

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間：2012 年 4 月 1 日～2013 年 3 月 31 日

研究題目：がん幹細胞の表面抗原分子を標的とした抗体治療法の開発

研究代表者：東京大学分子細胞生物学研究所 教授 宮島 篤

研究成果の概要：

肝臓に存在する幹／前駆細胞としては、胎児肝の肝芽細胞と成体障害肝のオーバル細胞が知られるが、我々はこれらの細胞で高発現する膜タンパク分子を 20 分子以上同定してきた。本課題ではこれらの分子が抗体治療の標的分子となりうるかについて検討するため、マウス正常肝の構成細胞や肝がん細胞、ヒトがん細胞株での遺伝子発現解析やフローサイトメトリー解析、免疫染色等を行ない、最終的に 4 つの有望な分子に絞り込んだ。

研究分野：免疫学

キーワード：幹細胞、抗体

1. 研究開始当初の背景

肝幹細胞とは肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有し、自己複製することのできる細胞と定義される。胎児期の肝臓においては肝芽細胞と呼ばれる細胞集団が肝幹／前駆細胞であるとされる一方で、成体においてもげっ歯類の肝障害モデルを用いた実験系で、重篤な肝障害を受けた際に出現するオーバル細胞は成体肝の幹／前駆細胞であると考えられていた。特にヒト肝がん組織においてもオーバル細胞様の細胞が認められることから、オーバル細胞と発癌との関連性やがん幹細胞としての可能性も指摘されている。我々は肝芽細胞やオーバル細胞に特異的に発現し、正常な成体肝臓には発現しない膜タンパク分子を複数同定し、その抗体を用いて肝臓の幹／前駆細胞の分離や幹細胞としての性状解析を行ってきた。肝芽細胞やオーバル細胞のような未分化な幹／前駆細胞に高発現する分子はがん幹細胞にも発現している可能性は高いと考えられたことから、本研究でその検証を行なった。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロアレイ解析から見出された肝芽細胞や肝幹／前駆細胞に高発現する分子について、膜タンパク質をコードする遺伝子に焦点を絞り、がん幹細胞に対する抗体治療の標的となりうるかについて検討を行なう。

3. 研究の方法

本研究では候補分子について、以下の解析を行なった。(1)マウスの正常肝構成細胞における候補遺伝子のリアルタイム RT-PCR による発現解析(2)マウスがん組織での免疫染色、(3)ヒトがん細胞株(肝がんや膵がん細胞株等)でのリアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析、(4)ヒト肝がん細胞株でのフローサイトメトリー解析。以上の解析から候補分子の絞り込みを行なった。

4. 研究成果

(1)当初、肝芽細胞や肝幹／前駆細胞で高発現する候補分子は 20 遺伝子近くあったが、発現解析の結果、正常肝臓の肝細胞や非実質細胞での発現が高いものは特異性が低いと判断し、半分に絞り込んだ。さらに、(3)ヒトがん細胞株(膵臓がん 8 株、肝臓がん 9 株、大腸がん 4 株、肺がん 1 株、乳がん 2 株)の計 24 株について候補遺伝子の発現解析を行なった結果、肝細胞株で発現の多い分子を 4 分子(LPCM#1～4 と命名)に絞り込んだ。(2)LPCM#1～4 についてマウスの肝がん組織を用いて免疫組織化学的染色を行なった結果、LPCM#3, 4 ががん部で強く染色された。(4)ヒト肝がん細胞株(HuH7, HepG2)を用いて LPCM#1～4 に対する抗体でフローサイトメトリー解析を行なった結果、いずれの分子もシフトが見られた。特に LPCM#1 は HuH7 株において強陽性と弱陽性集団に分かれた。今後はこれらの分子のがん細胞における

機能を調べるとともに、発現強度に違いが見られた細胞集団についても性状の違いなどについて検討を行なう。

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5件)

Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 22, 1166-1175, 2012.

Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol. Biol. Cell.* 23, 2845-2855, 2012.

Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A. α 1- and α 5-Containing laminins regulate the development of bile ducts via β 1-integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287, 28586-28597, 2012.

Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013.

Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and*

Development 27, 169-181, 2013.

〔学会発表〕(計7件)

Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima
Critical role of FGF7 for development of adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers

FASEB Summer Research Conference "Liver Biology: Fundamental mechanisms and translational applications. Snowmass Village Colorado, July 29-August 3, 2013.

Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima
"Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers"
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting
Thursday, June 14th, 2012

伊藤 暢、高瀬 比菜子、宮島 篤
「Critical role of FGF7 in regulating stem/progenitor cell response and regeneration in diseased mouse livers」
第85回 日本生化学会大会
平成24年12月16日 福岡市

谷貝 知樹、田中 稔、宮島 篤
肝再生および肝線維化におけるSemaphorin 3Eの機能. 第85回生化学会大会, 福岡
2012年12月16日

西條 栄子、内木 隆、宮島 篤
肝臓の発生および代謝機能獲得におけるTribbles遺伝子の役割学会
第35回日本分子生物学会年会福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
2012年12月12日

Miyajima A. “Cellular basis for liver regeneration”

Liver Metabolism, Diseases and Cancer,
Cold Spring Harbor Asia, Suzhou

May 21-25, 2012

Miyajima A. “Role for stem/progenitor cells in liver regeneration”

First EHBH International Forum on
Liver Biomarkers

Shanghai, May 26-26, 2012

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京大学分子細胞生物学研究所・教授
宮島 篤

(2) 研究分担者

(3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦