

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861192

研究課題名(和文) 低分化型細胞株から独自方法で誘導した浮遊細胞塊の解析による癌幹細胞治療標的の検討

研究課題名(英文) Analysis of induced cancer stem-like sphere cells from de-differentiated human hepatocellular carcinoma cell lines to examine the molecular targets for the cancer therapy

研究代表者

恒富 亮一 (TSUNEDOMI, Ryouichi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10420514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、予後不良な肝細胞癌を対象として癌幹細胞(CSC)を解析することで、肝内転移による再発の抑制に結びつける。本研究では、高い転移・浸潤能を有する低分化型肝細胞癌由来の細胞株から独自に誘導したCSC表現型を示す浮遊細胞塊(Sphere)を解析した。低分化型肝細胞癌由来細胞株からSphere細胞を誘導し、これらがCSCの特徴であるstemnessマーカー発現の亢進、抗癌剤耐性能の亢進を示し、さらに肝転移能亢進も示すことを明らかとした。また、mRNAおよびタンパクの網羅的発現解析を上述のSphere細胞及び臨床サンプルにて実施し、肝細胞癌の転移生再発と関連する4つの遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) are thought to play important roles in therapy-resistance. In this study, we induced cancer stem-like cells from hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines using a unique medium, and examined their potential for resistance to anti-cancer drugs. Poorly differentiated HCC derived cell lines efficiently formed spheres of cells, but well-differentiated HCC-derived cells did not. Sphere cells showed increased stemness marker levels. We observed more CD44 variant-positive cells in Sphere cells than in parental cells. The cell viability of Sphere cells was significantly higher than that of parental cells in the presence of several anti-cancer drugs. Sphere cells showed higher ABCG2 and HIF1A mRNA expression and lower ROS production compared to parental cells. Our novel method successfully induced cancer stem-like cells, which possessed chemoresistance that was related to the cell cycle, drug efflux, and ROS.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) 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。癌転移は古典的モデルに加えて (Liotta LA et al., Lab. Invest., 1983)、転移形成を担う細胞が早い段階に独立して存在すると提唱されている (Gray JW, Cancer Cell, 2003)。近年、上皮間葉系移行 (EMT) や癌幹細胞 (CSC) が転移・再発に重要と考えられている (Yang J et al., Cell, 2004, Li F et al., Cancer Res., 2007)。また、CSC 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 CSC を標的とした治療法が求められており、CSC マーカーの探索や機能解析が盛んに行われている。HCC においても、細胞株から CSC の性質の一つである色素排出能の高い side-population (SP) 画分や、CD133 等を CSC マーカーとして分離が行われている (Chiba T et al., Hepatol., 2006)。近年、乳癌においては、EMT を起こした癌細胞が CSC 様の表現型を示すことも報告されており (Mani SA et al., Cell, 2008)、従来の CSC を頂点とする癌細胞の階層性は絶対ではなく、CSCs 自身の heterogeneity や分化した癌細胞から CSCs への plasticity が認識され始めている。

本研究代表者は、HCC の転移・再発に関して研究を進めてきた中で、HCC 術後早期再発と CSC の抗癌剤耐性機構とも関連する ABC トランスポーター発現とが関連することを見出し (特願 2010-079801, PCT/JP2011/001905)、進展 (脱分化) した HCC の中に転移・再発に重要な CSC が存在すると考えるに至った。これまでの HCC からの CSC の分離は、高分化型由来細胞株 (HuH-7 等) では成されてきたが、高い転移・浸潤能を示す低分化型由来細胞株には CSC はほとんど含まれないとされてきた (Chen X et al., J Hepatol., 2011)。これは、発癌してすぐは CSC が比較的残存しているが、癌の進展に伴って CSC は癌細胞へ分化してしまうとの考えに基づいている。本研究代表者らは、しかしながら、前述の plasticity に基づき低分化型 HCC 由来細胞株 (SK-HEP-1) から CSC 表現型の一つである浮遊細胞塊 (Sphere) 形成能を有する CSC 様細胞の独自誘導に成功した (特願 2012-47433)。この誘導 CSC 様 sphere 細胞は、従来の癌細胞の階層性の頂点に位置する癌の発生に重要な CSC とは別に、新たに癌の進展に伴って発生する転移・再発に寄与する CSC と考え、研究を推進している。

2. 研究の目的

本研究は、予後不良な肝細胞癌を対象として、癌幹細胞 (CSC) を解析することで、肝内転移による再発の抑制に結びつける。本研

究では、高い転移・浸潤能を有する低分化型由来の細胞株から独自に誘導した CSC 表現型を示す浮遊細胞塊 (Sphere) を解析する。従来の癌細胞の階層性の頂点に位置する CSC 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 CSC に対するマーカーやその性質を明らかとし、特に、CSC 特異的バイオマーカー (表面抗原、分泌 microRNA 等) から、癌免疫療法や抗体・核酸医薬の候補分子を同定する。

本研究は、低分化型由来の細胞株から得られる CSC 様細胞 (SK-sphere) が、転移・再発および抗癌剤耐性を亢進しているとのこれまでの実験結果の下、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。これまで CSC 様細胞は細胞集団から数%しか分離できなかったが、我々は CSC 様細胞を高効率に誘導できることから、CSC に対する様々な機能解析や抗癌剤スクリーニングを行うことが出来る。本課題によって、転移性の CSC に効果的な抗癌剤や核酸医薬、免疫療法等による肝細胞癌予後の改善が期待される。また、転移性 CSC マーカーは再発リスクの予測を可能とし、患者の層別化によって新規治療の開発だけでなく医療経済的な面でも期待が持たれる。

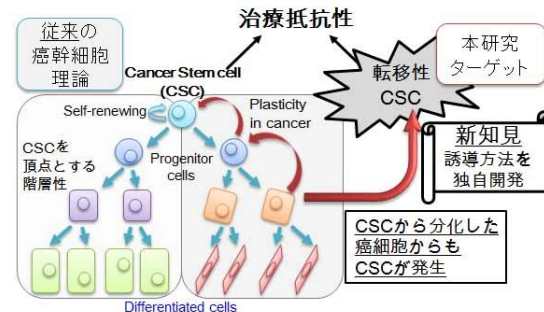


図 1. 本研究標的となる転移性 CSC.

3. 研究の方法

転移性の CSC を解析するに当たって、従来の SP 画分や CD133 等をマーカーとしても低分化型由来の HCC 細胞株からは CSC 様細胞が得られていないことから、従来のマーカーを用いての分離・精製は行えない。そこで、CSC 表現型の一つである Sphere 形成に着目し、低分化型由来の HCC 細胞株から CSC 様細胞として Sphere を誘導培養し、これを解析することとした。これまでに独自の特殊培養によって、低分化型由来 HCC 細胞株 (SK-HEP-1) からの CSC 様細胞 (SK-sphere) の誘導を達成している (図 2)。この誘導法において、最も重要な因子の一つは神経生存因子; NSF-1 (neural survival factor-1) であった。

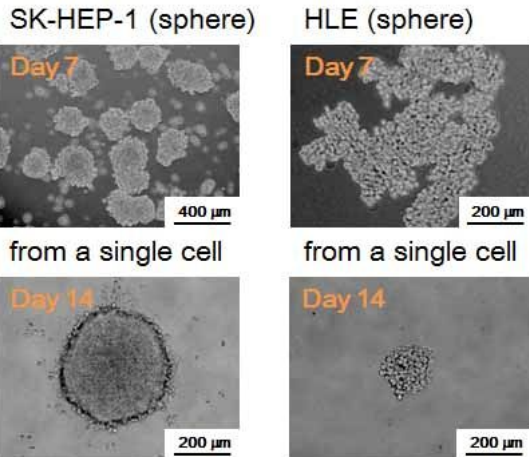


図 2. 独自誘導 Sphere cells. 左, SK-HEP-1 より誘導. 右, HLE より誘導.

得られた SK-sphere は、高い sphere 形成能だけでなく、抗癌剤抵抗性や重度複合免疫不全マウスにおける高い肝転移能を示した。SK-sphere は癌細胞から CSC への plasticity を示すものであり、転移・再発の原因となる CSC であるとの仮説に基づき、解析を行う。これによって、肝細胞癌 (HCC) の転移・再発に關与する癌幹細胞 (CSC) に対する新規マーカーの獲得、CSC に対する治療戦略の開発を進める。

神経生存因子を含むことを特徴とする培地を用いることでヒト HCC 細胞株より癌幹細胞様 Sphere 細胞の誘導を行った。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。発現解析には RT real-time PCR 及びフローサイトメトリーを用いた。網羅的発現解析には RNA-seq、DNA チップ及び iTRAQ-coupled 2D-LC-MS/MS を用いた。臨床サンプルとして、術後 1 年以内再発症例及び術後 2 年以上無再発症例からの凍結抽出標本を用いた。

4. 研究成果

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 Sphere 細胞 (SK-sphere 及び HLE-sphere) の誘導が観察された。一方、高分化型肝細胞癌由来の HuH-7 及び Hep 3B から Sphere 細胞は誘導されなかった。肝転移モデルにおいて、 1×10^3 cells では SK-sphere は 2/5 で肝転移が観察されたのに対して、SK-HEP-1 では 0/4 であった。さらに、SK-sphere での Vimentin 発現亢進が確認された。SK-sphere は親株と比較して Cisplatin や 5-FU 等に対して耐性を示し ($P < 0.05$) (図 3)、Sphere 細胞における CD44 variant (図 4)、HIF1A 発現亢進、及び細胞内 ROS レベルの低下が観察された (図 5)。

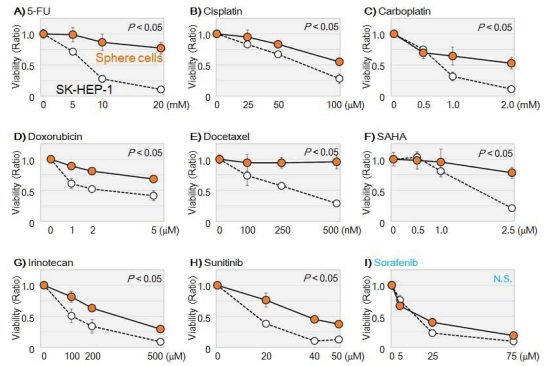


図 3. SK-sphere における抗癌剤耐性.

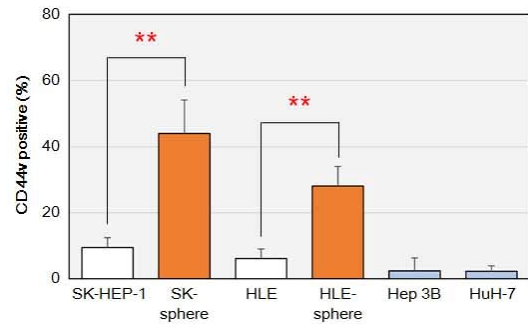


図 4. Sphere 細胞における CD44v 陽性細胞の増加.

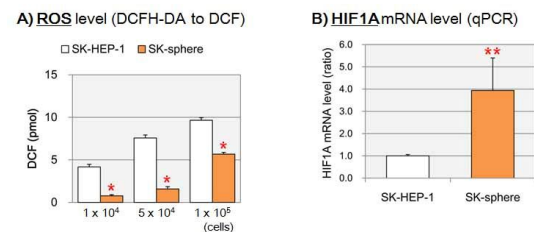


図 5. SK-sphere における ROS 産生低下 (左) 及び HIF1A 発現亢進 (右).

網羅的発現解析の結果、SK-sphere は親株と比較して、有意な細胞浸潤における活性化及び EMT 関連遺伝子、HIF1-alpha 下流遺伝子の発現亢進が見られた (図 6)。

また、HILPDA (Hypoxia-inducible protein 2; HIG-2) の mRNA level は、SK-sphere での発現亢進に加えて、臨床サンプルにおいても無再発群と比較して再発群において発現亢進が確認された。上記、HIG-2 含めて 4 つの遺伝子について、HCC の再発予測マーカーおよび転移抑制の治療標的として特許出願を行った。

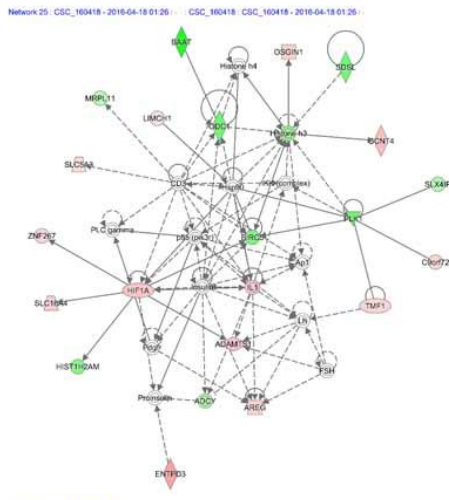
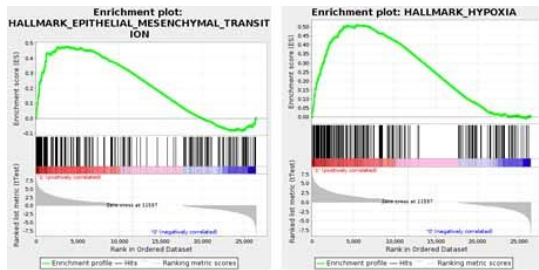


図 6. SK-sphere における Enrichment gene expression.

上段, RNA-seq 解析から得られた発現情報を GSEA した結果. 下段, 同じく IPA によって解析した結果.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Susumu Ishiguro, Kiyoshi Yoshimura, Ryouichi Tsunedomi, Masaaki Oka, Sonshin Takao, Makoto Inui, Atsushi Kawabata, Terrahn Wall, Vassiliki Magafa, Paul Cordopatis, Andreas G Tzacos, and Masaaki Tamura. Involvement of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a novel AT2R agonist effectively attenuates growth of PDAC grafts in mice. *Cancer Biology & Therapy*, 16: 307-316 (2015), 査読有, doi: 10.1080/15384047.2014.1002357.

Shinsuke Kanekiyo, Norio Iizuka, Ryouichi Tsunedomi, Yukio Tokumitsu, Noriaki Hashimoto, Yoshihiro Tokuhisa, Yoshinari Maeda, Michihisa Iida, Kazuhiko Sakamoto, Takao Tamesa, Yusuke Fujita, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama, Yoshihiko Hamamoto, and Masaaki Oka. Preoperative serum methylation signature as prognostic tool after curative hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer*

Res, 35: 997-1007 (2015), 査読有. Noriaki Hashimoto, Ryouichi Tsunedomi, Kiyoshi Yoshimura, Yusaku Watanabe, Shoichi Hazama, and Masaaki Oka. Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer*, 14: 722 (2014), 査読有, doi: 10.1186/1471-2407-14-722.

Yusaku Watanabe, Kiyoshi Yoshimura, Koichi Yoshikawa, Ryoichi Tsunedomi, Yoshitaro Shindo, Sou Matsukuma, Noriko Maeda, Shinsuke Kanekiyo, Nobuaki Suzuki, Atsuo Kuramasu, Kouhei Sonoda, Koji Tamada, Sei Kobayashi, Hideyuki Saya, Shoichi Hazama, and Masaaki Oka. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. *International Journal of Oncology*, 45: 1857-1866 (2014), 査読有, doi: 10.3892/ijo.2014.2603.

Ryouichi Tsunedomi, Shoichi Hazama, Yusuke Fujita, Naoko Okayama, Shinsuke Kanekiyo, Yuka Inoue, Shigefumi Yoshino, Takahiro Yamasaki, Yutaka Suehiro, Koji Oba, Hideyuki Mishima, Junichi Sakamoto, Yoshihiko Hamamoto, and Masaaki Oka. A novel system for predicting the toxicity of irinotecan based on statistical pattern recognition with UGT1A genotypes. *International Journal of Oncology*, 45: 1381-1390 (2014), 査読有, doi: 10.3892/ijo.2014.2556.

Shoichi Hazama, Hiroko Takenouchi, Ryouichi Tsunedomi, Michihisa Iida, Nobuaki Suzuki, Norio Iizuka, Yuka Inoue, Kazuhiko Sakamoto, Mitsuhiro Nakao, Yoshitaro Shindo, Shinsuke Kanekiyo, Yukio Tokumitsu, Kiyoshi Yoshimura, Noriko Maeda, Kazunari Maeda, Yoshinari Maeda, Hiroto Matsui, Shigefumi Yoshino, Yusuke Nakamura, Yusuke Fujita, Yoshihiko Hamamoto, Masato Okamoto, Tomonobu Fujita, Yutaka Kawakami, and Masaaki Oka. Predictive Biomarkers for the Outcome of Vaccination of Five Therapeutic Epitope Peptides for Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 34: 4201-4205 (2014), 査読有.

Shoichi Hazama, Yusuke Nakamura, Hiroaki Tanaka, Kosei Hirakawa, Ko Tahara, Ryoichi Shimizu, Hiroaki Ozasa, Ryoichi Etoh, Fumiaki Sugiura, Kiyotaka Okuno, Takumi Furuya, Taku Nishimura, Koichiro Sakata, Kazuhiko Yoshimatsu, Hiroko Takenouchi, Ryouichi Tsunedomi, Yuka Inoue, Shinsuke Kanekiyo, Yoshitaro Shindo, Nobuaki Suzuki,

Shigefumi Yoshino, Hirokazu Shinozaki, Akira Kamiya, Hiroyuki Furukawa, Takeharu Yamanaka, Tomonobu Fujita, Yutaka Kawakami, and Masaaki Oka. A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *Journal of Translational Medicine*, 12: 108 (2014), 査読有, doi: 10.1186/1479-5876-12-108.

Shoichi Hazama, Yusuke Nakamura, Hiroko Takenouchi, Nobuaki Suzuki, Ryouichi Tsunedomi, Yuka Inoue, Yoshihiro Tokuhisa, Norio Iizuka, Shigefumi Yoshino, Kazuyoshi Takeda, Hirokazu Shinozaki, Akira Kamiya, Hiroyuki Furukawa, and Masaaki Oka. A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome. *Journal of Translational Medicine*, 12: 63 (2014), 査読有, doi: 10.1186/1479-5876-12-63.

Noriko Maeda, Kiyoshi Yoshimura, Sigeru Yamamoto, Atsuo Kuramasu, Moeko Inoue, Nobuaki Suzuki, Yusaku Watanabe, Yoshinari Maeda, Ryoji Kamei, Ryouichi Tsunedomi, Yoshitaro Shindo, Makoto Inui, Koji Tamada, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama, and Masaaki Oka. Expression of B7-H3, a Potential Factor of Tumor Immune Evasion in Combination with the Number of Regulatory T Cells, Affects Against Recurrence-Free Survival in Breast Cancer Patients. *Annals of Surgical Oncology*, 4: S546-554 (2014), 査読有, doi: 10.1245/s10434-014-3564-2.

Shoichi Hazama, Hideyuki Mishima, Ryouichi Tsunedomi, Yusuke Okuyama, Takeshi Kato, Ken-ichi Takahashi, Hiroshi Nozawa, Hideaki Ando, Michiya Kobayashi, Hiroyoshi Takemoto, Naoki Nagata, Shinsuke Kanekiyo, Yuka Inoue, Yoshihiko Hamamoto, Yusuke Fujita, Yuji Hinoda, Naoko Okayama, Koji Oba, Jun-ichi Sakamoto, and Masaaki Oka. UGT1A1*6, 1A7*3, and 1A9*22 genotypes predict severe neutropenia in FOLFIRI-treated metastatic colorectal cancer in two prospective studies in Japan. *Cancer Science*, 104: 1662-1669 (2013), 査読有, doi: 10.1111/cas.12283.

[学会発表](計33件)

恒富 亮一: 肝転移能亢進を示す癌幹細胞様細胞における分子標的の探索; 第26回

日本消化器癌発生学会総会、2015年11月20日、米子全日空ホテル(鳥取県・米子市)
Michihisa Iida: OVEREXPRESSION OF MIRNA221 AND 222 IN CANCER STROMA IS ASSOCIATED WITH MALIGNANT POTENTIALS IN COLORECTAL CANCER; 23rd United European Gastroenterology Week (UEGW2014), 2015年10月26日、Barcelona (SPAIN)

Ryouichi Tsunedomi: Up-regulation of antioxidant ability and HIF1 regulated genes in hepatocellular carcinoma stem-like sphere cells; 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Satoshi Matsukuma: Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem like cells; 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

恒富 亮一: Cancer-stem like 細胞の解析による術後肝内再発抑制に向けた分子標的の探索; 第24回癌病態治療研究会、2015年6月26日、日光千姫物語(栃木県・日光市)

恒富 亮一: 肝細胞癌細胞株より誘導した癌幹細胞様細胞における肝転移能; 第25回日本消化器癌発生学会総会、2014年11月13日、ホテル日航福岡(福岡県・福岡市)

恒富 亮一: 低分型ヒト肝細胞癌細胞株から誘導培養した癌幹細胞様細胞の解析; 第22回日本消化器関連学会週間(JDDW2014)、2014年10月26日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

Ryouichi Tsunedomi: CANCER STEM-LIKE SPHERE CELLS INDUCED FROM DE-DIFFERENTIATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA-DERIVED CELL LINES EXERTS LIVER METASTATIC POTENTIAL AND CHEMORESISTANCE; 22nd United European Gastroenterology Week (UEGW2014), 2014年10月22日、Vienna (AUSTRIA)

Ryouichi Tsunedomi: Induced cancer stem-like sphere cells from de-differentiated human hepatocellular carcinoma cell lines; 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

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69回消化器外科学会総会、2014年7月17日、福島郡山総合体育館(福島県・郡山市)

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解析; 第23回癌病態治療研究会、2014年6月12日、ホテルグランヴェール岐山(岐阜県・岐阜市)

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, Berlin (The Federal Republic of GERMANY)

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、グランドプリンスホテル高輪、品川プリンスホテル (東京都・港区)

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、グランドプリンスホテル高輪、品川プリンスホテル (東京都・港区)

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 (神奈川県・横浜市)

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 (神奈川県・横浜市)

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 (神奈川県・横浜市)

恒富 亮一、吉村 清、橋本 憲輝、渡邊 裕策、岡 正朗: 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、石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)

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 (山口県・宇部市)

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 (山口県・宇部市)

⑳ 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 (山口県・宇部市)

㉑ 吉村 清: ヒト膵癌幹細胞における微小周辺環境の探索; 第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日、福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

㉒ 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、福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 2件)

名称: 肝細胞がんの転移性再発リスクの予測方法

発明者: 岡 正朗、 裕 彰一、 恒富 亮一

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-016586

出願年月日: 2015年1月30日

国内外の別: 国内

名称: ペプチドワクチン療法の効果予測方法

発明者: 裕 彰一、 岡 正朗、 恒富 亮一、 竹之内 寛子、 浜本 義彦、 藤田 悠介

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-99682

出願年月日: 2014年5月13日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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