

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18808

研究課題名(和文) 犬脂肪由来幹細胞が肝星細胞を中心とした肝細胞癌の腫瘍微小環境に与える効果の解析

研究課題名(英文) The effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on tumor microenvironment of hepatic carcinoma

研究代表者

手嶋 隆洋 (TESHIMA, TAKAHIRO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：80610708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究から、犬の脂肪由来幹細胞(ASCs)は肝星細胞(HSC)の活性化や増殖を促進することが明らかとなった。また、ASCsの培養上清のみを添加した環境下においても同様の変化がみられたことから、ASCsの分泌する液性因子がHSCの変化を誘引していると考えられた。また、犬肝細胞癌細胞の増殖能や浸潤能も犬ASCsの液性因子によってup-regulateするだけでなく、腫瘍形成にかかわる因子の発現量にも増加がみられたことから、犬ASCsは肝細胞癌の増殖や浸潤を促進することが示唆された。本研究の結果より、犬ASCsは肝細胞癌の微小環境も含めて、腫瘍形成を促進すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that the activation and differentiation of hepatic stellate cells were facilitated by the canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. These alterations could be induced by the soluble factor secreted from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. The differentiation and invasion abilities of canine hepatic carcinoma cells also were up-regulated by soluble factor secreted from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Moreover, mRNA expression levels of factors related to the tumor development were significantly higher in canine hepatic carcinoma cells co-cultured with soluble factor secreted from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.

These findings suggest that soluble factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote the proliferation and invasion of canine hepatocellular carcinoma cells including tumor microenvironment.

研究分野：獣医学

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞 肝細胞癌 肝星細胞 犬

### 1. 研究開始当初の背景

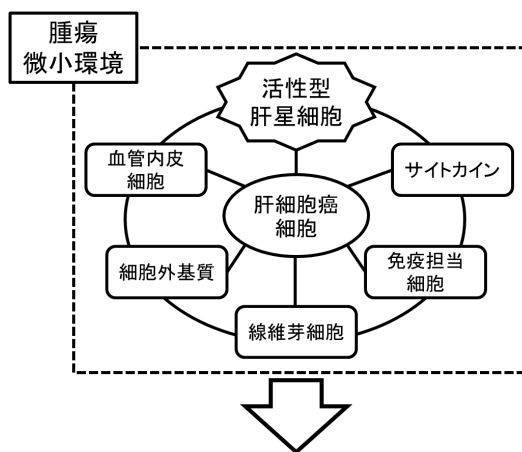
肝細胞癌に対する新たな治療戦略として、脂肪由来幹細胞 (ASCs) のもつ再生効果や抗腫瘍効果の応用が、獣医学分野に限らずヒト医学分野においても注目されている。しかし、ASCs が癌細胞に与える効果や、肝細胞癌を取り囲む微小環境へ与える影響に関しては十分に解明されていない。

これまでに ASCs を利用した肝細胞癌の治療報告は数報あるものの、肝細胞癌の増殖を促進したとする結果もあることから、肝細胞癌の治療への ASCs の応用は賛否両論の意見が出されている。

そのため、肝細胞癌に対する ASCs の治療効果を解析するためには、腫瘍細胞に与える効果だけではなく微小環境への影響も解明する必要があると考えた。そこで、犬の ASCs が肝細胞癌の微小環境形成に与える影響を明らかにするために、微小環境の重要なファクターである肝星細胞(HSC) を中心に捉えた研究を計画した。

### 2. 研究の目的

肝細胞癌の微小環境形成に重要な働きをもつ HSC を本研究のターゲットとして、犬 ASCs が HSC も含めた微小環境の形成に与える効果だけではなく、ASCs による影響を受けた HSC が微小環境に及ぼす作用も含めて解明すること、犬 ASCs が肝細胞癌細胞に与える影響を解明することを本研究の目的とした。



- ・腫瘍の増殖
- ・免疫回避
- ・抵抗性の増大
- ・遠隔転移

### 3. 研究の方法

(1) 犬 ASCs が腫瘍微小環境の形成にかかわる HSC の機能に対して与える効果の解析

- a. HSC の活性化に対する効果
- b. HSC の増殖に与える影響の解析

(2) 犬 ASCs が微小環境の血管新生に与える影響

- a. 血管内皮細胞の血管形成能に与える効果の解析

(3) 犬 ASCs が肝細胞癌細胞に与える影響の解析

- a. 増殖能と浸潤能の変化
- b. 腫瘍形成に

### 4. 研究成果

(1) 犬 ASCs が腫瘍微小環境の形成にかかわる HSC の機能に対して与える効果の解析

HSC と犬 ASCs とを共培養した結果、HSC の増殖能(MTT アッセイ)および活性化(-SMA の発現程度)は有意に増加することが確認された。また、これらの変化は HSC に犬 ASCs の培養上清を添加した環境下においても確認された。

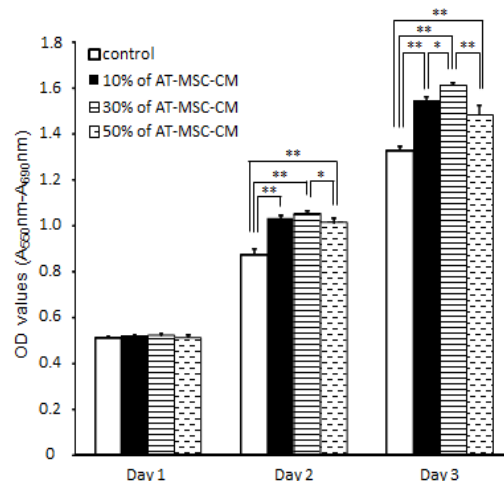
(2) 犬 ASCs が微小環境の血管新生や免疫機能に与える影響

犬の肺より分離した血管内皮細胞と犬 ASCs を共培養した結果、マトリックスゲルによるチューブ形成能は上昇することが確認された。また、これらの変化は HSC に犬 ASCs の培養上清を添加した環境下においても確認された。

(3) 犬 ASCs が肝細胞癌細胞に与える影響の解析

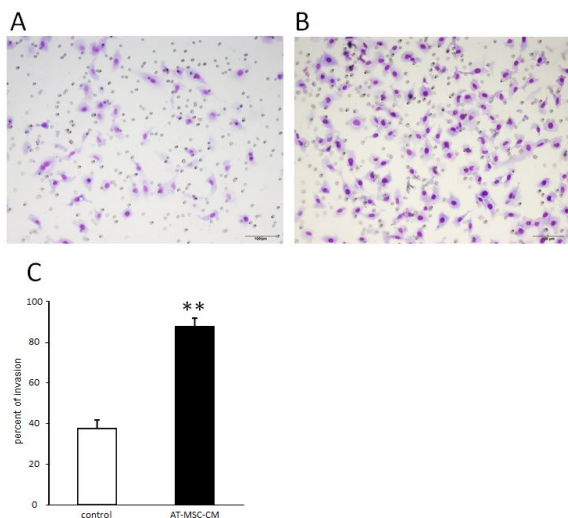
犬 ASCs の培養上清を添加した環境下では、犬肝細胞癌細胞の増殖能および浸潤能に有意な増加が認められた。

MTT assay の結果

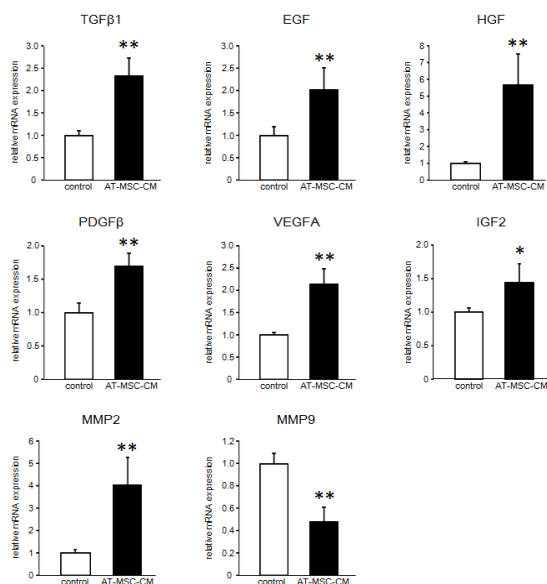


Cell invasion assay の結果

A : 犬 ASCs 培養上清添加なし, B : 犬 ASCs 培養上清添加あり, C : 浸潤度の比較



また、犬 ASCs の培養上清を含む環境下では腫瘍増殖に関連した因子の発現量に増加がみられた。



本研究の結果より、犬 ASCs は微小環境の重要な構成要素である HSC の活性化や増殖を促進する作用を持つ可能性が示唆された。

また、肝細胞癌細胞自体の増殖能や浸潤能および腫瘍形成を促進する因子の発現を up-regulate することが確認された。

そのため、犬 ASCs は肝細胞癌の増殖能および浸潤能を促進するだけでなく、腫瘍を取り巻く微小環境も腫瘍の成長を促進する方向へと支持する作用があると考えられる。

現在、獣医学分野に限らずヒト医学分野に

おいても、様々な疾患に対する脂肪由来幹細胞の治療効果が検討され、臨床応用への展開が期待されている。しかし、犬の肝細胞癌を対象とした本研究結果より、ASCs の抗腫瘍効果については、更なる検討を行う必要があると考えられる。

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 2 件)

Teshima T, Matsumoto H, Michishita M, Matsuoka A, Shiba M, Nagashima T, Koyama H. Allogenic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Acute Hepatic Injury in Dogs. Stem Cells Int. 2017;2017:3892514.

Teshima T, Matsumoto H, Koyama H. Soluble factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote canine hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion. PLoS One. 2018 Jan 18;13(1):e0191539.

〔学会発表〕(計 1 件)

手嶋隆洋, 内山莉音, 松本浩毅, 小山秀一 犬の急性肝障害モデルに対する他家脂肪由来間葉系幹細胞の効果について 第 13 回 日本獣医内科学アカデミー学術大会 2017 年

〔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

手嶋 隆洋 (TESHIMA TAKAHIRO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：80610708