

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462779

研究課題名(和文) 肝芽腫幹細胞による腫瘍血管の構築機構

研究課題名(英文) Mechanism of tumor vasculature by hepatoblastoma stem cells

研究代表者

藤田 恵子 (FUJITA, Keiko)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80173425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管新生は既存血管から伸長するとされたが、神経膠芽腫ではCD133陽性のがん幹細胞(CSCs)が腫瘍血管内皮前駆細胞を生成し、腫瘍血管内皮細胞に分化することが報告された。ヒト肝芽腫における腫瘍血管内皮細胞とCSCsの関係を調べた。肝芽腫細胞において、糸状仮足および葉状仮足にCD133陽性部位が認められた。がん幹細胞を異種移植し形成された腫瘍を用いスフェア形成実験を行った。3次元コラーゲンゲル培養によりスフェアを培養すると、スフェアからCD133陽性のチューブ様構造が新生した。電子顕微鏡でチューブの管腔構造を確認した。結果からCD133陽性肝芽腫幹細胞から腫瘍血管新生の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： It is widely accepted that new tumor blood vessels sprout from pre-existing vasculature. However, recent evidence suggests that CD133-positive cancer stem cells (CSCs) in glioblastomas generate tumor endothelial progenitor cells, which further differentiate into tumor endothelial cells. It was investigated the relationship between tumor endothelial cells and CSCs in human hepatoblastoma. Examination of the CD133-positive sites using SEM revealed that they coincided with filopodia and lamellipodia. Digested xenograft tumor fragments were cultured and tumor sphere assay was carried out. The spheres were cultivated using three-dimensional collagen gel culture methods. Some spheres formed CD133-positive capillary-like structures. TEM imaging of these structures confirmed the presence of identifiable lumens. The observations suggest that CD133-positive CSCs in hepatoblastoma differentiate into tumor endothelial cells.

研究分野：解剖学

キーワード：がん幹細胞 肝芽腫 腫瘍血管新生 培養 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) がん幹細胞の存在

正常幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を有する『がん幹細胞(cancer stem cells, CSCs)』の存在が注目された。がん幹細胞の増殖には周囲の微小環境(ニッチ)が非常に重要であるとされている。がん幹細胞をとりまく微小環境はきわめて多様で、がんの種類によって異なると言われている。この微小環境を形成しているのが、腫瘍血管であることがわかってきた。

(2) 腫瘍血管内皮細胞とがん幹細胞の関係

神経膠芽腫においては、がん幹細胞と同じゲノム変化が腫瘍血管内皮細胞に認められることから、がん幹細胞が腫瘍血管内皮細胞に分化し、血管新生が生じることが示唆された。がんを根治するためにはがん幹細胞をターゲットとした治療法の開発が必須である。しかしながら、がん幹細胞がどのようにして生体内に棲みつくのが明らかにされていないため、がん幹細胞をターゲットとした治療法が確立されていなかった。肝芽腫の発がん機構を解明し、予後判定を実施し新たな治療法の開発を進めていく上で、本研究による肝芽腫幹細胞をとりまく微小環境、すなわち腫瘍血管の新生機序とがん幹細胞との相互作用の解明が重要であった。

2. 研究の目的

がん根治のためには転移・治療抵抗性に関与する『がん幹細胞』を特異的に殺傷しなければならない。これまで小児肝臓の悪性腫瘍で最も罹患率の高い『肝芽腫』におけるがん幹細胞の分離・同定法を確立してきた。

肝芽腫幹細胞をターゲットとした新たな治療法ならびに肝芽腫幹細胞周囲に存在する微小環境(腫瘍血管)を破綻させる治療法開発のために、肝芽腫幹細胞とその維持に関与する周囲微小環境である腫瘍血管との関係の解明をめざして研究を推進した。

本研究は

(1) 肝芽腫幹細胞の微小環境を構成する腫瘍血管の血管新生分子機序の解明

(2) 腫瘍血管形成過程における肝芽腫幹細胞の関連性の解明

を目的として、研究を進めた。

3. 研究の方法

ヒト肝芽腫培養実験モデルを用い、小児癌である肝芽腫におけるがん幹細胞(肝芽腫幹細胞)と腫瘍血管形成との関係について調べた。

(1) 肝芽腫細胞におけるCD133の発現局在

幹細胞マーカーであるCD133の肝芽腫細胞における分布状態について光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡を用いて検討した。

(2) 肝芽腫細胞培養実験モデル作成

培養モデルとしてヒト肝芽腫細胞株(HuH-6 clone-5, well differentiated type, JCRB0401)を使用した。細胞を10% FBS, 50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle 培地を用いて 37、5%CO₂ の条件下で培養し、細胞がコンフルエントになった時点で実験に用いた。

(3) 肝芽腫幹細胞の分離

今まで確立してきた方法により、肝芽腫細胞を培養し、肝芽腫幹細胞を分離した。

培養細胞から肝芽腫幹細胞候補集団を分散する際の指標として、超生体染色色素である Hoechst 33342の排出能の高い集団である side population (SP)を検出するアッセイを用いた。細胞株をトリプシン/EDTAを用いて培養フラスコより回収し、PBSで洗浄した後、HBSSで浮遊させた。トリパンブルーで細胞数をカウントし、 1×10^6 個/mlの濃度に調整し、Hoechst 33342 (Sigma, MO, USA)を5.0 μ g/ml 加え、37 で30分染色した。遠心(4、300G、5分)し上清を除去した後、PI(最終濃度 1 μ g/ml)を含む HBSSに浮遊させ、測定まで氷上で静置した。フローサイトメーターにより解析した。なお、ABC transporter阻害剤である verapamil (Sigma, MO, USA)を添加し Hoechst33342排出を阻害し、SP分画を消失させることにより、SP分画の細胞を確認した。

SP 分画細胞ならびに non-SP(main population: MP)分画細胞をソーティングした。

(4) ソーティングした肝芽腫幹細胞の免疫不全マウスへの移植実験

実験群として、ソーティングした SP 分画細胞を NOD/SCID マウスの皮下に接種した。接種した細胞の調整法は Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, CA, USA) と等量混合して行った。なお、コントロールとして培養液のみと Matrigel を混合したものを接種した。

(5) NOD/SCID マウスに形成された腫瘍確認

実験に使用した NOD/SCID マウスは 20 週後に犠牲剖検し、腫瘍形成の有無を肉眼で確認した。形成された腫瘍をパラフィン包埋し、5 μ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い組織学的に調べた。

また、腫瘍細胞の増殖能を確認するために、NOD/SCID マウスに形成された腫瘍の組織培養を行った。摘出した腫瘍を眼窩用尖刃で粥状になるまで細切し、滅菌したメッシュでろ過した後、ろ液(細胞浮遊液)を 35mm glass base dish(IWAKI, Tokyo, Japan)に散布し 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下で培養した。

細胞が培養 dish 底面に接着、増殖した段階で Hoechst33342 の排出能を確認した。培養液を除去、洗浄後、Hoechst 33342(Sigma, MO, USA)を終濃度 5.0 μ g/ml になるように培養 dish に加えた。37 $^{\circ}$ C で 30 分染色し、直ちに蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan)で観察した。

(6) 肝芽腫細胞細胞塊(スフェア)形成実験

肝芽腫細胞のスフェア形成実験を実施した。SCIDマウスに形成された腫瘍を分離・培養し、スフェアを形成させた。コラーゲンゲルをスキャフォールドとした 3 次元培養を用いて、スフェアを培養した。スフェアから新生されたチューブ様構造を形態学的、免疫組織化学的に解析した。

4. 研究成果

肝芽腫細胞における CD133 の発現部位を電子顕微鏡で観察し、CD133 の機能的意義について考察した。肝芽腫細胞では CD133 陽性部位は細胞膜にみられる糸状仮足および葉状仮足を含む複雑な構造を呈する複合体の部位に局在することが明らかとなった。CD133 陽性部位の局在性より、CD133 が肝芽腫細胞の接着・遊走に関与することを確認した。

文献：

Fujita *et al.* Physiologic and Pathologic Angiogenesis - Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. INTECH.2017, 215-225.
Akita *et al.* Microsc Res Tech. 76, 2014, 844-852.

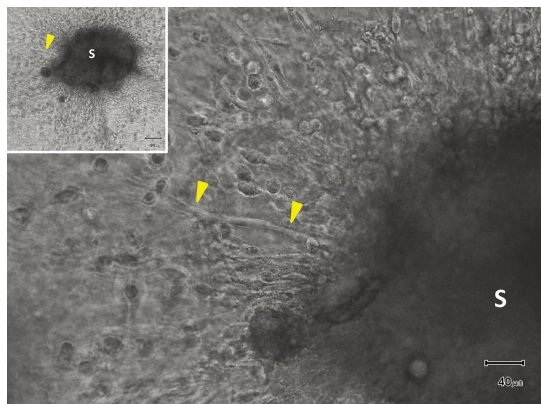
ヒト肝芽腫細胞株(HuH-6 clone-5)から SP 分画法により肝芽腫幹細胞を分離した。SP 細胞を免疫不全マウスに移植した場合は腫瘍が形成された。SP 細胞は高い腫瘍形成能を有し、この細胞集団にがん幹細胞が含まれていることが示された。*In vivo* 実験の結果、免疫不全マウスに接種した SP 分画細胞が自己複製したことが証明された。

文献：

Hayashi *et al.* Pediatr Surg Int. 27, 2011, 9-16.

培養ヒト肝芽腫細胞から分画したがん幹細胞の候補となる細胞を免疫不全マウスに異種移植し、腫瘍再構成を確認後、初代がん細胞のスフェア形成実験を行うと、がん細胞由来の細胞集塊(スフェア)が形成された。コラーゲンゲルをスキャフォールドとした 3 次元培養を用いて、スフェアを培養すると、スフェアの周囲には多数の細胞が遊走し、また、チューブ様構造も観察された。遊走細胞の一部とチューブ様構造は CD133 陽性であった。スフェロイド培養ではがん幹細胞がスフェアを形成し、がん幹細胞ニッチとして血管新生因子を産生するといわれており、CD133 陽性細胞から腫瘍血管の新生の可能性が示

唆された。



さらに、腫瘍の低酸素環境と血管新生因子の関係について明らかにした。スフェアの中心付近は酸素分圧の低下により、低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor(HIF)-1 発現の亢進がみられ、血管内皮増殖因子 VEGF の発現を誘導し、血管新生を刺激していることが確認された。また、スフェア内における

低酸素シグナルの中心的分子である prolyl hydroxylase(PHD)と HIF-1 の関係は HIF-1 が sphere の中心部に存在し、PHD はスフェア辺縁部にみられた。これらスフェア形成実験を用いた *in vitro* 実験の結果は、*in vivo* におけるがん微小環境（ニッチ）と同様の因子分布を示すことが明らかとなった。

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3件）

Masumi Akita, Sachiko Matsumoto, Noriko Murai, Kumiko Komatsu, Keiko Fujita. Subcellular localization of CD133 and interleukin-6 receptor (IL-6R) in human hepatoblastoma cell-line (HuH-6 Clone-5). J Stem Cell Res Dev Ther. 査読有 . 1, 2014, 1-5.
<http://www.heraldopenaccess.us/journals/Stem-Cells-Research-Development-&Therapy/volume-1-&-issue-1.php>

Masumi Akita, Kayoko Tanaka, Noriko Murai, Sachiko Matsumoto, Keiko Fujita, Takashi Takaki, Hidetoshi Nishiyama. Detection of CD133 (prominin-1) in a human hepatoblastoma cell line (HuH-6 clone 5). Microsc Res Tech. 査読有 .76, 2014, 844-852. DOI:10.1002/jemt.22237.

Masumi Akita, Kayoko Tanaka, Sachiko Matsumoto, Kumiko Komatsu, Keiko Fujita. Detection of the hematopoietic stem and progenitor cell marker CD133 during angiogenesis in three-dimensional collagen gel culture. Stem Cells Int. 査読有 . 927403, 2013, DOI:10.1155/2013/927403.

〔学会発表〕（計9件）

藤田 恵子, 松本 幸子, 藤田 一正, 穠田 真澄, 永島 雅文. ヒト肝芽腫細胞におけるがん微小環境ストレスに対する適応応答. 第122回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017年3月30日. 長崎大学坂本キャンパス（長崎県長崎市）.

藤田 恵子, 松本 幸子, 小松 久美子, 村井 則子, 穠田 真澄. 腫瘍血管構築に關与する肝芽腫幹細胞について. 第48回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2016年9月24日. くまもと県民交流館パレア(熊本県熊本市).

藤田 恵子, 松本 幸子, 藤田 一正, 穠田 真澄, 永島 雅文. がん微小環境における肝芽腫幹細胞と病的血管新生の關係. 第121回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016年3月29日. ビッグパレット福島(福島県郡山市).

藤田 恵子, 松本 幸子, 小松 久美子, 村井 則子, 穠田 真澄. 腫瘍における病的血管新生のメカニズム - 肝芽腫幹細胞と腫瘍血

管新生との関係．第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会．2015年9月18日．長崎大学医学部（長崎県長崎市）．

藤田 恵子, 松本 幸子, 藤田 一正, 穠田 真澄, 永島 雅文. Critical role of human hepatoblastoma stem cells in tumor angiogenesis. 第120回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 第92回日本生理学会大会 合同大会．2015年3月22日．神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)．

藤田 恵子, 松本 幸子, 小松 久美子, 村井 則子, 穠田 真澄. 肝芽腫幹細胞からCD133陽性腫瘍血管内皮細胞への分化と血管新生．第46回日本臨床分子形態学会総会・学術集会．2014年10月17日．TKP市ヶ谷カンファレンスセンター(東京都新宿区)．

Masumi Akita, Keiko Fujita. Detection of the hematopoietic stem and progenitor cell marker CD133 during angiogenesis in vitro. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014年4月15日．京都市勧業館みやこめっせ(京都府京都市)．

藤田 恵子, 松本 幸子, 藤田 一正, 穠田 真澄, 永島 雅文. がん幹細胞マーカーCD133陽性細胞からの腫瘍血管新生の可能性．第119回 日本解剖学会総会・全国学術集会．2014年3月27日．自治医科大学(栃木県下野市)．

藤田 恵子, 松本 幸子, 小松 久美子, 村井 則子, 穠田 真澄. 光顕・電顕シームレス解析法によるヒト肝芽腫由来細胞株におけるCD133とIL-6Rの発現．第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会．2013年9月13日．アクロス福岡(福岡県福岡市)．

〔図書〕(計1件)

Keiko Fujita, Masumi Akita. INTECH, Physiologic and Pathologic Angiogenesis - Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. (Chapter12) Tumor Angiogenesis: A Focus on the Role of Cancer Stem Cells. 2017. 11(215-225).

査読有 オープンアクセス
<http://dx.doi.org/10.5772/66402>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 恵子 (FUJITA, Keiko)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80173425