

研究テーマ**肝がんにおけるがん幹細胞マーカーの同定と解析**

1. はじめに

再生医療の実現に向けた潮流の中で、各臓器や組織の幹細胞を同定し、その特性を制御する分子メカニズムを解明することは、極めて重要な研究課題といえる。また、近年注目されている幹細胞と発がんの関係においても、いわゆる「がん幹細胞」の同定とその特性制御の分子基盤の解明が強く求められる。固形臓器のひとつである肝臓は、再生能力が高い特殊な臓器である一方、肝炎ウイルスの影響などによる再生不全から肝がんへと進展してしまうことも多い。そのため、肝臓の再生や発がんと肝臓の組織幹細胞（肝幹細胞）の密接な関係が疑われる。しかしながら、これまで、肝幹細胞に関する実験的検討はほとんど行われておらず、その存在は不明確であった。それは、肝臓が複数種の細胞によって構成され、さらに多くの血球細胞を含む複雑な構造体であるために、数が少なく、形態による識別が困難な肝幹細胞に的を絞った研究を行うことが難しかったからである。そこで申請者らは、肝幹細胞を他の細胞から選別する手法として、細胞表面抗原を抗体で染色した細胞を生きのまま回収可能な装置であるフローサイトメトリー（fluorescence activated cell sorting: FACS）を活用し、回収された細胞の性状をクローナルな解析系にて調べた。その結果、高い増殖能、多分化能、自己複製能、肝組織再構築能といった肝幹細胞の特性をすべて満たし、マウス胎仔肝臓細胞の10万個にわずか6個しか存在しない肝幹細胞がc-Met⁺ CD49f^{+/low} c-Kit⁻ CD45⁻ TER119⁻ 細胞画分中に極めて限定して含まれることを突き止め、その同定と特異的分離・回収に成功した（1-2）。本研究では、これまでに確立した肝幹細胞の分離法とそのクローナルな解析法を駆使し、肝幹細胞の機能制御を担う重要分子の同定と解析を行った。また、それらの分子の発現と肝がんにおける幹細胞（肝がん幹細胞）の機能の関係について研究を進め、正常な肝幹細胞の分子マーカーと肝がん幹細胞の分子マーカーとの相関性について解析を行っている。

2. 研究方法と結果

肝幹細胞の増殖と分化を制御する転写因子、Tbx3 の発見

T-boxファミリーに属する転写因子は、多くの器官や組織の発生において重要な役割を担っているが、肝発生における役割はこれまで不明であった。そこで申請者は、肝幹細胞の分離法とそのクローナルな解析法を用いて、肝幹細胞におけるT-box転写因子の役割について解析を行った。まず、胎生13.5日のマウス胎仔肝臓におけるT-box転写因子の発現を網羅的に調べた。その結果、17個あるT-box転写因子中、7個のT-box転写因子（Eomes、Tbx3、Tbx6、Tbx10、Tbx12、Tbx15、Tbx20）が胎仔肝臓で発現していた。さらに、マウス胎仔肝臓から肝幹細胞を分離して解析した結果、それら7個のT-box転写因子のうちTbx3だけが肝幹細胞で強く発現していた。そこで次に、肝発生におけるTbx3の機能解析を行う目的で、Tbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓を用いて研究を行った。驚くことに、Tbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓はとても小さく、肝上皮細胞の増殖が強く抑制されていた（図1）。また、肝細胞の数は激減していたが、胆管上皮細胞の数は相対的に増加して

いた (図1)。そこで、これらの表現型が肝幹細胞の機能異常によるものか否かを調べるべく、Tbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓から肝幹細胞を分離し、その増殖能と分化能をクローナルな実験系で解析した。その結果、Tbx3ノックアウトマウス由来肝幹細胞のコロニー形成能は著しく低下しており、また、肝細胞へはほとんど分化せず、胆管上皮細胞へ優位に分化した (図2)。さらに、Tbx3はp19^{ARF}の発現を抑制することで肝幹細胞の増殖と肝細胞への分化を促進し、逆にTbx3によるp19^{ARF}の抑制が減少もしくは停止すると肝幹細胞は増殖を止め胆管上皮細胞に分化することが判明した (図3)。これらの結果から、Tbx3はp19^{ARF}の抑制を介して肝幹細胞の増殖と分化を制御することにより、肝臓の発生を進める上で必須の役割を担っていることが明らかとなった (3)。

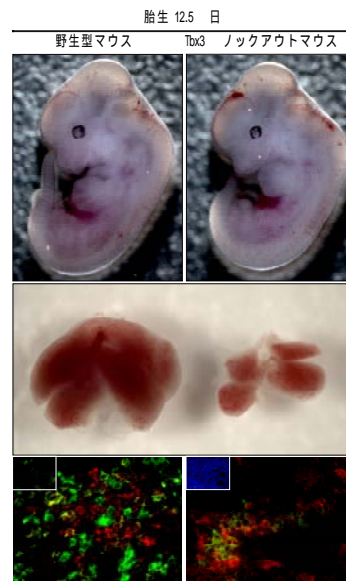


図1 : Tbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓は野生型マウスと比べて小さく、その肝臓中ではアルブミン陽性の肝細胞 (緑色) の数が激減し、逆にサイトケラチン-7陽性の胆管上皮細胞 (赤色) の数が増加していた。(文献3の図を改変)

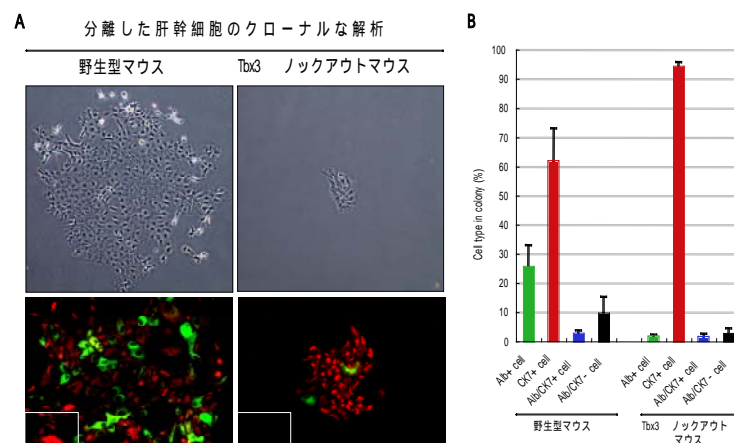


図2 : (A) 野生型マウスとTbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓からフローサイトメトリーを用いて肝幹細胞を分離し、単一細胞培養下でコロニー解析を行った。その結果、Tbx3ノックアウトマウス

ス由来肝幹細胞のコロニー形成能は強く抑制され、また、アルブミン陽性肝細胞（緑色）に対し、サイトケラチン-7陽性胆管上皮細胞（赤色）へ優位に分化した。(B) 各コロニーに含まれる細胞を種類別にカウントし、グラフ化した。Tbx3ノックアウトマウス由来肝幹細胞のコロニーでは、アルブミン陽性肝細胞への分化が抑制され、サイトケラチン-7陽性胆管上皮細胞への分化が促進されていることがわかる。(文献3の図を改変)

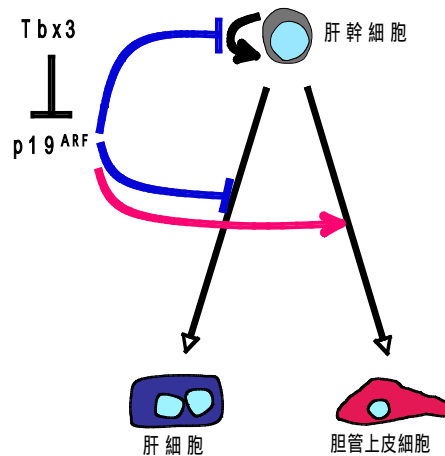


図3 : Tbx3はp19^{ARF}の抑制を介して肝幹細胞の増殖と分化を制御することにより、肝臓の発生を進める上で必須の役割を担っている。

肝がんに含まれる Tbx3 陽性細胞の分離と解析

Tbx3 は肝幹細胞の増殖が盛んな発生初期で強く発現し、肝発生の進行と共に発現が減少/停止する。しかしながら、肝癌のマウスモデルでは Tbx3 の発現が再び上昇し、癌細胞の増殖を活性化する。また、Tbx3 の発現が高いヒトの肝癌では、Tbx3 の発現が低い肝癌に比べ、進行癌の割合や転移・再発の頻度が高く、生存率も低いことが報告されている (4)。これらの結果は、Tbx3 陽性の癌細胞が増殖や生存に関して特殊な能力を有することを示唆している。そこで本研究では、肝がんに含まれる Tbx3 陽性細胞を全がん細胞から分離し、その特性を解明することで、正常発生期の肝幹細胞と同様に、Tbx3 の発現が肝がん幹細胞の性質を規定する分子マーカーになりうるか否かを明らかにする。

まず、マウス胎仔肝臓から分離した肝幹細胞にTbx3遺伝子を導入し、Tbx3の過剰発現を誘導した。その結果、Tbx3を過剰発現させた肝幹細胞は腫瘍細胞の性質を獲得し、未分化細胞のまま異常増殖することが判明した (図4)。そこで次に、肝がんに含まれるTbx3陽性細胞を分離すべく、Tbx3陽性細胞が緑色蛍光タンパク質 (eGFP) を発現する遺伝子改変マウスの作製を進めた。本研究では、胚性幹細胞 (ES細胞) 内でTbx3の遺伝子をeGFP遺伝子で置き換える「ノックイン」という方法を用いて、Tbx3を発現する細胞がeGFPを発現するような *Tbx3^{egfp/+}* マウスの作製を試みた (図5A)。その結果、ES細胞もTbx3を発現するために、eGFPを発現し緑色蛍光を発するES細胞株が複数得られた (図5B)。そこで、これらのES細胞をマウスのブラストシストに戻し、遺伝子改変マウスの作製を行った。現在、キメラマウスが無事作製されつつあるため、導入したES細胞が生殖系列へ分化したかどうかを解析中である (図5C)。一方、マウスで肝がんを誘導するために、肝臓特異的な *Pten* 欠損マウス (*Pten^{loxp/loxp}; Alb-Cre* マウス) を作製した。このマウスは、通常、1年以上をかけて腫瘍を形成するため、実験効率が悪い。そこで、四塩化炭素を投与することで肝障害を誘導し、発がんのス

ピードを早めることを試みている。今後、Tbx3陽性細胞がeGFPを発現するマウスと *Pten*^{1oxp/1oxp}; *Alb-Cre*マウスを交配して得た *Pten*^{1oxp/1oxp}; *Alb-Cre*; *Tbx3*^{egfp/+}マウスに対し、肝障害を誘導して腫瘍形成を促進させ、がん組織中に含まれるTbx3陽性細胞の同定と分離、そして、その機能解析を進めていく予定である。

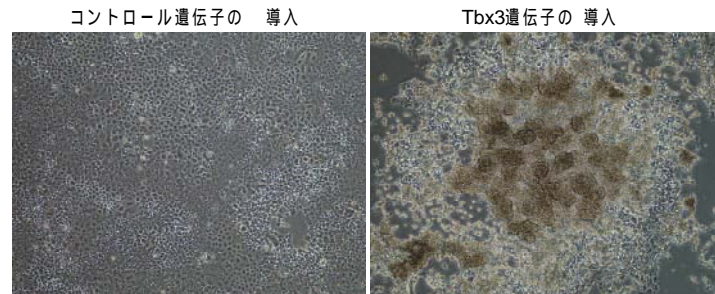


図4：マウス胎仔肝臓から分離した肝幹細胞に対し、レトロウイルスを用いてコントロール遺伝子もしくはTbx3遺伝子を導入した。その結果、Tbx3を過剰発現させた肝幹細胞は腫瘍細胞の性質を獲得し、未分化細胞のまま異常増殖することが判明した。

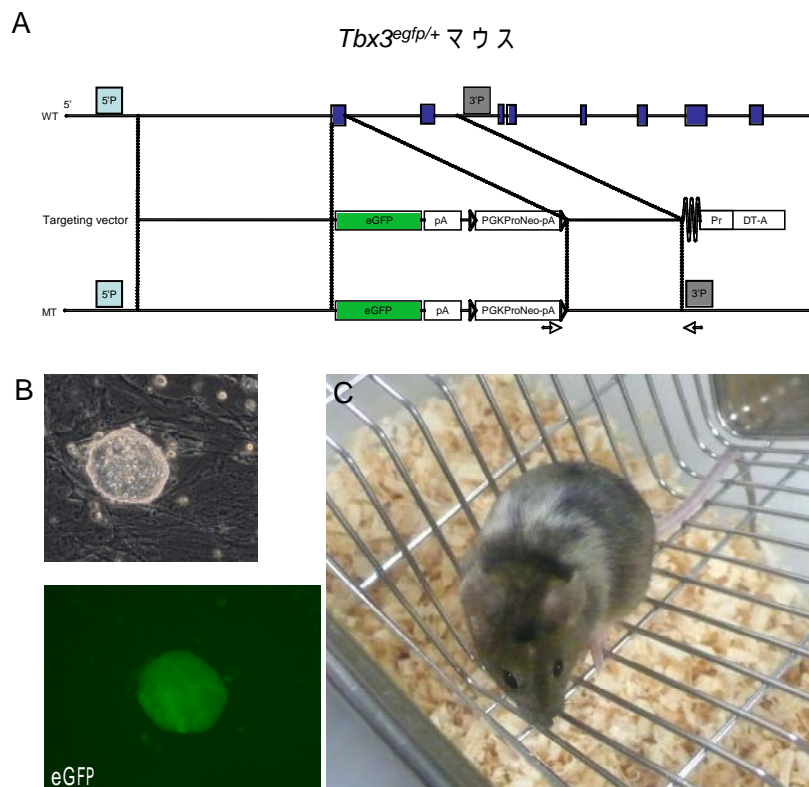


図5：*Tbx3*^{egfp/+}マウスの作製。(A) Tbx3遺伝子をeGFP遺伝子で置換する方法の概略図。(B) ES細胞はTbx3を発現するため、作製した*Tbx3*^{egfp/+}ES細胞はeGFPを発現し蛍光を発する。(C) *Tbx3*^{egfp/+}ES細胞をブラストシストに戻すことによって作製されたキメラマウス。

3. 考察

近年の幹細胞研究の進展に伴い、これまで全く不明であった幹細胞と発がんの関係がクローズアップされている。ある種の再発性白血病では、放射線抵抗性を有する造血幹細胞そのものの異常が原因である可能性が高く、その実験的検証が進められている。また、がん組織そのものやがん由来細胞株では、細胞集団中の一部の細胞にのみ腫瘍形成能が備わっているといった実験結果が示されており、幹細胞様の特殊な細胞が混在すると考えられている。このように、いわゆる「がん幹細胞」の存在が脚光を浴びつつあるが、これらが幹細胞の同定や発がんに与える影響などの解析は始まったばかりであり、とりわけ、肝臓などの固形臓器に対する研究速度は非常に遅い。それは、固形臓器のがん組織中に含まれるがん幹細胞を他の細胞と見分ける方法が確立されていないからと言える。近年、CD133という細胞表面分子が大腸がんなどのがん幹細胞に特異的に発現するといった研究結果が報告された (5-7)。しかしながら、この結果を否定する研究結果も報告され、その正否については混沌とした状態が続いている (8)。また、少なくともCD133は細胞増殖を促進する働きを有しておらず、その存在意義にも疑問が残る。それゆえ、がん幹細胞において特異的に発現し、機能的にもがん幹細胞の特性を制御する分子の発見が強く望まれている。こうした分子が見つければ、がん幹細胞をがん組織中から分離して解析できるだけでなく、その分子を標的としてがん幹細胞の増殖抑制や細胞死誘導などの治療法の開発につながると考えられる。本研究で扱うTbx3は、一昨年、マウスの肝がんモデルにおいて発現の増強が確認され、細胞増殖を促進する β -cateninによって制御されていることが報告された (4)。また、Tbx3の発現が高いヒトの肝がんでは、Tbx3の発現が低い肝がん に比べ、進行がんの割合や転移・再発の頻度が高く、生存率も低いことが報告された (4)。一方、申請者らの研究により、Tbx3が肝幹細胞の増殖に必須の遺伝子であることも明らかとなった (3)。これらの研究結果は、Tbx3が肝がんのがん幹細胞に発現してその増殖を活性化していることを示唆しており、今後の研究で、Tbx3が肝がん幹細胞に特異的に発現し、かつ、機能的に肝がん幹細胞の増殖制御の中心を担う分子であることが判明すれば、肝がん幹細胞を他の細胞と識別するための分子マーカーを世界に先駆けて同定でき、また、Tbx3を標的とした肝がんに対する革新的な治療法の開発にも貢献できると考えられる。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、財団法人病態代謝研究会より助成を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

5. 文献

1. Suzuki A., Zheng Y.W., Kondo R., et al. Flow cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32, 1230-1239, 2000.
2. Suzuki A., Zheng Y.W., Kaneko S., et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 156, 173-184, 2002.
3. Suzuki A., Sekiya S., Buscher D., et al. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing $p19^{ARF}$ expression. *Development* 135, 1589-1595, 2008.
4. Renard C.A., Labalette C., Armengol C., et al. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin

pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer. *Cancer Res* 67, 901-910, 2007.

5. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110, 2007.
6. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115, 2007.
7. Zhu L., Gibson P., Currie D.S., et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457, 603-607, 2009.
8. Shmelkov S.V., Butler J.M., Hooper A.T., et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118, 2111-2120, 2008.