

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659611

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞の治療効果増強のためのホーミング機序解明と制御

研究課題名(英文) The possible mechanism on homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver

研究代表者

島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10216070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脂肪由来幹細胞(ADRC)の標的臓器への特異的集積能力(homing効果)の制御を目的とした。ADRCはin vitroにおける肝細胞保護効果、肝切除(Hx)+虚血再灌流傷害(I/R)モデルマウスにおける肝傷害軽減効果とともにIn vivo imaging・蛍光顕微鏡により肝に特異的に集積していることを確認した。さらにADRCの臓器特異的集積能にSDF-1/CXCR4 axisが機能している可能性も確認した。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the regulation of homing effect of systemically transplanted human adipose-derived stem cells(ADRCs) into the injured liver. ADRCs indicated the reduction of liver injury with 70% hepatectomy(Hx) and ischemia-reperfusion(I/R) in mouse model. ADRCs were traced by in vivo imaging for 24h, and found in various organs immediately following transplantation and almost accumulated in remnant liver or spleen at 6 h after transplantation. Also, ADRCs were histologically revealed in the harvested liver. 70%Hx and I/R injury significantly enhanced SDF-1 expressions regardless of ADRCs transplantation, and only ADRC transplantation increased CXCR-4 expressions. The predominant SDF-1 positive cells in the liver were equally identified in parenchymal and nonparenchymal cells at 6h, but shifted to non-parenchymal cells at 24 h after transplantation. Systemically transplanted ADRCs homed to the injured liver after transplantation, possibly based on the mechanisms of SDF-1/CXCR-4 axis.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝不全 幹細胞 homing効果 遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

肝再生において多くの再生制御因子の作用メカニズムが解明されているが、絶対的再生肝細胞の不足した肝不全の状況を克服するには至らず、新たな細胞資源としての脂肪由来幹細胞：adipose tissue-derived mesenchymal regenerative cell (ADRC)を用いた細胞移植治療が注目されている。ADRCは単位容積あたりの幹細胞数が多く、標的臓器への分化能以外にも様々な能力が期待されているが、依然克服すべき問題点として疾患臓器への低い分化誘導効率があげられる。健常マウス肝における幹細胞集積率は2%で肝硬変モデルでも8~10%とされ、最も効率的な解決策としてi)移植幹細胞数の増加とii)標的臓器への特異的集積能力(homing effect)の制御があげられる。ADRCは豊富なcell sourceにより移植細胞数の問題をクリアしているが、さらに細胞移植治療を現実的にするためには、homing効果の機序解明が必須である。現在までに癌転移homing制御機構としてSDF-1/CXCR4 axisが知られており、その詳細なメカニズムや、SDF-1産生細胞・誘導時期についてさえ依然明らかにはされていない。特にADRCの肝再生・傷害におけるhomingについての検討はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本研究では(1)再生肝におけるADRCの肝障害軽減効果、(2)SDF-1を中心としたhoming effect制御因子(接着・浸潤)発現細胞の同定、(3)homing effect制御(増強)による治療効果向上の検討を通して細胞治療の効率化を目指す。さらにhoming効果の臓器特異性についても解析を加え、疾患横断的細胞治療となりうるかどうかとも検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ADRCの肝傷害軽減効果

#### Trophic 効果

ADRCのtrophic効果を、ヌードマウス肝細胞( $1.0 \times 10^5$  cells/well)/ADRC( $1.0 \times 10^5$  cells/well)のcell-cell contact(-)共培養(n=4)し、肝細胞のviability・培養液中サイトカインを経時的に追跡し、肝細胞単独培養群(n=4)と比較検討した。特に増殖因子としてIL-6、VEGFに着目し解析を追加した。

### 肝切除術・虚血再灌流傷害後肝傷害軽減効果

肝切除後肝再生・肝傷害に対するADRCの効果を確認するため、balb/cマウスに20min肝虚血下(I/R)+70%肝切除術(Hx)を施行。heparin併用下にADRC( $1.0 \times 10^5$  cells)を経静脈的(尾静脈)に投与し(コントロール群：heparinのみ)、肝切除後肝傷害(AST, ALT, T-Bil)肝再生、生存率を比較検討した。

### (2) ADRCのHoming 効果

#### 肝切除術・虚血再灌流傷害後肝傷害モデル

balb/cマウスに15min I/R+70%Hxを施行。

heparin併用下にADRC( $1.0 \times 10^5$  cells)を経静脈(尾静脈)投与し(コントロール群：heparinのみ)、homing効果を検討した。Xenolight Dir<sup>®</sup>でlabelingしたADRCはIn vivo imaging、Neo Stem<sup>®</sup>でlabelingしたADRCは肝組織切片を蛍光顕微鏡により集積臓器を検索した。さらにHoming効果におけるSDF-1/CXCR4 axisの関与についてもreal time PCR、免疫染色により検討した。

### 膵島傷害(糖尿病)モデル

balb/cマウスにstreptozotocin(STZ)を静脈投与した5日後、Xenolight Dir<sup>®</sup>でlabelingしたADRC( $1.0 \times 10^5$  cells)を経静脈(尾静脈)投与し、24時間後に擬死させ、In vivo imagingにより集積臓器を確認した。

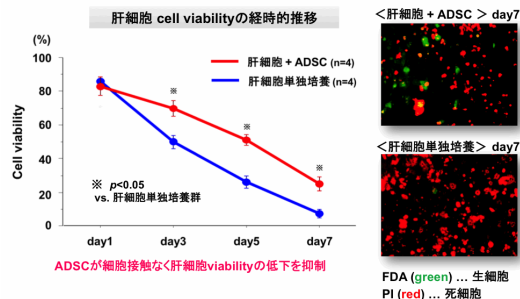
## 4. 研究成果

### (1) ADRCの肝傷害軽減効果

#### Trophic 効果

マウス肝細胞・ADRCのcell-cell contact(-)共培養において、肝細胞viabilityは共培養群で有意に良好であった(肝細胞単独群 vs ADRCs共培養群：1.1±0.2% vs 16.6±2.1% in day7)。

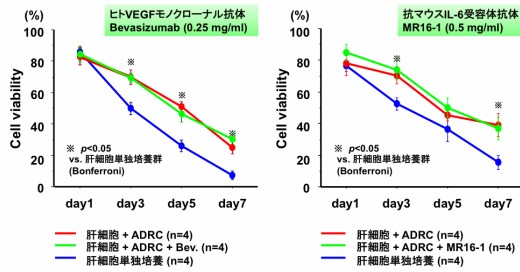
### ADRCと肝細胞の共培養



また培養液中HGF、VEGF、TNF- $\alpha$ をERISA測定したところVEGF高値であったことから、VEGFがADRCのtrophic効果に関与していると考え、肝細胞・ADRC群に抗VEGF抗体を加えると、非投与群とviabilityに変化を認めず、ADRCの肝細胞保護効果にはVEGFが関与していないことが示された(J Surg Res 2013: 論文 No.26)。

また肝傷害とともにの肝再生イニシエーションの役割を担うIL-6にていて検討を加えるため抗IL-6受容体抗体投与によりIL-6シグナルのキャンセルを試みたが、同様に肝細胞保護効果に変化はみられなかった。今後ADRCによるtrophic効果のkey moleculeについてさらに解析していく予定である。

## VEGF・IL-6の肝細胞保護効果への影響



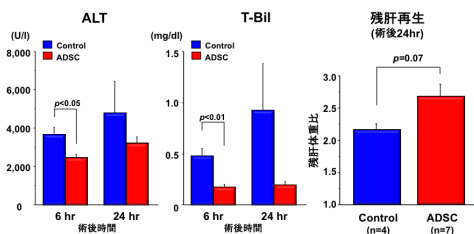
## 肝切除術・虚血再灌流傷害後肝傷害軽減効果

In vivo においては、min I/R+70%Hx モデルに ADRC 投与により肝傷害は有意に改善した (control 群 vs. ADRC 投与群: 血清 AST 848±75 vs. 615±82)。また肝再生率は上昇し、生存率も向上した (術後 24 時間生存率、control 群 vs. ADRC 投与群: 23.5% vs. 41.2%)。

これらの結果から、ADRC の分泌する液性因子により肝細胞保護効果 (trophic 効果) を有することが示された。今後は 考察したごとく、主要な液性因子を同定していく予定である。

## ADRCの肝傷害軽減効果

- 70%肝切除+20min虚血再灌流傷害モデル -



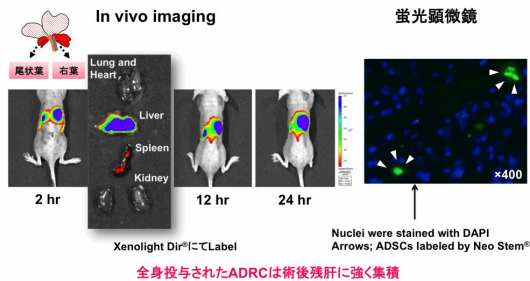
## (2) ADRC の Homing 効果

### 肝切除術・虚血再灌流傷害後肝傷害モデル

15min I/R+70%Hx において尾静脈から投与された ADRC は再生肝へ強く集積することが IVIS®, Neo-Stem® により確認された。

## ADRCのHoming効果

- 70%肝切除+15min虚血再灌流傷害モデル -

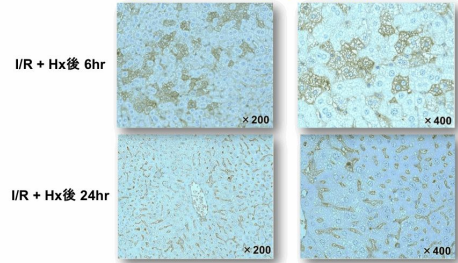


さらに 15min I/R+70%Hx 群 (ADRC 投与・非投与群ともに) は Sham 群と比較して肝内 SDF1 発現 (免疫染色) が増強するとともに、さらに SDF-1 発現細胞が術後 6 時間では肝実質細胞と非実質細胞が同等であったが、術後

24 時間後には非実質細胞に有意にシフトしていた。

## SDF-1発現細胞の変化

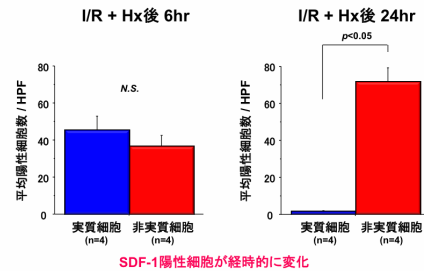
- 70%肝切除+15min虚血再灌流傷害モデル -



抗 SDF-1 抗体(ab25117) abcam®

## SDF-1発現細胞経時的推移

- 70%肝切除+15min虚血再灌流傷害モデル -

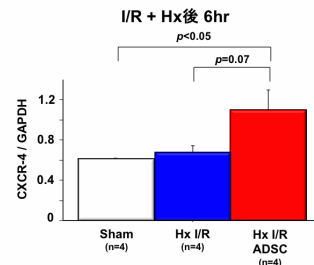


SDF-1陽性細胞が経時的に変化

CXCR4 mRNA 発現は Sham 群、15min I/R+70%Hx 群と比較して 15min I/R+70%Hx+ADRC 群で有意に上昇していることを確認した。

## 残肝CXCR-4発現

- 70%肝切除+15min虚血再灌流傷害モデル -



CXCR-4を発現したADRCの残肝Homingの可能性

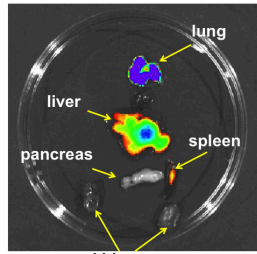
これは肝傷害そのものにより SDF1 が発現し、肝内に Homing した ADRC が接着因子である CXCR4 を発現していることが予想され、ADRC の Homing 効果には SDF-1/CXCR4 axis (ADRC の CXCR4 と肝内 SDF1) が強く関与していることが示唆された。さらに肝再生過程において Homing するターゲット細胞に変化が生じることを示唆している。

## 膵島傷害 (糖尿病) モデル

streptozotocin (STZ) による糖尿病モデルマウスに STZ 投与 5 日後、ADRC は、傷害膵ではなく肝内に ADRC の強い集積を認めた。さらに傷害膵に SDF-1 局所投与によっても同様の結果であった。このことは、SDF-1/CXCR4 axis の肝特異的 homing 機構によるものが示唆された。

## ADRCのHoming効果

- Streptozotocin誘導膵島傷害モデル -



ADRCは膵臓ではなく、肺・肝に集積

今後、ADRC の homing 効果・SDF-1/CXCR4 axis の臓器特異性についても検討を加える必要があると思われる。

### 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 13 件)

1. Enkhbold C, Morine Y, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, Arakawa Y, Saito Y, Yamada S, Ishikawa D, Shimada M. Dysfunction of liver regeneration in aged liver after partial hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1111/jgh.12930. 2015 in press. 査読有
2. Shimada M, Morine Y, Nagano H, Hatano E, Kaiho T, Miyazaki M, Kono T, Kamiyama T, Morita S, Sakamoto J, Kusano M, Saji S, Kanematsu T, Kitajima M. Effect of TU-100, a traditional Japanese medicine, administered after hepatic resection in patients with liver cancer: a multi-center, phase III trial (JFMC40-1001). *Int J Clin Oncol*. 2015;20(1):95-104. doi: 10.1007/s10147-014-0678-2. 査読有
3. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Takasu C. Homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014;21(12):873-880. doi: 10.1002/jhbp.147. 査読有
4. Asanoma M, Ikemoto T, Mori H, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Shimada M. Cytokine expression in spleen affects progression of liver cirrhosis through liver-spleen cross-talk. *Hepatol Res*. 2014;44(12):1217-1223. doi: 10.1111/hepr.12267. 査読有
5. Zhu C, Ikemoto T, Utsunomiya T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Arakawa Y, Takasu C, Ishikawa D, Shimada M. Senescence-related genes possibly responsible for poor liver regeneration after hepatectomy in elderly patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(15):1102-1108. doi: 10.1111/jgh.12468. 査読有
6. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Saito Y, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S. Trophic effect of adipose tissue-derived stem cells on porcine islet cells. *J Surg Res*. 2014;187(2):667-672. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.031. 査読有
7. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y. CXC receptor 4 and stromal cell-derived factor 1 in primary tumors and liver metastases of colorectal cancer. *J Surg Res*. 2014;187(1):107-112. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.030. 査読有
8. Saito Y, Mori H, Takasu C, Komatsu M, Hanaoka J, Yamada S, Asanoma M, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Shimada M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol*. 2014;49(4):692-701. doi: 10.1007/s00535-013-0799-9. 査読有
9. Arakawa Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Takasu C. Effects of splenectomy on hepatic gene expression profiles after massive hepatectomy in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(10):1669-1677. doi: 10.1111/jgh.12316. 査読有
10. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M. The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res*. 2013;180(1):162-168. doi: 10.1016/j.jss.2012.10.009. 査読有
11. Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H. Significance of sonic hedgehog signaling after massive hepatectomy in a rat. *Surg Today*. 2013;43(3):300-307. doi: 10.1007/s00595-012-0248-z. 査読有
12. Mori H, Shimada M, Ikegami T, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Hanaoka J, Iwahashi S, Saito Y, Asanoma M, Yamada S, Miyake H. The impact of pegylated-interferon  $\alpha$ -2b on partial and massive hepatectomy model in rats. *Hepatogastroenterology*. 2012;59(119):2300-2304. doi: 10.5754/hge10401. 査読有
13. Kanamoto M, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J. Impact of a new refrigerator on the preservation of hepatic grafts. *Hepatol Res*. 2012;42(8):798-805. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00987.x. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. Arakawa Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Kanamoto M, Higashijima J, Takasu C. The Impact of Endoplasmic Reticulum Stress in Non-Tumor Tissue on Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *American college of Surgery(ACS2014)*2014年10月26-30日 Moscone Center(アメリカ サンフランシスコ)
2. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S. Usefulness of 3D-virtual hepatectomy and intraoperative navigation system in liver resection. **第28回国際コンピュータ支援放射線医学・外科学会( CARS )**2014年6月25日-28日福岡国際会議場(福岡県福岡市)
3. Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y, Takasu C, Yamada S. Recent Advancements in Liver Surgery: Assessment of Functional Reserve, Simulation and Navigation. *International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists 2013 (IASGO)*2013年9月18日-21日 The Palace of the Parliament(ルーマニア ブカレスト)
4. Arakawa Y, Shimada M, Ishikawa D, Yamada S, Saito Y, Takasu C, Iwahashi S, Kanamoto M, Mori H, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Utsunomiya T, Sato H, Miyake H. The gene profile in the spleen under rat small-for-size graft model using cDNA microarray and pathway analysis. *The 13th Congress of the Asian Society Of Transplantation 2013 (CAST)* 2013年9月2日-6日 国立京都国際会館(京都府京都市)
5. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Takasu C. The homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: The shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. *The 13th Congress of the Asian Society Of Transplantation 2013 (CAST)* 2013年9月2日-6日 国立京都国際会館(京都府京都市)
6. Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S. Successful management of liver transplant recipient with strongly positive donor-specific antibody against human leukocyte antigen. *International Surgical Week 2013 (SW2013)*2013年8月25日-29日 Helsinki Exhibition and Convention Centre(フィンランド ヘルシンキ)
7. Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Hanaoka J, T Miyatani T, Saito Y, Yamada S, Enkhbold Chinbold. One-Stop Shopping for 3-Dimensional

Anatomy of Hepatic Vasculature and Bile Duct with a Special Reference to Biliary Image Reconstruction. *American College Of Surgeons Annual Clinical Congress (ACS)*2012年9月30日-10月4日 McCormick Place (アメリカ シカゴ)

8. Ikemoto T, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Hanaoka J, Miyatani T, Kanamoto M. Impact of human adipose tissue derived regenerative cell for cryopreserved porcine islets. *10<sup>th</sup> World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (IHPBA)*2012年7月1日-5日 Paris des Congres(フランス パリ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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・大学院ヘルパイクライネス研究部・教授  
研究者番号: 10216070

##### (2)研究分担者

森根 裕二 (MORINE, Yuji)  
徳島大学・大学院ヘルパイクライネス研究部・講師  
研究者番号: 60398021

居村 暁 (IMURA, Satoru)  
徳島大学・病院・特任教授  
研究者番号: 90380021

宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA, Toru)  
徳島大学・大学院ヘルパイクライネス研究部・准講師  
研究者番号: 30304801