

**Identification of A Hepatocellular Carcinoma Cell Line**

**With Cancer Stem Cell (CSC) Hierarchy And**

**Effect of Sorafenib On CD13-positive CSCs**

(癌幹細胞 CSC ヒエラルキーを有する肝細胞癌細胞  
株の同定と CD13 陽性 CSC に対するソラフェニブの  
効果に関する検討)

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

山 田 武 史

## 略語

5-FU	5-fluorouracil
7-AAD	7-Amino Actinomycin D
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G
ALDH	Aldehyde-dehydrogenase
APC	Allophycocyanin
BAAA	BODIPY- aminoacetaldehyde
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CBF	Core-binding factor
CD	Cluster of differentiation
DEAB	Diethylaminobenzaldehyde
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ESD	Endoscopic submucosal dissection
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FCM	Flow-cytometry
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
IGCC	International Germ Cell Consensus
IPSS	International Prognostic Scoring System
NCP	NanoCulture Plate
PD-1	Programmed death-1
PE	Phycoerythrin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SSC	Side Scatter
TACE	Transcatheter arterial Chemoembolization
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WPSS	WHO classification-based Prognostic Scoring System

## 目次

略語一覧	1
第1章 研究の背景	4
1.1 がん治療における個別化	
1.1.1 Inter-patient heterogeneity	
1.1.2 Intra-patient heterogeneity	
1.2 癌幹細胞の存在	
1.3 肝細胞癌における癌幹細胞	
第2章 研究の目的	10
2.1 肝癌細胞株における癌幹細胞の同定	
2.2 肝癌幹細胞に対する薬剤の検討	
第3章 対象と方法	11
3.1 細胞株	
3.2 フローサイトメトリー	
3.3 細胞ソーティング	
3.4 増殖アッセイと抗がん剤感受性試験	
3.5 アルデフローアッセイ	
3.6 スフェロイドコロニーアッセイ	
3.7 蛍光染色	
3.8 マイクロアレイ遺伝子解析	
3.9 動物実験	
3.10 移植腫瘍の免疫組織化学およびフローサイトメトリー	
3.11 統計解析	
第4章 結果	19
4.1 肝細胞癌細胞株における Population switch	
4.2 <i>in vitro</i> における Li-7 細胞のヒエラルキー	
4.3 Li-7 細胞の機能的階層性	
4.4 <i>in vivo</i> における CD13 発現	
4.5 ソラフェニブと 5-FU の治療効果	

第 5 章 考察 .....	33
5.1 本研究であきらかとしたこと	
5.2 細胞株の Population switch	
5.3 肝細胞癌の癌幹細胞マーカー	
5.4 他のモデルからみた本モデルの利点	
5.5 5-FU とソラフェニブの異なる標的細胞集団	
5.6 課題と展望	
第 6 章 結論 .....	40
研究費	
利益相反	
引用文献 .....	40
参考論文 .....	47
謝辞 .....	48

## 第1章 背景

### 1.1 がん治療における個別化

#### 1.1.1 Inter-patient heterogeneity

高齢社会の日本における死因は、悪性新生物による死亡が最も多く、その罹患数・死亡数はともに増加の一途を辿っている（国立がん研究センターがん対策情報センター）。一方、より侵襲が少なく、効率的で有効な癌治療のために治療の個別化が進んでおり、今や進行度に応じた治療選択はあらゆる癌種において確立されている。表1に国内の主な癌の進行度別の治療法の概略をまとめた（各学会ガイドライン参照）。

表1 進行度別の主な癌に対する治療方法

癌種	早期	⇔	進行期
胃癌	内視鏡治療	手術＋補助化学療法	化学療法
大腸癌	内視鏡治療	手術±補助化学療法	化学療法±手術
肺癌	手術 ＋補助化学療法	化学放射線療法	化学療法
乳癌	手術±放射線	周術期化学・ホルモン療法＋手術＋放射線	化学療法、 ホルモン療法
前立腺癌	経過観察、手術	手術/放射線＋補助ホルモン療法	ホルモン療法、 化学療法
リンパ腫	化学・放射線療法	化学療法	化学療法±移植
肝癌	手術、ラジオ波	手術、TACE	TACE、動注、移植、 化学療法、放射線

また、血液腫瘍を中心とした一部のがんでは、進行度のみならず予後因子によっても治療法が決定されている。主なものを表2にまとめた。

表2 予後因子による治療選択

癌種	予後因子	治療法
急性骨髄性白血病	染色体異常(CBF⇔複雑核型)、年齢	High dose Ara-C⇔移植
骨髄異型性症候群	IPSS、WPSS	経過観察⇔薬物療法⇔移植
慢性型成人T細胞性白血病	LDH・Alb・BUN	経過観察⇔化学療法
多発性骨髄腫	年齢	薬物療法±移植
前立腺癌	Glisonスコア・PSA・T stage	経過観察⇔手術/放射線+ホルモン短期⇒長期
胚細胞腫瘍	IGCC分類	BEP 3⇔4コース

さらに近年では、分子生物学の進歩により様々な分子標的薬が開発され、バイオマーカーによって治療対象となる患者選択が行われている。現在国内で実臨床に应用されているものを表3にまとめた。

表3 バイオマーカーによる分子標的薬の選択

癌種	バイオマーカー	薬剤
非ホジキンリンパ腫	CD20発現	リツキシマブ・イブリットモマブ
急性リンパ性白血病	BLR/ABL	イマチニブ
胃癌	HER2発現	トラスツズマブ
乳癌	HER2発現	トラスツズマブ・ラパチニブ・ペルツズマブ・T-DM1
非小細胞肺癌	EGFR変異	ゲフィチニブ・エルロチニブ・アファチニブ
非小細胞肺癌	ALK癒合遺伝子	クリゾチニブ・アレクチニブ
大腸癌	KRAS野生型	セツキシマブ・パニツムマブ

こうした患者の個別化治療は主に進行期に用いられているが、術後再発を予測する目的で遺伝子解析が行われ、術後補助化学療法を選択に利用されることもある（国内未承認）。一方、我々は内視鏡的切除（ESD）のよい適応とされる 2cm 以内、分化型腺癌、潰瘍なしの早期胃癌において、中分化型腺癌および乳頭腺癌の組織型、0-IIa+IIc または 0-IIc+IIa の肉眼型、1.5cm 以上の腫瘍径が、脈管侵襲および粘膜下層浸潤（SM/LV）の独立したリスク因子であることを明らかにした[参考論文：Yamada T, et al. Gastric Cancer 2014;17:692-690.]。これにより、術前精査や追加治療の患者説明を層別化できうと考えられる（図 1）。

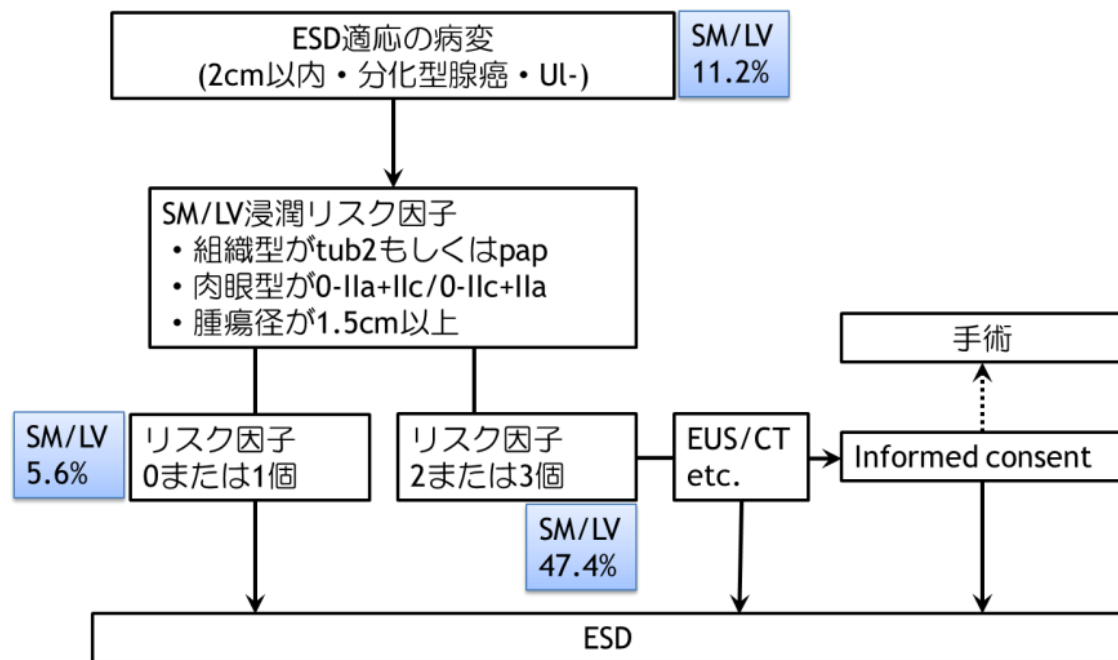


図 1 脈管侵襲・粘膜下層浸潤リスクによる内視鏡治療前の層別化（文献より一部改編）

このようにして、現在臨床で行われている個別化医療は、個々の患者間での多様性（Inter-patient heterogeneity）に対して、患者ごとの進行度や予後因子、バイオマーカーなどを用いて行われている（図 2）。

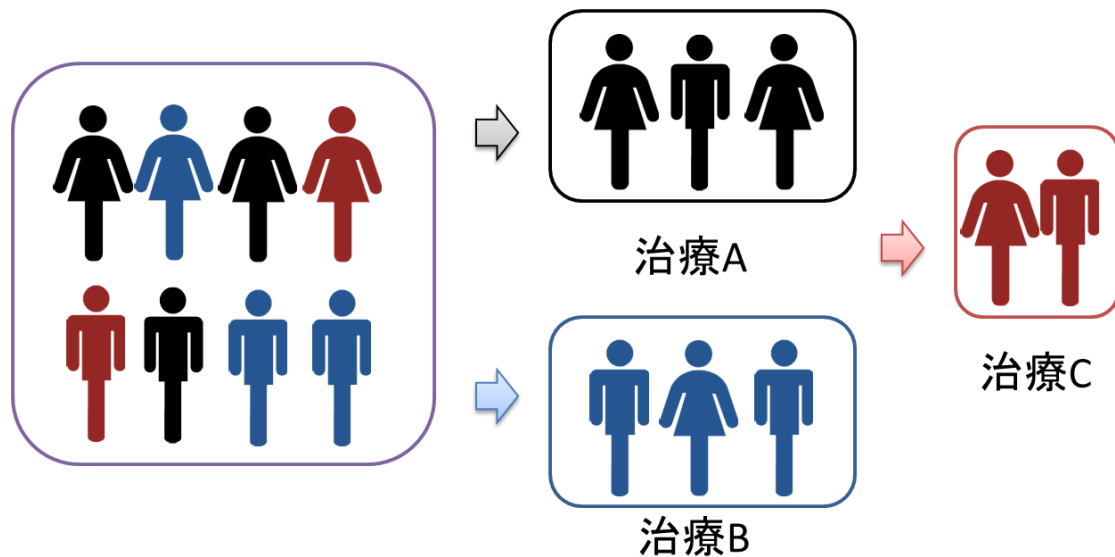


図2 Inter-patient heterogeneity に対する個別化医療

### 1.1.2 Intra-patient heterogeneity

その一方で、一人の患者においてもその腫瘍組織に含まれる癌細胞そのものが不均一であることが指摘されている (Intra-patient heterogeneity)。その不均一性を生んでいる主要因として、微小環境と呼ばれる腫瘍血管・免疫細胞・間質成分との相互作用があり、それらに対する治療の開発が進められている[文献 1]。

具体的には、血管内皮増殖因子 VEGF を標的とする多くの抗体・小分子化合物などが様々な固形腫瘍に対して国内で既に臨床応用されており、免疫チェックポイントを標的とする抗 PD-1 抗体がメラノーマに対して承認され、抗 CTLA-4 抗体についても 2014 年 9 月承認申請が出されている。また、細胞外基質との接着に重要なインテグリンを標的とする分子標的薬などの開発が進められている。このように、がんの微小環境を標的とした治療法が次々と開発されている。その一方で、癌細胞の不均一性を説明する重要なモデルとして、癌幹細胞の存在が指摘されている。



## 1.2 癌幹細胞の存在

長い間、全ての腫瘍細胞が一様に元の腫瘍を形成することが可能であるという確率的モデル (Stochastic model) に基づいて、腫瘍進展について説明がなされていた。しかし、この 20 年の間に新たな説明モデルとして、癌幹細胞と呼ばれる腫瘍細胞の一部の細胞集団のみが、その不均一な腫瘍細胞全てを構築できるとする階層的モデル (Hierarchical model) によるパラダイムシフトが起きた。癌幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、腫瘍に含まれる不均一な腫瘍細胞を階層的に構築する能力を有するとされる[文献 2]。そして、階層の頂点に存在する増殖の遅い休眠状態の (Dormant) 癌幹細胞は、従来の殺細胞薬や放射線に対して抵抗性であり、がんの発育・転移・再発に関与するとされている[文献 3, 4]。

1997 年に白血病幹細胞の存在が明らかとされて以降[文献 5]、様々な固形腫瘍においても癌幹細胞が同定されている。主なものを表 4 にまとめた。

表 4 固形腫瘍の癌幹細胞の分子マーカー

癌種	分子マーカー	文献
AML	CD34+ CD38-	Nat Med 1997,3:730
乳癌	CD44+ CD24-/low Lin- EpCAM+	PNAS 2003,100:3983
脳腫瘍	CD133+	Nature 2004,432:396
大腸癌	CD133+ EPCAM+ CD44+ Lin- CD166+	Nature 2007,445:111 PNAS 2007;104:10158
頭頸部癌	CD44+ Lin-	PNAS 2007,104:973
膵癌	CD44+ CD24+ EpCAM+ CD133+	Cancer res 2007,67:1030 Cell Stem Cell 2007,1:313
メラノーマ	ABC5+	Nature 2008,456:593
卵巣癌	CD44+ CD117+	Cancer res 2008,68:4311
膀胱癌	Lin- CD44+ CK5+ CK20-	PNAS 2009,106:14016
Ewing肉腫	CD133+	Cancer res 2009,69:1776

### 1.3 肝細胞癌における癌幹細胞

肝細胞癌は全世界の中でも特にアジア諸国において、がんによる死亡の主たる原因の1つである[文献 6]。肝細胞癌に対しても病期毎に、幾つかの治療選択肢が存在する[文献 7]。しかしながら、進行肝細胞癌に対して全身投与により生存の延長が確認されているのは分子標的薬のソラフェニブだけであり、その効果は限定的である[文献 8, 9]。従って、特に局所治療が困難な進行肝細胞癌の患者では、更なる効果的な治療方法の確立が求められている。

肝細胞癌においても、癌幹細胞の存在は指摘されており、膜輸送蛋白 ABCG2 の機能的アッセイであるサイドポピュレーションや[文献 10, 11]、CD133[文献 12]、CD90[文献 13]、EpCAM[文献 14]、CD44[文献 15]、CD24[文献 16]といった表面マーカーの発現、ALDH 活性を検出するアルデフローアッセイ[文献 17]などにより同定されてきた。最近では、CD13 が静止期にある癌幹細胞のマーカーとして報告されている[文献 18]。また、プロテアソーム活性や活性酸素種が低いことを利用して、癌幹細胞を可視化する技術も報告されている[文献 19]。

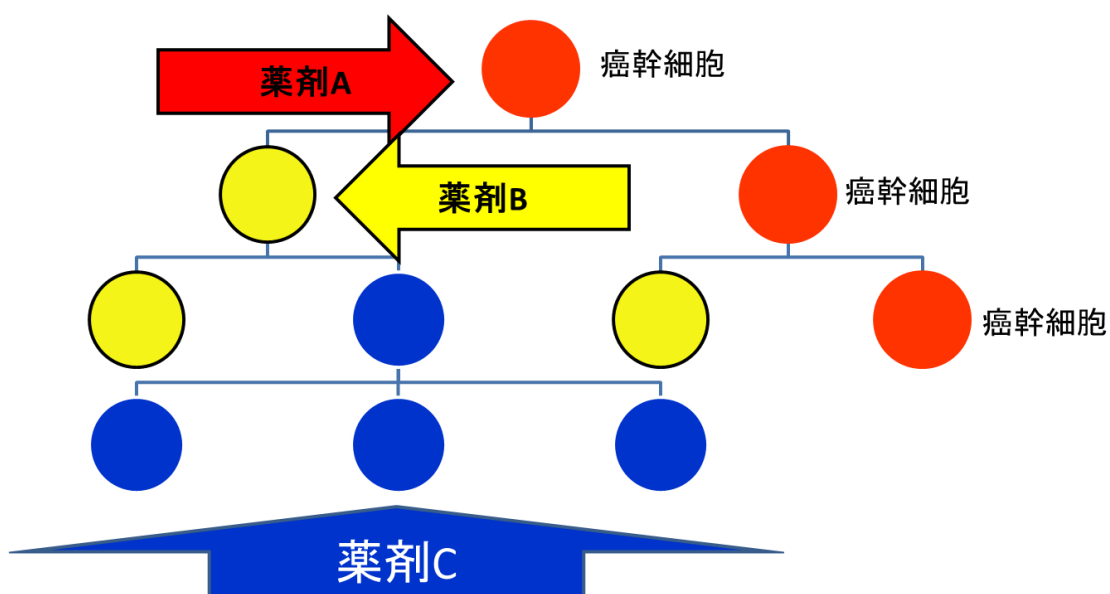


図3 Intra-patient heterogeneity に対する癌幹細胞モデルからみた治療戦略

癌幹細胞モデルは今では確立され、腫瘍組織の複雑性をより詳しく理解することが可能となっている[文献 20]。結果的に、癌幹細胞を標的とする新たな治療戦略を開発する必要性が強く認識されており、肝細胞癌においても癌幹細胞を標的とすることでより効果的な治療法が期待される（図 3）。しかしながら、増殖の遅い癌幹細胞を、それより分化した増殖の速い前駆細胞から明確に区別することのできる階層性を保持した *in vitro* のモデルは限られているため、癌幹細胞を標的とする薬剤のスクリーニングは容易ではない。肝細胞癌の癌幹細胞を標的とする薬剤のスクリーニングに利用可能な、適切かつシンプルな *in vitro* のモデルを確立することが必須である。

## 第 2 章 研究の目的

### 2.1 肝癌細胞株における癌幹細胞の同定

我々は本研究において、癌幹細胞の階層性が維持された肝細胞癌細胞株を同定することを第 1 の目的とした。階層性を構成する癌幹細胞と非癌幹細胞をいかにして識別するかが問題となるが、我々は次のような仮説をたててその課題に臨んだ。即ち、もし仮に増殖の遅い癌幹細胞集団が細胞株に含まれるのであれば、その増殖の遅さ故に、あるいは増殖の速い前駆細胞へと分化（非対称性分裂）することで、培養過程においてその割合が減っていくであろう（Population switch）との仮説を立てた（図 4）。この仮説に基づき、我々は肝細胞癌細胞株の様々な表面マーカーが 2 か月間の培養の間に変化しないかを検討した。そして、Population switch がみられた細胞株において、*in vitro* における階層性が存在するのかを検証した。

### 2.2 肝癌幹細胞に対する薬剤の検討

また、ソラフェニブが癌幹細胞の階層性において、どの集団を標的としているのかについて

は議論がある。研究の第2の目的として、ソラフェニブが標的とする細胞集団について、本モデルを用いて評価することとした。そして、本モデルが今後の研究や治療戦略にどう利用することが可能かについて検討を行うこととした。

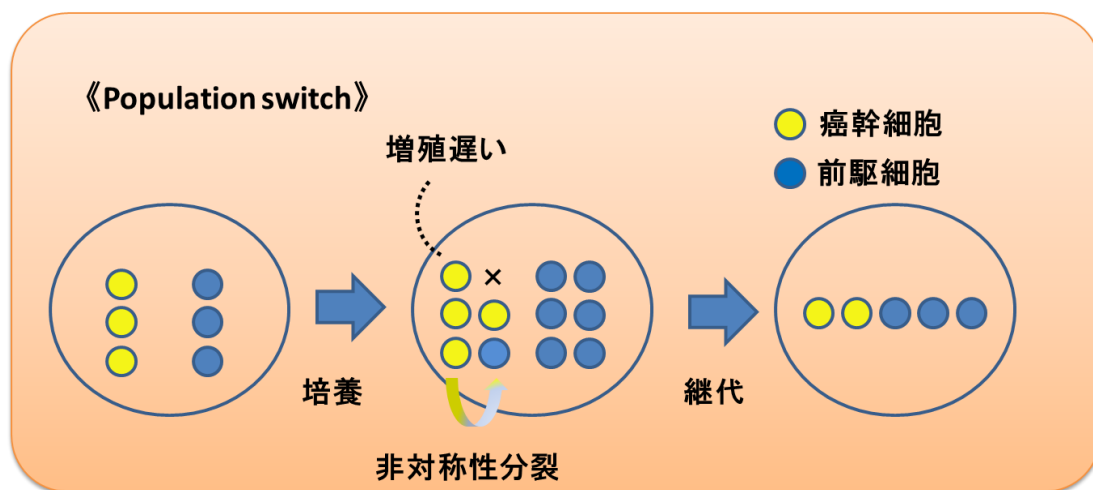


図4 Population switch のシェーマ。増殖が遅く非対称性分裂する癌幹細胞（黄色）は、継代培養により割合が減少し、分化した前駆細胞（青色）が増加する。

### 第3章 対象と方法

#### 3.1 細胞株

肝細胞癌の細胞株として、HuH-7 と Li-7 細胞を理研バイオリソースセンターから、また PLC/PRF/5、HLE および HLF を JCRB 細胞バンクより分譲を受けた。HuH-7 細胞は本研究の利用について、承諾者に紙面での承諾を得た。HuH-7、Li-7 および PLC/PRF/5 は 10%FBS 含有 RPMI1640 培地で、HLE および HLF は 10%、5%FBS 含有 DMEM 培地においてそれぞれ細胞培養を行った。培養条件は各細胞バンクが規定しているものに従った。全ての細胞は 37℃、5%CO<sub>2</sub> で培養し、およそ 80% 程度の confluency で週 2 回、10cm 培養ディッシュに

継代を行い、その間培地交換は行わなかった。尚、今回の研究とは直接的には関係ないものの、肝細胞癌以外の細胞株においても、培養による形質変化について、別途検討を行った。

### 3.2 フローサイトメトリー

フローサイトメトリー (FCM) は、 $5 \times 10^5$  個の細胞に対してそれぞれ以下の蛍光色素で標識した抗体をラベル化して行った。PE-CD166 (ALCAM; BD Bioscience, San Jose, CA)、CD324 (EpCAM; eBioscience, San Diego, CA)、CD133 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, German)、CD44 (eBioscience)、FITC-CD44 (eBioscience)、biotin-CD24 (eBioscience)、APC-CD13 (eBioscience)、CD133 (Miltenyi Biotec)、CD90 (eBioscience)。それぞれアイソタイプコントロールを用いた。抗体と反応させた細胞は、FACSCalibur (BD biosciences)と CellQuest ソフトウェア (Version 6.0, BD biosciences)を用いて解析を行い、死細胞は 7-AAD (BD biosciences)で除去した。

尚、FCM の原理としては、サンプル流がシース液流の中心を流れ、細胞はレーザービーム照射部位の中心を 1 個 1 個流れるように調整される。そして、サンプルに照射したレーザーの散乱光と蛍光を検出する。散乱光のうち、前方成分の FSC は細胞の大きさ、側方成分 SSC は細胞の顆粒性状を表す。一方、FITC のような蛍光色素が、ある波長 (488nm) の光によって励起されると、長波長 (530nm) の光を放出して基底状態に戻る。その光を、光学フィルター (515 ~ 545nm) を通して光電子倍增管で増幅し、検出器で検出された強さに比例した電圧パルス (幅  $W$ ・面積  $A$ ・高さ  $H$ ) をヒストグラムもしくはドットプロットで表示して解析に用いる。

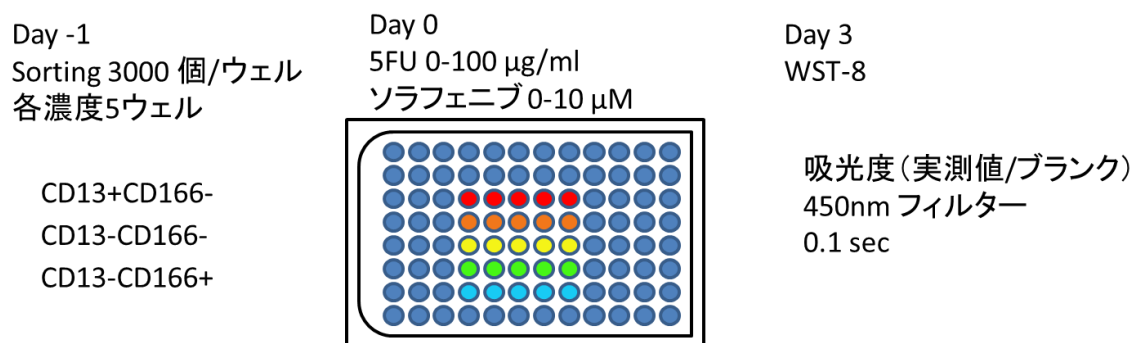
### 3.3 細胞ソーティング

細胞のソーティングは、蛍光標識した抗体でラベル化した細胞を FACS Aria II (BD biosciences)と FACSDiva ソフトウェア (Version 6.1, BD biosciences)を用いて行った。FSC-H と FSC-W および SSC-H と SSC-W の解析でシングルセル以外は除去し、7-AAD 陽性細胞は死細胞として除去した。陽性集団、陰性集団として蛍光強度の高い 25%と低い 20%の細胞を選択し

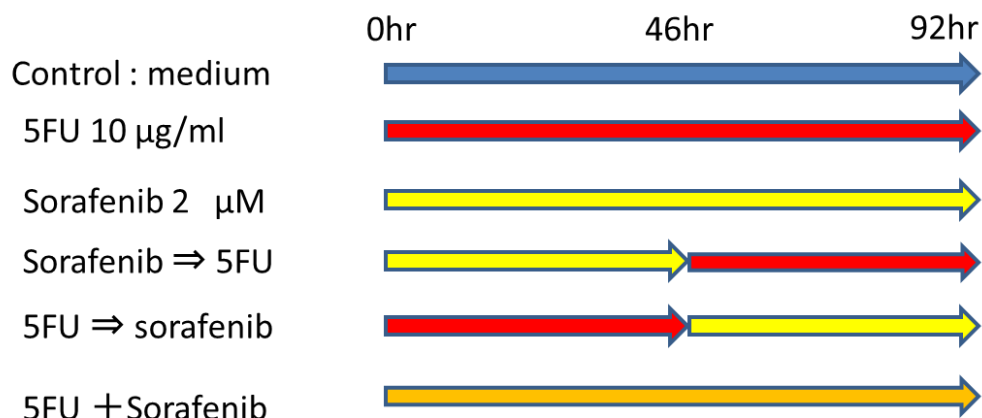
てソーティングし、純度が 90%以上あることを確認した。

### 3.4 増殖アッセイと抗がん剤感受性試験

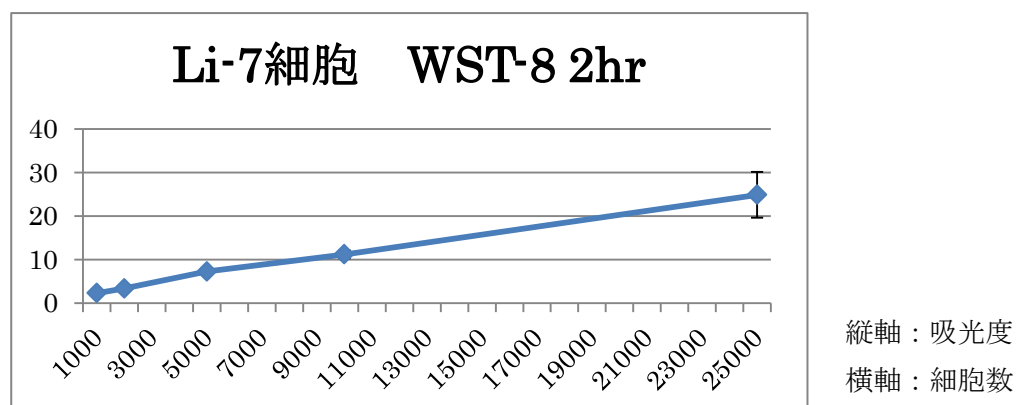
増殖アッセイでは、96 穴マイクロプレート各ウェルに  $3 \times 10^3$  個の細胞を直接ソーティングし、Cell Counting Ki-t-8 (同仁化学)を用いて、24、48、72、96 時間後に 2030 Multilabel Reader (ARVO X3; PerkinElmer, Waltham, MA) で 450nm 吸光度を測定した。5-FU とソラフェニブの感受性試験では、同様に細胞をソーティングし、翌日各濃度の薬剤を添加した培地に交換し、72 時間後の吸光度を測定した。ソラフェニブは DMSO で 10mM に溶解した後、培地で希釈して使用した。一方、各細胞株の Bulk の集団に関しては各ウェルに  $5 \times 10^3$  個ずつまき、翌日同様にソラフェニブ含有培地に交換し、72 時間後に吸光度を測定した。



ソラフェニブと 5-FU の併用あるいは逐次治療による効果をみるため、Bulk の Li-7 細胞を各ウェル  $3 \times 10^3$  個ずつ 96 穴プレートにまき、翌日培地交換した。コントロールとして新鮮な培地を入れ、その他 5-FU 10  $\mu\text{g/ml}$ 、ソラフェニブ 2  $\mu\text{M}$  を 2 群ずつ、あるいは 5-FU 10  $\mu\text{g/ml}$  とソラフェニブ 2  $\mu\text{M}$  をまぜた培地と交換して 46 時間培養した。その後 5-FU、ソラフェニブ 1 群ずつの培地をソラフェニブ、5-FU へそれぞれ交換しさらに 46 時間培養し、薬剤投与開始 92 時間後に WST-8 で Viability を評価した。



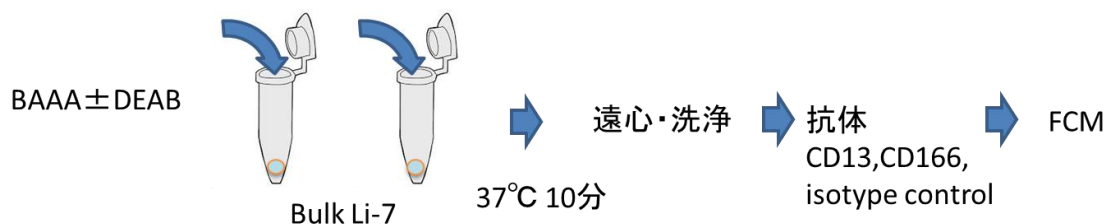
尚、Cell Counting Kit-8 で使用される WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する。このホルマザンの 450 nm の吸光度を直接測定することにより、生細胞数を計測することができる。以下のように細胞数と吸光度に比例関係があることを確認して実験に使用した。



### 3.5 アルデフローアッセイ

ALDEFLUOR (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)を細胞内の ALDH1 酵素活性の検出に用いた。本アッセイでは、ALDEFLUOR 試薬すなわち基質の BAAA (BODIPY-aminoacetaldehyde) が細胞内に取り込まれて、ALDH によって BAA (Bodipy<sup>TM</sup>-aminoacetate)に変換され、強い緑色の蛍光を発することを利用して、ALDH 活性の高い細胞を FCM で検出できる。5x10<sup>5</sup>細胞に対して、0.12 µg/ml の BAAA と陰性コントロ

ールには 15  $\mu$ M の diethylaminobenzaldehyde (DEAB)を添加し 37 度で 10 分間インキュベートした。その後遠心にて細胞を回収した後、蛍光標識した CD13 および CD166 抗体に反応させ、サンプルの活性が低下しないよう、最終的にアッセイ用のバッファーに懸濁して準備し、氷上で遮光し 30 分以内に FCM 解析を終了した。



尚、我々が使用した FACS Aria II には 5 つのレーザーが搭載されており、特に FITC と PE のコンペンセーションがほとんど不要であり、正確な多重染色の評価が可能である。本アッセイでは、yellow-green レーザーを用いて PE 標識 CD166 を、blue レーザーを用いて Aldefluor と 7-AAD を、そして red レーザーを用いて APC 標識 CD13 をそれぞれ検出し、FACS Aria II と FloJo ソフトウェア (Tomy Digital Biology, Tokyo, Japan) にて解析を行った。

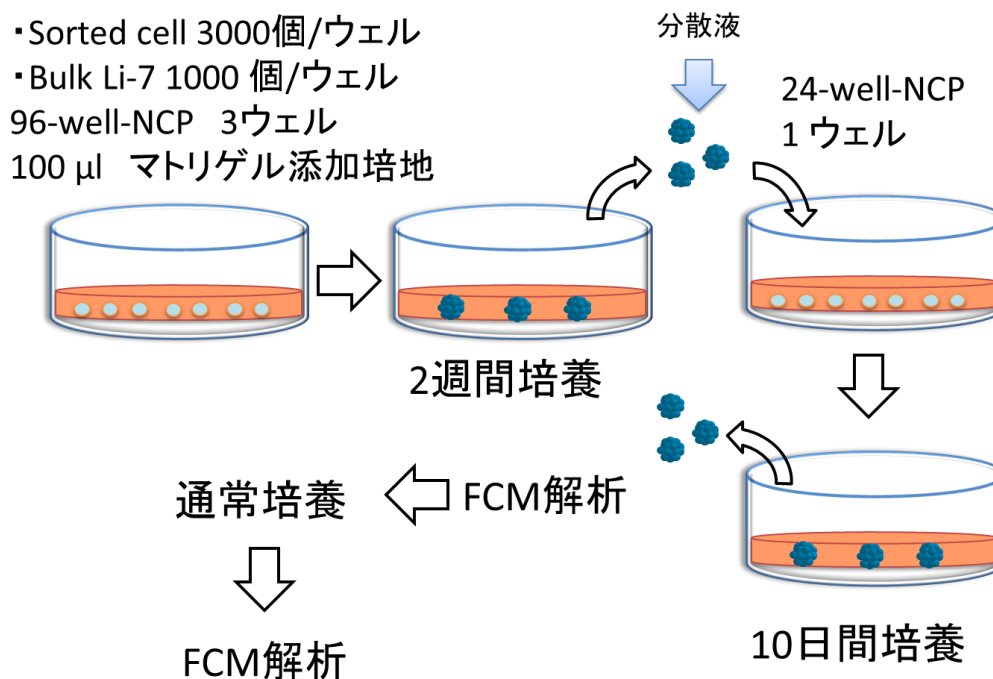
### 3.6 スフェロイドコロニーアッセイ

3x10<sup>3</sup> 個の細胞を 96 穴 Nanoculture plate (NCP)-MS (Scivax, Kawasaki, Kanagawa, Japan) にソーティングし、10%FBS-R (Scivax) を添加した 150  $\mu$ l の NanoCulture medium R type (Scivax) で培養した。培地は 3, 4 日毎に半分程度交換した。培養 20 日目に直径 100  $\mu$ m 以上のスフェロイドの数を、デジタルカメラ (DP25, Olympus, Tokyo, Japan) 付き顕微鏡下にイメージングソフトウェア (CellSens, Olympus) を用いて計測した。また、以下に示す方法に従い、FCM で解析も行った。

Bulk の Li-7 細胞 1000 個を 96 穴 NCP-MS の各ウェルに 3 ウェルまき、14 日後に形成されたスフェロイドコロニーを分離液 (Scivax) でシングルセルにした後、24 穴 NCP-MS1 ウェルにまき直し、24 日後に FCM で表面マーカー解析を行った。シングルセルにしたスフェロイ



ドコロニーの細胞は、通常培養条件に戻し、形態を観察しながら適宜 FCM で解析した。尚、本アッセイに使用した培地には、5%マトリゲルが添加されており、細胞の足場依存的な増殖がサポートされた。



### 3.7 蛍光染色

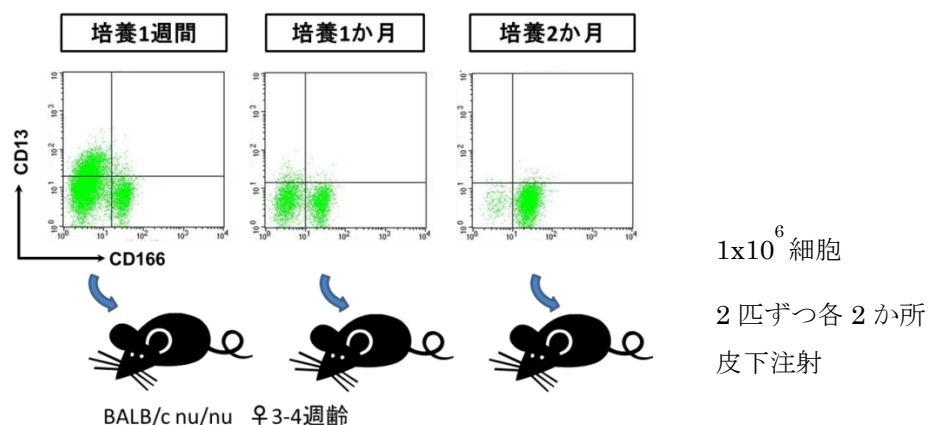
Li-7 細胞を  $1 \times 10^4$  個ずつチャンバースライド (LAB-TEK, Hatfield, PA) の各ウェルに 0.5ml の培地とともにまき、10 日間培養した後 4%ホルムアルデヒドで室温 15 分間固定した。その後抗ヒト CD166 マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences) と抗ヒト Ki-67 ラビットポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, MA) を  $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。二次抗体は Alexa Fluor 546 標識ゴート抗マウス IgG 抗体 (Life technologies, Carlsbad, CA) と Aldexa Fluor 488 標識ゴート抗ラビット IgG 抗体 (Life technologies) を室温で 1 時間反応させた。DAPI 含有マウンティング液を添加した後、カバースライドをかけて蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) とイメージングソフトウェア (cellSens, Olympus) で蛍光イメージの解析を行った。

### 3.8 マイクロアレイ遺伝子解析

Bulk の Li-7 細胞の CD166(-)細胞と CD166(+)細胞をソーティングし、RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて全 RNA を抽出した。吸光度計 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) で RNA サンプルの定量評価を行った後、添付文書に従い Cy3 ラベル化 cRNA を作成した。色素の量と cRNA 濃度を吸光度で測定した。1650 ng の Cy3 ラベル化 cRNA をマイクロアレイスライド (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 上のオリゴヌクレオチドに 65°C17 時間でハイブリダイゼーションした。スライドは Gene Expression Wash Buffer (Agilent Technologies) で洗浄し、Agilent Microarray Scanner でスキャンした。各ステップは手順書 (Agilent Technologies) に従い、データ解析は GeneSpring ソフトウェア (version 12.5, Agilent Technologies) で行った。解析は、東北メディカルメガバンク機構ゲノム多形機能解析分野檀上稲穂博士に依頼した。

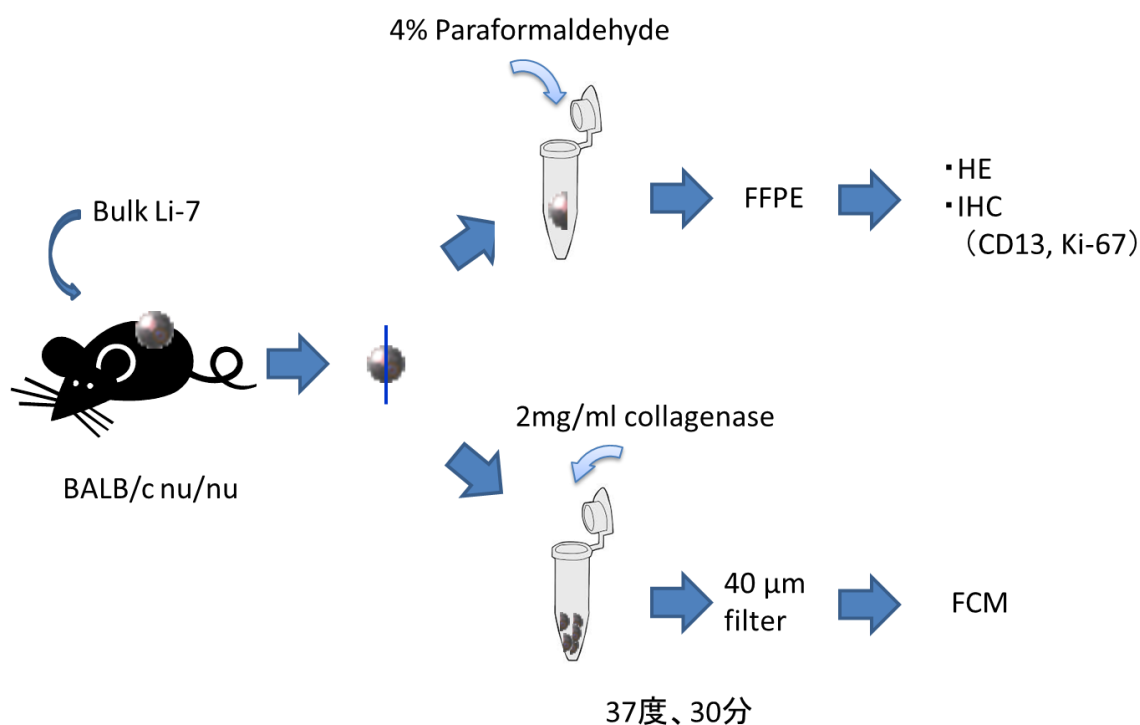
### 3.9 動物実験

日本 CLEA (Tokyo, Japan) より 3~4 週齢の雌 BALB/c nu/nu マウスを購入した。継代回数異なる  $1 \times 10^6$  個の Bulk の Li-7 細胞を 0.1ml の培地に懸濁し、各マウス 2 か所ずつ計 4 か所に皮下注射した。皮下注射は実験動物センターで職務経験 10 年以上の技官によって行われた。マウスは腫瘍形成を確認した後、あるいは皮下注射後 4 か月で sacrifice した。動物実験は、理研 BRC の動物実験実施規定に従って行い(承認番号:実 14-003)、飼育は SPF (Specific Pathogen Free) 管理下で、実験後にマウスに感染症がないことを PCR レベルで確認した。



### 3.10 移植腫瘍の免疫組織化学およびフローサイトメトリー

Bulk の Li-7 細胞より形成した腫瘍片の半分を用いて、4%ホルムアルデヒドで固定した後パラフィン埋没標本を作成した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と併せて、抗ヒト CD13 マウスモノクローナル抗体 (eBioscience、1:1000、proK) と抗ヒト Ki-67 ラビットポリクローナル抗体 (DAKO、1:200、TE/105℃) を用いて免疫組織化学的検討を行った。本検討は、つくばヒト組織診断センターの TRRC (Translational Research and Resource core) に依頼して実施した。



残りの腫瘍片は、細断後に 2mg/ml コラゲナーゼ含有 5%FBS 添加 RPMI 培地で 37 度、30 分間インキュベートした。ピペッティングした後、40 μm の cell strainer (BD Biosciences, Bedford, MA) に通して、抗体と反応させた。死細胞やダブレットの細胞は上記方法にて除去した。

### 3.11 統計解析

腫瘍形成能の比較に関しては Fisher の正確検定を、spheroid 形成能と薬剤感受性の比較に関しては t 検定を行い、p 値 0.05 未満を有意とした。解析には統計解析ソフトウェア SPSS statistics 22.0 (IBM Japan、Tokyo) を用いた。

## 第 4 章 結果

### 4.1 肝細胞癌細胞株における Population switch

癌幹細胞ヒエラルキーを保持した肝細胞癌細胞株を同定するために、我々は様々な肝細胞癌細胞株の細胞表面マーカーの発現における変化を、FCM にてスクリーニングした。培養初期の各細胞株のマーカーの発現パターンを示す (図 5)

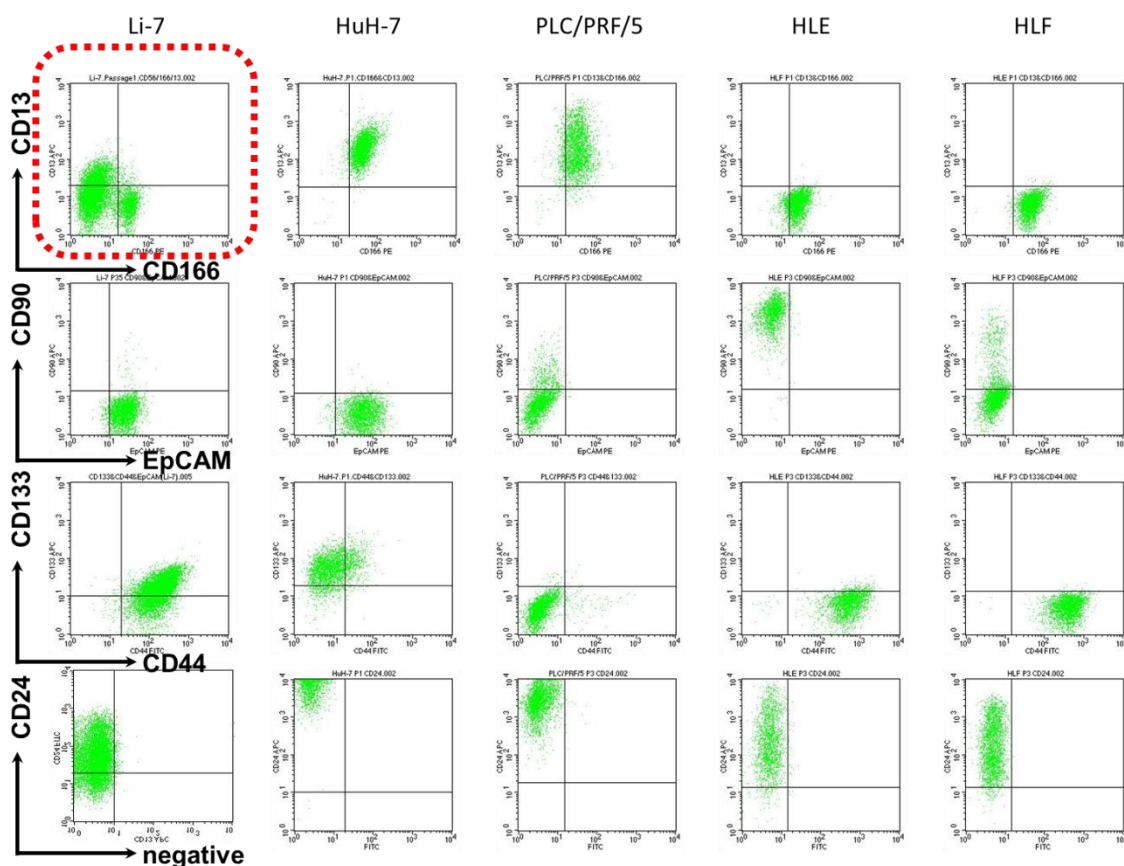


図 5 培養 1 週間の肝細胞癌細胞株における各種 CSC マーカの発現

表5 2 か月間培養前後における肝細胞癌細胞株の癌幹細胞マーカーの発現の変化

	Li-7		HuH-7		PLC/PRF/5		HLF		HLE	
	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
<b>CD133</b>	+	+	++	++	-	-	-	-	-	-
<b>EpCAM</b>	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
<b>CD90</b>	-	-	-	-	+-	+-	+-	+-	++	++
<b>CD24</b>	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++
<b>CD44</b>	++	++	+	+	+-	+-	++	++	++	++
<b>CD13</b>	+	-	++	++	++	++	-	-	-	-
<b>CD166</b>	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++

前 培養 1 週間、後 培養 2 か月、- 5%未満、+- 5~30%、+ 30~70%、++ 70%以上

HuH-7、Li-7、PLC/PRF/5、HLF および HLE の肝細胞癌細胞株を 2 か月間培養した前後で、癌幹細胞マーカーの CD13、EpCAM、CD133、CD44、CD90、CD24 および CD166 を FCM で評価した。Li-7 細胞のみ明白な Population switch を呈し、この細胞集団の CD13 陽性細胞の割合が減少し、代って CD166 陽性細胞の割合が増加していることが明らかとなった（表 5）。これらのマーカーを継代毎に FCM で解析し、この変化を再確認したところ、CD13 陽性 CD166 陰性細胞は 1 か月の培養期間で消失した。一方で、CD13 陰性 CD166 陽性細胞は徐々に割合が増加し、約 2 か月後には Bulk の Li-7 細胞をほとんど占めるほどとなった（図 4 a）。この傾向は繰り返し確認された。我々は 2 か月間の培養による変化が、細胞の凍結保存後に戻るのかを評価した。細胞集団の割合は凍結・融解後にも変化せず、短期間の培養によってもたらされた変化が不可逆的であることが示された。表面マーカーの変化とともに、Li-7 細胞の形態にも変化が観察された。培養初期には類円形の細胞集塊がみられたが、培養とともに

徐々に減少していき、2 か月後にはほとんど認められなくなった (図 4 b)。こうした形態の変化も Li-7 細胞において Population switch が生じていることを支持するデータであった。

我々は、継代培養前後において Li-7 細胞の腫瘍形成能を比較評価した。1 週間培養した Li-7 細胞には CD13 陽性 CD166 陰性細胞が 20%程度含まれていたが、これをヌードマウスに 4 か所皮下注射したところ、すべての部位に腫瘍形成を認めた (4/4 ; 図 6 c、表 6)。一か月間培養した Li-7 細胞には CD13 陽性 CD166 陰性細胞は含まれず、CD13 陰性 CD166 陰性細胞と CD13 陰性 CD166 陽性細胞のみが含まれ、これらを皮下注射すると 2 か月で 1 か所のみで腫瘍形成を認めた (1/4)。一方、2 か月間培養した Li-7 細胞はほとんどが CD13 陰性 CD166 陽性細胞のみとなっており、これらを皮下注射して 4 か月経過しても腫瘍形成は認められなかった (0/4、図 6 c、表 6)。従って、Li-7 細胞は培養することで Population switch が生じ、ヌードマウスにおける腫瘍形成能が継代培養とともに低下していくことが示された。

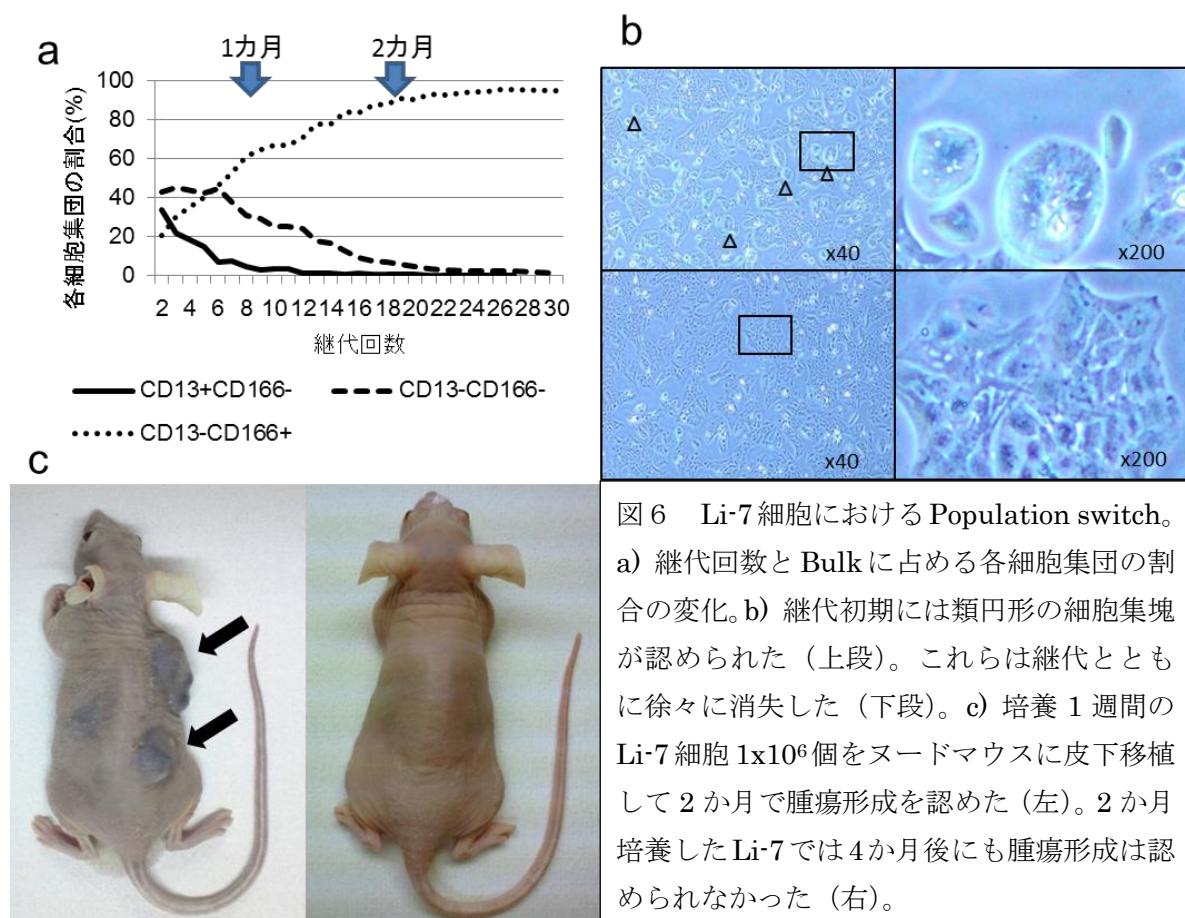


図 6 Li-7 細胞における Population switch。a) 継代回数と Bulk に占める各細胞集団の割合の変化。b) 継代初期には類円形の細胞集塊が認められた (上段)。これらは継代とともに徐々に消失した (下段)。c) 培養 1 週間の Li-7 細胞  $1 \times 10^6$  個をヌードマウスに皮下移植して 2 か月で腫瘍形成を認めた (左)。2 か月培養した Li-7 では 4 か月後にも腫瘍形成は認められなかった (右)。

表 6 培養期間に従って消失する Li-7 細胞の腫瘍形成能

培養期間		腫瘍形成能
1 週間	(CD13 陽性 CD166 陰性細胞を含む)	4/4
1 か月	(CD13 陰性 CD166 陰性/陽性細胞)	1/4
2 か月	(CD13 陰性 CD166 陽性細胞)	0/4

\*  $p < 0.05$

#### 4.2 *in vitro* における Li-7 細胞のヒエラルキー

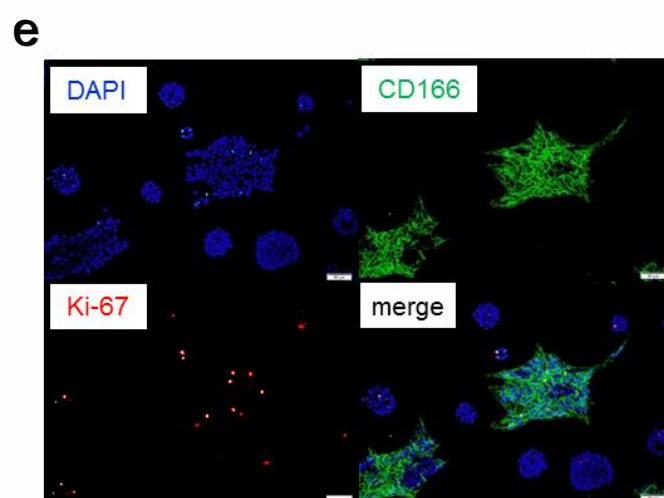
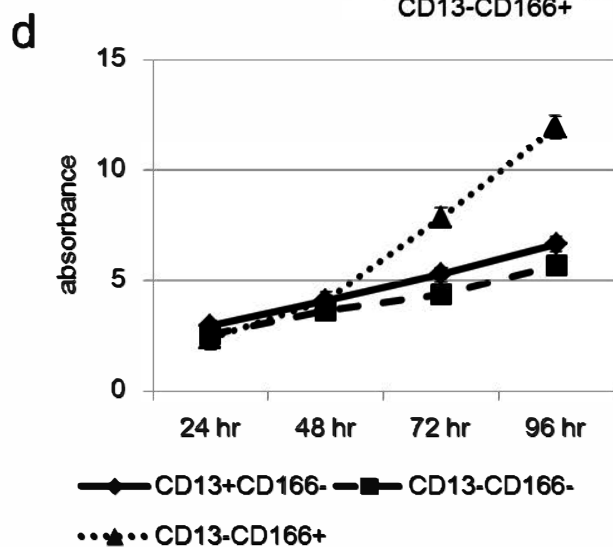
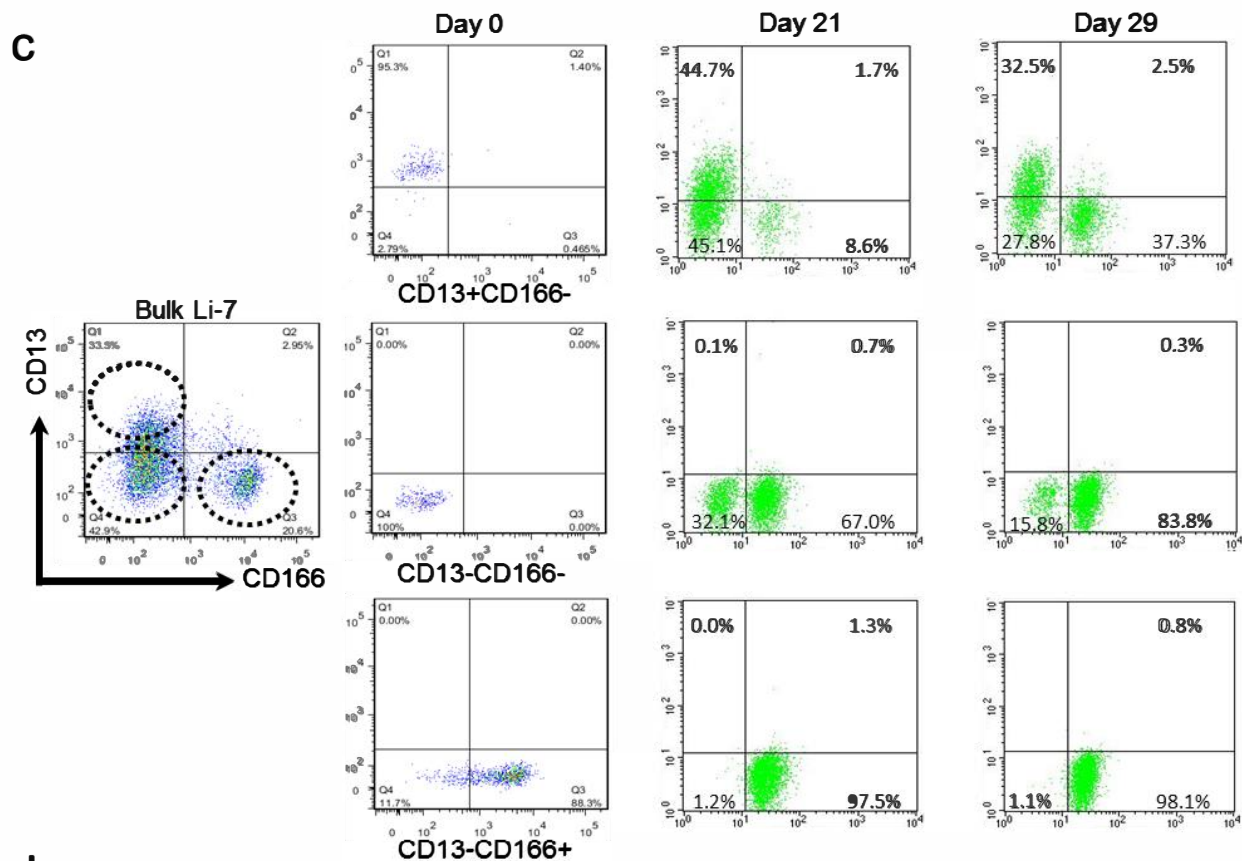
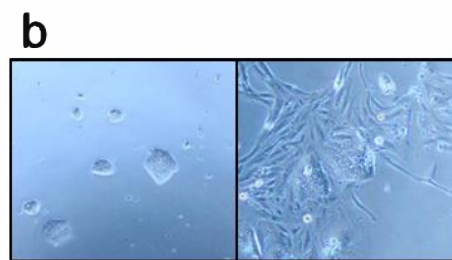
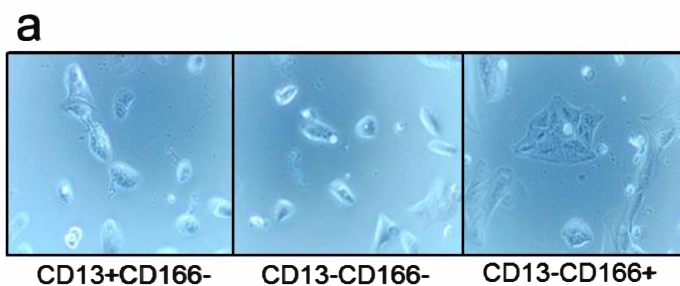
我々は引き続いて、Li-7 細胞の CD13 陽性 CD166 陰性細胞が癌幹細胞として、また CD13 陰性 CD166 陽性細胞が前駆細胞として、階層性を有した不均一な集団から構成されるかを検討した。表面マーカーの発現パターンから 3 つの細胞集団に FACS で分離し、それらの細胞集団が他の細胞集団を再構築できるかを解析した。CD13 陽性 CD166 陰性細胞のほとんどが類円形の細胞集塊として増殖したが、これは培養初期の Bulk の Li-7 に含まれる細胞に類似していた (図 7 a)。その細胞集塊は細胞数が増加してくると、ディッシュに広がるように伸展し形態を変えた (図 7 b)。そして、CD13 陽性 CD166 陰性細胞は 3 週間以内に CD13 陰性 CD166 陰性細胞を構成した。ソーティングして 1 か月間の培養により、CD13 陰性 CD166 陽性細胞の割合はおよそ 40%までに増加した。また、発現マーカーの変化とともに、類円形の細胞集塊は徐々に数を減らしていった。一方で、CD13 陰性 CD166 陰性細胞は CD13 陰性 CD166 陽性細胞を構成したが、CD13 陽性 CD166 陰性細胞は構成しなかった。CD13 陰性 CD166 陽性細胞は、1 か月の培養期間で他の細胞集団を再構成できなかった (図 7 c)。これらの結果から、CD13 陽性 CD166 陰性細胞のみが全ての Li-7 細胞集団を再構成することが可能であり、従ってこの集団が Li-7 細胞の階層性において他の集団よりも上位に位置すると結論を得た。

Li-7 細胞集団を培養していく中で、我々は CD13 陰性 CD166 陽性細胞が CD166 陰性集団

よりも早く増殖することに気が付いた。これを確かめるため、各 Li-7 細胞集団の増殖能を比較した。CD13 陰性 CD166 陽性細胞は CD166 陰性細胞よりも顕著に増殖が速く、CD13 陽性 CD166 陰性細胞はソーティング後 96 時間までは CD13 陰性 CD166 陰性細胞と同程度に増殖が遅いことが示された (図 7 d)。分離した細胞集団における増殖能が Bulk の細胞集団においても同様であるのかを検討するため、Bulk の Li-7 細胞を希釈してまき、各細胞コロニーが離れて増殖するようにして増殖マーカーである Ki-67 の発現を調べた。Ki-67 は主に CD166 陽性のコロニーに発現しており、この細胞集団が Li-7 細胞株において増殖の速い前駆細胞であることが確認された (図 7 e)。

図 7 (次頁) CD13 陽性 CD166 陰性細胞からの Li-7 細胞の再構成 a)ソーティング 72 時間後の各細胞集団の形態。CD13 陽性 CD166 陰性細胞 (左) と CD13 陰性 CD166 陰性細胞 (中央) は、ともに類円形の形態を呈しているのに対し、CD13 陰性 CD166 陽性細胞 (右) は接着して広がった形態を呈する。b)CD13 陽性 CD166 陰性細胞の培養中の形態変化。CD166 陽性細胞と同様な細胞へ形態が変化する。c)各細胞集団の培養経過による表面マーカーの推移。CD13 陽性 CD166 陰性細胞のみが Li-7 細胞を再構成した (上段)。CD13 陰性 CD166 陽性細胞はその他の細胞集団を構成することはなかった (下段)。d)各細胞集団の増殖能。CD13 陰性 CD166 陽性細胞の増殖が顕著に早く、CD166 陰性細胞は CD13 陽性・陰性どちらの細胞もソーティングして 96 時間までは同等に増殖が遅かった。e)Bulk の培養条件において、Ki-67 発現細胞 (赤) は CD166 陽性細胞 (緑) のコロニーに多く認められる。(青 : DAPI)

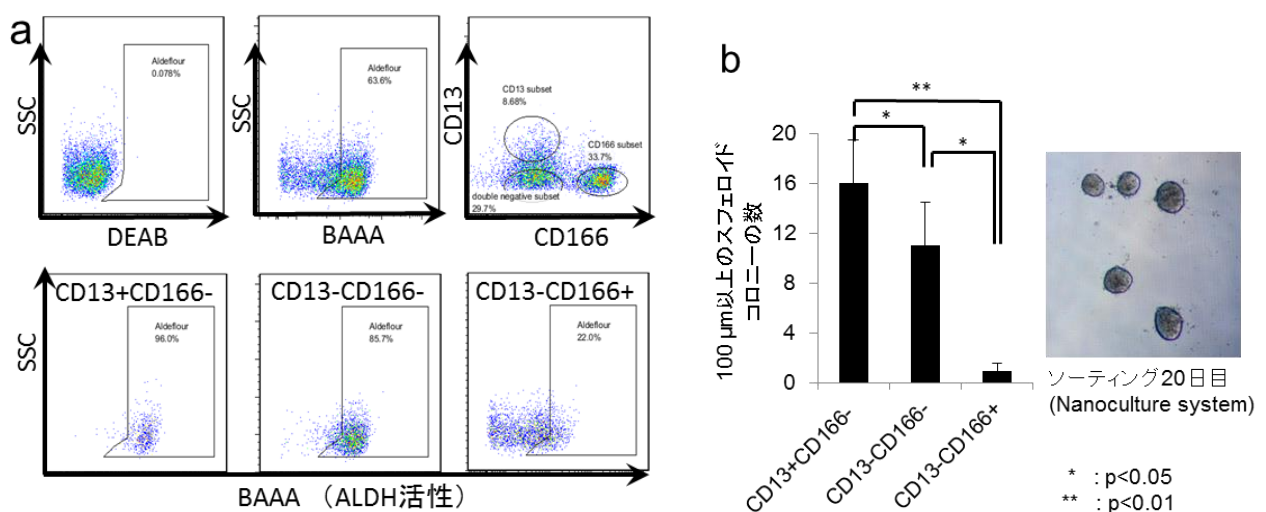




### 4.3 Li-7 細胞の機能的階層性

Li-7 細胞における機能的な階層性を評価するため、Aldefluor アッセイと同時に CD13 と CD166 の二重染色を併せて行った。すると、CD13 陽性 CD166 陰性細胞のほとんど (96%) の細胞が ALDH 活性を示した (図 8 a)。CD13 陰性 CD166 陰性細胞の多く (85.7%) の細胞も ALDH 活性を示した。その一方で、CD13 陰性 CD166 陽性細胞の 22%のみが ALDH 活性を示した (図 8 a)。このことから、CD13 陽性 CD166 陰性細胞は癌幹細胞の重要な特性の一つ[文献 17]を有していることが示された。

次に、癌幹細胞の別の特徴であるスフェロイド形成能[文献 21]に関して Li-7 細胞を評価した。CD13 陽性 CD166 陰性細胞は CD13 陰性 CD166 陰性細胞よりも多くの、大きなスフェロイドコロニーを形成した。CD13 陰性 CD166 陽性細胞はこれら 3 つの細胞集団の中で、最もスフェロイドコロニー形成能が低かった (図 8 b)。我々は、Bulk の Li-7 細胞のスフェロイド形成能が Population switch 後に低下することも確認した。興味深いことに、Bulk の Li-7 細胞から形成されるスフェロイドコロニーは CD166 ではなく CD13 を発現していた (図 9)。CD13 陽性 CD166 陰性細胞、さらには CD13 陰性 CD166 陰性細胞から形成したスフェロイドでさえ、ほとんどの細胞が CD13 を発現していたが、通常培養条件に戻すと CD13 の発現は低下した (図 10)。



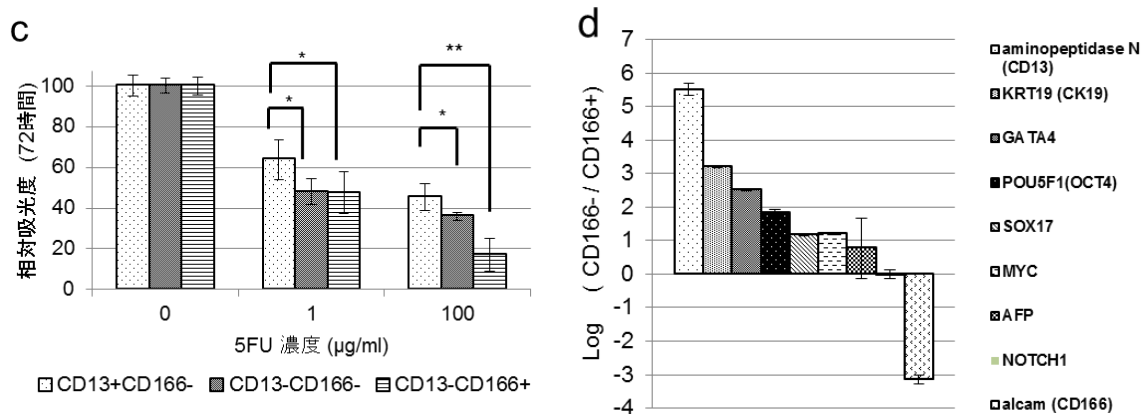


図8 in vitro における Li-7 細胞の機能的階層性。a) ALDEFLUOR アッセイと CD13・CD166 発現解析。CD13 陽性 CD166 陰性細胞（下左）が最も ALDH 活性が高い。b) スフェロイドコロニーアッセイ。CD13 陽性 CD166 陰性細胞が最もスフェロイド形成能が高い。c) 5-FU 感受性試験。CD13 陽性 CD166 陰性細胞が最も 5-FU に抵抗性である。d) マイクロアレイ遺伝子解析。CD166 陰性細胞で Stemness 関連遺伝子発現が高い。

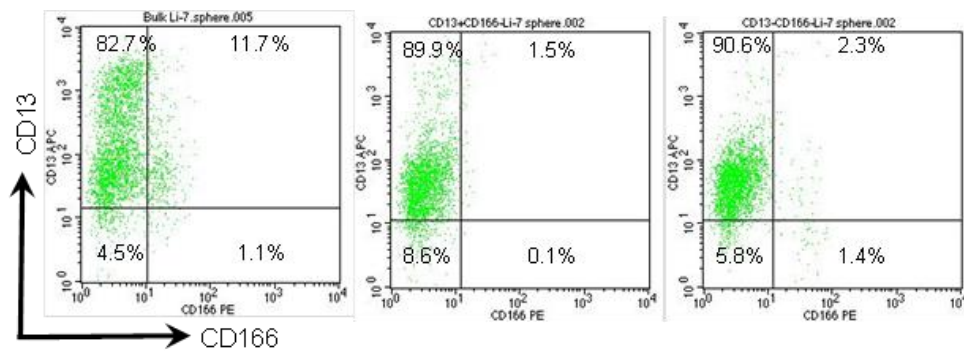


図9 スフェロイドコロニーにおける CD13 と CD166 発現。Bulk の Li-7 細胞のスフェロイドの細胞の多くが CD13 を発現していた（左）。CD13 陽性 CD166 陰性細胞のスフェロイドにおいて、Population switch は起きずに CD13 発現が維持されていた（中央）。CD13 陰性 CD166 陰性細胞のスフェロイドでは、CD13 の発現が認められた（右）。

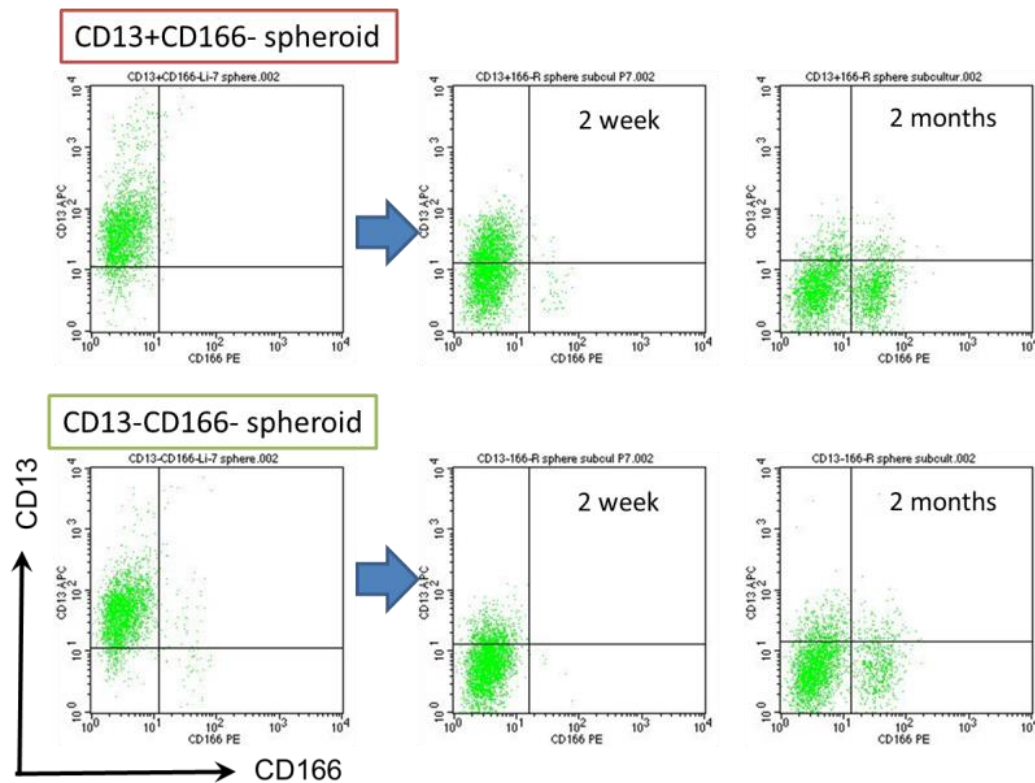


図 1 0 スフェロイド細胞を通常培養条件に戻した後の Population switch。CD13 陽性 CD166 陰性細胞（上段）および CD13 陰性 CD166 陰性細胞（下段）のスフェロイドは、通常培養条件に戻すと、CD13 の発現が低下し、CD166 の発現が増加する。

続いて、Li-7 細胞の 5-FU への感受性を評価したところ、CD13 陰性 CD166 陽性細胞の増殖がより積極的に抑制され、CD13 陽性 CD166 陰性細胞は最も影響されなかった（図 6 c）。我々はまた、Population switch 後に Li-7 細胞が相対的に 5-FU へ感受性となることも確認した。

最後に、CD166 陰性細胞と CD166 陽性細胞における Stemness 関連遺伝子の発現をマイクロアレイ解析で比較した。解析結果から、*OCT4*、*SOX17*、*MYC* といった Stemness 関連遺伝子は CD166 陽性細胞よりも CD166 陰性細胞において高発現であることが示された（図 8 d）。さらに、肝細胞癌で未分化マーカーとされる *KRT19* の mRNA レベルも CD166 陽性細胞よりも CD166 陰性細胞において高いことが示された。

#### 4.4 *in vivo*におけるCD13発現

CD13が*in vitro*においては、Li-7細胞の癌幹細胞集団に発現していることが示されたが、*in vivo*においても増殖の遅い癌幹細胞のマーカーとして働いているのかについて検討を行った。初めに、BulkのLi-7細胞をヌードマウスに移植して形成された腫瘍組織を用いてFCMによる表面マーカー解析を行った。CD13とEpCAM、CD133あるいはCD24の二重染色により、これらの他の癌幹細胞マーカーがCD13と共発現していることが示された(図1 1 a)。*in vitro*ではEpCAM、CD133、CD24あるいはCD44はLi-7細胞の3つの細胞集団全てに発現がみられるものの(図1 2)、興味深いことにこれらの他の癌幹細胞マーカーは*in vivo*においてはCD13を発現した非常にわずかな細胞集団においてのみ発現が認められた。これらのデータは、*in vitro*と*in vivo*では癌幹細胞マーカーの発現パターンが異なることを示しているが、Li-7細胞においてはCD13が*in vitro*、*in vivo*ともに癌幹細胞マーカーとして機能していることを示唆している。

同じ移植腫瘍片を用いてCD13とKi-67の発現細胞の分布を免疫組織化学的な解析を行った。CD13はわずかな細胞に発現しており、分裂像を呈する細胞には認められなかった(図1 1 b)。また、腫瘍血管近傍にCD13陽性が限局性に集積しており、ヘマトキシリン・エオジン染色では同部位に、核クロマチンが凝集した核/細胞質比の大きな、小型の細胞が多数認められた(図1 1 c)。そして、同部位ではKi-67の発現が低い傾向にあった。これらの結果から、CD13は*in vivo*においても、形態的に未分化な増殖の遅い癌幹細胞に発現していることが推察された。



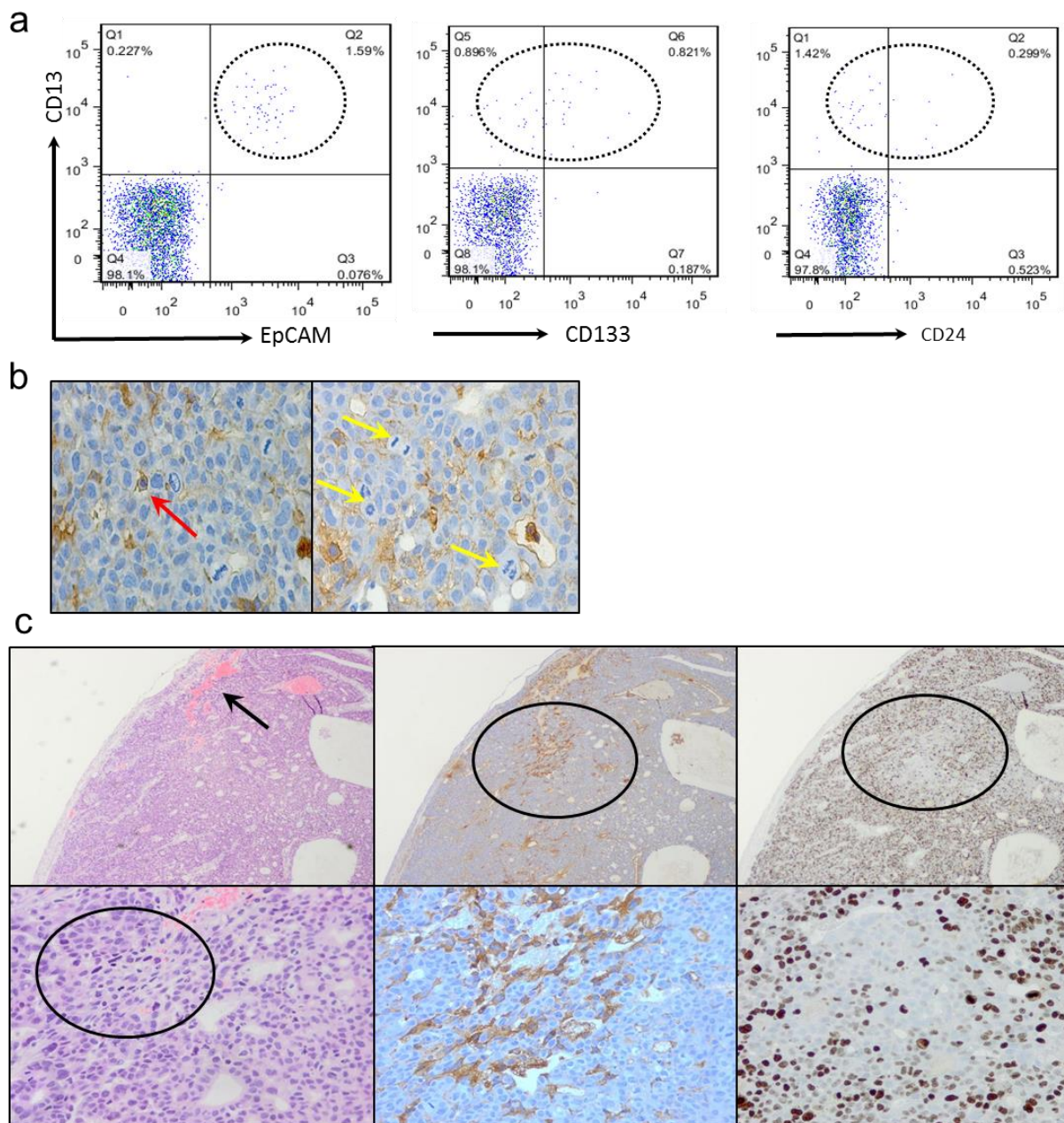


図 1 1 in vivo における CD13 発現。a) CD13 と EpCAM (左)、CD133 (中央)、CD44 (右) の二重染色による FCM。数%の細胞が CD13 を発現し、他の CSC マーカーは CD13 陽性細胞のみに発現を認める。b) CD13 免疫組織染色で、細胞分裂 (黄色矢印) を伴わない、一部の細胞に CD13 の発現を認める (赤矢印)。c) 腫瘍血管 (黒矢印) 近傍における CD13 陽性細胞の集簇 (中央)。同部位では Ki-67 の発現が弱く (右)、HE (左) で核クロマチンが凝集した N/C 比の高い小型の細胞を多数認める。

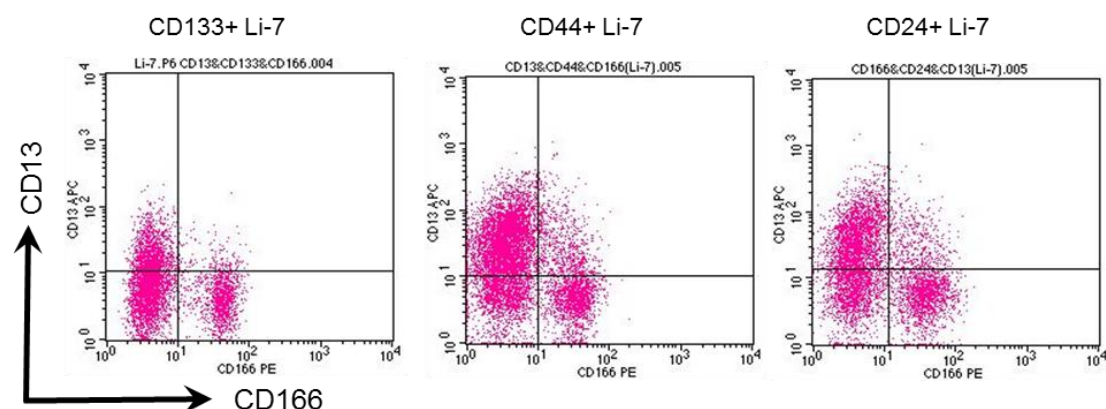
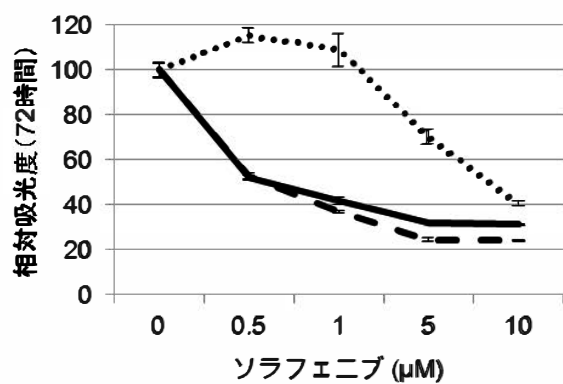


図 1 2 *in vitro*における CD13・CD166 発現と他の CSC マーカーの三重染色による FCM 解析。CD133 (左)、CD44 (中央)、CD24 (右) を発現する細胞はいずれも、CD13 陽性 CD166 陰性細胞以外の細胞集団に発現が認められる。

#### 4.5 ソラフェニブと 5-FU の治療効果

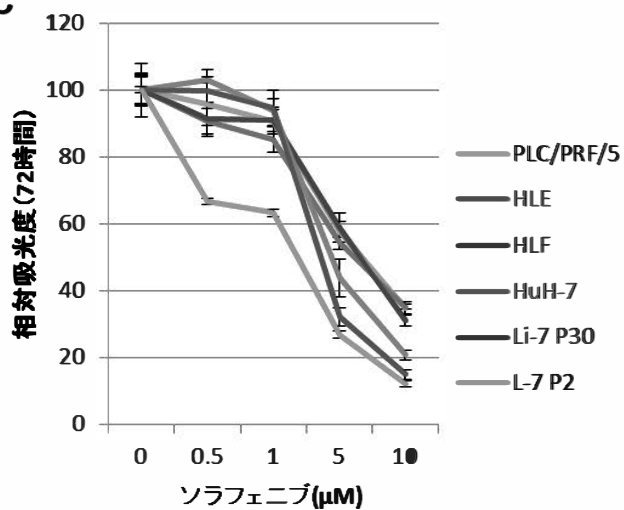
続いて、Li-7 の各細胞集団におけるソラフェニブの効果を検証した。ソラフェニブは CD166 陰性細胞の増殖を選別的に抑制した (図 1 3 a)。さらに、Bulk の Li-7 細胞にソラフェニブ 5  $\mu$ M で 72 時間処理すると、CD166 陽性細胞のみが生存しており、ソラフェニブが CD166 陰性細胞を標的としていることが示された (図 1 3 b)。Li-7 細胞株は、CD166 発現の高い他の細胞株 (HLE、HLF、PLF/PRF/5、HuH-7) に比べソラフェニブに感受性が高かった (図 1 3 c,d)。このことから、CD166 がソラフェニブ抵抗性に関わるマーカーであることが推測された。CD13 陽性 CD166 陰性細胞と CD13 陰性 CD166 陰性細胞は、ソラフェニブに同等の感受性を示した。そこで、CD166 陰性細胞と CD166 陽性細胞において、ソラフェニブの標的遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較した。*BRAF*を除き、*VEGFR*、*PDGFR*、*Flt-3*を含むソラフェニブの標的遺伝子は CD166 陰性細胞において発現が高かった。臨床的にソラフェニブの奏功例にのみ増幅が認められる *FGF3*と *FGF4*も[文献 22]、CD166 陰性細胞において顕著に発現レベルが高いことが示された (図 1 3 e)。これらのデータは、ソラフェニブが CD13 陽性 CD166 陰性癌幹細胞を含む CD166 陰性細胞を標的としていることを支持している。

a

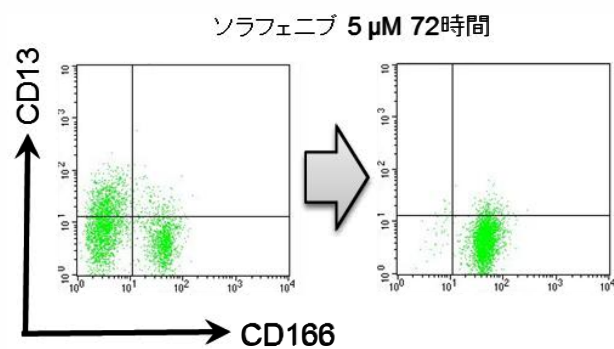


— CD13+CD166-    - - - CD13-CD166-  
 ..... CD13-CD166+

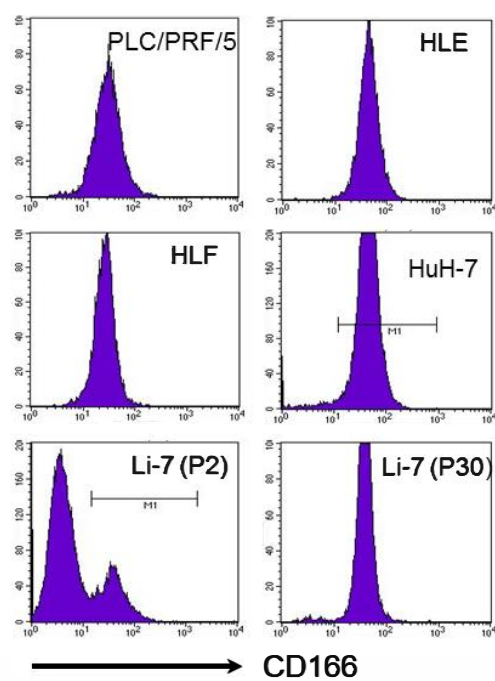
c



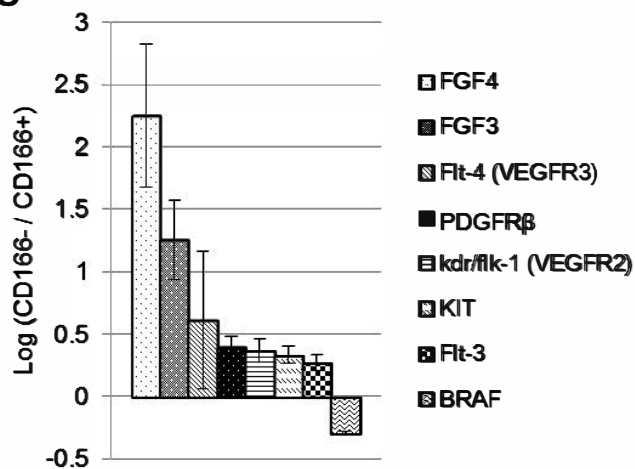
b



d



e



f

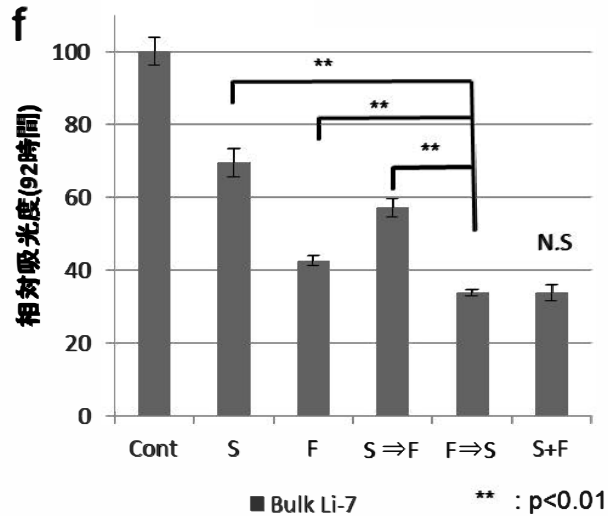




図 1 3 (前頁) ソラフェニブの標的細胞集団。a)各細胞集団におけるソラフェニブ 72 時間処理後の増殖抑制効果。低濃度から CD166 陰性細胞の増殖が選択的に抑制される。b) Bulk の Li-7 細胞をソラフェニブ 5  $\mu$ M、72 時間処理後の生存細胞の FCM 解析。CD166 陰性細胞に対して選択的な殺細胞効果が認められる。c)各細胞株のソラフェニブへの感受性。Population switch 前の Li-7 (P2) は最もソラフェニブに感受性が高い。d)各細胞株における CD166 発現。ソラフェニブ抵抗性の細胞株は CD166 発現が高い。e)Li-7 細胞の CD166 陰性細胞においてソラフェニブ標的遺伝子と FGF3/4 の発現が高い。f) 5-FU に引き続くソラフェニブの逐次治療 (F $\Rightarrow$ S) は両剤併用と同等に、単剤もしくは逆の順番による逐次治療よりも、強力に Li-7 細胞の増殖を抑える。

ソラフェニブとは対照的に、5-FU は CD166 陽性細胞の増殖を積極的に抑制していた (図 6 c)。即ち、ソラフェニブと 5-FU の標的細胞集団が異なるため (図 1 4)、この両剤を併用することにより、さらに効果が強まるかを検証した。その結果、5-FU に引き続くソラフェニブの投与は Bulk の Li-7 細胞の増殖を単剤よりも効果的に抑制した。その上、この投与順は逆のソラフェニブに引き続く 5-FU よりも効果的であった (図 1 3 f)。

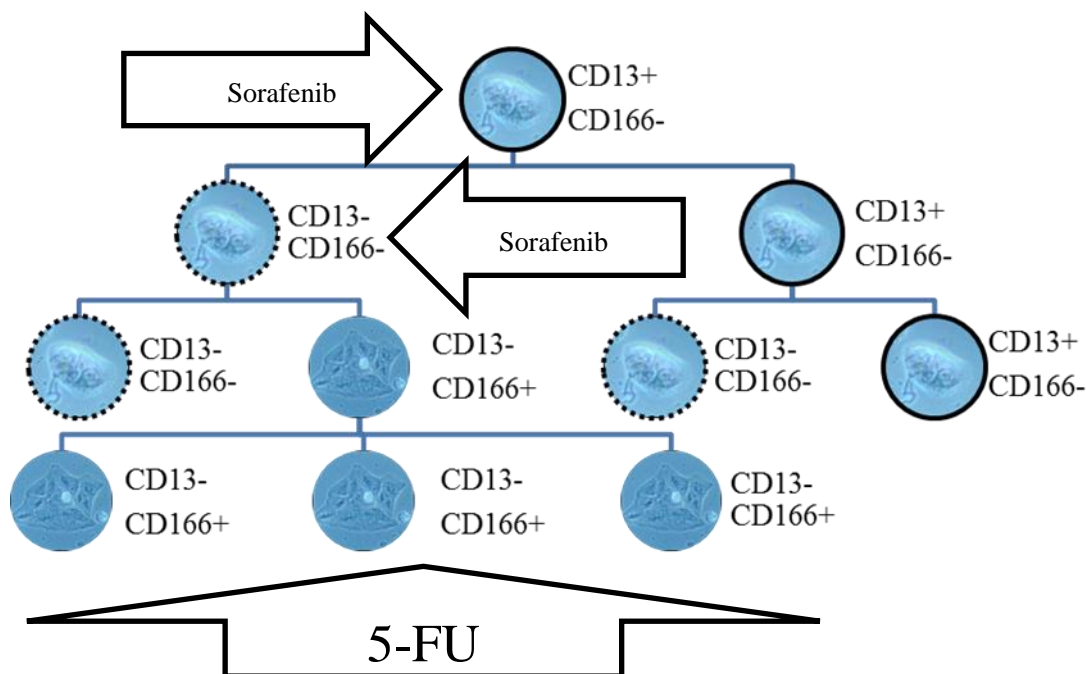


図 1 4 癌幹細胞階層性を標的とした薬剤選択

## 第5章 考察

### 5.1 本研究で明らかとしたこと

我々は様々な肝細胞癌細胞株の中から、Li-7 細胞が培養経過で癌幹細胞から非癌幹細胞へと Population switch を来すことを明らかとした（図 6、表 5）。我々の知る限り、癌細胞株が培養経過で Population switch を来すことを示したのは、これが初めてである。そして、Li-7 細胞が階層的に不均一な集団から構成され、CD13 陽性 CD166 陰性細胞が増殖の遅い癌幹細胞として、また CD13 陰性 CD166 陽性細胞が分化した増殖の速い前駆細胞として機能することを明らかとした（図 7 d,e、図 1 4）。さらに、ソラフェニブと 5-FU がそれぞれ癌幹細胞と非癌幹細胞集団をより積極的に標的としていることを示した（図 8 c、1 3 a）。そして 5-FU に引き続くソラフェニブ投与がこの肝細胞癌細胞株に対して強力な増殖抑制効果をもつことを示した（図 1 3 f）。

即ち、Li-7 細胞株は *in vitro* において、癌幹細胞による階層性を保持しており、癌幹細胞を標的とする薬剤の候補を検証し、肝細胞癌の新たな治療手段の構築に適している細胞株であることが明らかとなった。そして、癌幹細胞分化のメカニズムや抗癌剤耐性を研究することに価値のあるモデルであると考えられる。

### 5.2 細胞株の Population switch

誤認やマイコプラズマ感染、クロスコンタミネーションがなければ一般的には、細胞株は樹立されてから長期間経っても、その特性を安定して維持するものと信じられていた。しかしながら、我々の Population switch の結果からは、少なくともある種の細胞株においてはその特性が変化し得ることが示された。驚くべきことに、ほんの数か月間の培養によって Li-7 細胞の細胞表面マーカーの発現は変化した（図 6）。癌幹細胞から非癌幹細胞へ分化し（図 7 a-c）、それらの増殖速度が異なること（図 7 d,e）が Population switch の原因であると考えられた。

Li-7 細胞がこのような特性をもつ理由の一つとして、この細胞株がもともとはヌードマウス移植片として樹立され、しばらくの間継代されていたことがあげられる[文献 24]。従って、数十年前に *in vitro* で樹立され、よりクローナルな細胞集団から成るその他の細胞株と比べ[文献 25-27]、Li-7 細胞は不均一、あるいは *in vitro* の細胞株としては『未熟』であるかもしれない。我々は、最も有名な肝芽腫の細胞株の一つである HepG2 細胞株においても、培養経過で CD13 の割合が減少し CD133 の割合が増加することを見出した (図 1 5)。このことは、HepG2 の CD133 の発現が 0.2~41%と報告によって異なる [文献 2,12,29-31]原因かもしれない。

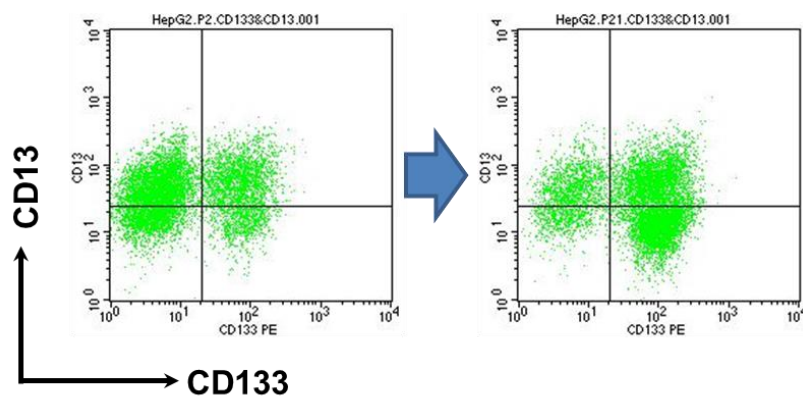


図 1 5 HepG2 細胞は培養経過で CD13 が低下し CD133 が増加する

Li-7 とは対照的に、HuH-7 などの細胞は 10 か月間培養しても安定して集団を維持した (図 1 6)。これらの細胞株で Population switch が認められなかった原因として、すでに Population switch が生じた後のクローナルな集団であるか、もしくはなんらかの理由で癌幹細胞の分化が抑制されている可能性が考えられる。あるいは、今回の研究で使用した表面マーカーでは検出できなかった変化を来している可能性も考えられる。

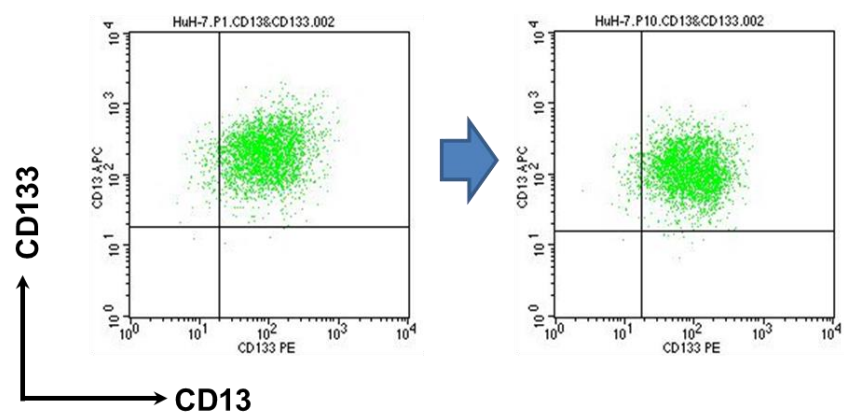


図 1 6 HuH-7 は 10 か月間培養してもマーカー発現に変化がなかった

癌細胞株における癌幹細胞マーカーの発現に関しては、培養条件も関与してくる。例えば、大腸癌細胞株では Confluency 依存的に CD26 の発現が増加することが報告されている[文献 32]。一方、我々は半浮遊細胞である大腸癌細胞株 COLO205 細胞を用いて、浮遊細胞のみを継代していくと CD133 陰性 CD44 強陽性の細胞が選択的に培養されることを見出した (図 1 7)。Population switch を来す細胞株と、安定した細胞株の間で何が根本的に異なるのかについてはさらなる研究が必要である。

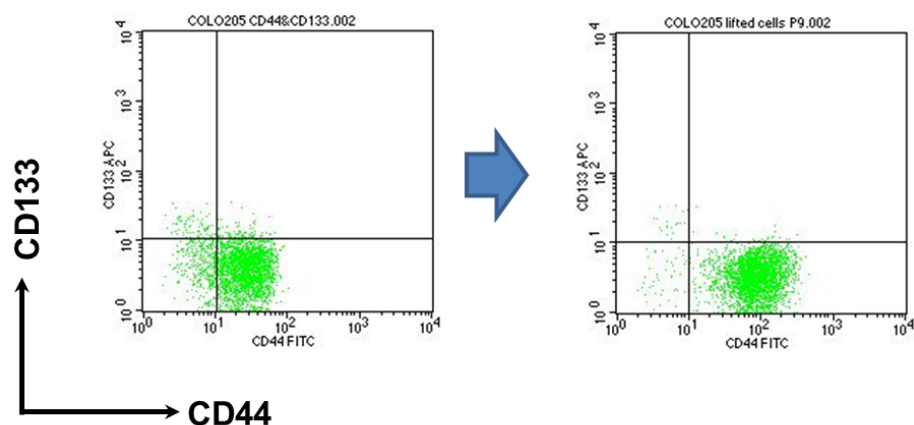


図 1 7 COLO205 細胞株の培養条件による CD133 と CD44 の発現の変化。左：培養初期。右：浮遊細胞のみを継代すると CD133 陰性 CD44 陽性細胞が選択的に培養される。

### 5.3 肝細胞癌の癌幹細胞マーカー

CD13 は肝細胞癌の亜静止期の癌幹細胞マーカーとして Haraguchi らによって報告された [文献 18]。CD13 (アミノペプチダーゼ N) 阻害剤であるベスタチンは国内では急性非リンパ性白血病の維持療法に保険適応されているが、彼らは *in vitro* および *in vivo* において癌幹細胞を標的とするベスタチンの可能性を示している。また、Martin-Padura らは、マウス移植腫瘍モデルにおいて、CD13 陽性細胞が治療抵抗性で、再発の源であることを示した [文献 33]。今回、我々は Aldefluor アッセイやスフェロイドコロニーアッセイ、薬剤感受性試験およびマイクロアレイ解析を含む様々な機能的アッセイ系を用いて、CD13 陽性 CD166 陰性細胞が *in vitro* において Li-7 細胞の中で増殖の遅い癌幹細胞集団であることを示し、また *in vivo* においても癌幹細胞として存在するであろうことを示した。そして、CD13 陰性 CD166 陽性細胞が、Li-7 細胞の階層性において増殖の速い前駆細胞に相当することを示した。

EpCAM、CD133、CD24 および CD44 などのその他の癌幹細胞マーカーに関しては、Li-7 細胞の 3 つの細胞集団全てに発現が見られ、これらのマーカーが増殖の遅い癌幹細胞のみならず、増殖の速い前駆細胞にも発現していることが明らかとなった。実際、これらのマーカーは CD13 のように増殖速度が遅い癌幹細胞マーカーとしては報告されていない。また、細胞株に共通した癌幹細胞マーカーはないとする報告も認められる [文献 34]。そのため、それぞれの細胞株には *in vitro* における固有の癌幹細胞マーカーが存在すると思われる。

しかしながら、大変興味深いことにこれらのマーカーは *in vivo* においては CD13 陽性細胞にのみ発現が認められた (図 1 1 a)。 *in vitro* と *in vivo* で癌幹細胞マーカーの発現パターンが異なる要因はいくつか可能性があげられる。まず、癌幹細胞は微小環境、いわゆるニッチによって制御される [文献 35]。確かに Li-7 の移植腫瘍において、CD13 陽性細胞は巣状に腫瘍血管近傍に集積していた (図 1 1 c)。また、休眠状態には可塑性があり [文献 36,37]、非癌幹細胞から癌幹細胞へのリプログラミングも起こりうる [文献 38]。我々は CD13 陰性細胞がスフェロ

イドコロニーでは CD13 を発現することを見出した。このことは CD13 の発現に可塑性が存在し、スフェロイド形成を促す培養条件が Population switch を抑制し、CD13 陽性癌幹細胞の維持に適していることを示唆している。

#### 5.4 他のモデルからみた本モデルの利点

*in vitro* において癌幹細胞を標識して可視化する様々なアプローチが他の研究者によって行われているが、これらの方法は特別な遺伝子操作によるラベル化を必要とするため、ある一定の制限を有する[文献 19,39,40]。対照的に、我々のモデルは遺伝子操作を必要とせず、簡便なアプローチである。Li-7 細胞の正確な特性を維持するためには CD13 陽性細胞を選んで、定期的にクローニングを行う必要はあるものの、この細胞株は公共の細胞レポジトリから全ての研究者が自由に入手することが可能である。Li-7 細胞では CD13 と CD166 のマーカーをそれぞれ用いれば、増殖の遅い癌幹細胞分画と、増殖の速い前駆細胞分画両方を同時に識別することができる。このような癌幹細胞と前駆細胞を同時に識別できるモデルは他にはほとんどない。こうした特徴を活かすことで、我々のシステムは、癌幹細胞と非癌幹細胞を *in vitro* で標的とする薬剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

#### 5.5 5-FU とソラフェニブの異なる標的細胞集団

我々は、最も頻繁に使われている殺細胞薬の一つである 5-FU が、CD166 陽性非癌幹細胞を積極的に標的としていることを確認した。これまでの報告から、癌幹細胞は薬剤を排泄する ATP 結合カセット輸送体などのトランスポーターを発現し、化学療法の DNA 障害を回避するために活性酸素種を減らすことで、従来の抗がん剤に対して比較的抵抗性であることが示されている[文献 18]。

ソラフェニブは Li-7 細胞の CD166 陰性細胞を選択的に標的としていた (図 1 3 a,b)。既報では、HLE 細胞の ALDH 活性の高い細胞集団はソラフェニブに感受性であり[文献 42]、ソラ

フェニブが PI3K 阻害剤と併せて癌幹細胞を標的化できるとされる[文献 43]。その一方で、肝細胞癌の癌幹細胞はソラフェニブに抵抗性であるとする報告もある[文献 39,40]。ただし、これらのモデルにおける癌幹細胞は増殖の遅い集団ではなく、速い集団であるとされている。近年癌幹細胞の自己複製に VEGF シグナルが重要であることが想定されており[文献 44]、VEGF シグナルを阻害するソラフェニブが癌幹細胞を選択的に標的とすることは合理的であると考えられる。Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルもまた、癌幹細胞の維持に非常に重要であるが、FGF シグナルとクロストークがある[文献 45]。臨床的には、ソラフェニブ奏功例においてのみ FGF3 と FGF4 の増幅が認められている[文献 21]。我々は CD166 陰性集団において FGF3 と FGF4 の遺伝子発現が顕著に高いことを明らかにしたが（図 1 3 e）、このことはソラフェニブの CD166 陰性集団に対する効果が FGF と Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルを介するものであることを支持する。

我々は、5-FU に引き続くソラフェニブが、それぞれの単剤よりも Li-7 細胞の増殖を強力に阻害することを示した（図 1 3 f）。これまでの報告から、ソラフェニブは細胞周期を G1 停止させて、S 期特異的な 5-FU[文献 46]や放射線[文献 47]の殺細胞効果を減弱させることが指摘されている。確かに、逆の投与順でソラフェニブに引き続いて 5-FU を投与しても顕著な効果は示されなかった（図 1 3 f）。このことから、この 2 つの薬剤の投与順が重要であることが示唆される。現在様々な臨床試験において、ソラフェニブの併用療法や逐次治療の効果が検証されているものの、いまだ生存期間の延長を示すデータは得られていない。

## 5.6 課題と展望

本研究において、様々な疑問と課題が浮上してくる。がんにおける Hierarchical heterogeneity がさらに解明され、それぞれの細胞集団を標的とする薬剤が同定されたとしても、薬理相互作用を考えなければならないし、それぞれの薬剤が有する毒性に関しても考慮されなければならない。特に分子標的薬剤では時に思わぬ有害事象が発生することがある[参考論

文 : Yamada T, et al. *Onkologie*. 2013;36:209-12.]. そうした有害事象が出やすい患者集団が存在する可能性もあり[参考論文 : Saito R, Suzuki H, Yamada T, et al. *Anticancer Res*. 2013;33:4995-8.], 個別化する項目は枚挙に暇がない。

最も重要な疑問は、果たして *in vitro* のモデルが *in vivo* や肝細胞癌の臨床に応用されるのかということである。というのも、上述した通り *in vitro* よりも *in vivo* における癌幹細胞ヒエラルキーはより複雑のようであるためである[文献 35-38]。一方で様々な研究から、*in vitro* の肝細胞癌細胞株から見つかった癌幹細胞マーカーが *in vivo* や臨床的にも十分な意義が示されてきている。例えば、マウス移植モデルにおいて CD13 陽性細胞は肝細胞癌の再発の原因となっており、CD13 を標的する治療が効果的であることが示されている[文献 33]。また、肝細胞癌患者の予後は AFP と EpCAM の発現で層別化される[文献 50]。CD24 の発現は、肝細胞癌術後再発と関連している[文献 16]。CD90 と CD44、EpCAM、ICAM を発現する循環腫瘍細胞もまた、肝細胞癌再発の予測因子として報告されている[文献 13,51,52]。癌幹細胞を標的とする治療で肝細胞癌患者の予後を改善させるものはいまだないものの、そうした治療の臨床的效果を検証するために様々な前臨床研究が進んでいる。こうした事実を踏まえて、我々は Li-7 細胞がさらなる詳細な解析をする価値あるモデルであると考え。このモデルによりシスプラチン、ドキソルビシンあるいはマイトマイシンなどの他の殺細胞薬の標的細胞についての検討や、癌幹細胞を標的とする新しい薬剤のスクリーニング、さらには肝細胞癌に対する効果的な併用療法を検討することが可能である。

また、他の癌種における細胞株を Population switch の有無を調べることにより、癌幹細胞階層性を保持した新たなモデル候補を見つけることが期待される。癌幹細胞を標的とする薬剤のスクリーニングシステムが増えることで、この分野の研究が躍進する一つの可能性が期待される。



## 第6章 結論

Li-7 細胞株では、継代培養によって CD13 陽性細胞が減少し、CD166 陽性細胞が増加する Population switch を来することが明らかとなった。in vitro において、CD13 陽性 CD166 陰性細胞は増殖の遅い癌幹細胞集団として、CD13 陰性 CD166 陽性細胞は分化した増殖の速い前駆細胞集団であると考えられた。これらの細胞集団に対して、ソラフェニブと 5-FU は癌幹細胞と非癌幹細胞を標的としており、5-FU に引き続くソラフェニブが Li-7 細胞に対して顕著な増殖抑制効果を示すことを明らかとした。Li-7 細胞株は癌幹細胞研究において、非常に有用な細胞株である。

### 研究費

本研究は、文部科学省の科学研究費助成事業にサポートされ実施した。

### 利益相反

本研究に関わる利益相反はない

### 引用文献

1. Diwakar R. Pattabiraman and Robert A. Weinberg. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:497-512.
2. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006; 6 :425-36.
3. Nagano H, Ishii H, Marubashi S, Haraguchi N, Eguchi H, Doki Y, Mori M. Novel therapeutic target for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2012; 19: 600-5.

4. Touil Y, Igoudjil W, Corvaisier M, Dessein AF, Vandomme J, Monté D, et al. Colon cancer cells escape 5-FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 837-46.
5. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3:730-7.
6. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-2917.
7. Abei M. Clinical staging and treatment selection for hepatocellular carcinoma: Overview of the current status and perspectives for the future. In: Ohkohchi N. *Therapy of hepatocellular carcinoma: Etiology and treatment*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014: 61-100.
8. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New Engl. J Med* 2008; 359: 378-90.
9. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34.
10. Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251.
11. Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-13.
12. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, et al. Identification and

- characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-56.
13. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 153-66.
  14. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136: 1012-24.
  15. Zhu Z, Hao X, Yan M, Yao M, Ge C, Gu J, Li J. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126: 2067-78.
  16. Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. CD24+ liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 50-63.
  17. Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, Guan XY. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1146-53.
  18. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120: 3326-3339.
  19. Muramatsu S, Tanaka S, Mogushi K, Adikrisna R, Aihara A, Ban D, et al. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication. *Hepatology* 2013; 58: 218-28.
  20. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering

- M, Clevers H. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 2012; 337: 730-5.
21. Fujiwara D, Kato K, Nohara S, Iwanuma Y, Kajiyama Y. The usefulness of three-dimensional cell culture in induction of cancer stem cells from esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434: 773-8.
  22. Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, et al. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013; 57: 1407-15.
  23. J. R. Masters, C. Alston-Roberts, T. Barrett, E. C. Burnett, J. R. Cooper, W. G. Dirks, et al. Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines. *Nature* 2012; 492: 186.
  24. Hirohashi S, Shimosato Y, Kameya T, Koide T, Mukojima T, Taguchi Y, Kageyama K. Production of alpha-fetoprotein and normal serum proteins by xenotransplanted human hepatomas in relation to their growth and morphology. *Cancer Res* 1979; 39: 1819-28.
  25. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 1982; 42: 3858-63.
  26. Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW, Lecatsas G. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *South Africa Med J* 1976; 50: 2124-8.
  27. Dor I, Namba M, Sato J. Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines. *Gann* 1975; 66: 385-92.
  28. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a

- hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 2009; 40: 1512-5.
29. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-4.
  30. Wang F, He L, Dai WQ, Xu YP, Wu D, Lin CL, et al. Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells *In vitro* and *In vivo*. *PLoS One* 2012; 7: e50638.
  31. Yin C, Lin Y, Zhang X, Chen YX, Zeng X, Yue HY, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4alpha gene. *Hepatology* 2008; 48: 1528-39.
  32. Abe M, Havre PA, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang LH, Dang NH. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 2011; 11: 51.
  33. Martin-Padura I, Marighetti P, Agliano A, Colombo F, Larzabal L, Redrado M, et al. Residual dormant cancer stem-cell foci are responsible for tumor relapse after antiangiogenic metronomic therapy in hepatocellular carcinoma xenografts. *Lab Invest* 2012; 92: 952-66.
  34. Muraro MG, Mele V, Däster S, Han J, Heberer M, Cesare Spagnoli G, Iezzi G. CD133+, CD166+CD44+, and CD24+CD44+ phenotypes fail to reliably identify cell populations with cancer stem cell functional features in established human colorectal cancer cell lines. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1: 592-603.
  35. Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: The place to be. *Cancer Res* 2011;71:634-639.
  36. Sugihara E, Saya H. Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer*. 2013;

132:1249-59.

37. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013; 501: 328-37.
38. Singh AK, Arya RK, Maheshwari S, Singh A, Meena S, Pandey P, Dormond O, Datta D. Tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: Updates in concept, controversies and clinical relevance. *Int J Cancer*. 2014 Feb 22. doi: 10.1002/ijc.28804.
39. Xin HW, Ambe CM, Hari DM, Wiegand GW, Miller TC, Chen JQ, et al. Label-retaining liver cancer cells are relatively resistant to sorafenib. *Gut* 2013; 62: 1777-86.
40. Shan J, Shen J, Liu L, Xia F, Xu C, Duan G, et al. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 56: 1004-14.
41. Abdullah LN, Chow EK. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin Transl Med* 2013; 2: 3.
42. Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolta J, Zern MA, Wu J. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. *J Hepatol* 2011; 55: 838-45.
43. Gedaly R, Galuppo R, Musgrave Y, Angulo P, Hundley J, Shah M, et al. PKI-587 and sorafenib alone and in combination on inhibition of liver cancer stem cell proliferation. *J Surg Res* 2013; 185: 225-30.
44. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 871-82.
45. Katoh M, Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to

- regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1059-64.
46. Deng L, Ren Z, Jia Q, Wu W, Shen H, Wang Y. Schedule-dependent antitumor effects of 5-fluorouracil combined with sorafenib in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2013; 13: 363.
  47. Wild AT, Gandhi N, Chettiar ST, Aziz K, Gajula RP, Williams RD, et al. Concurrent versus sequential sorafenib therapy in combination with radiation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013; 8: e65726.
  48. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012; 21: 283-96.
  49. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 133-43.
  50. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 1451-61.
  51. Fan ST, Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Yu WC, Wong J. Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: a prospective study. *Ann Surg* 2011; 254: 569-76.
  52. Liu S, Li N, Yu X, Xiao X, Cheng K, Hu J, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 by hepatocellular carcinoma stem cells and circulating tumor cells. *Gastroenterology* 2013; 144: 1031-41.

## 参考論文

- Yamada T, Sugiyama H, Ochi D, Akutsu D, Suzuki H, et al. Risk factors for submucosal and lymphovascular invasion in gastric cancer looking indicative for endoscopic submucosal dissection. *Gastric Cancer* 2014;17:692-693.
- Endo S, Saito R, Ochi D, Yamada T, Hirose M, Hiroshima Y, Yamamoto Y, Ueno T, Hasegawa N, Moriwaki T, Narasaka T, Kaneko T, Fukuda K, Suzuki H, Mizokami Y, Hyodo I. Effectiveness of an Endoscopic Biopsy Procedure Using EUS-FNA and EMR-C for Diagnosing Adenocarcinoma Arising from Ectopic Pancreas: Two Case Reports and a Literature Review. *Intern Med.* 2014;53(10):1055-62.
- Yamamoto Y, Yamada T, Akutsu D, Sugaya A, Murashita T, Matsuda K, Yamamoto Y, Kusakabe R, Kaneko T, Suzuki H, Hyodo I, Sato T, Takayashiki N, Murakoshi N, Hara K, Mizokami Y. Collagenous sprue diagnosed by double balloon endoscopy. *Dig Endosc.* 2014;26:108-12.
- Saito R, Suzuki H, Yamada T, Endo S, Moriwaki T, Ueno T, Hirose M, Hirai S, Yamato K, Mizokami Y, Hyodo I. Predicting skin toxicity according to EGFR polymorphisms in patients with colorectal cancer receiving antibody against EGFR. *Anticancer Res.* 2013;33:4995-8.
- Yamada T, Moriwaki T, Matsuda K, Yamamoto Y, Sugaya A, Akutsu D, Murashita T, Endo S, Hyodo I. Panitumumab-induced interstitial lung disease in a case of metastatic colorectal cancer. *Onkologie.* 2013;36:209-12.



## 謝辞

本研究は、理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室にて中村幸夫室長の寛大なるご協力のもとに実施することができた。檀上稲穂博士（現東北メディカルメガバンク講師）を中心に、研究室のメンバーと議論をする機会に恵まれた。こうしたディスカッションは、これまで知らなかった基礎研究の奥深さに触れる貴重な機会となり、時に厳しく批判を頂いたことは私の財産であると感じている。城田涼子さんには多くの時間を割いて頂き、実験の技術的サポートをして頂いた。その他、理研で研究を行う上で多くの方々に技術的・事務的サポートを頂いた。

免疫染色に関しては、附属病院内の TRRC に依頼させて頂いたが、竹内朋代先生与李冬平先生には条件検討の煩雑な業務にも関わらず、親切に相談に載って頂いた。

今回の研究は、肝細胞癌の EpCAM を研究されておられる金沢大学の山下太郎先生に共同研究者として参加して頂き、CSC に関する貴重なご意見を頂戴した。

論文執筆にあたっては、消化器内科安部井誠人准教授に丁寧なご指導を賜った。そして、兵頭一之介教授には常に臨床の視点から本研究を評価して頂き、癌幹細胞に関する多くの論文を勉強する機会を頂いた。

また、私が参加した大学院のがんプロフェッショナル養成プランの多くのプログラムは、がんを知りたいという高い意欲につながり研究を推進する大きな励みとなった。e-learning の講義を用意して下さった先生方、がん薬物療法専門医に向けローテーションにご協力頂いた、血液内科・呼吸器内科・乳腺甲状腺外科・病理診断科の多くの先生方、そして事務局関係各位に深謝申し上げたい。

最後に、私の精神的な拠りどころとして常に支えて励ましてくれた妻と、子供たちにも大変感謝している。本研究が未来のがん治療のために、わずかでも役に立つことがあれば、これ以上の幸せはない。