

筑 波 大 学

博 士（ 医 学 ）学 位 論 文

**A robust culture method for maintaining
tumorigenic cancer stem cells in the hepatocellular
carcinoma cell line Li-7**

(肝細胞癌細胞株 Li-7 における
高腫瘍形成性がん幹細胞の維持培養方法)

2018

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

佐藤 由花子

略語

CSC : Cancer stem cell

AML : acute myeloid leukemia

ALDH : aldehyde dehydrogenase

ROS : reactive oxygen species

iPS : induced pluripotent stem

HLA : human leucocyte antigen

ES : embryonic stem

bFGF : basic fibroblast growth factor

FGFR : fibroblast growth factor receptor

目次

略語一覧	1
第 1 章 研究の背景	4
1.1 肝細胞癌の疫学	
1.2 肝細胞癌の治療	
1.3 がん幹細胞に関する研究	
1.4 肝細胞癌におけるがん幹細胞	
1.4.1 肝細胞癌におけるがん幹細胞	
1.4.2 肝細胞癌細胞株 Li-7 におけるがん幹細胞の報告と研究開始時の問題点	
1.5 <i>in vitro</i> でのがん幹細胞の維持	
第 2 章 研究の目的	7
2.1 肝癌細胞株 Li-7 におけるがん幹細胞の新しい維持培養方法の構築	
2.2 がん幹細胞の高腫瘍形成能獲得メカニズムの解明	
第 3 章 対象と方法	8
3.1 細胞培養	
3.2 フローサイトメトリー解析とセルソーティング	
3.3 アルデフローアッセイ	
3.4 スフェア形成アッセイ	
3.5 動物実験	
3.6 移植腫瘍の組織学的評価とフローサイトメトリー解析	
3.7 RNA シークエンス	
3.8 統計解析	
第 4 章 結果	11
4.1 CD13+CD166-細胞を維持した Li-7 の新しい培養方法	
4.2 mTeSR1 で培養された Li-7 の性質	
4.3 免疫不全マウスにおける腫瘍形成能の比較	
4.4 mTeSR1 で培養した Li-7 の移植腫瘍の評価	
4.5 高腫瘍形成細胞の遺伝子解析	
第 5 章 考察	15
5.1 本研究で明らかとしたこと	

5.2	CSC 培養法の利点	
5.3	Li-7 と他のがん細胞株の相違点	
5.4	CSC と ES/iPS 細胞の類似点	
5.5	課題と展望	

第 6 章	結論	17
-------	----	----

利益相反	17
------	----

引用文献	18
------	----

図	21
---	----

表	27
---	----

参考論文	32
------	----

謝辞	33
----	----

第1章 研究の背景

1.1 肝細胞癌の疫学

肝細胞癌は肝臓原発悪性腫瘍の大部分を占め、ウイルス性肝炎に対する効果的な治療が実用化された現在においてもなお、世界のがん関連死亡の原因原発部位として第4番目である[1]。肝細胞癌のリスクファクターは、途上国においてはB型C型肝炎ウイルス感染や慢性アルコール性肝障害が多く、先進諸国においては2型糖尿病や非アルコール性脂肪肝疾患が多いとされ、その発症率は4:1で男性に多い[2] [3]。他のアジア諸国においてはB型肝炎ウイルス感染が多いことが知られているが、わが国の肝細胞癌の原因疾患はC型肝炎ウイルス感染が多いのが特徴である[4]。

1.2 肝細胞癌の治療

前述のとおり肝細胞癌は背景肝に慢性肝障害や肝硬変を合併していることが多いため、その治療方針は肝予備能・肝外転移・脈管侵襲・腫瘍数・腫瘍径の5因子を考慮して判定される(日本肝臓学会 肝癌診療ガイドライン 2017年版)。根治的治療としては、外科的切除、ラジオ波焼灼療法、肝動脈化学塞栓療法、肝移植が選択されるが、切除不能と判定された場合には、肝動注化学療法、薬物療法、緩和的治療が選択される[5] [6] [7]。切除不能肝細胞癌に対する薬物療法は、マルチキナーゼ阻害剤であるソラフェニブが唯一の標準的治療であった[8]。同じマルチキナーゼ阻害剤であるレゴラフェニブのソラフェニブ治療後症例に対する生存期間延長効果が示されたことから[9]、2017年6月にレゴラフェニブはわが国でも肝細胞癌への使用が承認された。さらにレンバチニブはソラフェニブに対して全生存期間の非劣性が認められたことから、2018年3月にわが国で切除不能肝細胞癌の一次治療薬として承認された。しかしながらいずれの治療もわずか3か月程度までの生存期間延長効果が示されたにすぎず、切除不能肝細胞癌に対する薬物療法は今後の更なる発

展が求められている。

1.3 がん幹細胞に関する研究

従来、がん組織における全てのがん細胞は一様に造腫瘍能を有していると考えられてきたが、現在ではがん組織にわずかな割合で存在するがん幹細胞(cancer stem cells : CSCs)のみが造腫瘍能を有するというがん幹細胞コンセプトが広く受け入れられつつある[10] [11]。CSCs は、自己複製能と分化能を有し、がん組織の heterogeneity を構成する細胞と定義される[12]。CSCs は、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia : AML)の骨髄細胞から、免疫不全マウスに移植可能かつヒト AML を再構築可能な細胞集団として 1997 年に初めて同定された[13]。それからの 20 年間で、CSCs に関する研究は多くの固形がんにおいても展開された。その中で、CSCs は治療抵抗性が高い細胞集団であり、がんの再発や転移の起源となることが明らかとなった。CSCs の治療抵抗性のメカニズムについては、①CSCs が細胞静止期 G0 期にあるため、がん細胞の高い細胞増殖能を標的とした従来の治療が効きにくい[14]、②ABC トランスポーターなどの薬剤排出ポンプ機能亢進やアルデヒド脱水素酵素(aldehyde dehydrogenase : ALDH)の高活性によって抗がん剤排出能が亢進している[15] [16]、③活性化酸素(reactive oxygen species : ROS)の高い抑制能による抗がん剤・放射線治療抵抗性[17]などが報告されている。これらのメカニズムのため、従来の化学療法や放射線療法では CSCs 以外のがん細胞が死滅しても CSCs が生き残り、がんの治癒が困難であると考えられている。CSCs 以外のがん細胞を標的とする従来の治療に加え、CSCs を標的とする新たな治療の開発が待望されている[10] [14]。

1.4 肝細胞癌におけるがん幹細胞

1.4.1 肝細胞癌におけるがん幹細胞

近年の肝細胞癌 CSCs 研究によって、肝細胞癌 CSCs を同定する様々なマーカーが明

らかとなっている[18] [19]。主なものを表 1 にまとめた。これらのマーカーの他に、肝細胞癌 CSCs の維持に関与するシグナル伝達経路として、Wnt/ β -catenin、PI3K/AKT、TGF- β 、IL-6/STAT3、Hedgehog、Notch シグナル伝達経路が報告されている[18] [20]。肝細胞癌 CSCs 研究においては、これらの CSCs に特徴的なマーカーやシグナル伝達経路の評価を通して CSCs を同定する手法がとられている。

肝細胞癌 CSCs の培養方法としては、CSCs が高いスフェア形成能を持つことを利用した 3 次元培養法があるが[21]、スフェア培養方法が各施設間で統一されておらず、さらに 2 次元培養に比べて大量培養にかかるコストが高いなどの克服すべき問題点もある。

1.4.2 肝細胞癌細胞株 Li-7 におけるがん幹細胞の報告と研究開始時の問題点

我々の研究室では、肝細胞癌細胞株 Li-7 において、CD13+CD166-細胞が CSCs の特徴を持つことを報告している[22]。Li-7 は *in vitro* の長期継代培養によって、CD13+CD166-細胞の割合が次第に減少する一方、non-CSCs の割合が増えることを明らかにし、この現象を **population change** と名付けた。すでに確立されている細胞株が、通常条件の継代培養によってその表現型が変化する点と、この **population change** が CSCs から non-CSCs への分化による可能性を示した点で画期的な報告であった。

しかし、**population change** によって CSCs の割合が減るということは、Li-7 が長期継代培養によって腫瘍形成能を失っていくこと意味する。実際、本研究開始時点でセルバンクから再入手可能な Li-7 は、2012 年の我々の研究で使用された Li-7 に比べて、マウス造腫瘍能の低下が確認された(表 2)。さらに、他の研究室で維持された Li-7 においても **cell suspension** の状態でマウス腫瘍形成能が低下しているものがある[23]。

本研究開始時、高い腫瘍形成能と分化能を持つ CD13+CD166- CSCs は、肝細胞癌の腫瘍形成メカニズムの解明や、肝細胞癌 CSCs 標的治療の研究に大変有効であると考えた。しかし、これらの研究を遂行するには、十分量の CD13+CD166- CSCs を *in vitro* で

安定して維持する必要があった。分化能を有するがん細胞株 Li-7 において CD13+CD166- CSCs の安定した維持培養は、研究開始時の大きな課題であった。

1.5 *in vitro* でのがん幹細胞の維持

CSCs 研究において、*in vitro* で CSCs を効率的に維持することは、かねてよりの課題であった。プライマリー細胞に含まれている CSCs の割合は非常に少ない上、例えばプライマリー細胞からの分離・回収に成功しても維持培養中に非対称性分裂を繰り返し、分化が進むことがその理由である。

これまでに *in vitro* での CSCs の維持を目的とした試みがいくつか報告されている。Kobayashi らは、プライマリーのヒト大腸癌細胞を NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ null (NOG)マウスで継代維持したのちに自ら調整した無血清培地で培養し、LGR5 陽性の高腫瘍形成能を持つ細胞が得られたことを報告した[24]。一方、Oshima らは、iPS (induced pluripotent stem)因子である 3 遺伝子(*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*)を大腸癌細胞株 SW480 に遺伝子導入すると、CSCs の特徴を持った細胞が得られることを報告した[25]。

これらの報告は *in vitro* で CSCs が維持培養できる方法を示しているものの、煩雑な工程を必要とするものであった。このため、より簡便で高い再現性のある *in vitro* での CSCs の維持培養方法が求められている。

第 2 章 研究の目的

2.1 肝癌細胞株 Li-7 におけるがん幹細胞の新しい維持培養方法の構築

本研究の第 1 の目的は、肝細胞癌細胞株 Li-7 の CD13+CD166- CSCs を長期に安定して維持培養できる方法を構築することとした。なお、この新しい維持培養方法は、Cell Bank で品質保証された細胞株を入手すれば、誰でも再現可能な簡便な方法であることを目指し

た。

2.2 がん幹細胞の高腫瘍形成能獲得メカニズムの解明

in vitro で CSCs が安定して維持培養できるようになった次段階の本研究第 2 の目的は、その材料を用いて高腫瘍形成能獲得メカニズムを解明することであった。CSCs の高腫瘍形成能獲得メカニズムが解明されれば、その後の CSCs 標的治療の研究に役立つと考えた。

第 3 章 対象と方法

3.1 細胞培養

肝細胞癌細胞株 Li-7 は、理研バイオリソース研究センター細胞材料開発室 (RIKEN cell bank, Tsukuba, Japan) から分譲を受けた。特に記載がない場合、Li-7 は 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で培養した。高腫瘍形成性 Li-7 の確立のため胚性幹(embryonic stem : ES)細胞や iPS 細胞に用いられる培養液・培地を用いて検討した。細胞は 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地で継代し 1 晩インキュベート後、PBS で 1 回洗浄してから mTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada)、StemFit AK02N (AJINOMOTO, Tokyo, Japan)、Essential 8 (Gibco, Thermo Fisher Scientific)、Stem Partner (KYOKUTO Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan) に培地交換した。細胞は 37℃、5%CO₂ で培養し、およそ 80% 程度の confluency で週 2 回継代培養した。

3.2 フローサイトメトリー解析とセルソーティング

細胞は 0.25% トリプシン EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で剥離・回

収し、染色用バッファー (5% FBS 含有 PBS)内で蛍光色素標識抗体と 4℃で 20 分間反応させた。本研究で用いた蛍光色素標識抗体は表 3 にまとめた。抗体反応後の細胞は染色用バッファーで 1 回洗浄し、死細胞除去のため 7-AAD (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)を加えた染色用バッファーで懸濁して解析を行った。ダブレット細胞は FSC-W/FSC-H プロットで除去した。各抗体のアイソトープコントロール抗体を用いて陰性/陽性ラインを決定した。セルソーティングでは、ソート後解析で各ソーティングの純度が 95%以上であることを確認した。フローサイトメトリー解析には FACS Verse、FACS Calibur を用い、解析には FACSuite、CellQuest ソフトウェア (すべて BD Biosciences)を用いた。セルソーティングには FACS SORP(Special Order Research Products) Aria と FACSDiva ソフトウェア (ともに BD Biosciences)を用いた。

3.3 アルデフローアッセイ

ALDEFLUOR reagent (STEMCELL Technologies)を用いて細胞内 ALDH 活性を測定した。活性化された ALDEFLUOR reagent に含まれる bodipy-aminoacetaldehyde は、細胞内 ALDH によって蛍光物質である bodipy-aminoacetate (BAA-)に変換され、フローサイトメトリーで検出可能となる。15 μ M の ALDH 選択阻害剤 diethylaminobenzaldehyde で前処理したものをネガティブコントロールとし、ALDEFLUOR reagent を加えたサンプルは 37℃で 20 分間反応させた。ALDEFLUOR reagent との反応後、細胞は前述の染色用バッファーで 1 回洗浄し、BAA-の退色を防ぐため aldefluor buffer (STEMCELL Technologies)内で蛍光標識抗体と 4℃で 20 分間反応させた。染色用バッファーで 1 回洗浄後、7-AAD を加えた aldefluor buffer で再懸濁し、FACS SORP Aria で解析した。

3.4 スフェア形成アッセイ

10% FBS 含有ナノカルチャーメディアウム R タイプ (ORGANOGENIX, Kawasaki,

Japan)を各ウェル 100 μ l ずつ加えた 96 ウェルナノカルチャープレート-MS (ORGANOGENIX)に 4×10^3 個の細胞をセルソーティングで回収した。週に 2 回、培地の半量を新しい培地に交換し、37°C、5%CO₂ で培養した。培養 14 日目に顕微鏡下に観察し、100 μ m 以上のスフェア数をカウントした。

3.5 動物実験

BALB/c *nu/nu* メスマウスを日本 CLEA (Tokyo, Japan)から購入し、6 週齢までに細胞移植実験を行った。細胞は 200 μ l の RPMI 1640 に懸濁し、イソフルラン吸入麻酔で鎮静したマウス体幹の皮下に移植した。マウスは移植腫瘍の生着が確認された後にイソフルラン吸入麻酔で安楽死させた。全ての実験は、理研バイオリソース研究センターの動物実験実施規定に従って行った。

3.6 移植腫瘍の組織学的評価とフローサイトメトリ解析

マウス移植腫瘍はマウスの安楽死後に摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋して 3 μ m 厚の切片を作製した。切片はヘマトキシリンエオジン染色後にデジタルカメラ搭載顕微鏡 DP25 (Olympus, Tokyo, Japan)で観察し写真撮影した。

フローサイトメトリ解析では、摘出腫瘍を約 8mm 四方の大きさで分離し、これを眼科剪刀でミンチ状にした。腫瘍細胞は 1mg/ml のコラゲナーゼタイプ I (FUJIFILM Wako, Osaka, Japan)を加えた RPMI 1640 に懸濁し、30°C で 37 分間処理した。細胞懸濁液を 40 μ m セルストレーナー (BD Biosciences)に通してから遠心分離で腫瘍細胞を回収した。細胞は前述の方法で蛍光標識抗体染色した。マウス由来細胞は HLA (human leucocyte antigen)-ABC 陰性細胞として除外し、FACS Verse (BD Biosciences)で解析した。

3.7 RNA シークエンス

1×10⁶ 個ずつの細胞を前述のセルソーティングで回収した。北海道システム・サイエンス株式会社 (Sapporo, Japan) に依頼し、各細胞集団からのトータル RNA 抽出、RNA シークエンス解析 (Illumina HiSeq2500 100bp ペアエンド解析, リード数 2000 万リードペア, Illumina, San Diego, CA, USA) を行った。生データは FASTQ 形式で出力された後、TopHat でリファレンス配列にマッピングされ、Cufflinks で遺伝子発現量解析を行った。

3.8 統計解析

スフェア形成能の比較には t 検定を行い、p 値 0.05 未満を有意とした。

第 4 章 結果

4.1 CD13+CD166-細胞を維持した Li-7 の新しい培養方法

2016 年に理研バイオリソース研究センターから新たに分譲された Li-7 は、解凍・培養開始直後におよそ 40% の CD13+CD166-細胞を含んでいた。しかし既報の通り、FBS 含有培地で 1 か月以上の継代培養をすると、CD13+CD166-細胞の割合は明らかに減少した (図 1 A、B) [22]。初めに、CD13+CD166-細胞を維持することを期待して、ES 細胞 / iPS 細胞培養用培地 (mTeSR1、StemFit AK02N、Essential 8、StemPartner) の使用を試みた。これらの培地は、線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)、インスリン、トランスフェリンなどの無血清条件下での細胞生存と増殖に必要な因子を基礎培地に加えて生成されている [26]。これらの ES/iPS 細胞培養用培地で Li-7 を 15 日間培養した結果、CD13+CD166-細胞は高い割合で含まれることが判明した (図 1 C)。使用した ES/iPS 細胞培養用培地の中において、Li-7 は mTeSR1 で培養した場合に生存率がよく、増殖速度が安定していた。さらに mTeSR1 培養で長期継代培養した場合、通常培養に比べて CD13+CD166-細胞を高い割合で維持することが明らかとなった (図 1 D、E)。次に、mTeSR1

で完全無血清培養が可能か検討する目的で、継代時に RPMI 1640 + 10% FBS を用いずに mTeSR1 のみを用いて、iPS 細胞培養に用いられるラミニン 511 コーティングディッシュ上の培養を行った。結果、mTeSR1 のみで Li-7 の長期継代培養は可能であったが、次第に CD166⁺細胞が減少することが明らかとなった(図 1 F)。なお、コーティングのない通常ディッシュ上で mTeSR1 のみを使用しても細胞の接着が得られず、長期継代培養は不能であった。これらの結果から、培養当日は RPMI 1640+10% FBS 培地を用い、播種翌日から mTeSR1 培地に切り替える方法を Li-7 における CD13⁺CD166⁺細胞を長期に維持する培養方法として確立した。

4.2 mTeSR1 で培養された Li-7 の性質

次に、4.1 で示した新しい培養方法を用いて培養した Li-7 が CSCs の特徴を持つかどうか検討した。通常培養または mTeSR1 で培養された Li-7 の形態を図 2 A に示す。通常培養された Li-7 は紡錘形の線維芽細胞様の形態である一方、mTeSR1 で培養された Li-7 は小型で円形の形態を示し、より未分化な細胞形態と推察された。続いて、通常培養または mTeSR1 培養された Li-7 において、肝細胞癌の CSCs マーカーである epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)と CD133 の発現をフローサイトメトリーで解析した(図 2 B)。mTeSR1 培養された Li-7 の CD13⁺細胞は、EpCAM および CD133 が高発現していた。さらに、ヒト幹細胞の表面マーカーである SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 についてもフローサイトメトリーで解析した。いずれのマーカーも通常培養した Li-7 に比べて mTeSR1 で培養された Li-7 の CD13⁺CD166⁺細胞で高発現していた(図 2 C)。

次に mTeSR1 で培養した Li-7 においても、CD13⁺CD166⁺細胞が CSCs の特徴を持つことを確認した。まず各細胞集団の ALDH 活性を比較した(図 2 D)。mTeSR1 で培養した Li-7 において CD13⁺CD166⁺細胞は CD13⁺CD166⁻、CD13⁻CD166⁺細胞に比べて高い ALDH 活性を示した。次に mTeSR1 で培養した Li-7 から各細胞集団をセルソーティング

で回収した後に 3 次元培養を行い、そのスフェア形成能を比較した。培養 14 日目の顕微鏡写真を図 2 E に示した。CD13+CD166⁻細胞は CD13+C166⁺、CD13⁻CD166⁺細胞に比べて高いスフェア形成能を示した(図 2 F)。

次に CD13+CD166⁻細胞の分化能を調べる目的で、セルソーティングで回収した CD13+CD166⁻細胞を長期培養し、その表現型をフローサイトメトリーで評価した。mTeSR1 で培養した Li-7 から回収した CD13+CD166⁻細胞を mTeSR1 で維持培養すると、ソート 2 か月後でも CD13+CD166⁻細胞は高率に維持された(図 2 G 左)。一方、この細胞を通常培養に再度切り替えると、次第に CD13 の発現は低下し CD166⁺細胞の出現が確認された(図 2 G 右)。この結果から、mTeSR1 で維持された CD13+CD166⁻細胞は、non-CSCs に分化するポテンシャルを持っていることが示唆された。

4.3 免疫不全マウスにおける腫瘍形成能の比較

次に、通常培養された Li-7 と mTeSR1 で培養された Li-7 の造腫瘍能をヌードマウスへの皮下移植実験で評価した(表 4)。mTeSR1 で培養された Li-7 は 2×10^5 細胞の移植 2 週間後には皮下腫瘍が確認されたが、通常培養された Li-7 は 2×10^6 細胞の移植から 8 週間経過しないと皮下腫瘍は確認できなかった。

通常培養した Li-7 の CD166⁻細胞と CD166⁺細胞、さらに mTeSR1 で培養した Li-7 の CD13+CD166⁻細胞と CD166⁺細胞をそれぞれセルソーティングで回収し、これを 1×10^6 細胞ずつマウスに移植した(表 5)。mTeSR1 で培養した Li-7 の CD13+CD166⁻細胞は、移植 4 週間後には皮下腫瘍が確認されたが、他の細胞分画は移植 12 週間においても腫瘍の生着が確認できなかった。

4.4 mTeSR1 で培養した Li-7 の移植腫瘍の評価

通常培養した Li-7 と mTeSR1 で培養した Li-7 をバルクで 5×10^6 個ずつヌードマウス

に移植して皮下腫瘍を形成させた。取り出した腫瘍のヘマトキシリンエオジン染色の組織像を図 3 A に示した。いずれの腫瘍組織も充実性発育した部分と、偽腺管様構造(図 3 A 下段)を示す部分の混合によって形成されており、組織像は類似していた。

さらに、mTeSR1 で培養した Li-7 が形成した腫瘍細胞を摘出後に長期間通常培養を行うと、次第に CD13 の発現が低下し CD166+細胞が出現するという population change の再現がみられた(図 3 B)。マウスでの腫瘍形成細胞は、*in vitro* で non-CSCs に分化するポテンシャルを持っていることが示された。

4.5 高腫瘍形成細胞の遺伝子解析

CSCs の高腫瘍形成能のメカニズムを解明するために、遺伝子発現解析を行った。最も高い腫瘍形成能を持つ mTeSR1 で培養した Li-7 の CD13+CD166-細胞と、通常培養した Li-7 の CD13+CD166-、CD13-CD166-、CD13-CD166+細胞をそれぞれセルソーティングで回収し、RNA シークエンス解析を行った。最も高い腫瘍形成能を持つ mTeSR1 で培養した Li-7 の CD13+CD166-細胞において、他の細胞集団と比べて高発現であった遺伝子数を図 4 A、低発現であった遺伝子数を図 4 B にそれぞれ示した。mTeSR1 で培養した Li-7 の CD13+CD166-において、他の細胞集団との比較で共通に高発現していた遺伝子数は 24、共通に低発現していた遺伝子数は 25 であった。これらの遺伝子群で PANTHER Classification System (<http://www.pantherdb.org>) のパスウェイ解析を実施したが、候補となるパスウェイは挙げられなかった。その一方で、これらの遺伝子群には線維芽細胞増殖因子受容体(fibroblast growth factor receptor : FGFR)を介するシグナルに関与する遺伝子が複数含まれていた。主なものを図 4 C に示した。*FGFR2*、*3*、*4*に加え、これらのシグナル伝達路下流の転写因子をコードする遺伝子(*EGR1*、*FOS*、*FOSB*、*JUN*、*ETV4*)が、高い腫瘍形成能をもつ細胞集団で高発現していた。さらに、通常の幹細胞のシグナル伝達に関与することが知られている *NOTCH1*、*JAG1*、*BMP2* も、mTeSR1 で培養した Li-7 の

CD13+CD166+細胞において他の細胞集団よりも高発現していた（図 4 D）。

第 5 章 考察

5.1 本研究で明らかとしたこと

Li-7 は分化能を持った CSC 分画を含んだまま細胞株化された貴重な細胞のひとつであるが、この CSC 分画は通常培養によって次第に失われてしまうことが明らかとなっている (population change) [22]。本研究において、市販の ES/iPS 培養用培地を利用した培養方法によって Li-7 の CSC 分画が長期に維持されることを示した。私の知る限り、ES/iPS 細胞培養用培地である mTeSR1 が CSC を維持するのに有用であることを示したのは初めてである。

5.2 CSC 培養法の利点

今回使用した ES/iPS 細胞培養用培地は Figure1C に示したが、これらの培地は通常培養に比べて高い CSC 維持効果を示した。今回使用した ES/iPS 細胞培養用培地のうち、全ての組成が公表されているのは、mTeSR1 と Essential8 であり [27] [28] [29] [30]、Li-7 の培養において細胞の生存率と増殖性が良いのは mTeSR1 であった。今回は Li-7 の培養に mTeSR1 を選択して利用したが、これ以外の市販の ES/iPS 細胞培養用培地も他の癌細胞の CSC の維持に有効である可能性があると考えている。

今回の研究では、市販の ES/iPS 細胞培養用培地を用いており、さらに Li-7 は品質保証された細胞バンクから誰でも入手可能な細胞株の一つである。今回示した CSC 培養法は、誰もがどの研究室でも簡単に再現可能な培養方法である。

5.3 Li-7 と他のがん細胞株の相違点

驚いたことに、Li-7 は培養条件を変更したことで、CD13 陰性の non-CSC 細胞から CD13 陽性の CSC 細胞への脱分化が起こったようにみられた。実際、通常培養した Li-7 から CD13+CD166⁻、CD13⁻CD166⁻、CD166⁺細胞をそれぞれセルソーティングで回収して mTeSR1 培養に切り替えると、CD13⁻CD166⁻細胞からも CD13+CD166⁻細胞が多く出現することを確認している(図 5)。このことから、mTeSR1 での培養で CD13+CD166⁻細胞が優先的に増えたのではなく、CD13⁻細胞は CD13+細胞へ脱分化するポテンシャルを保っていることが示唆された。

すでに細胞株として樹立された細胞に可塑性が認められることは重要な所見である。実際、分化能・脱分化能を持つ CSC を含むヒトがん細胞株は希少である。このことは、Li-7 の樹立方法と関係があると推察する。ほとんどの癌細胞株は、プライマリー細胞から直接 *in vitro* の培養が開始されて樹立されるが、Li-7 はヒト組織から採取後、ヌードマウスでの継代培養を長期間繰り返してから *in vitro* の培養が開始された[31]。ヌードマウスの腫瘍組織内で CSC が維持されたのち、他の細胞株と比べて短期間の *in vitro* の継代培養を経て細胞株化されたことが Li-7 の独自性と関与したものとする。大多数の細胞株は *in vitro* で FBS 含有の通常培養中に CSC が成熟した no-CSC に分化するため、Li-7 のように CSC を含んだ状態で細胞バンクに寄託された細胞株は極めて稀なものである。

5.4 CSC と ES/iPS 細胞の類似点

以前から知られているように、CSC の性質の一部は ES/iPS 細胞と類似する[32]。実際、今回 mTeSR1 で培養した Li-7 の CD13+CD166⁻細胞は、iPS 細胞のマーカーである SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 が高発現しており[33][34]、RNA シークエンス解析では正常幹細胞の維持に関与する遺伝子である FGF シグナル関連遺伝子、*NOTCH1*、*JAG1*、*BMP2*が高発現していた(図 2C、4C、4D)[35][36][37]。mTeSR1 を含めた多くの ES/iPS 細胞培養用培地には basic FGF が含まれており[26]、これが ES/iPS 細胞培養用培地によっ

て Li-7 が高腫瘍形成能を取り戻したことに関与した可能性がある。ES/iPS 細胞の維持に必要なメカニズムと CSC の維持に必要なメカニズムには共通点があると推察され、ES/iPS 細胞培養用培地は Li-7 のみならず他のがん幹細胞においても CSC の高腫瘍形成能獲得メカニズムの研究に有用であると考えられる。

5.5 課題と展望

本研究において、がん幹細胞の高腫瘍形成能獲得メカニズムの解明は達成されなかった。しかし、本研究は高腫瘍形成能獲得メカニズムの解明に必要な、貴重な材料と方法を手することに成功した。本研究の次の段階として、RNA シークエンス解析で得られた候補遺伝子の機能解析を行い、Li-7 のみならず、プライマリー細胞を含めた肝細胞癌の腫瘍形成メカニズムの解明に取り組んでいきたいと考えている。

第 6 章 結論

ES/iPS 培養用培地によって肝細胞癌細胞株 Li-7 の CD13+CD166⁻ CSC が効率的に維持されることを明らかにした。維持された CD13+CD166⁻細胞は、分化能と高腫瘍形成能を示した。今回示した新しい培養方法は、今後の肝細胞癌の腫瘍形成メカニズムの解明と、さらには CSC 標的治療の研究において有用な方法と考えられる。

利益相反

本研究に関わる利益相反はない。

引用文献

1. Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA oncology* 2018, DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.2706:
2. Dutta R, Mahato RI. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy. *Pharmacology & therapeutics* 2017; 173: 106-117
3. Dhanasekaran R, Limaye A, Cabrera R. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics. *Hepatic medicine : evidence and research* 2012; 4: 19-37
4. Ukawa S, Okada E, Nakamura K et al. Characteristics of patients with liver cancer in the BioBank Japan project. *Journal of epidemiology* 2017; 27: S43-s48
5. Raoul JL, Kudo M, Finn RS et al. Systemic therapy for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib and beyond. *Cancer treatment reviews* 2018; 68: 16-24
6. Chacko S, Samanta S. "Hepatocellular carcinoma: A life-threatening disease". *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2016; 84: 1679-1688
7. Song P, Cai Y, Tang H et al. The clinical management of hepatocellular carcinoma worldwide: A concise review and comparison of current guidelines from 2001 to 2017. *Bioscience trends* 2017; 11: 389-398
8. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* 2008; 359: 378-390
9. Bruix J, Qin S, Merle P et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 2017; 389: 56-66
10. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
11. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P et al. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature reviews Cancer* 2012; 12: 133-143
12. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 2006; 66: 9339-9344

13. Bonnet D, Dick J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
14. Park CY, Tseng D, Weissman IL. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther* 2009; 17: 219-230
15. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 14228-14233
16. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell* 2007; 1: 555-567
17. Diehn M, Cho RW, Lobo NA et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458: 780-783
18. Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Seminars in oncology* 2012; 39: 461-472
19. Wang K, Sun D. Cancer stem cells of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9: 23306-23314
20. Oishi N, Yamashita T, Kaneko S. Molecular biology of liver cancer stem cells. *Liver cancer* 2014; 3: 71-84
21. Cao L, Zhou Y, Zhai B et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC gastroenterology* 2011; 11: 71
22. Yamada T, Abei M, Danjoh I et al. 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* 2015; 15: 260
23. Fujita K, Iwama H, Sakamoto T et al. Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo. *International journal of oncology* 2015; 46: 2419-2430
24. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M et al. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells* 2012; 30: 2631-2644
25. Oshima N, Yamada Y, Nagayama S et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PloS one* 2014; 9: e101735
26. International Stem Cell Initiative C, Akopian V, Andrews PW et al. Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46: 247-258
27. Ludwig TE, Bergendahl V, Levenstein ME et al. Feeder-independent culture of

- human embryonic stem cells. *Nature methods* 2006; 3: 637-646
28. Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2014; 4: 3594
 29. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature methods* 2011; 8: 424-429
 30. Takenaka C, Miyajima H, Yoda Y et al. Controlled Growth and the Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells by Cultivation with Defined Medium on Extracellular Matrix-Coated Micropatterned Dishes. *PloS one* 2015; 10: e0129855
 31. Hirohashi S, Shimosato Y, Kameya T et al. Production of alpha-fetoprotein and normal serum proteins by xenotransplanted human hepatomas in relation to their growth and morphology. *Cancer research* 1979; 39: 1819-1828
 32. Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W et al. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappaB signalling. *Nature communications* 2011; 2: 162
 33. Draper JS, Pigott C, Thomson JA et al. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *Journal of anatomy* 2002; 200: 249-258
 34. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature biotechnology* 2007; 25: 803-816
 35. Wang R, Sun Q, Wang P et al. Notch and Wnt/beta-catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells. *Oncotarget* 2016; 7: 5754-5768
 36. Kawaguchi K, Honda M, Yamashita T et al. Jagged1 DNA Copy Number Variation Is Associated with Poor Outcome in Liver Cancer. *Am J Pathol* 2016; 186: 2055-2067
 37. Choi YJ, Ingram PN, Yang K et al. Identifying an ovarian cancer cell hierarchy regulated by bone morphogenetic protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112: E6882-6888

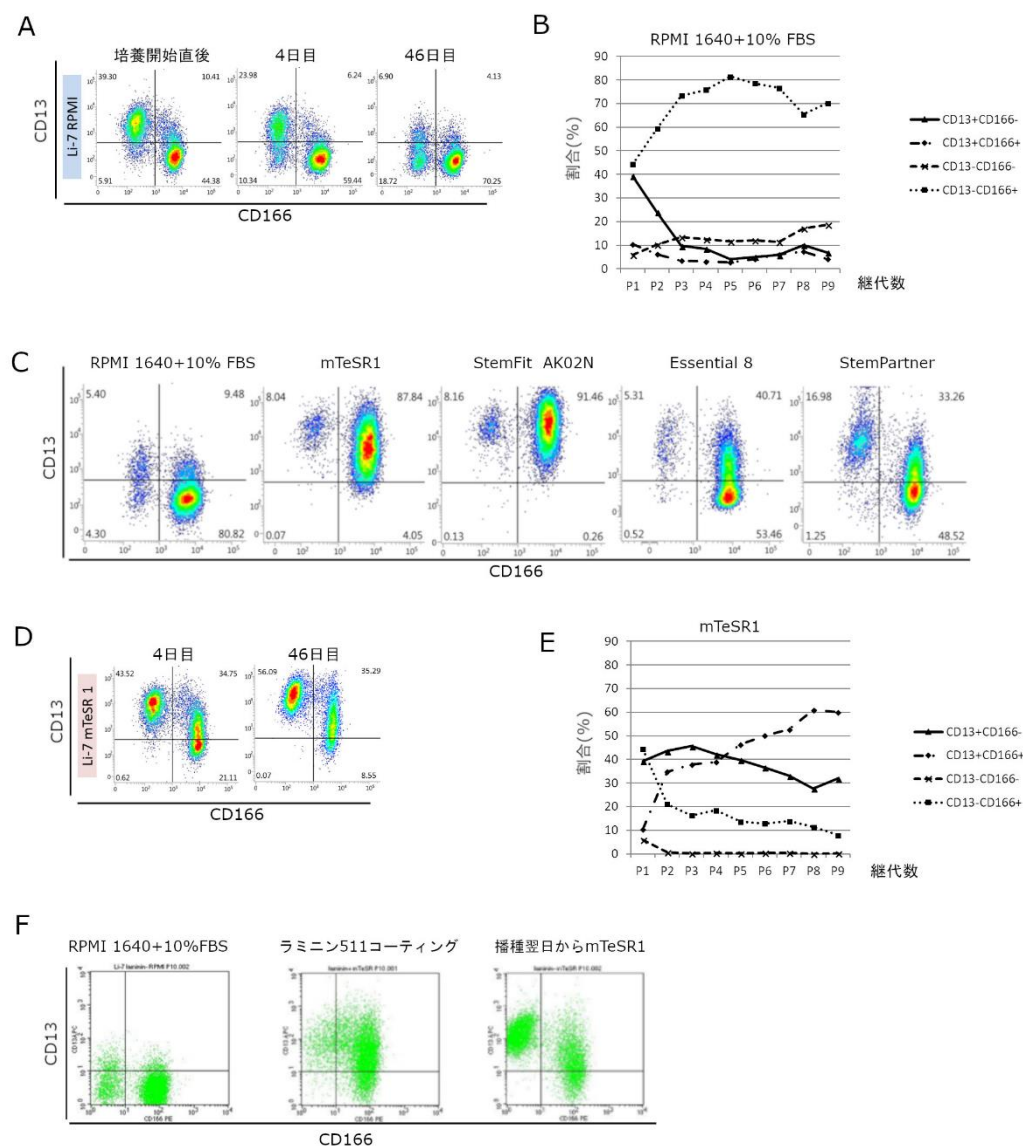


図 1 CD13+CD166-細胞を維持した新しい Li-7 の培養方法の検討

A) RPMI 1640+10% FBS で通常培養した場合の CD13 と CD166 の発現解析結果を示した。B) RPMI 1640+10% FBS で通常培養した場合の各継代時における細胞分画の割合を示した。C) RPMI+10%FBS と ES/iPS 細胞培養用培地で 15 日間培養した場合の CD13 と CD166 の発現解析結果を示した。D) 播種翌日から mTeSR1 で培養した場合の CD13 と CD166 の発現解析結果を示した。E) 播種翌日から mTeSR1 で培養した場合の各継代時における細胞分画の割合を示した。F) RPMI 1640+10% FBS で通常培養(左)、mTeSR1 のみでラミニン 511 コーティングディッシュ上に培養(中央)、播種翌日から mTeSR1 培養(右)を 10 継代行った後の CD13 と CD166 の発現解析結果を示した。

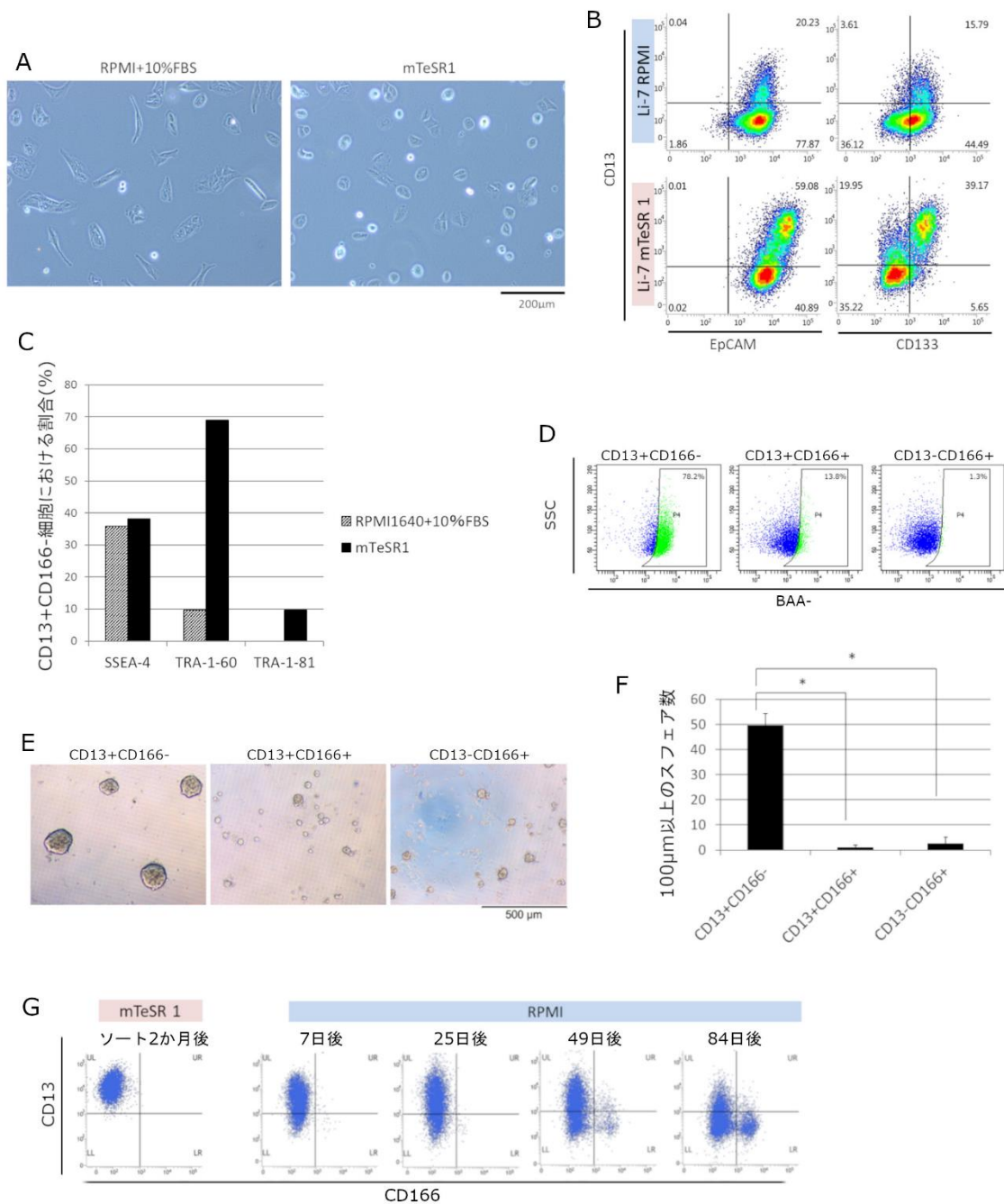


図2 mTeSR1 培養された Li-7 の評価

A) 通常培養された Li-7 (左)、mTeSR1 で培養された Li-7 (右)の形態写真を示した。B) 通常培養(上段)と mTeSR1 で培養(下段)された Li-7 の CD13 と EpCAM および CD133 の発現をフローサイトメトリーで解析した。C) 通常培養および mTeSR1 で培養した Li-7 の CD13+CD166-細胞における SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 の発現をフローサイトメトリーで解析した。D) mTeSR1 で培養した Li-7 の各細胞分画の ALDH 活性をフローサイト

メトリー解析で比較した。E、F) mTeSR1 で培養した Li-7 の各細胞分画をセルソーティングで回収後に 3 次元培養し、スフェア形成能を比較した。G) mTeSR1 で培養した Li-7 から CD13+CD166+細胞をセルソーティングで回収後に mTeSR1 で維持培養(左)、または通常培養(右)した。培地の切り替えから 7 日後、25 日後、49 日後、84 日後に CD13 と CD166 の発現をフローサイトメトリーで解析した。

* $p < 0.05$

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule

SSC : side scatter

BAA- : Bodipy-aminoacetate

ALDH: aldehyde dehydrogenase

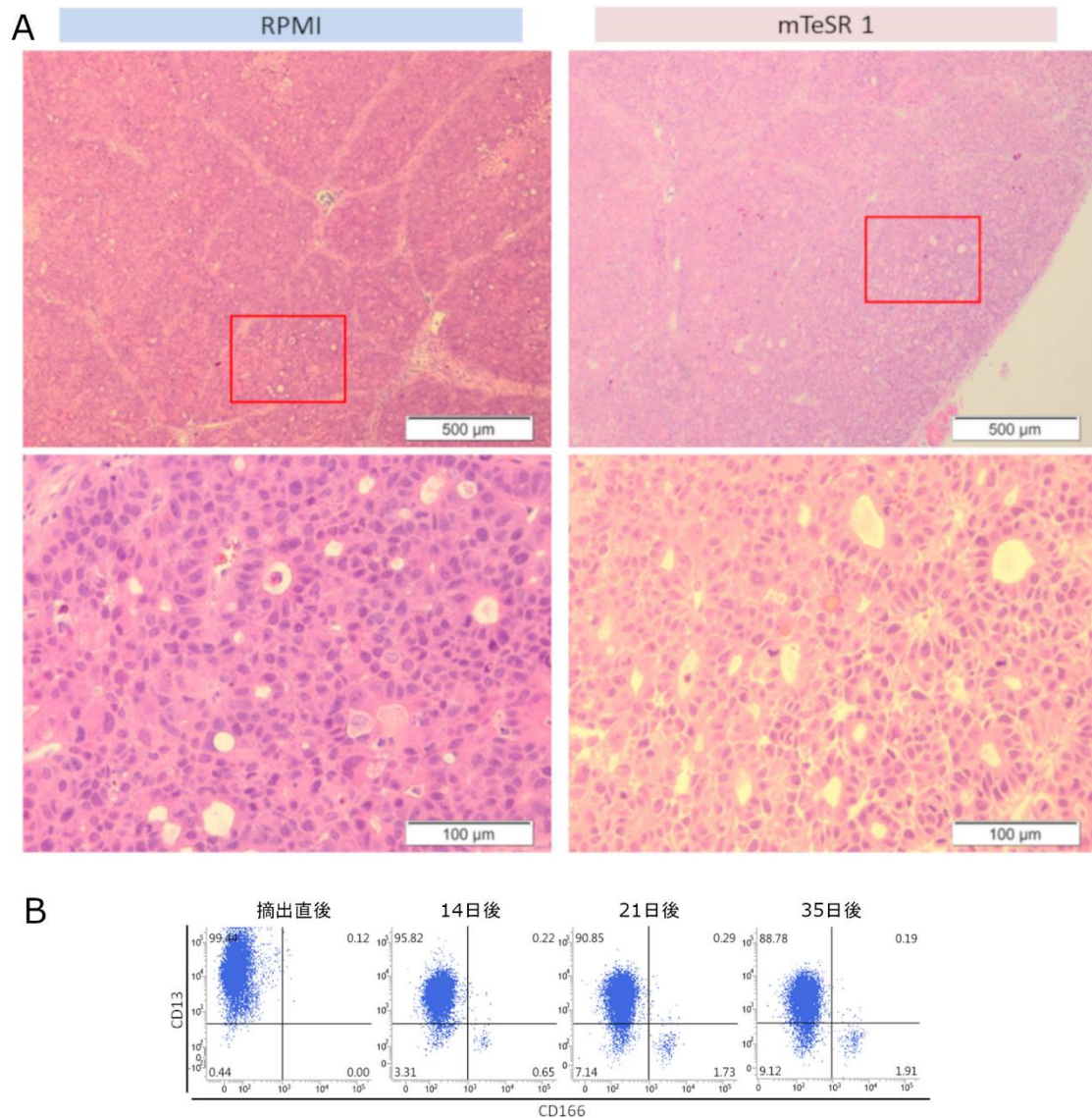


図 3 移植腫瘍細胞の評価

A) 通常培養した Li-7 の移植腫瘍組織像(左)と mTeSR1 培養した Li-7 の移植腫瘍組織像(右)を示した。上段は低倍率(40 倍)、下段は赤い四角形で囲った部分の高倍率(400 倍)での観察。B) mTeSR1 培養した Li-7 の移植腫瘍を摘出して通常培養し、摘出直後、14 日後、21 日後、35 日後の CD13 と CD166 のフローサイトメトリー解析結果を示した。

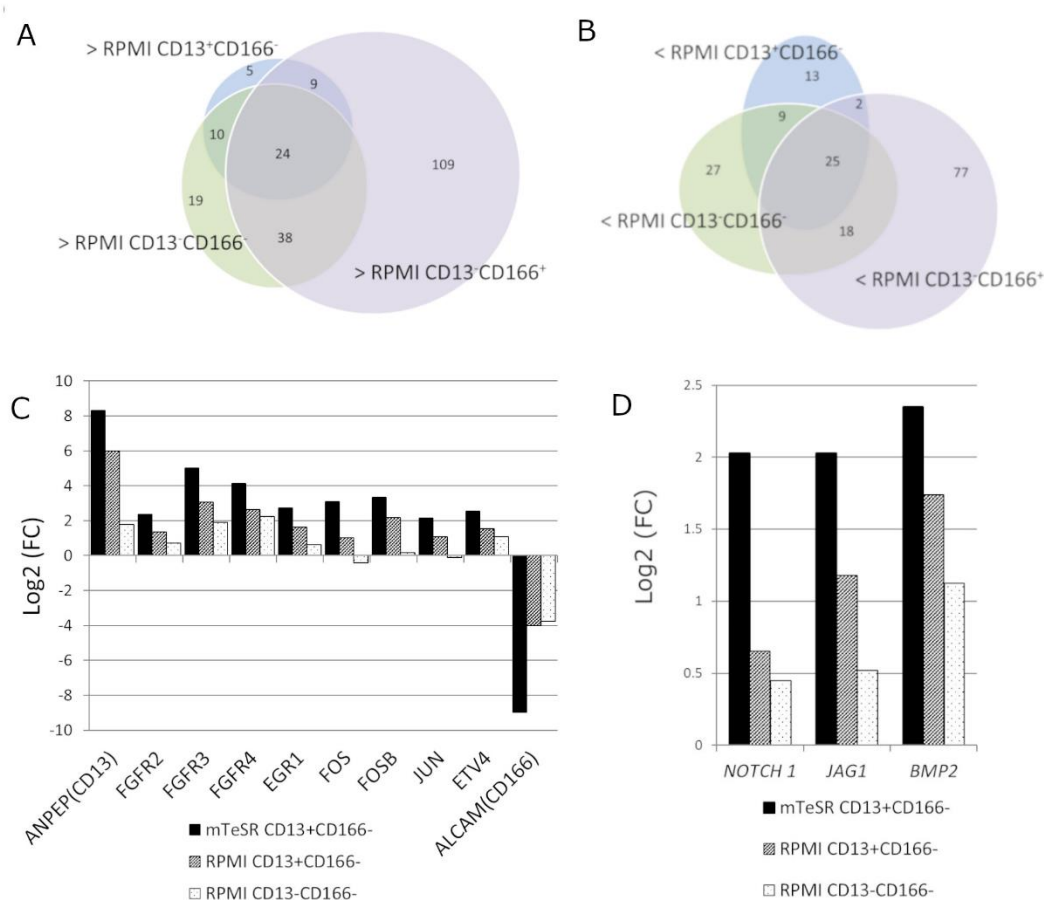


図4 高腫瘍形成 Li-7 の遺伝子発現解析

A, B) mTeSR1 で培養された Li-7 の CD13⁺CD166⁻細胞において、他の分画に比べて高発現(A)、低発現(B)であった遺伝子の数を示した。C) 各細胞集団における FGFR シグナル関連遺伝子の発現を、RPMI で培養された Li-7 の CD13⁻CD166⁺細胞と比較して示した。ANPEP(CD13)と ALCAM(CD166)をそれぞれポジティブ/ネカティブコントロールとして示した。D)各細胞集団における NOTCH1、JAG1、BMP2 の発現を、RPMI で培養された Li-7 の CD13⁻CD166⁺細胞と比較して示した。

FGFR : fibroblast growth factor receptor

FC : fold change

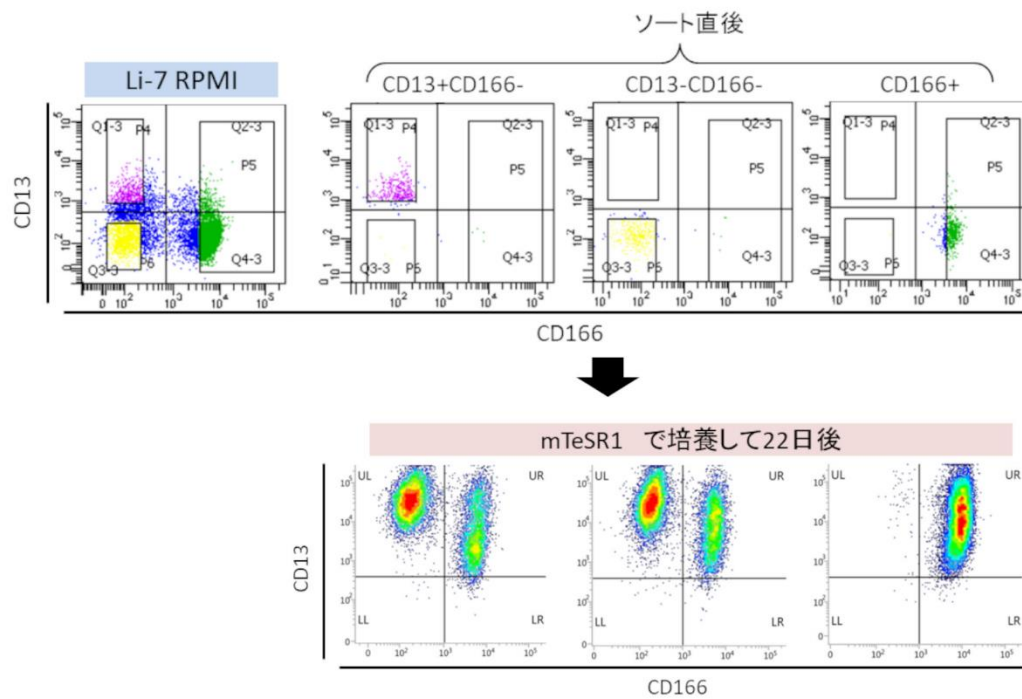


図 5 CD13 陰性細胞から CD13 陽性細胞の出現

通常培養した Li-7 から CD13+CD166⁻、CD13-CD166⁻、CD166⁺細胞をそれぞれセルソーティングで回収し、直後から mTeSR1 培養に切り替えた。切り替えてから 22 日後の CD13、CD166 のフローサイトメトリー解析結果を下段に示した。

表 1 肝細胞癌がん幹細胞のマーカー

マーカーの種類	マーカーの名称	文献
細胞表面マーカー	CD133	Gastroenterology 2007; 132: 2542-56.
	CD90	Cancer Cell 2008; 13: 153-66.
	CD13	J Clin Invest 2010; 120: 3326-39.
	CD44	Int J Cancer 2010; 126: 2067-78.
	CD24	Cell Stem Cell 2011; 9: 50-63.
	EpCAM	Gastroenterology 2009; 136: 1012-24.
機能性マーカー	SP cells	Stem Cells 2006; 24: 506-13.
	ALDH 高活性	Mol Cancer Res 2008; 6: 1146-53.

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule

SP : side population

ALDH : aldehyde dehydrogenase

表 2 Li-7 のマウス造腫瘍能の変化

	移植数	マウス	2 か月後の腫瘍形成
2012 年に使用された Li-7	1×10^6	BALB/cA nu/nu, female	4/4
2016 年に再入手した Li-7	1×10^6	BALB/cA nu/nu, female	0/4

表 3 本研究で用いた蛍光色素抗体

抗原名	クローン	蛍光標識	メーカー
CD13	WM-15	APC	eBioscience
CD166	3A6	PE	BD Biosciences
CD166	REA442	PE-Vio770	Miltenyi Biotec
EpCAM	1B7	PE-Cy7	BD Biosciences
CD133/2	293C3	APC	Miltenyi Biotec
HLA-ABC	G46-2.6	PE-Cy7	BD Biosciences

APC : allophycocyanin

PE : phycoerythrin

Cy7 : cyanine-7

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule

HLA : human leucocyte antigen

表 4 通常培養された Li-7 と mTeSR1 培養された Li-7 のマウス皮下移植実験

培養条件	移植細胞数	2 週	4 週	6 週	8 週
RPMI 1640 + 10% FBS	1×10^6	0/4	0/4	0/4	0/4
	2×10^6	0/4	0/4	0/4	1/4
	5×10^6	0/4	0/4	0/4	1/4
mTeSR1	2×10^5	2/4	4/4		
	5×10^5	4/4			

表 5 セルソーティングで回収した各細胞集団のマウス皮下移植実験

培養条件	移植した細胞分画	2 週	4 週	6 週	8 週	12 週
RPMI 1640 + 10% FBS	CD166-	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	CD166+	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
mTeSR1	CD13+CD166-	0/2	1/2	2/2		
	CD166+	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

参考論文

- Hamano Yukako, Moriwaki Toshikazu, To Keii, Watahiki Takahisa, Yamada Takeshi, Sakashita Shingo, Hyodo Ichinosuke. A neuroendocrine tumor of unknown primary origin that responded to treatment based on tumor grade progression: A Case Report. Internal medicine に掲載予定
- Takeshi Yamada, Yukako Sato, Naoyuki Hasegawa, Emiko Seo, Kuniaki Fukuda, Kazunari K. Yokoyama, Ichinosuke Hyodo and Masato Abei. Oncolytic virotherapy and gene therapy strategies for hepatobiliary cancers. Current Cancer Drug Targets. 18(2): 188-201, 2018.

謝辞

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おいて、本研究のご指導をいただいた中村 幸夫 室長に感謝を申し上げます。研究の道筋をお示しいただき、実験手技上の多大なるご指導もいただいた同室の寛山 隆 博士、須藤 和寛 博士に感謝します。動物実験および RNA 取り扱い実験のご指導をいただいた同室の井上 循 技師に感謝します。理化学研究所において技術的および事務的サポートをいただいた同室の野口 道也 博士に感謝します。その他、理化学研究所で研究を行う上での多くのサポートを頂いた同室のすべてのメンバーに感謝します。RNA シーケンス解析についてご助言をいただいた理化学研究所バイオリソースセンター疾患ゲノム動態解析技術開発チームの鈴木 伸ノ介 特別研究員に感謝します。本研究に多くのご助言ご指導を頂いた山田 武史 先生と長谷川 直之 先生に感謝します。

本研究を進めるにあたり、研究の全体像をご評価いただき、多大なるご助言ご指導を賜りました兵頭 一之介 教授に感謝を申し上げます。

最後に、私を常に支え励ましてくれた家族に感謝します。本研究が未来のがん治療の発展にわずかでも役立つことを願っています。