

図 2 皮膚創傷治癒における I 型 $\alpha 1$ 、V 型 $\alpha 1$ コラーゲン発現パターン⁴⁾

A: マウス背部に 6 mm の皮膚全層欠損創を形成した、10 日程で治癒している。

B: 創傷部の組織像。* が創傷部を示す。左: 創傷なし、中: 創傷後 6 日、右: 同 10 日。

上段: HE 染色、中段: I 型 $\alpha 1$ 鎖の *in situ* hybridization、下段: 同 V 型 $\alpha 1$ 鎖の *in situ*。白く見えるシグナルが、各コラーゲン遺伝子の mRNA 発現に対応する。V 型コラーゲンの方が創部により特異的に発現しているのが分かる。

サイド
メモ

マイナーコラーゲン

著者が携わった事例で、微量であるにもかかわらず非線維性のコラーゲンが重要な役割をもっていることを示した実例として、XIX 型コラーゲンのケースを紹介する。XIX 型コラーゲンは線維性コラーゲンと相互作用するとされる FACIT に属するマイナーコラーゲンであるが、線維性コラーゲンの乏しい脳の海馬領域や胎児期の筋芽細胞に特異的に発現していることを見出していた。その機能解析のためにノックアウトマウスを作製したところ、下部食道括約筋帯の弛緩にかかわる神経刺激伝達機構が失われ、マウスの大半が餓死するという、予想外の神経症状が現れた。この XIX 型コラーゲンは、特定の神経や筋肉の接続を促すガイダンス分子の役割を果たしているものと考えている。細胞にとって ECM は外界の情報を取り入れる窓口であり、多細胞生物の ECM は組織の形や機能を構築する能力を有している。ECM 分子と細胞の“対話”を解明することは再生医療の重要な命題にほかならない。

デルとして解析した⁴⁾。マウスの皮膚を欠損させ、新生コラーゲンによって創傷部が埋められる過程を *in situ* hybridization を用いて I 型 $\alpha 1$ 鎖、V 型 $\alpha 1$ 鎖のコラーゲン遺伝子発現の局在を調べたところ、ともに創傷後 6 日後には新生肉芽組織に強く発現するようになった。とくに V 型コラーゲンは創傷部を中心に発現が増強し、明瞭なコントラストをなしており、線維の形成初期に V 型コラーゲンが多く含まれることを裏付けていた(図 2)。また、観察像からコラーゲンを発現している領域は真皮からでなく、皮下の筋膜組織から遊走してくるようみられた。電子顕微鏡で新生コラーゲンの構築を観察すると、創傷部位には細く方向性が一定でないコラーゲン線維(図 3-A、①)と太く規則的に並行するコラーゲン線維(図 3-A、②)が存在し、細い線維が会合する様子もみられた。しかし、創傷部の新生コラーゲンは太くなくても直径 50 nm ほどで、真皮コラーゲン線維の半分である。真皮コラーゲンはきれいな流紋を示し、多方

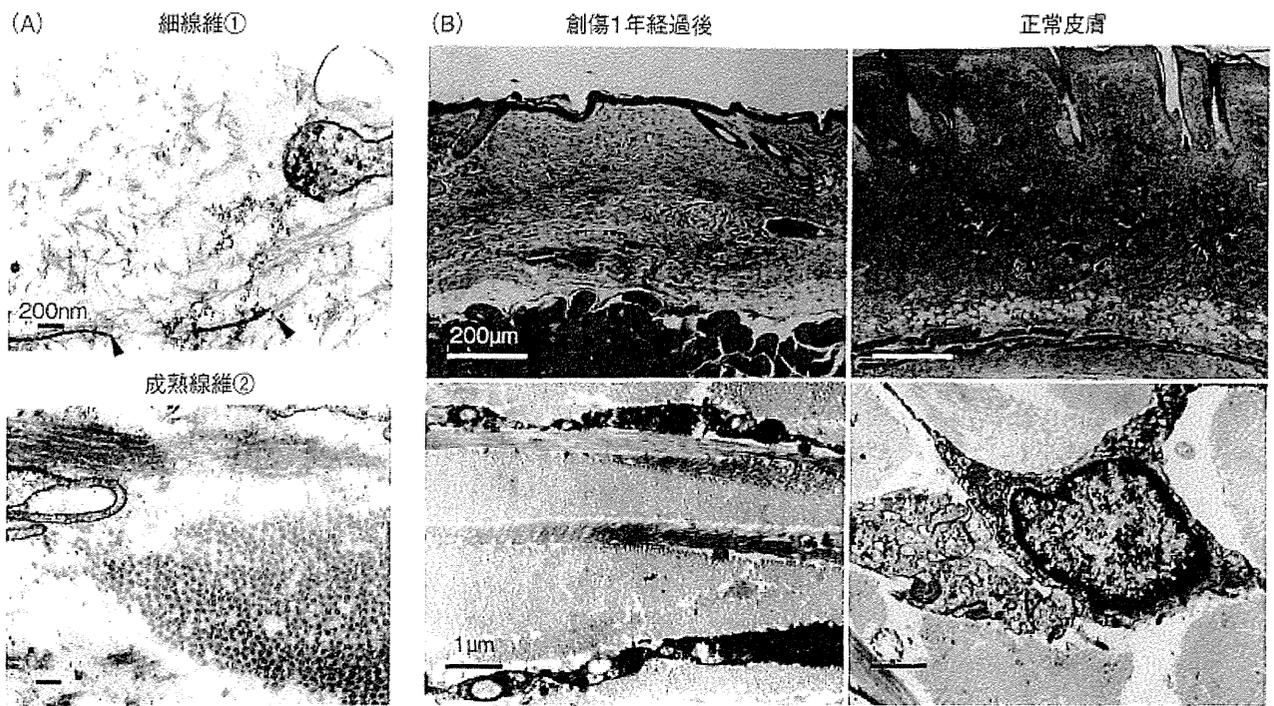


図3 新生コラーゲンにみられる2種類のコラーゲン線維

- A: 細線維①は直径15 nm程のばらついた形状の細い線維。会合・集束しつつある線維もみられる(矢頭)。成熟線維②は直径50 nm程で方向も揃った形状を示す。
- B: 左側: 創傷1年後線維痕組織, 右側: 正常皮膚組織。上段: マッソントリクロム染色。創傷後痕のコラーゲン線維走行は平坦だが、正常真皮は流紋状を示す。下段: 同部位の電子顕微鏡像。創傷後痕のコラーゲンは直径50 nm程の水平方向の層構造で、線維芽細胞も横長の形態を示す。正常真皮は直径100 nm以上の3次元に張り巡らされた線維で線維芽細胞は星形の形態を示す。

向に走行し表面も滑らかである一方、創傷部のコラーゲンは平板で層状に配列し、表面に粗さがあるなど、コラーゲンの形態に明らかな違いがみられた(図3-B)。この特徴は皮下筋膜由来のコラーゲンの形態と類似し、創傷を埋めたのは皮膚由来でなく、創傷によって活性化した筋膜由来の前駆線維産生細胞であり、コラーゲンは異所的に合成されたといえる。創傷部のコラーゲンと皮膚コラーゲンは構造が異なり、傷痕は明瞭に見分けられた。前駆線維産生細胞は肝における星細胞のように、体内の至るところで見られる事例である。皮膚の創傷治癒例では過度の線維化を自己抑制する機構があるが、もし活性化機構が継続(逸脱)する要因が加われば、線維症に発展するであろう。線維化の自己抑制機構について多くのことはわかっておらず、研究の進展が待たれる。

V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖と線維化の抑制

ここでコラーゲンによる線維化自己調節機構の

候補として、V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖についての新しい知見について述べたい。V型 $\alpha 3$ 鎖[以下 $\alpha 3(V)$]はV型コラーゲン遺伝子のひとつであり、成体組織中にはほとんどみられない希少なコラーゲン分子種である。通常V型コラーゲンは $\alpha 1$ 鎖2本と $\alpha 2$ 鎖1本からなる $[\alpha 1(V)]_2[\alpha 2(V)]$ である。後に第3のV型 α 鎖の遺伝子構造が明らかとなり、N末端には塩基性アミノ酸を多く含む $\alpha 1$ 鎖と異なったテロペプチドをもっていた。このN末端領域にはヘパリン結合ドメインが含まれ、強い細胞接着性を有している。 $\alpha 3(V)$ 鎖は、胎児の臍帯、羊膜、筋膜、骨膜に多く局在しており^{5,6)}、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖と共同して $[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$ のトリマーを形成し⁷⁾、通常V型コラーゲンと混在する形になる。この $\alpha 3(V)$ 鎖の皮膚創傷例における組織局在を解析したところ、この特異なコラーゲン種も肉芽組織に見出され、新生コラーゲンの構築に付与していることが示された。しかし、10日目以降になくなってしま

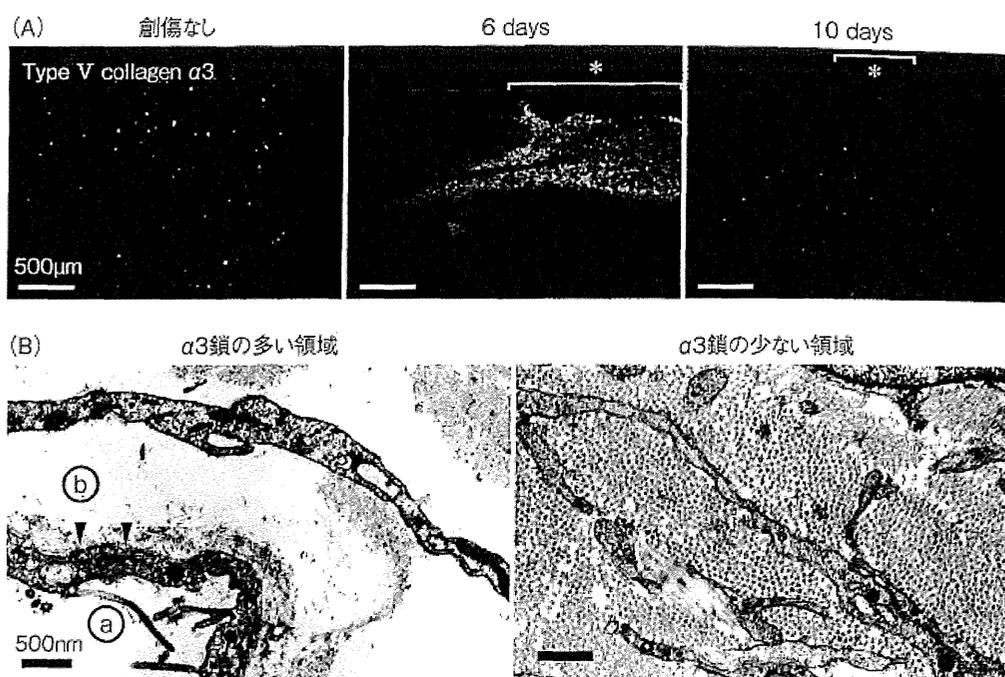


図 4 V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖が線維構築に与える効果⁴⁾

- A: V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の *in situ* hybridization, 図2と同組織, 線維形成初期の6日後にのみ発現を認め, 10日目以後は発現が消失している。
- B: V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の多い組織(筋膜直上)と少ない組織(筋より深部)の電子顕微鏡像, V型 $\alpha 3$ 鎖が多い組織はコラーゲンが細く保たれ, 隙間が大きい, 最外部の細胞はコラーゲンと接する側①に基底膜様の構造が形成され(矢頭), 反対側②にはコラーゲンは全く見られず, 絨毛状の突起が形成されるなどの形態変化がみられる。

い, 発現は初期に限られていた(図4-A). $\alpha 3(V)$ 鎖は, 筋膜, 真皮, 表皮との辺縁部により多く局在し, 面白いことにこれら $\alpha 3(V)$ 鎖が多く発現する領域は細線維が多く, 線維密度がルーズになる傾向があり, $\alpha 3(V)$ 発現量のとくに多い筋膜との境界面には明瞭な剝離面が形成されていた。この部分の細胞の底面には細線維コラーゲンが附着し, その側に基底膜が形成されつつあること, 反対側の細胞面にはコラーゲンのない空間が形成されるなど, 細胞に極性が生じる所見が観察できた(図4-B左)。筋より深部の創傷になると $\alpha 3(V)$ 鎖の発現は少なくなり, コラーゲンの束が早くまとまり(図4-B右), 線維化がより早く進行することも観察された。これらから $\alpha 3(V)$ 鎖は, ①コラーゲン線維の集束形成を抑制する(線維化に対する効果), ②細胞に足場を提供し方向性を与える(細胞の生育環境・組織の構築), といった興味深い役割をもっていると考えられる。この機序は $\alpha 3(V)$ 鎖のもつN末端ドメインによってコラーゲン線維と周囲のECM分子との相互作用が

変化した結果, 会合集束過程が抑制され, 過度の線維化を抑制しているものと推測される。コラーゲン線維の主成分はあくまでI型コラーゲンであり, それに準じる成分としてIII, V型が含まれ, さらに $\alpha 3(V)$ 鎖は微量成分にすぎない。本例は微量であってもコラーゲンの会合集束過程に介入することで, 線維の密度や分解性を調節できる可能性を示すものであり, たいへん興味深い。

おわりに

肝硬変などの臓器線維症の病態はコラーゲンの無秩序な増生と蓄積であり, その抑制戦略としてコラーゲンの合成と分解の要所が標的とされてきた。たとえばコラーゲンの合成抑制では, これまでI型 $\alpha 2$ 鎖をはじめコラーゲン遺伝子プロモーター領域の解析が進められ, またTGF- β , IFN- γ , TNF- α , HGFなど, コラーゲンの転写を促進・抑制するサイトカインの作用機序と対応するプロモーター領域・転写因子群の解析が行われた結果, 転写の促進・抑制シグナルに介入し転写を

抑制しうる分子標的薬の開発などの成果に結びついている^{8,9)}。コラーゲン分解促進においては、線維化した肝にコラーゲンを特異的に分解する matrix metalloproteinases (MMPs) を導入する方法として骨髄由来細胞を利用する方法が良好な成果をおさめている^{10,11)}。治療への応用のために、作用機序の異なる方法を組み合わせて用いればより効果的であると思われるが、その点でコラーゲンの会合集束過程も有効な線維化抑制ステップになりうると期待している。コラーゲンは結晶が成長するように形成されるわけではなく、生体にはコラーゲンがたえず生産されているにもかかわらず不思議と線維が蓄積しない仕組みがあり、それは理想的な線維化の制御となりうる。その回答はコラーゲン分子と ECM 蛋白質の相互作用のなかにあり、その分子的な機序についてはまだ手付かずの状態である。今回見出された $\alpha 3(V)$ 鎖の知見をとりかかりの糸口にしたいと期待している。

文献

- 1) van der Rest, M. and Garrone, R.: Collagen family of proteins. *FASEB J.*, **5** : 2814-2823, 1991.
- 2) Linsemayer, T. F. et al.: Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken $\alpha 1(V)$ NH₂-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J. Cell Biol.*, **121** : 1181-1189, 1993.
- 3) Wenstrup, J. R. et al.: Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J. Biol. Chem.*, **279** : 53331-53337, 2004.
- 4) Sumiyoshi, H. et al.: Transient expression of mouse pro- $\alpha 3(V)$ collagen gene (col5a3) in wound healing. *Connect. Tissue Res.*, **53** : 313-317, 2012.
- 5) Imamura, Y. et al.: The pro- $\alpha 3(V)$ collagen chain. *J. Biol. Chem.*, **275** : 8749-8759, 2000.
- 6) Yamaguchi, K. et al.: Pro- $\alpha 3(V)$ collagen chain is expressed in bone and its basic N-terminal peptide adheres to osteosarcoma cells. *Matrix Biol.*, **24** : 283-294, 2005.
- 7) Niyibizi, C. et al.: Human placenta Type V collagens. *J. Biol. Chem.*, **259** : 14170-14174, 1984.
- 8) Inagaki, Y. and Okazaki, I.: Emerging insights into transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*, **56** : 284-292, 2007.
- 9) Higashi, K. et al.: Interferon- γ interferes with transforming growth factor- β signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J. Biol. Chem.*, **278** : 43470-43479, 2003.
- 10) Sakaida, I. et al.: Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, **40** : 1304-1311, 2004.
- 11) Higashiyama, R. et al.: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology*, **45** : 213-222, 2007.

* * *

肝癌幹細胞の生物学的特徴と 幹細胞標的新規治療法開発の可能性

酒井佳夫* 山下太郎* 金子周一*

索引用語：肝癌幹細胞，分化誘導，化学療法感受性

1 はじめに

癌組織の生物学的特徴について，幹細胞から生体が発生する概念，あるいは，前駆細胞から細胞が分化する概念をあてはめた，“癌幹細胞”あるいは“癌源細胞”を起源とする癌形成の考え方が提唱されている¹⁾。どちらも，癌組織の形成には，その起源となる根源的な細胞が存在するという考え方である。急性骨髄性白血病における白血病幹細胞を同定した報告²⁾以来，乳癌，大腸癌，脳腫瘍をはじめとした固形癌においても，“癌幹細胞”“癌源細胞”を示唆する研究結果が多数報告されてきた。肝癌においても，この概念により，新たに研究が展開されている。

本稿では，肝癌における“癌幹細胞”“癌源細胞”について，その表現型とシグナル伝達，分子機構についての研究の現況と，それらの解析に基づいて試みられている新たな治療方

法開発の検討について述べる。なお，以後，癌幹細胞と癌源細胞を同義として，癌幹細胞に統一して記載する。

2 肝癌における癌幹細胞の特徴

肝組織は，肝細胞，胆管細胞，類洞内皮細胞，クッパー細胞，星細胞などより構成されている。肝癌細胞は，肝細胞あるいは胆管細胞と肝細胞に分化しうる前駆細胞から発生するものと考えられる。肝の発生においては，幹細胞からの発生，分化の過程において出現する細胞において，それぞれ特徴的な細胞表面抗原が発現する(図1)³⁾。肝芽細胞において発現し，成熟肝細胞あるいは胆管細胞へと分化する過程で消失する細胞表面抗原が，肝癌細胞において再び発現がみられるものがあり，肝癌細胞の，前駆細胞化，幹細胞化の特徴として考えられる。

以下に，これまでに報告されてきた肝癌幹

Yoshio SAKAI *et al* : Biological features of liver cancer stem cells and its possible application of the novel target therapy to cancer stem cells

*金沢大学消化器内科 [〒 920-8641 石川県金沢市宝町 13-1]

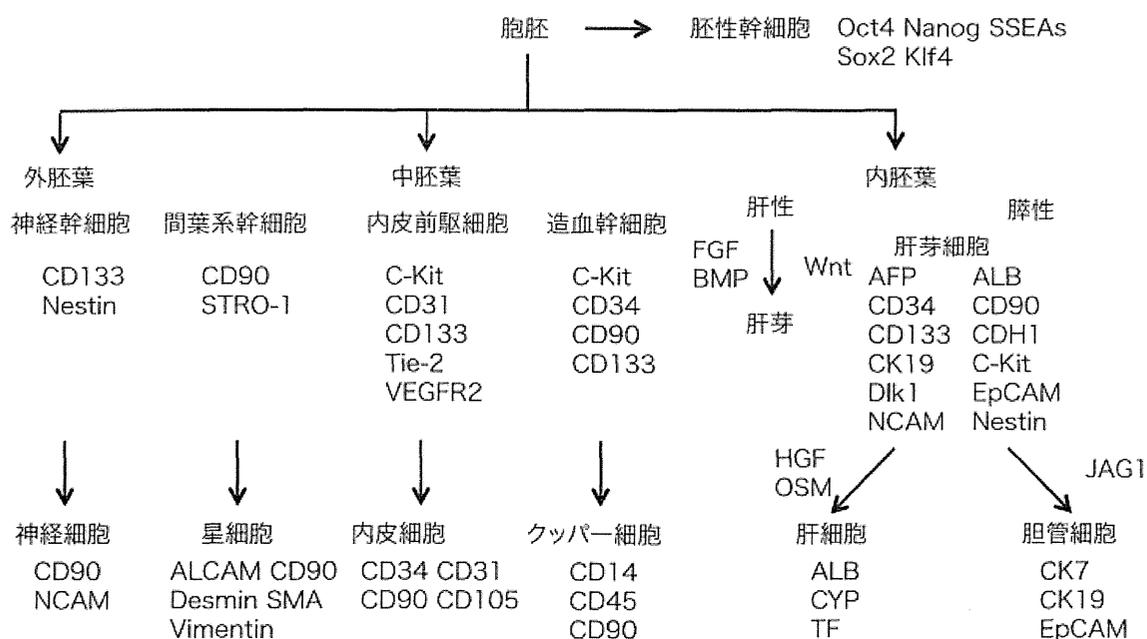


図1 肝発生と表面抗原(文献3より改変引用)

表1 肝癌幹細胞の細胞表面マーカー

細胞表面抗原
CD133
CD44
CD326 (EpCAM)
CD90
CD13

細胞を示すと考えられる細胞群の表面抗原を記す(表1)。

1. CD133 (prominin-1)

CD133は、115-120kDaの5回膜貫通糖蛋白であり、神経、造血系、上皮、肝細胞、内皮系の幹細胞に発現している^{4,5)}。Huh-7肝細胞癌株においてCD133陽性細胞が存在し、CD133陽性細胞は、陰性細胞と比較して、細胞増殖能が高く、成熟細胞のマーカー遺伝子の発現が低く、免疫不全マウスにおける高い腫瘍形成能が示されている⁶⁾。

2. CD326 (EpCAM)

EpCAMは、約40 kDaの糖蛋白であり、細

胞接着に関与する分子である⁷⁾。胚発生において、胚性幹細胞、胚様体において発現し、胚形成初期段階に関与していると考えられる^{7~9)}。胎児の肝発生、肝の再生および肝硬変に伴う肝の修復の際に発現がみられる。成熟肝細胞ではEpCAMは発現していないが、胆管上皮では発現がみられる⁴⁾。EpCAM陽性肝癌の遺伝子発現プロファイルは、肝前駆細胞と類似している(図2)¹⁰⁾。

3. CD90 (Thy-1)

CD90は、25-37kDaのグリコホスファチジルイノシトール(GPI)-アンカー糖蛋白であり、細胞-細胞間、細胞-基質間の作用に関与する¹¹⁾。正常組織では、白血球、間葉系幹細胞や肝前駆細胞において発現がみられる^{11~13)}。樹立ヒト肝癌細胞株において、また肝癌患者の癌組織および血液中のCD90陽性腫瘍細胞が強い腫瘍形成能を有していることを報告している¹⁴⁾。

4. CD44

CD44は、7つの細胞外ドメインと膜貫通

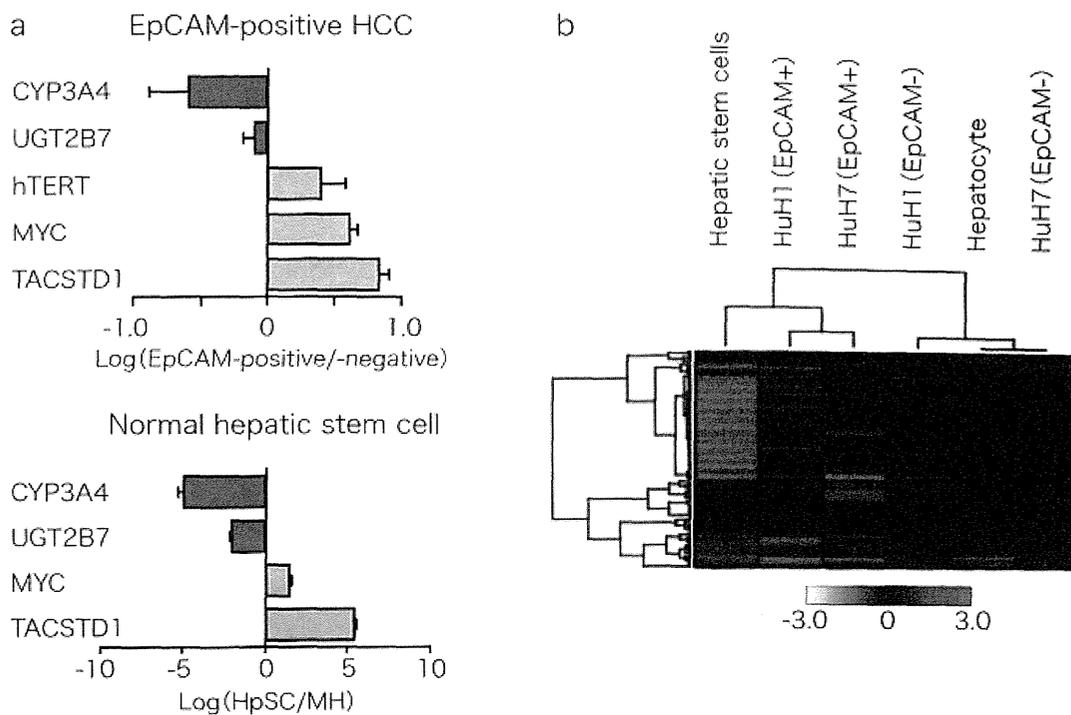


図2 EpCAM陽性肝細胞癌の遺伝子発現(文献21より引用)

- a. リアルタイム定量PCRでEpCAM陽性肝細胞癌は、正常肝幹細胞と同様に、MYC、TACSTD1の発現がみられた。
- b. マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルでは、EpCAM陽性の肝細胞癌は、EpCAM陰性の肝細胞癌と比較して、肝幹細胞の発現プロファイルに類似した。

ドメインおよび細胞内ドメインからなる糖蛋白であり¹⁵⁾、ヒアルロン酸の受容体である¹⁶⁾。CD133陽性肝細胞癌幹細胞、CD90陽性肝細胞癌幹細胞のなかでも、さらに腫瘍形成能の高い癌幹細胞集団を示すマーカーとして報告されている¹²⁾。

5. CD13

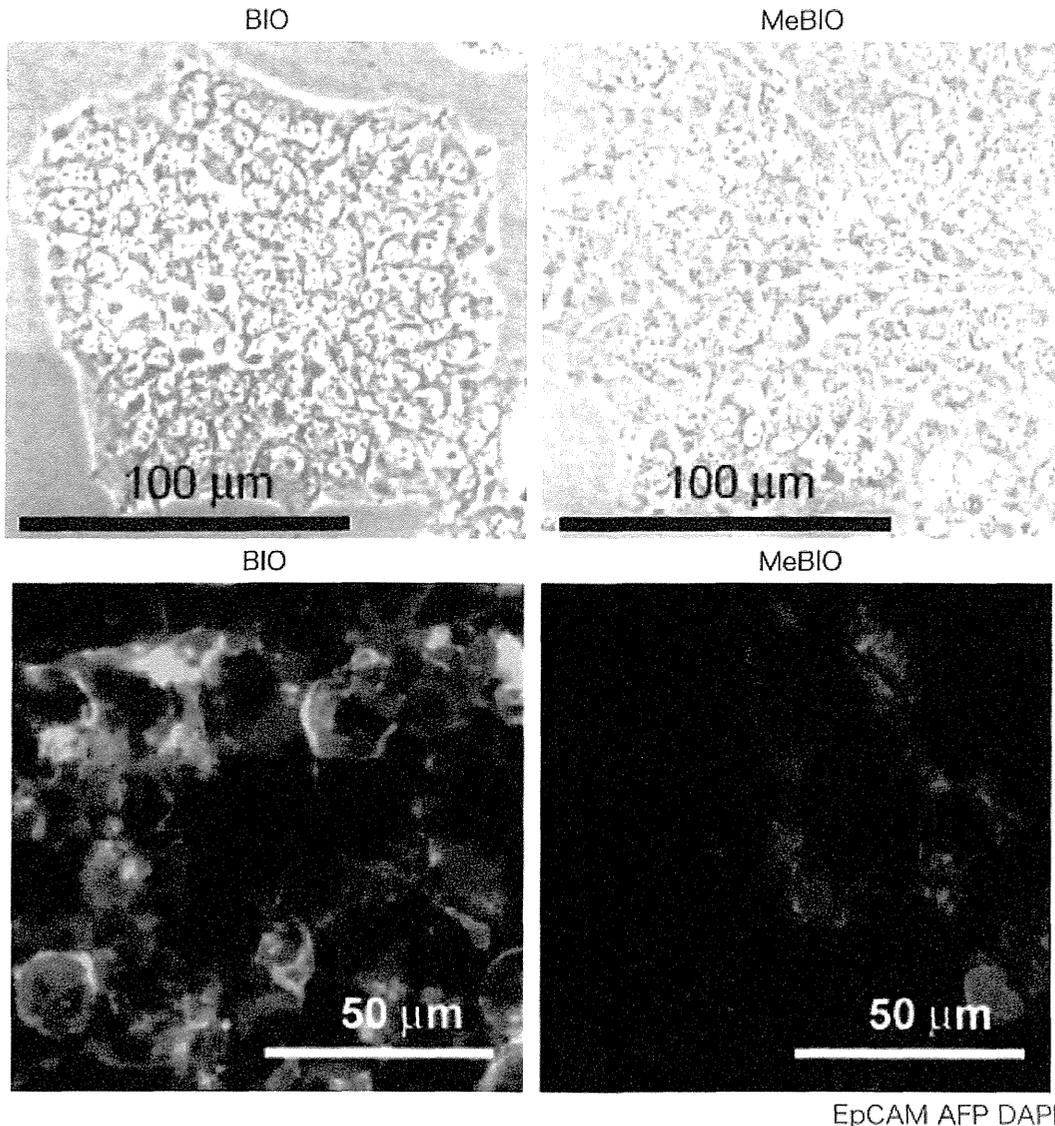
CD13は、150kDaのアミノペプチダーゼNであるが、癌幹細胞を示唆するHoechst33342染色液排出能の高いside population細胞において、CD13陽性細胞が豊富に存在する。CD13陽性肝細胞癌は、G1/G0期での休眠状態のものが多く、かつ腫瘍形成能が最も高いことより、癌幹細胞としてのマーカーと考えられる¹⁷⁾。

3 肝癌幹細胞のシグナル伝達、分子機構

これまでに、肝細胞癌のシグナル伝達および分子機構に、幹細胞あるいは発生学的に特徴的なシグナル伝達機構、分子機構に深い関連を示す細胞があることが明らかとなり、肝細胞癌幹細胞の、幹細胞様の性質を示すものと考えられてきた。以下に、これまで報告のあった幹細胞様性質を示唆するシグナル伝達、分子機構を示す。

1. Wnt/ β -カテニンシグナル伝達

カノニカル伝達において、Wnt3aリガンドは、7回膜貫通Frizzled (Fzd)受容体および1回膜貫通りポ蛋白受容体関連(LRP)5あるいは6共役受容体に結合し、axin,



EpCAM AFP DAPI

図3 Wnt/ β -カテニン活性化による肝癌細胞の幹細胞様変化(文献21より引用)
 BIO処理により, Wnt/ β カテニンシグナルが活性化されると, 細胞の形がより小さな円形を示し, 幹細胞様の変化を呈した. また, EpCAM発現も増強した.

adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) からなる蛋白分解複合体を抑制し, その結果, β -カテニンの核内移行を促進させ, 遺伝子発現に参与する¹⁸⁾. 非カノニカル伝達では, Wnt11がFzd受容体に結合し, ヘテロ三量体GとDvlに作用し, ホスホリパーゼCを活性化し, ジアシルグリセロールとイノシトールホスファターゼを, ホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸から生成し, 細胞内のカルシウム濃

度を上昇させる. また, Wnt11とFzd受容体の結合は, p38キナーゼを刺激し, ホスホジエステラーゼ6活性化によりcGMPを加水分解させ, タンパクキナーゼGを不活化することによっても, 細胞内のカルシウム濃度を上昇させる. 細胞内Ca濃度の上昇は, カルモジュリン依存性キナーゼ2 (CamK II)を活性化し, カルシニューリンの活性化に続き, NF-ATファミリーおよびTAK1-NLKキナーゼが活性化される¹⁹⁾. このシグナル伝達は,

さまざまな組織の幹細胞の増殖，自己複製に関与する．個体の発生過程においては，肝芽発生後における肝組織の成長に関連する²⁰⁾．肝癌幹細胞におけるWnt/ β カテニンとの関連については，Wnt/ β カテニンシグナルを活性化させるGSK-3 β BIOで処理した肝癌細胞株で，EpCAM陽性細胞が増加することが確認され²¹⁾，この経路の活性化とEpCAM陽性細胞の関連が示されている(図3)．

2. TGF- β

TGF- β リガンドが，セリン・スレオニン受容体に結合すると，Smad2，Smad3およびアダプター蛋白である β -2スペクトリンがリン酸化され，これらとSmad4がヘテロ複合体を形成し核内へ移行し，標的遺伝子が発現する²²⁾．TGF- β シグナルは，胚の未分化状態の維持および分化の開始，神経系の発生，造血系細胞の発生，肝，胃，膵など内胚葉系臓器の発生に関与する²³⁾．Smad2とSmad3のヘテロ変異のあるマウス，および β -2スペクトリンをコードするElf遺伝子をターゲット破壊したマウスでは，肝臓と肝内胆管，および神経，心臓が欠失し，胎生致死となる．また，TGF- β は，幹細胞マーカーの発現が亢進しているスキルス様肝癌において，発現の亢進がみられ，幹細胞様癌におけるTGF- β の関与が示唆される²⁴⁾．

3. Notchシグナル伝達

Notchは，膜貫通蛋白であるDeltaやJaggedをリガンドとする受容体である²⁵⁾．リガンドと結合すると，ADAM10やADAM17によるS2切断， γ -セクレターゼによるS3切断により，細胞内ドメインが分離され(Nicd: Notch intracellular domain)，核内へ移行し，CSL複合体，共役活性化分子および他の転写因子とともに，標的遺伝子を活性化する．Notchシグナル伝達は，発生のプロセスにおいて，

極めて多様に機能している．また，Sphere形成肝癌細胞株において，CSL非依存性のNotchシグナル伝達の下流の蛋白発現が亢進していることが報告されている²⁶⁾．

4. Hedgehogシグナル伝達

Hedgehogは，個体の発生過程におけるさまざまな制御を行うモルフォゲンである^{27,28)}．哺乳類では，Sonic, Desert, Indianの3種のHedgehogが存在する．Hedgehogは，12回膜貫通蛋白であるPatchedに結合し，Patchedの機能を抑制する．Patchedは，SmoothedがCi/Gliファミリー転写因子の活性化を抑制しているため，Hedgehogのシグナル伝達によって，Ci/Gliファミリー転写因子によるHedgehog標的遺伝子が活性化される．60%の肝癌において，Sonic Hedgehogの発現がみられ，また，肝細胞癌株においてHedgehogシグナル伝達を抑制すると，細胞増殖を抑制し，アポトーシスに陥るとの報告がある²⁹⁾．

5. BMI1シグナル伝達

BMI1は，ポリコーム群遺伝子のひとつであり，エピジェネティックなクロマチン修飾を行う²⁹⁾．幹細胞では，自己複製プログラムに関わる．肝癌においては，癌幹細胞を示唆するHoechst33342染色液排出能の高いside population細胞群，CD133陽性細胞において発現が亢進している³⁰⁾．

4 肝癌幹細胞とmicroRNA (miRNA)

miRNAは，21～25塩基程度の一本鎖RNAであり，転写後において遺伝子発現を制御する³¹⁾．1つのmiRNAは多数の遺伝子の発現を制御する．癌発生との関連で，癌抑制的に作用するもの，癌原性に作用するものがある³²⁾．肝癌幹細胞との関連では，miR-181³³⁾，miR-130b³⁴⁾が報告されている．

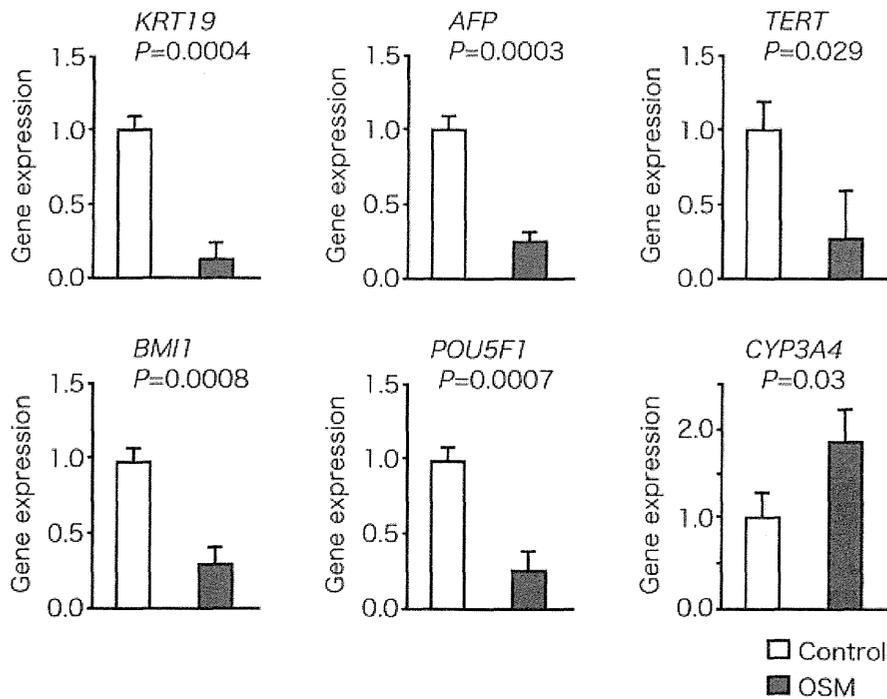


図4 オンコスタチンM処理による肝癌細胞の幹細胞化(文献44より引用)
OSM処理により、EpCAM陽性肝癌細胞において、前駆細胞様の遺伝子発現変化を示した。

AFP+EpCAM+肝細胞癌においては、miR-181の発現が亢進し、caudal-related homeobox2 (CDX2), GATA6, NLKを抑制する。NLKはWnt/ β -カテニンのシグナル伝達を抑制するため、miR-181の発現亢進は、Wnt/ β -カテニンのシグナル増強につながる³³⁾。miR-130bは、CD133+肝細胞癌において発現が亢進し、TP53INP1を抑制することにより、癌幹細胞の自己複製と腫瘍源性に参与している³⁴⁾。

5

肝癌幹細胞を標的とした治療法開発の検討

肝癌における癌幹細胞について、上述のような生物学的特徴が示唆されているが、こうした癌幹細胞の特徴を標的とした新しい治療法開発の検討が行われている。

CD133は、上述のごとく肝癌幹細胞の表面抗原マーカーと考えられている。CD133陽性肝癌細胞は、AKT/PKBのsurvival response

が活性化されており、AKT1阻害剤による細胞増殖抑制効果が期待される³⁵⁾。また、CD133を標的とする抗体を用いての抗腫瘍効果について、肝癌細胞株の*in vitro*および免疫不全マウス肝癌モデルを用いての有効性が報告されている³⁶⁾。

CD133陽性細胞のうち、CD44を発現する細胞は、より腫瘍源性が強く、強力な増殖能と、自己複製能と多彩な癌細胞へと分化することが報告されており、このCD44を標的とした抗体による癌治療法の可能性が報告されている³⁷⁾。

肝癌幹細胞のマーカーと考えられているCD133については、動物実験において、CD133の抑制と5-FUにより、腫瘍容積が軽減されることが報告されている¹⁷⁾。

EpCAMを標的とした抗体による治療法開発が、乳癌、前立腺癌、大腸癌において臨床試験が行われている^{38,39)}。また、RNAiにてEpCAM発現が抑制すると、肝癌幹細胞数が

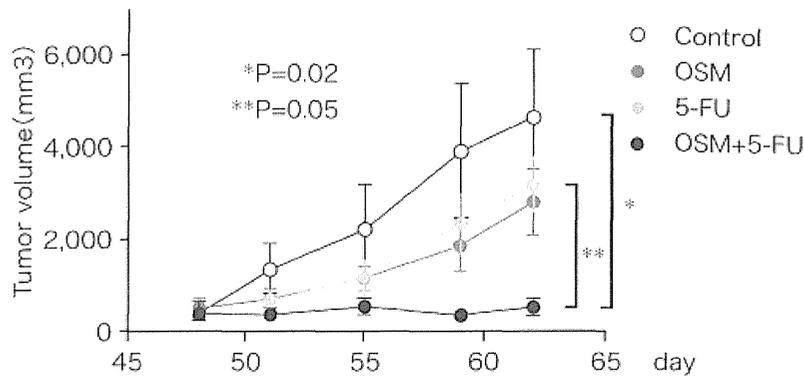


図5 オンコスタチンMによる肝癌細胞の5-FU感受性亢進(文献44より引用)
SCID マウスにおいて移植したEpCAM陽性AFP陽性肝癌腫瘍へ、OSMと5-FU
を投与した場合、5-FUの抗腫瘍効果の増強がみられた。

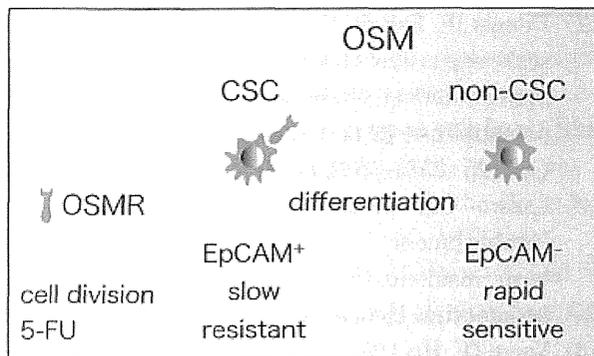


図6 オンコスタチンMによる癌幹細胞の分化と化学療法感受性(文献44より引用)
オンコスタチンM受容体を発現している肝癌幹細胞にオンコスタチンMが結合すると、分化誘導が生じ、化学療法に対する感受性が増強する。

減少し、腫瘍源性、侵襲性が低下する⁴⁰⁾。また、EpCAMは、Wnt/ β -カテニンシグナルの転写標的であることが示され⁴¹⁾、このシグナル伝達の抑制による肝癌幹細胞の標的治療が示唆されている⁴¹⁾。

オンコスタチンM (OsM)は、インターロイキン6関連のサイトカインである。肝芽細胞のOsM受容体と結合し、STAT3を介してシグナル伝達を行い、肝細胞への分化を促す^{42, 43)}。EpCAM陽性肝癌細胞をOsMにて処理すると、STAT3を介して肝細胞様に分化し、前駆細胞関連の遺伝子発現が減少した(図

4)⁴⁴⁾。また、5-FUによる抗腫瘍効果もOsMによって増強された(図5)⁴⁴⁾。このように、癌幹細胞の分化を誘導することにより、化学療法効果を増強させる可能性が示唆された(図6)。

Hedgehogシグナル伝達については、sonic HedgehogをsiRNAによって抑制した場合、肝癌細胞の増殖が抑制され、かつ5-FUの感受性が増強するとの報告がある⁴⁵⁾。

このように、肝癌幹細胞のマーカー、生物学的特徴を標的とした新たな治療方法の開発の可能性が示唆されている。

6 今後の展望

癌幹細胞あるいは癌源細胞は、その存在を示唆する知見が多く報告されているものの、まだ完全に定義、証明され得ていない⁴⁶⁾。このことは、癌生物学の複雑さの象徴であり、その根治治療法開発への道の険しさを物語っているとみえる。肝癌細胞群のなかには、細胞表面抗原、シグナル伝達機構、分子機構について、肝の発生、再生におけるそれらの特徴を共通に有する細胞群があり、その細胞群を肝癌幹細胞あるいは肝癌源細胞と定義して解析研究が進められてきた。癌化学療法に

よって完全に消失しなかった腫瘍内に、再び癌組織を増殖させる細胞が存在するのは明らかであるが、その残存腫瘍のなかにある細胞群のうち、どの細胞が癌の根源細胞なのか、その化学療法抵抗性のある根源細胞が、肝癌組織形成の原点と考えられ、報告されている肝癌幹細胞あるいは肝癌源細胞とすべて同一なのか、さらなる研究が必要である。肝癌幹細胞あるいは肝癌源細胞に特異的な表現型、シグナル伝達機構、分子機構を標的とした根治治療方法が開発され、その新たな根治治療法によって化学療法抵抗性の肝癌を完全除去することが可能になったときに、肝癌幹細胞あるいは肝癌源細胞の存在が確実に存在することが示され、それらを標的とした治療の重要性が証明される時であると考えられる。

文 献

- 1) Tong CM, Ma S, Guan XY : Biology of hepatic cancer stem cells. *J Gastroenterol Hepatol* 26 : 1229-1237, 2011
- 2) Bonnet D, Dick JE : Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3 : 730-737, 1997
- 3) Yamashita T, Honda M, Kaneko S : Heterogeneity of Liver Cancer Stem Cells. *Molecular Genetics of Liver Neoplasia* : Springer New York : 301-317, 2011
- 4) Schmelzer E, Zhang L, Bruce A et al : Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204 : 1973-1987, 2007
- 5) Mizrak D, Brittan M, Alison MR : CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 214 : 3-9, 2008
- 6) Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H et al : Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351 : 820-824, 2006
- 7) Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM et al : Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 171 : 386-395, 2007
- 8) Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED et al : AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90 : 5002-5012, 1997
- 9) Fargeas CA, Corbeil D, Huttner WB : Huttner, AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells* 21 : 506-508, 2003
- 10) Yamashita T, Forgues M, Wang W et al : EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68 : 1451-1461, 2008
- 11) Rege TA, Hagood JS : Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 20 : 1045-1054, 2006
- 12) Dennis JE, Esterly K, Awadallah A et al : Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem Cells* 25 : 2575-2582, 2007
- 13) Lázaro CA, Croager EJ, Mitchell C et al : Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* 38 : 1095-1106, 2003
- 14) Yang ZF, Ho DW, Ng MN et al : Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 13 : 153-166, 2008
- 15) Idzerda RL, Carter WG, Nottenburg C et al : Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 4659-4663, 1989
- 16) Zöller M : CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 11 : 254-267, 2011
- 17) Haraguchi N, Ishii H, Mimori K et al : CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 120 : 3326-3339, 2010
- 18) Clevers H : Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127 : 469-480, 2006
- 19) Kühl M : Non-canonical Wnt signaling in *Xenopus*: regulation of axis formation and gastrulation. *Semin Cell Dev Biol* 13 : 243-249, 2002
- 20) Zaret KS : Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 9 : 329-340, 2008

- 21) Yamashita T, Ji J, Budhu A et al : EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 136 : 1012–1024, 2009
- 22) Yao Z, Mishra L : Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 8 : 1691–1698, 2009
- 23) Mishra L, Derynck R, Mishra B : Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. *Science* 310 : 68–71, 2005
- 24) Seok JY, Na DC, Woo HG et al : A fibrous stromal component in hepatocellular carcinoma reveals a cholangiocarcinoma-like gene expression trait and EMT. *Hepatology*, 2012
- 25) Bray SJ : Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 : 678–689, 2006
- 26) Cao L, Zhou Y, Zhai B et al : Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 11 : 71, 2011
- 27) McMahon AP : More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 100 : 185–188, 2000
- 28) Wilson CW, Chuang PT : New "hogs" in Hedgehog transport and signal reception. *Cell* 125 : 435–438, 2006
- 29) Huang S, He J, Zhang X et al : Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 27 : 1334–1340, 2006
- 30) Chiba T, Miyagi S, Saraya A et al : The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68 : 7742–7749, 2008
- 31) Bartel DP : MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136 : 215–233, 2009
- 32) Ventura A, Jacks T : MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 136 : 586–591, 2009
- 33) Ji J, Yamashita T, Budhu A et al : Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology* 50 : 472–480, 2009
- 34) Ma S, Tang KH, Chan YP et al : miR-130b Promotes CD133 (+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell* 7 : 694–707, 2010
- 35) Ma S, Lee TK, Zheng BJ et al : CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 27 : 1749–1758, 2008
- 36) Smith LM, Nesterova A, Ryan MC et al : CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer* 99 : 100–109, 2008
- 37) Zhu Z, Hao X, Yan M et al : Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 126 : 2067–2078, 2010
- 38) Kurtz JE, Dufour P : Adecatumumab: an anti-EpCAM monoclonal antibody, from the bench to the bedside. *Expert Opin Biol Ther* 10 : 951–958, 2010
- 39) Gires O, Bauerle PA : EpCAM as a target in cancer therapy. *J Clin Oncol* 28 : e239–240, 2010
- 40) Terris B, Cavard C, Perret C : EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52 : 280–281, 2010
- 41) Yamashita T, Budhu A, Forgues M et al : Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 67 : 10831–10839, 2007
- 42) Kinoshita T, Miyajima A : Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 1592 : 303–312, 2002
- 43) Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y et al : Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 18 : 2127–2136, 1999
- 44) Yamashita T, Honda M, Nio K et al : Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 70 : 4687–4697, 2010
- 45) Wang Q, Huang S, Yang L et al : Down-regulation of Sonic hedgehog signaling pathway activity is involved in 5-fluorouracil-induced apoptosis and motility inhibition in Hep3B cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40 : 819–829, 2008
- 46) Oishi N, Wang XW : Wang, Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int J Biol Sci* 7 : 517–535, 2011

* * *

