

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05414

研究課題名(和文) プタプロテオミクスによる化学療法誘導性肝障害の病態解明と診断バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology of chemotherapy-induced liver injury by pig proteomics and development of diagnostic biomarkers

研究代表者

波多野 悦朗 (Hatano, Etsuro)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80359801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：12か月齢の雄性マイクロミニブタに対してFOLFOX療法を24週間施行した。FOLFOXの投与前後に血液検査を行い、経時的に開腹肝生検で肝障害を評価した。FOLFOX群3頭、生理食塩水投与のみを行ったsham群2頭の結果を比較し、病理所見でSOSに特異的な類洞の拡張や肝細胞索の狭小化を確認。電顕所見でも血管内皮細胞の脱落や類洞内の出血を認め、SOSと診断した。経時的なICG検査については、FOLFOX投与前のICG-K値は平均0.153であったが、sacrifice時は平均0.090と低下しており肝機能の悪化を認めた。FOLFOX群全例の病理所見でSOSの所見を認め、モデルの再現性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SOSは肝切除後の早期再発、術後合併症との関連が報告されており、大腸癌肝転移に対する集学的治療において大きな問題の一つである。本研究では、FOLFOXをヒトと同様の投与量・投与スケジュールで長期間に渡って投与することでSOSを発生させる慢性SOSモデルのため、よりヒトSOSの病態に近い結果を反映すると考えられる。このモデルを用いることで、SOSの予防に効果があると報告されている薬剤の至適投与量や至適投与方法を検証することが可能となる。また、SOSの予防効果がある薬剤がSOSを抑える機序を鑑みることで、最終的にはSOS発生のメカニズムが解明できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish an animal model of FOLFOX-induced SOS mimicking human SOS to further characterize the mechanism of SOS. Twelve-month-old male microminipigs were treated with FOLFOX regimen (n=3: FOLFOX group) or vehicle (n=2: Control group) for 12 times every other week. Blood test and liver biopsy by laparotomy was performed and the degree of hepatic injury on histopathology was evaluated using optical and electron microscopy. Pathological findings in FOLFOX group showed sinusoidal dilation and congestion, narrowing of hepatic cord and loss of sinusoidal endothelial cells. On electronic microscopical assessment, detachment of sinusoidal endothelial cell was observed with penetration of erythrocytes into the enlarged space of disse. We diagnosed all cases as SOS. Similar findings were found in all cases of the FOLFOX group, and we confirmed the reproducibility of the model.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：SOS FOLFOX バイオマーカー プタモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝転移は大腸癌の遠隔転移として最も頻度が高いが、完全切除が出来れば治癒が期待できる。診断時に切除不能と判断されても化学療法によって切除が可能となれば、肝切除後の生存率は当初から切除可能であった症例と遜色ないと報告されていることから (Lam VWT, Ann Surg Oncol 2012)、オキサリプラチンなどを用いた化学療法を施行後に肝切除を行う例が増加している。一方で、オキサリプラチンは sinusoidal obstruction syndrome (SOS) と呼ばれる特有の薬剤性肝障害を引き起こすことがある。SOS は肝切除後の早期再発 (Tamandl, Ann Surg Oncol.2011)、術後合併症 (Nakano, Ann Surg 2008) との関連が報告されており、大腸癌肝転移に対する集学的治療において大きな問題の一つである。肝転移が縮小して切除が可能と判断されても SOS による肝機能障害によって肝切除が不可能となることがあるため、早期に SOS が診断可能であれば肝切除を早期に実施したり化学療法剤を変更したりすることで、このような事態を避けることができる。

これまで動物モデルでは、ラット SOS モデルを用いて SOS のメカニズムが詳細に検討されている (DeLeve, Gastroenterology. 2002)(DeLeve, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003)。我々もラット SOS モデルを用いて SOS の発症メカニズムとその克服について複数の報告を行ってきた (Narita, Ann Surg. 2009)(Nakamura, J Hepatol. 2012)(Nakamura, Liver Int. 2014)(Okuno, J Surg Res. 2015)。しかしながら、ラット SOS モデルはピロリジンアルカロイドの一種であるモノクロタリンを投与することによって生じる急性 SOS モデルであり、オキサリプラチンに起因するヒト SOS とはメカニズムが異なる可能性がある。大腸癌肝転移に対する集学的治療においてオキサリプラチンによる SOS は、術後合併症の増加や肝機能障害による根治的肝切除不能など大きな問題である。しかしながら、ヒトを対象としてその発症メカニズムを組織標本を用いて経時的に評価することは不可能である。また、適切な動物モデルは未だ存在しない。そこで今回、ヒトに遺伝・解剖学的により近いブタを用いて SOS モデルを確立することを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、化学療法に起因する肝障害で、大腸癌肝転移に対する集学的治療において問題となる sinusoidal obstruction syndrome (SOS) のミニブタモデルを作成して、SOS の病態と発症メカニズムを明らかとし、そのバイオマーカーを同定することを目的とする。(マイクロミニブタにおけるオキサリプラチン誘導性 SOS モデルの確立) これまでにヒト SOS の病態と同一と考えられる動物モデルは存在しない。本研究ではヒトに遺伝・解剖学的に最も近いブタを用いてオキサリプラチン誘導性 SOS モデルを確立する。(SOS のバイオマーカーの検討) SOS の発症から進行までの各段階における肝臓ならびに血清プロテオミクス解析により、SOS のバイオマーカーを明らかにする。(ヒト SOS 標本における妥当性の検討) 大腸癌肝転移切除標本から、ブタモデルにおいて得られたバイオマーカーの妥当性を検討する。

3. 研究の方法

12 か月齢の雄性マイクロミニブタを富士マイクラ株式会社 (静岡) より購入する。ヒトで大腸癌に対して用いられている化学療法レジメン FOLFOX 療法 (oxaliplatin (L-OHP) + 5-FU + Leucovorin (I-LV)) の適切な投与量決定のために、まずは標準投与量、高用量、低用量の 3 つのグループおよび control 群に分けてそれぞれ 2 頭ずつ検討する。control 群 FOLFOX 標準投与量群 (L-OHP: 85 mg/m², I-LV: 200 mg/m², 5-FU 静注: 400 mg/m², 5-FU 持続静注 2400 mg/m²) FOLFOX 高用量群 (L-OHP: 120 mg/m², I-LV: 200mg/m², 5-FU 静注: 600mg /m², 5-FU 持続静注 3000 mg/m²) FOLFOX 低用量群 (L-OHP: 50 mg/m², I-LV: 200 mg/m², 5-FU 静注: 200 mg/ m², 5-FU 持続静注 1500 mg/m²)

FOLFOX 療法は 0 週から開始し、2 週間ごとに計 12 回の経静脈的投与を行う。control 群は同量の生理食塩水を投与する。評価項目: 適切に FOLFOX 療法によってオキサリプラチン誘導性 SOS モデルが形成されているかを確認する。(標本採取のタイミング) 2 週間ごとの薬剤投与の前後に血液検査を行い、0・4・8・12・18・24 週に開腹肝生検を行う。(血液検査) 肝障害: AST、ALT、 γ -GTP、総ビリルビン、ヒアルロン酸 凝固機能: 血小板、PT、aPTT、フィブリノゲン、AT (肝機能評価) マイクロミニブタの体重 1kg 当たり 0.5mg のインドシアニングリーンを投与して ICG 検査を行う。(肝生検組織学的検査) HE 染色において DeLeve らあるいは Rubbia-Brandt らの報告したスコアに基づいて SOS の評価を行う。透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いてさらに詳細な SOS の評価を行う。鍍銀染色により SOS による肝線維化の評価を行う。上記により SOS 発症を確認し、SOS モデルとして適切な FOLFOX 療法の投与量を確立する。

4. 研究成果

FOLFOX 標準容量群、高容量群ではともに FOLFOX 初回投与後 2 週間以内に死亡を確認 (各々 n=2) したため、薬剤毒性または嘔吐による高度の脱水で死亡したと判断し、低用量 (L-OHP: 42.5 mg/m²) での投与を行ったところ実験の継続が可能であったため、最終的に FOLFOX 投与を計 5 頭に行い、control 群として計 2 頭に生理食塩水の投与を行い、モデルの検証を行った。FOLFOX 投与群では 血中白濃度は平均 0.50 μ g/ml で経過し、血液検査は、AST:51.0 (37-85) U/L、ALT:47 (31-57) U/L、総ビリルビン値:0.14 (0.1-0.2)mg/dL、血小板数: 49.2 万 (15.8-91.7

万) / μ L、ヘモグロビン値: 7.6 (5.7-9.9) g/dL で経過し、投与開始時から犠死まで終始、大きな変動は認めなかった。ICG-K 値は、FOLFOX 初回投与前は平均 0.153 であったが、12 回投与後は平均 0.090 と低下しており、肝機能の悪化を認めた。8 週目の HE 染色による病理所見で SOS に特異的な類洞の拡張や肝細胞索の狭小化を確認し、電顕所見でも血管内皮細胞の脱落や類洞内の出血を認め、SOS と診断した (scoring: 6 点)。18 週以降の肝臓標本では肝細胞壊死を認め、SOS が経時的に進行していることを確認した (scoring: 9 点)。control 群では血液検査・病理所見とも著変なく経過しており、対照群としての成立も確認した (scoring: 0 点)。FOLFOX 投与群の全例で同様の所見を認め、再現性を確認した。24 週目の肝臓標本に対して行った鍍銀染色では細網線維の出現・増加を認め、HE 染色による病理所見でも中心静脈周囲の線維化を確認した。

研究目的の 1 つである SOS のバイオマーカー探索に関しては、現在解析中であり、研究予定期間を延長して継続する。

5 . 主な発表論文等

ESTABLISHMENT OF FOLFOX-INDUCED SINUSOIDAL OBSTRUCTION SYNDROME MODEL IN MICROMINIPIG ,
Toda R, Seo S, Uemoto Y, Nishino H, Nakamura N, Okuno M, Sato M, Iguchi K, Iwaisako K,
Taura K, Tsuruyama T, Kawaguchi H, Ikegawa M, Hatano E, Uemoto S, DDW 20190520

学会発表 和文

オキサリプラチン誘導性肝障害ブタモデルを使用した肝組織における金属元素の質量分析イメージング, 戸田 怜, 井口 公太, 中村 直彦, 瀬尾 智, 中川 貴之, 黒木 康生, 池川 雅哉, 上本 伸二, 第 6 6 回質量分析総合討論会 20180516

SOS の病態解明に向けた FOLFOX 誘導性マイクロミニブタ SOS モデルの確立, 戸田 怜, 瀬尾 智, 上本 裕介, 西野 裕人, 中村 直彦, 奥野 将之, 井口 公太, 佐藤 元彦, 祝迫 恵子, 田浦 康二郎, 鶴山 竜昭, 川口 博明, 池川 雅也, 波多野 悦朗, 上本 伸二, 第 119 回日本外科学会定期学術集会 20190419

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名: 上本伸二

ローマ字氏名: Shinji Uemoto

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 医学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 40252449

研究分担者氏名：池川雅哉
ローマ字氏名：Masaya Ikegawa
所属研究機関名：同志社大学
部局名：生命医科学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：60381943

研究分担者氏名：瀬尾 智
ローマ字氏名：Satoru Seo
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：70646546

研究分担者氏名：田浦康二郎
ローマ字氏名：Shinji Uemoto
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：80378629

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。