

はヒト疾患から予想される器官形成への関与に加えて、幹細胞の未分化性の維持や分化運命決定を担う、発生過程で重要な役割を果たす分子と考えられる。造血幹細胞ではSALL4が発現しており潜在的な増殖制御因子として正常造血機構を制御する一方で、急性骨髄性白血病(AML)や骨髄異形成症候群(MDS)で、健常人と比べてSALL4発現が高いことから白血病誘発との関連が示唆されている。実際にSALL4BトランスジェニックマウスではMDS様症状を呈しAMLへの移行がみられる¹⁵⁾。また胚細胞腫瘍、乳癌、AFP産生胃癌、肺癌などの固形癌でもSALL4発現が認められ、発癌との関連が示唆されている¹⁶⁻¹⁹⁾。しかし、肝癌におけるSALL4の関与はこれまで不明であった。

3 正常肝発生過程と肝癌組織におけるSALL4発現とその機能

筆者らはマウス胎仔を用いた研究から、Sall4が胎生肝幹・前駆細胞に発現しており、その後発生過程の進行に伴って発現が徐々に低下し成体の成熟肝細胞では消失することを見いだしている。またSall4の肝幹・前駆細胞の分化・運命決定における重要性を報告している²⁰⁾。一方、ヒト正常肝組織においてSALL4は、胎児肝では肝幹細胞が存在するEpCAM⁺CK19⁺のductal plate領域や肝小葉に散在する肝芽細胞に発現するのに対し、成体肝では成熟した肝細胞や胆管上皮細胞に全く発現を認めなかった(図1A-C)。この結果は前述のマウス肝発生過程における発現パターンと一致しており、ヒト肝発生においてもSALL4が重要な役割を果たす可能性を示唆している。肝癌組織においてもSALL4発現は肝細胞癌に加えて胆管細胞癌、混合型肝癌、Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma

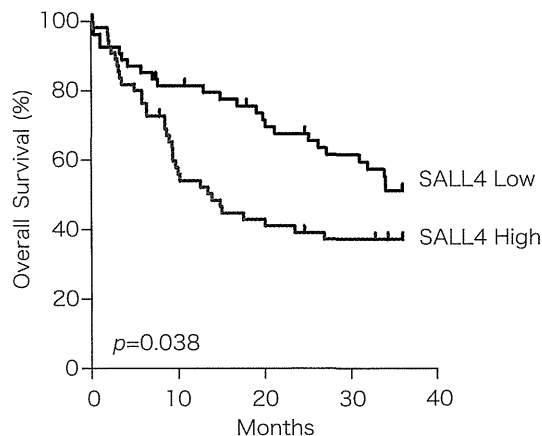


図2 肝細胞癌症例におけるSALL4高発現症例とSALL4低発現症例との生存曲線の比較 (文献21より改変引用)

でも認められた(図1D-F)。さらに、肝細胞癌110例のmicroarrayによる網羅的発現データの分析から、SALL4高発現症例がSALL4低発現症例と比較し有意に予後不良であることを明らかにした²¹⁾(図2)。以上の結果から、SALL4が肝癌の発癌やその進展に関与する可能性が想定された。

次に、肝癌細胞株を用いたSALL4の機能解析を行った。HuH7およびPLC/PRF/5細胞において、SALL4遺伝子の過剰発現およびshRNAを用いたノックダウンによる機能解析を行い、*in vitro*での細胞増殖をSALL4がCyclin D1, D2を介して正に制御することを示した(図3A)。またSALL4の過剰発現はTACSTD1 (EpCAM), CK19, ABCG2, POU5F1 (OCT3/4), CD90などのstemness(幹細胞性)関連遺伝子の発現を増強し癌幹細胞様への変化を誘導する一方で、SALL4の発現抑制によりstemness関連遺伝子の低下やAlbumin (ALB), Transthyretin (TTR), UDP-glucuronosyltransferase-2B7 (UGT2B7)などの成熟肝細胞分化マーカーの発現を増強させ肝成熟分化を促す方向(非癌幹細胞様)

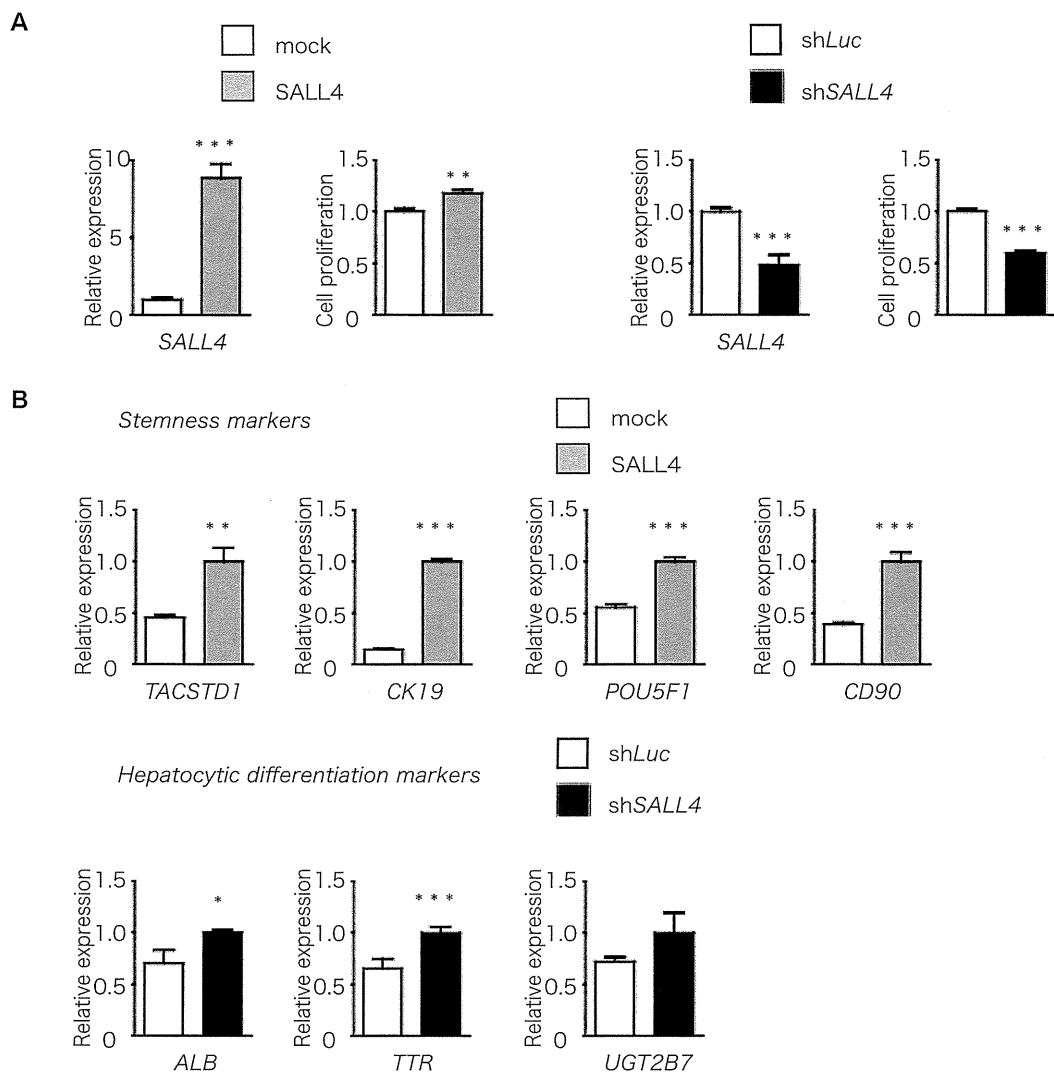


図3 肝癌細胞株におけるSALL4強制発現またはノックダウンによる*in vitro*増殖, 分化度への影響
 A: PLC/PRF/5細胞におけるSALL4強制発現またはノックダウンにおける増殖への影響
 B: PLC/PRF/5細胞におけるSALL4強制発現またはノックダウンにおけるstemness関連遺伝子または肝成熟分化マーカー遺伝子の発現
 (文献21より改変引用)

へと誘導することを示した(図3B)。さらに免疫不全マウスへの移植において, SALL4発現抑制によって, *in vivo*腫瘍造成が有意に低下する一方で(図4), SALL4の過剰発現により肝癌細胞株の化学療法抵抗性が上昇することを明らかとした。以上の結果はSALL4が正常肝組織における肝幹・前駆細胞の分化制

御のみならず, 肝癌においても増殖やいわゆる癌幹細胞と非癌幹細胞との分化制御を担うドライバーとして機能しており, SALL4高発現症例が癌幹細胞の性質をより有することで予後不良となることを示唆している。またSALL4が肝細胞癌の新規予後予測マーカーとしての使用のみならず, その機能の阻害によ

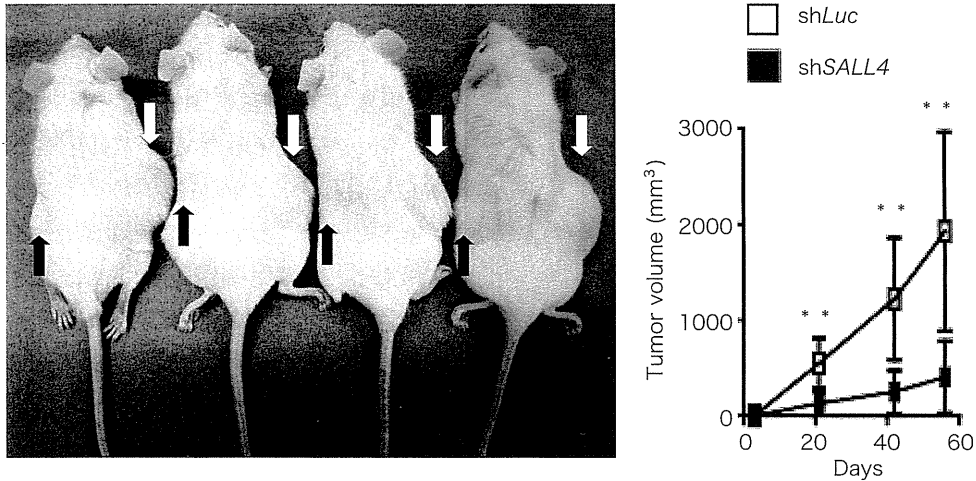


図4 SALL4ノックダウン肝癌細胞株における *in vivo* 腫瘍造成能への影響 (8週後)
 コントロール(白矢印)およびSALL4ノックダウン(黒矢印)したPLC/PRF/5細胞をNOD/SCIDマウス皮下に移植すると, SALL4ノックダウンしたPLC/PRF/5細胞の腫瘍造成能の低下が認められる。(文献21より改変引用)

り非肝癌幹細胞へと分化を誘導することで肝癌幹細胞を標的とした新たな治療アプローチとなることが期待される(図5)²¹⁾。

筆者らの研究成果に続いて, 最近別グループからの肝細胞癌とSALL4の関連性についての研究が報告された^{22,23)}。YongらはシンガポールでのB型肝炎関連肝細胞癌171例および香港の肝細胞癌228症例の大規模コホート解析を行い, やはりSALL4高発現症例が予後不良であることを報告している²²⁾。さらにmicroarrayを用いた網羅的遺伝子発現解析から, SALL4高発現肝細胞癌と正常胎児肝の遺伝子発現プロファイルが非常に類似していること, またSALL4高発現症例では肝癌幹細胞で高発現しているマーカー遺伝子群の発現が有意に高いことを示した。SALL4がNuRDを含むヒストンアセチル化酵素(HDAC)複合体と結合して転写リプレッサーとして機能しターゲット遺伝子である癌抑制遺伝子PTENを抑制することから¹⁵⁾, SALL4とNuRD相互作用に対して特異的に阻害することで抑制的

に機能する12アミノ酸ペプチドが開発された。このペプチド投与によってSALL4陽性の肝癌細胞株の *in vitro* 増殖および *in vivo* 免疫不全マウスへの移植による腫瘍造成の抑制が可能で, 癌幹細胞の制御に重要なシグナル伝達系の一つとされるPTEN/PI3K/AKTシグナルを介してSALL4が肝癌の病態を制御することが報告された²²⁾。またZengらは肝癌細胞株の中で肝癌幹細胞様の性質を持つEpCAM⁺AFP⁺分画がEpCAM⁻AFP⁻分画と比較してSALL4を高発現することを報告した。SALL4の発現はスフィア形成能や浸潤能などの癌幹細胞が有する性質と深く相関しており, われわれと同様に肝癌細胞の幹細胞性の維持にSALL4が重要であるという結論を得ている。肝細胞癌症例を用いた解析ではSALL4高発現とB型肝炎ウイルス罹患, 血清AFP値, EpCAM, CK19発現とに正の相関性があり, また術後無再発生存期間の比較においてSALL4陽性症例がSALL4陰性症例に比べ有意に不良であることを示した。また

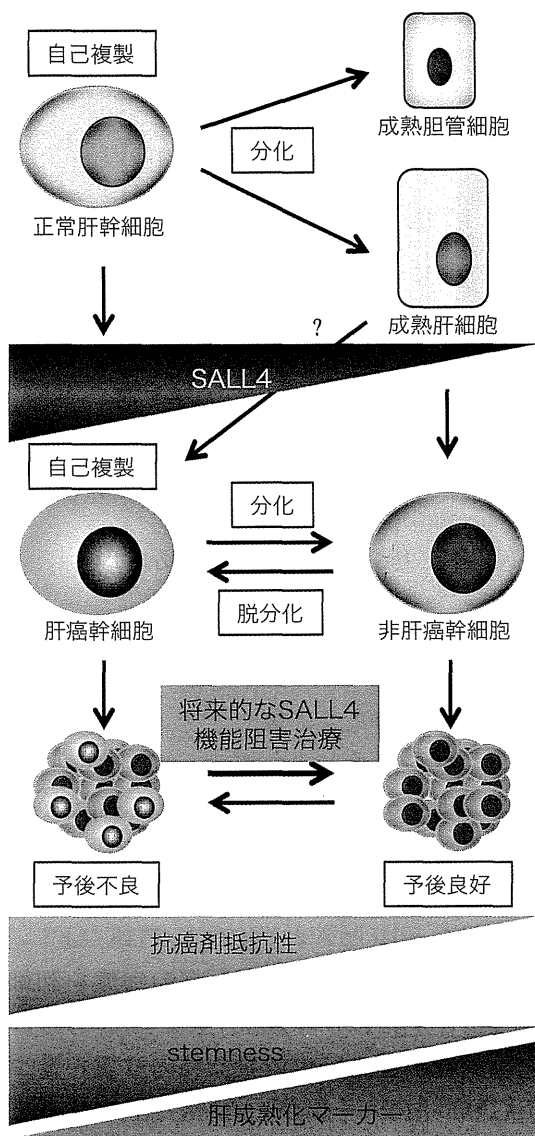


図5 正常肝と肝癌におけるSALL4の役割

SALL4が正常肝組織において肝幹・前駆細胞の分化制御のみならず、肝癌においても増殖や癌幹細胞と非癌幹細胞との分化制御に重要な役割を果たしている可能性がある。SALL4の機能阻害により非肝癌幹細胞へ分化を誘導することで将来的な肝癌幹細胞を標的とした新たな治療アプローチとなりうると考えられる。

SALL4発現とHDAC活性が正に相関し、HDAC阻害剤によってSALL4陽性の肝癌細胞株の増殖が抑制されることを示している²³⁾。

近年、癌におけるエピジェネティクス

異常が広く認識されるようになってきており、すでに一部の血液腫瘍などでDNAメチル化阻害剤やHDAC阻害剤が臨床応用されている。これら2つのグループの結果はSALL4が肝癌において癌幹細胞システムにおけるエピジェネティック制御にも重要な役割を果たしている可能性を示唆しており、将来的な治療応用も含めて大変興味深い。実際に肝細胞癌にHDAC阻害剤を用いたphase 2臨床研究が進行中であり、結果が待たれる(ClinicalTrials.gov NCT00943449)。

4 おわりに

正常幹細胞や癌幹細胞の制御機構が急速に解明されてきているが、SALL4の肝癌における制御機構の解析はまだ始まったばかりであり、今後の展開が期待される。特にSALL4発現を規定する上流因子はいまだに明らかとなっておらず、今後の解析が待たれる。また筆者らは正常の成体肝と同様に慢性肝炎ではSALL4は発現せず、肝癌や前癌状態である肝硬変では肝実質と間質の間に存在する肝細胞や細胆管の一部にSALL4が発現することを示したが²¹⁾、肝癌に高発現したSALL4は正常な肝幹細胞の形質転換によって生じた肝癌幹細胞に由来するか、あるいは成熟肝細胞がリプログラミングによって脱分化した細胞に由来するかは不明である。最近、CagA産生*H. Pylori*感染による前癌病変とされる胃壁細胞の腸上皮化生にSALL4が関与していることが明らかとなった。*H. Pylori*感染により胃壁細胞に腸上皮に特異的に発現するCDX1が異所性に発現することでリプログラミング因子であるSALL4とKLF5の活性化が起こり、胃壁細胞を一度未分化な幹細胞様状態に脱分化した後に腸上皮細胞へ分化させることが報告され、異常なりプログラミングが胃癌

発症に關与する可能性が示唆されている²⁴⁾。肝癌においても異常なリプログラミングを介した発癌機構が存在する可能性があり、肝癌の起源細胞を知るうえでも非常に興味深い。また近年、各症例に応じたテーラーメイド治療が注目されているが、SALL4はその発現によって肝細胞癌の予後予測を可能にし、将来的に予後不良であるSALL4陽性肝癌症例にはHDAC阻害剤やSALL4ペプチドなどと既存の治療法との組み合わせなどの積極的治療を行い、比較的予後が良好であるSALL4陰性症例にはスタンダード治療を行うといった治療選択のツールになりうると考えられる。また、SALL4をターゲットとすることで肝癌幹細胞の機能を制御・低下させる新規治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Jordan CT, Guzman ML, Noble M : Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355 : 1253–1261, 2006
- 2) Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ : Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3 : 895–902, 2003
- 3) Ma S, Chan KW, Hu L et al : Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132 : 2542–2556, 2007
- 4) Yang ZF, Ho DW, Ng MN et al : Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 13 : 153–166, 2008
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Lee TK, Castilho A, Cheung VC et al : CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell* 9 : 50–63, 2011
- 8) Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H et al : Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 24 : 506–513, 2006
- 9) Chiba T, Kita K, Zheng YW et al : Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 44 : 240–251, 2006
- 10) Lee JS, Heo J, Libbrecht L et al : A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* 12 : 410–416, 2006
- 11) Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L et al : Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet* 11 : 2979–2987, 2002
- 12) Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A et al : The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development* 133 : 3005–3013, 2006
- 13) Zhang J, Tam WL, Tong GQ et al : Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol* 8 : 1114–1123, 2006
- 14) Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K et al : Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells* 14 : 683–694, 2009
- 15) Gao C, Kong NR, Chai L : The role of stem cell factor SALL4 in leukemogenesis. *Crit Rev Oncog* 16 : 117–127, 2011
- 16) Bard JD, Gelebart P, Amin HM et al : Signal transducer and activator of transcription 3 is a transcriptional factor regulating the gene expression of SALL4. *Faseb J* 23 : 1405–1414, 2009
- 17) Cao D, Humphrey PA, Allan RW : SALL4 is a novel sensitive and specific marker for metastatic germ cell tumors, with particular utility in detection of metastatic yolk sac tumors. *Cancer* 115 : 2640–2651, 2009
- 18) Ushiku T, Shinozaki A, Shibahara J et al : SALL4 represents fetal gut differentiation of gastric cancer, and is diagnostically useful in distinguishing hepatoid gastric carcinoma from hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 34 : 533–540, 2010
- 19) Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M et al : Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. *Oncol Rep* 26 : 965–970, 2011

- 20) Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S et al : Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 136 : 1000–1011, 2009
- 21) Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, et al : Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers. *Hepatology* 57 : 1469–1483, 2013
- 22) Yong KJ, Gao C, Lim JS et al : Oncofetal gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 368 : 2266–2276, 2013
- 23) Zeng SS, Yamashita T, Kondo M et al : The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 60 : 127–134, 2014
- 24) Fujii Y, Yoshihashi K, Suzuki H et al : CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 : 20584–20589, 2012

* * *

