

201306011A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞を用いた 肝再生療法実用化研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞を用いた
肝再生療法実用化研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成26（2014）年 3月

肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞を用いた肝再生療法実用化研究

研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
<u>研究分担者</u>		
酒井 佳夫	金沢大学医薬保健研究域医学系	准教授
高村 雅之	金沢大学附属病院	講師
山下 竜也	金沢大学附属病院地域医療教育センター	特任教授
山下 太郎	金沢大学附属病院総合診療部	助教
荒井 邦明	金沢大学附属病院	助教
砂子阪 肇	金沢大学附属病院	助教
井野 秀一	金沢大学附属病院先端医療開発センター	特任教授
中村 裕之	金沢大学医薬保健研究域医学系・環境生態医学	教授
長瀬 克彦	金沢大学附属病院先端医療開発センター	准教授

目 次

I. 総括研究報告

肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞を用いた肝再生療法実用化研究

金子 周一 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 11

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

I. 総括研究報告

肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞を用いた肝再生療法実用化研究

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：肝硬変は、慢性肝疾患の終末像であり、肝機能低下、肝不全に至る重篤な状態である。肝硬変に対する治療法には肝移植以外に根治的治療法はなく、新たな治療法開発が望まれている。間葉系幹細胞は、多分化能を有し、肝細胞への分化能も報告されている。脂肪組織由来間質細胞には間葉系幹細胞が豊富に含まれ、アクセスがよく、自己由来の細胞が獲得可能である。これまでにマウス肝硬変モデルにおいて、脂肪組織由来間質細胞の肝修復再生効果を確認し報告した。本研究では、自己脂肪組織由来間質細胞投与による肝再生療法実用化を目的としている。第20回ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会（平成24年5月）にて実施を承認された安全性試験である「肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法の臨床研究」を実施する。本年度、実施予定4例中、2例を実施、重篤な有害事象の発生は認められなかった。安全性試験終了後の臨床試験計画策定における評価項目決定のため、疫学研究「肝硬変患者の予後調査観察研究」を計画し、学内倫理委員会の承認を得て開始した。

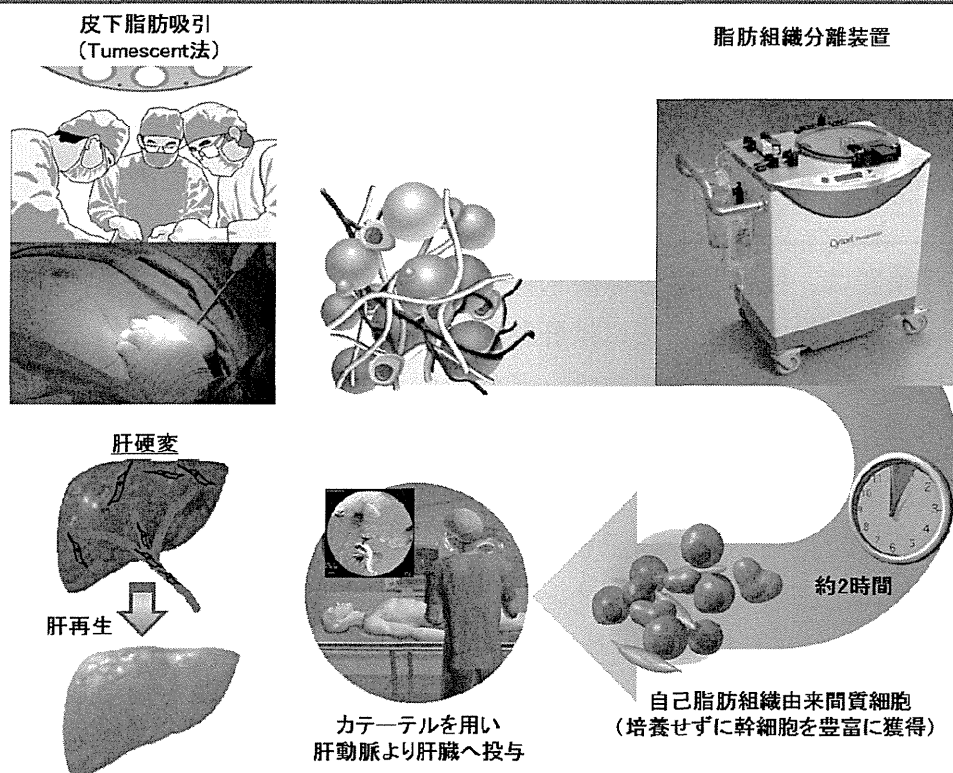
A. 研究目的

肝硬変患者は、我が国で約30-40万人存在し、年間1万7千人が死亡している。肝硬変に至ると最終的に肝臓の機能が著明に低下した肝不全に陥り、肝移植以外に治療法がない。また、肝移植療法においては、改正臓器移植法施行後においてもドナー不足は解消されず、生体肝移植が我が国では主である。肝移植療法の問題として、生体肝移植におけるドナーへの侵襲、肝移植後の免疫抑制剤投与がある。そのため、肝硬変に対する新たな治療法開発が必要である。間葉系幹細胞は、多分化能を有し、肝細胞への分化能も報告されており、臓器再生療法への応用研究が進められている。脂肪組

織間質細胞には、間葉系幹細胞が豊富に含まれるため、培養せずに自己由来の間葉系幹細胞を獲得できる。これまでに、前臨床検討として、マウス肝硬変モデルに対する脂肪組織由来間質細胞投与による肝線維化改善、肝機能改善効果、肝炎抑制効果を確認し、報告した(Hepatology 2013)。本研究は、肝硬変患者を対象とし、自己脂肪組織より、脂肪分離装置を用いて間質細胞を分離、培養せずに経肝動脈的にカテーテルを用いて硬変肝へ投与する肝再生療法の実用化研究である。肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞投与による肝再生療法実用化を目標とし、安全性臨床試験「肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈

図1

自己脂肪組織由来間質細胞投与による肝再生療法臨床試験



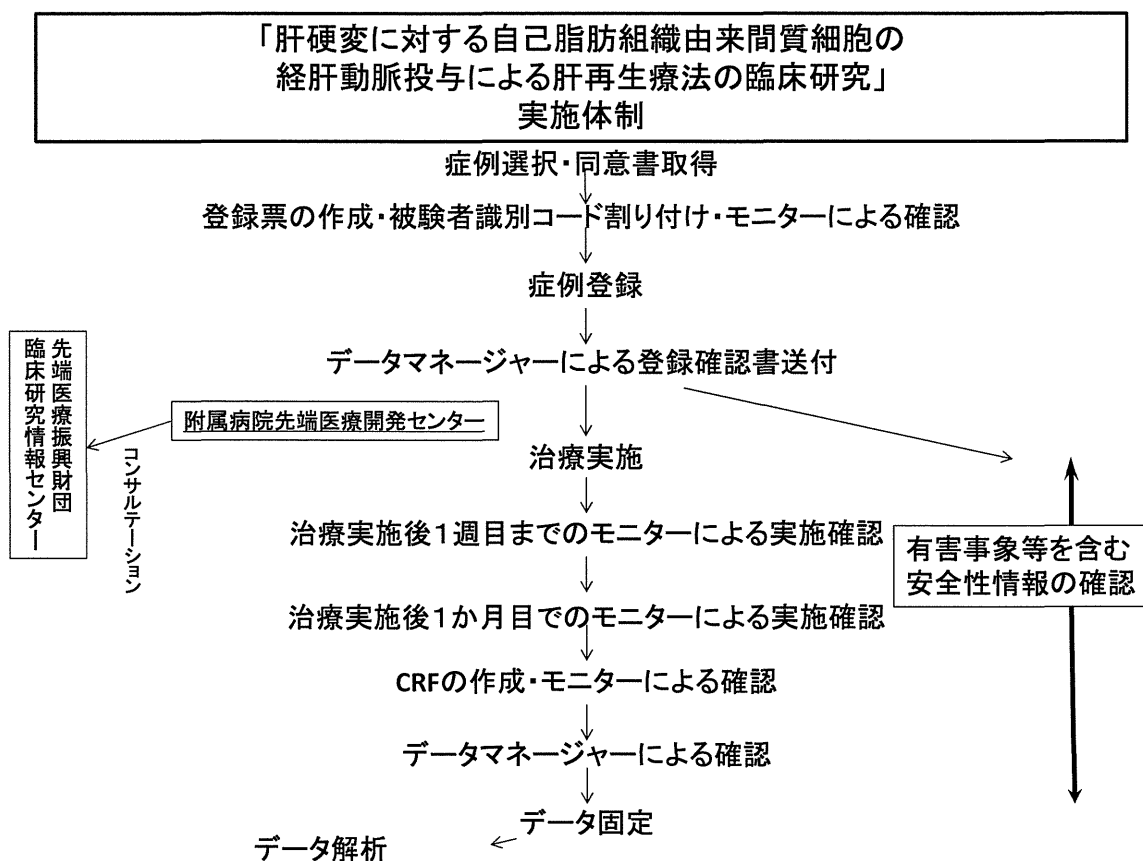
投与による肝再生療法の臨床研究」をまず実施し、実用化への臨床試験を行う。

B. 研究方法

「肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法の臨床研究」において、以下のエントリー基準を満たす肝硬変患者を対象とする。①血液検査、画像診断、病理学的検査の方法にて、肝硬変と診断されている患者で、以下の条件を満たす症例。原因については、原因不明以外は原則として問わない。②年齢が20歳以上、80歳以下、③総ビリルビン値が3.0 mg/dl以下、④血小板が $7.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 以上、⑤プロトロンビン活性が70%以上、⑥血清クレアチニンが1.5 mg/dl以下、⑦試験の性質を理解する能力を有し、本試

験の参加に関して同意が文書で得られる。対象者の腹壁、大腿、臀部のいずれかの皮下より、美容外科領域にて一般的に行われているチューメセント法により脂肪組織を採取、脂肪組織分離装置 (Cytori Therapeutics 社、San Diego、米国) を用いて脂肪組織由来間質細胞を獲得し、経皮的に肝動脈へカテーテルを挿入し、細胞を投与する (図1)。余剰脂肪組織由来間質細胞浮遊液について、日本薬局法に準拠した無菌試験を実施する。細胞表面抗原解析として、ヒト間葉系幹細胞解析用 Human MSC Analysis Kit® (BD) を用いて、フローサイトメトリーにて評価する。また、余剰細胞の培養を試みる。余剰脂肪組織由来間質細胞、および継代培養した脂肪組織由来間質細胞について、DNA マイクロアレイ

図 2



による包括的遺伝子発現解析を行い、特性解析を行う。実施予定症例数は4例。2例は $3.3 \times 10^5 / \text{Kg}$ 、2例は $6.6 \times 10^5 / \text{Kg}$ の細胞を投与予定。主要評価項目は、細胞投与後1か月における安全性評価である。実施においては、金沢大学先端医療開発センターによる、モニタリング、データマネジメントの下（図2）、図3に示すスケジュールにて実施した。

（倫理面への配慮）

臨床研究「肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法の臨床研究」は、第20回ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会（平成24年5月）にて実施の承認を得ている。実施において、モニタリング、データマネジメン

ト体制を整備している。

図3
スケジュール

	治療前	投与日	治療後		
			1日後	1週後	1ヶ月後
同意取得	○				
脂肪採取 細胞投与		○			
腹部造影CT あるいは MRI	○1か月 前				○
腹部超音波	○1か月 前				
血液検査	○	○	○	○	○
遺伝子発現 解析	○		○	○	○
末梢血液単 核球凍結保 存	○		○	○	○
有害事象		○	○	○	○

C. 研究結果

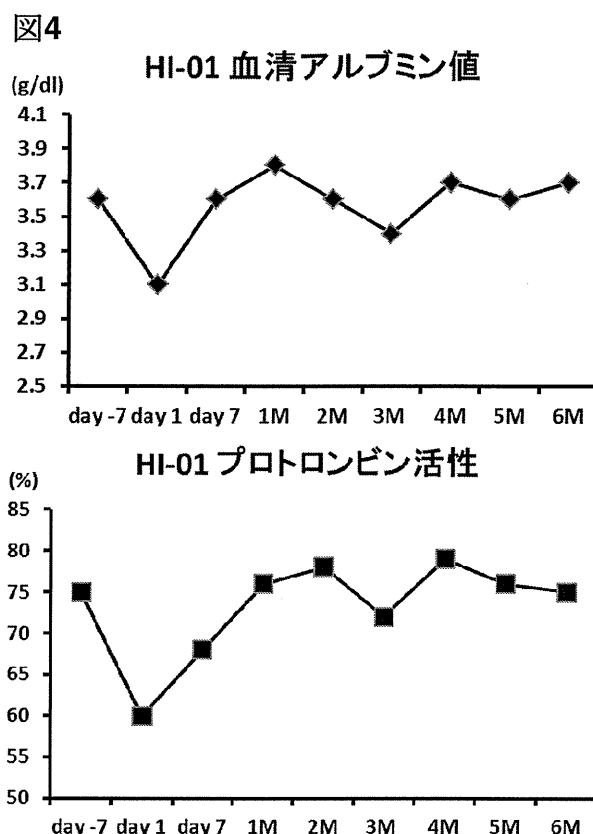
実施予定4例中、2例について実施した。登録番号 HI-01 の症例は、C 型肝硬変患者であり、エントリー基準を満たし、本臨床研究参加の文書同意を得た。臀部皮下より 320 ml の脂肪組織を採取、脂肪組織分離装置にて間質細胞を分離、94.5%の生存率で 5.15×10^7 個の生細胞を獲得した。獲得した間質細胞における、間葉系幹細胞マーカー関連表面抗原発現は、CD90:12.7%、CD73 11.2%、CD44 10.3%、であった(表1)。

表 1
脂肪組織由来間質細胞の
表面抗原発現 (HI-01)

抗原	発現率
CD90	12.7%
CD105	1.76%
CD73	11.2%
CD45	3.7%
CD44	10.3%
CD34	8.4%
CD31	5.6%

体重 66.1Kg のため、 3.3×10^5 個/Kg の投与細胞数である 2.2×10^7 個の細胞を経肝動脈的に投与した。投与後1か月間において重篤な有害事象を認めなかった。血清アルブミン値は、細胞投与1週前値 3.6 g/dl であったが、研究期間、追跡調査において、投与後1か月目 3.8 g/dl、6か月後 3.7 g/dl をはじめ、概ね投与前値を維持、あるいは改善を示した(図4)。プロトロンビン(PT)活性値は、細胞投与前 75%であったが、投与後2か月目 78%、投与後4か月

目 79%をはじめ、ほぼ投与前値同等か改善を示した。



登録番号 HI-03 は、C 型肝硬変患者でエントリー基準を満たし、本臨床研究参加の文書同意を得た。腹部皮下より 150 ml の脂肪組織を採取、脂肪組織分離装置にて間質細胞を分離、100%の生存率で 2.5×10^9 個の生細胞を獲得した。獲得した間質細胞における、間葉系幹細胞マーカー関連表面抗原発現は、CD90:1.73%、CD73 0.42%、CD44 32.7%、であった(表2)。体重 67.9Kg のため、 3.3×10^5 個/Kg の投与細胞数である 2.2×10^7 個の細胞を経肝動脈的に投与した。研究期間の1か月間の経過中、一過性のグレード1の血小板減少($67,000/\mu l$)を認めたものの、研究終了時には $91,000/\mu l$ に回復し、重篤な有害事象は認めなかった。

図5

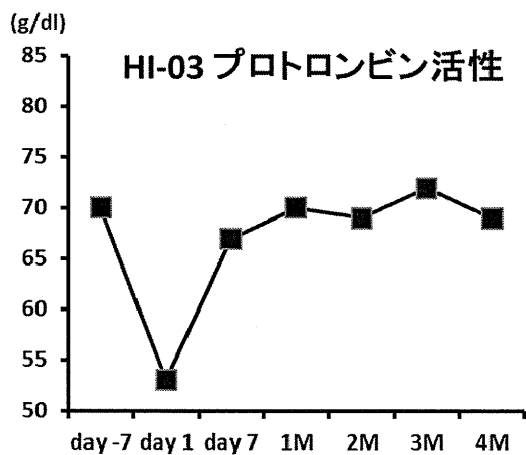
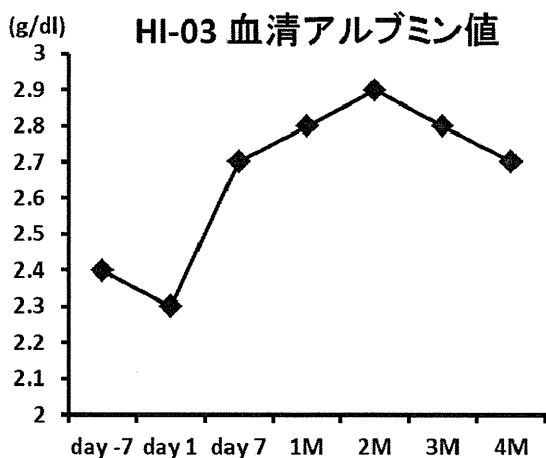


表2

脂肪組織由来間質細胞の表面抗原発現 (HI-03)

抗原	発現率
CD90	1.73%
CD105	0.01%
CD73	0.42%
CD45	0%
CD44	32.7%
CD34	0.9%
CD31	1.9%

投与後1か月目において腹部造影MRIを実施、著変は認められなかった。血清アルブミン値は、細胞投与1週間前値2.4g/dlであったが、治療後の研究期間、追跡調査において、2か月目の2.9g/dlをピークに前値より上昇した(図5)。プロトロンビン活性は、治療後1週以降において、ほぼ治療前値と同等であった。採取した細胞について、いずれも無菌試験による無菌性を確認し得た。

余剰脂肪組織由来間質細胞について、その特性解析を行った。HI-01、HI-03の余剰細胞の培養を試みたところ、継代培養が可能であった。HI-01の余剰脂肪組織由来間質細胞を5代継代した細胞の表面抗原発現解析では、CD90:96.6%、CD105 95.5%、CD73 96.7%、CD44 80.9%(表3)、HI-03では、CD90:86.0%、CD105 82.9%、CD73 96.4%、CD44 96.6%(表4)であり、継代培養増殖した細胞の多数において、間葉系幹細胞マーカーと考えられている表面抗原が発現していた。

表3

培養脂肪組織由来間質細胞の表面抗原発現 (HI-01、5代継代)

抗原	発現率
CD90	96.6%
CD105	95.5%
CD73	96.7%
CD45	0%
CD44	80.9%
CD34	0%

表4

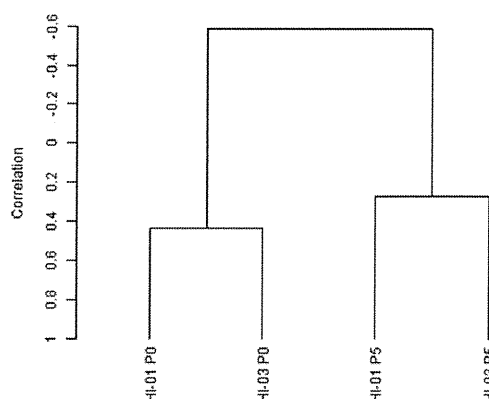
培養脂肪組織由来間質細胞の表面抗原発現 (HI-03、5代継代)

抗原	発現率
CD90	86.0%
CD105	82.9%
CD73	96.4%
CD45	0%
CD44	96.6%
CD34	0.6%

HI-01 および HI-03 の余剰脂肪組織間質細胞、および5代継代培養した間質細胞について、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。発現の Quality check を通過した 14014 遺伝子に関する階層クラスタリング解析では、非培養余剰脂肪組織間質細胞と培養脂肪組織由来間質細胞がクラスタを形成し、それぞれ発現プロファイルが類似することが示された (図6)。非培養余剰脂肪組織由来間質細胞と5代継代培養脂肪組織由来間質細胞間に2倍以上の発現量差があった遺伝子は、1890 個存在し、960 個が非培養余剰脂肪組織間質細胞で発現が亢進、930 個が5代継代培養脂肪組織において発現が亢進していた。非培養余剰脂肪組織由来間質細胞で発現が亢進していた遺伝子が関連する生物学的プロセスの上位には、immune system process、immune response、regulation of immune system process、があがり (表5)、5代継代培養脂肪組織由来間質脂肪で発現が亢進していた遺伝子が関連する生物学的プロセスの上位には、organic substance metabolic process、cellular metabolic

図6

非培養および5代培養脂肪組織由来間質細胞の遺伝子発現の階層クラスタリング



process、single-organism metabolic process、があがった (表6)。この結果より、非培養脂肪組織由来間質細胞の免疫系への関連、培養脂肪組織由来間質細胞の代謝プロセスへの関連が示された。

表5

非培養脂肪組織由来間質細胞において発現が亢進していた遺伝子が関連するプロセス

- 1 immune system process
- 2 immune response
- 3 regulation of immune system process
- 4 regulation of response to stimulus
- 5 positive regulation of immune system process
- 6 defense response
- 7 response to stimulus
- 8 response to wounding
- 9 regulation of immune response
- 10 positive regulation of response to stimulus
- 11 regulation of multicellular organismal process
- 12 response to stress
- 13 response to other organism
- 14 positive regulation of biological process
- 15 response to biotic stimulus

表6

5代継代培養脂肪組織由来間質細胞において発現が亢進していた遺伝子が関連するプロセス

1 organic substance metabolic process
2 cellular metabolic process
3 single-organism metabolic process
4 metabolic process
5 primary metabolic process
6 cellular process
7 biosynthetic process
8 organic substance biosynthetic process
9 small molecule metabolic process
10 cellular component organization
11 cellular component organization or biogenesis
12 cellular protein metabolic process
13 cellular biosynthetic process
14 organonitrogen compound metabolic process
15 cellular amino acid metabolic process

D. 考察

肝硬変患者に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法臨床研究につき、実施予定4例中、 3.3×10^5 個/Kgの投与数を予定した2例に実施した。1例において一過性の血小板減少を認めたものの、研究終了時には回復し、重篤な有害事象は認められなかった。次年度において、 6.6×10^5 個/Kgを投与する2例を実施する。安全性臨床試験終了後、速やかに有効性評価臨床試験を実施するため、計画書策定準備を進めている。有効性の評価項目の設定のため、2000年から2013年の期間で、金沢大学消化器内科で診療を受けた肝硬変患者を対象とし、経時的な採血項目の経過（血小板数、プロトロンビン時間、総タンパク、アルブミン、 γ グロブリン分画比、アンモニア、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン7S、ZTT、TTT、を含む）、Child-Pughスコア、食道静脈瘤合併の有無、肝性脳症合併の有無、肝細胞癌合併の有無の経過を検討する、疫学研究「肝硬変患者の予後調査観察研究」を計画し、金沢

大学医学倫理審査委員会の承認を得て（平成25年11月20日）実施中である。実用化に向け、医薬品・医療機器総合機構の個別面談を平成26年2月19日に受けた。引き続き医薬品・医療機器総合機構との相談を実施していく予定である。

獲得した脂肪組織由来間質細胞の特性について、間葉系幹細胞に発現していると考えられている表面抗原を発現する細胞群が、非培養および継代培養脂肪組織由来間質細胞において確認された。また、脂肪組織由来間質細胞の遺伝子発現解析により、非培養脂肪組織由来間質細胞の遺伝子発現の特徴は免疫系に関連し、余剰細胞に含まれ継代培養可能な細胞の遺伝子発現の特徴は、様々な代謝、細胞形成に関連するプロセスが関連することが示された。この遺伝子発現プロファイル解析から示された生物学的プロセスの特徴は、獲得され投与された自己脂肪組織由来間質細胞が、慢性炎症を背景に生じる肝硬変に対して、抗炎症、肝再生を促す生物学的作用を有する可能性を示唆すると考えられた。

E. 結論

安全性試験である臨床研究「肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法の臨床研究」において、実施予定4例中、2例を実施した。獲得した脂肪組織由来間質細胞の無菌状態、表面抗原解析、余剰脂肪組織由来間質細胞の培養により、間葉系幹細胞の特徴を有する細胞の含有が確認された。細胞投与による重篤な有害事象を認めなかった。次年度以降、安全性試験を終了し、有効性評価臨

床試験を実施し、実用化を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Eur J Immunol. 2013 Nov;43(11):2956-68.
- 2) Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology. 2013 Sep;58(3):1133-42.
- 3) S Sha Zeng, T Yamashita, M Kondo, K Nio, T Hayashi, Y Hara, Y Nomura, M Yoshida, T Hayashi, N Oishi, H Ikeda, M Honda, S Kaneko. The Transcription Factor SALL4 Regulates Stemness of EpCAM-positive Hepatocellular Carcinoma. J Hepatol 60(1):127-34, 2014 Jan.
- 4) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and

CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 57(4):1484-97, 2013 Apr.

2. 学会発表

- 1) Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Mami Higashimoto, Takuya Komura, Alessandro Nasti, Keiko Yoshida, Takahiro Ochiya, Takashi Wada, Masao Honda, Shuichi Kaneko. Features of immunomodulatory and therapeutic effects of mesenchymal stromal/stem cells on non-alcoholic steatohepatitis murine model in early and cirrhotic phases. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.1-5, 2013, Washington DC.
- 2) 酒井佳夫、関晃裕、金子周一. 脂肪組織由来間質細胞を用いた肝硬変に対する肝再生療法実用化への基礎的検討. シンポジウム消S10-1、第55回日本消化器病学会大会、平成25年10月10日 グランドプリンスホテル新高輪、東京
- 3) 酒井佳夫、関晃裕、金子周一. 肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来間質細胞投与による肝修復再生効果の検討. パネルディスカッション PD1-08、第40回日本肝臓学会西部会、平成25年12月6日、岐阜都ホテル、岐阜.
- 4) 関晃裕、酒井佳夫、Alessandro Nasti、吉田佳子、東元真実、小村卓也、本多政夫、金子周一. 肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来幹細胞による肝修復再生療法の検討. ポスターセッションP-156、第49回日本肝臓学会総会、平成25年6月6日、京王プラザホテル、東京.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

「脂肪組織由来間質細胞群を含む肝炎治療剤」(特願 2010-203796/2010-09-11)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
SS Zeng, (金子、山下太郎)	The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma.	J Hepatol	60(1)	127-134	2014
M Higashimoto, (金子、酒井、高村)	Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression.	Eur J Immunol	43(11)	2956-2968	2013
A Seki, (金子、酒井、高村)	Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model.	Hepatology	58(3)	1133-1142	2013
T Yamashita, (金子、山下竜也、山下太郎)	Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57(4)	1484-1497	2013

III. 研究成果の刊行物・別刷



The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma

Sha Sha Zeng¹, Taro Yamashita^{1,2,*}, Mitsumasa Kondo¹, Kouki Nio¹, Takehiro Hayashi¹, Yasumasa Hara¹, Yoshimoto Nomura¹, Mariko Yoshida¹, Tomoyuki Hayashi¹, Naoki Oishi¹, Hiroko Ikeda³, Masao Honda¹, Shuichi Kaneko¹

¹Department of Gastroenterology, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Ishikawa, Japan; ²Department of General Medicine, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Ishikawa, Japan; ³Department of Pathology, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Ishikawa, Japan

Background & Aims: Recent evidence suggests that hepatocellular carcinoma can be classified into certain molecular subtypes with distinct prognoses based on the stem/maturation status of the tumor. We investigated the transcription program deregulated in hepatocellular carcinomas with stem cell features.

Methods: Gene and protein expression profiles were obtained from 238 (analyzed by microarray), 144 (analyzed by immunohistochemistry), and 61 (analyzed by qRT-PCR) hepatocellular carcinoma cases. Activation/suppression of an identified transcription factor was used to evaluate its role in cell lines. The relationship of the transcription factor and prognosis was statistically examined.

Results: The transcription factor SALL4, known to regulate stemness in embryonic and hematopoietic stem cells, was found to be activated in a hepatocellular carcinoma subtype with stem cell features. SALL4-positive hepatocellular carcinoma patients were associated with high values of serum alpha fetoprotein, high frequency of hepatitis B virus infection, and poor prognosis after surgery compared with SALL4-negative patients. Activation of SALL4 enhanced spheroid formation and invasion capacities, key characteristics of cancer stem cells, and up-regulated the hepatic stem cell markers *KRT19*, *EPCAM*, and *CD44* in cell lines. Knockdown of SALL4 resulted in the down-regulation of these stem cell markers, together with attenuation of the invasion capacity. The SALL4 expression status was associated with

histone deacetylase activity in cell lines, and the histone deacetylase inhibitor successfully suppressed proliferation of SALL4-positive hepatocellular carcinoma cells.

Conclusions: SALL4 is a valuable biomarker and therapeutic target for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma with stem cell features.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Cancer is a heterogeneous disease in terms of morphology and clinical behavior. This heterogeneity has traditionally been explained by the clonal evolution of cancer cells and the accumulation of serial stochastic genetic/epigenetic changes [1]. The alteration of the microenvironment by tumor stromal cells is also considered to contribute to the development of the heterogeneous nature of the tumor through the activation of various signaling pathways in cancer cells, including epithelial mesenchymal transition programs [2].

Recent evidence suggests that a subset of tumor cells with stem cell features, known as cancer stem cells (CSCs), are capable of self-renewal and can give rise to relatively differentiated cells, thereby forming heterogeneous tumor cell populations [3]. CSCs were also found to generate tumors more efficiently in immunodeficient mice than non-cancer stem cells in various solid tumors as well as hematological malignancies [4]. CSCs are also more metastatic and chemo/radiation-resistant than non-CSCs and are therefore considered to be a pivotal target for tumor eradication [5,6].

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a leading cause of cancer death worldwide [7]. Recently, we proposed a novel HCC classification system based on the expression status of the hepatic stem/progenitor markers epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and alpha fetoprotein (AFP) [8]. EpCAM-positive (*) AFP⁺ HCC (hepatic stem cell-like HCC; HpSC-HCC) is characterized by an onset of disease at younger ages, activation of Wnt/ β -catenin signaling, a high frequency of portal vein invasion and poor

Keywords: Cancer stem cell; Hepatocellular carcinoma; Gene expression profile; Chemosensitivity.

Received 15 March 2013; received in revised form 27 August 2013; accepted 28 August 2013; available online 6 September 2013

* Corresponding author. Address: Department of General Medicine/Gastroenterology, Kanazawa University Hospital, 13-1 Takara-Machi, Kanazawa, Ishikawa 920-8641, Japan. Tel.: +81 76 265 2042; fax: +81 76 234 4281.

E-mail address: taroy@m-kanazawa.jp (T. Yamashita).

Abbreviations: CSC, cancer stem cell; HCC, hepatocellular carcinoma; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; AFP, alpha fetoprotein; HpSC-HCC, hepatic stem cell-like HCC; MH-HCC, mature hepatocyte-like HCC; SALL4, Sal-like 4 (*Drosophila*); qRT-PCR, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; HDAC, histone deacetylase; SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid; SBHA, suberic bis-hydroxamic acid; NuRD, nucleosome remodeling and deacetylase.



Research Article

prognosis after radical resection, compared with EpCAM⁻ AFP⁻ HCC (mature hepatocyte-like HCC; MH-HCC) [9]. *EPCAM* is a target gene of Wnt/ β -catenin signaling, and EpCAM⁺ HCC cells isolated from primary HCC and cell lines show CSC features including tumorigenicity, invasiveness, and resistance to fluorouracil [9,10]. Thus, EpCAM appears to be a potentially useful marker for the isolation of liver CSCs in HpSC-HCC. However, key transcriptional programs responsible for the maintenance of EpCAM⁺ CSCs are still unclear.

In this study, we aimed to clarify the transcriptional programs deregulated in HpSC-HCC using a gene expression profiling approach. We found that the *SALL4* gene encoding Sal-like 4 (*Drosophila*) (*SALL4*), a zinc finger transcriptional activator and vertebrate orthologue of the *Drosophila* gene *spalt (sal)* [11], was up-regulated in HpSC-HCC. In adults, *SALL4* is known to be expressed in hematopoietic stem cells and their malignancies, but its role in HCC has not yet been fully elucidated [12–14]. We therefore investigated the role of *SALL4* in the regulation and maintenance of EpCAM⁺ HCC.

Materials and methods

Clinical HCC specimens

A total of 144 HCC tissues and adjacent non-cancerous liver tissues were obtained from patients who underwent hepatectomy for HCC treatment from 2002 to 2010 at Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Japan. These samples were formalin-fixed and paraffin-embedded, and used for immunohistochemistry (IHC). A further 61 HCC samples were obtained from patients who underwent hepatectomy from 2008 to 2011; these were freshly snap-frozen in liquid nitrogen and used for RNA analysis. Of these 61 HCCs, 8 and 36 cases were defined as HpSC-HCC and MH-HCC, respectively, according to previously described criteria [8].

27 HCC cases were included in both the IHC cohort ($n = 144$) and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) cohort ($n = 61$), and *SALL4* gene and protein expression were compared between these cases. An additional fresh HpSC-HCC sample was obtained from a surgically resected specimen and immediately used for preparation of a single-cell suspension. All experimental and tissue acquisition procedures were approved by the Ethics Committee and the Institutional Review Board of Kanazawa University Hospital. All patients provided written informed consent.

Microarray analysis

Detailed information on microarray analysis is available in the Supplementary Materials and methods.

Cell culture and reagents

Human liver cancer cell lines HuH1, HuH7, HLE, and HLF were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB), and Hep3B and SK-Hep-1 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Single-cell suspensions of primary HCC tissue were prepared as described previously [15]. Detailed information is available in the Supplementary Materials and methods. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor suberic bis-hydroxamic acid (SBHA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Plasmid constructs pCMV6-SALL4 (encoding *SALL4A*), pCMV6-SALL4-GFP, and 29mer shRNA constructs against human *SALL4* (No. 7412) were obtained from OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD). These constructs were transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol.

Western blotting

Whole cell lysates were prepared using RIPA lysis buffer. Nuclear and cytoplasmic proteins were extracted using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). Mouse monoclonal antibody

to human *Sall4* clone 6E3 (Abnova, Walnut, CA), rabbit polyclonal antibodies to human Lamin B1 (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA), and mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used. Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) as described previously [15,16].

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Detailed information on qRT-PCR is available in the Supplementary Materials and methods.

IHC and immunofluorescence (IF) analyses

IHC was performed using an Envision+ kit (Dako, Carpinteria, CA) according to the manufacturer's instructions. Anti-SALL4 monoclonal antibody 6E3 (Abnova, Walnut, CA), anti-EpCAM monoclonal antibody VU-1D9 (Oncogene Research Products, San Diego, CA), and anti-CK19 monoclonal antibody RCK108 (Dako Japan, Tokyo, Japan) were used for detecting SALL4, EpCAM, and CK19, respectively. Anti-Sall4 rabbit polyclonal antibodies (ab29112) (Abnova) and vector red (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) were used for double color IHC analysis. Samples with >5% positive staining in a given area were considered to be positive for a particular antibody. For IF analyses, Alexa 488 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (Life Technologies) was used as a secondary antibody.

Cell proliferation, spheroid formation, invasion, and HDAC activity assay

Detailed information on this topic is available in the Supplementary Materials and methods.

Statistical analyses

Student's *t* tests were performed with GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) to compare various test groups assayed by cell proliferation assays and qRT-PCR analysis. Spearman's correlation analysis and Kaplan-Meier survival analysis were also performed with GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software).

Results

Activation of *SALL4* in HpSC-HCC

To elucidate the transcriptional programs deregulated in HpSC-HCC, we performed class-comparison analyses and identified 793 genes showing significant differences in differential expression between HpSC-HCC ($n = 60$) and MH-HCC ($n = 96$) ($p < 0.001$), as previously described [9]. Of them, 455 genes were specifically up-regulated in HpSC-HCC, and we performed transcription factor analysis using this gene set to identify their transcriptional regulators by MetaCore software. We identified four transcription factor genes, *SALL4*, *NFYA*, *TP53*, and *SP1*, that were potentially activated in HpSC-HCC (Fig. 1A). Involvement of *TP53* and *SP1* in the stemness of HCC has previously been described [17,18], but the roles of *SALL4* and *NFYA* were unclear.

We investigated the interaction networks affected by *SALL4* and *NFYA* using the MetaCore dataset. We showed that *SALL4* might be a regulator of Akt signaling (*SP1*), Wnt signaling (*TCF7L2*), and epigenetic modification (*JARID2*, *DMRT1*, *DNMT3B*) [19], and could potentially regulate two other transcriptional regulators, *SP1* and *NFYA*, through Akt and Myb signaling pathways (Fig. 1B). As a recent study indicated that *SALL4* is a direct target of the Wnt signaling pathway [20], which is dominantly activated in HpSC-HCC [9], we focused on the expression of *SALL4* in HpSC-HCC, and confirmed its up-regulation in HpSC-HCC compared

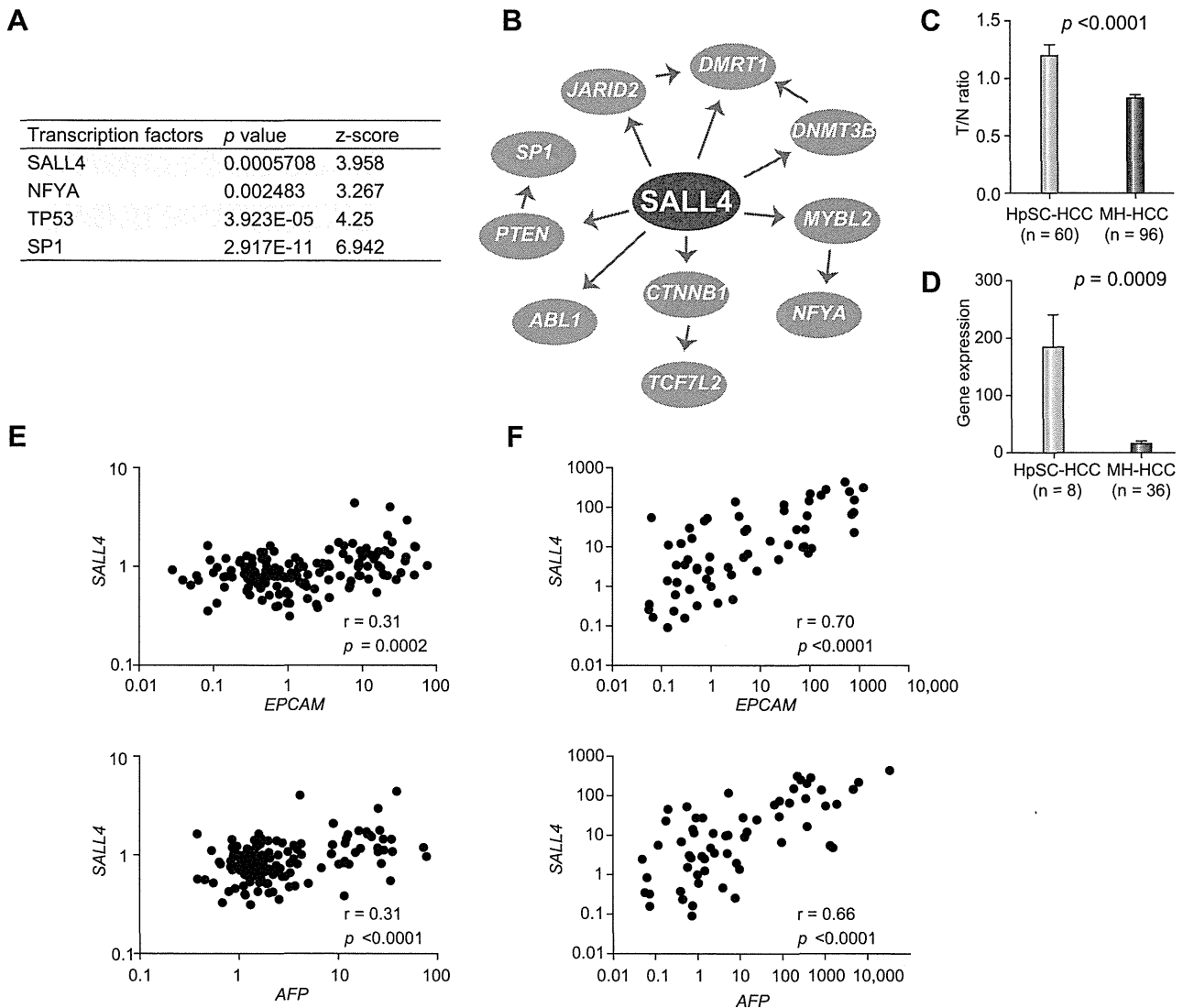


Fig. 1. Transcription factors potentially activated in HpSC-HCC. (A) Transcription factor analysis. Transcription factors regulating genes up-regulated in HpSC-HCC are listed with their *p* values and z-scores as calculated by MetaCore software. (B) Interaction network analysis. Seven genes (*ABL1*, *DMRT1*, *DNMT3B*, *JARID2*, *NFYA*, *SP1*, and *TCF7L2*, indicated in orange) shown to be up-regulated in HpSC-HCC were identified as potential target genes regulated by *SALL4* (indicated in red). (C) *SALL4* gene expression evaluated by microarray analysis. Tumor/non-tumor (T/N) ratios of microarray data in HpSC-HCC (*n* = 60) and MH-HCC (*n* = 96). (D) *SALL4* gene expression evaluated by qRT-PCR. Gene expression of *SALL4* in HpSC-HCC (*n* = 8) and MH-HCC (*n* = 36) samples. (E) Scatter plot analysis. Gene expression levels of *EPCAM* (upper panel) and *AFP* (lower panel) were positively correlated with those of *SALL4* in microarray data (*n* = 238, T/N ratios), as shown by Spearman's correlation coefficients. (F) Scatter plot analysis. Gene expression levels of *EPCAM* (upper panel) and *AFP* (lower panel) were positively correlated with those of *SALL4* in qRT-PCR data (*n* = 61), as shown by Spearman's correlation coefficients. (This figure appears in colour on the web.)

with MH-HCC as evaluated by microarray data (Fig. 1C). We validated this using an independent HCC cohort evaluated by qRT-PCR (Fig. 1D). We further examined the expression of *SALL4*, *EPCAM*, and *AFP* using microarray data of 238 HCC cases (Fig. 1E) and qRT-PCR data of 61 HCC cases (Fig. 1F). For the tumor/non-tumor ratios, we identified a weak positive correlation between *SALL4* and *EPCAM* ($r = 0.31$, $p < 0.0001$) and between *SALL4* and *AFP* ($r = 0.31$, $p = 0.0003$) in the microarray cohort. We further evaluated expression of these genes in HCC tissues by qRT-PCR, and we validated the strong positive correlation between *SALL4* and *EPCAM* ($r = 0.70$, $p < 0.0001$) and between *SALL4* and *AFP* ($r = 0.66$, $p < 0.0001$) in the independent cohort.

Next we performed IHC analysis of 144 HCC cases surgically resected at Kanazawa University Hospital. We first confirmed the nuclear accumulation of *SALL4* stained by an anti-human *SALL4* antibody (Fig. 2A). We further confirmed the concordance of *SALL4* protein expression evaluated by IHC, and *SALL4* gene expression evaluated by qRT-PCR using the same samples (Fig. 2B). We detected the nuclear expression of *SALL4* in 43 of 144 HCC cases (Table 1). After evaluating the clinicopathological characteristics of *SALL4*-positive and -negative HCC cases, we identified that *SALL4*-positive HCCs were associated with a significantly high frequency of hepatitis B virus (HBV) infection and significantly high serum AFP values. We further identified that