

令和元年6月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10582

研究課題名(和文)ALPPS手術による残肝容量増大メカニズムの解明

研究課題名(英文)Liver regeneration after associating liver partition and portal vein occlusion for staged hepatectomy

研究代表者

田中 邦哉(Tanaka, Kuniya)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：10295503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光肝転移ALPPSモデルを作製し、切除予定肝(DL)内、ならびに残存予定肝(FLR)内の転移巣を経時的に観察、測定した結果、門脈結紮群・ALPPS群はコントロール群と比較し、DL内では早期の転移増大はなく、晚期(Day9, 12)に有意に転移増大が生じた。一方、FLR内の転移巣の増大は、各群で有意差を認めなかった。また、DL、FLR内のgrowth factor, cytokineの変化は、TNF-、TGF-はDL、FLRにいずれにおいてもALPPS群で早期(Day1)に上昇していたが、HGFはFLRにおいてのみ、ALPPS群で有意に上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはALPPSの臨床データや臨床サンプルの組織像を詳細に検討し、ALPPS術後に急速に増大した残存予定肝細胞の未成熟性が術後肝不全の原因である可能性を指摘した。本研究により、ALPPS術後の固有の肝再生シグナル伝達経路はJak/STAT3が主経路であり、PDK1以下の経路をActivateすることにより、残存予定肝の機能的肝再生を促進できる可能性が示唆された。今後これらの知見を基盤としてさらなる検討を重ねることにより、ALPPSのMortalityを改善することが可能となり、大腸癌肝転移全体の治療成績の改善が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：A BALB/c mouse model (male, 8e10 weeks old) of liver metastasis labeled by red fluorescent protein was established. Changes in future liver remnant (FLR) volumes, tumor growth activity, and levels of cytokines and growth factors in liver tissues during the treatment period were compared among the models involving ALPPS, portal vein ligation (PVL), or sham operation. Results: The ratio of the FLR volume to body weight at 24 h after the procedure was greater for ALPPS than for PVL and sham operation. No differences in tumor progression in the FLR were observed at any time point after the procedures. Within the deportalized liver (DL), although tumor progression was observed during a later period after ALPPS (9 days postoperative) and PVL (12 days postoperative), no acceleration of tumor growth after ALPPS was observed in an early period similar to PVL.

Conclusion: ALPPS induces a rapid increase in FLR volume and avoids remnant tumor progression during the early postoperative period.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝再生 肝切除 転移性肝癌

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

1. 研究開始当初の背景

高度進行大腸癌肝転移例に対する新たな2期的切除の方法であるALPPS手術は、従来法と比較し、短期間で急速に残存予定肝容量を増大させることができ、2回目までの切除の完遂率はほぼ100%で非常に有望な新しい術式として全世界で注目されているが、10%を超える高いMortalityが問題であり、原因を究明し、改善していくことは必須である。申請者らは自験例の検討で、ALPPSで急速に増大した残存予定肝の機能はまだ未成熟で、形態的容量と乖離した機能的容量による残肝容量不足により生じる肝不全が主要原因の1つである可能性を示した。肝再生を制御する肝細胞内シグナル伝達経路にはJak/STAT3経路、PI3-K/Akt経路、MAPK経路などが存在するが、ALPPS初回術後の残存予定肝の再生では、細胞サイズが小さく、密度が高く、機能的に不十分であり、PDK1以下の経路が障害された再生パターンに近似していることから、ALPPS術後の肝再生固有のシグナル伝達経路はJak/STAT3が主経路と類推され、PDK1以下の経路をActivateすることにより、残存予定肝の機能的肝再生を促進できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ALPPS手術の早期残存予定肝容量増大の機序を「形態面」、「機能面」の両面から明らかにし、人為的介入により、ALPPS術後の残存予定肝の機能的肝再生促進の可能性を模索し、Mortalityを改善にすることである。

3. 研究の方法

(I) ラットALPPSモデルを用いた残存予定肝における肝再生シグナルの検討

(I-1) ラットALPPSモデルの樹立:

7-9週齢(220-400g)雄のSDラット(日本SLC)を使用し、ラットの中葉右側のみの門脈枝を温存した90%門脈結紮モデル、ならびにこのモデルの中葉に実質切離を加えて右と左に分離し中葉右側を残存予定肝(FLR)領域とした90%ALPPSモデルを作製・樹立する。以上のモデルを用い、ALPPS群、門脈結紮群、Control群(単開腹)の各群で、術後2, 6, 12, 24, 72, 120時間毎の残存予定肝(右中葉)容積を測定し(各5匹、各群計30匹)、形態的肝容量の経時的変化を比較する。

(I-2) ラットALPPSモデルにおける肝再生シグナルの検討:

各群のFLR組織からタンパク質を抽出し、Western Blottingにより肝再生シグナル(STAT3, pSTAT3, Akt, pAkt)の変化を観察する。

(I-3) ラットALPPSモデルにおける肝組織の変化に関する検討:

各群のFLR組織から切片を作製し、電子顕微鏡にて胞体内グリコーゲン顆粒、リポフスチン顆粒などの細胞内小器官の観察し、細胞の成熟度について評価する。

(II) ノードマウス肝転移モデルを用いたALPPS手術の腫瘍増殖への影響の検討

(II-1) 蛍光肝転移モデルの作製:

RFPで標識したヒト大腸癌細胞株(HCT116-RFP)をノードマウスの脾臓に注射し、多発転移性肝癌モデルを作製する。多発転移性肝癌モデルから肝腫瘍を摘出し、3mm角に細分したものを新規ノードマウスの左葉(LL)と中葉右側に移植する。

(II-2) 蛍光肝転移 ALPPS モデルにおける残存肝腫瘍の容量変化：

上記肝腫瘍を移植したマウスを1週間後に再開腹し、肝腫瘍が生着したのを確認後、マウス中葉左側と左葉 (LLL) の門脈枝を結紮した 50%門脈結紮モデル、ならびにこのモデルの中葉に実質切離を加えて右と左に分離し中葉右側を残存予定肝 (FLR) 領域とした 50% ALPPS モデルを作製する。(1)50%ALPPS、(2)50%門脈塞栓、(3)単開腹の3群を用意し、切除予定肝 (DL) 内、ならびに残存予定肝 (FLR) 内の転移巣の容量変化を経時的に観察、測定する。

(II-3) 蛍光肝転移 ALPPS モデルにおける Growth factor, cytokine の変化：

上記蛍光肝転移 ALPPS モデル各群の DL, FLR 組織から Total RNA を抽出し、growth factor, cytokine (TNF- α , TGF- β , HGF) の変化について、RT-PCR を用いて測定する。また、同様に各群の血清中の cytokine (TNF- α , Hmgb-1) の変化についても測定する。

4. 研究成果

(I) ラット ALPPS モデルを用いた残存予定肝における肝再生シグナルの検討：

7-9 週齢 (220-400g) 雄の SD ラット (日本 SLC) を使用した。動物実験は学内の動物実験倫理委員会で承認され (IRB 番号：帝動倫 15-025) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に準拠して行った。ラットの中葉右側のみの門脈枝を温存した 90%門脈結紮モデル、ならびにこのモデルの中葉に実質切離を加えて右と左に分離し中葉右側を残存予定肝 (FLR) 領域とした 90% ALPPS モデルを作成・樹立した (Fig.1)。以上のモデルを用い、ALPPS 群、門脈結紮群、

Control 群 (単開腹) の各群で、術後 2, 6, 12, 24, 72, 120 時間毎の残存予定肝 (右中葉) 容積を測定し (各 5 匹、各群計 30 匹) 形態的肝容量の経時変化を比較検討した結果

(Fig.2) 72 時間で ALPPS 群が PVL 群より有意に上回ることが確認された (Fig.2B)。FLR 組織の Western Blotting により STAT3, pSTAT3, Akt, pAkt などの肝再生シグナルの発現をコントロール群 (単開腹 sham モデル) および 90%門脈結紮モデルと比較すると ALPPS 群ではより早期より pSTAT3 の発現が亢進していることを確認した (Fig.3)。さらに、各群の電子顕微鏡所

Fig. 1

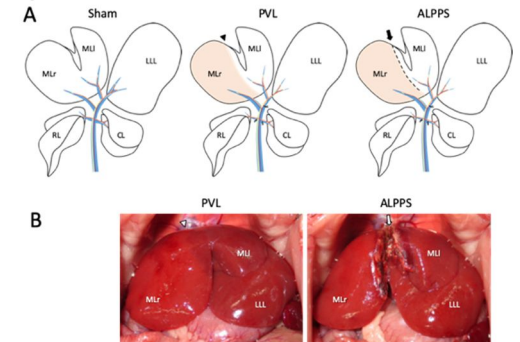


Fig. 2

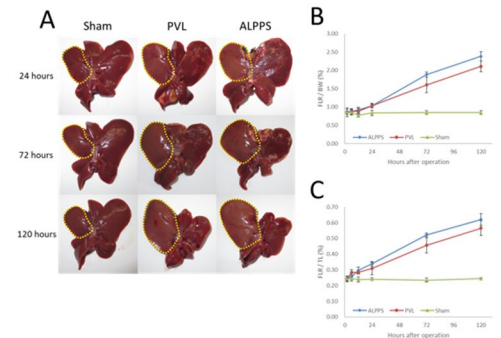


Fig. 3

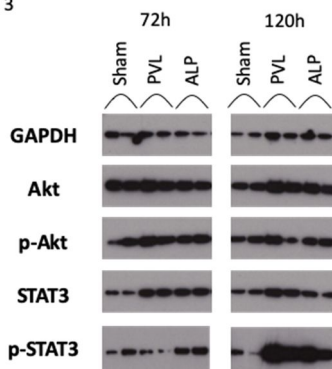
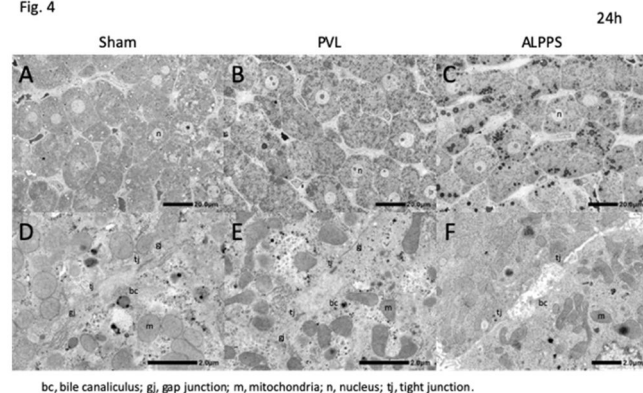


Fig. 4



bc, bile canaliculus; gj, gap junction; m, mitochondria; n, nucleus; tj, tight junction.

見を比較検討した結果、術後 72 時間の ALPPS 群において胞体内グリコーゲン顆粒、リポフスチン顆粒が著しく乏しく、細胞内小器官の未成熟の状態、さらに細胆管の形成不全を認め、細胞間の接着も弱く開大しており、組織としても未成熟な状態と考えられた (Fig.4)。これは、ALPPS 手術を施行した臨床検体での電子顕微鏡所見と類似するものであり、本モデルが臨床病態を極めて忠実に再現していることが確認された。

(II) ノードマウス肝転移モデルを用いた ALPPS 手術の腫瘍増殖への影響の検討：

蛍光肝転移 ALPPS モデルを作製し、

(1)50%ALPPS、(2)50%門脈塞栓、(3)単開腹の 3 群を用意し、切除予定肝 (DL)内、ならびに残存予定肝 (FLR) 内の転移巣を経時的に観察、測定した結果、門脈結紮群・ALPPS 群はコントロール群と比較し、いずれも DL 内では早期の転移増大はなく、晩期

(Day9, 12) に有意に転移増大が生じた。一方、FLR 内の転移巣の増大は、各群で有意差を認めなかった (Fig.5)。

また、DL, FLR 内の growth factor, cytokine の変化について、RT-PCR を用いて測定した結果、TNF- α 、TGF- β は DL, FLR にいずれにおいても ALPPS 群で早期 (Day1) に上昇していたが、HGF は FLR においてのみ、ALPPS 群で有意に上昇しており、HGF は FLR の肝再生に重要な役割を果たしていると考えられた。また、FLR おいて、各群で腫瘍増殖に差が認められなかったことから、肝組織中の TNF- α 、TGF- β 、

HGF は腫瘍増殖には関与していないと考えられた。一方、血清中の TNF- α は、Day1 において ALPPS 群、門脈塞栓群で有意に上昇しており、FLR の晩期転移巣増大に関与している可能性が示唆された (Fig.6)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1.

Impact of associating liver partition and portal vein occlusion for staged hepatectomy on tumor growth in a mouse model of liver metastasis.

Kikuchi Y, Hiroshima Y, Matsuo K, Murakami T, Kawaguchi D, Kasahara K, Tanaka K.

Eur J Surg Oncol. 2018 Jan;44(1):130-138. doi: 10.1016/j.ejso.2017.11.007. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29198493、査読あり

2.

Remnant Liver Tumor Growth Activity During Treatment Associating Liver Partition and Portal Vein Occlusion for Staged Hepatectomy (ALPPS).

Fig. 5

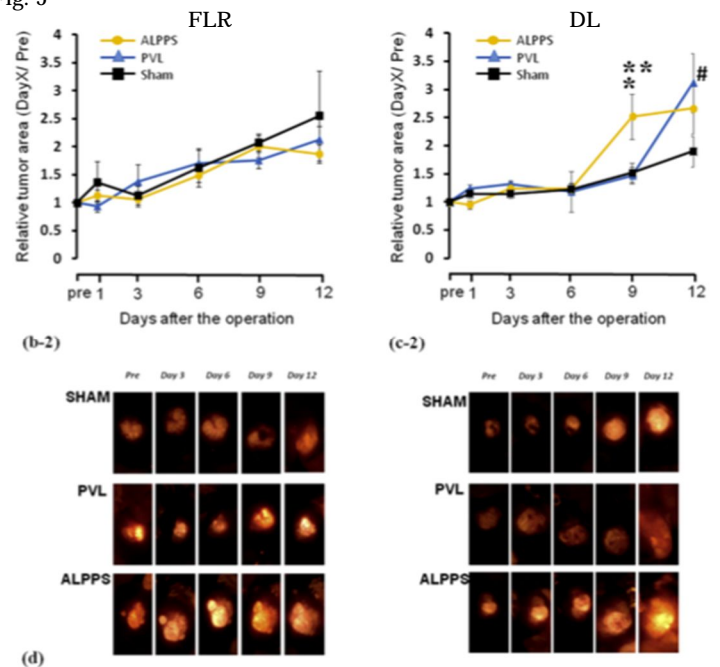
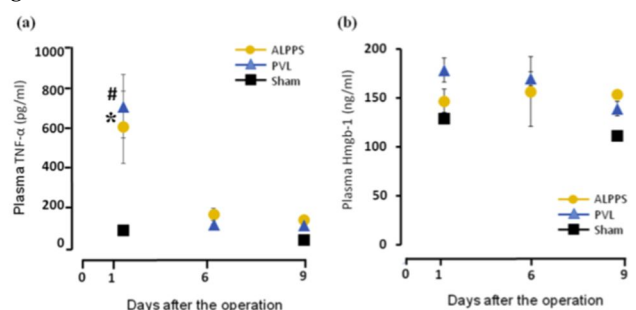


Fig. 6



Kikuchi Y, Hiroshima Y, Matsuo K, Murakami T, Kawaguchi D, Endo I, Yamazaki K, Ishida Y, Tanaka K.

J Gastrointest Surg. 2017 Nov;21(11):1851-1858. doi: 10.1007/s11605-017-3523-x. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28785935、査読あり

3.

Immaturity of Bile Canalicular-Ductule Networks in the Future Liver Remnant While Associating Liver Partition and Portal Vein Occlusion for Staged Hepatectomy (ALPPS). Matsuo K, Hiroshima Y, Yamazaki K, Kasahara K, Kikuchi Y, Kawaguchi D, Murakami T, Ishida Y, Tanaka K.

Ann Surg Oncol. 2017 Sep;24(9):2456-2464. doi: 10.1245/s10434-017-5922-3. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28612126、査読あり

4.

Associating Liver Partition and Portal Vein Occlusion, Including Venous Congestion, Induction in Rats.

Kawaguchi D, Hiroshima Y, Kikuchi Y, Matsuo K, Tanaka K.

Anticancer Res. 2017 Jun;37(6):2919-2925. PMID: 28551629、査読あり

〔学会発表〕(計0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：松尾 憲一

ローマ字氏名：Matsuo Kenichi

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：10363839

(2)研究分担者

研究分担者氏名：廣島 幸彦

ローマ字氏名：Hiroshima Yukihiko

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：客員講師

研究者番号(8桁)：60718021

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。