

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590967

研究課題名(和文) 肝癌幹細胞発生に関わるゲノム異常の網羅的解析

研究課題名(英文) Whole Exome Analysis of EpCAM-positive Hepatocellular Carcinoma Stem Cells

研究代表者

山下 太郎 (Yamashita, Taro)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：90377432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌の再発、転移など、難治性に関わる重要な細胞集団として癌幹細胞が知られている。本研究ではEpCAM陽性癌幹細胞における遺伝子変異を全エクソンレベルで網羅的に解析した。EpCAM陽性癌幹細胞を有する肝癌では癌抑制遺伝子であるTP53の変異が認められ、さらに個体特異的にARIDやCDKNなど癌の未分化性、細胞周期に関わる遺伝子に変異が認められ、肝癌の難治性を克服する上で重要な分子標的と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent evidences suggest that hepatocellular carcinoma possesses cancer stem cells that play a pivotal role on local recurrence and distant organ metastasis after radical treatment. In this study, we evaluated the genetic mutations observed in hepatocellular carcinoma containing EpCAM-positive cancer stem cells at whole exome level. We identified TP53, ARID, and CDKN mutations in EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells. These mutations may be responsible for the maintenance of EpCAM-positive cancer stem cells and therefore may be good targets for eradication of hepatocellular carcinoma.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

近年、固形癌において幹細胞様の特徴を示す癌幹細胞の存在が明らかになり、癌の転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっていることが示唆されている。我々は肝幹細胞マーカーを用いた肝細胞癌診断システムを開発、予後予測や Wnt シグナル阻害剤に対する薬物応答予測が可能であることを見出した (Yamashita et al, Cancer Res 67:10831, 2007, Cancer Res 68:1451, 2008)。更に我々は肝細胞癌において自己複製能力と非対称性分裂能力を持ち、NOD/SCID マウスで高い腫瘍形成をもつ癌幹細胞分画の分離精製に成功、Wnt シグナルが自己複製や非対称性分裂の制御を行っていることを同定した (Yamashita et al, Gastroenterology 136:1012, 2009)。興味深いことに、癌幹細胞は正常肝幹細胞同様に肝分化誘導サイトカインのひとつである Oncostatin M に反応し抗癌剤感受性が高まることが判明したが、分化誘導療法単独では腫瘍の完全退縮には至らず、肝細胞癌の根絶には癌幹細胞の自己複製に重要となる遺伝子異常の同定が必須であると考えられた (Yamashita et al, Cancer Res 70:4687, 2010)。しかしながら、肝癌幹細胞の発生維持に関わる遺伝子異常については研究開始時には全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

肝細胞癌の発生維持に必須な細胞集団であると考えられる肝癌幹細胞を分離し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子異常の解析およびマイクロアレイを用いた転写制御異常の解析を網羅的に行い、肝癌幹細胞の自己複製、腫瘍形成、浸潤転移、抗癌剤抵抗性に関わる遺伝子転写産物異常を同定、進行肝細胞癌患者に対する新規治療法の開発および創薬を推進することを目的とした。

3. 研究の方法

サンプル 金沢大学附属病院で肝切除術を

受けた 2 例の肝細胞癌の新鮮切除標本から癌幹細胞を EpCAM 抗体および AutoMACSpro を用いて分離した。分離後の細胞の純度は FACS Calibur フローサイトメーターを用いて評価した。腫瘍形成能力については 6 週齢オス NOD/SCID マウスの皮下移植モデルを用いて経時的に評価を行った。腫瘍細胞は PBS に懸濁後にマトリゲルと 1 : 1 で混和し、マウスの背部皮下に移植した。

シーケンス解析 分離した細胞は DNAzo1 を用いてゲノム DNA を回収した。次世代エクソームシーケンス解析はアジレント社 SureSelect Target Enrichment System およびイリミナ社 HiSeq 2000 を用いて解析した。同定した遺伝子変異についてはキャピラリーシーケンサーにより、同一サンプルを用いて確認した。さらに金沢大学附属病院で外科切除を受けた 60 例の肝細胞癌組織および 6 種類の肝癌培養細胞株 (Huh7, Huh1, Hep3B, HLE, HLF, SK-Hep-1) からゲノム DNA を抽出し、同定された遺伝子変異の頻度について解析した。

4. 研究成果

新鮮外科切除標本 2 例から EpCAM 陽性および陰性細胞を MACS ビーズおよび autoMACSpro を用いて分離し、分離後の純度をフローサイトメーターで評価、約 80% 程度の純度であることを確認した (図 1)。

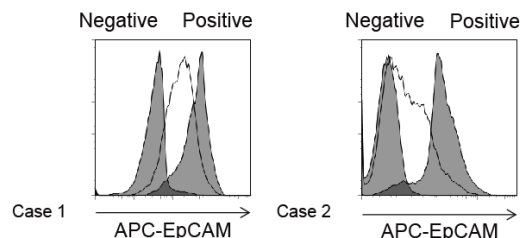


図 1 肝細胞癌細胞のフローサイトメーター解析結果

また、分離した細胞における *EPCAM* 遺伝子発現量を qRT-PCR で確認した (図 2)。

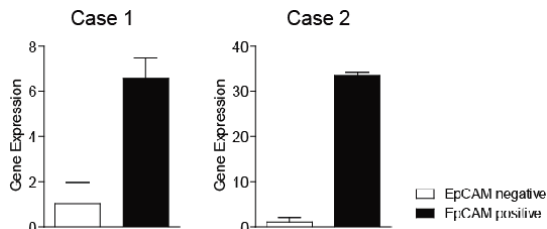
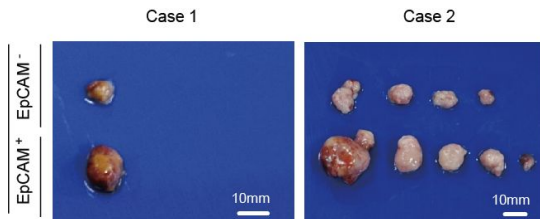


図2 分離した肝細胞癌細胞における EPCAM 発現量(qRT-PCR 解析)



さらに、分離した細胞を NOD/SCID マウスの皮下に移植し、腫瘍形成能力が EpCAM 陽性細胞分画で高いことを確認した(図3)。

図3 NOD/SCID マウス皮下移植モデルを用いて形成した腫瘍

以上の解析から、分離した EpCAM 陽性癌細胞が癌幹細胞の特徴を有していることを確認した。そこで、EpCAM 陽性細胞、陰性細胞、非癌部の肝硬変組織、並びに末梢血単核球から DNA を抽出し、癌における遺伝子変異を whole exome 解析で行った。EpCAM 陽性、陰性細胞を問わず、癌において認められるエクソソーム変異を 19,623 個同定し、クオリティチェックを行った後に末梢血単核球でも同様に認められるものは個体差による SNP として取り除くと 818 変異が同定された。うち確実に 20 回以上シーケンスが行われたものを選び、既知の SNPs を取り除き、かつ 20% 以上のリードで変異が確認できるものは 190 認められた。27 個が non missense 変異であり、うち機能異常を呈する可能性がある変異は 163 変異が 87 遺伝子上に同定された(図4)。

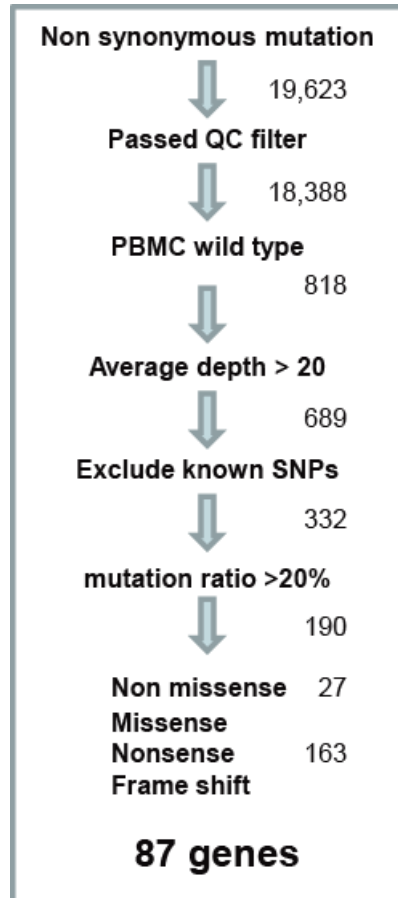


図4 次世代シーケンス解析から同定された肝癌遺伝子変異

2つの肝癌で共通に認められた変異は TP53 のみであり、肝癌において遺伝子変異は極めて多様であることが示唆された。Case1 では既報の遺伝子変異である ARID1A, ARID2 の変異が認められ、Case2 では細胞周期に関わる CDKN の変異が認められた。さらに EpCAM 陽性細胞で多く認められる変異を検討したところ、カドヘリンファミリーの PCDH18 遺伝子変異が EpCAM 陽性細胞で認められ、かつ他の 60 例の肝癌症例で検討を行ったところ 4 例でその変異が確認された。培養細胞における検討では EpCAM 陽性細胞での発現低下が認められ、この分子の機能異常が EpCAM 陽性肝癌幹細胞の悪性形質に関わっている可能性が示唆された。

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 5件)

Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, Honda M, and Kaneko S. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014 (60) 127-34.

査読有り

Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, and Kaneko S. Discrete Nature of EpCAM+ and CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Hepatology* 2013 (57) 1484-97. 査読有り

Yamashita T and Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J Clin Invest* 2013 (123) 1911-8. 査読有り

Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, Zhao X, Andersen JB, Ye QH, Jia HL, Qin LX, Yamashita T, Woo HG, Kim YJ, Kaneko S, Tang ZY, Thorgeirsson SS, and Wang XW. Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012 (56) 1792-803. 査読有り

Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, and

Hirao A. Nucleostemin in injury induced liver regeneration. *Stem Cells Dev* 2012 (21) 3044-54. 査読有り

[学会発表](計 9件)

Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Biomarkers of cancer stem cells in HCC. The 1st International Symposium of Catholic Liver Research Center, Symposium, Seoul, Korea 2013年12月7日

Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, and Kaneko S. Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI and Serum AFP Predict the Prognosis of Early-stage Hepatocellular Carcinoma. AASLD Annual Meeting, Washington DC, 2013年11月5日

Yamashita T, Honda M, Nio K, Hara Y, Hayashi T, Oishi N, Sunakozaka H, Takatori H, Colombo F, Porretti L, Wang XW, and Kaneko S. The evolution of diverse cancer stem cells in human liver cancer. AACR Annual Meeting, Washington DC 2013年4月7日

Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Cancer Stem Cells in Hepatocarcinogenesis. The 2nd JSGE International Topic Conference, Symposium, Kagoshima, Japan 2013年3月22日.

Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Colombo F, Porretti L, Wang XW, and Kaneko S.

The evolution of diverse cancer stem cells in human liver cancer. AASLD Annual Meeting, Boston, 2012年11月10日

山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞形質の多様性と進化、JDDW2012、シンポジウム、神戸、2012年10月11日

山下太郎、本多政夫、金子周一 肝細胞癌の分子分類、日本肝癌研究会、教育基調シンポジウム、金沢、2012年7月20日

山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞の分子標的薬に対する応答性の検討、日本肝臓学会総会、ワークショップ、金沢、2012年6月8日

Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Nio K, Hara Y, Wang XW, and Kaneko S. Distinct liver cancer stem cells defined by EpCAM and CD90 in human hepatocellular carcinoma. AACR Annual Meeting, Chicago 2012年4月4日

6 . 研究組織

- (1) 山下 太郎 (YAMASHITA TARO)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：90377432
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし