

# 研究報告書

一般課題：A

(平成28年度)

平成30年4月27日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 東京大学医科学研究所  
癌・細胞増殖部門 人癌病因遺伝子分野

住 所 東京都港区白金台4-6-1

研究者氏名 坂本 毅治



(研究課題)

膜型プロテアーゼによる肝癌幹細胞性の制御機構の解明

---

平成29年2月20日付助成金交付のあった標記一般課題：Aについて研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## <目的>

肝がんは、世界で約62万人が罹患し、我が国でも死亡者数は依然として毎年3万人を越える。ICGCによるゲノム解析結果が報告されており (Shibata & Aburatani, Nature Reviews, 2014)、多様な遺伝子変異の蓄積が観察されるものの、強力なドライバー遺伝子に相当する高頻度の変異等は認められていない。肝細胞癌 (HCC) は異なる幹細胞表面マーカーを発現する細胞が一定の割合で存在する不均一な細胞集団であり、幹細胞マーカーの中でも特に、EpCAM 陽性細胞と CD90 陽性細胞はお互いに独立して存在している (Yamashita, et al. Gastroenterology, 2009)。そのため、これら肝細胞癌幹細胞を標的とした治療法に開発には、どのように癌幹細胞性が制御されているかを明らかにする必要がある。そこで本研究では、多くのがんの悪性化に重要な役割を果たす膜型プロテアーゼ MT1-MMP に着目し、MT1-MMP が肝癌幹細胞性の制御、特に EpCAM 陽性・CD90 陽性癌幹細胞の制御にどのような役割を果たすかについて解明を目指す。

## <結果>

HCC 手術材料を用いた幹細胞マーカー発現の解析から、EpCAM 陽性細胞と CD90 陽性細胞が、独立したがん幹細胞様細胞として報告されており (Yamashita T et al., Hepatology, 2013)、HCC 細胞株では、HuH1、HuH7、Hep3B が EpCAM+/CD90-細胞、HLE、HLF、SK-Hep-1 は EcCAM-/CD90+細胞が認められている。そこで本研究ではまずこれらの細胞株を用いて MT1-MMP と同分子により駆動される分子経路に関わる分子の発現と機能を調べた。その結果、EcCAM-/CD90+細胞の HLE、HLF で特異的に MT1-MMP の発現が欠失していることが明らかとなった。また、近年明らかになった MT1-MMP のプロテアーゼ活性に依存しない転写因子 HIF-1 の活性化に働く Mint3 の発現を調べたところ、いずれの細胞株においても発現が認められた。また、金沢大学附属病院の手術検体から得られた肝癌細胞においても、MT1-MMP、Mint3 の発現が確認された。

続いて、MT1-MMP、Mint3 の肝癌細胞の幹細胞性への影響を調べるために、スフェロイドアッセイを行った。その結果、手術検体から得られた肝癌細胞で MT1-MMP、Mint3 をノックダウンすると、ディッシュ上での増殖には影響を与えないが、スフェロイド形性が有意に抑制されることが明らかとなった。また、MMP 阻害剤添加がスフェロイド形性に大きな影響を与えなかったことから、MT1-MMP の非プロテアーゼ活性が幹細胞性に関わる可能性が示唆された。

さらに、MT1-MMP を発現している EpCAM+/CD90-細胞の HuH1、HuH7、Hep3B 細胞で MT1-MMP を一過性にノックダウンした際の EpCAM 発現を解析した。その結果、HuH1 細胞、Hep3B 細胞で MT1-MMP をノックダウンした際に、EpCAM の発現の上昇が確認されたが、HuH7 細胞では EpCAM の発現に変化はなかった。これらの結果から、細胞種に依存したメカニズムで、MT1-MMP の発現抑制に対して代償的に幹細胞マーカーの発現上昇が起きていると考えられた。

### <考察>

本研究により、肝細胞癌の heterogeneity に関して、MT1-MMP が幹細胞性を介して影響を与えている可能性が示唆された。しかしながら、細胞株の種類やノックダウンの期間によって MT1-MMP と幹細胞性について、必ずしも同じ結果が得られないことから、肝細胞癌ならではの複雑性が実験結果に影響していることが考えられる。今後より体系的に実験結果を取得しメカニズムに迫ることで、MT1-MMP による肝細胞癌幹細胞性制御の全体像が明らかになることが期待される。