

平成21年 3月 14日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790255
 研究課題名（和文） 癌幹細胞に着目した肝胆膵領域の横断的発癌研究
 研究課題名（英文） Research of carcinogenesis of the hepatobiliary and pancreatic system from the aspect of cancer stem cells
 研究代表者
 全 陽（ZEN YOH）
 金沢大学・附属病院・准教授
 研究者番号：90377416

研究成果の概要：本研究により、肝細胞癌には ABCG2 発現に関して腫瘍細胞のヒエラルキーが存在し、ABCG2 陽性細胞に癌幹細胞が含まれることが明らかとなった。一方、CD133 は、幹細胞マーカーであると同時に、胆管や膵管にコンスタントに発現する分子であり、CD133 単独では癌幹細胞を同定するのが困難であると考えられた。肝細胞癌、胆管癌、膵管癌では、これらの分子の発現や分布、陽性細胞の生物学的特徴に違いが見られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肝細胞癌、胆管癌、膵癌、癌幹細胞、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで、固形癌は成熟細胞に遺伝子異常が蓄積することで腫瘍が発生すると考えられてきた。肝胆膵領域の癌腫も、肝細胞、胆管上皮、膵管上皮に遺伝子異常が蓄積し、多段階発癌を示すと考えられてきた。しかしながら、近年の幹細胞研究の急速な発展により、各臓器に存在する臓器幹細胞が固形癌の腫瘍発生に関与しているとの説（cancer stem cell theory）が提唱されている。この説では、臓器幹細胞が自己増殖能を獲得することで腫瘍が発生し、自己増殖能を獲得した臓器幹細胞は癌幹細胞（cancer stem cell）とし

て、腫瘍増殖を担うと考えられている。また、腫瘍内に存在する数%の癌幹細胞にしか腫瘍形成能はなく、残りの細胞は腫瘍形成能のない分化細胞と考えられている。このような腫瘍細胞が癌幹細胞を中心とした階層的な細胞社会を構成しているとの仮説が、多くの腫瘍で実験的に検証されている。肝細胞癌と膵癌の培養細胞にも機能的な幹細胞を特徴付ける“side population” cell (SP cell)が存在することが確認され、僅か数%の腫瘍細胞にしか腫瘍形成能がないと報告された。このように、固形癌における癌幹細胞の存在を示唆する報告がなされているが、多くは in

in vitro の研究であり、in vivo での腫瘍発生との関連性は明確にされていない。また、これまでの癌幹細胞に関する研究は各臓器に限られており、横断的な研究は全く行われていない。そこで、幹細胞マーカーを用いて、in vitro と in vivo の研究を比較検討することで、肝胆膵領域の腫瘍発生における癌幹細胞や組織幹細胞の関与がより明らかになると着想するにいたった。

2. 研究の目的

本研究では、肝胆膵領域の癌腫を幹細胞マーカーの観点から研究した。予備実験として、肝細胞癌の組織から RNA を抽出し、幹細胞マーカーの発現を検討したところ、ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2)、muscarinic acetylcholine receptor type 3 (M3R)、CD133 の発現が見られたので、これらの分子を中心に解析した。

本研究の目的は癌幹細胞と組織幹細胞が肝胆膵領域の癌腫の発生にどのように関与しているかを明らかにすることである。特に、肝細胞癌、胆管癌、膵管癌を横断的に解析することを目指した。

3. 研究の方法

肝細胞癌、胆管癌、膵管癌の組織から、RNA を抽出し、各種幹細胞マーカーの発現を検討した。また、病理組織標本を用いて、幹細胞マーカーの発現を免疫染色で検討した。前癌病変の組織標本でも同様に検討し、これまで多段階発癌を示すと考えられていた腫瘍の発生に幹細胞マーカーがどのように発現しているか検討した。さらに、アルブミンやサイトケラチン 19 (CK19) などの各種分化細胞マーカーと幹細胞マーカーの発現部位を組織切片上で比較することで、細胞の分化過程を評価した。

肝細胞癌と胆管癌の培養細胞を用いて、各種幹細胞マーカーの発現を検討した。培養細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で幹細胞マーカーの発現を検討した。また、免疫染色を行い、幹細胞マーカーの発現を蛋白レベルでも検討した。さらに、アルブミンや CK19 など他のマーカーとの 2 重染色を行い、これらの分子の共発現についても検討した。ABCG2 や CD133 の発現に関して、sorting を行い、ABCG2 陽性細胞と ABCG2 陰性細胞、CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞に分離した。分離した細胞群における、幹細胞や成熟細胞マーカーの発現を検討した。また、4 週間まで分離培養をつづけ、各種マーカーの発現変化について検討した。

また、機能的な幹細胞マーカーである、side population (SP) に着目し、SP と non-SP における TGF-beta の発現について検討した。SP の機能をつかさどるとされる ABCG2 や

MDR-1 の発現を病理組織標本の免疫染色で検討することで、in vitro の結果と in vivo との関連性を検討した。

4. 研究成果

非腫瘍性の肝組織、肝細胞癌とその前癌病変である dysplastic nodule における ABCG2 の発現を検討したところ、非腫瘍性肝組織では、ABCG2 は細胆管やヘリング管など、肝幹細胞と考えられている細胞に発現が見られた。また、dysplastic nodule では、結節内部に entrap された門脈域の周囲に陽性細胞が認められた。さらに、肝細胞癌でも全例で ABCG2 の発現が見られ、陽性細胞は散在性に確認できた。これらの結果から、ABCG2 は肝幹細胞のマーカーの 1 つとなると考えられた。この幹細胞マーカーは肝細胞癌の発癌プロセスである、肝硬変、dysplastic nodule、肝細胞癌のすべての過程で発現しており、特に門脈域周囲に位置していることが明らかとなった。M3R も同様に非腫瘍性肝組織の幹細胞に発現が見られ、dysplastic nodule や肝細胞癌でも発現が見られた。ABCG2 と M3R の 2 重染色を行ったところ、興味深いことにこれら 2 つの分子は共発現している傾向が高かった。特に dysplastic nodule では、門脈域周囲に 2 重陽性細胞が集簇して認められた。肝細胞癌の培養細胞株での ABCG2 と M3R の発現を検討すると、HepG2、PLC5、HuH7 でこれらの分子の発現が見られた。免疫染色を行うと、興味深いことにこれらの分子を発現する細胞は優位に高い核分裂率を呈していた。ABCG2 の発現に着目して、ABCG2 陽性細胞と陰性細胞にソーティングしたところ、M3R などの他の幹細胞マーカーは陽性細胞群で強く発現していた。ABCG2 陽性細胞を 4 週間培養すると、陽性細胞の比率が経時的に低下し、4 週間後にはソーティング前の陽性細胞率に戻った。一方、ABCG2 陰性細胞からは 4 週間の培養期間中に陽性細胞は産生されなかった。未熟な肝細胞マーカーである AFP は ABCG2 陽性細胞で強く発現し、分化肝細胞のマーカーである、アルブミンは ABCG2 陰性細胞で強く発現していた。転写因子に関しても、肝発生の早期で発現する GATA6 は ABCG2 陽性細胞で、肝発生の後期に発現する C/EBP-beta は ABCG2 陰性細胞で発現が強かった。これらの結果から、ABCG2 発現に関して、肝細胞癌の培養細胞にはヒエラルキーが存在し、ABCG2 陽性細胞はその高位に位置していると考えられた。他の肝細胞マーカーや幹細胞マーカー、転写因子の発現は、そのヒエラルキーの階層によって異なることが明らかとなった。癌幹細胞はヒエラルキーの高位に存在し、ABCG2 陽性細胞群に含まれていると考えられた。

一方、胆管癌や膵管癌では ABCG2 はびまん性に発現していた。非腫瘍性の膵管や胆管に

も ABCG2 の発現が見られることを考えると、胆管癌や膵管癌における ABCG2 発現は、幹細胞マーカーといよりも、胆管上皮や膵管上皮のマーカーとして発現している可能性が示唆された。

CD133 の発現に関しては、非腫瘍性肝組織では、肝幹細胞と胆管上皮に発現が見られた。それらの細胞は CD133+/CK19+/Hepparl- の形質を有していた。肝細胞癌では CD133 陽性細胞は少数しか認められなかった。それらの細胞は CD133+/CK19-/Hepparl+ の形質を有していた。胆管癌では癌細胞にびまん性に CD133 の発現が見られた。また、混合型肝癌では 2 種類の陽性細胞が見られ、CD133+/CK19+/Hepparl- と CD133+/CK19-/Hepparl+ であった。CD133 陽性細胞の特徴を検討するため、肝細胞癌と胆管癌の培養細胞から CD133 陽性細胞と陰性細胞にソーティングを行った。4 週間の分離培養を行ったところ、CD133 陽性細胞からは陽性細胞と陰性細胞が産生された。また、CD133 陰性細胞からも陽性細胞と陰性細胞が同様に産生され、ABCG2 で確認されたような、腫瘍細胞のヒエラルキーは確認できなかった。細胞形質マーカーの発現に関しては、ソーティング直後は他の幹細胞マーカーの発現強度に違いが見られたが、4 週間の分離培養後には、同様の形質となった。さらに、CD133 陽性細胞と SP との関連性を検討したところ、SP と non-SP の CD133 陽性細胞比に違いは見られなかった。さらに、SP/CD133+, SP/CD133-, non-SP/CD133+, non-SP/CD133- の 4 群に分けて分離培養しても、4 週間後には同じ細胞集団へと戻った。これらの結果から、CD133 は in vivo では幹細胞のマーカーであると同時に、胆管系などの分化細胞のマーカーでもあることが明らかとなった。また、培養細胞から、CD133 の発現のみに着目して癌幹細胞を抽出することは困難であると考えられた。

SP と non-SP におけるサイトカインの発現の違いを検討したところ、TGF-beta の発現に違いが見られた。SP の方が、TGF-beta の発現が強くみられた。これは RNA レベルでも、タンパクレベルでも同様の結果であり、培養上清中の濃度も SP の方が高く、分泌されていることが示された。そこで、幹細胞マーカーと TGF-beta の発現を硬化型肝細胞癌の病理組織標本を用いて検討したところ、ABCG2 や MDR1 など SP の形質をつかさどると考えられる分子の発現は TGF-beta の発現細胞とよく一致していた。つまり、硬化型肝細胞癌の中に存在する幹細胞マーカー陽性細胞から産生される TGF-beta が硬化型肝細胞癌の線維化誘導因子になっていると考えられた。

これらの幹細胞マーカーに着目した研究により、ABCG2 のように単独分子で、癌細胞のヒエラルキーを確認でき、癌幹細胞を含む

細胞集団を抽出できる分子もあるが、CD133 のように、単独では癌幹細胞を同定するのが困難な分子も存在することが明らかとなった。また、肝細胞癌、胆管癌、膵管癌では、これらの分子の発現や、陽性細胞の特徴に違いが見られた。特に、胆管癌や膵管癌では、CD133 は幹細胞マーカーとしてではなく、分化マーカーにも発現があるので、癌幹細胞を同定することは困難であると考えられた。今後は、さらに多種類の幹細胞マーカーを用いて、同様に in vitro と in vivo のデータを比較する研究を行っていく予定である。特に複数のマーカーを用いることで、より少ない細胞集団として癌幹細胞を抽出する方法を明らかにしたい。

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 Itatsu K, Zen Y (他 12 名、9 番目), Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha. 174, 829-41, 2009, 査読有
- ② Nakanishi Y, Zen Y (他 7 名、2 番目), Extrahepatic bile duct carcinoma with extensive intraepithelial spread: a clinicopathological study of 21 cases. Mod Pathol, 21, 807-16, 2008, 査読有
- ③ Fujii T, Zen Y (他 7 名、2 番目), Participation of liver cancer stem/progenitor cells in tumorigenesis of scirrhous hepatocellular carcinoma—human and cell culture study. Hum Pathol, 39, 1185-96, 2008, 査読有
- ④ Nishino R, Zen Y (他 10 名、6 番目), Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. J Hepatol, 49, 207-16, 2008, 査読有
- ⑤ Nakanuma Y, Zen Y (他 5 名、5 番目), Pathology of peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma with reference to tumorigenesis. Hepatol Res, 38, 325-34, 2008, 査読有
- ⑥ Chiba T, Zen Y (他 11 名、9 番目), Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. Gastroenterology, 133, 937-50, 2007, 査読有
- ⑦ Nakamura K, Zen Y (他 5 名、2 番目), Vascular endothelial growth factor,

- its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1alpha are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver. Hum Pathol, 38, 1532-46, 2007, 査読有
- ⑧ Fujii T, Zen Y (他 1 名、2 番目), Minute scirrhous hepatocellular carcinomas undergoing different carcinogenetic processes. Pathol Int, 57, 443-8, 2007, 査読有
- ⑨ Kozaka K, Zen Y (他 8 名、5 番目), A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'. 51, 390-400, 2007, 査読有
- ⑩ Zen Y (他 6 名、1 番目), Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. Am J Pathol, 170, 1750-62, 2007, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 全陽、中沼安二、胆管 IPMN (IPNB) の臨床病理学的特徴. 第 97 回日本病理学会、2008. 5. 16、金沢
- ② Yoh Zen, Yasuni Nakanuma, Close relationship between cytokeratin 19 expression and side population phenotype during human hepatocellular carcinogenesis. AASLD The Liver Meeting, 2007. 11. 4、ボストン
- ③ 全陽、富士井孝彦、中沼安二、Stem cell marker に着目した肝細胞癌の発癌研究. 第 43 回日本肝臓学会総会、2007. 6. 1、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

全 陽 (ZEN YOH)
金沢大学・附属病院・准教授
研究者番号：90377416