

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659243

研究課題名（和文）：脂肪由来幹細胞を用いた肝細胞癌の置換性発育の機序解明に関する研究
 研究課題名（英文）：The study to clarify a mechanism of replacing growth of the hepatocellular carcinoma using the adipose tissue derived stem cells

研究代表者：島田 光生 (SHIMADA MITSUO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10216070

研究成果の概要（和文）：今回、肝癌細胞株と脂肪由来幹細胞（ADSC）を共培養し、cell contact を介して ADSC が肝癌細胞の増殖を促進するという知見を得た。その機序には液性因子の関与よりも cell contact が重要であることが示唆された。また、高分化型肝癌切除標本を用いて、病理学的に置換性発育を認めた症例を計 11 例抽出し免疫組織染色を行ったが、フロント部位における幹細胞様細胞の同定には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of the adipose tissue-derived stem cells (ADSC) in replacing growth of hepatocellular carcinoma (HCC). HCC cell line (HuH7) and ADSC were co-cultured with or without cell-cell contact to clarify whether mediator affected HCC cell growth. And we concluded cell contact was important process in cell growth during co-culture HCC cells with ADSC. In addition, immunohistochemical staining of stemness marker (CD44 and CD133) and junction protein (Connexin 32) was performed in eleven well differentiated HCC patients with replacing growth. No positive cells were recognized in the invasive front area, however, junction protein (Cx32) was expressed at peripheral area in cytoplasm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌・置換性発育・脂肪幹細胞・癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

高分化型肝癌では、癌細胞は周囲肝組織との境界では隣接する肝細胞索を置換するように増殖する（図 1）が、その機序はほとんど解っていない。我々はこの特徴的変化は、肝の progenitor cell、stem-like cell が深く関与していると考え、癌細胞から何らかの影響を受けた幹細胞は、正常肝細胞を癌細胞へ変化させ癌組織へと置換させるポテンシ

ヤルを有するのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

癌細胞と接触したときの幹細胞および正常肝細胞の形態的あるいは生物学的変化を明らかにすること。

3. 研究の方法

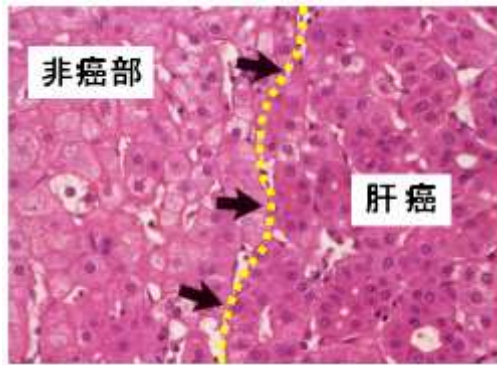


図 1

(1) 高分化型肝癌での置換性発育の検証

ヒト肝癌切除例のうち高分化型肝癌切除標本を用いて置換性発育フロント部位を中心に幹細胞マーカーである CD44、CD133 の免疫染色を行った。また、通常 Gap junction protein (Cx32) は細胞辺縁部に発現し、肝細胞の homeostasis を維持している (Hepatology 2008) が、Cx32 の細胞質への発現移動が腫瘍発育や癌幹細胞増殖に関与することが既に報告されている (JCI 2000) (図 2)。今回、フロント部位における正常肝細胞から肝癌細胞への組織学的変化を捉えるべく、同部位における Gap junction protein (Cx32) の免疫染色も行った。

(2) Cell contact (細胞接触) の影響

細胞接触を介した脂肪由来幹細胞 (ADSC) の肝癌細胞増殖に与える影響を以下の項目につき検討する。ADSC はヒト脂肪組織から採取した Stem Pro®を用いた。

① Cell viability

HuH7 単独培養および HuH7 と ADSC の共培養を 4 日間行った後に、MTT assay により HuH7 の cell viability を比較検討した。

② 細胞間接触の有無による評価

HuH7、ADSC を同一 dish に播種し 4 日間培養し、HuH7 と ADSC の cell contact を有する領域と cell contact のない領域で cell viability を評価した (trypan blue)。

③ 液性因子の関与に関する検討

HuH7 単独群、HuH7 + ADSC 共培養群を Trans-well® Permeable well を用いて 4 日間培養し、cell viability および cell growth を評価した。

4. 研究成果

(1) 置換性発育フロント部位には幹細胞様細胞 (CD44、CD133 陽性細胞) は認めなかった。一方、Cx32 の染色において、非フロント

部位の正常肝細胞は細胞質辺縁部に染色されるが、フロント部位の正常肝細胞では細胞質中心に染色される細胞が存在していた (図 3)。

Gap junction と肝癌発生

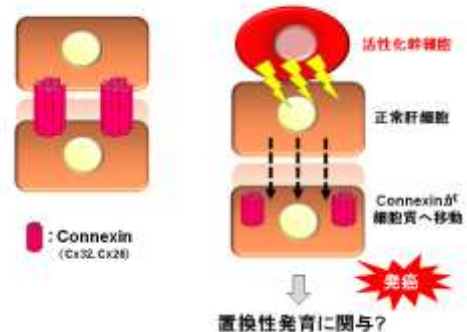


図 2

置換性発育フロント部位免疫組織染色 - Cx32 -

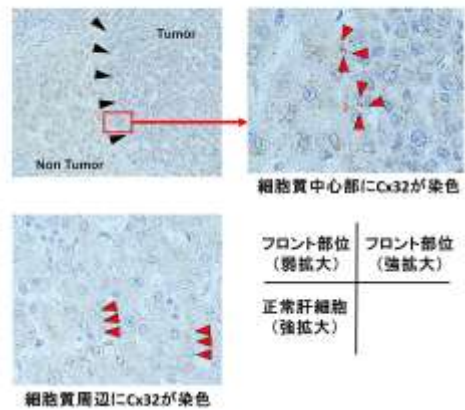


図 3

(2) ①HuH7 単独に比べ ADSC との共培養で cell viability が増加した。(図 4)

MTT assay

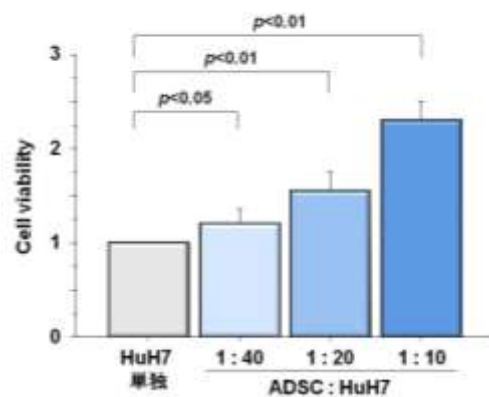


図 4

②HuH7 と ADSC の cell contact を有する領域は contact のない領域と比較して、有意に

HuH7 の cell viability が高値であった。(図 5、図 6)

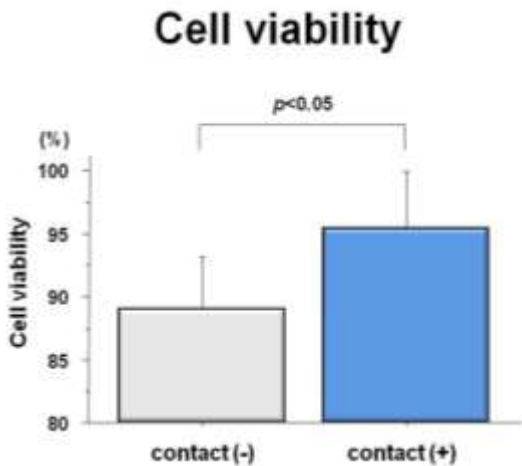


図 5

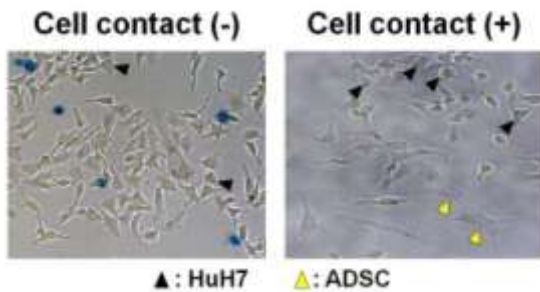
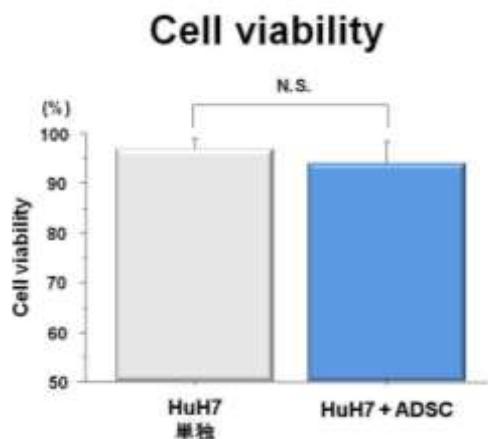


図 6

③HuH7 単独培養群と HuH7 + ADSC 共培養群の間に HuH7 細胞の cell viability や細胞数には差を認めなかった。(図 7)

図 7

以上の結果から、脂肪由来幹細胞は肝癌細



胞の増殖を増強することが示され、その機序には液性因子 (mediator) の関与ではなく cell contact が重要であることが示唆された。

今後の研究計画としては、癌細胞により活性化された ADSC が、正常肝細胞とどの

ように interact し癌化していくのかという活性化 ADSC と正常肝細胞の相互関係に関する検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery*, 査読有り, 151(3), 2012, 412-419. PMID: 21982637
- ② Arakawa Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Effects of pegylated interferon $\alpha 2b$ on metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*, 査読有り, 172(1), 2012, 95-101. PMID: 20851413
- ③ Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Role of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Today*, 査読有り, 42(2), 2012, 135-140. PMID: 22143355
- ④ Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Clinical impact of lymph node dissection in surgery for peripheral-type intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Today*, 査読有り, 42(2), 2012, 147-151. PMID: 22124809
- ⑤ Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Role of thymidine synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expressions in gallbladder carcinoma. *Surg Today*, 査読有り, 42(6):565-9, 2012, Jan, [Epub ahead of print]. PMID: 22270332
- ⑥ Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, et al. Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery. *Surg Today*, 査読有り, 41(1), 2011, 18-23. PMID: 21191687
- ⑦ Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Histone deacetylase inhibitor augments anti-tumor effect of gemcitabine and pegylated interferon- α on pancreatic cancer cells. *Int J Clin Oncol*, 査読有り, 16(6), 2011, 671-678. PMID: 21556798
- ⑧ Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Hypoxia inducible factor expression in intrahepatic colangiocarcinoma. *Hepatology*, 査読有り, 58(110-111), 2011, 1439-1444. PMID: 21940327
- ⑨ Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Histone deacetylase inhibitor enhances the anti-tumor effect of gemcitabine: a special reference to gene-expression microarray

analysis. *Oncol Rep*, 査読有り, 26(5), 2011, 1057-1062. PMID: 21805043

- ⑩ Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Outcome of hepatectomy in super-elderly patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol res*, 査読有り, in press, doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00952.x.

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① Yu Saito. Beneficial effects of adiose-derived stem cells on severe hepatic damage due to hepatectomy and ischemia reperfusion injury in mice. 21st World Congress of the International Association of surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO 2011), 2011.11.9, 京王プラザホテル (東京)
- ② 齋藤裕. ヒト脂肪由来幹細胞による肝虚血再灌流障害軽減効果に関する基礎的検討. 第 47 回日本移植学会総会, 2011.10.4, 仙台国際センター (宮城)
- ③ 齋藤裕. 肝虚血再灌流傷害におけるヒト脂肪由来幹細胞ホーミング効果の機序解明. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3, 名古屋国際会議場 (愛知)
- ④ Yu Saito. The possibility of adipose-derived stem cells for an alternative therapy for liver failure. 12th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST2011), 2011.9.25, COEX Seoul (Seoul)
- ⑤ Yu Saito. Ischemia reperfusion injury enhances SDF1 expressions and homing of adipose derived stem cells. 8th International Smposium on Minimal Residual Cancer (ISMRC2011), 2011.9.21-23, Osaka international convention center (Osaka)
- ⑥ Hiroki Mori. The possibility of adipose-derived regenerative cells for an alternative therapy for liver failure. European Society for Organ Transplantation (ESOT2011), 2011.9.5, The Scottish Exhibition and Conference Centre (Glasgow)
- ⑦ 齋藤裕. ヒト脂肪由来幹細胞による肝再生療法に関する基礎的検討. 第 23 回日本肝胆膵外科学会学術集会, 2011.6.9, 京王プラザホテル (東京)
- ⑧ 居村暁. 非 B 非 C 型肝癌再発に対する分子遺伝学的治療戦略～遺伝子および miRNA 発現のハイブリッド解析から～. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京)
- ⑨ 森根裕二. 癌幹細胞の epigenetic 修飾と癌根治療法への可能性. 第 97 回日本消化器病学会総会, 2011.5.13, 京王プラザホテル (東京)
- ⑩ Yuji Morine. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic

cholangiocarcinoma. 102nd American Association for Cancer Research (AACR 2011), 2011.4.2-6, Orange County Convention Center (Orlando)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 光生 (SHIMADA MITSUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号 : 10216070

(2) 研究分担者

宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA TOHRU)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号 : 30304801

居村 暁 (IMURA SATORU)
徳島大学・病院・助教
研究者番号 : 90380021

森根 裕二 (MORINE YUJI)
徳島大学・病院・助教
研究者番号 : 60398021

池本 哲也 (IKEMOTO TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：20398019

坂東 良美 (BANDO YOSHIMI)
徳島大学・病院・准教授
研究者番号：00238239

(3) 連携研究者
()

研究者番号：