



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14495
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96783
Type	doctoral thesis
File Information	Michio_Tani.pdf



学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

谷 道夫

学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

谷 道夫

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	12 頁
結果	19 頁
考察	37 頁
結論	42 頁
謝辞	43 頁
利益相反	44 頁
引用文献	45 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に投稿中である。

Michio Tani, Masumi Tsuda, Jun Suzuka, Lei Wang, Satoshi Tanikawa, Hirokazu Sugino, Yusuke Ishida, Toshiya Kamiyama, Jian Ping Gong, Akinobu Taketomi, Shinya Tanaka.
Identification of novel LCSCs marker via reprogramming by Double-Network gel
Nature, submitted, 2020

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 谷道夫、津田真寿美、鈴鹿淳、王磊、杉野弘和、谷川聖、石田雄介、グン剣萍、田中伸哉、武富紹信
バイオマテリアルによる肝癌幹細胞の新規誘導法
第 119 回日本外科学会学術集会、2019. 4.18-20、大阪

2. 谷道夫、津田真寿美、鈴鹿淳、王磊、杉野弘和、谷川聖、石田雄介、グン剣萍、田中伸哉、武富紹信
バイオマテリアルによる肝癌幹細胞の新規誘導法の開発とその解析
第 120 回日本外科学会定期学術集会、2020.8.13-15、横浜/Web

3. 谷道夫、津田真寿美、鈴鹿淳、武富紹信、田中伸哉
CMKLR1 は肝癌幹細胞標的治療のための候補分子である
第 79 回日本癌学会学術総会、2020. 10.1-3、広島/Web

4. 谷道夫、津田真寿美、王磊、鈴鹿淳、杉野弘和、グン剣萍、武富紹信、田中伸哉
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
第 122 回北海道癌談話会、2020. 10.17、札幌

要旨

【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、手術適応症例は少ない。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。肝細胞癌においても癌幹細胞の役割について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 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する高機能ゲルである。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 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 細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、肝癌幹細胞を標的とした治療候補分子としてケメリン受容体 Chemokine like receptor 1 (CMKLR1)を選定した。3) 免疫組織化学染色：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、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) ethyltrimethyl-ammonium iodide (α -NETA) を処理して細胞障害程度を評価し、さらに 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治療によ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た。また、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：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を抽出した。DN ゲルで発現亢進が認められた 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。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) *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 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。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。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。臨床検体を用いた予後解析から、肝細胞癌における 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。

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、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。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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

1	AML	acute myeloid leukemia
2	ABC	adenosine triphosphate binding cassette
3	BSA	bovine serum albumin
4	CMKLR1	chemokine like receptor 1
5	CSCs	cancer stem cells
6	DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
7	DN	double-network
8	EpCAM	epithelial adhesion molecule
9	HCC	hepatocellular carcinoma
10	ECL	enhanced chemiluminescence
11	EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
12	ERK	extracellular-signal-regulated kinase
13	FBS	fetal bovine serum
14	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
15	GPR1	G protein-coupled receptor 1
16	H&E	hematoxylin & eosin
17	HEPES	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
18	HRP	horseradish peroxidase
19	LCSCs	liver cancer stem cells
20	MAPK	mitogen-activated protein kinase
21	NaF	sodium fluoride
22	NOD	nonobese diabetic
23	OPN	osteopontin
24	PAMPS	poly- (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid)
25	PCR	polymerase chain reaction
26	PDMAAm	poly- (N,N'- dimethyl acrylamide)
27	PBS	phosphate-buffered saline
28	PKB	protein kinase B
29	PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
30	PS	polystyrene
31	PVDF	polyvinylidene difluoride

1	RIPA	radioimmunoprecipitation assay
2	RTK	receptor tyrosine kinase
3	RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
4	SDS	sodium dodecyl sulfate
5	UL	ultralow attachment
6	α -NETA	2-(α -Naphthoyl) ethyltrimethyl-ammonium iodide
7		

緒言

肝細胞癌の疫学と治療の現状

肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）は肝原発悪性腫瘍のうち 80% 以上を占め、世界における癌関連死因で第四位であり頻度が高く予後不良の癌腫である（Yang *et al.*, 2019）。国内においても 2018 年の統計で部位別癌死亡者数において男性 5 位、女性 6 位、全体で 5 位であり、年間約 2 万 6 千人が肝癌により死亡している（国立がん研究センターがん情報サービス, 2020）。根治のための第一選択は切除であるが、ウィルス性やアルコール性、脂肪肝炎などの慢性肝障害を背景に発癌するため、診断時には肝予備能が乏しいことが多く、また、肝切除術自体が侵襲の高い手術であるため、リスクが高くなり実際の手術適応となる症例は 5-10%程度と少数である（Forner, Reig and Bruix, 2018）。その上、切除後の再発率は 5 年以内に 70-80%程度と高率である（Ikeda *et al.*, 2003）。

HCC は DNA のコピー数解析から MET プロテインキナーゼやサイクリン D1 や MYC といった腫瘍発生の原因となる遺伝子や、mTOR 経路に関連する遺伝子である *RPS6KB1* などの増幅が明らかとなり、分子標的治療の対象として研究されている（Katoh *et al.*, 2007）。さらに近年は検体を用いた大規模ゲノム解析による網羅的な解析が行われた結果、テロメラーゼ遺伝子（*TERT*）のプロモーター変異が 50%超の症例で見られ、*TP53* ならびに *CTNNB1* 遺伝子異常が 30%程度あり、それらに続いて頻度としては全体の 10%以下であるがクロマチンリモデリングに関連する SWI/SNF 複合体の構成分子（*ARID1A*、*ARID1B*、*ARID2*）、WNT 経路制御分子（*AXIN*、*APC1*）、酸化ストレス適応制御分子（*NRF2*、*KEAP1*）、mTOR 経路制御分子（*TSC 2*、*RPS 6KA*）といったドライバー遺伝子の変異が同定されている（Totoki *et al.*, 2014）。従来は転移・再発例への全身療法において有効な抗癌剤治療はなく、ソラフェニブやレンバチニブなどの分子標的薬の登場により初めて全身療法において予後の延長が得られるようになったが、生存中央値は 12-13 ヶ月（Kudo *et al.*, 2018）と依然として予後は不良であり治療効果は十分ではない。さらなる治療効果を持つ新規治療薬の開発が期待されている。

1 癌幹細胞と肝細胞癌

2 癌幹細胞 (Cancer stem cells, CSCs) の概念は、ヒト急性骨髄性白血病
3 (Acute myeloid leukemia, AML) で初めて報告された (Bonnet and Dick,
4 1997)。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
5 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
6 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
7 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
8 されるようになった。

9 その後さらに詳細な解析から、CSCs は正常幹細胞と同様に自己複製能
10 と多分化能を有し、薬剤排泄に関わる ATP-binding cassette (ABC) トラン
11 スポーターや薬剤代謝に関与する aldehyde dehydrogenase (ALDH) が高発
12 現し、放射線療法施行時に細胞致死性に働く活性酸素の消去に関わる酵素
13 の発現が亢進していることから、化学療法や放射線療法に対する抵抗性を
14 有するため、再発や転移の原因となると考えられている (Jordan, Guzman
15 and Noble, 2006; Diehn *et al.*, 2009)。

16 肝癌における癌幹細胞 (liver cancer stem cells, LCSCs) については
17 CD133 陽性細胞が少数存在し、生体内腫瘍形成能を有する CSCs の特徴を
18 持った細胞として報告された (Ma *et al.*, 2007)。その後、epithelial cell
19 adhesion molecule (EpCAM)、CD13、CD24、CD44、CD90、OV-6、
20 aldehyde dehydrogenase (ALDH)、K19 などが LCSCs の細胞表面マーカーと
21 して報告された (W. Yang *et al.*, 2008; Z. F. Yang *et al.*, 2008a; Kimura *et al.*,
22 2010; Zhu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018)。さらに *Nanog* や *Oct3/4* が LCSCs
23 幹細胞マーカーとして重要と考えられ (Lee *et al.*, 2011; Ajani *et al.*, 2015)、
24 Wnt/ β -catenin (Chai *et al.*, 2016)、STAT3/ *Nanog* (Lee *et al.*, 2011)、Akt/
25 PKB などの細胞内シグナルと幹細胞性との関連が報告されている。

26 現在、Wnt/ β -catenin、Notch、Hedgehog、Transforming Growth Factor- β
27 (TGF- β) 経路、腫瘍微小環境、LCSC 表面マーカー、エピジェネティック
28 な状態変化、オートファジーの調節、ABC トランスポーターの阻害などを
29 ターゲットとした、LCSC への標的治療法の開発が行われているが (Wang
30 *et al.*, 2018)、現状において実用化されたものはなく、LCSC 標的治療法の
31 開発は依然として急務である。

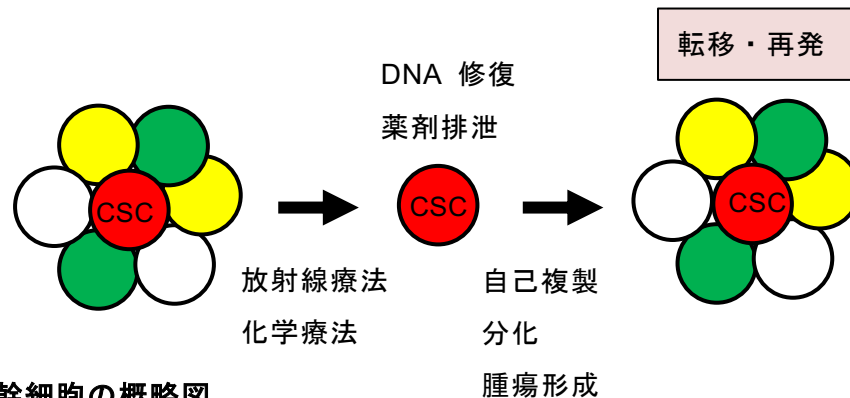


図 1 癌幹細胞の概略図

癌組織内に存在する CSCs は、放射線療法、化学療法に対して DNA 修復や薬剤排泄能の亢進などにより治療抵抗性を獲得して生存し、自己複製能、多分化能を持つことで腫瘍形成を行い、転移・再発の原因となる。

癌幹細胞誘導と高分子ポリマーの Double Network hydrogel

癌幹細胞は癌全体のヒエラルキーの上位に少数のみ存在することから、研究対象として必要量を確保するにはフローサイトメトリーによるソーティングや培養基材による濃縮などの手法が試みられているが、前者は細胞へのダメージ、後者は長時間を要すること、また、両者に共通して取得できる細胞数が少ないことなどが研究の障害となっている。そこで迅速且つ効率的な肝癌幹細胞の誘導が必要と考えられ、我々はその基材として高分子ポリマーに着目した。

Double-network hydrogel (DN ゲル) は、85-90%の水分を含む軟らかく強靱な器材である。柔らかく水分を多く含む性質は生体組織と類似しているためウサギの膝関節の軟骨の再生を誘導する (Yasuda *et al.*, 2009) といった生体内での特性を示す。DN ゲルは、立体構造と機械的特性が対照的な 2 種類のポリマーネットワークから構成される：第一のネットワークは硬くて脆いのに対し、第二のネットワークは伸縮性があり柔らかい性質を持つ。第一のネットワークは密に架橋された高分子電解質からなり、第二のネットワークは疎に架橋された中性ポリマーによって構成される (Gong, 2014)。

我々は近年、第一のネットワークとして poly-(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS)、第二のネットワークとして poly-(N,N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) からなる DN ゲルを用いて、効率的に CSC を誘導する新規の方法を開発した (Suzuka, *et al.*, Nat. Biomed. Eng. acceptable in principle, 2020)。DN ゲルは 24 時間以内に non-CSCs から

CSCs を迅速且つ効率的に誘導することが可能で、CSC の性状解析や CSCs への選択性の高い薬剤を同定する際に一助になると考えられる。

ケメリン受容体とシグナル伝達について

ケメリンは炎症や免疫細胞の走化性への関連から解析が始まり、その後脂肪が分泌するアディポカインとして注目を集め、さらに炎症や肥満、代謝疾患心血管系、癌との関連で研究が行われている。

ケメリン受容体 chemokine like receptor 1 (CMKLR1) がコードするタンパク質は、7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体である。当初はリガンドが不明なオーファン受容体として先にケメリン受容体 CMKLR1 の存在が発見され、その後にリガンドのケメリンが同定された。さらにケメリンをリガンドに持つ受容体蛋白として G protein-coupled receptor1 (GPR1) が発見され、CMKLR1 と GPR1 が、それぞれ chemerin receptor1、chemerin receptor 2 と命名された (Davenport *et al.*, 2013)。ケメリン受容体 GPR1 は、ケメリン受容体 CMKLR1 と一部共通の構造を持ち、肥満状態のマウスにおける血糖の維持に関連する報告があるが (Rourke *et al.*, 2014)、ケメリン受容体 CMKLR1 と比較して機能解析の報告は少なく不明な点が多い。

リガンドのケメリンはプロケメリンとして分泌され、セリンプロテアーゼにより活性をもつケメリンへ変換される。全身に広く分布しており特に、肝、膵、副腎、皮膚などの臓器で発現が高いと報告されている

(Zabel, Silverio and Butcher, 2005)。ケメリン受容体 CMKLR1 および GPR1 は細胞内ドメインで G α 蛋白と結合する構造を共有しており、G α 蛋白の活性化を機転に細胞内 Ca イオンの放出や cAMP の蓄積阻害、MAPK/ERK/p38、RhoA などの細胞内シグナル経路の活性化が共通するものとして報告されており、また、ケメリン受容体 CMKLR1 については WNT シグナル経路の活性化を介した間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化や AKT、ERK1/2 を介した血管新生や腫瘍増殖への関連の報告もある (図 2) (Kennedy and Davenport, 2018a; Rourke *et al.*, 2015)。

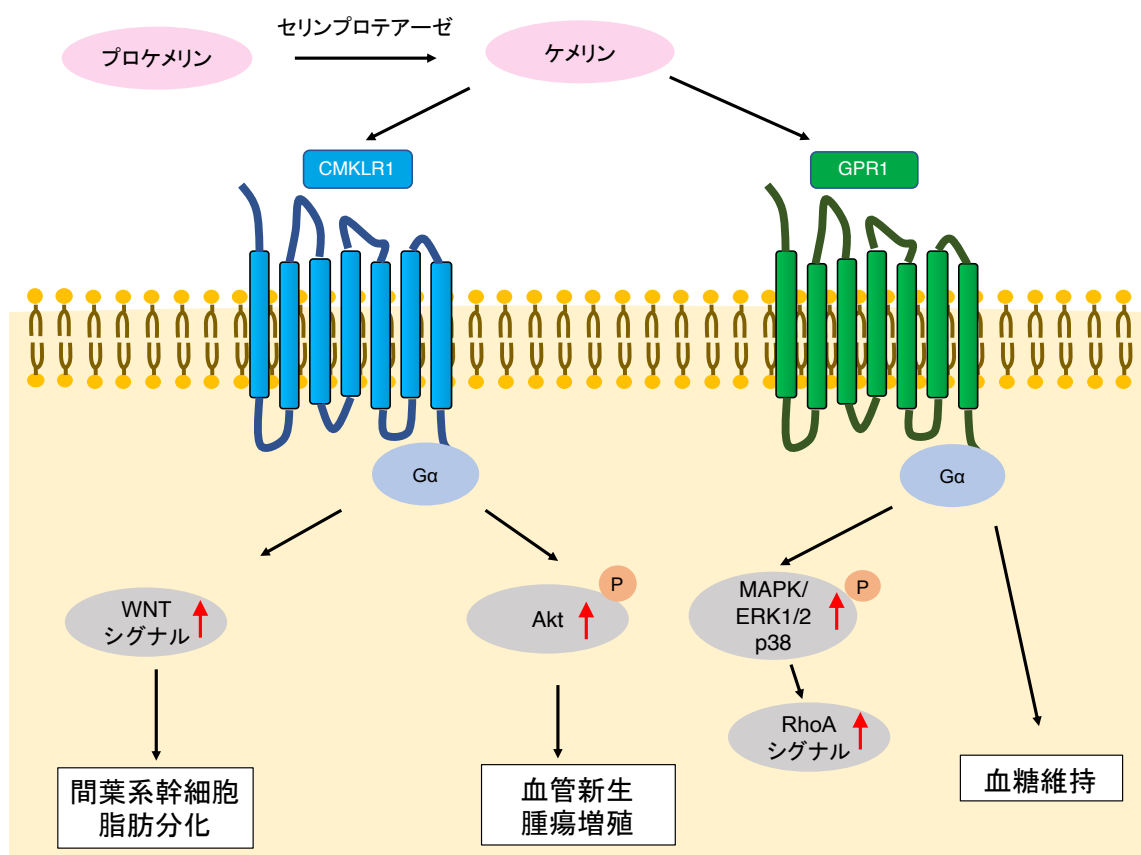


図 2 ケメリンが受容体に作用する概略図

プロケメリンがセリンプロテアーゼによりケメリンへ変換され、ケメリン受容体 chemokine like receptor 1 (CMKLR1) および G protein coupled receptor 1 (GPR1) に作用し、Gα蛋白質を介して細胞内にシグナルが伝達される。

本研究では、DN ゲルによって LCSCs の誘導が可能であるという仮説のもとに、DN ゲルで誘導した LCSCs の解析を行うことで治療標的となる分子の同定を試みた。そこで、DN ゲル上で培養した HCC 細胞株の遺伝子発現の解析を行い幹細胞性の獲得について評価し、網羅的遺伝子発現解析から LCSCs に対する治療候補分子を選定した。次いで 115 例の臨床検体を用いて同分子の蛋白発現と予後との関連の解析を行った。さらに阻害剤を用いて *in vitro* 細胞障害性と遺伝子発現の解析および *in vivo* で皮下への異種移植マウスモデルでの腫瘍形成への影響を評価した。

方法

1. DN ゲルの合成

DN ゲルは以前に報告された 2-step sequential polymerization method を用いて合成した (図 3) (Gong *et al.*, 2003)。2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS) (Toagosei Co. Ltd., Japan)、N,N'-dimethylacrylamide (DMAAm) (KOHJIN Co. Ltd., Tokyo, Japan)、N,N'-methylenebisacrylamide (MBAA) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)、2-oxoglutaric acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を購入した。DMAAm 以外の薬剤は追加の精製を行わずに使用した。架橋剤として MBAA を用い、重合開始剤として 2-oxoglutaric acid を用いたラジカル重合によりハイドロゲルを作製した。モノマーおよび架橋剤、開始剤を含む水溶液をシリコーンゴムで仕切られた一対のガラス板からなるセルに注入した。このセルに UV ランプ (波長 365 nm) を約 8 時間照射した。第 1 のネットワークである PAMPS ハイドロゲルを MBAA および 2-2-oxoglutaric acid を含む 2M の DMAAm 溶液に平衡に達するまで浸漬した。続いて UV 光を約 8 時間照射して重合させることで PDMAAm による第 2 のネットワークを作製した。重合後、未反応物を除去するため 4-(2-HydroxyEthyl) -1-Piperazine Ethane Sulfonic acid (HEPES) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 緩衝液に浸漬し 1 週間毎日交換して平衡状態に達したものを細胞培養に用いた。

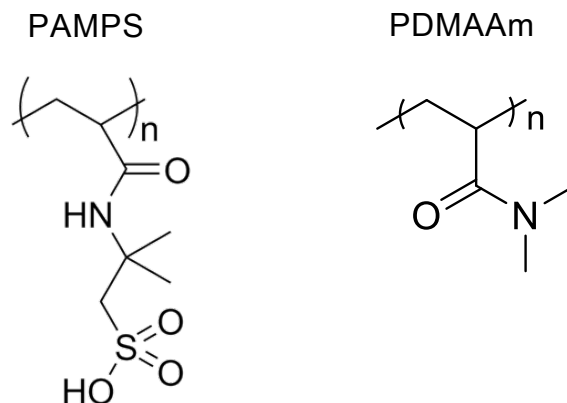


図 3 DN ゲルを構成する二種類のポリマー

poly (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) と poly (N,N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) の化学式を示す。

2. 細胞株と培養方法

4 種のヒト HCC 細胞株 (HLF、HUH7、HepG2、Hep3B) を使用した。HLF (JCRB 0405)、HUH7 (JCRB 0403)、HepG2 (JCRB1054) は Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Osaka, Japan) から、Hep3B cells (HB-8064) は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した (表 1)。全ての細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養液を用い、5%二酸化炭素 (CO₂) 存在下、37 度のインキュベータ内で培養した。各培養液には 10%ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 U/ml ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した。DN ゲルは培養ディッシュの大きさに合わせて型抜きを実施後、オートクレーブ滅菌を行った。DN ゲルを培養ディッシュに沈め、培養細胞に適合した培地で一晚浸漬後、ゲル上に 1.0×10^5 cells/ml の濃度となるように細胞を播種し、培養した。コントロールとして、通常培養条件である polystyrene dish (PS) および spheroid 培養条件である ultralow attachment dish (UL) (Corning, Lowell, MA, USA) で培養した細胞を用いた。

表 1 HCC 細胞株の由来となった腫瘍および症例の情報

細胞株	組織型	年齢 / 性別	人種	B型肝炎
HLF	HCC(低分化)	68 / 男	NA [#]	陰性
HUH7	HCC(高分化)	57 / 男	Asian	陰性
HepG2	肝芽腫	15 / 男	Caucasian	陰性
Hep3B	HCC(高分化)	8 / 男	Black	陽性

[#] NA, not applicable.

3. Real-time PCR

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてプロトコールに従い抽出し、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) にて濃度測定した。抽出した total RNA 2000 ng を用いて、SuperScript VILO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により cDNA を作製した。cDNA の quality 評価として、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) を内因性コントロールに使用した。cDNA を含む各 RT 反応液 1 µl に、SYBR Green Premix, Ex Taq II (Takara, shiga, Japan) 10 µl、10 µM forward プライマー 0.4 µl、10 µM reverse プライ

1 マー 0.4 μ l、滅菌蒸留水 8.2 μ l を添加し、各反応液を 95℃にて 3 分間反応
2 させた後、95℃にて 30 秒、58℃にて 30 秒、72℃にて 30 秒の条件で 40 サ
3 イクル反応させ、最後に 72℃にて 5 分反応させた。遺伝子とプライマー配
4 列を以下に示す（表 2）。

5

6 **表 2 遺伝子とプライマーの配列**

遺伝子名		配列
<i>ABCB4</i>	Forward	5'- GGACAGTGCTTCTCGATGGT -3'
	Reverse	5'- CGGCAATGCTGCAGTCAAAT -3'
<i>ABCC6</i>	Forward	5'- TTAGACGCGAGAGGTCCATCA -3'
	Reverse	5'- CCGTATTGGATGCTGTCCTTTC -3'
<i>ABCG2</i>	Forward	5'- GAGCCTACAACTGGCTTAGACTCAA -3'
	Reverse	5'- TGATTGTTTCGTCCCTGCTTAGAC -3'
<i>BDH1</i>	Forward	5'- CTGCCTGCGCTATGAGATGT -3'
	Reverse	5'- GTAGTCCATGGGGTGGTAGC -3'
<i>CD133</i>	Forward	5'- AAGGCATATGAATCCAAAATTGA -3'
	Reverse	5'- CCACCAGAGGCATCAGAATAA -3'
<i>CMKLR1</i>	Forward	5'- CGGCCATGTGCAAGATCAGC -3'
	Reverse	5'- CAGGCTGAAGTTGTAAAGC -3'
<i>EpCAM</i>	Forward	5'- AGTTGGTGCACAAAATACTGTCAT -3'
	Reverse	5'- CTCCCAAGTTTTGAGCCATT -3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'- AGCCACATCGCTCAGACAC -3'
	Reverse	5'- GCCCAATACGA CAAATCC -3'
<i>MST1</i>	Forward	5'- GATGGGCACTGTCCGAGTAG -3'
	Reverse	5'- GCAACGTGTCATCGTGCTC -3'
<i>NANOG</i>	Forward	5'- TGCATGCTTTGCGAGT -3'
	Reverse	5'- GTTAGGTGTGGA AGTC -3'
<i>OCT3/4</i>	Forward	5'- CGACCATCTGCCGCTTTGAG -3'
	Reverse	5'- CCCCCTGTCCCCCATTCTTA -3'
<i>RNF186</i>	Forward	5'- CAGCTTGGTGGGAGAGGATG -3'
	Reverse	5'- ATGAAGGTGAGCACCCATCG -3'
<i>SPOCK2</i>	Forward	5'- GACCCCTGCCAGAAGGTGAA -3'
	Reverse	5'- CCAGCTTCTTGCGACTGATG -3'
<i>TESMIN</i>	Forward	5'- GACTGGAGGTTTGGAAGGCA -3'
	Reverse	5'- CTCAGTGTGGAGAATCTGTGA -3'

7

8

4. Western blotting

細胞に radioimmunoprecipitation assay (RIPA) バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、10% glycerol、1% Triton X-100、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、50 mM NaF、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4)、protease inhibitor mixture: Complete (EDTA-free) protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland)] を添加し、氷上にて 20 分間静置後、4°Cにて 15,000 rpm、10 分間遠心し上清を回収した。回収した上清に 2×還元サンプルバッファー (2×Laemmli sample buffer) を添加し、95°Cにて 5 分間熱変性させ、イムノブロッティング法のサンプルとして用いた。10%または 12% SDS 含有アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を実施後、分離された蛋白質を PVDF メンブレン (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後のメンブレンは TBS-T で希釈した 2% BSA または 5% スキムミルク溶液を用いてブロッキング後、一次抗体を 4°Cで一晩反応させた。反応後のメンブレンは TBS-T で洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、再度 TBS-T で洗浄後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) による処理後、LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いてシグナルを検出した。

一次抗体は以下の抗体を用いた。

抗 ERK1/2 抗体 (#9102)、抗 phospho-ERK1/2 抗体 (#9101)、抗 Akt 抗体 (#9272)、抗 phospho-Akt (S473) (#4070) 抗体、抗 Nanog 抗体 (#4903) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、抗 β -Actin 抗体 (AM4302) (Chemicon International, Temecula, CA)、抗 CMKLR1 抗体 (GTX56249) (Gene Tex, Irvine, CA, USA)、DFNA5/GSDME (ab215191) (abcam, Cambridge, UK)。

5. DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析

DN ゲル、UL dish および PS dish 上でそれぞれ 72 時間培養した HLF 細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。マイクロアレイ解析には SurePrint G3 Human Gene Expression 8 × 60K v3.0 (Agilent Array) を使用し、階層的クラスタリングおよびヒートマップの可視化には JMP Pro version 14.0.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を使用した。

6. ヒト HCC 切除検体の免疫組織化学染色

ヒト HCC 組織は 2008 年から 2014 年までに北海道大学消化器外科 I にて外科的切除された 162 名のうち根治的切除不能例（遠隔転移または切除断端陽性）、臨床情報が十分得られない症例、検体状態により評価が困難な症例を除外し、計 115 名の患者で評価した。患者データは消化器外科 I で作成したデータベースおよび行われた予後調査を利用した。ホルマリン固定パラフィン包埋組織は、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色および抗ケメリン受容体 CMKLR1 抗体（GTX56249）による免疫組織化学染色を行った。発現強度の評価基準は、腫瘍組織内でケメリン受容体 CMKLR1 の染色強度が最高の部位と、内因性コントロールとしての胆管上皮細胞の染色強度を比較対象として、胆管上皮よりも染色性の高いものを High、同等のものを Middle、低いものを Low と 3 群に分類した。なお、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従い、検体採取においてはインフォームドコンセントを得た患者標本を用いた（研究倫理審査承認番号：医 17-021）。

7. Small interfering RNA (si RNA) を用いた CMKLR1 のノックダウン

ヒトケメリン受容体 CMKLR1 をターゲットとした二種類 siRNA mixture、GeneSolution siRNA (Cat. No.1027416, Qiagen) および ON-TARGET plus SMART pool, Human CMKLR1 (Cat # L-005467-00-0005, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) を購入した。前者の配列を以下に示す。
i) CAG CCA TAG AAG CTT TAC CAA、ii) CCC AAG GAT ATG TCT TCT GAA、iii) CTG GTC AAT GCT CTA AGT GAA、iv) CAG CCT TGG ACT AGC AAT TTA。後者の配列情報は提供されなかった。二種類の siRNA mixture に関して a)、b)、c) をそれぞれ実施した。遺伝子組換え実験は、「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」を遵守して実施した。

1) Conventional method

2.5×10^5 個の HLF および HUH7 細胞を PS dish に播種し、24 時間後に 10、20、40 nM の siCMKLR1 を HiPerfect transfection reagent (Qiagen) を用いて遺伝子導入し、48 時間インキュベート後に回収した。

2) Reverse transfection

5 × 10⁵ 個の HLF 細胞を PS dish に播種し、同時に 10、20、40 nM の siCMKLR1 を HiPerfect transfection reagent (Qiagen) を用いて遺伝子導入し、48 時間インキュベート後に回収した。

3) DN ゲル上での遺伝子発現誘導に対するノックダウン実験

HLF 細胞を 1 × 10⁵ 個/ml の密度で DN ゲルに播種し、同時に 10、20 nM の siCMKLR1 を HiPerfect transfection reagent (Qiagen) を用いて遺伝子導入し、48 時間インキュベート後に回収した。

8. ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤での細胞毒性の検証および低濃度での暴露実験

ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤である 2- (α-Naphthoyl) ethyltrimethylammonium iodide (α-NETA) (AG-CR1-0151) 分子量 369.2 を AdipoGen (San Diego, CA, USA) から購入した。sulfobutylether-α-cyclodextrin (SBE-α-CD) を ChemScene (Monmouth Junction, NJ, USA) から購入した。α-NETA の溶媒として 10% SBE-α-CD 水溶液を使用した。PS 上での実験では、細胞を 1.0 × 10⁵ cells/ml の密度となるように播種し、24 時間後に各濃度に調整した α-NETA を添加した。DN ゲル上での実験では細胞を 1.0 × 10⁵ cells/ml の密度となるように播種し、4 時間後に各濃度に調整した α-NETA を添加した。細胞毒性の検証では α-NETA を添加 24 時間後に細胞を回収し、トリプシンによりピペッティングして細胞塊を単一細胞へ分離したのち、トリパンブルーで死細胞を染色し、染色されない生細胞数をカウントした。低濃度の暴露実験では α-NETA を 0.5 μg/ml の濃度で 24 時間暴露したのち細胞を回収し RNA を抽出した。

9. tdTomato-luc2 導入 HCC 細胞の樹立

発光酵素 Luciferase 2、赤色蛍光蛋白質 tdTomato の共発現ベクター pCSII-CMV-tdTomato-Luc2 を、FuGENE® HD transfection reagent (Promega, Madison, WI, USA) を用いて HUH7、HLF、HepG2、Hep3B 細胞に遺伝子導入後、0.5 - 0.8 mg/ml ゼオシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて薬剤選択を実施し耐性コロニーを取得した。遺伝子組換え実験は、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定を遵守して実施した。

10. ノードマウスへの異所性移植と評価

生後 6 週齢の雄のノードマウス Balb/cA Jcl nu/nu (Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) を 1.75 %イソフルランで全身麻酔後、左季肋下切開を行った。一ヶ所あたり 1×10^6 個の HUH7 細胞 (コントロール、各 $n=4$) を、27G 針を付した 1 mL 使い捨て注射器を使用して左右側腹部の皮下組織へ緩徐に注入した。治療群には 27G 針を付した 1 mL 使い捨て注射器を用いて腹腔内に 10% SBE- β -CD 水溶液 100 μ l に溶解した各用量の α -NETA を、control 群には 10% SBE- β -CD 水溶液 100 μ l を隔日投与した。前治療群には 48 時間前に 1.0×10^5 cells/ml の密度となるように細胞を PS 上に播種し、dish に接着した 24 時間後に各濃度となるように α -NETA を添加し、さらに 24 時間後にトリプシンで細胞を剥離し、トリパンブルーで死細胞を染色して生細胞のみをカウントし、細胞数を調整して移植を行った。非治療群は α -NETA を添加せず、溶媒の 10% SBE- β -CD 水溶液のみを添加した。細胞移植 2 週間後に肉眼腫瘍形成が確認されたマウスを安楽死させた後、マウスの体重を測定した後に腫瘍を摘出して重量を測定し、4%緩衝ホルマリンを用いて固定した。組織切片は hematoxylin & eosin (H&E) 染色及び抗 E-cadherin 抗体 (NCL-L-E-Cad, Leica biosystems, Wetzlar, Germany) を用いた免疫組織化学により組織標本を作製した。全ての動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した (動物実験計画書承認番号: 17-0061)。

11. 統計解析

統計解析には、JMP Pro version 14.0.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いた。Real-time PCR における群間比較を行う場合、3 群比較の際は PS dish をコントロールとして Dunnett 検定を用い、2 群比較では Student's *t*-test を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。臨床検体におけるケメリン受容体 CMKLR1 発現と臨床病理学的特徴との相関においてはカテゴリー変数については尤度比検定、連続変数については Student's *t*-test で評価した。全生存率、無病生存率に関してはイベントまでの時間終了点を Kaplan-Meier 法で計算し、群間の比較には log-rank 検定を用いた。

結果

1. DN ゲル上で培養した HCC 細胞株の形態と遺伝子発現

以前、我々は DN 上で glioblastoma 細胞株を培養することにより幹細胞性を誘導することを報告した (Suzuka et al., acceptable in principle by Nat. Biomed. Eng. 2020)。ここでは、HCC 細胞株における DN ゲルによる幹細胞誘導の効果を検証するため、DN ゲル上で HCC 細胞株培養して形態を観察し、幹細胞に関する遺伝子発現を解析した。4 種の HCC 細胞株 (HLF、HUH7、HepG2、Hep3B) を PS dish 上で 3 日間通常培養したものは接着している一方で、DN ゲル上で 3 日間、および 7 日間培養すると浮遊した細胞集塊による球体 (スフィア) 形成が認められた (図 4)。PS dish 上で 7 日間培養した細胞はコンフルエント以上となり、単層培養が維持できず、浮遊した死細胞が散見されたため、対照としては不適切と判断し実験系から除外した。

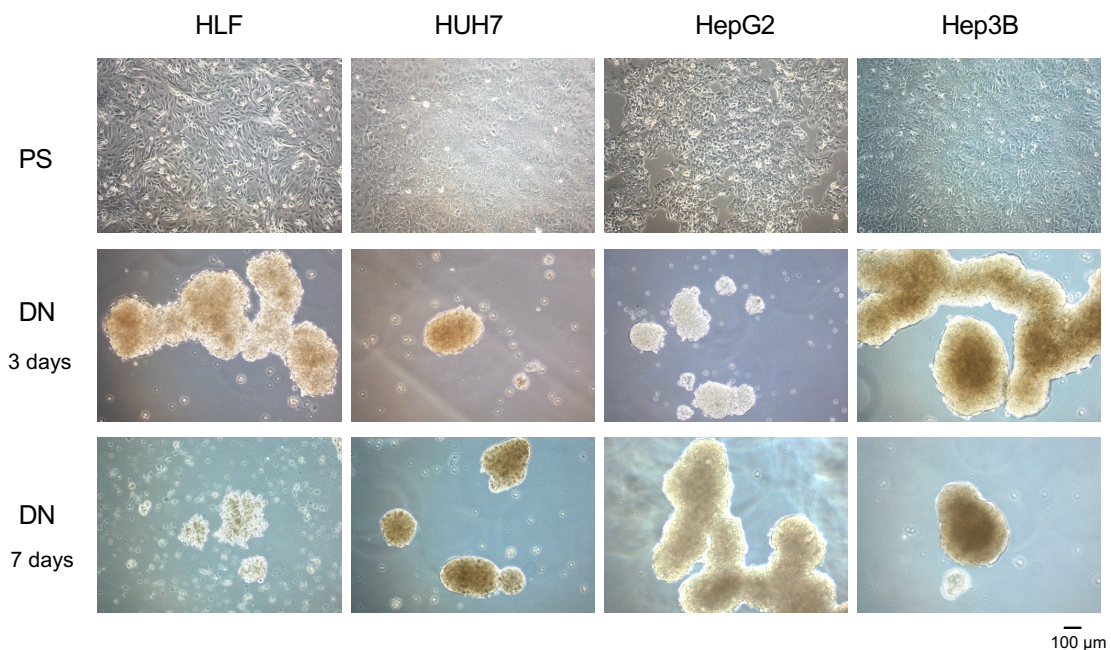


図 4 DN ゲル上での培養による形態の変化

PS dish 上での通常培養および DN ゲル上で 3 日間、7 日間培養した 4 種類の HCC 細胞株 (HLF、HUH7、HepG2、Hep3B) の位相差顕微鏡での観察像。
Scale bar=100 μm。

次に幹細胞性に関する遺伝子発現を評価するため、real-time PCR により DN ゲル上で培養した細胞株の *Nanog*、*Oct3/4*、*CD133*、*EpCAM* の発現変動を解析したところ、*Nanog* は HLF、HUH7、Hep3B 細胞において、*Oct3/4* は HLF、HUH7 細胞において DN ゲル上で培養したことにより有意な発現亢進が認められた。また、*ABCB4* は HLF、HUH7、HepG2 細胞で、*ABCC6* は HLF、HUH7 細胞で、*ABCG2* は HLF 細胞で DN ゲル上培養により遺伝子発現の亢進が認められた（図 5）。

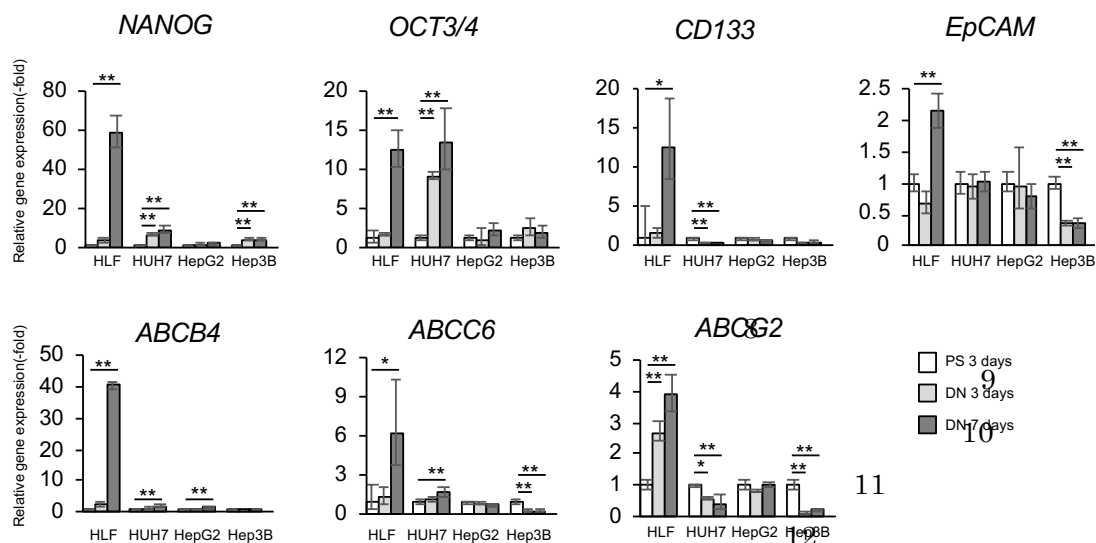


図 5 Real-time PCR による幹細胞関連遺伝子発現変動の評価

PS dish 上での通常培養、DN ゲル上で 3 日間、7 日間培養した 4 種類の HCC 細胞株での幹細胞マーカー遺伝子（*NANOG*、*OCT3/4*、*CD133*、*EpCAM*）と ABC トランスポーター遺伝子（*ABCB4*、*ABCC6*、*ABCG2*）において、PS dish 上での発現量を基準とした時の相対的発現量を real-time PCR で評価した。データは 3 回の実験の平均値±標準偏差で示す。3 群間の比較は PS dish をコントロールとして Dunnett 検定を用いて行い、 $P < 0.05$ を*、 $P < 0.01$ を**として示す。

今回の幹細胞性に関連する遺伝子発現解析において、HLF、HUH7 細胞で反応が大きかったため、この 2 つの細胞株に関して DN ゲルおよび PS dish 上で 3 日間培養したものを Western blotting で *Nanog* および *Oct3/4* の蛋白発現変動を評価したところ、いずれの細胞においても DN ゲル上で発現の亢進が認められた（図 6）。

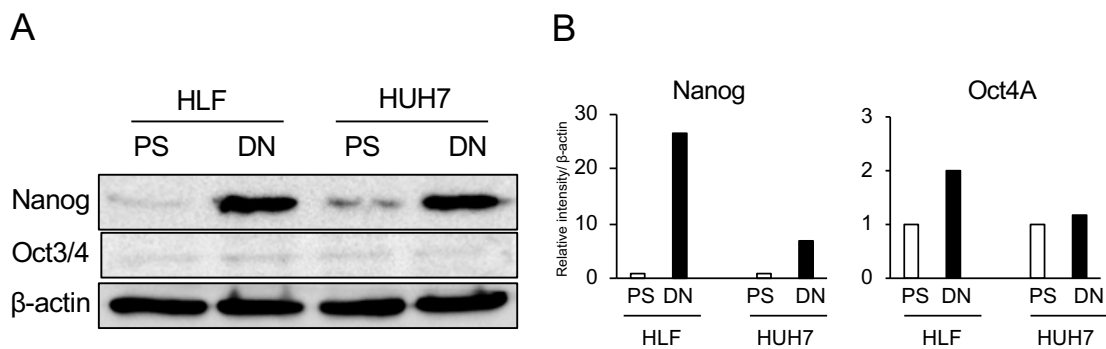


図 6 DN ゲル上での培養による蛋白質の発現変動

(A) Western blotting による Nanog、Oct3/4 の発現の検出。(B) β -actin を基準として相対的な発現量を定量化した。

2. DN ゲルと UL dish 上で培養した HLF 細胞の形態および遺伝子発現

上記の実験で特に HLF 細胞が DN ゲルにおいて最も幹細胞誘導の反応性が良好であったため、同細胞に着目して詳細な解析を続けた。古典的に幹細胞誘導に使用される培養基材である ultralow attachment dish (UL) を比較する培養条件に追加し、HLF 細胞における LCSCs に関連する遺伝子発現変動を解析した。PS dish、UL dish および DN ゲル上で培養した HLF 細胞の形態を比較すると、UL dish 上では DN ゲルと同様に細胞集塊によるスフィア形成が認められ、real-time PCR により、PS dish および UL dish の両条件に対して DN ゲル上で培養した細胞では幹細胞遺伝子の *Nanog*、*Oct3/4* の発現が亢進した (図 7)。

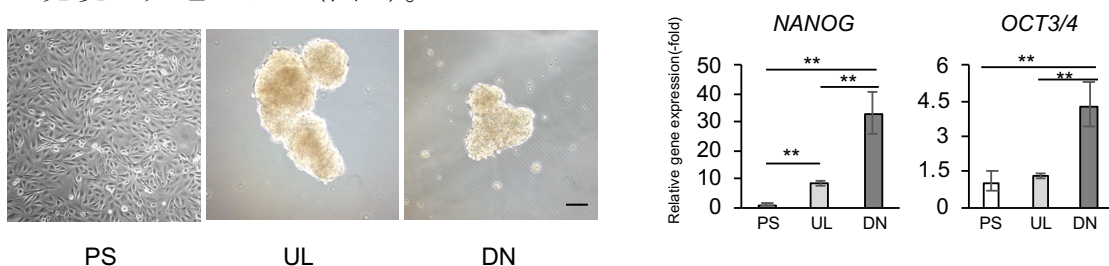


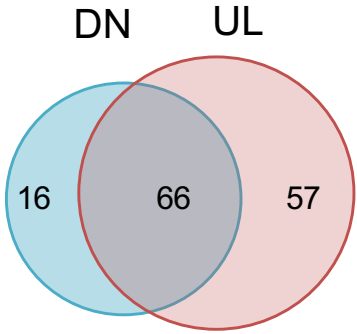
図 7 DN ゲル、UL dish 上で培養した HLF 細胞の形態および遺伝子発現

(A) PS dish、UL dish、DN ゲル上で培養した HLF 細胞の位相差顕微鏡での観察像。(B) 幹細胞マーカー遺伝子 (*NANOG*, *OCT3/4*) において、PS dish 上での発現量を基準とした時の相対的発現量を real-time PCR で評価した。データは 3 回の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差で示す。各群間を Student's *t*-test により検定し、 $P < 0.05$ を*、 $P < 0.01$ を**として示す。

3. Microarray での網羅的遺伝子発現解析による治療候補遺伝子の選定

幹細胞の性質に関連する分子を同定するために PS dish、UL dish、DN ゲル上で 3 日間培養した HLF 細胞から RNA を抽出し、microarray により遺伝子発現プロファイルを解析した。標準化されたデータを用いて、DN ゲルおよび UL dish で PS dish に対して 2 倍以上の発現亢進のあった遺伝子をピックアップし、ベン図で表記した (図 8 A)。DN ゲル上で発現亢進が認められたのは 82 遺伝子あり (表 3)、そのうち UL dish 上で共通して発現亢進がみられたのは 66 遺伝子 (表 3) であった。さらに DN ゲル特異的な発現パターンを示す遺伝子を抽出するため、DN ゲル上で発現亢進の認められた 82 遺伝子に関して階層クラスター解析を行った (図 8 B)。DN ゲルで特異的な発現亢進がみられたクラスターの 28 遺伝子を抽出し (表 4)、さらに蛋白質をコードしている 7 遺伝子を治療候補分子として選定した (表 4)。

A



B

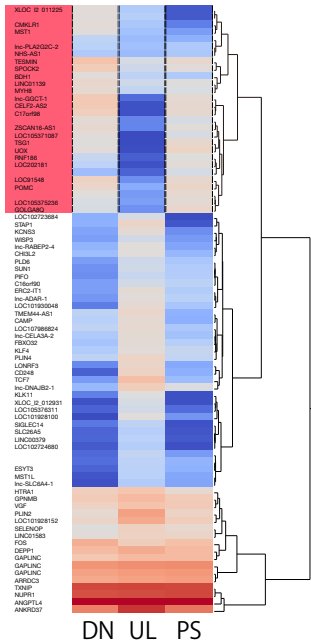


図 8 マイクロアレイでの網羅的遺伝子発現解析

(A) PS dish に対して UL dish と DN ゲルで 2 倍以上の発現亢進が認められた遺伝子の数をベン図で示す。(B) PS dish に対して DN ゲル上で 2 倍以上の発現亢進があった 82 遺伝子について階層的クラスタリング解析を行い、DN ゲル特異的な発現亢進を示すクラスターを選定した (具体的な遺伝子名は表 3 に記載)。

1 表 3 PS dish に対して DN ゲルで 2 倍以上発現亢進が認められた 82 遺伝子

FeatureNumber	GeneSymbol	FeatureNumber	GeneSymbol
8374	XLOC_I2_011225	56373	GPNMB
2790		58269	KLF4
19572	CMKLR1	4309	LONRF3
1152	MST1	62718	DEPP1
7275	LOC102723684	669	RNF186
697	STAP1	3999	TCF7
8718	TESMIN	2153	
15753	SPOCK2	8752	
10498	Inc-GGCT-1	17420	LOC105375236
28594	BDH1	4651	SELENOP
10662	CELF2-AS2	49831	PLD6
2494		12003	TSG1
6947	TMEM44-AS1	10491	VGf
13484	KLK11	28988	LINC01583
10682	CAMP	40480	PLIN2
51454	HTRA1	40504	LOC101928152
2183	SIGLEC14	861	ERC2-IT1
3787	LINC01139	403	LOC101928100
4932	C17orf98	54209	TXNIP
15529	FOS	41751	
32902	MYH8	15103	
14499		50440	GAPLINC
16777	KCNS3	10055	C16orf90
15152	LOC91548	30849	GAPLINC
3951	ZSCAN16-AS1	42998	MST1L
1957	LOC107986824	10827	LOC202181
9305	SLC26A5	8385	SUN1
11840	LOC105371087	11155	GOLGA8Q
18711	LINC00379	23135	ESYT3
8901	Inc-RABEP2-4	9576	Inc-SLC6A4-1
3499	LOC102724680	32310	CD248
7111	Inc-CELA3A-2	41997	ANGPTL4
6278	XLOC_I2_012931	38510	GAPLINC
2803	Inc-PLA2G2C-2	11831	UOX
48015	CHI3L2	12842	ARRDC3
2364	WISP3	2822	Inc-ADAR-1
32174	NHS-AS1	30021	PIFO
47892	LOC105376311	18466	ANKRD37
14694	PLIN4	10132	NUPR1
52497	FBXO32	41859	Inc-DNAJB2-1
24778	POMC	8715	LOC101930048

*UL dish でも共通して PS dish に対し 2 倍以上の発現亢進のある遺伝子は太字で表す。

1 表 4 DN ゲル上で特異的な発現亢進のあったクラスターの 28 遺伝子

Feature Number	Gene Symbol	蛋白名	局在
8374	XLOC_I2_011225		
2790			
19572	CMKLR1	chemerin chemokine-like receptor 1 chemerin receptor1	細胞膜
1152	MST1	macrophage stimulating 1 testis expressed metallothionein like	細胞内、分泌
8718	TESMIN	protein	細胞内
15753	SPOCK2	SPARC (osteonectin), cwcw and kazal like domains proteoglycan 2	分泌
10498	lnc-GGCT-1		
28594	BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1	細胞内
10662	CELF2-AS2		
2494			
3787	LINC01139		
4932	C17orf98		
32902	MYH8	myosin heavy chain 8	細胞内
14499			
15152	LOC91548		
3951	ZSCAN16-AS1		
11840	LOC105371087		
2803	lnc-PLA2G2C-2		
32174	NHS-AS1		
24778	POMC		
669	RNF186	ring finger protein 186	細胞膜
2153			
17420	LOC105375236		
12003	TSG1		
15103			
10827	LOC202181		
11155	GOLGA8Q		
11831	UOX		

2 *28 遺伝子の中から蛋白質をコードしており候補として抽出した 7 遺伝子を太字で表す

3
4 この 7 遺伝子に関して、real-time PCR により PS dish、UL dish、DN ゲル
5 で 3 日間培養した HLF 細胞における発現変動を評価した (図 9 A)。この
6 中で他の培養条件と比較して DN ゲル上での発現亢進が有意であり、変動
7 が大きく、かつ治療的なアプローチが比較的容易な細胞膜上に発現してい
8 ること (Kennedy and Davenport, 2018) からケメリン受容体 *CMKLR1* を治
9 療対象候補遺伝子として選定した。Real-time PCR により 4 種の HCC 細胞
10 株における DN ゲルでの発現変動を解析すると、HLF、HUH7 細胞におい
11 て有意な発現亢進が認められた (図 9 B)。

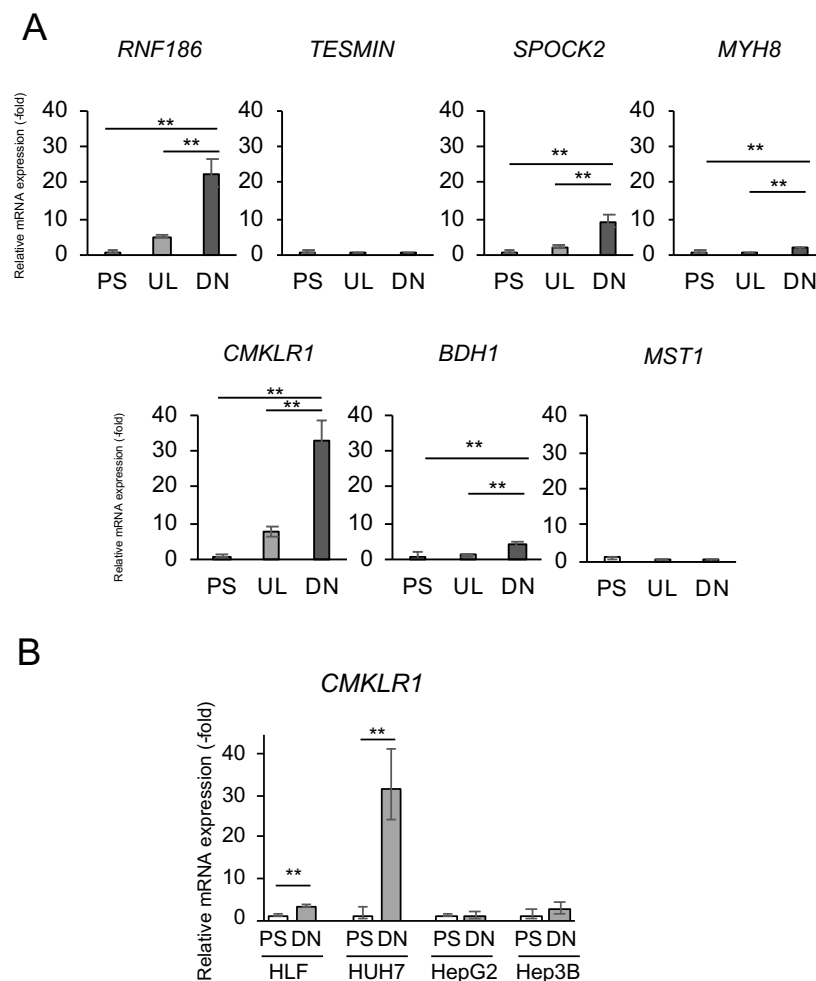


図9 マイクロアレイ解析から治療標的候補となった7遺伝子について培養基材の違いによる発現変動とケメリン受容体 *CMKLR1* の発現変動の解析

(A) HLF 細胞における7候補遺伝子の発現変動。PS dish 上で培養した HLF 細胞での発現量を基準とした際の UL dish、DN ゲルでの相対的発現変動を real-time PCR により解析した。(B) PS dish および DN ゲル上で培養した HLF、HUH7、HepG2、Hep3B 細胞において、ケメリン受容体 *CMKLR1* の相対的発現変動を解析した。各細胞株において、PS dish 上での *CMKLR1* の発現量を基準とした。データは3回の実験の平均値±標準偏差で示す。各群間を Student's *t*-test により検定し、 $P < 0.05$ を*、 $P < 0.01$ を**として示す。

ケメリン受容体 *CMKLR1* は Chemokine-like receptor1 の略称であり、ケメリンをリガンドに持つ7回膜貫通型 G 蛋白質共役受容体で、細胞内伝達シグナルにおいて ERK や Akt のリン酸化の制御に関連していることが報告されている (Treeck, Buechler and Ortmann, 2019)。そこで Western blotting に

より DN ゲルで培養した HLF 細胞におけるケメリン受容体 CMKLR1 蛋白質および ERK、Akt のリン酸化量を評価したところ、ケメリン受容体 CMKLR1 蛋白質の発現亢進および Akt リン酸化の低下、ERK リン酸化の亢進が認められた（図 10）。

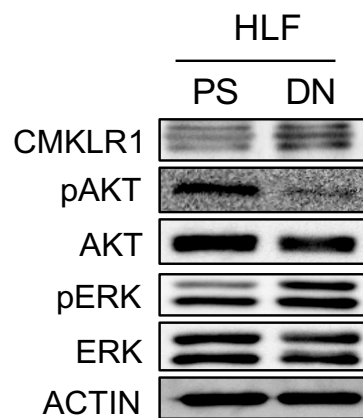


図 10 Western blotting による蛋白質およびリン酸化量の解析

Western blotting により、HLF 細胞を PS dish、DN ゲル上で 3 日間培養した際の蛋白質およびリン酸化量を解析した。DN ゲル上で CMKLR1 の発現亢進および AKT のリン酸化の低下、ERK のリン酸化亢進が検出された。

4. ヒト HCC 検体組織におけるケメリン受容体 CMKLR1 の発現量と予後との関連

ケメリン受容体 CMKLR1 の発現は神経膠芽腫において予後不良因子であること（Tümmeler *et al.*, 2017）、また食道扁平上皮癌でのケメリン受容体 CMKLR1 の発現は *in vitro* における浸潤能亢進に関与することが報告されており、癌の悪性度との関連が注目されている。本研究では、ヒト HCC 組織におけるケメリン受容体 CMKLR1 の発現について、手術検体を用いて検討した。対象となった症例の患者背景を表 4 に示す。

表 4 対象症例の患者背景因子

項目	全症例 (n=115)
年齢 中央値 (四分位範囲)	66 (58-72)
性別 男 / 女, n(%)	95 (82.6) / 20 (17.4)
B型肝炎 / C型肝炎 / 非B非C型肝炎, n(%)	41 (35.7) / 35 (30.4) / 39 (33.9)
腫瘍分化度 高分化および中分化 / 低分化, n(%)	85 (73.9) / 30 (26.1)
腫瘍径 中央値 (四分位範囲), cm	4.2 (2.5-6.2)
腫瘍個数 単発 / 多発, n(%)	87 (75.7) / 28 (24.3)
血管侵襲 陽性 / 陰性, n(%)	29 (25.2) / 86 (74.8)
UICC(8 th) Stage	
IA	9 (7.8)
IB	60 (52.2)
II	26 (22.6)
IIIA	10 (8.7)
IIIB	9 (7.8)
IVA, n(%)	1 (0.9)
Child Pugh A/B/C, n(%)	112 (97.4) / 3 (2.6) / 0 (0.0)
肝硬変 あり / なし, n(%)	37 (32.2) / 78 (67.8)

免疫組織化学染色ではケメリン受容体 CMKLR1 は HCC 組織の細胞膜および細胞質に染色性を示し、また、同一症例内でも部位により染色強度が様々であった。中には同一視野内で細胞ごとに発現強度が異なる不均一な染色性（ヘテロジェナイティ）を示す症例が認められた（図 11）。

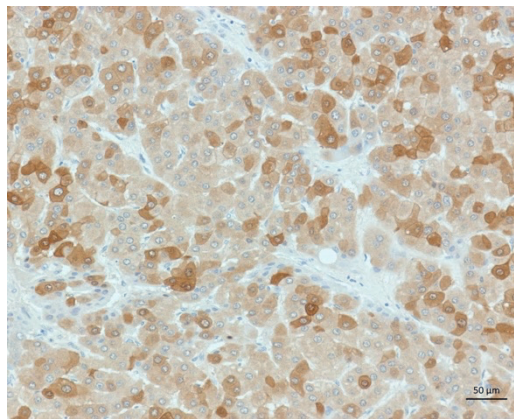


図 11 HCC 切除検体において抗 CMKLR1 抗体による免疫染色で観察されたヘテロジェナイティの代表像

HCC 切除検体に対し抗 CMKLR1 抗体を使用して免疫染色したところ、26 症例で腫瘍細胞毎に染色強度の異なる不均一性（ヘテロジェナイティ）が観察された。写真は代表例を示す。

腫瘍組織においてケメリン受容体 CMKLR1 の蛋白発現が最も高い領域の染色強度により悪性度を規定するという仮説のもとに、症例を High (n=37)、Middle (n=31)、Low (n=47) の三群に分類した。High 群と、Middle および Low 群の 2 群に分けて予後を比較すると、全生存期間および無病再発期間ともに High 群で統計学的に有意に予後不良であった (図 12)。また、この分類において患者背景と病理学的因子について検討したところ (表 5)、組織中のケメリン受容体 CMKLR1 発現と有意差をもって相関する項目はみられなかった。

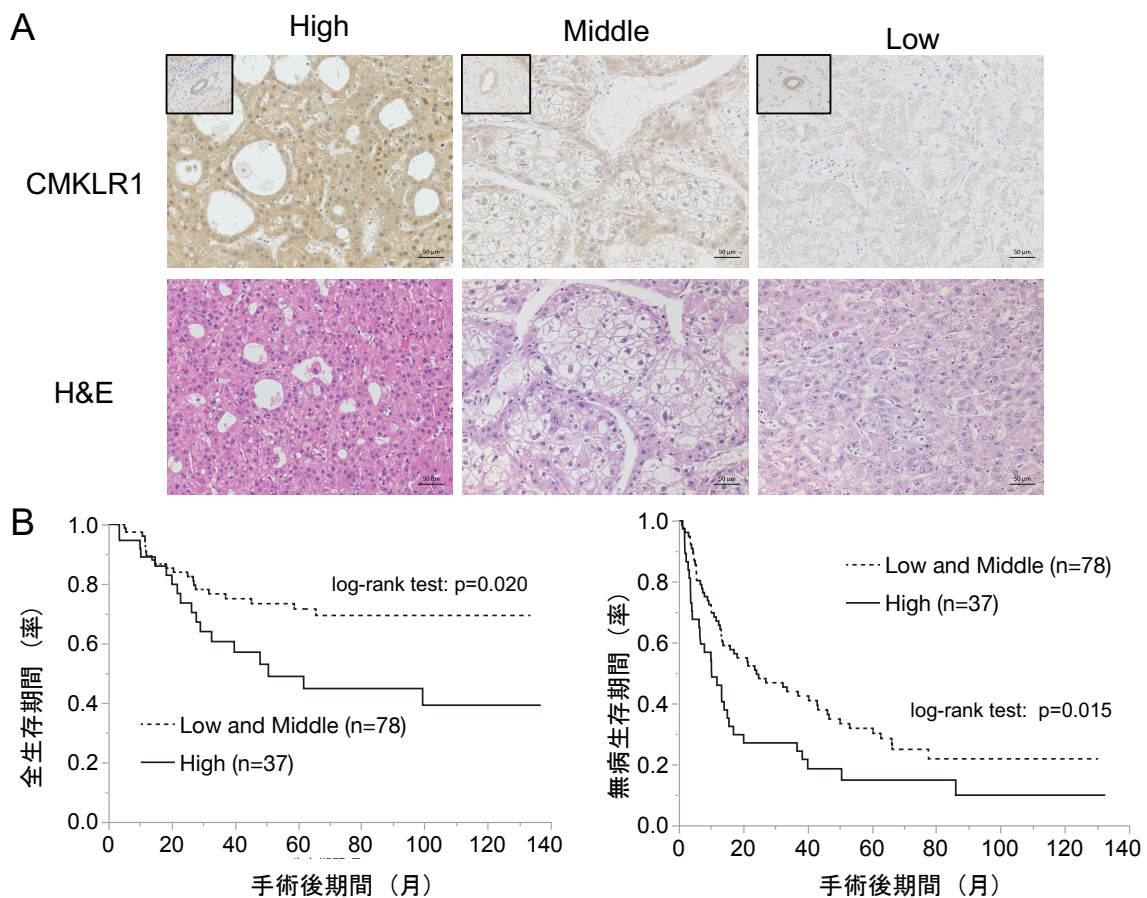


図 12 HCC 切除検体の腫瘍組織におけるケメリン受容体 CMKLR1 の免疫染色像および予後

(A) 抗 CMKLR1 抗体による免疫染色像、H&E 染色像を示す。上段の左上四角にそれぞれの症例において比較対象とした内因性コントロールの胆管上皮細胞を示した。上下のペアはそれぞれ同一症例、同視野である。(B) HCC 患者 115 名 of 全生存期間および無病生存期間の Kaplan-Meier 曲線。ケメリン受容体 CMKLR1 の発現レベルは High (実線)、Low および middle (破線) で示す。群間差について Log-rank 検定を行ったところ、全生存期間は $p=0.019$ 、無病生存期間は $p=0.015$ であった。

表 5 患者背景と病理学的因子のケメリン受容体 CMKLR1 発現強度による分類

項目	CMKLR1 High群 (n=37)	CMKLR1 MiddleおよびLow群(n=78)	p value
年齢 中央値 (四分位範囲)	66 (57.5-72.5)	66 (54.8-72)	0.14
性別 男 / 女, n(%)	3 (8.1) / 34 (91.9)	17 (21.8) / 61 (78.2)	0.056
B型肝炎 / C型肝炎 / 非B非C型肝炎, n(%)	12 (32.4) / 14 (37.9) / 11 (39.7)	29 (37.2) / 21 (26.9) / 28 (35.9)	0.50
腫瘍分化度 高分化および中分化 / 低分化, n(%)	23 (62.2) / 14 (37.8)	40 (51.3) / 38 (48.7)	0.27
腫瘍径 中央値 (四分位範囲), cm	3.7 (2.65-6.65)	4.5 (2.5-6.4)	0.83
腫瘍個数 単発 / 多発, n(%)	28 (75.7) / 9 (24.3)	59 (75.6) / 19 (24.4)	1.00
血管侵襲 陽性 / 陰性, n(%)	9 (24.3) / 28 (75.7)	20 (25.6) / 58 (74.4)	0.88
UICC(8 th) Stage, n(%)			
IA	5 (13.5)	4 (5.1)	0.54
IB	17 (46.0)	43 (55.1)	
II	9 (24.3)	17 (21.8)	
IIIA	4 (10.8)	6 (7.7)	
IIIB	2 (5.4)	7 (9.0)	
IVA	0 (0)	1 (1.3)	
Child Pugh A/B/C, n(%)	36 (97.3) / 1 (2.7) / 0(0)	76 (97.4) / 2 (2.6) / 0(0)	0.97
肝硬変 あり / なし, n(%)	15 (40.5) / 22 (59.5)	22 (28.2) / 56 (71.8)	0.19

5. siRNA による CMKLR1 のノックダウン

ケメリン受容体 CMKLR1 の発現を特異的に抑制するため、siRNA のトランスフェクションを試みた。Conventional method で HLF、HUH7 細胞に siRNA をトランスフェクションし、real-time PCR で遺伝子発現を評価した。最初に Qiagen 社から購入した GeneSolution siRNA (4 種の siRNA を含む) を混合し、10 nM、20 nM の濃度でトランスフェクションしたが、CMKLR1 の発現抑制効果は得られなかった。次に、HLF 細胞に対して各 siRNA を 10 nM、20 nM の濃度でトランスフェクションを実施したが十分な抑制は得られなかった。そこで、reverse transfection による導入を再度試みたが、発現抑制効果は得られなかった。標的配列の不適合が考慮されたため、siRNA 自体を変更して再度ノックダウン実験を行うこととし、Dharmacon 社より siRNA の mixture (ON- TARGET plus SMART pool) を購入し、conventional method、reverse transfection を施行したが、CMKLR1 の発現抑制効果は得られなかった。DN ゲル上で培養した際に CMKLR1 の発現が亢進するのを siRNA が抑制できるかを検討するため、DN ゲル上に細胞を播種すると同時に reverse transfection を行ったが発現抑制効果は得られなかった。以上の結果より siRNA を用いてのノックダウンは困難と評価し、阻害剤による機能抑制実験を行う方針とした。

6. ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤の細胞毒性の検討

ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤である 2-(α -Naphthoyl) ethyltrimethylammonium iodide (α -NETA) を使用し、HCC 細胞株への毒性を *in vitro* 環境で検証した。HLF、HUH7 を PS dish で培養し、 α -NETA を添加したところ、濃度依存的に殺細胞効果が得られ、一部の細胞では細胞内液が水泡上に膨張する形態変化が認められた (図 13)。一方、DN ゲル上で培養した際も濃度依存的な殺細胞効果が認められるとともに、細胞集塊の形成が阻害され、より多数の細胞で細胞内液が水泡上に膨張する形態変化が認められた

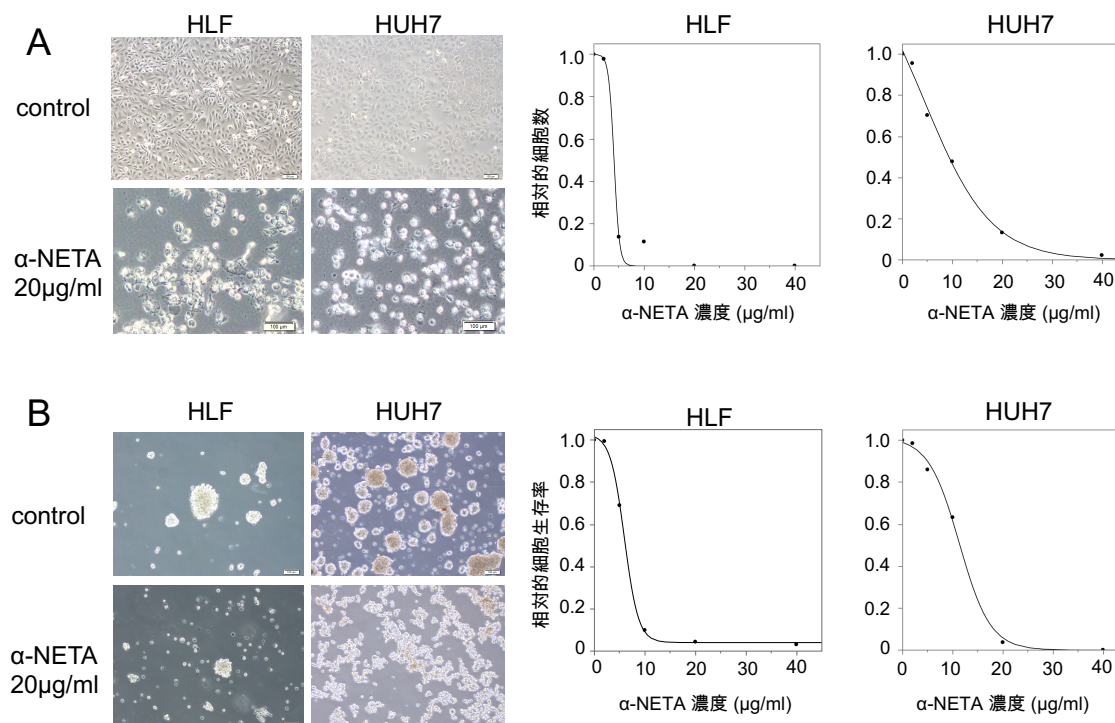


図 13 ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤の細胞毒性の検討

(A) PS dish 上で培養した HLF および HUH7 細胞に溶媒のみ添加したものを control とし、 α -NETA 20 μ g/ml を添加後 24 時間の細胞形態 (左) および細胞生存率 (右) を示す。 α -NETA の殺細胞効果に関して、HLF 細胞での half maximal effective concentration (EC₅₀) は 4.38 μ g/ml、HUH7 細胞での EC₅₀ は 9.31 μ g/ml であった。(B) DN ゲル上で培養した HLF および HUH7 細胞に溶媒のみ添加したものを control とし、 α -NETA 20 μ g/ml を添加後 24 時間の細胞形態 (左) および細胞生存率 (右) を示す。HLF 細胞の EC₅₀ は 6.13 μ g/ml、HUH7 細胞の EC₅₀ は 11.42 μ g/ml であった。

化学療法によって生じるパイロトーシスを介在すると報告のある GSDME 蛋白質およびその N 末端ドメインの発現を Western blotting で解析したところ、DN ゲル上では N 末端ドメイン蛋白質の発現が上昇しており（図 14）、形態と合わせて GSDME を介したパイロトーシスが生じている可能性が示唆された。

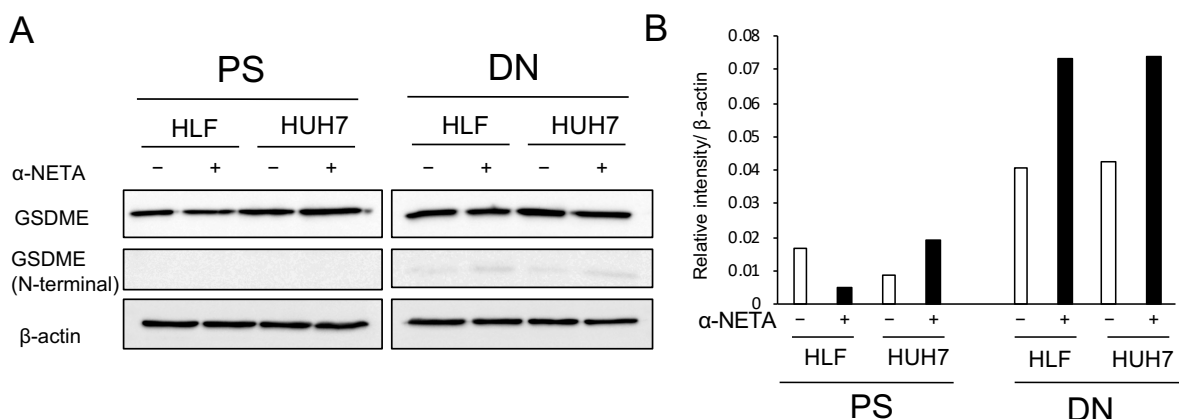


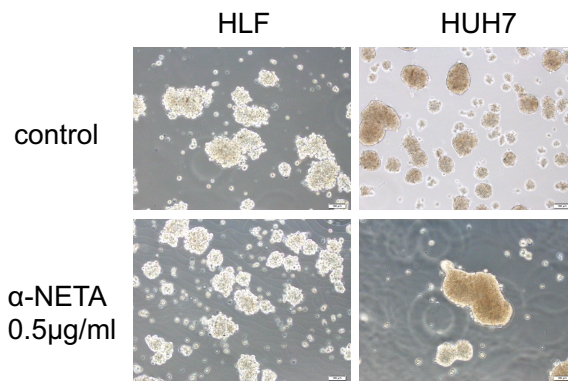
図 14 α -NETA の添加による蛋白質の発現変動

(A) PS dish および DN ゲル上で HLF、HUH7 細胞を培養し、 α -NETA 20 μ g/ml または溶媒のみを添加後 24 時間の各細胞における GSDME および GSDME-N 蛋白質発現量。(B) β -actin を基準として GSDME-N 末端の相対的な発現量を定量化したグラフを示す。DN ゲル上で培養した HLF、HUH7 細胞において、 α -NETA の添加により GSDME-N 末端の発現が亢進した。

7. ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤を低濃度で暴露した時の細胞への影響

上記より、 α -NETA を高濃度で暴露した際には HLF、HUH7 細胞に対して殺細胞効果を持つことが示された。既報によると受容体としてのケメリン受容体 CMKLR1 に対する α -NETA の half inhibitory concentration (IC_{50}) は 0.38 μ M (0.14 μ g/ml) であり (Kumar *et al.*, 2016)、より低濃度での作用する可能性が示唆された。HLF および HUH7 細胞は DN ゲル上で培養した際に幹細胞遺伝子の発現が亢進するが（図 5）、その過程においてケメリン受容体 CMKLR1 分子の機能阻害を行うことを想定として α -NETA の暴露実験を行った。DN ゲル上で培養している HLF、HUH7 細胞を濃度 0.5 μ g/ml の α -NETA で曝露したところ、形態学的変化は認められなかったが、real-time PCR で遺伝子発現変動を評価したところ、幹細胞遺伝子 *Nanog*、*Oct3/4* の発現が低減した（図 15）。

A



B

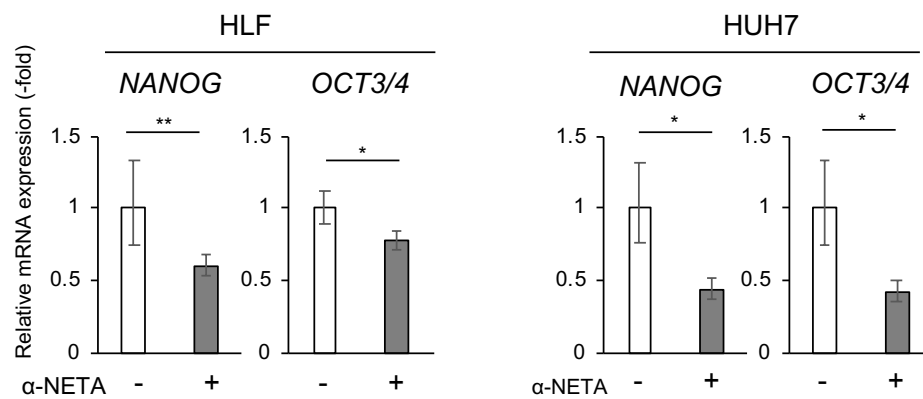


図 15 DN ゲル上で培養した HCC 細胞における低濃度 α-NETA の影響

(A) HLF、HUH7 細胞を DN ゲル上で培養し、α-NETA 0.5 μg/ml を添加後 24 時間の位相差顕微鏡による観察像を示す。溶媒のみ添加したものを control とした。

(B) (A) の条件下で HLF、HUH7 細胞を培養し、real-time PCR により NANOG および OCT3/4 の発現量を解析した。グラフは、各 control 細胞での発現量を基準とした際の相対的発現量の変動を示す。いずれの細胞において α-NETA の添加により NANOG、OCT3/4 の発現低下が認められた。データは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で示す。各群間を Student's *t*-test により検定し、*P* < 0.05 を*、*P* < 0.01 を**として示す。

8. tdTomato-luc2 導入 HCC 細胞の樹立の検討

マウス同所性異種移植モデルを用いて *in vivo* マウスでの腫瘍形成における α -NETA の効果を検討し、*in vivo* イメージングシステム (IVIS Spectrum) において、導入細胞の腫瘍増殖過程を可視化することを目的として tdTomato-luc2 の安定発現 HCC 細胞の樹立を試みた。HLF 細胞では tdTomato-luc2 の安定発現株を樹立することに成功したが (図 16)、HUH7 ではトランスフェクション効率が低く、実験に使用可能なルシフェラーゼ活性を有した細胞を樹立することはできなかった。

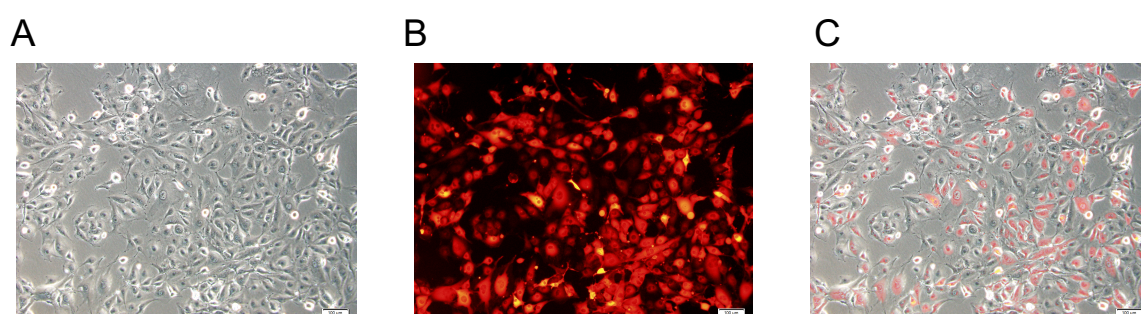


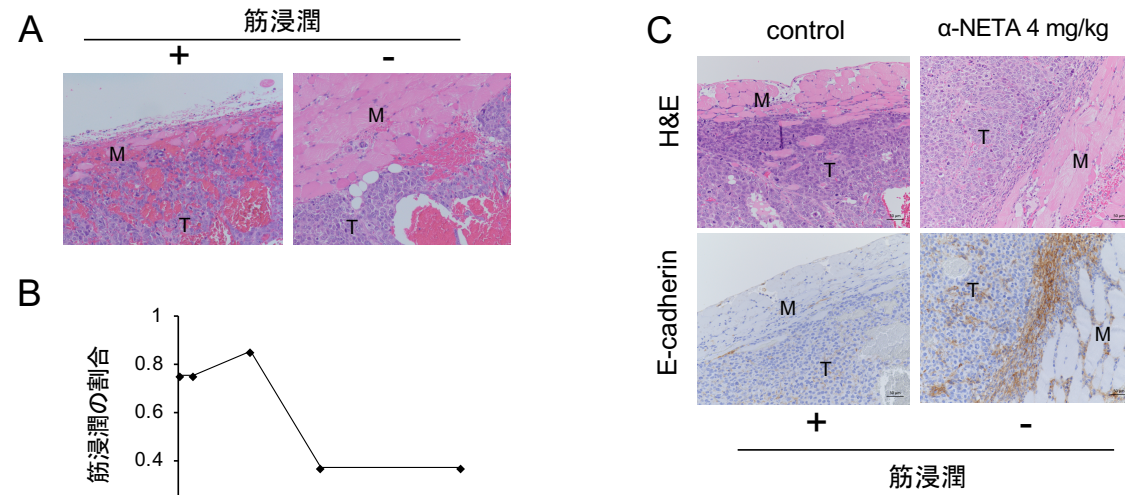
図 16 HLF 細胞の tdTomato-luc2 安定発現株の観察像

(A) 位相差顕微鏡像による観察像。円形の細胞と紡錘形の細胞が混在しており祖細胞の HLF 細胞と同様の形態を示す。(B) 蛍光顕微鏡による観察像。tdTomato-luc2 導入細胞は赤色を呈する。(C) (A) と (B) の重ね合わせ像。赤色を呈する細胞は td-tomato-luc2 が導入されていることを示す。

9. 生体内での腫瘍形成に対する α -NETA の影響

DN ゲルに対して *in vitro* 実験で最も反応性が良好であった HLF 細胞を *in vivo* での実験で使用することを計画し、肝被膜下に注入する同所移植による実験を試みたが、腫瘍形成は得られなかった。PubMed で検索したところ、文献的に HLF 細胞を生体内腫瘍形成モデルに用いた報告はなく、同細胞による腫瘍形成モデル実験は困難と判断した。そこで、マウスモデルでの腫瘍形成の報告があり (Z. F. Yang *et al.*, 2008)、本研究において DN ゲル上の培養で幹細胞遺伝子およびケメリン受容体 *CMKLR1* の発現亢進が認められる HUH7 細胞を使用した。HUH7 細胞には luciferase 導入ができておらず同所での *in vivo* imaging による評価が困難であるため、皮下移植モデルでの実験を行った。腫瘍形成への影響を評価するため、腫瘍移植早期に薬剤投与を行った。

1 1×10^6 個の HUH7 細胞を 12 匹のヌードマウスの左右側腹部の皮下、計
 2 24 カ所に接種し、同日から α -NETA の腹腔内投与を開始した。2 週間後に
 3 評価を行ったところ 1 カ所を除く全ての部位で腫瘍が形成され、いくつか
 4 の腫瘍で組織学的に筋層に浸潤して像が観察された (図 17 A)。 α -NETA の
 5 投与量が増加するにつれて、筋層への浸潤頻度は減少する傾向であった
 6 (図 17 B)。上皮マーカーであり細胞-細胞間接着分子である E-cadherin の
 7 発現について評価を行ったところ、control 群の腫瘍の筋層浸潤部位での発
 8 現が低かったのに対し、浸潤が認められなかった α -NETA 高容量投与群で
 9 は筋層と腫瘍の境界で E-cadherin の発現が認められた (図 17 C)。



Dose of α -NETA (mg/kg)	control	0.2	1.0	2.0	4.0
筋浸潤の割合 (筋浸潤/全腫瘍)	0.75 (6/8)	0.75 (6/8)	0.85 (6/7)	0.38 (3/8)	0.38 (3/8)

図 17 ヌードマウスの腫瘍細胞皮下移植モデルでの腫瘍形成における α -NETA 投薬の効果

HUH7 細胞のヌードマウス皮下移植モデルにおいて、 α -NETA の腹腔内投与開始後 2 週間で腫瘍組織学的検索を行った。画像中の M は筋、T は腫瘍を示す。(A) 腫瘍と筋の境界領域の H&E 染色像を示す。左は腫瘍の筋浸潤症例、右は非浸潤症例の代表像を示す。(B) α -NETA を各用量で投与した群において形成された腫瘍の筋浸潤割合をグラフと表で示す。筋浸潤の割合は α -NETA の容量依存的に低下した。(C) 筋浸潤症例 (左) と、非筋浸潤症例 (α -NETA 4.0 mg/kg 治療群、右) における腫瘍と筋の境界領域の H&E 染色および E-cadherin 免疫染色の代表像。非筋浸潤症例では、筋の境界部近傍の腫瘍細胞間隙に E-cadherin の発現が認められた。

次いで、HLF 細胞を α -NETA で前処理したのち、生細胞を皮下に接種し、同日より α -NETA の腹腔内投与を行い、2 週間後に評価した所 1 カ所を除く全ての部位で腫瘍形成が認められた。20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の α -NETA で前処理した群の腫瘍は、対照群の腫瘍よりも有意に重量が小さかった（図 18 B）。また、筋層浸潤率は治療群の方が低かった（図 18 C）。いずれの実験においても、評価時のマウスの体重は、コントロール群と各治療群に有意差はなかった（表 6）。

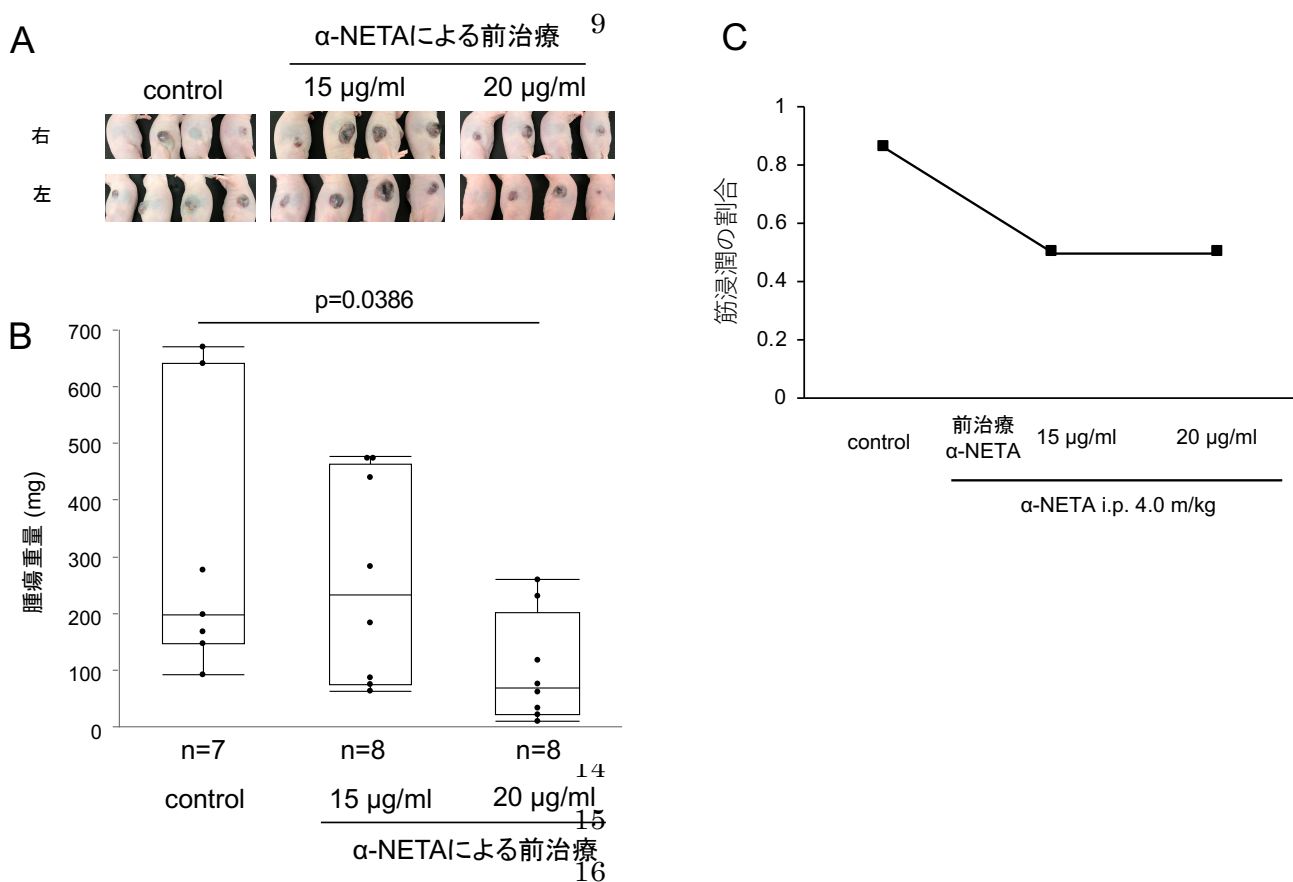


図 18 マウス生体内での腫瘍形成における α -NETA の前処理効果の検討

α -NETA で前処理した HUH7 細胞をマウスの皮下に移植し、同時に α -NETA の腹腔内投与を開始した実験系。細胞移植 2 週間後のマウスの肉眼写真（A）、および摘出した腫瘍重量（B）を示す。（C）腫瘍の筋層浸潤の割合。各群間を Student's t-test により検定し、 α -NETA 20 $\mu\text{g/ml}$ での前処理群とコントロール群の差は $P=0.0386$ であった。

1 表 6 投薬実験における治療開始 2 週間後のマウスの体重

治療法	体重 中央値(四分位範囲) (g)	2
Control (n=4)	22.0 (20.5-24.2)	3
α -NETA 0.2 mg/kg (n=4)	23.7 (23.1-24.0)	4
α -NETA 1.0 mg/kg (n=4)	22.6 (22.3-23.5)	5
α -NETA 2.0 mg/kg (n=4)	23.3 (21.5-23.8)	6
α -NETA 4.0 mg/kg (n=4)	23.3 (21.9-23.8)	7
Control (n=4)	25.5 (24.9-26.1)	8
Pretreat 15 μ g/ml α -NETA 4.0 mg/kg (n=4)	26.4 (25.1-27.1)	9
Pretreat 20 μ g/ml α -NETA 4.0 mg/kg (n=4)	26.3 (26.1-28.1)	10
		11
		12
		13

14 * Student's *t*-test による検定で Control 群と各治療群間に有意差はなかった。

15

16

考察

本実験において、我々は近年報告したハイドロゲルを使用して迅速に CSCs を誘導する方法 (Suzuka *et al.*, Nat. Biomed. Eng. acceptable in principle. 2020) を用いて本実験を行った。本検討により DN ゲルを用いて HCC 細胞株から遺伝子レベル、および蛋白発現レベルで幹細胞性を誘導できることを証明し、それらの解析から、肝癌幹細胞の新規マーカー分子並びに治療候補分子としてケメリン受容体 CMKLR1 を選定した。HCC の臨床検体から同分子が予後制御因子であることが明らかとなり、ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤が、*in vitro* では細胞障害性を示すと共に幹細胞誘導の阻害効果を発揮し、*in vivo* マウス実験から腫瘍の周囲組織への浸潤および腫瘍形成の阻害効果を示した。

4 種の細胞株を DN ゲル上で培養したところ、形態上はそれぞれスフェアを形成したが、遺伝子発現の変動は細胞によって反応が異なり、HLF 細胞が幹細胞マーカー遺伝子の発現に関して最も強く反応した。今回使用した 4 種の細胞株の中で HLF 細胞は低分化型 HCC 由来であり、分化能を有する CSCs に最も近い性質をもつと考えられる。液性因子を用いた肝癌幹細胞誘導において未分化な細胞株で幹細胞誘導の反応が良好であると報告されており (Cao *et al.*, 2011)、DN ゲルを用いた本実験でもより未分化な細胞が CSCs 誘導に反応する同様の傾向がみられた。

また、遺伝子発現のみならず Nanog や Oct4 などの未分化マーカーがタンパクレベルで発現亢進することも確認され、幹細胞性の獲得のより強い根拠が示されたと考えられる。古典的な幹細胞誘導に使用される UL dish を追加して DN ゲルを用いた培養条件との比較を行なったところ、UL dish でも PS dish と比較して幹細胞マーカー遺伝子の発現亢進は認められたが、DN ゲルでより大きな幹細胞マーカー遺伝子の亢進が認められ、DN ゲルの優位性が確認された。

マイクロアレイ解析において DN ゲル上培養により発現亢進の認められた 82 遺伝子の中には、induced pluripotency stem cell (iPS 細胞) 作成時に導入が必要な遺伝子の一つである *KLF4* や (Takahashi and Yamanaka, 2006)、過剰発現により骨肉腫細胞の腫瘍形成能を亢進することが報告されている遺伝子の *FOS* (Eferl and Wagner, 2003) といった、幹細胞性に強く関連する遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は UL dish でも PS dish の条件と比較して発現亢進が認められており、DN ゲルと UL dish 上での培養

1 条件に共通したスフェア形成による細胞の反応と考えられた。DN ゲルで
2 の培養は UL dish に対しても優位性をもって幹細胞マーカー遺伝子発現が
3 亢進していたことから、培養された細胞は DN ゲルから特有の刺激を受容
4 して幹細胞性を獲得していると考え、DN ゲルで特異的な発現亢進がみら
5 れたクラスターに注目した。このクラスターの遺伝子の多くは蛋白をコー
6 ドしておらず、現時点では機能に関して未報告であるものが大半であった
7 が、幹細胞性に関連している可能性も考えられ、今後の検討課題と考えら
8 れる。

9 我々はさらにタンパク質をコードしている 7 遺伝子に対象を絞り込ん
10 だ。この中のひとつである *MST1* は肝臓の過剰な増殖や腫瘍形成の制御に
11 関連することが示されており (Camargo *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2007; Zhou
12 *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2015; Sohn *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2019)、
13 DN ゲル特異的な反応が CSCs の特徴である腫瘍形成能に関連することを裏
14 付ける結果の一つと考えられる。DN ゲル上で培養した細胞が癌幹細胞の
15 性質を有するより強い根拠としては、自己複製能、多分化能、治療抵抗
16 性、生体内腫瘍形成能など癌幹細胞の生物学的特徴を評価する必要があ
17 り、今後の検討課題である。

18 今回我々は、細胞膜上に局在する受容体蛋白であるケメリン受容体
19 CMKLR1 をさらなる検討対象として選定した (図 9)。ケメリン受容体
20 CMKLR1 と癌との関連として、ケメリン/CMKLR1 経路の活性化が神経膠
21 芽腫や食道癌、胃癌の増殖能や遊走能などの悪性度との関連が報告されて
22 いる一方で (Kumar *et al.*, 2016; Tümmeler *et al.*, 2017; Dinesh Kumar *et al.*,
23 2019)、メラノーマにおいてケメリン受容体 CMKLR1 を発現したナチュラ
24 ルキラー細胞がケメリンによってリクルートされることで抗腫瘍効果を示
25 した報告や (Pachynski *et al.*, 2012)、HCC でケメリンが CMKLR1-PTEN-
26 pAkt の相互作用を阻害することで HCC の遊走・浸潤・転移を抑制する報
27 告などがあり (Li *et al.*, 2018)、癌において治療対象の分子として注目され
28 つつある。本実験において DN ゲル上で培養することによりケメリン受容
29 体 CMKLR1 蛋白発現の亢進とともに ERK1/2 のリン酸化が亢進しており、
30 シグナル経路が活性化していることが示唆された。

31 次いでケメリン受容体 CMKLR1 分子について HCC 組織の免疫組織化学
32 染色を行った。その結果、ケメリン受容体 CMKLR1 の強発現群が優位差を
33 もって予後不良であることが示され、ケメリン受容体 CMKLR1 の発現が悪
34 性度と関連する可能性が示唆された。今回検討した患者因子からはケメリ

ン受容体 CMKLR1 の発現強度と有意に相関する患者因子は認められなかったが、既知の因子とは別の新たな因子を見いだせる可能性が考えられ、さらなる検討の余地がある。

CSCs の概念において癌組織は単純化すると CSCs と非 CSCs からなるが、実際には非 CSCs の中でも分化の程度がグラデーションのように異なる細胞が混在していると考えられる。腫瘍組織内にケメリン受容体 CMKLR1 の染色性の異なるヘテロジェナイティが観察された領域では細胞毎に染色強度が異なり、この幹細胞性のヘテロジェナイティを捉えている可能性がある。これを検証するにはケメリン受容体 CMKLR1 と幹細胞マーカーとなる蛋白の発現が同一細胞でみられているか同時に評価すること、また、セルソーティングにより CMKLR1 陽性 HCC 細胞を分取し、生体内腫瘍形成能の評価を行うことを追加実験として現在開始しており、今後の検討課題である。

パイロトーシスは、毒素や細菌感染などの病原体に対する免疫応答として知られ、細胞膜から大きな水泡が膨潤する特徴的な溶解性変化を伴った、ガスダーミン蛋白質が介在するプログラム化された細胞死である (Shi, Gao and Shao, 2017)。Gasdermin A-E および Deafness autosomal recessive type 59 (DFNB59) からなる gasdermin ファミリーは、細胞毒性のある N 末端ドメインと C 末端リプレッサードメインが柔軟なリンカーにより接続されている。これら 2 つのドメイン間のタンパク質分解的切断により、細胞毒性ドメインが解放されて、N 末端ドメインが細胞膜に入り込んで孔を形成し、細胞死を誘導する (図 19) (Broz, Pelegrín and Shao, 2020)。ガスダーミン E は、SH-SY5Y (神経芽腫) や MeWo (悪性黒色腫) などのがん細胞株で発現しており、ドキソルビシン、シスプラチン、エトポシドなどの抗癌剤によりカスパーゼ 3 介在性パイロトーシスを惹起させることが報告されている (Wang *et al.*, 2017)。

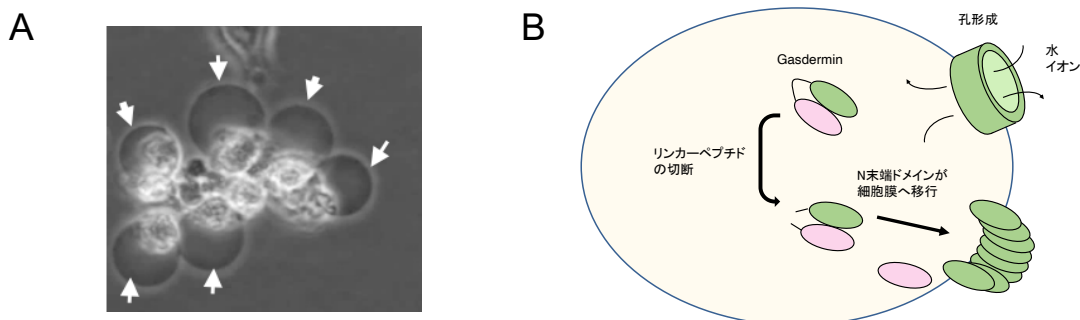


図 19 パイロトーシスの概略図および形態

(A) シスプラチン処理によりパイロトーシスを起こした SH-SY5Y 細胞の位相差顕微鏡像。(Wang *et al.*, 2017) より引用。(B) Gasdermin がリンカーペプチドの切断により分裂し、N 末端ドメインが細胞膜に表出し、孔形成によりパイロトーシスが生じるシエーマ。(Shi, Gao and Shao, 2017) より改変。

ケメリン受容体 CMKLR1 特異的な機能の評価のため siRNA を用いてノックダウンを試みたが困難であったため、ケメリン受容体 CMKLR1 阻害剤 α -NETA を用いて実験を行った。 α -NETA は、開発当初コリントランスフェラーゼ阻害剤 (IC₅₀: 3.3 μ g/ml) として報告されたが (Sastry *et al.*, 1988)、その後 CMKLR1 に対する薬効 (IC₅₀: 0.14 μ g/ml) が明らかとなり、CMKLR1 に対して選択性の高い阻害剤として報告された (Graham *et al.*, 2014)。また、 α -NETA は多発性硬化症を模倣した実験的自己免疫性脳脊髄炎のマウスモデルにおいて、CMKLR1 遺伝子のノックアウトマウスと同様に α -NETA の投薬により臨床症状が改善する効果が報告されている (Kumar *et al.*, 2019)。さらに、上皮性卵巣癌のマウス移植モデルにおいては、 α -NETA の投薬により溶解性変化を伴う細胞死であるパイロトーシスを介した抗腫瘍効果が報告されている (Qiao *et al.*, 2019)。

α -NETA は高濃度 (20 μ g/ml) では HCC に対する殺細胞効果が認められた。この時、形態的に細胞膜が水泡状に膨張し、蛋白レベルで GSDME から孔形成活性を有する N 末端ドメインの切断が生じておりパイロトーシスが生じていることが示された (図 14)。また、DN ゲル上で幹細胞誘導を行う過程で、細胞死は惹起せずに CMKLR1 阻害効果のみを発揮すると考えられる低濃度 (0.5 μ g/ml) で α -NETA を暴露した際には、幹細胞関連遺伝子の発現を抑制する効果をもつことが示され (図 15)、ケメリン受容体 CMKLR1 を阻害することで、CSCs の治療につながる可能性が示唆された。

次に、ヌードマウスの異種移植モデルにおいて腫瘍細胞移植後早期から α -NETA を投与し、生体内での腫瘍形成における本剤の効果を検討した。腫瘍移植後から腹腔内投与した実験セットでは腫瘍細胞の周囲筋組織への浸潤が阻害され、免疫組織化学的検索では E-cadherin の発現が誘導されることが示された。 α -NETA で前処理してから HUH7 細胞を移植する実験セットでは、周辺組織への浸潤抑制と腫瘍形成の抑制が示された。生体内での腫瘍形成能や周囲組織への浸潤能は CSCs が有する特徴の一つであり、本動物実験においては CSCs の性質を一部阻害する効果を示すことができたと考えられる (図 17)。既報の投与プロトコルを参考に一回あたりの

1 最大用量を 4.0 mg/kg として α -NETA の腹腔内投与実験を行ったが (Qiao *et*
2 *al.*, 2019)、浸潤抑制効果は認められたものの腫瘍形成の阻害は前処置を行
3 った場合しか効果は得られておらず、投与方法や投与量が最適ではなかった
4 可能性が考えられる。本研究で実施した投与方法とは異なるが、マウスに
5 対する経口単回投与における 50%致死量は 873 mg/kg と報告されており
6 (Kumar *et al.*, 2019)、本研究の実験でも薬剤投与による体重変化はなく、
7 明らかな副作用は認められなかったため、より高用量での投与を行う余地
8 があると考えられ、今後の検討課題である。

9
10

結論

1. 本研究から得られた新知見

1) ヒト肝細胞株を DN ゲル上で培養することにより幹細胞性が誘導され、網羅的遺伝子発現解析から新規肝癌幹細胞マーカーおよび治療標的分子としてケメリン受容体 **CMKLR1** を同定した。

2) 115 症例のヒト肝細胞癌切除検体において、ケメリン受容体 **CMKLR1** の高発現群は予後が不良であった。

3) ケメリン受容体 **CMKLR1** 阻害剤は幹細胞誘導の阻害効果、および生体内腫瘍形成阻害作用を示した。

2. 新知見の意義

現在肝細胞癌の薬物療法は十分な治療効果を得られておらず、極めて予後不良の癌である。本研究により得られた新知見により、ケメリン受容体 **CMKLR1** 分子が肝細胞癌の治療において新たな分子標的となることが期待される。

3. 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

ケメリン受容体 **CMKLR1** 阻害剤の治療薬としての効果を検証し、臨床応用への可能性を探索する。

4. 今後の課題

ケメリン受容体 **CMKLR1** 遺伝子の特異的発現抑制および過剰発現実験を行うことで、HCC の幹細胞化におけるケメリン受容体 **CMKLR1** 分子の必要性の検証、およびその過程での詳細な分子機序の解明が必要である。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武富紹信教授に深謝致します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室、田中伸哉教授、津田真寿美准教授に感謝の意を表します。

最後に、本論文を作成するに当たってご指導・ご協力を頂いたすべての皆様に、重ねて御礼申し上げます。

利益相反

1

2

3

開示すべき利益相反状態はない。

4

5

6

7

8

引用文献

- Ajani, J.A., Song, S., Hochster, H.S., and Steinberg, I.B. (2015). Cancer stem cells: The promise and the potential. *Semin. Oncol.* *42*, S3–S17.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* *3*, 730–737.
- Broz, P., Pelegrín, P., and Shao, F. (2020). The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 143–157.
- Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2007). YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Curr. Biol.* *17*, 2054–2060.
- Cao, L., Zhou, Y., Zhai, B., Liao, J., Xu, W., Zhang, R., Li, J., Zhang, Y., Chen, L., Qian, H., et al. (2011). Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol.* *11*, 71.
- Chai, S., Ng, K.Y., Tong, M., Lau, E.Y., Lee, T.K., Chan, K.W., Yuan, Y.F., Cheung, T.T., Cheung, S.T., Wang, X.Q., et al. (2016). Octamer 4/microRNA-1246 signaling axis drives Wnt/ β -catenin activation in liver cancer stem cells. *Hepatology* *64*, 2062–2076.
- Davenport, A.P., Alexander, S.P.H., Sharman, J.L., Pawson, A.J., Benson, H.E., Monaghan, A.E., Liew, W.C., Mpamhanga, C.P., Bonner, T.I., Neubig, R.R., et al. (2013). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXVIII. g protein-coupled receptor list: Recommendations for new pairings with cognate Ligands. *Pharmacol. Rev.* *65*, 967–986.
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., et al. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* *458*, 780–783.

1 Dinesh Kumar, J., Aolymat, I., Tiszlavicz, L., Reisz, Z., Garalla, H.M., Beynon,
2 R., Simpson, D., Dockray, G.J., and Varro, A. (2019). Chemerin acts via
3 CMKLR1 and GPR1 to stimulate migration and invasion of gastric cancer cells:
4 Putative role of decreased TIMP-1 and TIMP-2. *Oncotarget* *10*, 98–112.
5
6 Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed,
7 M.F.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007). Elucidation of a Universal
8 Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals. *Cell* *130*, 1120–1133.
9
10 Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: A double-edged sword in
11 tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 859–868.
12
13 Forner, A., Reig, M., and Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *Lancet* *391*,
14 1301–1314.
15 Gong, J.P. (2014). Materials both Tough and Soft. *Science* (80-.). *344*, 161–162.
16
17 Gong, J.P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T., and Osada, Y. (2003). Double-network
18 hydrogels with extremely high mechanical strength. *Adv. Mater.* *15*, 1155–1158.
19
20 Graham, K.L., Zabel, B.A., Loghavi, S., Zuniga, L.A., Ho, P.P., Sobel, R.A., and
21 Butcher, E.C. (2009). Chemokine-Like Receptor-1 Expression by Central Nervous
22 System-Infiltrating Leukocytes and Involvement in a Model of Autoimmune
23 Demyelinating Disease. *J. Immunol.* *183*, 6717–6723.
24
25 Graham, K.L., Zhang, J. V., Lewén, S., Burke, T.M., Dang, T., Zoudilova, M.,
26 Sobel, R.A., Butcher, E.C., and Zabel, B.A. (2014). A novel CMKLR1 small
27 molecule antagonist suppresses CNS autoimmune inflammatory disease. *PLoS*
28 *One* *9*, 1–26.
29
30 Ikeda, K., Arase, Y., Kobayashi, M., Saitoh, S., Someya, T., Hosaka, T., Suzuki,
31 Y., Suzuki, F., Tsubota, A., Akuta, N., et al. (2003). Significance of multicentric
32 cancer recurrence after potentially curative ablation of hepatocellular carcinoma:
33 A longterm cohort study of 892 patients with viral cirrhosis. *J. Gastroenterol.* *38*,
34 865–876.

- 1 Ji, S., Liu, Q., Zhang, S., Chen, Q., Wang, C., Zhang, W., Xiao, C., Li, Y., Nian,
2 C., Li, J., et al. (2019). FGF15 Activates Hippo Signaling to Suppress Bile Acid
3 Metabolism and Liver Tumorigenesis. *Dev. Cell* 48, 460-474.e9.
4
- 5 Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer Stem Cells. *N. Engl.*
6 *J. Med.* 355, 1253–1261.
7
- 8 Katoh, H., Ojima, H., Kokubu, A., Saito, S., Kondo, T., Kosuge, T., Hosoda, F.,
9 Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., et al. (2007). Genetically Distinct and
10 Clinically Relevant Classification of Hepatocellular Carcinoma: Putative
11 Therapeutic Targets. *Gastroenterology* 133, 1475–1486.
12
- 13 Kennedy, A.J., and Davenport, A.P. (2018a). International union of basic and
14 clinical pharmacology CIII: Chemerin receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1
15 (Chemerin2) nomenclature, pharmacology, and function. *Pharmacol. Rev.* 70,
16 174–196.
17
- 18 Kimura, O., Takahashi, T., Ishii, N., Inoue, Y., Ueno, Y., Kogure, T., Fukushima,
19 K., Shiina, M., Yamagiwa, Y., Kondo, Y., et al. (2010). Characterization of the
20 epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular
21 carcinoma cell lines. *Cancer Sci.* 101, 2145–2155.
22
- 23 Kudo, M., Finn, R.S., Qin, S., Han, K.H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park,
24 J.W., Han, G., Jassem, J., et al. (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line
25 treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised
26 phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 391, 1163–1173.
27
- 28 Kumar, J.D., Kandola, S., Tiszlavicz, L., Reisz, Z., Dockray, G.J., and Varro, A.
29 (2016). The role of chemerin and ChemR23 in stimulating the invasion of
30 squamous oesophageal cancer cells. *Br. J. Cancer* 114, 1152–1159.
31
- 32 Kumar, V., LaJevic, M., Pandrala, M., Jacobo, S.A., Malhotra, S. V., and Zabel,
33 B.A. (2019). Novel CMKLR1 Inhibitors for Application in Demyelinating
34 Disease. *Sci. Rep.* 9, 1–13.

1 Lee, T.K.W., Castilho, A., Cheung, V.C.H., Tang, K.H., Ma, S., and Ng, I.O.L.
 2 (2011). CD24 + Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor
 3 Initiation through STAT3-Mediated NANOG Regulation. *Cell Stem Cell* 9, 50–
 4 63.
 5
 6 Li, J.J., Yin, H.K., Guan, D.X., Zhao, J.S., Feng, Y.X., Deng, Y.Z., Wang, X., Li,
 7 N., Wang, X.F., Cheng, S.Q., et al. (2018). Chemerin suppresses hepatocellular
 8 carcinoma metastasis through CMKLR1-PTEN-Akt axis. *Br. J. Cancer* 118, 1337–
 9 1348.
 10
 11 Lu, L., Li, Y., Kim, S.M., Bossuyt, W., Liu, P., Qiu, Q., Wang, Y., Halder, G.,
 12 Finegold, M.J., Lee, J.S., et al. (2010). Hippo signaling is a potent in vivo growth
 13 and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*
 14 *S. A.* 107, 1437–1442.
 15
 16 Ma, S., Chan, K.-W., Hu, L., Lee, T.K.-W., Wo, J.Y.-H., Ng, I.O.-L., Zheng, B.-
 17 J., and Guan, X.-Y. (2007). Identification and characterization of tumorigenic
 18 liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132, 2542–2556.
 19
 20 Pachynski, R.K., Zabel, B.A., Kohrt, H.E., Tejeda, N.M., Monnier, J., Swanson,
 21 C.D., Holzer, A.K., Gentles, A.J., Sperinde, G. V., Edalati, A., et al. (2012). The
 22 chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell
 23 antitumor defenses. *J. Exp. Med.* 209, 1427–1435.
 24
 25 Qiao, L., Wu, X., Zhang, J., Liu, L., Sui, X., Zhang, R., Liu, W., Shen, F., Sun,
 26 Y., and Xi, X. (2019). α -NETA induces pyroptosis of epithelial ovarian cancer
 27 cells through the GSDMD/caspase-4 pathway. *FASEB J.* 33, 12760–12767.
 28
 29 Rourke, J.L., Muruganandan, S., Dranse, H.J., McMullen, N.M., and Sinal, C.J.
 30 (2014). Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in
 31 obese mice. *J. Endocrinol.* 222, 201–215.
 32
 33 Rourke, J.L., Dranse, H.J., and Sinal, C.J. (2015). CMKLR1 and GPR1 mediate
 34 chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.*
 35 417, 36–51.

1 Sastry, B. V, Jaiswal, N., Owens, L.K., Janson, V.E., and Moore, R.D. (1988). 2-
2 (alpha-Naphthoyl)ethyltrimethylammonium iodide and its beta-isomer: new
3 selective, stable and fluorescent inhibitors of choline acetyltransferase. *J.*
4 *Pharmacol. Exp. Ther.* *245*, 72–80.

5

6 Shi, J., Gao, W., and Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated
7 Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 245–254.

8

9 Sohn, B.H., Shim, J.J., Kim, S.B., Jang, K.Y., Kim, S.M., Kim, J.H., Hwang, J.E.,
10 Jang, H.J., Lee, H.S., Kim, S.C., et al. (2016). Inactivation of hippo pathway is
11 significantly associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin.*
12 *Cancer Res.* *22*, 1256–1264.

13

14 Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells
15 from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*
16 *126*, 663–676.

17

18 Totoki, Y., Tatsuno, K., Covington, K.R., Ueda, H., Creighton, C.J., Kato, M.,
19 Tsuji, S., Donehower, L.A., Slagle, B.L., Nakamura, H., et al. (2014). Trans-
20 ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat. Genet.*
21 *46*, 1267–1273.

22

23 Treeck, O., Buechler, C., and Ortmann, O. (2019). Chemerin and cancer. *Int. J.*
24 *Mol. Sci.* *20*.

25

26 Tümmler, C., Snapkov, I., Wickström, M., Moens, U., Ljungblad, L., Elfman,
27 L.H.M., Winberg, J.O., Kogner, P., Johnsen, J.I., and Sveinbjørnsson, B. (2017).
28 Inhibition of chemerin/CMKLR1 axis in neuroblastoma cells reduces
29 clonogenicity and cell viability in vitro and impairs tumor growth in vivo.
30 *Oncotarget* *8*, 95135–95151.

31

32 Wang, N., Wang, S., Li, M.Y., Hu, B.G., Liu, L.P., Yang, S.L., Yang, S., Gong,
33 Z., Lai, P.B.S., and Chen, G.G. (2018). Cancer stem cells in hepatocellular
34 carcinoma: an overview and promising therapeutic strategies. *Ther. Adv. Med.*
35 *Oncol.* *10*, 1–25.

Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K., and Shao, F. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* 547, 99–103.

Wu, H., Wei, L., Fan, F., Ji, S., Zhang, S., Geng, J., Hong, L., Fan, X., Chen, Q., Tian, J., et al. (2015). Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis. *Nat. Commun.* 6.

Yang, J.D., Hainaut, P., Gores, G.J., Amadou, A., Plymoth, A., and Roberts, L.R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 589–604.

Yang, W., Yan, H.X., Chen, L., Liu, Q., He, Y.Q., Yu, L.X., Zhang, S.H., Huang, D.D., Tang, L., Kong, X.N., et al. (2008a). Wnt/ β -catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res.* 68, 4287–4295.

Yang, Z.F., Ho, D.W., Ng, M.N., Lau, C.K., Yu, W.C., Ngai, P., Chu, P.W.K., Lam, C.T., Poon, R.T.P., and Fan, S.T. (2008b). Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 13, 153–166.

Yasuda, K., Kitamura, N., Gong, J.P., Arakaki, K., Kwon, H.J., Onodera, S., Chen, Y.M., Kurokawa, T., Kanaya, F., Ohmiya, Y., et al. (2009). A novel double-network hydrogel induces spontaneous articular cartilage regeneration in vivo in a large osteochondral defect. *Macromol. Biosci.* 9, 307–316.

Zabel, B.A., Silverio, A.M., and Butcher, E.C. (2005). Chemokine-Like Receptor 1 Expression and Chemerin-Directed Chemotaxis Distinguish Plasmacytoid from Myeloid Dendritic Cells in Human Blood. *J. Immunol.* 174, 244–251.

Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J., et al. (2009). Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell* 16, 425–438.

- 1 Zhu, Z., Hao, X., Yan, M., Yao, M., Ge, C., Gu, J., and Li, J. (2010). Cancer
- 2 stem/progenitor cells are highly enriched in CD133 +CD44+ population in
- 3 hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* *126*, 2067–2078.
- 4
- 5 国立がん研究センターがん情報サービス. がん登録・統計 (2020)
- 6 https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html