管癌における脱分化シグナルと細胞マーカーの解析

肝内胆管癌外科切除材料を用いて、細胞脱分化に関与しているとされる gankyrin と原発性肝癌癌源細胞の細胞マーカーである Oct4, OV6 につき市販の抗体を用いて免疫組織染色を行い、その発現状況を検討する。そして、それらと臨床病理学的因子との関連について比較検討するとともに、外科切除後の予後との関連についても検討する。

(2) 肝内胆管癌細胞における gankyrin と癌源細胞の動態についての解析

肝内胆管癌細胞株を用い、gankyrin をノックインあるいはノックアウトさせることで、幹細胞関連転写因子である Oct4, Sox2, Klf4 の発現変化を Western blot 法を用いて解析するとともに OV6 陽性細胞数の変化についてフローサイトメトリーで検討する。さらに gankyrin をノックアウトした細胞におけるスフェア形成能についても検討する。

(3) non-B, non-C 肝細胞癌におけるマイクロ RNA(miR)-214 の解析

non-B, non-C 肝細胞癌外科切除材料を用いて、real-time RT-PCR 法にて miR-214 の発現状況を検討する。そして、それらと臨床病理学的因子、予後との関連について比較検討する。さらに、miR-214 の発現と gankyrin 発現の関係についても検討する。

(4) 肝細胞癌細胞における miR-214 の機能解析

肝細胞癌細胞株を用いて miR-214 を強制発現させ、細胞増殖能、浸潤能、アポトーシスの変化を解析するとともに、Oct4 の発現変化を Western blot 法を用いて解析、また CD133 陽性細胞数の変化についてフローサイトメトリーで検討する。さらに、gankyrin 発現の変化についても検討を加える。

4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌における脱分化シグナルと細胞マーカーの解析

45 例の肝内胆管癌外科切除材料において gankyrin の発現を検討したところ、44 例に発現がみられ、うち、29 例(65.9%)は高発現していた。一方、Oct4 は 44 例に発現がみられ、その発現強度は gankyrin 発現と正の相関がみられた。また、OV6 の発現は 40 例にみられ、その発現強度は gankyrin 発現と正の相関がみられた。臨床病理学的因子との関連をみると、gankyrin 高発現、Oct4/OV6 高発現肝内胆管癌症例では血清中の CA19-9 値が高い症例が多いことが判明した。また、gankyrin 高発現、Oct4/OV6 高発現肝内胆管癌症例は外科切除後の予後が有意に不良であった。Oct4 や OV6 が癌源細胞あるいは肝前駆細胞のマーカーであることを考慮すると、この結果は肝内胆管癌では種々の程度に癌源細胞が含まれ、その程度により癌の生物学的 heterogeneity がもたれられていることを示唆するものと考えられた。そして gankyrin が、大腸癌や肝細胞癌で示唆されているように、癌細胞の脱分化から癌源細胞の供給に関与している可能性が想定された。

(2) 肝内胆管癌細胞における gankyrin と癌源細胞の動態についての解析

肝内胆管癌細胞株ではすでに gankyrin の発現がみられているが、それを siRNA によりノックダウンすると、Oct4, Sox2, Klf4 の有意な発現低下がみられ、OV6 陽性細胞数の減少も認められた。また、それらにはスフェア形成能の減弱も伴っていた。一方、gankyrin の発現がすでにみられている肝内胆管癌細胞株に、さらに gankyrin を強制発現させたが、Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc の発現には変化がみられず、OV6 陽性細胞数についても変化がみられなかった。この結果は肝内胆管癌における gankyrin の役割は癌細胞の誘導というよりはむしろ、癌源細胞の維持に重要な役割を果たしているものと考えられる。肝細胞癌では gankyrin は癌細胞の脱分化を誘導し、癌源細胞の供給に重要な役割を果たしているとされるが、脱分化のメカニズムには細胞特異性があり、肝内胆管癌では gankyrin-independent なメカニズムが存在しているのかもしれない。

(3) non-B, non-C 肝細胞癌におけるマイクロ RNA(miR)-214 の解析

40例の non-B, non-C 肝細胞癌外科切除材料において miR-214 の発現を検討したところ、非癌部に比し有意に癌部での発現低下が認められた。なかでも miR-214 の発現が低い症例は外科切除後の無再発生存率が低いことが判明したが、一般的に用いられる臨床病理学的因子との関係は認められなかった。一方、miR-214 の低発現は、血管浸潤とともに独立した外科切除後再発危険因子であった。この結果から、miR214 の発現は外科切除後の再発を予測するバイオマーカーとなりうる可能性を示唆するものである。

(4) 肝細胞癌細胞におけるマイクロ RNA(miR)-214 の機能解析

肝細胞癌細胞株において miR-214 を強制発現させると、癌細胞の増殖能、浸潤能が損なわれ、アポトーシスを起こす細胞数の増加が認められた。また、Oct4 の有意な発現低下と CD133 陽性細胞数の減少がみられた。gankyrin の発現との関係を見ると、miR-214 と gankyrin の発現には逆相関がみられ、miR-214 の発現を増強させることによって、gankyrin タンパクの発現が低下することが明らかになった。

これらの結果から、miR-214 は gankyrin の発現を調節し、肝細胞癌、特に non-B, non-C 肝細胞癌において、より悪性度の高い性質獲得に関与しているものと考えられる。したがって、miR-214 を強制的に発現させることは、肝細胞癌に対する新たな治療法となり得る可能性を有しているものと考えられる。

以上のことから、原発性肝癌においては癌源細胞の動態がその性質、多様性に深く関与しているものと考えられ、そこには gankyrin が大きな役割を果たし、癌源細胞の維持、特に肝細胞癌では誘導にも関与していることが明らかになった。gankyrin を調節する分子としては miR-214 があり、それを調節することで、癌の性質変化を誘導できることがわかり、新たな治療法開発の基盤となりうるものと考えられる。

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 19 件)

1 Pin1 facilitates NF- κ B activation and promotes tumor progression in human hepatocellular carcinoma. Shinoda K, Kuboki S, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Br J Cancer 113:1323-1331, 2015. (査読 有) DOI: 10.1038/bjc.2015.272.

Histone lysine methyltransferase SUV39H1 is a potent target for epigenetic therapy of hepatocellular carcinoma. Chiba T, Saito T, Yuki K, Zen Y, Koide S,

Kanogawa N, Motoyama T, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Tawada A, Otsuka M, Miyazaki M, Iwama A, Yokosuka O. Int J Cancer. 136:289-98, 2015. (査読 有) DOI: 10.1002/ijc.28985.

術中戦略 リンパ節郭清範囲 肝内胆管癌. 大塚将之, 清水宏明, 加藤 厚, 吉富秀幸, 古川勝規, 高屋敷 吏, 久保木 知, 高野重紹, 岡村大樹, 鈴木大亮, 酒井 望, 賀川真吾, 宮崎 勝 臨床外科 70:63-67, 2015 (査読 無)

Cytoskeleton-associated protein 2 is a potential predictive marker for risk of early and extensive recurrence of hepatocellular carcinoma after operative resection. Hayashi T, Ohtsuka M, Okamura D, Seki N, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Surgery 155:114-23, 2014. (査読 有) DOI: 10.1016/j.surg.2013.06.009.

Intraductal papillary neoplasms of the bile duct. Ohtsuka M, Shimizu H, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Tsuyuguchi T, Sakai Y, Yokosuka O, Miyazaki M. Int J Hepatol 2014:459091, 2014. (査読 有) DOI: 10.1155/2014/459091.

肝内胆管癌の血管浸潤. 大塚将之, 清水宏明, 加藤 厚, 古川勝規, 吉富秀幸, 高屋敷 吏, 久保木 知, 高野重紹, 岡村大樹, 鈴木大亮, 酒井 望, 賀川真吾, 宮崎 勝 臨床外科 69:926-932, 2014 (査読 無)

Surgical resection after downsizing chemotherapy for initially unresectable locally advanced biliary tract cancer: a retrospective single-center study. Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Yoshidome H, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Kimura F, Miyazaki M. Ann Surg Oncol. 20:318-24, 2013. DOI: 10.1245/s10434-012-2312-8.

[学会発表](計 20 件)

1 末梢型肝内胆管癌における Gankyrin 発現と stem cell marker との関連 三島 敬, 大塚将之, 清水宏明, 加藤 厚, 吉富秀幸, 古川勝規, 高屋敷 吏, 久保木 知, 高野重紹, 岡村大樹, 鈴木大亮, 酒井 望, 賀川真吾, 宮崎 勝 第 115 回日本外科学会定期学術集会 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2015 年 4 月 16 日

肝内胆管癌に対する外科切除を中心とした治療戦略 大塚将之, 清水宏明, 加藤 厚, 吉富秀幸, 古川勝規, 高屋敷 吏, 久保木 知, 高野重紹, 岡村大樹, 鈴木大亮, 酒井 望, 賀川真吾, 宮崎 勝 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 ホテル グランパシフィック LE DAIBA (東京) 2015 年 6 月 12 日

Significance of repeat resection for intrahepatic cholangiocarcinoma after surgical resection. Ohtsuka M, Shimizu H, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Okamura D, Suzuki D, Miyazaki M 11th World Congress of the IHPBA ソウル(大韓民国) 2014年3月26日

肝内胆管癌に対する外科切除成績からみたリンパ節郭清の意義 大塚将之、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷 吏、久保木 知、岡村大樹、鈴木大亮、中島正之、相田俊明、宮崎 勝 第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会 ホテル東日本宇都宮・栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市) 2013年6月12日

Notch pathway is activated in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma possibly derived from hepatic progenitor cells. Nakajima M, Ohtsuka M, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Takeuchi D, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Okamura D, Suzuki D, Aida T, Miyazaki M. 4th Biennial Congress of Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association 上海(中華人民共和国) 2013年3月29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 将之 (OHTSUKA MASAYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：90334185

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156

(3) 研究分担者

清水 宏明 (SHIMIZU HIROAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：80272318

(4) 研究分担者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60375631

(5) 研究分担者

岡村 大樹 (OKAMURA DAIKI)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号：50375698

(6) 研究分担者

中島 正之 (NAKAJIMA MASAYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80466705
平成26年4月16日削除