



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 [全文の要約]
Author(s)	谷, 道夫
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2614 他
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/2115/81836
Type	doctoral thesis
File Information	Michio_Tani_summary.pdf



学 位 論 文（要約）

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（要約）

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

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

谷 道夫

学 位 論 文 (要約)

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 (要約)

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

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

谷 道夫

【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、世界的に罹患率が高く予後不良な癌腫である。根治治療は切除であるが、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、手術適応症例は全体の 5-10%に限定される。また、切除後の再発率は 7 割を超え、高率である。転移・再発例に対しては分子標的治療薬の開発により予後は延長しているが、治療成績は生存中央値が約 1 年程度と依然として不良であり、より効果的な治療法が開発が期待される。

癌の転移・再発や治療抵抗性の原因は、癌幹細胞の存在によると考えられている。癌幹細胞はヒト急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia, AML）で初めて報告された概念である。不均一なヒト AML 細胞の集団の中から特定のパターンの細胞表面蛋白質を発現する細胞が、極少数で免疫不全マウスにヒト AML を定着させ、多様な細胞を再構成する少数集団として存在することが報告され、腫瘍形成に必要な少数の存在が増殖して分化するというヒエラルキーが認識されるようになった。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り、腫瘍の転移・再発の誘因と考えられている。癌幹細胞の存在は肝細胞癌を含む多様な癌種で存在が報告されており、肝癌幹細胞の役割についても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た癌幹細胞の新規誘導法を開発した。DN ゲルは poly (2-acrylamide-2-methylpropane-sulfonic acid)（PAMPS）ゲルと poly (N,N'- dimethylacrylamide)（PDMAAm）ゲルの性質の異なる 2 種類のハイドロゲルから構成され、親水性と高い剛性を併有している点で生体組織に類似した性質を有する高機能ゲルである。このゲルはウサギの生体内に移植することで軟骨再生を誘導し、その際にゲルと接着した周囲組織の細胞の幹細胞性を惹起することが報告されており、幹細胞化を誘導するバイオマテリアルとしてのポテンシャルが期待される。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）を通常培養メディウム（10%FBS 含有 DMEM）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 による遺伝子発現解析、Western blotting による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 細胞から抽出した RNA に対し、SurePrint G3 Human Gene Expression 8 × 60K v3.0（Agilent Array）を使用して網羅的遺伝子発現解析を行い、培養条件による発現強度の変化を評価し、治療対象候補遺伝子を抽出した。
- 3) 免疫組織化学染色：治療対象候補遺伝子として CMKLR1 に注目し、肝細胞癌検体 115 例に対して抗 CMKLR1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、腫瘍組織における染色強度と予後との相関を解析した。
- 4) CMKLR1 阻害剤の暴露実験：PS dish および DN ゲル上で培養した肝癌細胞株（HLF、HUH7）に CMKLR1 阻害剤 2-(α -Naphthoyl) ethyltrimethylammonium iodide (α -NETA) を処理して細胞障害程度を評価し、さらに細胞を殺傷しない濃度で α -NETA を暴露し、DN ゲル上培養細胞において幹細胞関連遺伝子の発現変動を解析した。
- 5) マウスゼノグラフト実験：HUH7 細胞をヌードマウスの皮下に移植して異所性異種移植モデルを作製し、 α -NETA の腹腔内投与および移植前処置を追加した際における腫瘍形成能への影響を解析した。

【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（スフィア）を形成し、real-time PCR で幹細胞マーカー遺伝子の発現亢進および癌幹細胞の特徴の一つである ATP binding cassette（ABC）トランスポーター遺伝子の発現亢進が認められ、特に HLF 細胞ではその傾向が顕著であった。DN ゲル上で培養した HLF、HUH7 細胞において、Western blotting で幹細胞マーカーの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：HLF 細胞を DN ゲル、UL dish 上で培養した条件それぞれにおいて、PS dish 上で培養した条件対して 2 倍以上発現亢進した遺

伝子を抽出した。DN ゲルで発現亢進が認められた 82 遺伝子の各培養条件による発現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を抽出した。さらに同クラスター内でタンパクをコードする 7 遺伝子を候補遺伝子として抽出し、その中から細胞膜局在分子である *CMKLR1* を治療標的候補分子として選定した。

3) 免疫組織化学染色：115 例の肝細胞癌切除検体において *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。さらに High 群と Middle/Low 群の 2 群へ分類し、 Kaplan-Meier 曲線を作成し、比較すると High 群は統計学的に有意に予後不良であった。また、患者背景因子・腫瘍因子において High 群と Middle/Low 群の 2 群間に有意差を生じる因子は認めなかった。

4) *CMKLR1* 阻害剤 α -NETA の暴露実験：HLF、HUH7 細胞において α -NETA の殺細胞性における EC₅₀ 値を測定した。このとき溶解性の細胞死であるパイロトーシスが起き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* の発現が低下した。

5) 生体内腫瘍形成阻害効果の検証： α -NETA をマウス腹腔内に投与することにより、用量依存的に腫瘍の筋層浸潤が低下した。筋層浸潤が抑制された領域では上皮系マーカーの E-cadherin の発現が上昇していた。また、移植前に α -NETA 治療を付加した実験系では、形成した腫瘍の重量低下が認められた。

【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。幹細胞性を獲得するメカニズムを解析するため、幹細胞マーカーと連動して発現変動のある遺伝子を抽出するため、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た。治療候補分子として、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おり、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。この分子の悪性度を解析するため、当教室における切除検体を用いた予後解析を行なったところ、肝細胞癌において *CMKLR1* 蛋白質の高発現は予後不良因子であることが示され、癌の悪性度に関連する因子である可能性が示された。ま

た、一部の症例では同一検体、同一視野内で染色性が細胞ごとに強弱が認められ、幹細胞性のヘテロジェナイティを呈している可能性が考えられた。また、CMKLR1 阻害剤 α -NETA は肝細胞癌細胞株に対して 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で細胞障害性を発揮する一方で、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度での暴露は幹細胞性誘導の阻害効果が認められた。この結果から、CMKLR1 が幹細胞マーカー発現の上流に位置する可能性が示唆された。また *in vivo* 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抑制効果が認められ、CMKLR1 の阻害が癌幹細胞としての腫瘍形成能への阻害効果を示している可能性が示唆された。

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の発現低下および生体内腫瘍形成能力の抑制が認められた。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標的とした新規治療法の開発につながる可能性を示唆する。 α -NETA は *in vitro* において細胞障害性を示すことから、治療薬としての有効性が期待できる。

【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。