

脱分化型肝細胞癌由来細胞株から誘導した癌幹細胞様

Sphere 細胞は抗癌剤耐性を有する

氏名 橋本 憲輝

所属 山口大学大学院 医学系研究科

応用分子生命科学系専攻

消化器・腫瘍外科学分野

平成 26 年 12 月

目 次

1.	要旨	1
2.	背景	2
3.	目的	3
4.	方法	3
5.	結果	5
6.	考察	10
7.	結語	13
8.	謝辞	13
9.	参考文献	14
10.	図	21

1. 要旨

【背景】 癌幹細胞は癌の治療抵抗性に重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、特殊培地を用いてヒト肝細胞癌細胞株から癌幹細胞様細胞を誘導し、その抗癌剤耐性を解析した。【方法】 ヒト肝細胞癌細胞株である SK-HEP-1 (SK)、HLE、Hep 3B、HuH-7 を用いて、neural survival factor-1 を添加した幹細胞用培地にて幹細胞様細胞 (Sphere 細胞) の誘導を行った。幹細胞マーカーとして *NANOG* と *LIN28A* の発現を解析した。癌幹細胞の表面マーカーである CD24 や CD44、CD44 variant、CD90 の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。抗癌剤耐性に関しては MTS アッセイ、細胞周期解析、活性酸素種 (ROS) 活性アッセイにより評価した。【結果】 低分化型肝細胞癌由来の SK と未分化型肝細胞癌由来の HLE からは効率的に Sphere 細胞が誘導されたが、高分化型肝細胞癌由来の HuH-7、Hep 3B からは誘導されなかった。SK より誘導された Sphere 細胞 (SK-sphere) は、*NANOG*、*LIN28*、*ALDH1* の mRNA 発現が亢進していた。また、SK-sphere では CD44 variant の発現が亢進していた。数種類の抗癌剤存在下で、ソラフェニブを除き、SK-sphere は高い細胞生存率を示した。細胞周期において SK-sphere は G0/G1 期の割合の増加を示した。また、SK-sphere における *ABCG2* と *HIF1A* の mRNA 発現亢進と活性酸素種の低下が観察された。【結語】 我々の新規 Sphere 細胞誘導培養法により癌幹細胞様細胞が効率よく誘導可能であり、それらは化学療法抵抗性を示した。その機序には細胞周期や薬剤排出能、活性酸素種の関与が考えられた。

2. 背景

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma、以下、HCC) は、世界で 6 番目に罹患率が高く、年間 100 万人以上が罹患し、癌死の原因として 3 番目に多い悪性腫瘍である¹⁾。その治療法として肝切除術や肝移植、腫瘍焼灼術などが挙げられるが、進行期の HCC に対してはいまだ有効性が定かではなく、5 年再発率は 40～80%とされる²⁾³⁾。肝動脈化学塞栓療法や全身及び局所化学療法、インターフェロン療法、免疫療法、経口非環式レチノイド療法などが補助療法として行われているが、それらの有効性も一定の見解を得られていない。そのため HCC の予後改善をめざし、新たな補助療法の確立が必要である。

近年、HCC を含めた癌の特性を研究する上で、癌幹細胞 (Cancer stem cells、以下、CSCs) が注目されている。CSCs は幹細胞の特性、つまり自己複製能や腫瘍形成能、転移能、化学療法抵抗性を有する⁴⁾。腫瘍の形成や再発に関わる CSC の性質を研究する方法としては、摘出標本や癌細胞株から CSCs の分離に関する報告が多い。その結果、Side-population 分画といくつかのタンパクが CSCs のマーカーとして同定された⁵⁾⁶⁾。これらのマーカーとして CD44 や CD133、CD90、CD13、Aldehyde dehydrogenase (ALDH)、Oval cell marker (OV6)、Epithelial cell adhesion molecule が挙げられるが⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、CSCs との関連性に一定の見解は得られていない¹⁵⁾。一方、Epidermal growth factor (EGF) や Basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加した無血清培地にて得られる Sphere 形成細胞が、CSC の特性を豊富に有していると考えられつつあり、Sphere 細胞が自己複製能と腫瘍形成能を有したことから、CSC 様細胞であると結論付けた報告がある¹⁶⁾¹⁷⁾。

当初、CSCs あるいはその前駆細胞は、一方向性を有する細胞分化階層性の頂点に存在すると考えられていた¹⁸⁾。この理論に基づき、多くの研究では、低分

化型 HCC と比較してより多くの CSCs を含むと予想された高分化型 HCC 細胞株からの CSCs の分離が試みられた¹⁷⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾。一方、最近の乳癌に関する研究で、分化した癌細胞が Epithelial-mesenchymal transition (EMT) を介して CSC 様細胞へ変化することが明らかにされ、癌細胞の可塑性が提唱された²³⁾。さらに、神経膠腫や口腔扁平上皮癌の研究においても、低分化な癌細胞から形成された Sphere 細胞が、高分化な癌細胞から形成されたものと比較し、CSC マーカーの発現が亢進していたと報告されている²⁴⁾²⁵⁾。一方、HCC に関しての最近の研究では、高分化型 HCC からの CSCs の分離が試みられているのみである。

3. 目的

本研究では、先述した癌細胞の可塑性理論に基づき、画期的な培養方法を用いて低分化型 HCC 細胞株から CSCs の誘導を行い、これを解析することとした。

4. 方法

4-1. 癌細胞株

ヒト HCC 細胞株である SK-HEP-1 (SK) および HLE、HuH-7、Hep 3B は Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入した。SK は低分化型 HCC 由来、HLE は未分化型 HCC 由来であり、HuH-7 と Hep 3B は高分化型 HCC 由来の細胞株である。細胞の培養は 10% FBS (Life Technologies, Tokyo, Japan) を添加した DMEM 培地 (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) にペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 μ /ml)、炭酸水素ナトリウム (1.5 g/l) を加えた培地により 5% CO₂、37°C 下にて静置培養した。

4-2. Sphere 細胞の誘導

細胞を神経幹細胞培地を基に作成した Sphere 誘導培地に懸濁して行った。Sphere 誘導培地の基本組成は、DMEM/F12 培地(Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) に HEPES (10 mM) (Sigma-Aldrich)、抗生物質/抗真菌物質 (ペニシリン ; 100 U、ストレプトマイシン ; 0.1 mg、アムホテリシン B ; 250 ng) (Sigma-Aldrich)、グルコース (0.6%) (Sigma-Aldrich)、トランスフェリン (1 mg/ml)、インスリン (250 μ g/ml) (Sigma-Aldrich)、プトレシン (0.6 mM) (Sigma-Aldrich)、亜セレン酸ナトリウム (0.3 μ M) (Sigma-Aldrich)、プロゲステロン (0.2 μ M) (Sigma-Aldrich)を加えた。最終的に Sphere 細胞を誘導する際には、これにヘパリン (2 μ g/ml) (Sigma-Aldrich)、ヒト組み換え EGF (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich)、bFGF (10 ng/ml) (Merck Millipore, Tokyo, Japan)、白血病阻止因子 (LIF) (10 ng/ml) (Merck Millipore)、N アセチル L システイン (NAC) (60 ng/ml) (Sigma-Aldrich)、Neural survival factor-1 (NSF-1) (1/50 vol.) (Lonza, Tokyo, Japan)を添加した培地を用いた。培養方法は、まず、細胞採取の後に血清含有通常培地を除去し、Sphere 誘導培地にて培養を開始した。翌日に浮遊細胞塊を採取し、親水性超低接着性フラスコ (Corning, NY)に移し替え、培養を継続した。

4-3. 半定量リアルタイム PCR (Semi-quantitative real-time PCR, semi-qRT-PCR)

我々の施設が以前報告した Semi-qRT-PCR 法²⁶⁾に一部変更を加えて、細胞の遺伝子発現を解析した。PCR 増幅は Light Cycler System Version 3 (Roche Diagnostics)を用いて行い、Light-Cycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics,

Tokyo, Japan)と Universal ProbeLibrary Probes (Roche Diagnostics)を用いた (各プライマーとプローブは表 1 に記載した。)。PCR 反応は二段階サイクル法を用いて、95°C、10 秒の変性と 60°C、30 秒のアニーリングを 45 サイクル行った。PCR 産物の定量は、mRNA レベルで $\Delta\Delta$ 閾値サイクル法 (threshold cycle, CT) を用いて解析した。比較対照遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH))とホスホグリセリン酸キナーゼ 1(Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1))を用いた。

4.4. フローサイトメトリー

培養した細胞はアキュマックス(Innovative Cell Technologies, San Diego, CA)により分離し、Fixable Viability Dye eFluor 450 (eBioscience, San Diego, CA)により染色することで生死の判別を行った。フローサイトメトリーに際して、用いた抗体は APC 標識抗 CD44 抗体 (eBioscience)、APC 標識抗 CD24 抗体 (eBioscience)、FITC 標識抗 CD90 抗体(Miltenyi Biotec, BergischGladbach, Germany)を用い、ネガティブコントロールとして各々、APC 標識ラット IgG2b アイソタイプコントロール(eBioscience)、APC 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロール(R&D Systems)、FITC 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロール(R&D Systems)を用いた。CD44 variant の染色には抗 CD44v9 抗体(Cosmo Bio, Tokyo,Japan)および FITC 標識マウス抗ラット IgG 抗体(eBioscience)を一次および二次抗体として用いた。抗 CD44v9 抗体のネガティブコントロールとしてラット IgG2a アイソタイプコントロール(eBioscience)を用いた。フローサイトメトリーは MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec)を用いて行った。

また、細胞周期解析はプロピジウムイオダイドによる核酸染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。細胞を 70%エタノールで固定した後に、

PI/RNase Staining Buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)に再度懸濁した。MACSQuant analyzer により Singlet 細胞の DNA 組成を解析した。

4-5. 薬剤感受性試験

細胞の薬剤感受性は、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Tokyo, Japan)を用いて、

3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfohenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay により解析した。96 ウェルのプレートに 5×10^3 個/well の細胞をまき、Sphere 誘導培地で 7 日間培養した。次に、各ウェルに同量ずつの抗癌剤含有培地、すなわち 5-フルオロウラシル(5-FU, Sigma-Aldrich)、シスプラチン(Sigma-Aldrich)、カルボプラチン(Sigma-Aldrich)、ドキソルビシン(Sigma-Aldrich)、ドセタキセル(Sigma-Aldrich)、スベロイラニリド・ハイドロザミック酸(SAHA, Cosmo Bio)、イリノテカン(Sigma-Aldrich)、スニチニブ(Sigma-Aldrich)、ソラフェニブ(MBL, Nagoya, Japan)を加え、37°Cで 24 時間培養を継続させた。さらに、各細胞に MTS 試薬を加え、さらに 37°Cで 2 時間反応させた。最後に EnVision plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA)を用いて、492nm、650nm の波長で吸光度を測定した。これらの実験は同一条件下の 3 個のプレートで行った。

4-6. ROS 活性アッセイ

細胞内の ROS 活性は Oxi-Select ROS Assay Kit (CELL BIOLABS, San Diego, CA)を用いて解析した。原理としては、細胞膜透過性蛍光色素である 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)を細胞に加えると、細胞内エラスターゼにより DCFH-DA は非透過性の非蛍光合成物である DCFH に変換され

る。ROSによりDCFHが酸化され、強く蛍光するDCFが産生される。細胞内のDCFの蛍光強度をEnVision plate readerを用いて測定した。これらの実験は同一条件下の3個のプレートで行った。

4-7. 統計学的解析

各実験は3回以上繰り返し行い、実験データは平均値±標準偏差で表記した。各群間の有意差検定はMann-Whitney U-testまたはANCOVA解析を用いて行った。統計解析ソフトウェアはSPSS Statistics 17.0 software (IBM, Tokyo, Japan)を用いた。有意差は*P*値が0.05未満の時、有意差ありとした。

5. 結果

5-1. HCC細胞株からのSphere細胞の誘導

SK、HLE、Hep 3B、HUH-7の4種類のヒトHCC細胞株を用いてSphere細胞の誘導を行ったところ、SKとHLEの細胞からはSphere細胞が形成された(以下、各SK-sphereおよびHLE-sphere)(図1)。さらにSK-sphereはHLE-sphereと比較しより大きな浮遊細胞塊を形成した(図1A-D)。また、SK細胞数を 1×10^5 cells/mlと高密度で培養を開始した場合に、より多くのSphere細胞を誘導可能であった(図1E・F)。一方、同じ細胞密度のHLEからはSphere細胞のみならず接着細胞も形成された(図2)。これらのSphere細胞を翌日に親水性超低接着性フラスコへ移したところ、SK-sphereは再度、形成されたが(図1E)、HLE-sphereはSphere細胞が凝集するのみであった(図1F)。

SK-sphereとHLE-sphereを一旦、解離して、再度Sphere誘導培地で培養したところ、再びSphereを形成した(図2C・D)。さらに、解離したSK-sphereとHLE-sphereを通常のFBS含有培地で培養したところ、接着細胞が形成され

た。(図 2E・F)。同じ条件下で Hep 3B と HUH-7 からは浮遊細胞も形成されなかった(図 2G・H)。我々が用いた Sphere 誘導培地から NSF-1 を除去して SK の培養を行ったところ、Sphere 細胞は誘導されなかった(図 3)。逆に、通常培地に NSF-1 のみ添加し誘導を試みたところ、Sphere 細胞が形成されたが、フラスコへの接着が見られた。我々が用いた、NSF-1 を添加した Sphere 誘導培地では、低分化型 HCC 細胞株、とりわけ SK からは Sphere 細胞が形成されたが、高分化型 HCC 細胞株からは誘導されなかった。この結果から、高密度の細胞から誘導された 7 日目の SK-sphere に焦点を当てて、以後の解析に用いることとした。

5-2. 幹細胞マーカーの発現

semi-qRT-PCR の結果、SK-sphere では親細胞と比較し *NANOG* と *LIN28A* の mRNA が高発現していた(図 4)。さらに SK-sphere は親細胞と比較し、3 倍の ALDH 活性を示した(図 5)。しかしながら、HLE-sphere は、SK-sphere の場合と比較し、*NANOG* の mRNA の発現の差はわずかであった(図 4A)。

5-3. CSC マーカーの発現

これまでに提唱されてきた HCC の CSC マーカー、すなわち CD44 standard isoform (CD44s)、CD44 variant isoform (CD44v)、CD24、CD90、CD133 に関して、フローサイトメトリーにより解析した。SK-sphere と HLE-sphere は、Sphere を形成しなかった Hep 3B と HUH-7 と比較し、CD44s が高発現していた(図 6A)。さらに SK-sphere と HLE-sphere は各親細胞と比較し、CD44v が 4.5 倍以上高発現していた ($P < 0.05$ 、図 6B-D)。一方で、CD24 と CD90 に関しては、いずれの Sphere 細胞も親細胞より低発現であった(図 7A・B)。CD133

に関しては、親細胞である SK、HLE いずれにおいても発現を認めなかった。SK-sphere においても発現誘導はなく、HLE-sphere においてわずかに発現しているのみであった (図 7C)。

5-4. SK-sphere の抗癌剤感受性

SK および SK-sphere を各種抗癌剤に 24 時間暴露した後に、細胞のミトコンドリア活性を指標として細胞生存率を測定することで抗癌剤感受性を解析した (図 8)。この結果、5-FU、シスプラチン、カルボプラチン、ドキソルビシン、ドセタキセル、SAHA、イリノテカン、およびスニチニブに対し、SK-sphere は SK と比較し、有意に薬剤耐性を示した (1.7-7.3 倍、 $P<0.05$)。興味深いことに、ソラフェニブに対して、SK-sphere および SK はいずれも感受性を示した (図 8I)。同様に HLE-sphere は HLE と比較し化学療法抵抗性を示した (図 9)。これらの結果から、いずれの Sphere 細胞も異なった種類の抗癌剤に対し耐性を有することが判明した。

5-5. ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの発現

我々は semi-qRT-PCR とフローサイトメトリーを用いて、ABC トランスポーターの一つである *ABCG2* の mRNA およびタンパクの発現を解析した。

SK-sphere では SK と比較し、*ABCG2* の mRNA が約 3 倍高発現しており

($P<0.05$ 、図 10A)、同様に、*ABCG2* はタンパクレベルでも高発現していた (図 10B-D)。一方、HLE-sphere と HLE においては *ABCG2* の発現量に差は認めなかった (図 10D)。

5-6. Sphere 細胞における細胞周期分布

細胞周期の分布は、SK では G0/G1 期 ; $64.5 \pm 3.2\%$ 、S 期 ; $13.9 \pm 4.7\%$ 、G2/M 期 ; $21.6 \pm 1.5\%$ であった。一方、SK-sphere では G0/G1 期 ; $87.8 \pm 7.8\%$ 、S 期 ; $2.5 \pm 1.9\%$ 、G2/M 期 ; $9.7 \pm 5.9\%$ であった (図 11A・B)。HLE-sphere も同様に親細胞と比較し G0/G1 期の細胞が増加していた (図 11C・D)。また、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子である *P21* の mRNA が SK-sphere では 2 倍、HLE-sphere では 2.2 倍、各親細胞と比較し有意に高発現していた (図 11E)。

5-7. HIF 1 α と ROS レベル

低酸素誘導因子の一つである HIF1 α と細胞内 ROS レベルを、各々 semi-qRT-PCR と ROS 活性アッセイにより解析した。Semi-qRT-PCR の結果、SK-sphere では親細胞と比較し HIF1 α をコードする *HIF1A* の mRNA が約 2.4 倍高発現していた ($P < 0.05$ 、図 12A)。また、SK-sphere では親細胞よりも ROS 活性が低いことが観察された (約 0.1 倍、 $P < 0.05$ 、図 12B)。同様に、HLE-sphere においても *HIF1A* の高発現と低 ROS 活性が示された (図 12)。これらの結果から、SK-sphere と HLE-sphere はいずれも抗酸化能を有する可能性が示唆された。

6. 考察

本研究において、我々は NSF-1 を添加した培地を用いて、ヒト低分化型 HCC 由来細胞株である SK から Sphere 細胞を誘導する画期的な方法を樹立した。また、未分化型 HCC 由来細胞株である HLE からも Sphere 細胞の誘導は可能であった。一方、高分化型 HCC 由来細胞株である Hep 3B と HuH-7 からは、同じ条件下でも Sphere 細胞は誘導されなかった。SK-sphere は SK と比較して CSC マーカーの高発現を認め、抗癌剤耐性を有していた。さらに、SK-sphere

では ABCG2 の高発現、細胞周期における G0/G1 期への停滞、HIF1A の高発現と ROS の低下が観察された。

近年、様々な癌種において、Sphere 細胞が幹細胞様の特性を有すると考えられており¹⁶⁾¹⁷⁾²⁷⁾、Sphere 細胞の分離という実験方法は、細胞に傷害を与えるソーティングが不要であるという利点を有する。通常、Sphere の形成には bFGF ならびに EGF を添加した無血清培地が用いられる¹⁵⁾¹⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾。我々は、これらに加え、SK-sphere の誘導に不可欠であった NSF-1 を添加した (図 3)。我々の考案したこの方法では、容易にかつ多数の癌幹細胞様細胞が採取可能となった。これまでに報告された、いくつかの研究では NSF-1 の代わりに B27 や N2 が添加されている¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²⁷⁾²⁹⁾。データは示していないが、我々は NSF-1 を添加した方が、B27 を添加した場合よりも Sphere 細胞が効果的に誘導可能であったことを確認した。さらに、我々の考案した方法では、単一の細胞から Sphere が形成された (図 1)。

興味深いことに、我々の用いた方法では、低分化型または未分化型 HCC 細胞株である SK と HLE からは Sphere 細胞が誘導されたが、高分化型 HCC 細胞株である Hep 3B と HuH-7 からは誘導されなかった。SK-sphere においては幹細胞マーカーである NANOG と LIN28 の高発現、ALDH 活性、CD44 の高発現を認めた (図 4・6)。NANOG と LIN28 は、幹細胞の表現型を維持することに不可欠な、多能性に関する遺伝子、マスター転写因子として同定されており³⁰⁾³¹⁾、また、癌幹細胞が高い ALDH 活性を有することが様々な癌種において報告されている³²⁾³³⁾。CD44 variant isoforms に関しては、数種類の固形癌において CSC や転移能のマーカーとして同定されている⁷⁾³⁴⁾。一方、本研究で誘導した Sphere 細胞では CD24 の低発現が観察され (図 7)、乳癌での CSCs の研究において同様のことが報告されている³⁵⁾。しかしながら、これまで HCC の CSC

マーカーとされてきた CD133 は⁸⁾⁹⁾¹³⁾、SK-sphere と HLE-sphere のいずれにおいても発現は認めず(図 7)、さらに CD133 が発現していた Hep 3B と HuH-7 では Sphere 細胞が誘導されなかった。既知の報告では、高分化型 HCC 細胞株の方が低分化型のものよりも CSCs を多く有するとされてきた²²⁾。我々の研究結果から、癌原発巣の発生に関わる階層性の頂点に位置する CSCs¹⁸⁾と、可塑性を有する進行癌由来の CSCs²³⁾とに、特性の相違があることが示唆された。また、癌の微小環境における contextual signal や EMT が、CSC 様細胞の形成を含めた癌の可塑性に寄与するといわれる³⁶⁾。データは示していないが、実際、SK-sphere において間葉系マーカーである Vimentin の高発現が観察された。

近年、CSCs は癌の化学療法抵抗性において重要な役割を果たしていると考えられている⁹⁾³⁷⁾³⁸⁾。我々が誘導した CSC 様細胞である SK-sphere と HLE-sphere も、親細胞と比較して、5-FU やシスプラチン、カルボプラチン、ドキシソルビシン、ドセタキセル、SAHA、スニチニブに対し耐性を示した。よく知られている化学療法抵抗性の機序の一つとして、抗癌剤排出に関わる ABC トランスポーターの高発現がある³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾。SK-sphere において、そのうちの一つである ABCG2 の高発現を認めたが、HLE-sphere と HLE の間には ABCG2 の発現に差はみられなかった(図 10)。また、CSC dormancy、つまり CSC の細胞周期における活動停止期の存在も、化学療法抵抗性に関与していると考えられている⁴⁰⁾。

SK-sphere では、細胞周期において G0/G1 期への停滞が観察され、P21 の mRNA が高発現していた(図 11)。P21 は G1 期における細胞周期進行を抑止する重要な調節因子である⁴¹⁾⁴²⁾。

さらに、癌の化学療法抵抗性において ROS も重要な因子である。SK-sphere と HLE-sphere で、HIF1A の高発現と ROS 活性の低下を認めた(図 12)。CSCs は ROS 活性が低下しており、非 CSC 細胞と比較し DNA 傷害を回避する機構

を有している。HIF1A は、低酸素下で活性される主要転写因子ファミリーの一つであるが、ROS 産生を減少させる重要な因子とされる²⁸⁾⁴³⁾⁴⁴⁾。加えて、CD44 variant isoform は、シスチンのトランスポーターである xCT を細胞膜で安定化し、抗酸化物質の合成を促進する⁴⁵⁾。SK-sphere と HLE-sphere 両者において、CD44 variant isoform が高発現していた (図 6)。

化学療法抵抗性の解析において我々が用いた抗癌剤の中で、ソラフェニブのみが Sphere 細胞と親細胞、いずれに対しても抗腫瘍効果を示した (図 8・9)。ソラフェニブとスニチニブはいずれも複数のレセプターをターゲットとしたチロシンキナーゼ阻害剤であるが、ソラフェニブは RAS/RAF/MAPK シグナルを阻害する。進行 HCC 症例に対する治療効果を比較した臨床試験において、ソラフェニブはスニチニブと比較し、全生存期間を有意に延長させた⁴⁶⁾。以上から、ソラフェニブは HCC と CSC のいずれに対しても治療効果を有する可能性が考えられた。

HLE-sphere も、SK-sphere と同様に、親細胞と比較し高い抗癌剤耐性能や抗酸化能を示した。しかしながら、HLE から誘導され Sphere 細胞は、形態や幹細胞マーカーの発現、ABCG2 の発現に関しては不完全な CSC の特性を有していると考えられた。

7. 結語

我々は、低分化型 HCC 細胞株から、癌幹細胞の特性および化学療法抵抗性を有する Sphere 細胞を、短期間で誘導可能である画期的な方法を確認した。

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、直接ご指導を頂きました山口大学大学院医学系

研究科 消化器・腫瘍外科学 助教 恒富 亮一先生に深く感謝致します。また、実験にご協力を頂きました山口大学大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学 井上 萌子さん、佐野 昭子さんに感謝致します。本研究を遂行するにあたり、ご御指導ならびにご助言を頂きました山口大学大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学 岡 正朗前教授（現 山口大学学長）に深謝致します。

9. 参考文献

- 1) Forner A, Llovet JM, Bruix J: Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012,379:245–255.
- 2) Tung-Ping PR, Fan ST, Wong J: Risk factors, prevention, and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000, 232:10–24.
- 3) Chang CH, Chau GY, Lui WY, Tsay SH, King KL, Wu CW: Long-term results of hepatic resection for hepatocellular carcinoma originating from the noncirrhotic liver. *Arch Surg* 2004, 139:320–325.
- 4) Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM: Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006, 66:9339–9344.
- 5) Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004, 432:396–401.
- 6) Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY: Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*

2007, 67:4827–4833.

- 7) Endo K, Terada T: Protein expression of cd44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol* 2000, 32:78–84.
- 8) Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY: Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007, 132:2542–2556.
- 9) Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY: CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the akt/pkb survival pathway. *Oncogene* 2008, 27:1749–1758.
- 10) Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST: Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008, 13:153–166.
- 11) Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, He YQ, Yu LX, Zhang SH, Huang DD, Tang L, Kong XN, Chen C, Liu SQ, Wu MC, Wang HY: Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008, 68:4287–4295.
- 12) Kimura O, Takahashi T, Ishii N, Inoue Y, Ueno Y, Kogure T, Fukushima K, Shiina M, Yamagiwa Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Iwasaki T, Kawagishi N, Shimosegawa T, Sugamura K: Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) + cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2010, 101:2145–2155.
- 13) Fan L, He F, Liu H, Zhu J, Liu Y, Yin Z, Wang L, Guo Y, Wang Z, Yan Q,

- Huang G: CD133: a potential indicator for differentiation and prognosis of human cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 2011, 11:320.
- 14) Kim HM, Haraguchi N, Ishii H, Ohkuma M, Okano M, Mimori K, Eguchi H, Yamamoto H, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M: Increased CD13 expression reduces reactive oxygen species, promoting survival of liver cancer stem cells via an epithelial-mesenchymal transition-like phenomenon. *Ann Surg Oncol* 2012, 3:539–548.
- 15) Shen G, Shen F, Shi Z, Liu W, Hu W, Zheng X, Wen L, Yang X: Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2008, 44:280–289.
- 16) Yu SC, Ping YF, Yi L, Zhou ZH, Chen JH, Yao XH, Gao L, Wang JM, Bian XW: Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett* 2008, 265:124–134.
- 17) Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, Li J, Zhang Y, Chen L, Qian H, Wu M, Yin Z: Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 2011, 11:71.
- 18) O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH: Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res* 2010, 16:3113–3120.
- 19) Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H: Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006, 44:240–251.

- 20) Harris MA, Yang H, Low BE, Mukherjee J, Guha A, Bronson RT, Shultz LD, Israel MA, Yun K: Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. *Cancer Res* 2008, 68:10051–10059.
- 21) Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW: EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell. *Gastroenterology* 2009, 136:1012–1024.
- 22) Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolte J, Zern MA, Wu J: Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. *J Hepatol* 2011, 55:838–845.
- 23) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, 133:704–715.
- 24) Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, Chou SH, Chien CS, Ku HH, Lo JF: Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008, 14:4085–4095.
- 25) Thon N, Damianoff K, Hegermann J, Grau S, Krebs B, Schnell O, Tonn JC, Goldbrunner R: Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol Cell Neurosci* 2010, 43:51–59.

- 26) Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, Hamaguchi T, Somura H, Yamada M, Oka M: Decreased ID2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2008, 14:1025–1031.
- 27) Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W, Zhang Y, Li C, Zhang S: Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* 2010, 299:150–160.
- 28) Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: Glioma stem cells promote radio-resistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, 444:756–760.
- 29) Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA: Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006, 9:391–403.
- 30) Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A: Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003, 113:643–655.
- 31) Yang DH, Moss EG: Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr Patterns* 2003, 3:719–726.
- 32) 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, 6:1146–1153.
- 33) Ma I, Allan AL: The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* 2011, 7:292–306.
- 34) Gao C, Guo H, Downey L, Marroquin C, Wei J, Kuo PC: Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 2003, 24:1871–1878.
- 35) Phillips TM, McBride WH, Pajonk F: The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:1777–1785.
- 36) Scheel C, Weinberg RA: Phenotypic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transitions in Cancer - and Normal Stem Cells? *Int J Cancer* 2011, 129:2310–2314.
- 37) Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM: Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:219–234.
- 38) Sukowati CH, Rosso N, Crocè LS, Tiribelli C: Hepatic cancer stem cells and drug resistance: Relevance in targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2010, 2:114–126.
- 39) Gillet JP, Gottesman MM: Advances in the molecular detection of ABC transporters involved in multidrug resistance in cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2011, 12:686–692.
- 40) Gottesman MM: Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002, 53:615–627.
- 41) Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators

- of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999, 13:1501–1512.
- 42) Coqueret O: New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003, 13:65–70.
- 43) Semenza GL: HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002, 8:62–67.
- 44) Rohwer N, Cramer T: HIFs as central regulators of gastric cancer pathogenesis. *Cancer Biol Ther* 2010, 10:383–385.
- 45) Nagano O, Okazaki S, Saya H: Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene* 2013, 32:5191–5198.
- 46) Chang A, Kang Y, Lin D, Park J, Kudo M, Qin S, Omata M, Pitman Lowenthal SW, Lanzalone S, Yang L, Lechuga M, Raymond E: Phase III trial of sunitinib (Su) versus sorafenib (So) in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* 2011, 29(suppl):256s. Abstract 4000.

Sequence	
<i>NG2G</i>	
5'-primer	5'-AGATGCCTCACACGGAGACT-3'
3'-primer	5'-TTTGGACACTCTTCTCTGC-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #31*
<i>LNGBA</i>	
5'-primer	5'-GAAGCCAGATCAAAAGGAG-3'
3'-primer	5'-GCTGATGCTCTGGCAGAAAT-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #23*
<i>ALDH1A1</i>	
5'-primer	5'-TTTGGTGGATTCAAGATGTCTG-3'
3'-primer	5'-CACTGTGACTGTTTTGACCTCTG-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #14*
<i>ABCG2</i>	
5'-primer	5'-TTCCACGATATGGATTACGG-3'
3'-primer	5'-GTTTCTGTTGCATTGAGTCC-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #29*
<i>CDKN1A (P21)</i>	
5'-primer	5'-TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC-3'
3'-primer	5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #31*
<i>HIF1A</i>	
5'-primer	5'-TTTTTCAAGCAGTAGGAA TTGA-3'
3'-primer	5'-GTGATGTAGTAGCTGCATGATCG-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #66*
<i>GAPDH</i>	
5'-primer	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
3'-primer	5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #60*
<i>PGK1</i>	
5'-primer	5'-CTGTGGCTTCTGGCATACT-3'
3'-primer	5'-CGAGTGACAGCCTCAGCATA-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #42*

*The number for the Universal ProbeLibrary probes (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan).

表 1 semi-qRT-PCR で用いたプライマーの塩基配列

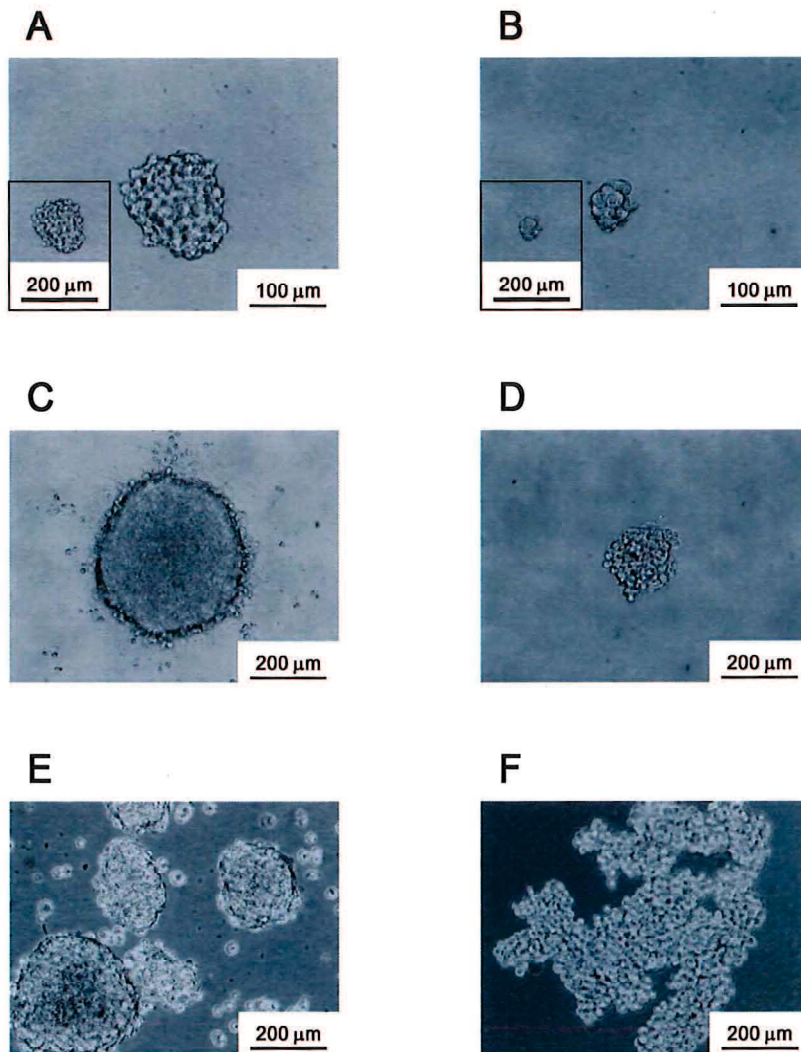


図1 HCC細胞株からのSphere細胞の誘導

Sphere 誘導培地において、シングル細胞から誘導された Sphere 細胞の経時的な変化を示した：7 日目 (A ; SK、 B ; HLE)、14 日目 (C ; SK、 D ; HLE))。培養を開始する SK 細胞数を 1×10^5 cells/ml とし、7 日目の Sphere 細胞を示した (E ; SK、 F ; HLE)。

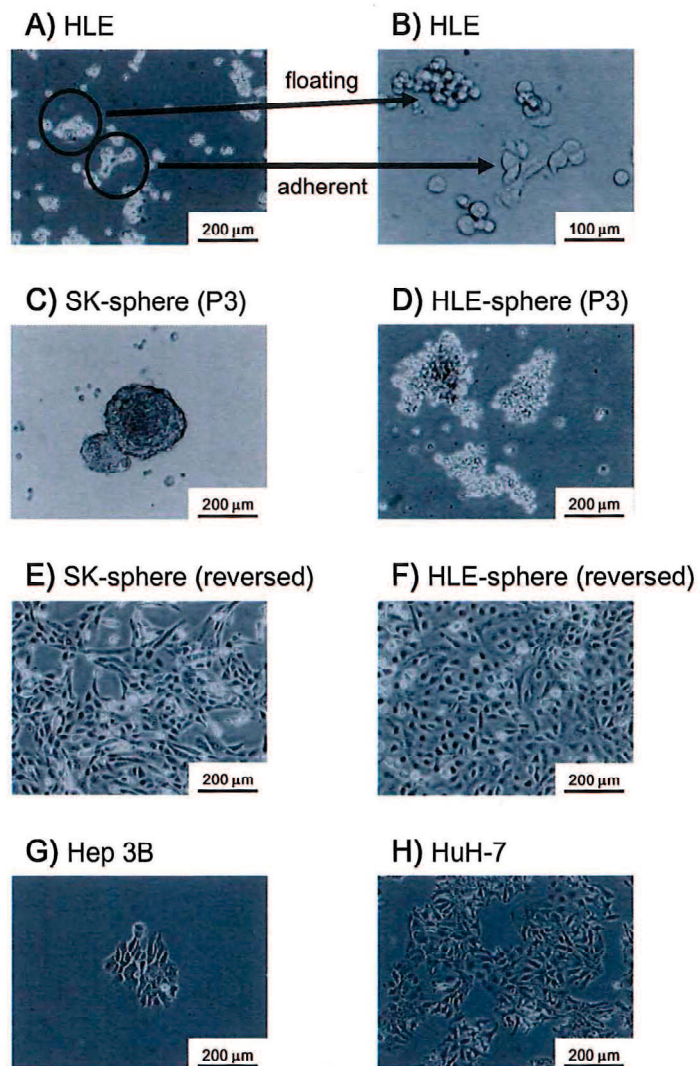


図2 HCC 細胞株からの Sphere 細胞の誘導

Sphere 誘導培地において、HLE から誘導された 4 日目の Sphere 細胞を示した (A・B)。浮遊細胞と接着細胞とがいずれも観察された。分離した SK-sphere と HLE-sphere を、再度、Sphere 誘導培地において 7 日間培養した際の形態 (各順に C・D) と、通常の血清培地にて培養した際の形態 (各 E・F) を示した。Sphere 培養培地を用いても Hep 3B と HuH-7 からは Sphere 細胞が誘導されなかった (各順に G・D)。

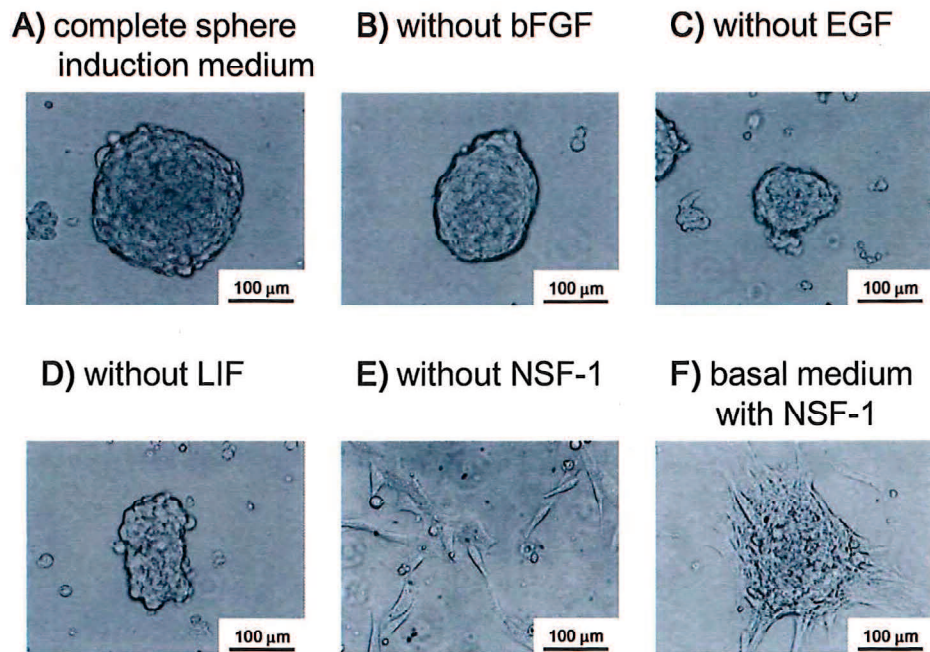


図3 Sphere 誘導に関する主要因子

培養を開始する SK 細胞数を 1×10^5 cells/ml とし、7 日間 Sphere 誘導を行った際の形態を示した。完全な Sphere 誘導培地で誘導を行った際の Sphere 細胞を示した (A)。完全な Sphere 誘導培地から bFGF、EGF、LIF、NSF-1 をそれぞれ除いた培地を用いて誘導を行った際の細胞形態を示した (各順に B・C・D・E)。逆に NSF-1 のみ添加した培地での細胞形態を示した (F)。

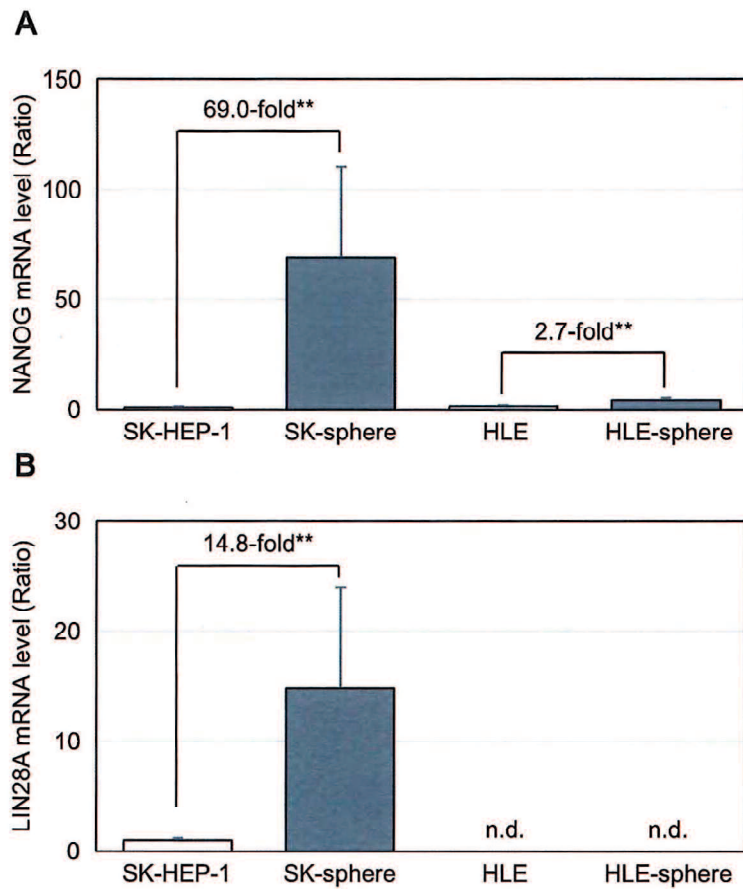


図4 Sphere細胞における幹細胞マーカーのmRNA発現

semi-qRT-PCRを用いたSK-sphereにおける*NANOG* (A)と*LIN28A* (B)のmRNA発現量を、SKにおける発現量との割合で示した。Mann-Whitney *U*-testにおいて $P < 0.05$ を有意差ありとし、「**」で表記した。値が検出されなかった場合に、「n.d.」と表記した。

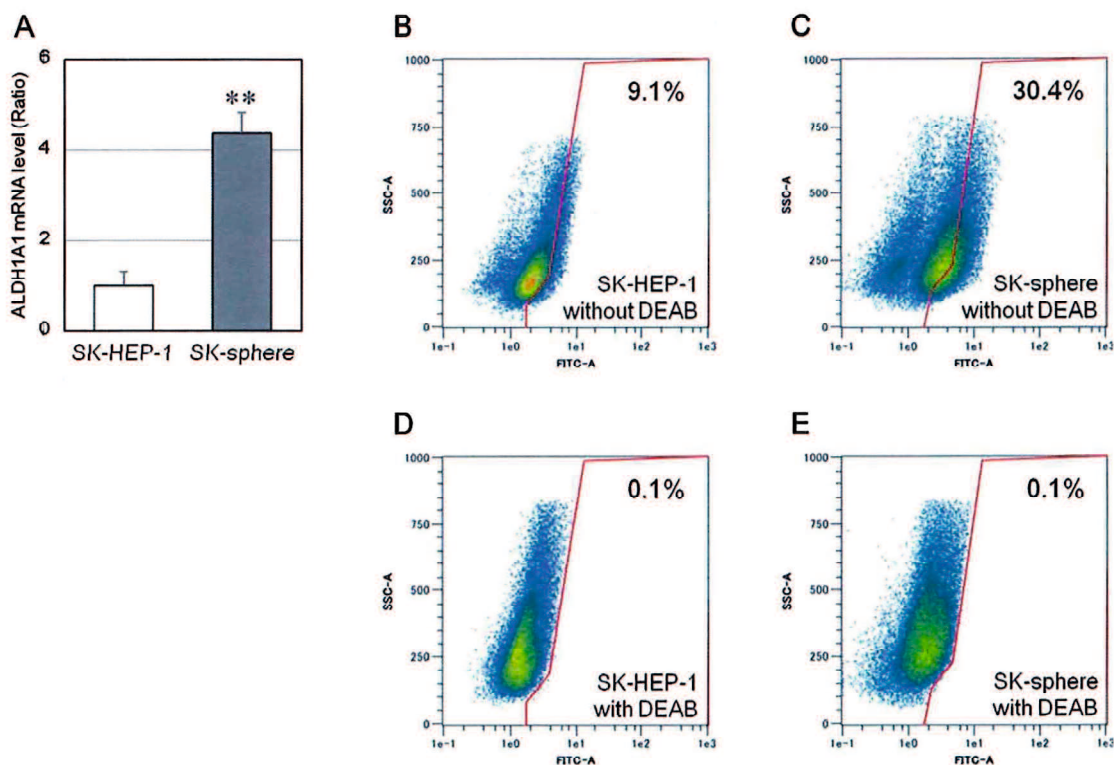


図5 ALDHの発現と活性

semi-qRT-PCRを用いたSK-sphereにおける $ALDH1A1$ のmRNA発現量を、SKにおける発現量との割合で示した(A)。Mann-Whitney U -testにおいて $P < 0.05$ を有意差ありとし、「**」で表記した。また、ALDEFLUOR kit (StemCell Technologies, Durham, NC)を用いて細胞内のALDH酵素活性を測定した。ALDH基質を含むALDEFLUORバッファーに懸濁し、37°Cで40分間培養した際の、SKとSK-sphereのALDH活性を示した(各順にB・C)。ネガティブコントロールとして、ALDH特異的阻害物質である50 mMのジエチルアミノベンズアルデヒド(DEAB)を加えた際の、SKとSK-sphereのALDH活性を示した(各順にD・E)。

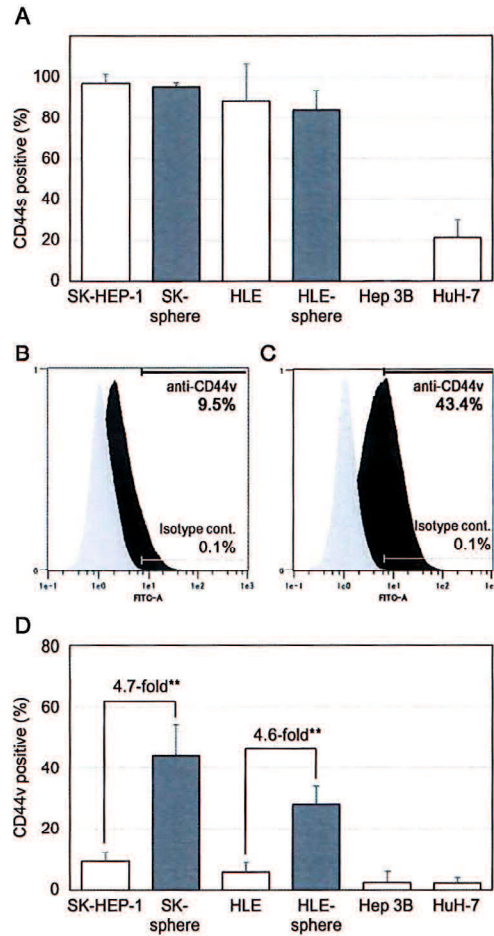


図6 フローサイトメトリーにおけるCD44の発現

APC 標識抗 CD44 抗体で染色した場合 (A) と、FITC 標識マウス抗ラット IgG 抗体を一次抗体として、未標識の抗 CD44 variant 抗体とで染色した場合の (B-D)、フローサイトメトリーで解析した結果を示した。SK-sphere と HLE-sphere において各親細胞と比較し CD44s 陽性率が高かった (A)。SK と SK-sphere の CD44v におけるヒストグラムを示した (各順に B・C)。黒が CD44v 陽性、グレーがアイソタイプコントロールのヒストグラムである。また、フローサイトメトリーの結果を棒グラフで表した (D)。SK-sphere と HLE-sphere において各親細胞と比較し CD44v 陽性率が高かった (D)。Mann-Whitney *U*-test において $P < 0.05$ を有意差ありとし、「**」で表記した。

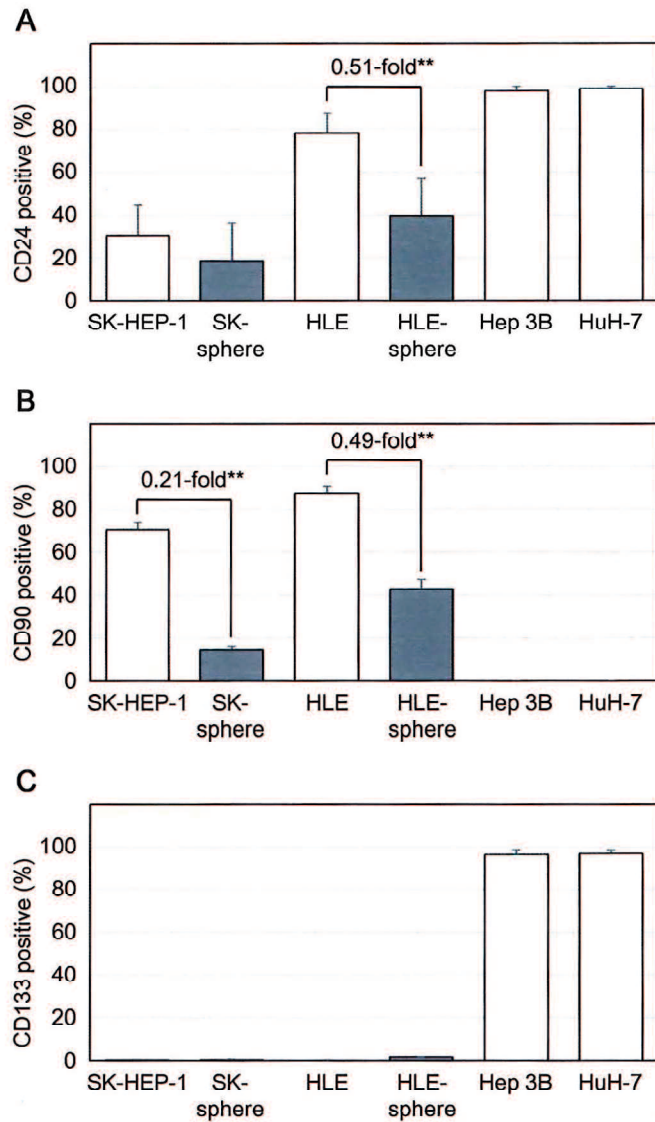


図7 CD24、CD90、CD133の発現

APC 標識抗 CD24 抗体、FITC 標識抗 CD90 抗体、PE 標識抗 CD133 抗体により染色し、フローサイトメトリーで解析した (各順に A・B・C)。各 Sphere 細胞は親細胞と比較し、CD24、CD90 の発現が低下していた。SK、HLE、およびそれらから誘導された Sphere 細胞では CD133 が発現していなかった。

Mann-Whitney U -test において $P < 0.05$ を有意差ありとし、「**」で表記した。

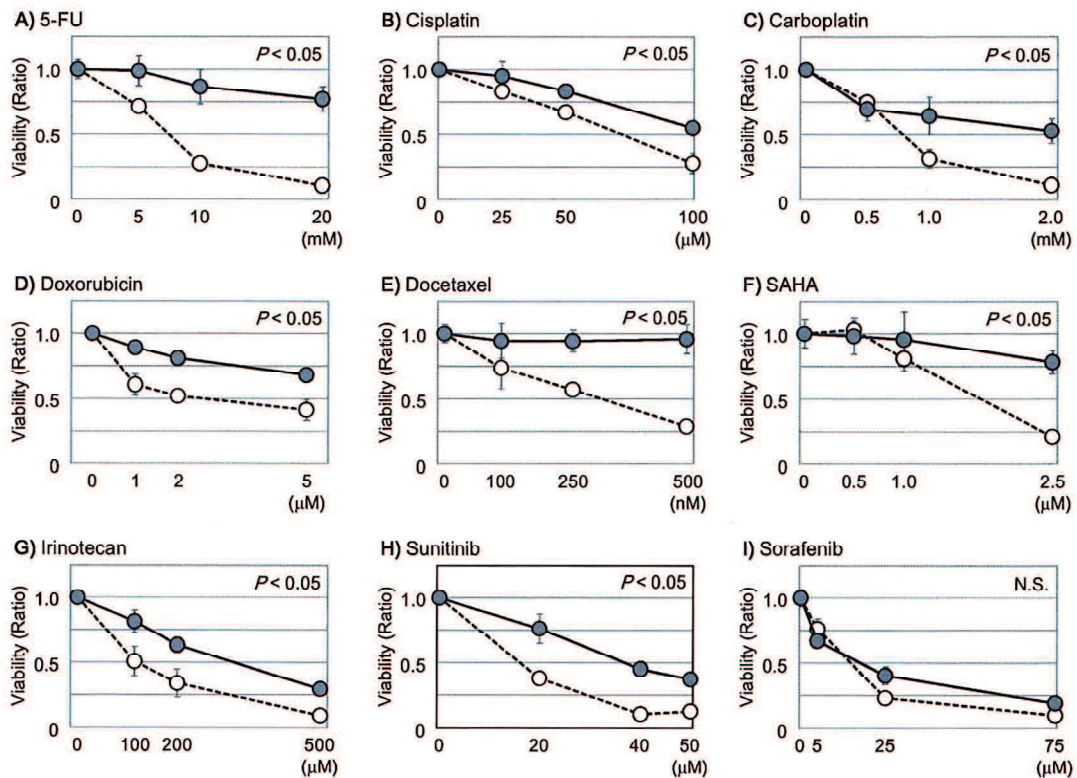


図8 SK および SK-sphere の抗癌剤感受性

MTSアッセイで解析した、抗癌剤存在下におけるSK(図中の白丸)とSK-sphere(図中の灰色丸)の細胞生存率を示した(A; 5-FU、B; シスプラチン、C; カルボプラチン、D; ドキソルビシン、E; ドセタキセル、F; SAHA、G; イリノテカン、H; スニチニブ、I; ソラフェニブ)。SK-sphereはソラフェニブ以外の抗癌剤に対し耐性を示した。ANCOVA解析において $P < 0.05$ を有意差ありとした。

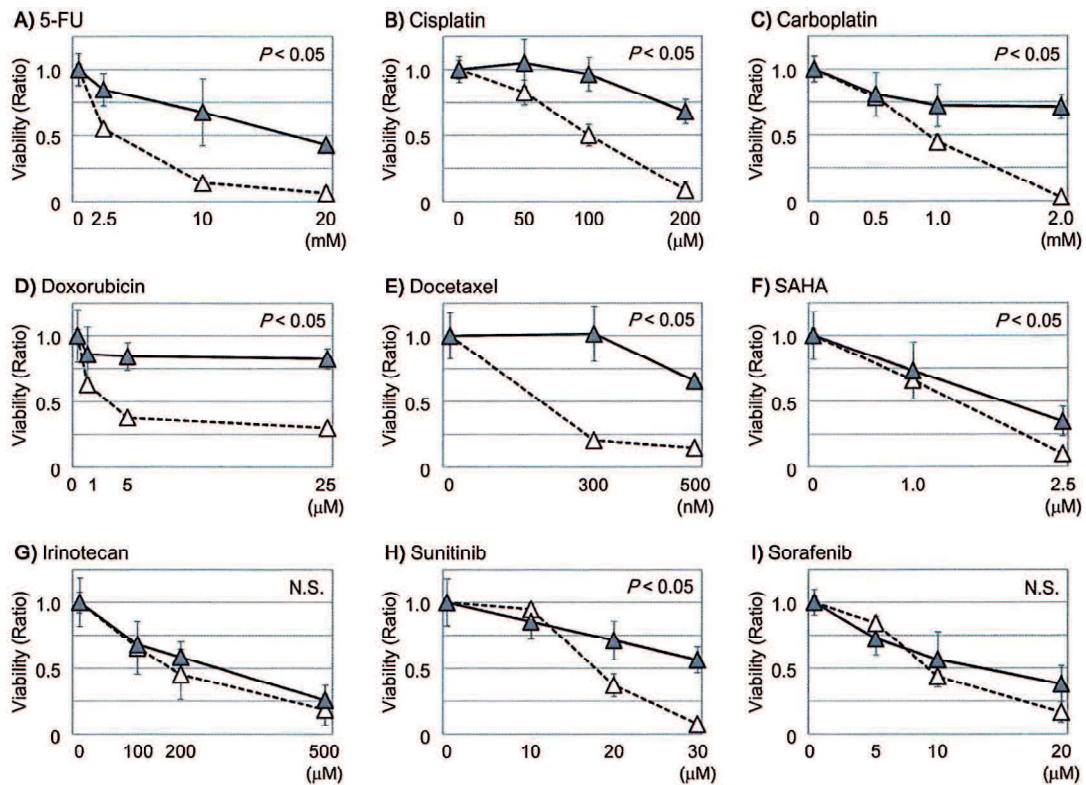


図9 HLE および HLE-sphere の抗癌剤感受性

MTS アッセイで解析した、抗癌剤存在下における HLE (図中の白丸) と HLE-sphere (図中の灰色丸) の細胞生存率を示した (A ; 5-FU、B ; シスプラチン、C ; カルボプラチン、D ; ドキソルビシン、E ; ドセタキセル、F ; SAHA、G ; イリノテカン、H ; スニチニブ、I ; ソラフェニブ)。ANCOVA 解析において $P < 0.05$ を有意差ありとした。

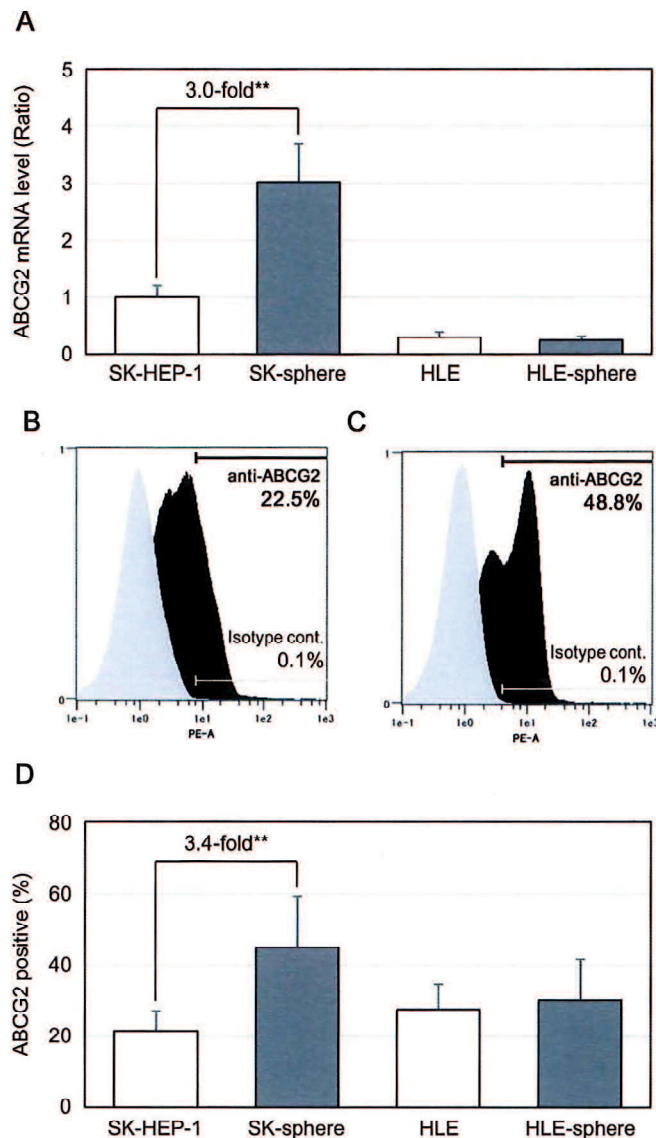


図 10 ABCG2 の発現

ABCG2 の mRNA レベルでの発現と、タンパクレベルでの発現を各々 semi-qRT-PCR(A) とフローサイトメトリー(B-D) で解析した。SK と SK-sphere の ABCG2 における代表的なヒストグラムを示した (各順に B・C)。黒が PE 標識抗 ABCG2 抗体、灰色がアイソタイプコントロール抗体で染色された細胞のヒストグラムである。D にフローサイトメトリーの結果を示した。

Mann-Whitney *U*-test において $P < 0.05$ を有意差ありとし、「**」で表記した。

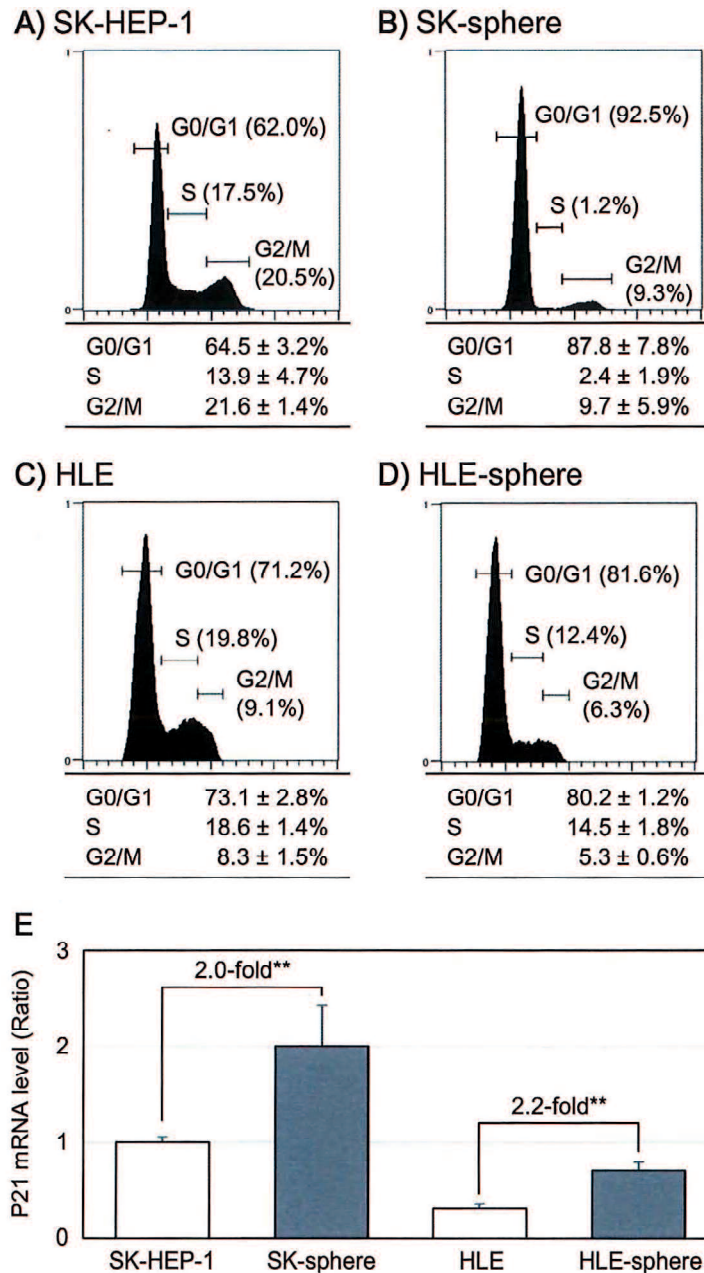


図 11 細胞周期解析

SK、SK-sphere、HLE、HLE-sphere の細胞周期分布を示した (各順に A-D)。方法 4-4. で記述した解析法で各 DNA 量を測定した。A-D 各パネルの上段に代表的なヒストグラムを、下段に細胞周期各段階の比率を記載した。また、semi-qRT-PCR により解析した *P21* の mRNA 発現を示した (E)。

Mann-Whitney *U*-test において $P < 0.05$ を有意差ありとし、「**」で表記した。

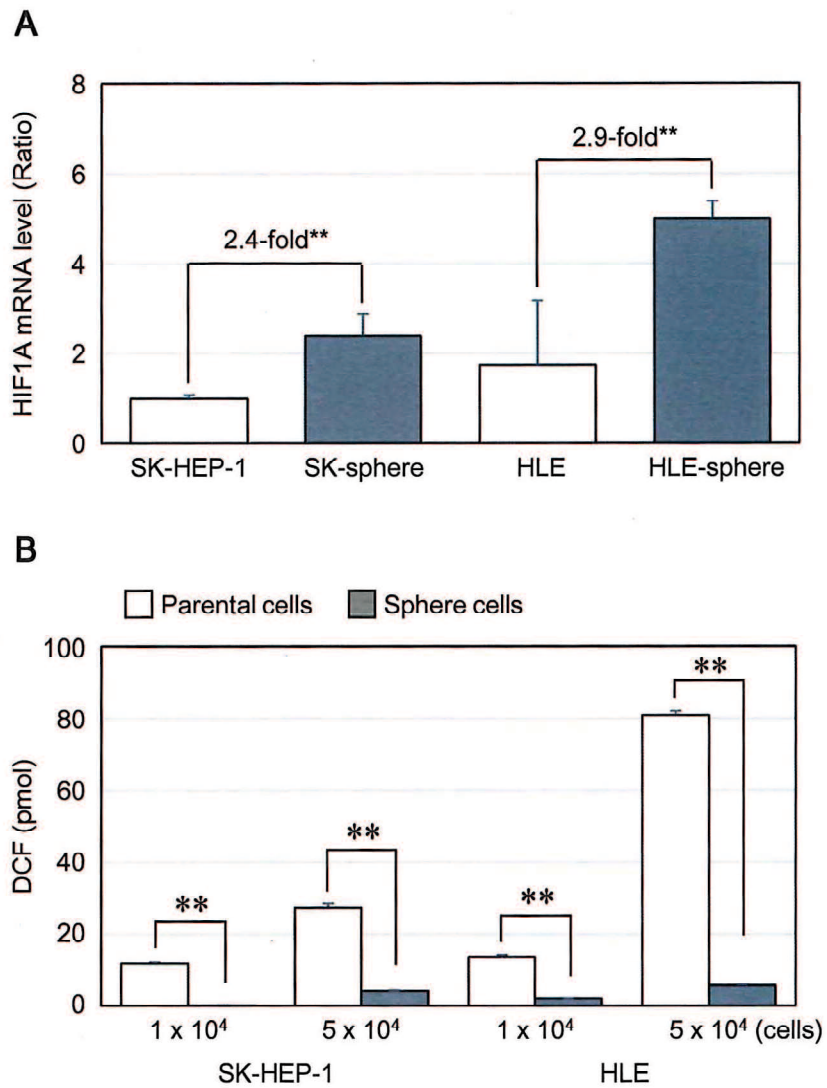


図 12 *HIF1A* の mRNA 発現と ROS レベル

semi-qRT-PCR により解析した *HIF1A* の mRNA 発現と、方法 4・6. で記述した方法で解析した細胞内 ROS 活性を示した (各順に A・B)。Mann-Whitney *U*-test において $P < 0.05$ を有意差ありとし、「**」で表記した。