

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460975

研究課題名(和文) 腫瘍融解ワクシニアウイルスの肝癌幹細胞に対する殺細胞効果の評価

研究課題名(英文) Evaluation of cytotoxic effects of oncolytic vaccinia virus on cancer stem cells of liver cancers.

研究代表者

安部井 誠人 (Abei, Masato)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：20261802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌の治療には癌幹細胞に対する標的治療の必要性が明らかになっているが、その薬効評価に資するin vitro細胞系は不明であった。本研究では、初めに種々の肝細胞癌細胞株のうちLi-7細胞株のCD13陽性CD166陰性細胞が癌幹細胞の性質を示すこと、そしてLi-7細胞が肝細胞癌の癌幹細胞に対する薬効評価に資することを明らかにした。次いで、この細胞を用いJX-594の効果の評価したところ、JX-594はCD13陰性非癌幹細胞とともにCD13陽性CD166陰性癌幹細胞をも殺傷した。JX-594腫瘍融解ウイルスは肝細胞癌の癌幹細胞に対し殺傷効果を示すことが初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is recently revealed that cancer show cancer stem cells(CSC) hierarchy and that therapies targeting the CSC is necessary. Some oncolytic viruses which selectively replicate and lyse cancer cells showed cytotoxicity to CSC. In this study, we aim to evaluate the effects of the oncolytic vaccinia virus, JX-594, on the CSC of liver cancer. At first, we found that among various cell lines the CD13 positive CD166 negative cells of the Li-7 cell line differentiate and demonstrate the characteristics of CSC and that the cell line is suitable for testing the effects of drugs on CSC in vitro. When we next evaluated the effects of the JX-594 virus on this cell line, we found that the virus shows significant cytotoxic effects against not only CD13 negative non-CSC cells but also against CD13 positive CD166 negative CSC cells. We revealed that the JX-594 oncolytic vaccinia virus demonstrates cytotoxicity to the CSC of the liver cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 腫瘍融解ウイルス 癌幹細胞 ワクシニアウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 癌幹細胞研究の進歩

近年、種々の固形癌の「癌幹細胞」が同定され、注目されている。それら癌幹細胞の発癌、癌転移、治療抵抗性獲得における意義が認識されるとともに、癌幹細胞を標的とした新規治療法を開発する必要性が広く認識されるに至っている。肝細胞癌においても、CD133, CD90, CD24, EpCAM 等、複数の癌幹細胞マーカーが同定された。しかしながら、現在、肝癌癌幹細胞を標的とした治療法(薬剤)のスクリーニングに資する *in vitro* の培養細胞系は同定されていない。

### (2) 腫瘍融解ウイルス

近年、腫瘍細胞選択的に増殖し、腫瘍を融解壊死させる種々の「腫瘍融解ウイルス」が開発され、それらの癌遺伝子治療への応用が注目されている。従来の非増殖型ベクターを用いた遺伝子治療に比し、腫瘍融解ウイルスは癌細胞内で数千から数万倍増殖する結果、転移・浸潤巣に対する効果も期待でき、大量投与を必要とせず安全性にも優れ、固形癌の革新的な治療法と期待されている。

特に最近、ワクシニアウイルスは旺盛な増殖能かつ高い腫瘍融解能に加え、中和抗体の存在下でも血中で増殖可能である等、腫瘍融解ウイルスとして理想的な性質を有することが明らかとなってきた。なかでも米国 Jennerex 社が開発した腫瘍融解ワクシニアウイルス JX-594 は、ウイルスの thymidine kinase(TK)を欠損することにより腫瘍選択的に増殖し、腫瘍を融解壊死するとともに、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)遺伝子を搭載することにより強力に抗腫瘍免疫を賦活する効果を有する。JX-594 は、すでに米国、欧州と韓国において進行肝細胞癌に対する腫瘍内注入の第I相臨床試験および第II相臨床試験が実施され高い安全性と抗腫瘍効果を示すことが確認された(*Nat Med.* 2013; 19:329-36.)。さらに米国では、種々の進行癌患者に対し、JX-594 静脈注射の第I相試験が実施され、全身の癌細胞内でのみウイルスが特異的に増殖、GM-CSF 遺伝子を発現し、抗腫瘍効果を発揮することが確認された。この臨床試験は、「静脈注射による癌病巣への特異的な遺伝子送達」という癌遺伝子治療の歴史上の大きな break through を達成したことから *Nature* 誌に掲載された(*Nature* 2011; 477: 99-102.)。JX-594 は、現在、海外において肝細胞癌に対する第III相臨床試験が行われており、

世界初のグローバルな癌遺伝子治療薬となる可能性が期待されている。

一方、最近、いくつかの腫瘍融解ウイルス(アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、等)が「癌幹細胞を殺傷する能力」を有することが報告された。しかし、JX-594 の癌幹細胞への効果は知られていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、初めに、種々の肝癌細胞由来培養細胞株のうち、癌幹細胞への薬効を評価可能な細胞の同定を試みた。次に、この細胞系を用いて、腫瘍融解ウイルス JX-594 の肝癌幹細胞に対する薬効の評価を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料:

肝細胞癌由来細胞株  
HuH-7 細胞, Li-7 細胞, PLC/PRF/5 細胞, HLE 細胞, HLF 細胞  
ワクシニアウイルス  
JX-594 (UPRT 搭載腫瘍融解アデノウイルス)

### (2) 方法:

#### フローサイトメトリー(FACS)

細胞は、以下の抗体によりラベルされた: PE 抱合 CD166, CD324, CD133, CD44, FITC 抱合 CD44, biotin 抱合 CD44, APC 抱合 CD13, CD133, CD90。コントロールとして以下の抗体が使用された: APC 抱合マウス IgG1, マウス IgG2b, PE 抱合マウス IgG1。FACS Calibur と CellQuest software を用いた FACS により解析された。

#### 細胞増殖、抗癌剤感受性の評価

細胞増殖は細胞を 96 穴プレート上にまき、24, 48, 72, 96 時間後に viability を Cell Counting Kit -8 により測定し求めた。抗癌剤感受性は、細胞を 96 穴のプレート上にまき、5-FU またはソラフェニブを添加後 72 時間後に viability を評価した。

#### Aldefluor assay

細胞内 ALDH1 酵素活性の評価には、ALDEFLUOR 試薬を用いた。

#### Spheroid colony assay

分画した細胞を 96 穴 Nanoculture プレートにまき、Nanoculture medium, FBS とともに培養、20 日目に Spheroid colony の個数を数えた。Spheroid colony は 24 日目に回収し、FACS にて解析した。

#### 免疫組織学的評価

スライドにまいた Li-7 細胞を paraformaldehyde にて固定し、抗 CD166 抗体、抗 Ki-67 抗体と一晩反応させた。次いで、二次抗体と反応させた。

#### Microarray 分析

Li-7 細胞より CD166(-), CD166(+)細胞をそれぞれ分離し RNA を抽出した。Cy-3 にてラベルされた cRNA を microarray slide 表面に

immobilized された oligonucleotide と hybridize し Microarray Scanner にて scan , データは GeneSpring software にて解析した。

#### 動物実験

3,4 週齢の雌性 BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に異なる期間培養した Li-7 細胞を注入した。形成された移植腫瘍を切除し, 抗 CD13 抗体 抗 Ki-67 抗体を用いた免疫組織染色および FACS 解析を施行した。

#### 4. 研究成果

初めに, 種々の肝癌細胞株のうち Li-7 細胞株の CD13 陽性 CD166 陰性細胞が癌幹細胞の性質を示すこと, そして Li-7 細胞株は肝癌の癌幹細胞に対する薬効の評価に有効であることが明らかとなった。

#### (1) 肝癌細胞株の形質の変化 (population change)

Table 1 種々の肝細胞癌株における培養 2 ヶ月間前後の CSC マーカー の変化

	Li-7		HuH-7		PLC/PRF/5		HLF		HLE	
	pre	post	Pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
CD133	+	+	++	++	-	-	-	-	-	-
EpCAM	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
CD90	-	-	-	-	+-	+-	+-	+-	++	++
CD24	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++
CD44	++	++	+	+	+-	+-	++	++	++	++
CD13	+	-	++	++	++	++	-	-	-	-
CD166	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++

pre, 培養 1 週間後; post, 培養 2 週間後

初めに, 種々の肝細胞癌由来細胞株 (HuH-7, Li-7, PLC/PRF/5, HLF, HLE) が癌幹細胞の性質を有するかを調べるために, これら細胞を 2 ヶ月間培養した前後で種々のマーカー (CD13, EpCAM, CD133, CD44, CD90, CD24, CD166) の発現変化を評価した。その結果, Li-7 細胞のみがマーカー発現の変化を示した (Table 1)。

次に形質の変化の前後における腫瘍造形成能を比較した。1 週間の培養により

CD13(+)/CD166(-)細胞は, Li-7細胞全体の約 20% を占め, Li-7細胞の注射により全ての動物に皮下腫瘍が形成された (4/4; Table 2)。1 ヶ月間の培養により Li-7細胞には CD13(+)/CD166(-)細胞がなくなり, 全て CD13(-)/CD166(-)細胞と CD13(-)/CD166(+ )細胞により構成されるようになったが, Li-7細胞の注射により 4 匹中 1 匹の動物にのみ皮下腫瘍が形成された (Table 2)。2 ヶ月間の培養により Li-7細胞は CD13(-)/CD166(+ )細胞によりほとんど構成されるようになったが, Li-7細胞の注射により造腫瘍能は全く認められなくなった (Table 2; Figure 1c)。

Table 2 Li-7 細胞株の培養による造腫瘍能の消失

Culture period	Tumorigenicity
1 week (containing CD13+/CD166-)	4/4
4 weeks (CD13-/CD166- and CD13-/CD166+)	1/4
8 weeks (only CD13-/CD166+)	0/4*

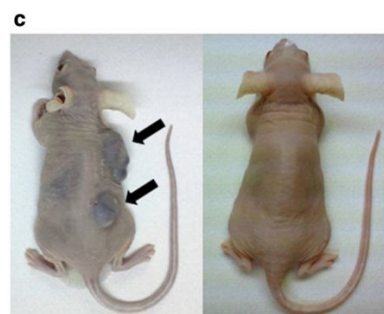
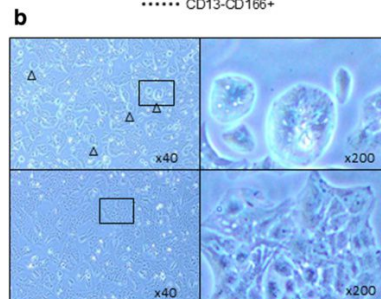
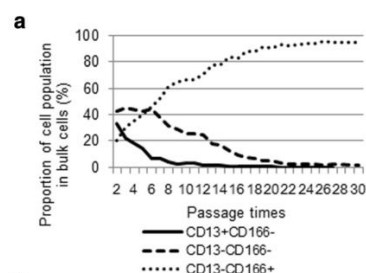


Figure 1. Li-7 細胞株における培養中の細胞分画の変化とその形態, 造腫瘍能の変化

#### (2) Li-7細胞の in vitroにおける階層性

次に, Li-7細胞株は, CD13(+)/CD166(-)細胞を幹細胞とし, CD13(-)/CD166(+ )細胞を progenitor細胞とする階層性を有する不均一な細胞集団であることを明らかにした。

FACSにより分離した3つの細胞集団から他の細胞集団が生じるかどうかを検討した。CD13(-)/CD166(+ )細胞からは, CD13(-)/CD166(-)細胞が 3 週間以内に生じ, 1 ヶ月以内には CD13(-)/CD166(+ )細胞が全体の 40% を占めた。一方, CD13(-)/CD166(-)細胞からは, CD13(-)/CD166(+ )細胞が産生したが, CD13(+)/CD166(-)細胞は産生しなかった。CD13(-)/CD166(+ )細胞は, 1 ヶ月間の培養により他の細胞を産生しなかった。これらの結果より, CD13(+)/CD166(-)細胞だけが,

Li-7 細胞株における全ての細胞集団を産生することができ、癌幹細胞としての性質を有することが判明した。

### (3) Li-7 細胞株における機能的階層性

Li-7 細胞株における機能的階層性を明らかにするために、Aldefluor assay と CD13 と CD166 の二重染色を行った。その結果、ほとんど(96%)の CD13(+)/CD166(-)細胞は高い ALDH 活性を有していた(Figure 2a)。多数(85.7%)の CD13(+)/CD166(-)細胞も高い ALDH 活性を示した。CD13(+)/CD166(-)細胞は癌幹細胞の特徴を備えていることがわかった。

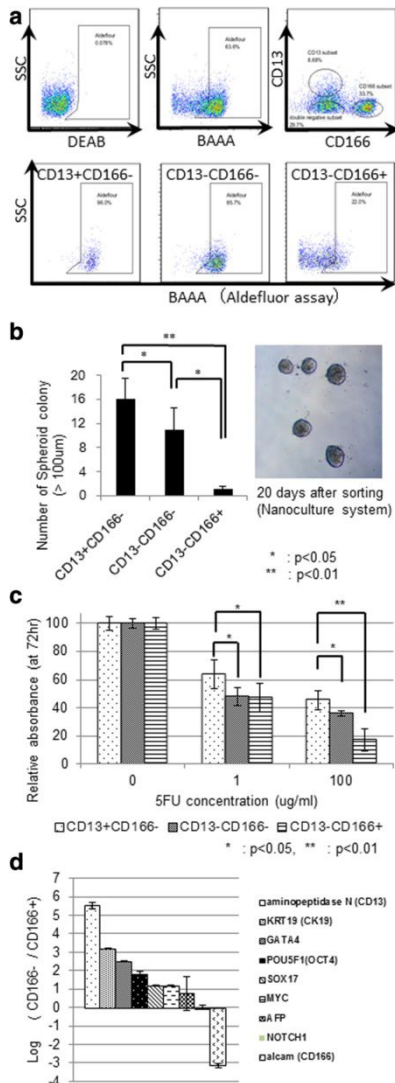


Figure 2. Li-7 細胞における機能的階層性。

次に、癌幹細胞のもう一つの特徴である Spheroid 形成能について調べた。CD13(+)/CD166(-)細胞は、CD13(+)/CD166(-)細胞に比し、数多くの大きな Spheroid colony を形成した。CD13(-)/CD166(+ )細胞は、最も Spheroid colony を形成しなかった(Figure

2b)。Li-7 細胞全体を調べると、長期培養による形質変化に伴い、Spheroid colony は減少した。Spheroid colony 中の細胞の多くは、CD13 を発現していた。

抗癌剤 5-FU に対する Li-7 細胞の反応をみると、CD13(-)/CD166(+ )細胞の増殖は抑制されたが、CD13(+)/CD166(-)細胞は増殖が抑制されず、抗癌剤抵抗性という癌幹細胞の特徴を有していた。長期培養による形質変化に伴い、Li-7 細胞全体の 5-FU に対する感受性も比較的に向上した。

最期に、CD13(+ )細胞と CD166(+ )細胞における stemness 関連遺伝子の発現を microarray 分析により比較した。OCT4, SOX17, MYC 等の stemness 関連遺伝子は、CD166(+ )細胞よりも CD166(-)細胞に発現していた(Figure 2d)。

### (4) In vivo における CD13 の発現

次に、CD13 が癌幹細胞マーカーとしての役割を *in vivo* で果たしているかを調べた。Li-7 細胞を皮下移植して形成された腫瘍を FACS 解析し、CD13 と EpCAM, CD133, CD24 等、他の癌幹細胞マーカーを共染色したところ、これらは CD13 と共発現していることがわかった。EpCAM, CD133, CD24 は、*in vitro* では3つの細胞分画のいずれにも発現したが、*in vivo* では CD13 発現細胞のみに発現していた。

CD13 と Ki-67 の発現をみると、CD13 は、Ki-67 発現の乏しく分裂能の乏しい細胞に発現していた。

### (5) ソラフェニブまたは 5-FU 治療の効果

次に Li-7 細胞の各分画に対するソラフェニブの効果を検討した。ソラフェニブは、CD166(-)細胞を選択的に殺し、CD166(+ )細胞は殺さなかった。CD13(+)/CD166(-)細胞と CD13(-)/CD166(-)細胞はソラフェニブに対し、同様の感受性を示した。一方、5-FU は CD166(+ )細胞の成長を優位に抑制した。5-FU とそれに引き続くソラフェニブの併用は、両者の単独使用よりも Li-7 細胞の増殖を抑制したが、ソラフェニブとそれに引き続く 5-FU の併用は併用効果を示さなかった。

以上より、種々の肝癌細胞株のうち Li-7 細胞株の CD13 陽性 CD166 陰性細胞が癌幹細胞の性質を示すこと、また Li-7 細胞は癌幹細胞への薬効の評価に有効であることが判明した。

**腫瘍融解ワクシニアウイルス JX-594 は、肝細胞癌由来 Li-7 細胞株の CD13(+ )CD166(-)癌幹細胞を殺傷する効果を示すことが明らかとなった。**

次いで、Li-7 細胞を用い JX-594 の効果を評価した。その結果、JX-594 は、Li-7 細胞より分離した CD13(-)CD166(-)細胞および CD13(-)CD166(+ )細胞の非癌幹細胞を殺傷す

るとともに、CD13(+)CD166(-)の肝細胞癌の癌幹細胞をも殺傷した。

以上より、腫瘍融ワクシニアウイルス JX-594 は、肝癌の幹細胞に対して殺傷効果を示すことが判明した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takeshi Yamada, Masato Abei, Inaho Danjo, Ryoko Shiota, Taro Yamashita, Ichinosuke Hyodo, Yukio Nakamura.

Identification of a unique hepatocellular carcinoma line, Li-7 with CD13(+) cancer stem cells hierarchy and population change upon its differentiation during culture and effects of sorafenib. BMC Cancer 15 巻, 2015, 260.

doi: 10.1186/s12885-015-1297-7. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Takeshi Yamada, Masato Abei, Inaho Danjo, Ichinosuke Hyodo, Yukio Nakamura.

A hepatocellular line able to monitor cancer stem cells differentiation and effects of drugs targeting CSC.

第 73 回日本癌学会, 2014 年 9 月 25 日パシフィコ横浜, 横浜。

2. Takeshi Yamada, Masato Abei, Inaho Danjo, Ryoko Shiota, Taro Yamashita, Ichinosuke Hyodo, Yukio Nakamura.

Identification of a hepatocellular carcinoma line, Li-7, capable of monitoring the differentiation of CD13(+)CD166(-) cancer stem cells and effects of sorafenib.

米国癌学会(AACR)2015, 2015 年 4 月 20 日, フィラデルフィアコンベンションセンター, フィラデルフィア, アメリカ合衆国

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部井 誠人 (ABEI MASATO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 20261802

(2) 研究分担者

永田 恭介 (NAGATA KYOSUKE)

筑波大学・学長

研究者番号: 40180492

兵頭 一之介 (HYODO ICHINOSUKE)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 60416469

山下 達郎 (YAMASHITA TATSUROU)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号: 90377432

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: