

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590740

研究課題名（和文） 肝細胞癌由来癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走における脂肪組織の役割とその制御機構

研究課題名（英文） The regulation mechanism of adipose tissue in survival, proliferation, differentiation and migration of hepatocellular carcinoma-derived cancer stem cells

研究代表者

西島（松延） 亜紀（NISHIJIMA-MATSUNOBU AKI）

佐賀大学・医学部・医員

研究者番号：40566105

研究成果の概要（和文）： 肝癌幹細胞は、脂肪組織存在下では、増殖が抑制される傾向にあり、アポトーシスに変化は見られなかった。遊走に関しては内臓脂肪組織と皮下脂肪組織が与える影響は異なっていたが、蛋白レベルでは有意差は認められなかった。癌幹細胞と脂肪組織が接触/非接触状態で異なる動態を示す可能性があった。また、脂肪組織が産生するアディポカインは皮下/内臓脂肪組織で異なっていたが、癌幹細胞の有無により産生量に変化は見られなかった。

研究成果の概要（英文）： Adipose tissue inhibited the proliferation of hepatocellular carcinoma-derived cancer stem cells (CSCs) and did not affect apoptosis. The effect between subcutaneous and visceral adipose tissue about the migration is controversial immunohistochemically, but there is no significant difference in the expression of migration-related molecules. Adipokine production levels differ between subcutaneous and visceral adipose tissue, but the production level is not different with or without CSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：医学、病理学、肝臓病学

キーワード：肝癌幹細胞、脂肪組織、癌幹細胞-間質細胞相互作用

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は、癌細胞を産生し、腫瘍の形成・維持・進展に必須である。2006年、肝細胞癌の癌幹細胞（CD133陽性）が同定され、我々も肝細胞癌組織より、CD133陽性癌幹細胞の単離に成功した。しかし、その細胞動態の詳細は不明である。

一方、C型慢性肝炎や非アルコール性脂肪性

肝炎（NASH）においては、全身の脂肪組織が病的に増加した肥満者に肝細胞癌の発生率が高い。さらに肥満はNASHの肝細胞癌根治的治療後の再発に関する独立危険因子であることが判明した。それ故に、肝細胞癌組織に存在する癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走にも、脂肪組織が活発に影響を与えていると推測されるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、肝細胞癌由来癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走、即ち、その未分化性の維持、自己複製、癌細胞産生、浸潤・転移巣形成における脂肪組織の役割とその制御機構を、培養系と移植実験系を用いて解明する。本研究により、肝細胞癌の癌幹細胞標的療法の開発が期待できる。

3. 研究の方法

癌幹細胞-脂肪組織相互作用を癌幹細胞と脂肪組織片との混合培養系で、組織化学、免疫組織化学、collagen gel invasion assay、ボイデンチャンバー、FACS、PCR、Western blotを用いて解析し、脂肪組織が癌幹細胞の生存・増殖・未分化性・自己複製・癌細胞産生・遊走・浸潤能に与える影響を解明する。

1) 材料：

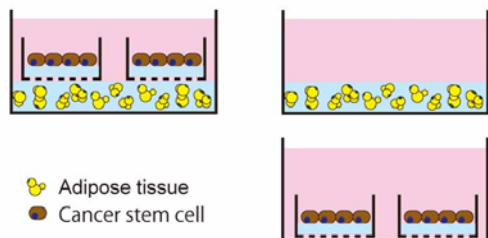
- ① 癌細胞：ヒト肝癌細胞株、およびヒト肝細胞癌組織（学内倫理委員会の許可症例）より単離した肝細胞癌由来癌幹細胞を用いる。
- ② 脂肪細胞：ラットの皮下/内臓脂肪組織、およびヒトの皮下/内臓脂肪組織を用いる（ヒトは学内倫理委員会の許可症例で、肝疾患以外の手術例より採取）。

2) 培養システム：

collagen gel invasion assay systemを用いる（図）。

まず、底面がニトロセルロース膜からなる内皿に、0.5mmに細切した脂肪組織片0.5mlを、5mlのI型コラーゲンゲル内に包埋し、1日間培養する。そのゲル上に肝細胞癌由来癌幹細胞（30万個）を播種し培養する。コントロールは、脂肪組織片単独、癌幹細胞単独培養である。

collagen gel invasion assay system



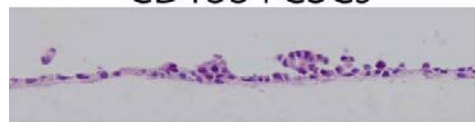
4. 研究成果

HepG2肝癌細胞株を用いて、CD133陽性細胞をマイクロビーズ法により単離し、肝癌幹細胞

と同一化した。ラット脂肪組織を、皮下脂肪組織（SAT）、内臓脂肪組織（VAT）[大網、腸間膜]より採取し、細切したのち得られた脂肪組織片をコラーゲンゲルに包埋し、3次元培養を行った。コラーゲンゲル上に、CD133陽性HepG2肝癌幹細胞を30万個ずつ播種し、脂肪組織片の共培養群と、単独培養群を作製し比較検討した。

単独培養群において、培養開始後は、CD133陽性癌幹細胞はCD133陰性細胞よりも増殖が遅く、一週間の培養でほぼ同程度となる。一方、脂肪組織との共培養群では、CD133陽性癌幹細胞の方がCD133陰性細胞よりもより強く増殖が抑制された。明らかなゲル内への浸潤像はいずれの培養群でも認められなかった。

CD133+CSCs



CD133+CSCs with VAT



CD133+CSCs with SAT



免疫組織化学的検討では、EカドヘリンはCD133陽性癌幹細胞/陰性細胞の単独培養群でいずれも部分的に発現を認めていたが、脂肪組織との共培養では発現が減弱する傾向にあった。FilaminAは、CD133陽性癌幹細胞/陰性細胞の単独培養では同程度に発現していた。CD133陽性癌幹細胞に関しては、VATとの共培養では発現が軽度抑制され、SATとの共培養で発現が亢進していた。一方CD133陰性細胞に関しては、VATとの共培養で発現は変わらず、SATとの共培養で発現が軽度減弱していた。

Cleaved caspase-3でアポトーシスを検討したが、発現はほとんど認められなかった。

すなわち、形態学的、免疫組織化学的検討では、CD133陽性癌幹細胞は、ラット脂肪組織により増殖が抑制される傾向にあり、アポトーシスに変化は見られなかった。遊走に関してはVATとSATにおける動態に相違が認められた。しかしWestern blotでは、遊走に関連す

る蛋白質であるFilaminA, Laminin-5, Eカドヘリンの発現に有意差は認められなかった。これは、癌幹細胞と脂肪組織の接触/非接触条件下による差異の可能性が示唆され、さらなる検討が必要と考える。

また、培養上清中のadipokineを測定したところ、SATに比しVATでadiponectinが多く、leptin, resistinが少なく産生されていた。しかしCD133陽性癌幹細胞/陰性細胞との共培養によって変化は認められなかった。すなわち、癌幹細胞は脂肪組織のアディポカイン産生に影響しないと考えられた。

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 11 件)

(1) Nishijima-Matsunobu A, Uchihashi K, Aoki S, Ootani A, Node K, Toda S. Three-dimensional culture model for analyzing crosstalk between adipose tissue and hepatocytes. *Cell Tissue Res* 査読有 2013, 352, 611-612

(2) Aoki S, Udo K, Morimoto H, Ikeda S, Takezawa T, Uchihashi K., Nishijima-Matsunobu A, Noguchi M, Toda S. Adipose tissue behavior is distinctly regulated by neighboring cells and fluid flow stress: a possible role of adipose tissue in peritoneal fibrosis. *Journal of Artificial Organs* 査読有 2013, in press

(3) Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Ootani A, Node K, Toda S. Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: A novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone* 査読有 2013, 52 (1), 102-110

(4) Nomoto-Kojima N, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Koike E, et. al. Interaction between adipose tissue stromal cells and gastric cancer cells in vitro. *Cell Tissue Res* 査読有 2011, 344, 287-298

(5) Anan M, Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Ootani A, Node K, Toda S. A promising culture model for analyzing the interaction between adipose tissue and cardiomyocytes. *Endocrinology* 査読有 2011, 152 (4), 1599-1605

(6) Udo K, Aoki S, Uchihashi K, Kawasaki M, Matsunobu A, Tokuda Y, Ootani A, Toda S, Uozumi J. Adipose tissue explants and MDCK cells reciprocally regulate their morphogenesis in coculture. *Kidney Int* 査読有 2010, 78, 60-68

(7) Yee CH, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A,

Yamasaki F, et.al. The air liquid-interface, a skin microenvironment, promotes growth of melanoma cells, but not their apoptosis and invasion, through activation of mitogen-activated protein kinase. *Acta Histochem Cytochem* 査読有 2010, 43, 1-7

(8) 戸田修二、松延亜紀、内橋和芳、山本美保子、薬師寺舞、他4名. 脂肪組織と脂肪細胞の基礎形態学臨床検査 査読無 2011, 55 (6), 581-586

(9)松延亜紀、藤本一眞、戸田修二. 脂肪組織を基盤とした生体恒常性・メタボリックシンドローム病態解析モデル. 臨床検査 査読無 2011, 55 (6), 533-538

(10) 戸田修二、青木茂久、内橋和芳、松延亜紀、他5名. メタボリック症候群における脂肪組織の病理形態と病態解析培養モデル. 病理と臨床 査読無 2010, 28 (9), 959-965

(11) Aoki S, Kitajima Y, Takezawa T, Uchihashi K, Matsunobu A, et. al. Epidermal regeneration by keratinocyte-alien mesenchymal cell interactions. *Inflammation and Regeneration*, 査読無, 2010, 30 (5), 428-433

[学会発表] (計 5 件)

(1) 松延 亜紀, 脂肪組織 - 肝細胞相互作用解析モデルの確立, 日本内分泌病理学会学術総会, 2012年10月12日, 仙台長陵会館

(2) 松延 亜紀, 内臓脂肪組織は肝細胞に脂肪毒性を誘導する, 日本病理学会総会 2012年4月27日, 京王プラザホテル

(3) 松延 亜紀, 脂肪組織が、肝細胞の生存・増殖・分化に及ぼす影響とその制御機構の解明, 日本内分泌学会学術総会, 2012年4月21日, 名古屋国際会議場

(4) 松延 亜紀, 脂肪組織由来間質細胞は胃癌の直接促進因子であり、分子標的療法の阻害因子である, 日本消化管学会総会 2012年2月10日, 仙台国際センター

(5) Matsunobu A, Uchihashi K, Aoki S, Toda S. A novel model for analyzing the interaction between adipose tissue and hepatocytes. 4th International Congress on PREDIABATES and the METABOLIC SYNDROME. 2011, 4, 9. Spain, Madrid.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西島 (松延) 亜紀 (NISHIJIMA-MATSUNOBU AKI)

佐賀大学・医学部・医員
研究者番号：40566105

(2)研究分担者

戸田 修二 (TODA SHUJI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80188755