

図1 胎児および成体肝臓における幹・前駆細胞

肝臓は発生初期に腸管の一部が肝芽へと分化することで生じる。この肝芽に含まれる肝幹・前駆細胞(肝芽細胞)は活発な増殖力を持つとともに、成熟肝細胞および胆管細胞への分化能を保持する。一方、成体肝臓にも肝幹・前駆細胞が存在し、重篤な肝障害の際などに機能すると考えられる。

成熟肝細胞と胆管細胞への分化能を持つ幹・前駆細胞であることを示した。成体肝臓ではCD133は胆管系細胞に発現することから、胎仔期における肝芽細胞の一部が胆管系細胞へと分化する過程で、その一部(canals of Hering構造周辺と考えられる)に多分化能と高増殖性を持つ成体肝幹・前駆細胞が含まれるという形に、発生過程における肝臓の幹細胞システムが変化すると考えられた(図2)。実際に、胆管などのマーカーであるSox9陽性細胞から分化する細胞系譜をlineage tracingの手法を用いて解析した研究では、正常肝臓においても成熟肝細胞の新陳代謝にSox9陽性の胆管様細胞が関与していることが報告されている¹¹⁾。

多能性幹細胞と肝細胞系への分化誘導

多能性幹細胞は、ほぼ無限といえる高い増殖・自己複製能力とさまざまな臓器の機能細胞へと分化可能な多能性を持つ細胞であり、その特性から再生医療に最適なソースとして考えられている(図3)。多能性幹細胞には、受精卵(胚盤胞)

の一部の細胞を培養して作製するembryonic stem細胞(ES細胞)と体細胞(皮膚・血液細胞など)に山中因子(Oct3/4, Sox2, Klf4など)を遺伝子導入して作成するinduced pluripotent stem細胞(iPS細胞)がある。ヒトES細胞は1998年にジェームズ・トムソン博士らによって樹立されたが、生命の萌芽である受精卵を破壊するという倫理的問題や、受精卵の遺伝的バックグラウンドや免疫学的性質を引き継ぐためにES細胞から作製した機能細胞や組織を他人に移植しても免疫的に拒絶されるという問題点があった¹²⁾。この問題を解決したのが、2007年に山中教授によって作製されたヒトiPS細胞である¹³⁾。ヒト個体から容易に採取できる皮膚や血液細胞に複数の遺伝子を導入し培養することで、ほぼES細胞と同等の増殖能・多分化能を持つiPS細胞が得られることがわかった。受精卵を破壊して作製する必要がないために倫理的問題を解決するとともに、患者本人からiPS細胞を樹立し目的の細胞へと分化・移植を行うことで、ほぼ免疫的に拒絶を受けない移植が可能になると期待されている。初期のiPS細胞

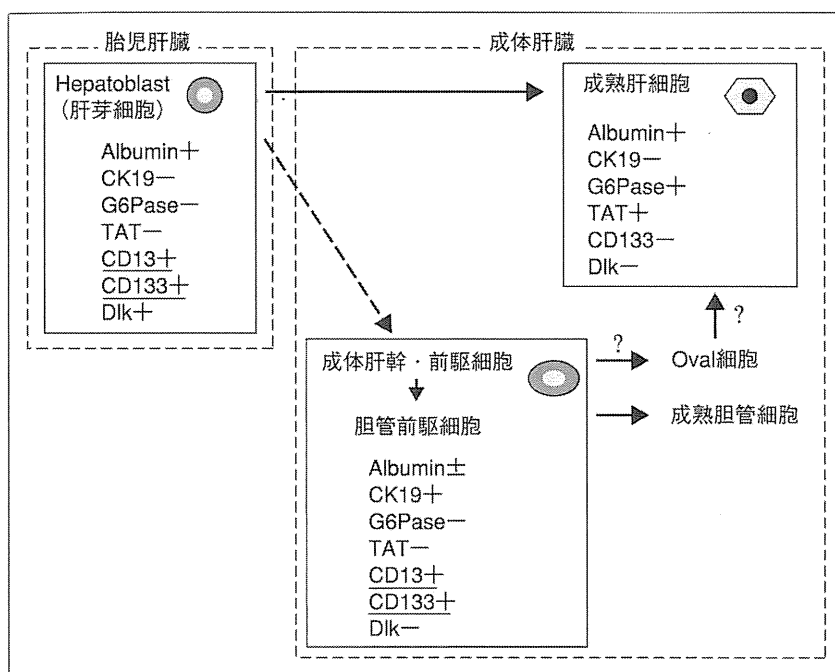


図2 肝発生過程における肝幹・前駆細胞の変化

胎児期の肝幹・前駆細胞はCD13, CD133の他Dlk1などを細胞表面マーカーとして発現している。またalbuminの発現量が高い一方でcytokeratin19(CK19)などの発現は非常に弱い。一方、成体肝臓における幹・前駆細胞はCD13, CD133など胎児期と共通する細胞表面マーカーを発現する一方で、Dlk1などは発現しない。また、albuminの発現量が非常に低い一方でCK19の発現上昇がみられ、より胆管細胞に近い細胞であると考えられる。

の作製にはレトロウイルスを用いるために、山中因子が染色体に導入され将来の癌化などの危険を伴うことが指摘されていたが、近年エプソマルベクターなど染色体を変異させないiPS細胞誘導法が確立され、日本においても網膜色素上皮変性症への移植治療など実際にヒトiPS細胞を用いた再生医療の開始が計画されている¹⁴⁾。

ヒトES, iPS細胞を再生医療や創薬へと応用するには、目的の細胞系譜への効率的な分化誘導系が不可欠である。肝臓系細胞への分化誘導系は、生体の肝発生を模倣する形で行われる。初期肝臓原基は、内胚葉系細胞共通の前駆細胞であるendodermal progenitor cellより発生する。多能性幹細胞からendodermal progenitor cellの分化誘導に必要なのがTGFβファミリーに属するActivin Aである。Activin Aは多能性幹細胞に高濃度で作用するとendodermal progenitor cellへの分化誘導を促進する濃度依存性が知られている。また、ケモカイン受容体のCXCR4が特異的

マーカーとして報告されており、分化誘導系内のE-cadherin⁺CXCR4⁺細胞がendodermal progenitor cellとして純化できる¹⁵⁾。発生過程では、腸管のendodermal progenitor cellが心臓細胞からのfibroblast growth factor (FGF)や横隔膜細胞からのbone morphogenetic protein 4 (BMP4)の作用により初期肝細胞へとspecificationを受ける¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、胎生期の肝細胞の増殖には肝細胞増殖因子(HGF)が必須である¹⁸⁾。そこで、Activin Aに続いてFGF, BMP4, HGFと連続的にこれらのサイトカインを添加することで、ヒト多能性幹細胞からの効率的な肝細胞誘導系が構築され、ヒトiPS細胞からSox9, CXCR4陽性のendodermal progenitor cell, FoxA2陽性の初期肝芽細胞, HNF4α, αフェトプロテイン陽性の幼弱肝細胞と発生段階と同様に段階的に分化することが報告された¹⁹⁾。

このように胎仔肝発生の分子メカニズムを理解することは、多能性幹細胞からの効率的な肝

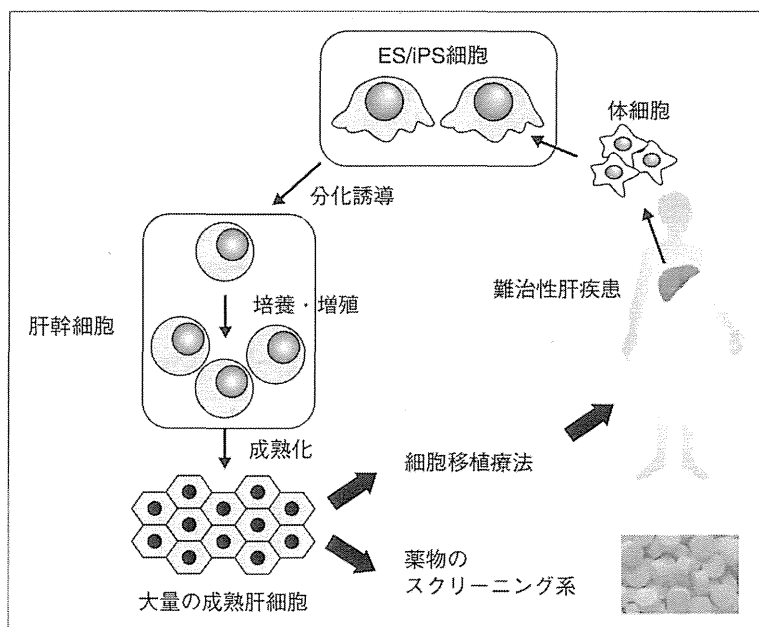


図3 多能性幹細胞を用いた肝疾患治療・創薬への応用

iPS細胞誘導技術の進化により、血液などの侵襲性の低い細胞を用いて多能性幹細胞の樹立が可能になった。そこで、健康人または肝疾患患者からiPS細胞を樹立し、肝幹・前駆細胞を分化誘導する。試験管内で必要な細胞数にまで増殖させた後に成熟肝細胞へ分化誘導することで、創薬や肝細胞移植療法に使用可能な大量の成熟肝細胞を得ることができる。

分化誘導系の確立には必須である。われわれは、胎生期肝細胞の培養系を構築し、さまざまなサイトカイン・液性因子を添加することで、肝細胞の成熟過程に重要な因子の探索を行った。胎生期の肝臓は造血幹細胞が活発に増殖する造血器官として機能することが知られている。われわれは胎生肝臓に多数存在する血液細胞から供給されるオンコスタチンM(OSM)が、胎生肝細胞からの成熟肝細胞への分化を誘導することを見出した²⁰⁾。OSMは多能性幹細胞から誘導した幼弱肝細胞を成熟化させる際にも用いられている。しかし、多能性幹細胞由来成熟肝細胞は、薬物代謝酵素などの肝臓の代謝に必須な遺伝子群の発現が生体内の肝細胞と比較して非常に低いことが知られており、発生過程での肝成熟化過程に重要な分子群が同定されることで、多能性肝細胞からのより高機能な肝細胞の誘導が可能になると予想される。

多能性幹細胞からの 肝幹・前駆細胞様細胞の誘導系

難治性肝疾患に対する肝細胞移植療法や創薬における肝毒性評価など成熟ヒト肝細胞の需要が高まっている。現在、脳死ドナー肝臓から分離された肝細胞が用いられるが、遺伝的な均一性などからヒト多能性幹細胞(ES, iPS細胞)から誘導された成熟肝細胞がそのソースとして期待されている。しかし、成熟肝細胞を機能を維持したまま試験管内で増幅することは困難で、大量のヒト肝細胞を得る手段の開発が必要とされる。そこでわれわれは、多分化能と高増殖能を持つ肝前駆細胞をヒト多能性幹細胞から誘導し、試験管内での長期培養により多数の細胞を得た後に、成熟肝細胞等へ分化誘導できる系の構築を目的として研究を行っている。ヒトiPS細胞を既報に従ってサイトカインの連続添加(Activin A 4日間, FGF+BMP4 3~4日間, HGF 3~4日間)によって刺激することで、AFP⁺HNF4 α ⁺の幼

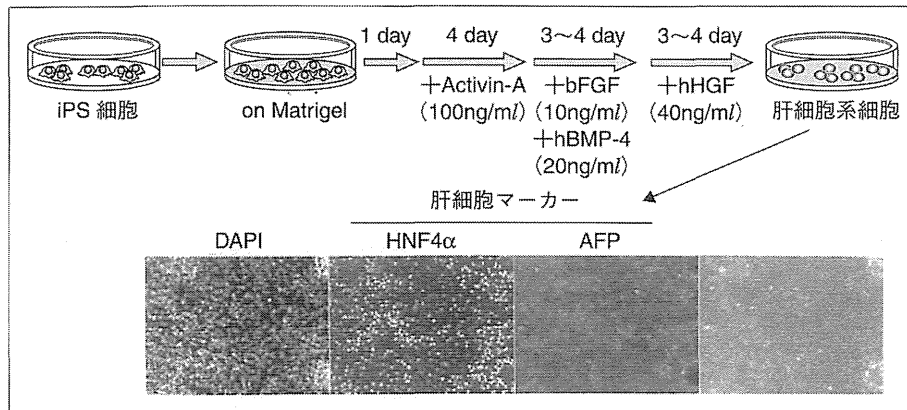


図4 多能性幹細胞からの肝臓系細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞は、Activin A, basic fibroblast growth factor (bFGF), bone morphogenetic protein (BMP) 4, hepatocyte growth factor (HGF)の連続的添加により、HNF4 α および α フェトпротеイン(AFP)陽性の幼弱肝細胞へと分化する。

弱肝細胞へと分化誘導できる(図4)。得られた細胞画分内に高増殖性の肝前駆細胞様の細胞が存在するか、低密度培養によるコロニーアッセイによって検討した。しかし、分化誘導したiPS細胞由来肝臓系細胞を酵素的に分散し単独でculture dish上で培養した結果、高い増殖性を示すものはみられなかった。われわれは培養系に問題がある可能性を考慮し、まずマウス胎児肝臓由来細胞をモデルとして肝幹・前駆細胞の新規培養系を構築した。初期肝臓原基では、腸管から分化した初期肝幹・前駆細胞が横隔膜に侵入しつつ増殖することで肝発生過程が進行する。肝幹細胞マーカーCD13, CD133, Dlk等を用いて肝発生初期の肝幹・前駆細胞を純化しその性質を詳細に解析した結果、高い細胞増殖のためには間葉系細胞との相互作用が必要なことを見出した²¹⁾。ヒトiPS細胞からの肝分化誘導系においても、肝前駆細胞の増殖に間葉系細胞との相互作用が必要な可能性を考え、mouse embryonic fibroblast (MEF)との共培養系を構築した(図5)。ヒトiPS細胞をサイトカイン刺激によって誘導した後に、肝幹・前駆細胞マーカーであるCD13およびCD133の発現を解析した。その結果、サイトカイン刺激に伴ってCD13, CD133両陽性細胞が出現することを見出した。この細胞画分をFACSを用いて純化し、MEFをフィーダー細胞として低密度で培養した結果、1細胞から増殖し100細胞

以上からなる大型のコロニーを形成できる高増殖性の細胞が多数含まれることを見出した。このコロニーは、AFP⁺HNF4 α ⁺の肝臓系細胞であり、他の画分(CD13およびCD133の発現が低い細胞集団)では高いコロニー形成能はみられなかった。以上の結果から、CD13およびCD133を用いることで、ヒトiPS細胞分化系から肝前駆細胞様細胞(hepatic progenitor-like cell; HPC)を純化できることを見出した。次にわれわれは、ヒトiPS細胞由来HPCの試験管内での長期増殖能について検討した。ヒトiPS細胞を肝細胞系へと分化誘導した後に、CD13⁺CD133⁺細胞を純化・培養しコロニーを形成させた(1st culture)。得られたコロニーを酵素的に分散し、新規フィーダー細胞上に低密度で播種した(2nd culture)。同様に得られたコロニーを継代培養し、各段階での細胞数を計測した結果、サイトカイン・シグナル伝達阻害剤などの添加により1か月以上にわたり増殖可能なことを見出した。数継代後のコロニーを肝細胞マーカーなどで染色したところ、HNF4 α やAFPといった肝細胞マーカーの発現が維持されている一方で、一部の細胞で胆管細胞マーカー(CK7)の発現が上昇することを見出した。以上の結果から、われわれの分離したヒトiPS細胞由来HPCが、その一部は胆管などの細胞系列へと分化するものの、コロニー形成能を維持したまま長期増殖が可能なことを見出した。

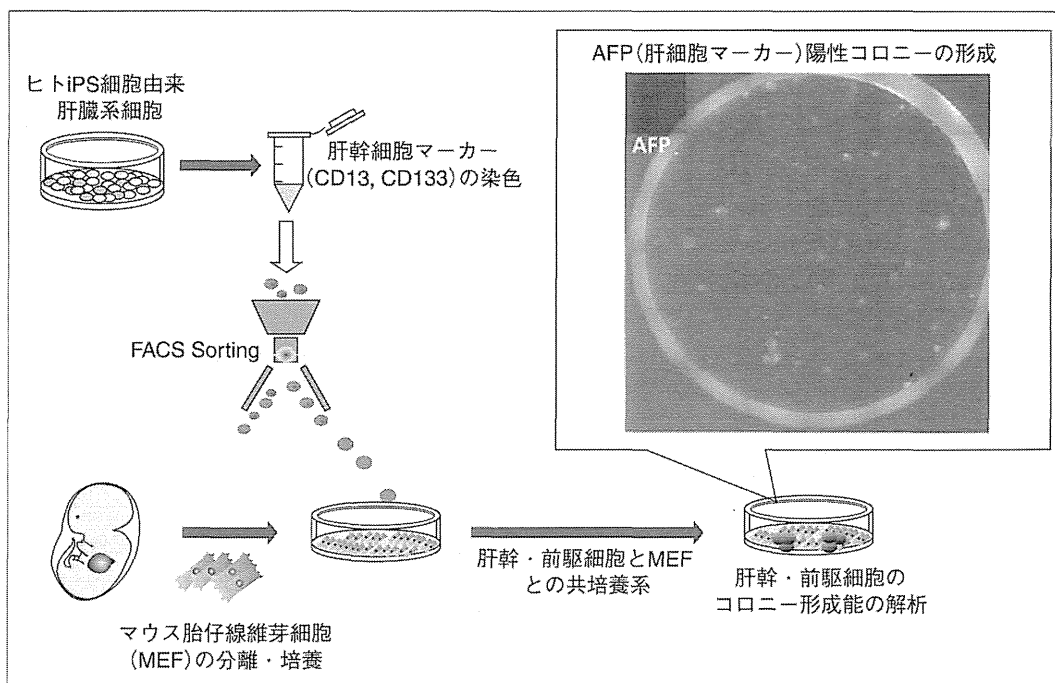


図5 正常成体肝臓由来の肝幹・前駆細胞様細胞の性状解析

iPS細胞から分化誘導した肝臓系細胞中のCD13⁺CD133⁺画分をフローサイトメーターを用いて純化し、マウス胎児線維芽細胞(MEF)上で培養した。低密度で細胞を播種した際に、1細胞に由来するAFP陽性の大型コロニーが多数形成され、この画分に高増殖性と肝細胞系への分化能を持つ肝前駆細胞様細胞が多数含まれることを見出した。

肝・前駆細胞の特徴の一つは、さまざまな機能細胞への多分化能である。発生過程の肝臓では、肝芽細胞が増殖しつつ成熟肝細胞・胆管細胞へと分化していく。そこで、ヒトiPS細胞由来HPCの2方向分化能について検討した。肝臓は、外来薬物などの代謝の重要器官であり、成熟肝細胞はさまざまな薬物代謝酵素(cytochrome P450)を発現している。肝前駆細胞は、3次元培養による細胞間接着の促進により、より成熟した細胞へと分化することが知られている²²⁾。ヒトiPS細胞由来HPCをハンギングドロップ法により細胞凝集塊を作製することで細胞分化を誘導した結果、成熟肝細胞マーカーであるcytochrome P450遺伝子の発現が誘導されることがわかった。また、マウス肝前駆細胞を基底膜様の細胞外マトリクス(ラミニンなど)を含むゲル培地で培養することで、胆管様の上皮管腔構造が誘導されることが報告されている²³⁾。そこで、ヒトiPS細胞由来HPCでも同様に胆管様に分化可能か検討を行った。その結果、マトリゲル等を含むゲル培

地で培養しさまざまなサイトカインで刺激することで、極性を持つ上皮管腔構造が誘導されることがわかった。この一部は胆管細胞マーカーであるCK7を発現しており、ヒトiPS細胞由来HPCが胆管系への分化能を持つことが示された。以上の結果から、われわれが樹立したヒトiPS細胞由来HPCが試験管内での長期増殖能とともに、成熟肝・胆管細胞への分化能を持ち、高増殖性と多分化能という前駆細胞としての性質を保持した細胞であることが示された。

多能性幹細胞由来 肝幹・前駆細胞様細胞の応用・可能性

肝細胞の発現する薬物代謝酵素の発現量・活性は、個々人での個体差があることが知られている。さまざまな薬物代謝酵素の発現プロファイルの違いは、投与薬物の代謝量の差、さらには肝毒性や副作用の個人差の原因となる。新規創薬の過程や治療段階において、投与薬物による個人差を*in vitro*で簡便に判断できる系の構築

は非常に有用と考えられる。iPS細胞技術により、個人の遺伝子情報を反映した多能性幹細胞が血液などの容易に採取可能なサンプルから樹立可能になった。そこで、薬物代謝酵素の発現に関係するさまざまな遺伝的背景を持つ個人から多能性幹細胞を樹立した上で、肝幹・前駆細胞さらに成熟肝細胞への分化誘導を行うことで、薬物代謝の個人差を反映する肝細胞ライブラリーの作製が可能となる。われわれが今回樹立したヒトiPS細胞由来の肝前駆細胞様細胞は、高増殖性や分化能を持つ一方で凍結保存が可能という利点がある。今後、より効率的な成熟肝細胞への分化誘導系を構築していくことで、創薬などへの応用を可能にすることを計画している。

ヒトにおける肝分化の分子メカニズム・発生過程は、胎児等を実験に使用する倫理的課題などの問題からこれまで解析が困難であった。ヒトiPS細胞は倫理的課題を克服しつつ、生体の発生過程と類似した分化能を持つことが知られている。われわれが分離したヒトiPS細胞由来HPCも、マウスでの発生過程での解析結果と同様の細胞表面抗原マーカーを持つことがわかっている。したがって、ヒトiPS細胞からの分化誘導系が医療・創薬などの応用だけでなく、ヒトの発生過程を細胞レベルで再現し、そのメカニズムを解析するツールとして使用できる可能性が考えられる。ヒト多能性幹細胞はマウスと異なり相同組換えの効率が低頻度であり、遺伝子の改変等が困難という欠点があった。近年、zinc finger nucleaseやTAL effector nucleaseといった人工ヌクレアーゼを使用することで、ゲノムの任意の場所を改変・編集できる技術の開発が急速に進んでいる²⁴⁾²⁵⁾。今後、このような技術を組み合わせることで、今まで困難であったヒト細胞を用いた発生学の進展がみられると期待される。

文 献

- 1) Douarin NM. An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 1975 ; 53 : 427.
- 2) Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ* 1980 ; 9 : 269.
- 3) Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H. Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Front Biosci* 2006 ; 11 : 1302.
- 4) Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002 ; 156 : 173.
- 5) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, et al. SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* 2002 ; 250 : 332.
- 6) Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, et al. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 2003 ; 116 : 1775.
- 7) Kakinuma S, Ohta H, Kamiya A, et al. Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. *J Hepatol* 2009 ; 51 : 127.
- 8) Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1973.
- 9) Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 2009 ; 136 : 1951.
- 10) Kamiya A, Kakinuma S, Yamazaki Y, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1114.
- 11) Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 34.
- 12) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145.
- 13) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861.
- 14) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011 ; 8 : 409.
- 15) Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, et al. Induction and monitoring of definitive and visceral

- endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23 : 1542.
- 16) Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999 ; 284 : 1998.
- 17) Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 2001 ; 15 : 1998.
- 18) Schmidt C, Blatt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995 ; 373 : 699.
- 19) Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010 ; 51 : 297.
- 20) 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* 1999 ; 18 : 2127.
- 21) Okada K, Kamiya A, Ito K, et al. Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells Dev* 2012 ; 21 : 1124.
- 22) Koide N, Shinji T, Tanabe T, et al. Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 161 : 385.
- 23) Tanimizu N, Miyajima A, Mostoy KE. Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture. *Mol Biol Cell* 2007 ; 18 : 1472.
- 24) Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2009 ; 27 : 851.
- 25) Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. *Cell Stem Cell* 2012 Dec 12 [Epub ahead of print].

* * *

【肝細胞移植を用いた肝疾患の治療】

Establishment of hepatocyte transplantation for liver diseases

近田 裕美・紙谷 聡英

Hiromi Chikada

Akihide Kamiya

Key words

hepatocytes, tissue engineering,
hepatic stem/progenitor cells,
fluorescence activated cell sorting

要 約

肝細胞移植療法の開発として、①肝外部位に成熟肝細胞を移植することにより小肝組織を作製する組織工学と②肝幹・前駆細胞を体外で増殖させ移植する研究を紹介する。成熟肝細胞を用いた組織工学的アプローチとして、肝外部位への成熟肝細胞移植による小肝組織の作製の報告例がある。この異所性小肝組織は本来の肝臓と類似の機能を有しており、動物実験レベルでは臨床的な有効性が示されている。一方で、成熟肝細胞は生体外での増殖が困難であり、治療に必要な大量の細胞の確保に問題がある。そこで、生体外で高い増殖能力を有する肝幹・前駆細胞を純化・増殖させる細胞生物学的アプローチが進められている。筆者らは表面抗原マーカーの探索から、胎仔または成体肝臓からの肝幹・前駆細胞の純化・培養系を構築し、さらに胎仔由来肝前駆細胞の細胞移植療法における有用性を示している。今後、臓器移植とともにこのような細胞移植による肝疾患治療が期待される。

はじめに

肝臓は、血清蛋白質の合成・アミノ酸、糖代謝・アルコール、薬物の分解など多種の代謝機能を持つ、生体のホメオスタシス維持のための重要臓器である。また肝臓は固形臓器としては稀な高い再生能力を持ち、臓器全体の70%を切除しても約1週間で元の大きさを回復する。しかし、肝炎ウイルスの感染やアルコールの過剰摂取などで肝細胞の破壊と再生を繰り返す慢

性肝炎の状態が進行することで、肝線維症・肝硬変を経て肝ガンへと移行する重篤な肝疾患につながり、最終的には死に至ることも少なくない。このような肝疾患の根本的治療法として肝臓移植が挙げられるが、健常人ドナーに対する侵襲性（生体肝移植）や脳死判定等の問題（脳死肝移植）が存在する。このため、肝臓移植に替わる治療法として、細胞移植療法が期待されている。肝細胞を用いた次世代の再生医療として、①肝外部位に成熟肝細胞を移植することにより小肝組織を作製する肝組織工学や、②肝幹・前駆細胞を体外で増幅させ移植する研究などが現在行われている。（図1）

1. 成熟肝細胞を用いた組織工学的アプローチ

肝臓の多様な代謝機能を人工的に再現することは非常に困難である。そこで生細胞を用いた組織工学的アプローチとして、異所性部位に肝細胞を移植し小肝組織を形成させることで、低下した肝臓の代謝機能を補完し病態を改善する試みがなされている。異所性部位として腎被膜下と皮下における研究報告について以下に概説する。

腎被膜下は豊富な血流に隣接し、腹膜からの栄養供給を受けることから、代謝活性の活発な肝細胞の生着に有利である。そこでEHSマトリックスとともに分離肝細胞を腎被膜下に注入したところ、移植した肝細胞が腎皮膜下でドナー由来の血管等を取り込み疑似的な小葉構造を再構成し、マウスの生涯を通して維持される小肝組織が形成できることが報告された¹⁾。一方

東海大学 創造科学技術研究機構・医学部門 肝細胞治療分野

Laboratory of Stem Cell Therapy, Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University

〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143 TEL: 0463-93-1121

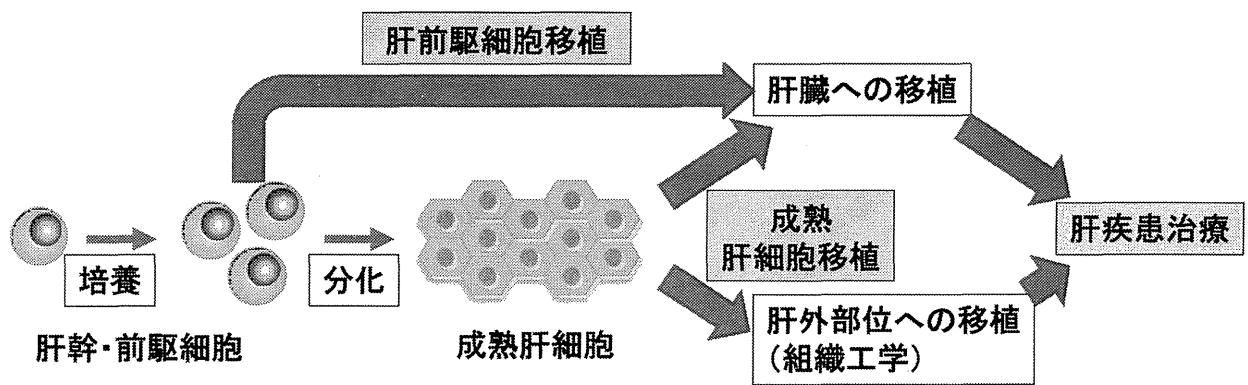


図1 次世代再生医療を目指した肝細胞移植療法

肝細胞移植療法として成熟肝細胞を用いた組織工学的アプローチと肝前駆細胞を用いた細胞生物学的アプローチなどが現在行われている。

で皮下組織は治療の侵襲度が最も小さく肝組織工学の標的部位として利点を持つものの、血流の乏しさから肝細胞の生着やその後の代謝機能の発揮に適さない。そこで、皮下の組織作成予定部位に予め bFGF の除放システムを組み込み血管を誘導した後に、EHS マトリックスとともに肝細胞を移植するという二段階法によって皮下における小肝組織の作製系が樹立された²⁾。このような異所性小肝組織はアルブミンの発現や薬物代謝酵素群の誘導が認められ、肝臓の代謝機能を有する²⁾。また、このような小肝組織を血友病モデルマウス腎被膜下に作製することで血液凝固因子の産生を促し、治療が可能なが分かった³⁾。

以上の結果では、自己肝臓と同等で長期機能維持可能な異所性肝臓の作製に成功したものの、本来の肝臓の三次元的な構造を誘導することは困難である。そこで、肝細胞相互の機能接着と肝細胞 - 血管内皮細胞の接着を制御することにより三次元構造が誘導できることを利用し、シート工学を応用した肝組織作製手法が開発されている。ポリ N- イソプロピルアクリルアミドをナノメートルレベルで均一にコーティングした培養皿は 32℃ 以上では疎水性で接着培養可能であるが、32℃ 以下では親水性に変化し、細胞をシート状に回収できる。これにより取得した肝細胞シートは、機能的細胞間結合が維持されており、かつ細胞外マトリックスによる細胞外微小環境を有した二次元構造を有する。そこで 6FGF により誘導した皮下の血管組織上にこのような肝細胞シートを層状に複数移植することで、肝細胞相互の機能接着と肝細胞 - 血管内皮細胞の接着を有する三次元的構造を形成し、より高い肝機能

を発揮できることが報告されている³⁾。

以上のように、成熟肝細胞の異所性移植による小肝組織の作成系が研究されている。この異所性小肝組織は本来の肝臓と類似した代謝機能を有し、また動物実験レベルでの臨床的な有効性も示されており、今後の研究によるヒトへの応用が期待されている。

2. 肝幹・前駆細胞を用いた細胞生物学的アプローチ

成熟肝細胞の障害肝臓への移植、また先に示した異所性肝臓形成による肝機能向上による肝疾患治療の有用性が検証される一方で、分離した成熟肝細胞は生体外では増殖が困難であり必要とされる大量の成熟肝細胞のソースが問題となっている。そこで、生体外でも高い増殖能力を有する肝幹・前駆細胞に着目し、この肝幹・前駆細胞を純化・増殖させる細胞生物学的アプローチも進められている。ここでは肝幹・前駆細胞の純化・増幅系を確立するための基礎研究、および肝幹・前駆細胞を用いた細胞移植療法への応用について概説する。

生体内では、胎児期および成体肝臓における肝幹・前駆細胞の存在やその性状が報告されている。肝芽細胞は、胎児期の肝臓に存在する高い増殖性と肝細胞・胆管上皮細胞への二方向の分化能を持つ肝前駆細胞である。肝芽細胞を標識する表面抗原マーカーとして、Delta-like 1 homolog (Dlk1) や Liv2 などが報告されている^{4,5)}。Dlk1 は、胎児期の肝前駆細胞を用いたシグナルシーケンストラップ法によって同定された表面

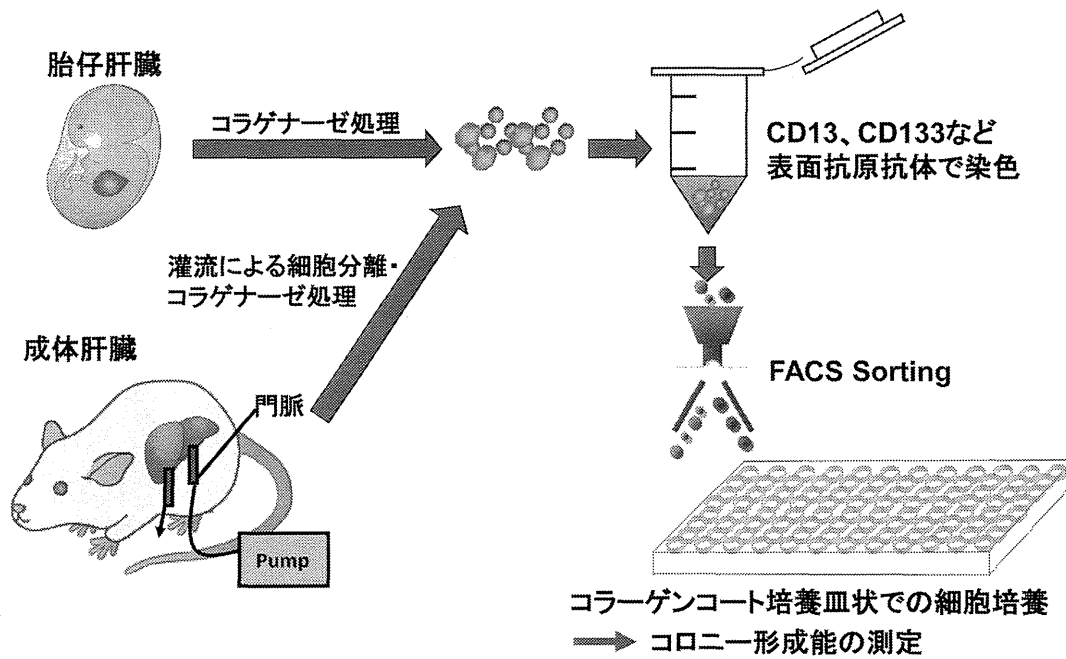


図2 FACSを用いた肝幹・前駆細胞の分離と培養

胎仔肝臓または成体肝臓より細胞を取得し、CD13、CD133などの表面抗原抗体で染色後FACSにより分離する。分離した細胞はコラーゲンコート培養皿状で培養し、コロニー形成能を測定する。

抗原タンパク質であり、幼弱な肝細胞に発現する一方で肝発生の進行に伴いその発現が低下・消失する⁴⁾。

また、筆者らは表面抗原抗体を用いた網羅的なスクリーニングによって、CD13等の新規の肝芽細胞マーカーを同定している⁶⁾。胎児肝由来CD13陽性細胞は、高増殖性とアルブミン陽性の肝細胞系およびサイトケラチン(CK)19陽性の二方向性の分化能をもつ。また、肝障害モデルマウスへCD13陽性細胞を移植することで、アルブミン陽性の成熟肝細胞としてレシピエント肝臓に生着することが分かった。以上の結果から、肝幹・前駆細胞のマーカーとしてCD13の有用性が示された。

このように胎生期における肝幹・前駆細胞の同定が進んでいる一方で、正常の成体肝臓での肝幹・前駆細胞については不明な点が多い。肝臓の一部を切除した際の肝再生などでは成熟肝細胞の肥大と一過性の増殖により再生を行い、肝幹・前駆細胞は関与していない⁷⁾。しかし、重篤な肝障害等で成熟肝細胞が増殖できない状態では、成体肝臓の門脈領域周囲にOval cellとよばれる細胞が出現し肝再生に重要な役割を果たしていることが分かった⁸⁾。Oval cellの起源は胆管か肝細胞か議論があるところであるが、Oval cellの誘導には、肝障害時に門脈周囲のThy1陽性細胞が産生するFGF7が必要であることが明らかにさ

れている⁹⁾。さらに正常成体肝臓においても胆管周囲のCanals of Hering領域にEpCAM陽性の肝幹・前駆細胞が存在することが報告された¹⁰⁾。筆者らは表面抗原マーカーの網羅的探索によって、正常成体肝臓由来の肝幹・前駆細胞の純化・培養系の構築を行った。その結果、マウス胎仔肝幹細胞の表面抗原マーカーであるCD13およびCD133の陽性細胞が正常成体肝臓の非実質細胞画分に存在することを見出した。CD13+CD133+細胞を純化しクローナルに培養した結果、アルブミンとCK19が共に陽性で高増殖性のコロニーが複数出現した。この細胞は継代による長期培養が可能である。さらに、オンコスタチンMと細胞外マトリックスの添加により成熟肝細胞の機能遺伝子の発現を誘導できる一方で、コラーゲン包埋培養によって胆管様構造が誘導されることから、肝細胞と胆管上皮細胞への二方向への分化能を有することが分かった。以上の結果から、正常肝臓のCD13+CD133+細胞画分に、成体における肝幹・前駆細胞が存在することが示唆された¹¹⁾。(図2)

次に筆者らは、肝幹・前駆細胞の細胞移植療法における有用性を検討した。アポリポプロテインEは家族性高脂血症の原因遺伝子であり、その欠損マウスはコレステロール代謝異常による血中コレステロール上昇や動脈硬化などの病態を示す。ApoEは肝細胞が主要

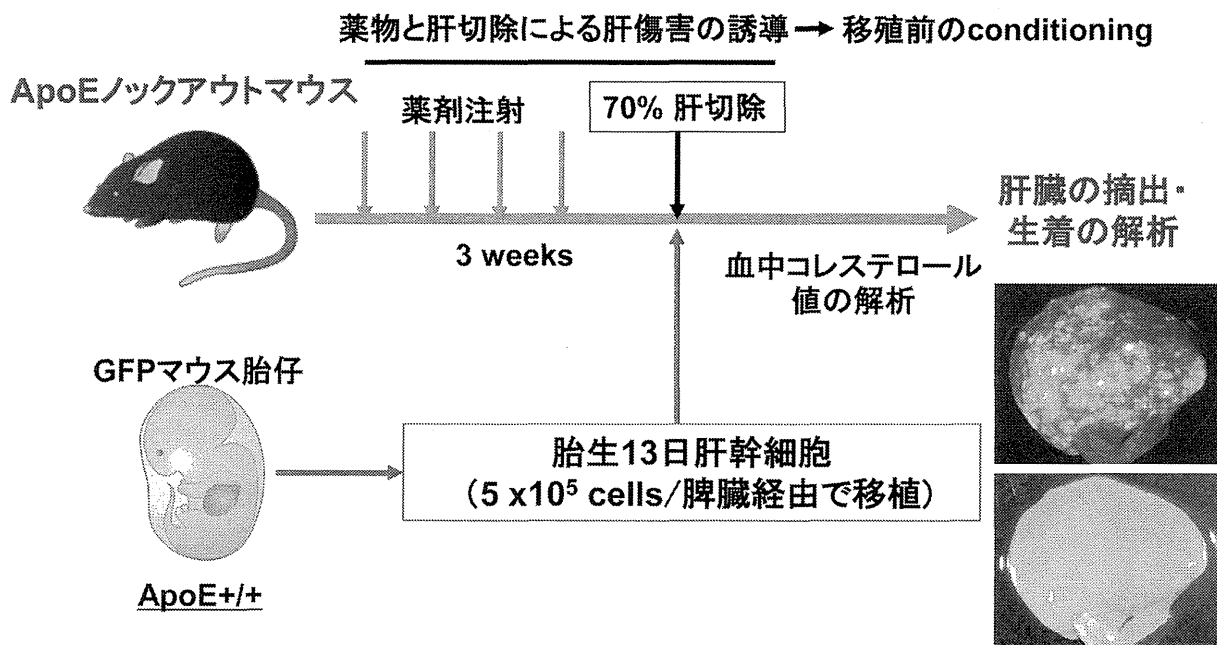


図3 肝幹細胞を使用した ApoE 欠損マウスの細胞移植療法

ApoE 欠損マウスは肝傷害を誘導した後、GFP トランスジェニックマウス由来肝前駆細胞を脾臓経路で移植した。移植後4か月経過しても GFP 陽性細胞の生着が認められた。

な産生細胞であることから、細胞移植による治療効果を期待し以下の実験を行った。胎生13日マウス(GFPトランスジェニックマウス由来)肝臓より肝前駆細胞を単離し、ApoE欠損マウス肝臓へ経脾臓的に移植した結果、移植後4か月以上でもドナー細胞の生着が認められた(図3)。このとき血中コレステロールも速やかに低下し、1年以上にわたり効果が持続した。これらのことから、移植した肝幹・前駆細胞は長期にわたり生着・機能し、疾患の治療が可能であることが示された。

おわりに

本稿では、肝臓移植を代替する肝疾患治療法として、①成熟肝細胞を用いた組織工学的アプローチ、②肝幹・前駆細胞を用いた細胞生物学的アプローチを解説した。いずれの治療法も動物実験での有効性が示されており、今後ヒトへの臨床応用が期待される。しかし、生体外に取り出した成熟肝細胞や肝幹・前駆細胞は、肝機能関連遺伝子などの発現が生体内の肝細胞と比較し低下していることが知られている。細胞移植療法の確立のために、生体外で高い肝機能を維持する、または誘導できるような培養系の構築が重要と考えられる。

文 献

- 1) Ohashi, K., Waugh, J. M., Dake, M. D. *et al.* Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 41, 132-140, (2005).
- 2) Yokoyama, T., Ohashi, K., Kuge, H. *et al.* *In vivo* engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity. *Am J Transplant* 6, 50-59, (2006).
- 3) Ohashi, K., Yokoyama, T., Yamato, M. *et al.* Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 13, 880-885, (2007).
- 4) Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H. *et al.* Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 116, 1775-1786, (2003).
- 5) Watanabe, T., Nakagawa, K., Ohata, S. *et al.* SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* 250, 332-347, (2002).
- 6) Kakinuma, S., Ohta, H., Kamiya, A. *et al.* Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. *J Hepatol* 51, 127-138, (2009).
- 7) Miyaoka, Y., Ebato, K., Kato, H. *et al.* Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 22, 1166-1175, (2012).
- 8) Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M. *et al.* The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11881-11888, (2003).
- 9) Takase, H. M., Itoh, T., Ino, S. *et al.* FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev* 27, 169-181, (2013).
- 10) Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A. *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204, 1973-1987, (2007).
- 11) Kamiya, A., Kakinuma, S., Yamazaki, Y. *et al.* Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology* 137, 1114-1126, 1126 e1111-1114, (2009).

肝腫瘍に対する創薬シーズ 幹細胞マーカーSALL4の肝癌治療法における可能性

及川 恒一^{*,**} 紙谷 聡英^{***}

索引用語：SALL4, 幹細胞, 癌幹細胞, 肝癌

1 はじめに

幹細胞は自己複製能と多分化能を兼ね備えた細胞で、さまざまな臓器・組織の機能細胞の元になる組織幹細胞が同定されている。一方、癌組織でも一部のヘテロな細胞集団が癌の維持に重要であり、癌幹細胞の存在が示唆されていた。近年、白血病に加えてさまざまな固形癌においても自己複製と腫瘍形成能を有する癌幹細胞の存在が報告され、癌の階層社会の起点として発癌、浸潤、転移、再発などに密接に関与している可能性が報告されている¹⁾。正常幹細胞と癌幹細胞は、自己複製制御機構や表面マーカーの発現パターンが類似しており、この自己複製制御機構の破綻が癌化につながる可能性が示唆されている²⁾。癌幹細胞の同定にはさまざまな細胞表面マーカーが用いられており、肝癌ではEpithelial cell adhesion molecule (EpCAM), CD133, CD90, CD44, CD24, CD13などが報告されてい

る³⁻⁷⁾。またATP-binding cassette(ABC) transporterを介したDNA染色色素Hoechst33342の排泄能が高い細胞集団side population (SP細胞)が幹細胞に近い性質を持つことが知られており、肝癌でのSP細胞の存在が確認されている^{8,9)}。これらの幹細胞マーカー陽性の細胞を含む肝細胞癌では予後が不良であることが報告されており¹⁰⁾、癌の根治を目指すには抗癌剤感受性や浸潤転移に深く関与する癌幹細胞を標的とした治療が重要になる。

本稿では、ヒト正常肝幹細胞と肝癌における新規幹細胞マーカー SALL4の発現ならびに機能と将来的な肝癌治療法における可能性について考察する。

2 幹細胞マーカーSALL4

SALL4はショウジョウバエからヒトまで広く保存されたジンクフィンガー蛋白質であり、その遺伝子異常から生じるOkhiro症候群は、主に上肢形成不全や眼球運動制限、ま

Tsunekazu OIKAWA *et al* : SALL4, a stem cell biomarker in liver cancers

*東京慈恵会医科大学・内科学講座・消化器・肝臓内科 [〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8]

ノースカロライナ大学・ラインバーガー総合癌センター *東海大学・創造科学技術研究機構・医学部門

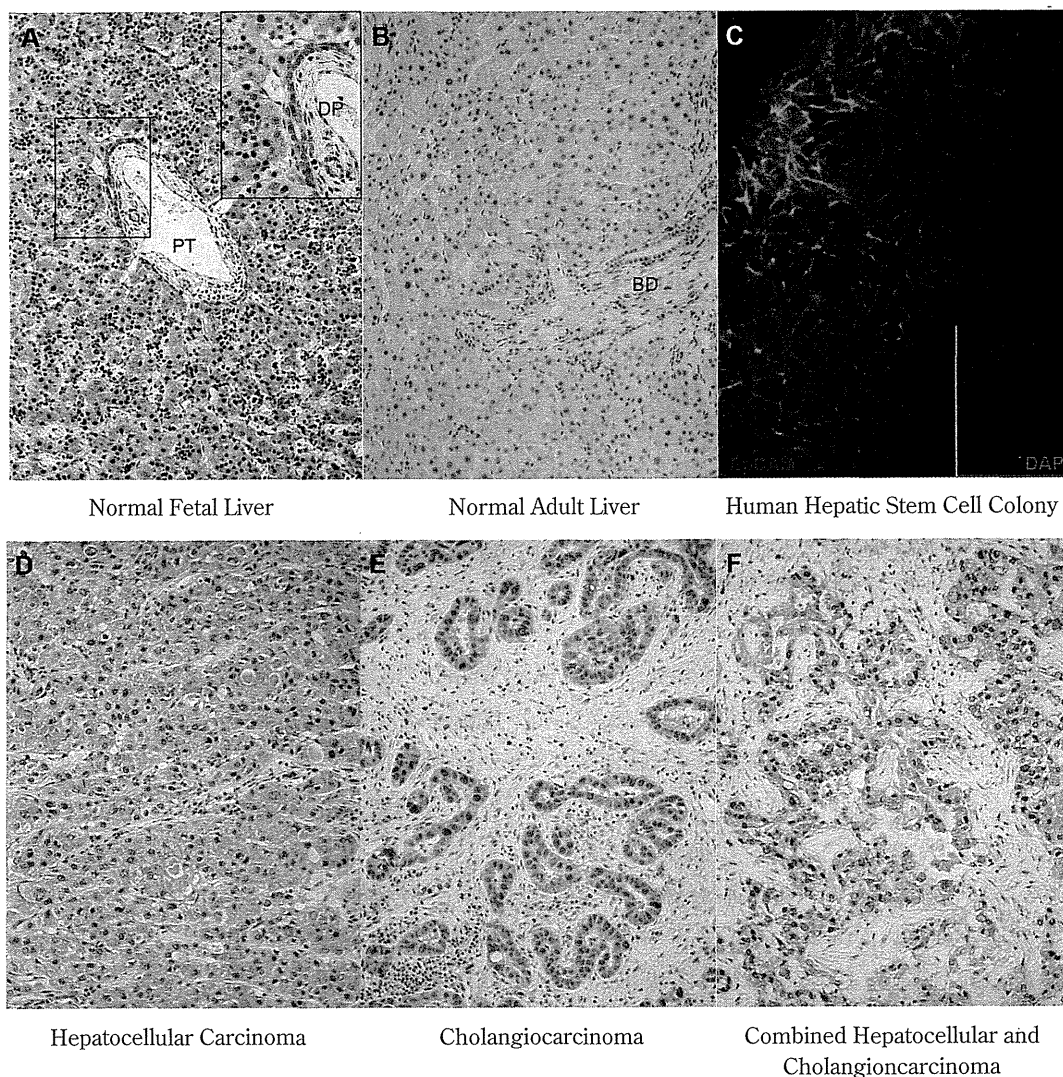


図1 ヒト正常肝組織とさまざまな肝癌組織におけるSALL4の発現

A: 正常胎児肝(19週)ではductal plate (DP)を含め、肝小葉にびまん性にSALL4発現を認めるが、B: 正常成体肝では全くSALL4発現がみられない、C: *in vitro*培養ヒト肝幹細胞においてSALL4はEpCAMと共発現する、D: 肝細胞癌(HCC)、E: 胆管細胞癌(CC)、F: 混合型肝癌(HC-CC)でSALL4の発現が認められる。PT: portal tract, DP: ductal plate, BD: bile duct (文献21より改変引用)

た心室中隔欠損や直腸形成異常を一部に呈する¹¹⁾。Sall4ノックアウトマウスの解析では、ホモマウスは胎生致死であり、ヘテロマウスの大半は正常に生育・繁殖するものの、ヒトのOkhiro症候群に類似した心臓、直腸や脳の奇形が確認されている¹²⁾。SALL4は核内に存在する転写因子として作用しembryonic

stem細胞の機能に重要であることが知られており、NANOG, OCT3/4, SOX2と相互作用することで増殖と未分化性の維持や分化決定を制御する^{12,13)}。近年では体細胞からinduced pluripotent stem (iPS)細胞を誘導する際のリプログラミングファクターの一つとして報告されている¹⁴⁾。したがって、SALL4

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

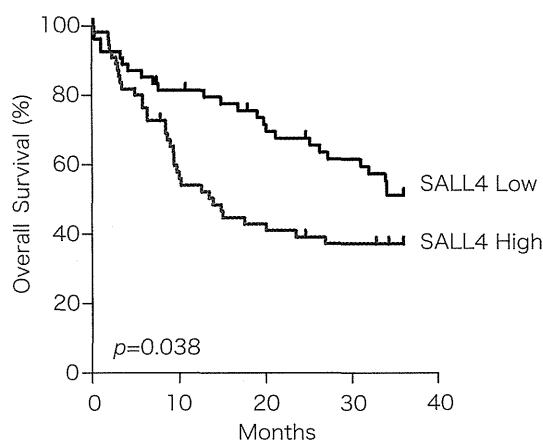


図2 肝細胞癌症例におけるSALL4高発現症例とSALL4低発現症例との生存曲線の比較 (文献21より改変引用)

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)

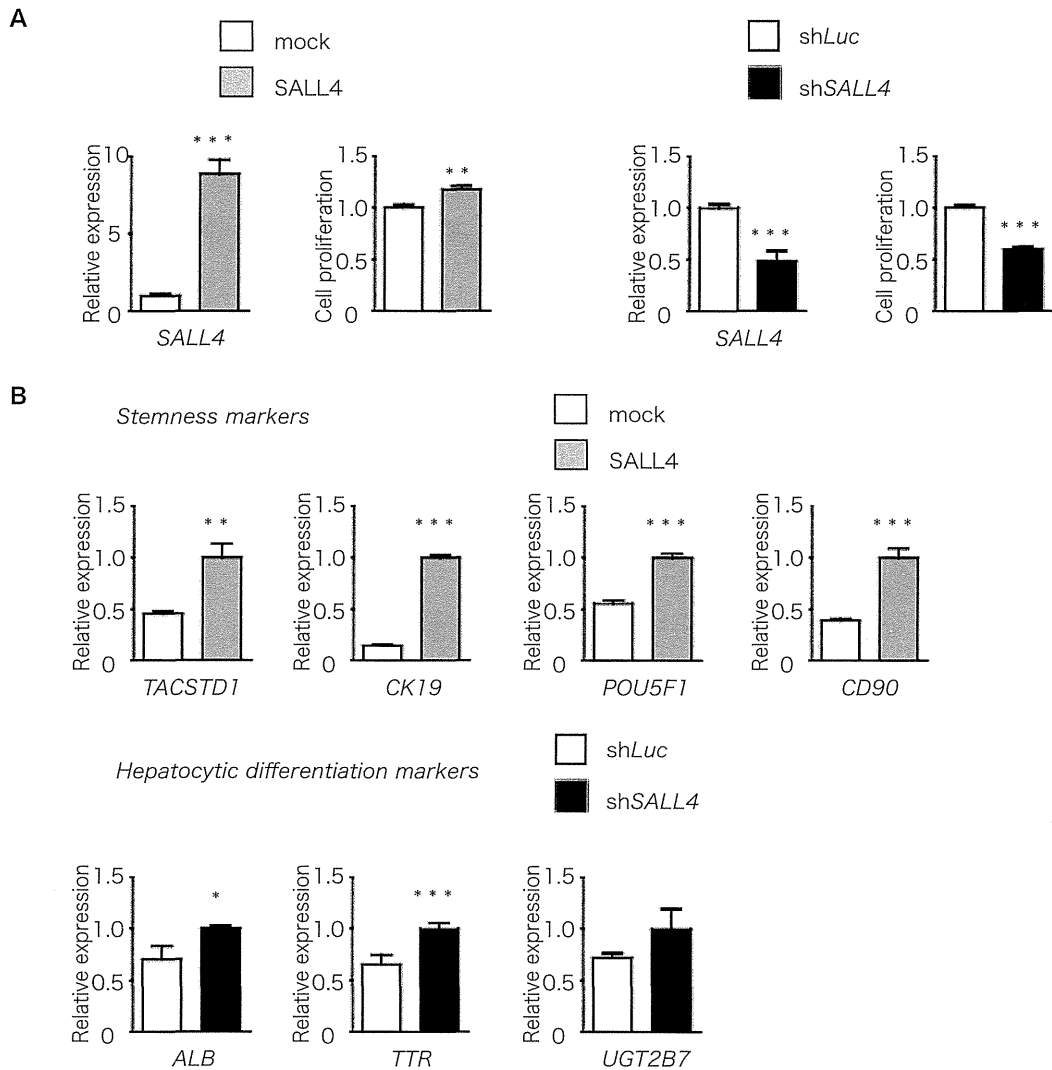


図3 肝癌細胞株における SALL4 強制発現またはノックダウンによる *in vitro* 増殖, 分化度への影響
 A: PLC/PRF/5 細胞における SALL4 強制発現またはノックダウンにおける増殖への影響
 B: PLC/PRF/5 細胞における SALL4 強制発現またはノックダウンにおける stemness 関連遺伝子または肝成熟分化マーカー遺伝子の発現
 (文献21より改変引用)

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

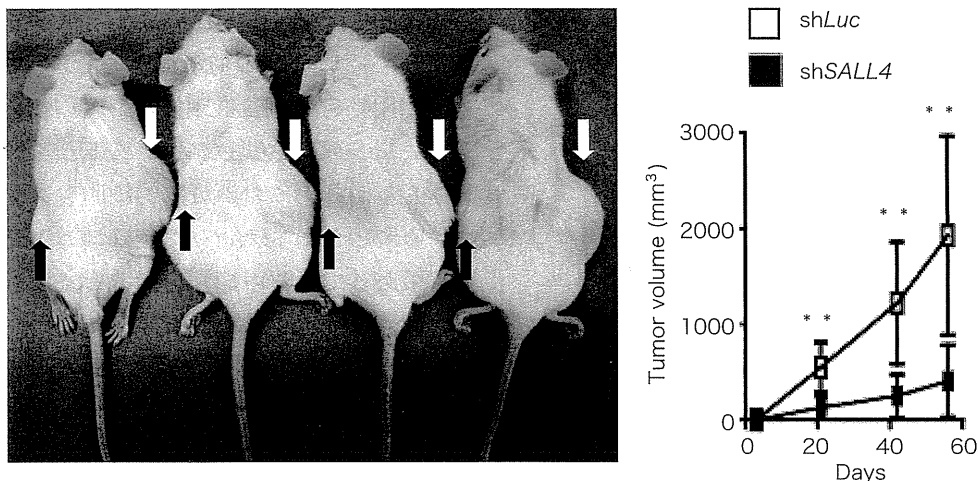


図4 SALL4ノックダウン肝癌細胞株における *in vivo* 腫瘍造成能への影響 (8週後)
 コントロール(白矢印)およびSALL4ノックダウン(黒矢印)したPLC/PRF/5細胞をNOD/SCIDマウス皮下に移植すると、SALL4ノックダウンしたPLC/PRF/5細胞の腫瘍造成能の低下が認められる。(文献21より改変引用)

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

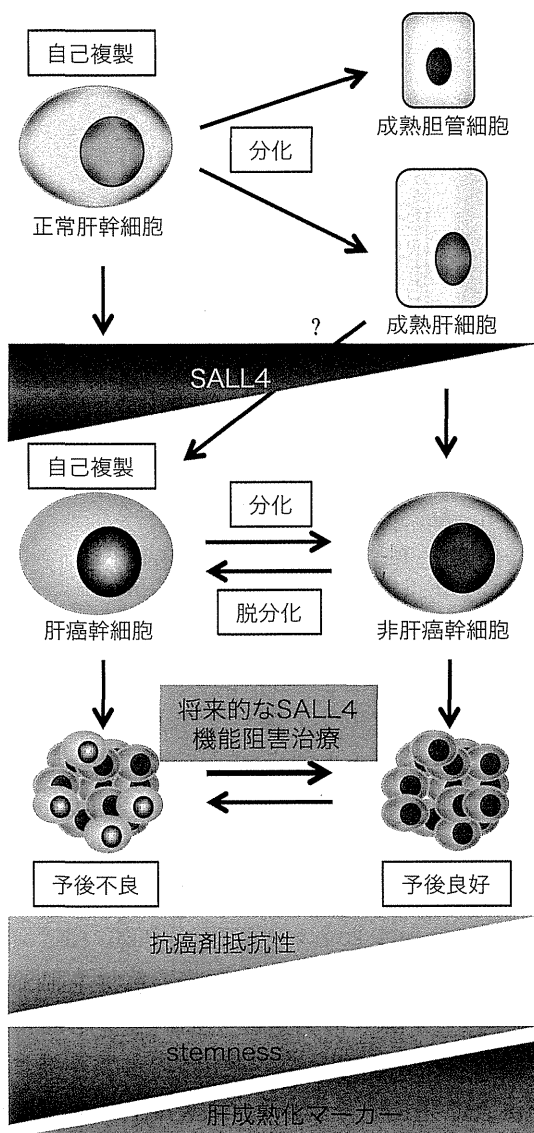


図5 正常肝と肝臓におけるSALL4の役割

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、肝臓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が肝臓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の肝臓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、肝臓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⁾、肝臓に高発現した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、異常なリプログラミングが胃癌

発症に関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

*

*

*

