

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19898

研究課題名(和文) 化学療法後の肝類洞閉塞症候群の分子機構解明と抗VEGF抗体療法の有効性の解析

研究課題名(英文) Clarification the molecular mechanism of chemotherapy-related sinusoidal obstructive syndrome and the study for efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy.

研究代表者

黒木 秀幸 (KUROKI, Hideyuki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50594876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、化学療法後の肝類洞閉塞症候群(SOS)の発症とTSP-1の発現との関係及び抗VEGF抗体のSOS予防効果を明らかにすることである。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の増殖に、TSP-1が関与していたが、oxaliplatinをHUVECに投与してもTSP-1の発現が誘導されなかった。oxaliplatin単独またはoxaliplatin+bevacizumabによる化学療法後の大腸癌肝転移切除標本でTSP-1の免疫染色を行ったが、両群ともTSP-1の発現率に有意差を認めなかった。SOSの発症とTSP-1の発現は関係性が低い可能性がある。

研究成果の概要(英文)：TSP-1 was involved in the proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). However, when oxaliplatin was administered to HUVEC, expression of TSP-1 was not induced. In immunostaining of TSP-1 in specimen of colorectal cancer liver metastases receiving oxaliplatin with or without bevacizumab, there was no significant difference in the expression of TSP-1 between the two groups. The possibility that the expression of TSP-1 is involved in development of SOS is low.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：大腸癌肝転移 肝類洞閉塞症候群 oxaliplatin Thrombospondin-1 (TSP-1) bevacizumab

1. 研究開始当初の背景

我が国における大腸癌罹患患者数は増加しているが、集学的治療によりその治療成績は向上している。大腸癌の転移、再発形式として最も多いのが肝転移であるが、化学療法を行うことによって肝転移巣を縮小させた後、根治切除することができる症例もある。大腸癌に対して用いられる FOLFOX 療法、FOLFIRI 療法は有効な化学療法であるが、Oxaliplatin を含む化学療法は SOS (sinusoidal obstructive syndrome) を来すことが知られ、SOS は肝切除手術に伴う合併症を増加させることが報告されている。近年、抗 VEGF 抗体である Bevacizumab が SOS を軽減させることが報告されるが、その分子メカニズムに関しては不明な点が多い。

1) Oxaliplatin による SOS と肝障害

Oxaliplatin をベースとした化学療法による SOS の病理学的な特徴としては肝類洞の拡張、肝細胞の萎縮、肝類洞周囲の線維化、再生結節などが知られている。SOS は肝切除後の肝不全による術後合併症のリスク因子として知られ、SOS を予防することが予後改善につながることを期待される。

2) 肝再生における TGF- β -Smad シグナルの解析

我々は肝切除による肝障害が ROS (reactive oxygen species) を産生させ肝類洞内皮細胞から Thrombospondin-1 (TSP-1) を誘導することにより、TGF- β -Smad シグナルを活性化することで肝再生を負に制御していることを明らかにした (Hepatology, 2012)。肝切除後には活性酸素が産生され、障害を受けた肝類洞内皮細胞で TSP-1 が産生される。この TSP-1 は細胞外マトリックスに貯蔵された TGF- β を活性化し、TGF- β 受容体への結合を可能にし、リン酸化された Smad2 (pSmad2) は核内に移行して肝細胞の増殖抑制もしくは細胞死を誘導する。野生型マウスと比較して TSP-1 ノックアウトマウスでは術後 6-12 時間での Smad2 のリン酸化が抑制され、術後 24 時間後の BrdU の核内取り込みの増加を認め、TUNEL 陽性細胞も減少した。すなわち、TSP-1 を介した TGF- β -Smad シグナルは肝細胞に対して、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導していると考えられる。

以上の知見より、TSP-1 は肝障害によって

誘導され、肝細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導されているが、化学療法によっても肝類洞内皮細胞から TSP-1 分泌が誘導され、TGF- β -Smad シグナルを活性化することで SOS に関与していることが予想される。

2. 研究の目的

化学療法後の SOS には TSP-1 を介した TGF- β -Smad シグナルの活性化が関与しているという仮説に基づいて、SOS の分子機構を明らかにするとともに抗 VEGF 抗体の SOS 予防効果を明らかにすることが本研究の目的である。Oxaliplatin をベースとした化学療法による SOS 誘導の分子機構は不明であり、本研究は化学療法による SOS が肝類洞内皮細胞から TSP-1 を誘導し、さらに抗 VEGF 抗体で TSP-1 の誘導が抑制されることにより、SOS を軽減することで肝再生を促すという生物学的意義を明らかにする意義深いものである。

3. 研究の方法

野生型マウス (C57BL/6J) に Oxaliplatin、5-FU、leucovorin を投与し、SOS モデルマウスを作成する。さらにこの SOS モデルマウスに 70%肝切除術を行う。一方で、SOS モデルマウスに抗 VEGF 抗体を投与し、これに対しても 70%肝切除術を行う。この 2 つの群に対して、肝切除前後における組織学的な変化、TSP-1 と TGF- β -Smad シグナルの変化、肝再生能、アポトーシスに関して比較を行う。

In vitro の実験においては、肝類洞内皮細胞と類似した性質を持つヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に Oxaliplatin、5-FU、leucovorin を投与し、TSP-1 の発現意義を明らかにする。

4. 研究成果

HUVEC を用いた細胞増殖アッセイでは、TSP-1 を si RNA で knock down すると HUVEC の増殖が促進され、逆に過剰発現させると HUVEC の増殖が抑制されることが確認され、HUVEC の増殖に TSP-1 の関与が示唆された。しかし HUVEC に Oxaliplatin (10 μ M、50 μ M、100 μ M) を投与し、TSP-1 の発現の有無を Western blotting 法及び real time PCR 法で確認したが、TSP-1 の発現は誘導されなかった。

oxaliplatin 単独 (38 症例) または oxaliplatin+bevacizumab (27 症例) による化学療法後の大腸癌肝転移切除標本に対する TSP-1(Thermo Fisher Scientific, USA) の免疫染色では、Oxaliplatin 単独群で 21% (8/38) Oxaliplatin+bevacizumab 併用群で 15% (4/27) に TSP-1 の発現を認めたと、両群間の TSP-1 の発現率に統計学的有意差を認めなかった。

Oxaliplatin による刺激では HUVEC の TSP-1 の発現が誘導されず、臨床検体による検討でも Oxaliplatin 投与と TSP-1 の発現に相関がみられないことから、SOS の発症機序に血管内皮細胞の TSP-1 の発現は関係性が低いことが示唆された。

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 4 件)

- 1) Hayashi H, Kuroki H, Higashi T, Takeyama H, Yokoyama N, Okabe H, Nitta H, Beppu T, Takamori H, Baba H. Thrombospondin-1 expression may be implicated in liver atrophic mechanism due to obstructed portal venous flow. *Hepatol Res*. 2016 Aug 18. DOI: 10.1111/hepr.12792. 査読有
- 2) Kuroki H, Hayashi H, Nakagawa S, Sakamoto K, Higashi T, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H. Effect of LSKL peptide on thrombospondin 1-mediated transforming growth factor signal activation and liver regeneration after hepatectomy in an experimental model. *Br J Surg*. 2015 Jun;102(7):813-25. DOI: 10.1002/bjs.9765. 査読有
- 3) Arima K, Okabe H, Hashimoto D, Chikamoto A, Kuroki H, Taki K, Kaida T, Higashi T, Nitta H, Komohara Y, Beppu T, Takeya M, Baba H. The Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Malignant Potential in

Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms.

J Gastrointest Surg. 2015

19(12):2171-7.

DOI: 10.1007/s11605-015-2973-2.

査読有

- 4) Hayashi H, Higashi T, Yokoyama N, Kaida T, Sakamoto K, Fukushima Y, Ishimoto T, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Oki E, Beppu T, Baba H. An Imbalance in TAZ and YAP Expression in Hepatocellular Carcinoma Confers Cancer Stem Cell-like Behaviors Contributing to Disease Progression. *Cancer Res*. 2015 Nov 15;75(22):4985-97. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0291. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 黒木 秀幸
「血中 TSP-1 は肝切除後の肝障害および肝機能を予測する因子として有用である」
第 72 回日本消化器外科学会総会、2017 年 7 月 20-22 日、石川県立音楽堂 (石川県)
- 2) 林 洋光、黒木 秀幸、東 孝暁、武山 秀晶、岡部 弘尚、今井 克憲、山下 洋市、高森 啓史、馬場 秀夫
「肝再生および肝萎縮におけるトロノポスポンディン 1 の役割解明と臨床応用への探索」
第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年 4 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
発表確定
- 3) 古閑 悠樹、別府 透、今井 克憲、新田 英利、甲斐田 剛圭、中川 茂樹、藏元 一崇、宮村 俊一、橋本 大輔、山下 洋市、近本 亮、石河 隆敏、山中 剛、馬場 秀夫
「冠動脈化学塞栓療法と門脈結紮術で臨床的 CR となった進行肝細胞癌の経験」
第 182 回熊本外科集談会例会、2016 年 10 月 15 日、熊本大学医学総合研究棟 (熊本県)
- 4) 黒木 秀幸、林 洋光、中川 茂樹、東 孝暁、橋本 大輔、新田 英利、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫
「肝切除後の血漿中 Thrombospondin-1

変化の肝障害の予測因子としての可能性」

第 116 回日本外科学会定期学術集会、
2016 年 4 月 16 日、大阪国際会議場（大阪府）

- 5) 有馬 浩太、岡部 弘尚、橋本 大輔、近本 亮、北野 雄希、山村 謙介、井上 梨沙、辻 顕、甲斐田 剛圭、高城 克暢、東 孝暁、黒木 秀幸、新田 英利、菰原 義弘、別府 透、竹屋 元裕、馬場 秀夫
「好中球リンパ球比は膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）の悪性化予測に有用である」

第 116 回日本外科学会定期学術集会、
2016 年 4 月 16 日、大阪国際会議場（大阪府）

- 6) 林 洋光、黒木 秀幸、馬場 秀夫
「cDNA マイクロアレイを用いた肝再生抑制因子トロンボスポンディン1の同定と阻害ペプチドを用いた肝再生促進療法」
第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 22 日、ホテル日航熊本（熊本県）

- 7) 黒木 秀幸、林 洋光、中川 茂樹、東 孝暁、橋本 大輔、新田 英利、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫
「肝切除術後早期における血漿中 Thrombospondin-1 の術後肝障害の予測因子としての可能性」
第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21 日、ホテル日航熊本（熊本県）

- 8) 黒木 秀幸、林 洋光、中川 茂樹、東 孝暁、橋本 大輔、新田 英利、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫
「TSP-1 を介した TGF-β 活性化機構抑制による肝切除術後の肝再生促進療法」
第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、
2015 年 6 月 12 日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA（東京都）

〔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

黒木 秀幸（KUROKI, Hideyuki）
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：50594876

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

林 洋光（HAYASHI, Hiromitsu）
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：80625773

東 孝暁（HIGASHI, Takaaki）
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：70594878）

中川 茂樹（NAKAGAWA, Shigeki）
熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：10594872

山村 謙介（YAMAMURA, Kensuke）
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師