

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460994

研究課題名(和文) 肝硬変微小環境による肝がん幹細胞発生維持制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of liver cancer stem cells by cirrhotic liver microenvironment

研究代表者

山下 太郎 (YAMASHITA, TARO)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：90377432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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可塑性について、特にがん幹細胞の維持制御機構と微小環境を構成する細胞との関連について検討を行った。線維芽細胞はTGF-betaを分泌しEpCAM陽性癌幹細胞を増加させ、そのメカニズムとしてKDM2Bの発現誘導によるH3K36メチル基のエピジェネティックメモリー制御が考えられた。また癌微小環境を反映すると考えられる6種の血清サイトカインを同定、分子標的薬ソラフェニブの感受性、予後延長効果に関わる可能性を見出した。

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 found that fibroblasts secretes TGF-beta and induce the stemness in EpCAM+ hepatocellular carcinoma. This effect was mediated at least in part through the activation of H3K36 demethylase KDM2B to modify epigenetic memories and induce the population of EpCAM+ cancer stem cells. We further identified the six cytokines, potentially reflecting the activation of microenvironment of hepatocellular carcinoma, to predict the survival outcome of hepatocellular carcinoma patients who received sorafenib treatment.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 癌幹細胞 肝硬変 微小環境

1. 研究開始当初の背景

近年癌細胞の一部に幹細胞様の性質を有する細胞集団が存在し、癌の発生維持に必須の役割を果たしているという仮説、いわゆる癌幹細胞 (Cancer Stem Cell: CSC) 仮説が注目を集めている。応募者は遺伝子発現プロファイルを用いた解析から肝幹細胞マーカーを用いた肝細胞癌診断システムを提唱、予後や 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、肝幹細胞マーカーである EpCAM 陽性細胞が肝癌 CSC である事、肝分化誘導サイトカイン Oncostatin M により分化誘導を受けることを見出した (Yamashita T, Cancer Res. 2007, 2008, Gastroenterology 2009, Cancer Res.2010)。また応募者は肝癌 CSC が均一な細胞集団でないこと、特に CD90 陽性 CSC (Yang ZF, Cancer Cell 2008) は EpCAM 陽性 CSC と独立して存在し間質細胞の形態を有し、TGF-β 産生を介して EpCAM 陽性 CSC と協調して腫瘍形成、転移を制御していることを同定した (Yamashita T, Hepatology 2013)。このことは細胞の多様性と周囲の微小環境との相互作用において、腫瘍形成過程と正常胚形成過程が極めて類似していることを示している。

癌発生進展過程における CSC 発生のメカニズムとして、遺伝子変異によるクローン進化に加え、近年クロマチン修飾変化による細胞のリプログラミングの関与が示唆されている (Magee JA, Cancer Cell 2012)。このリプログラミングは non-CSC をある条件で CSC に脱分化させる可能性があり、CSC の階層をダイナミックに変化させることで肝癌の臨床経過に影響を与えている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では肝硬変における間質細胞と CSC、non-CSC の相互作用について検討を行い、特に肝癌が肝硬変微小環境から受けるエピジェネティック記憶制御機構を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

線維芽細胞、血管内皮細胞、星細胞と肝癌培養細胞株を Cell Culture Insert (BD Bioscience) を用いて共培養し、各肝癌細胞株における EpCAM 陽性 CSC の頻度について FACS で解析した。CSC の頻度上昇が認められた肝癌細胞株と間質細胞の組み合わせを調べ、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子のプロファイルと照らし合わせて CSC の頻度を増加させる候補シグナル伝達系を同定した。同定したシグナルが KDM2B および H3K36me2 のヒストンマークに与える影響をウェスタンブロットで確認した。

4. 研究成果

Huh7 細胞を線維芽細胞株 TIG3 と共培養を行ったところ、EpCAM 陽性癌幹細胞分画の

上昇が認められた (図 1 上段)。この上昇は抗 TGF-beta 抗体投与および TGF-beta 受容体阻害薬の投与で抑制され、TGF-beta シグナル伝達系の関与が疑われた (図 1 下段)。

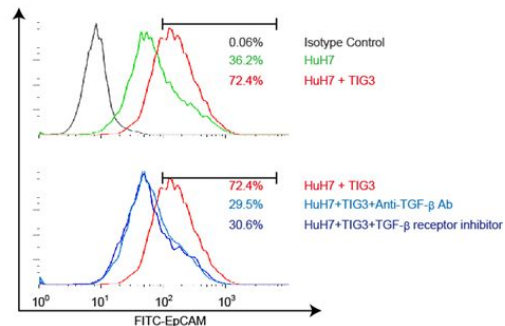


図 1 EpCAM 発現解析 (FACS)

さらに、細胞の遊走浸潤能、スフェロイド形成能を検討したところ、Huh7 細胞は TIG3 や Wi38 などの線維芽細胞と共培養したときにのみ浸潤能力の活性化が認められた (図 2)。

一方、星細胞株である Lx-2 や血管内皮細胞株である HUVEC との共培養ではそのような効果は認められず、癌微小環境の中でも特に線維芽細胞から分泌される TGF-beta が癌幹細胞の誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

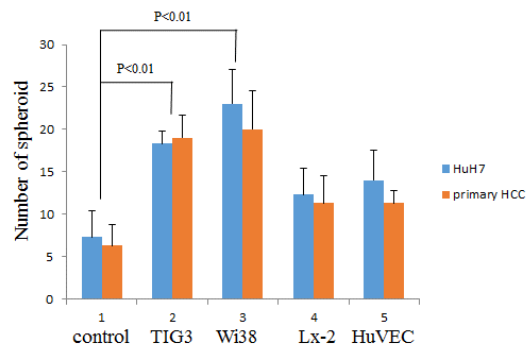


図 2 共培養によるスフェロイドアッセイ

次いで、TGF-beta がヒストンマークを制御する KDM2B に与える影響をウェスタンブロットで確認したところ、KDM2B は TGF-beta 投与 12 時間後より増加し、72 時間後に最大値を示すこと、EpCAM の発現量に相関することを同定した (図 3)。

以上の検討から、微小環境による TGF-beta シグナル伝達系の活性化が EpCAM 陽性癌幹細胞を誘導し、KDM2B を誘導することでエピジェネティックメモリーを制御し、肝細胞癌の増殖、転移に影響を与え、癌の悪性形質に影響を与えている可能性が示唆された。

そこで、最後に進行肝細胞癌患者の血清を用いてサイトカインの測定を行い、抗癌剤や分子標的薬の感受性との関連について検討を行った。すると、IL-8、IL-5、TGF-a、CXCL9、PDGF-BB、VEGF-A を測定することにより、肝細胞癌は微小環境シグナルが

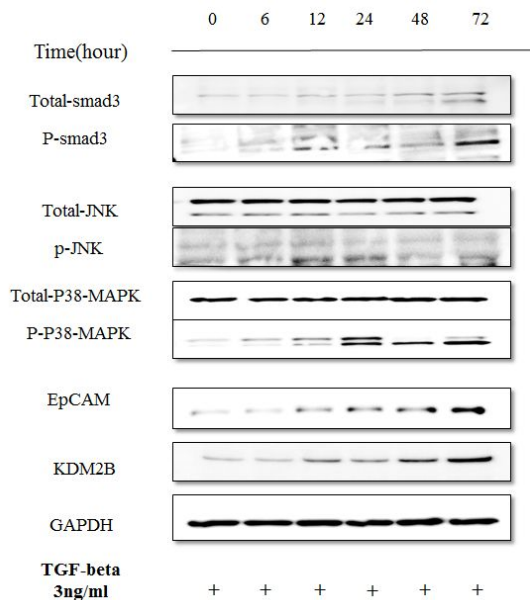


図3 ウェスタンブロットによる TGF-beta が KDM2B 発現に与える影響

活性化しているサブタイプと不活化しているサブタイプに分かれることを見出した(図4a, b)。さらにサイトカインが活性化しているサブタイプではソラフェニブによる治療で生存期間の延長が得られることを同定した(図4c)。

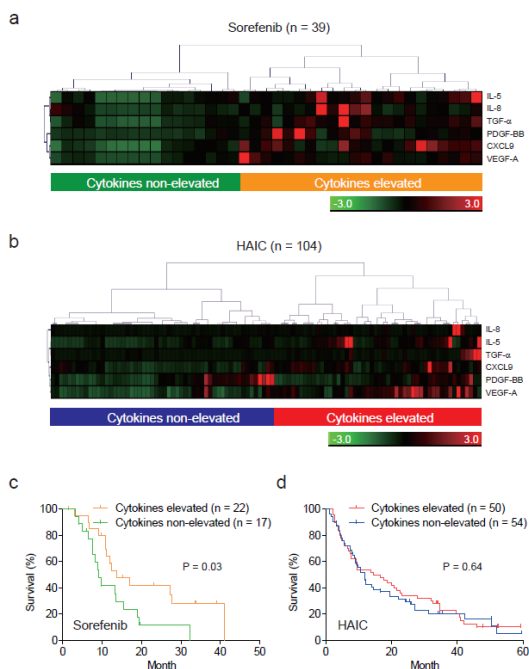


図4 血清サイトカインと抗癌剤、分子標的薬感受性

以上のことから肝癌微小環境は肝癌の幹細胞性、分子標的薬感受性に多大な影響を与えている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 5件)

1. Nomura Y, Yamashita T, Oishi N, Nio K, Hayashi T, Yoshida M, Hayashi T, Hashiba T, Asahina Y, Okada H, Sunagozaka H, Takatori H, Honda M, Kaneko S. De Novo Emergence of Mesenchymal Stem-Like CD105+ Cancer Cells by Cytotoxic Agents in Human Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol.* 2017; 2: 184-9. 査読あり
2. Nio K, Yamashita T, Kaneko S. The evolving concept of liver cancer stem cells. *Mol Cancer* 2017; 16: 4. 査読あり
3. Yamashita T, Nault JC. Stemness of liver cancer: From hepatitis B virus to Wnt activation. *J Hepatol* 2016;65:873-5. 査読あり
4. Nio K, Yamashita T, Okada H, Kondo M, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Zeng SS, Yoshida M, Sunagozaka H, Oishi N, Honda M, Kaneko S. Defeating EpCAM liver cancer stem cells by targeting chromatin remodeling enzyme CHD4 in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2015;63:1164-72. 査読あり
5. Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014;60:1674-85 査読あり

(学会発表)(計 7件)

1. Yamashita T, Honda M, Kaneko S. The role of liver cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. APASL, Shanghai, 2017.2.17
2. Yamashita T, Okada H, Honda M, Kaneko S. Peretinoin prevents DNA damage accumulation and reverts preneoplastic lesions to normal liver-like in platelet derived growth factor-c transgenic mice. AASLD, Boston, 2016.11.11
3. 山下太郎, 羽柴智美, 金子周一. ソラフェニブ抵抗性を獲得した肝細胞癌に対する治療戦略の基礎検討. 日本肝臓学会総会, 千葉, 2016.5.19.

4. Yamashita T, Kondo M, Okada H, Oishi N, Honda M, Kaneko S. Fibrotic liver microenvironment promotes stemness of liver cancer through the activation of TGF-beta and histone demethylase KDM2B in a p53 dependent manner. AASLD, San Francisco, 2015.11.12.
5. Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Exploring the stemness of hepatocellular carcinoma. Global Liver Conference, Honolulu, 2015.5.22.
6. Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI and AFP predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Molecular features of MRI images and their clinical utilities. AACR-SNMMI Joint Conference on State-of-the-Art Molecular Imaging in Cancer Biology and Therapy, San Diego, 2015.2.13.
7. Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Wnt/beta-catenin signaling activates different target genes in hepatocellular carcinoma based on the stem/maturational status and HNF4a. AASLD, Boston, 2014.11.10.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ソラフェニブ応答性予測のための方法

発明者：山下太郎、本多政夫、金子周一

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：2016-238838

出願年月日：2016年12月8日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 太郎 (YAMASHITA TARO)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：90377432

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし