



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロゲル誘導肝癌幹細胞に対する新規治療法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	谷, 道夫
Description	配架番号 : 2614
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14495号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81834
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Michio_Tani_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 谷 道夫

学位論文題名

ハイドロゲル誘導肝癌幹細胞に対する新規治療法の開発

(Development of Novel Therapies for Hydrogel-Induced Liver Cancer Stem Cells)

【背景と目的】

肝細胞癌は、原発性肝悪性腫瘍のうち 80%以上を占め、世界の癌関連死亡原因の 4 位であり、罹患率が高く予後不良な癌腫である。根治のための第一選択は切除であるが、ウイルス性やアルコール性肝炎、脂肪性肝炎などの慢性肝障害を背景に発癌するため、発見時には肝予備能が乏しいことが多く、手術適応となる症例は少ない。切除可能であっても術後再発率は 7 割を超え、高率である。転移・再発例に対する治療法は分子標的薬の開発が進み予後は延長しているが、生存中央値は約 12 ヶ月程度と依然不良である。

癌の転移・再発や治療抵抗性の原因は、癌幹細胞（Cancer Stem Cells, CSCs）の存在によると考えられている。癌幹細胞は自己複製能と多分化能、および生体内での腫瘍形成能を有し、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが明らかとなっている。肝細胞癌においても CSCs の役割について注目され、種々の研究が行われているが、機能解析は十分ではない。

我々は近年、Double Network hydrogel（DN ゲル）という培養基材を用いて CSCs を誘導する新規の方法を開発した。DN ゲルは poly（2-acrylamide-2-methylpropane-sulfonic acid）（PAMPS）ゲルと poly（N,N'-dimethylacryl-amide）（PDMAAm）ゲルの 2 種類のハイドロゲルからなり、親水性を持ちながら高い剛性を有する高機能ゲルである。我々はこれまで DN ゲルを用いて効率的に CSCs を誘導する方法を開発しており、さらなる治療開発の発展が期待されている。

本研究では DN ゲルによって肝癌幹細胞を誘導し、その分子生物学的解析を行うことで、肝癌幹細胞に対する治療標的分子の同定、および新規治療法の確立を目的とした。

【材料と方法】

1) 細胞株と培養方法：4 種類の肝細胞癌細胞株（HUH7、HLF、HepG2、Hep3B）を通常培養メディアウムを用いて Polystyrene（PS）dish、ultralow attachment（UL）dish、DN ゲル上で培養し、形態観察、real-time PCR および Western blotting による遺伝子および蛋白質発現解析を行った。2) マイクロアレイ解析：PS dish、UL dish、DN ゲル上で培養した HLF 細胞の発現量の差を網羅的に解析し、治療候補分子としてケメリン受容体 CMKLR1 を選定した。3) 免疫組織化学染色：抗 CMKLR1 抗体を使用しヒト肝細胞癌切除検体 115 症例を用いて免疫組織化学染色を行い、生命予後との関連を評価した。4) ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤の暴露実験：二つ肝細胞癌株（HLF、HUH7）について PS dish および DN ゲル上で培養した状態でのケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤の細胞障害性について評価し、次いで DN ゲル上で培養した際の遺伝子発現変動を解析した。5) ゼノグラフトモデル実験：HUH7 細胞をヌードマウスの皮下注射する異所性異種移植モデルを作製し、ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤 α -NETA による移植前治療および腹腔内投与を行い、腫瘍形成への影響を評価した。

【結果】

1) DN ゲルによる幹細胞性誘導の検証：DN ゲル上で培養した 4 種類の肝細胞癌細胞株は全て細胞集塊によるスフィアを形成し、real-time PCR で *Nanog*、*Oct3/4* などの stemness marker

genes および CSCs の特徴の一つである ATP binding cassette (ABC) トランスポーター遺伝子である *ABCB4*、*ABCC6*、*ABCG2* の発現亢進が認められた。また、DN ゲル上で培養した HLF、HUH7 細胞において、Western blotting で *Nanog* および *OCT3/4* の蛋白質発現亢進が認められた。HLF 細胞において幹細胞マーカー遺伝子および ABC トランスポーター遺伝子は PS dish と比較して UL dish で発現が亢進し、DN ゲルでは UL dish と比較してさらに発現の亢進が認められた。2) マイクロアレイ解析: DN ゲル、UL dish において PS dish と比較して 2 倍以上発現亢進した遺伝子らを抽出した。DN ゲルで発現亢進のあった 82 遺伝子について階層クラスター解析を行い、DN ゲル上で特異的な発現亢進を認めるクラスターから細胞膜局在分子である *CMKLR1* を治療候補として選定した。3) 免疫組織化学染色: 115 例のヒト肝細胞癌切除検体を用いてケメリン受容体 *CMKLR1* の免疫組織化学染色を行い、発現強度を High、Middle、Low の 3 段階に分類した。High 群の患者は Middle および Low 群と比較して統計学的に有意に予後不良であった。4) ケメリン受容体 *CMKLR1* 阻害剤の暴露実験: HLF、HUH7 細胞におけるケメリン受容体 *CMKLR1* 阻害剤 α -NETA の殺細胞性における EC_{50} 値を測定した。このとき、溶解性の細胞死であるパイロプトーシスが生じていることが明らかとなった。また、DN ゲル上で培養した HLF、HUH7 細胞に α -NETA を低濃度で暴露した際の遺伝子発現変動を real-time PCR で解析すると、*Nanog* および *Oct3/4* の発現が低下していた。5) 生体内腫瘍形成阻害効果の検証: 皮下移植マウスモデルにおいて α -NETA で前治療を行った HUH7 細胞を移植したところ、無前治療群に比較して形成した腫瘍の重量が有意に低下した。また、移植直後より α -NETA を腹腔内投与した群では、濃度依存性に腫瘍細胞が筋層へ浸潤する割合が低下する傾向にあった。免疫組織学的検討により、筋層浸潤が抑制された領域では上皮系マーカーである E-cadherin の発現が上昇していた。

【考察】

DN ゲル上で培養した肝細胞癌細胞株は、遺伝子発現および蛋白質発現解析より癌幹細胞の性質を獲得していることが示された。最も反応性の高かった HLF 細胞を用いて DN gel 上培養時の遺伝子発現変動を網羅的に解析し、治療候補分子として細胞膜上に発現する G 蛋白質共役受容体であるケメリン受容体 *CMKLR1* を選定した。ケメリン受容体 *CMKLR1* はケメリンをリガンドに持ち、白血球の走化性や間葉系幹細胞の分化、癌の増殖や浸潤に関与することが報告されている。115 例の肝細胞癌臨床検体を用いた予後解析から、ケメリン受容体 *CMKLR1* 蛋白質の高発現は予後不良因子であることが示された。ケメリン受容体 *CMKLR1* 阻害剤である α -NETA は肝細胞癌細胞株に対して 5 μ g/ml 以上の濃度で細胞障害性を発揮する一方で、0.5 μ g/ml の低濃度での暴露では幹細胞性の誘導を阻害する効果が認められた。また *in vivo* マウスゼノグラフト実験では α -NETA 投与群で腫瘍の周囲組織への浸潤および腫瘍形成の阻害効果が一部認められた。

本研究の結果から、ケメリン受容体 *CMKLR1* の機能阻害により幹細胞マーカー遺伝子発現の低減および癌幹細胞の特徴である生体内腫瘍形成能力の阻害効果が認められた。このことはケメリン受容体 *CMKLR1* の阻害により肝癌幹細胞をターゲットとした治療につながる可能性を示唆すると考えられる。また、*in vivo* では明らかではなかったが、*in vitro* においては細胞障害性も示されており、治療薬としての可能性を期待できる。

【結論】

DN ゲルを用いて肝細胞癌細胞株から癌幹細胞の性質を誘導し、解析を行った結果、肝癌幹細胞に対する新規治療候補分子ケメリン受容体 *CMKLR1* を同定した。同分子の機能阻害により幹細胞性の阻害効果が得られたことから同分子は治療候補分子として期待できる。