

令和元年6月7日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19931

研究課題名(和文) 肝癌肝切除における血液凝固異常と術後肝不全、肝転移促進に関するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Mechanisms between hypercoagulation following hepatectomy and post hepatectomy liver failure, promotion of liver cancer.

研究代表者

黒田 慎太郎 (Kuroda, Shintaro)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：30457246

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)：肝癌に対する肝切除後には血液凝固異常が生じることが知られているが、われわれは、この血液凝固異常による肝内微小循環の低下が、術後肝不全や癌の再発と密接に関わっていると考え、以下の検討を行った。肝切除後の血液凝固異常の改善を目的に抗トロンビン作用をもつ可溶性トロンボモジュリン製剤を使用し、特に肝不全を来しやすい脂肪肝マウスを用い、実験を行ったところ、トロンボモジュリン製剤の使用により、肝障害や癌の生着が有意に低減することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌に対する肝切除は最も効果的な治療法の一つだが、術後合併症や癌の再発が一定の割合で起こることが課題として残されている。その一因として肝切除後の血液凝固異常が挙げられるが、有効な治療法は報告されていない。今回のわれわれの検討では、抗トロンビン作用を示す可溶性トロンボモジュリン製剤の投与により、肝障害や癌の生着を予防する可能性が示された。同薬剤は既に感染症などによる血液凝固異常に対して日常的に使用されており、臨床応用への可能性は高い。実臨床における肝癌の肝切除の安全性や、長期成績の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that blood hypercoagulation occur after hepatectomy for liver cancer. The decrease in intrahepatic microcirculation due to blood hypercoagulation is closely related to postoperative liver failure and early recurrence of cancer. In this study, it was carried out that the use of a thrombomodulin preparation with antithrombin activity ameliorated blood hypercoagulation after hepatectomy of fatty liver mice which was susceptible to liver failure. Additionally, it was revealed that postoperative liver disorders and survival of cancer was significantly reduced.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝不全 血液凝固異常 肝癌 トロンボモジュリン 脂肪肝

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓に対する肝切除術は、日常の治療手段として行われているが、いまだに解決すべき課題が残されている。その中で、術後肝不全は極めて重大な問題である。National Clinical Database Annual Reportによると、肝切除術後 30 日死亡率は 1.9%、手術関連死亡率は 3.8%にのぼる。1) これは、他臓器の手術に比べて著しく高い数値であり、その安全性はまだ確立されたとは言い難い。

肝切除後の合併症の大半は術後肝不全と深く関わっており、その主要な原因の一つが周術期の血液凝固異常(過凝固状態)とそれに伴う微小循環障害である。われわれはこれまでの臨床研究で、肝切除後肝不全(Posthepatectomy Liver Failure; PHLF)と血液凝固異常の関連性、そして周術期の血液凝固異常対策による肝不全の改善効果を示してきた。2) また、われわれはこれまでの基礎研究で傷害肝における肝虚血後の微小血栓の形成や微小循環障害が術後肝不全の一因であることや、微小循環異常の制御により術後肝不全に対する改善効果があることを報告してきた。3,4)

さらに、広島大学病院における肝細胞癌肝切除後の再発に関する多変量解析により、PHLF は肝癌再発の独立した危険因子であることが判明した。これにより、肝切除後早期の血液凝固異常の制御により、PHLF の改善に加え、肝癌再発抑制の可能性が示された。だが、肝切除後の血液凝固異常もしくは PHLF の改善が肝癌再発抑制に寄与するといった報告はまだない。

われわれが以上の研究のターゲットと考えた分子がトロンピンである。トロンピンは多彩な機能を有するセリンプロテアーゼであり、よく知られている血液凝固カスケードの最終段階で血液凝固活性を促進させる機能のほかに、7 回膜貫通型の G 蛋白にカップリングしたプロテアーゼ活性化受容体を介して、血小板、血管内皮細胞、癌細胞を含むその他の細胞の活性化に関与し、血管新生、細胞形態、細胞運動、血液凝固などの機能における Key となる分子である。トロンピン刺激により癌細胞は血管内皮細胞増殖因子や IL-8、ケモカインなどのオートクラインを誘導し、さらに血管新生の促進・運動浸潤能の亢進により高転移能を獲得することも肝細胞癌を含む一部の癌細胞において報告されている。5)

近年、血液凝固異常の代表的な疾患である播種性血管内凝固症候群治療手段の一つとして、遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤が一般的である。トロンボモジュリンは主に血管内皮に存在し、トロンピンとの選択的結合による抗トロンピン作用や、凝固阻止因子であるプロテイン C の活性化の作用などにより、血管内皮の抗血栓作用に大きな役割を果たしていると言われている。また、トロンボモジュリンの N 末端レクチン様ドメインには炎症関連タンパク質(High-mobility group box 1; HMGB1)と選択的に結合し、トロンピンとの結合を介して抗炎症活性と補体活性抑制性を有するとされる。6,7) 一方で、血管内皮のダメージによりトロンボモジュリンは容易に遊離することが言われている。肝の微小血管である類洞内皮は、周術期の操作や全肝虚血の影響により容易に障害が起こりやすく、肝虚血再灌流障害の一因とされている。

われわれはこの病態におけるトロンボモジュリンの関与と治療への臨床の可能性を探ることとした。また、血液凝固亢進時に生成されるトロンピン刺激が癌を促進するメカニズムに焦点を当て、トロンボモジュリン製剤によるトロンピンを標的とする新規抗腫瘍療法の開発も視野に入れることとした。

さらに、最近の報告では脂肪肝などの傷害肝において、血液凝固に関わる因子が低下しているとされる。8) 傷害肝においては術後肝不全が高率におき、その原因の一つに微小循環の低下がある。われわれは、これまでの研究を進展させ、脂肪肝モデルマウスにおける類洞内皮細胞上のトロンボモジュリンの発現と、術後肝不全の関連を併せて検討することとした。

## 参考文献

- 1) Konno H, Wakabayashi G, et al. Annual Report of National Clinical Database in Gastroenterological Surgery 2011–2012. *Jpn J Gastroenterol Surg* 46:952-63, 2013.
- 2) Kuroda S, Tashiro H, et al. Administration of antithrombin III attenuates posthepatectomy liver failure in hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 32:173-80, 2015.
- 3) Kuroda S, Tashiro H, et al. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in the rat steatotic liver. *J Hepatology* 56:146-52, 2012.
- 4) Kuroda S, Tashiro H, et al. Rho-kinase inhibitor targeting the liver prevents ischemia/reperfusion injury in the steatotic liver without major systemic adversity in rats. *Liver Transpl* 21:123-31, 2015
- 5) Xue YH, Zhang XF, et al. Thrombin is a therapeutic target for metastatic osteopontin-positive hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 52:2012-22, 2012.
- 6) Abeyama K, Stern DM, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest*. 115:1267-74, 2005.
- 7) Nakamura K, Uemoto S, et al. Soluble thrombomodulin attenuates sinusoidal obstruction syndrome in rat through suppression of high mobility group box 1. *Liver Int* 34:1473-87, 2014.
- 8) Tripodi A, Fracanzani AL, et al. Procoagulant imbalance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 61:148-54, 2014.

## 2. 研究の目的

肝臓肝切除後には血液凝固異常が生じることが知られているが、術後肝不全はこの血液凝固異常と密接に関わっている。さらに、この血液凝固異常のうち、特にトロンピンによる刺激が癌の促進(転移)にも関与していると報告されてきた。しかしながらこれらの現象に寄与する分子機構や臨床応用へ

の報告は少ない。われわれはこのメカニズムにおけるトロンピンおよびトロンボモジュリンの関与に着目し、これらの分子と術後肝不全および肝癌の促進(転移)への関連性を明らかにすることを目的とした。特に、脂肪肝などの傷害肝においては術後肝不全が高率におきるため、脂肪肝モデルマウスにおける類洞内皮細胞上のトロンボモジュリンの発現と、術後肝不全の関連を併せて検討することとした。本研究の成果により術後肝不全の予防・治療に対する知見を得ることができ、臨床応用へ発展させることが期待できる。また、トロンピンを標的とする新規抗腫瘍療法の開発も視野に入れることとした。

### 3. 研究の方法

われわれは、血液凝固活性の亢進と術後肝不全の関与を小動物並びに分子生物学的に検討することとした。また、われわれは、肝虚血再灌流障害時のトロンボモジュリン製剤による HMGB-1 の抑制効果を検討した。特に、術後肝不全が高率におきるとされる脂肪肝などの傷害肝において、血液凝固に関わる因子がどのように変化しているかを併せて検討した。

脂肪肝モデルマウス: コリン欠乏食を6週間与えたマウスを作成し、以下の実験に使用した。通常食を与えたマウスをコントロールとして用いた(正常肝群)。組織学上、脂肪肝モデルマウスの肝組織は30%以上の中等度以上の脂肪肝と炎症細胞浸潤を認め、脂肪性肝炎(NASH)の状態であった。微小循環障害の確認のため、免疫染色において低酸素状態の指標となる、HIF1、ピモニダゾールの発現を確認した。また、血液凝固異常の状態の評価のため、トロンボモジュリンの発現を免疫染色、ウェスタンブロッティングで測定した。

血液生化学検査: 肝虚血再灌流障害の影響を測定するため、血性 HMGB1、TM 活性度、血性 ALT の測定を行った。

肝虚血再灌流: 肝虚血再灌流障害を与えるため、マウスには麻酔科に60分の70%部分肝阻血、または、全肝虚血を施行した後、閉腹を行った。肝虚血再灌流障害の低減にトロンボモジュリン製剤を6mg/kg 尾静脈より静注投与した。

癌の肝への生着試験: 肝虚血再灌流後の肝への癌細胞の生着を評価するために、肝癌細胞株 Hepa1-6 を  $0.5\text{mg} \times 10^6$  個を脾臓内に注射し、経門脈的に肝へ流出させ、処置より3週間後に肝を全摘し、肝の重量、腫瘍占拠率(組織学的)を測定した。また、肝への癌の生着抑制効果の評価のために、癌細胞投与1時間前に、トロンボモジュリン製剤を6mg/kg 尾静脈より静注投与した。

Migration assay: 低酸素下での癌細胞の浸潤・生着を確認するため、肝癌細胞株 Hepa1-6 をダブルチャンバーシステムを用いて培養し、2%酸素下で24時間後に下層に移動した肝癌細胞数を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 脂肪肝モデルマウスにおける類洞内皮細胞上のトロンボモジュリンの発現は、ウェスタンブロッティング上、正常肝と比較し脂肪肝において有意に低下していた( $n=5$ ,  $P<0.05$ )。このことより、脂肪肝では血液凝固異常がより強固に生じ、肝切除後肝不全が起こりやすい可能性が示唆された。

(2) 血性 HMGB1 は正常肝と比較し、脂肪肝において定常状態においても有意に高く( $2.4\text{ng/ml}$ ,  $11.6\text{ng/ml}$ ,  $P<0.01$ )、脂肪肝においては肝虚血再灌流障害が生じやすい可能性が示唆された。

(3) マウス肝組織抽出液中のトロンボモジュリン活性度を測定キットを用いて測定したところ、定常状態においても脂肪肝のトロンボモジュリン活性度は低いことが明らかになった(有効血中濃度  $12800\text{u/ml}$  と比し、正常肝 82%, 脂肪肝 20%,  $P<0.01$ )。

(4) 70%部分肝虚血再灌流モデルにおいては、正常肝群、脂肪肝群においてそれぞれトロンボモジュリン投与により血性 ALT 値は有意に改善した( $P<0.01$ ,  $P<0.01$ )。

(5) 同様に70%部分肝虚血再灌流モデルにおいては、血清 HMGB1 値は正常肝ではトロンボモジュリン投与により1時間後のみ差があったが、3,6時間後は差がなかった。一方で、

図1

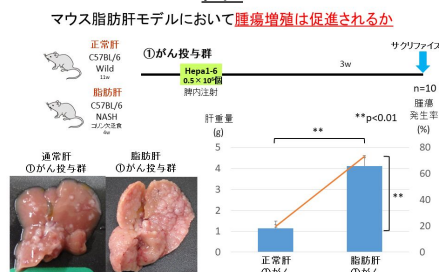


図2

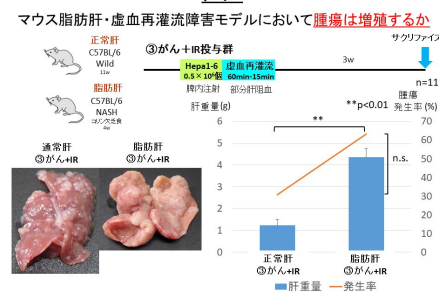


図3

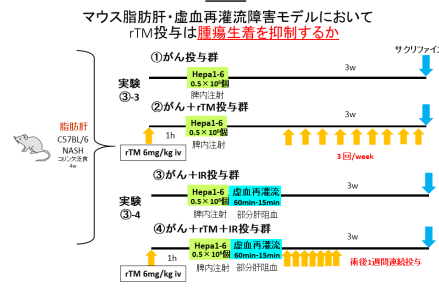
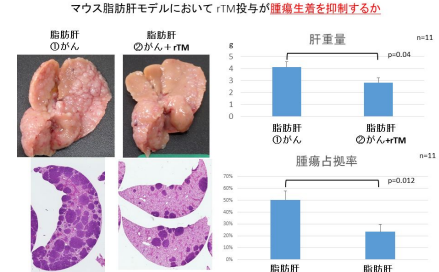


図4



脂肪肝においては、3時間後、6時間後においてトロンボモジュリン投与により有意に低下し、虚血再灌流障害の予防効果が高いことが示唆された。また、トロンボモジュリン投与により、血性 HMGB1 は低下した。

(6) 癌生着試験においては、正常肝と比べ、脂肪肝において腫瘍生着が亢進した。また、虚血再灌流障害を加えた場合も同様の結果であった(図 1,2)。続いて、トロンボモジュリンによる肝の生着抑制効果を検討したところ、トロンボモジュリン投与群(術前1回、術後3回/週の投与)で有意に肝重量と腫瘍占拠率の改善を認められた(図 3,4,5)。以上の結果より、脂肪肝マウスモデルにおいては、虚血再灌流障害が生じやすく、その原因がトロンボモジュリンの発現や活性度が低下していること、さらに、凝固能の亢進により肝障害が生じており、トロンボモジュリン投与によりその影響が改善する可能性が示唆された。また、同様に、肝虚血再灌流後の癌の生着をトロンボモジュリンにより抑制する可能性も示唆された。

(7)低酸素下での Migration Assay では、癌細胞の浸潤は、通常酸素濃度のコントロールと比較し優位に増加し(P<0.01)、トロンボモジュリンにより有意に低下した(P<0.01)。また、低酸素環境の培養液の HMGB1 値は有意に上昇しており、この培地を使用し 24 時間前処置培養を行ったところ、遊走能は有意に上昇し、トロンボモジュリン投与で改善を認められた。(図 6,7)

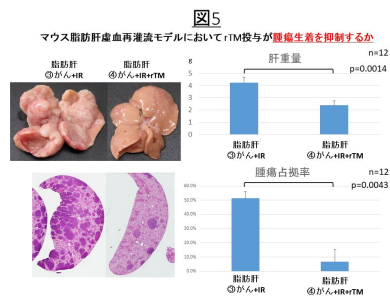


図5 マウス脂肪肝虚血再灌流モデルにおいてrTM投与が腫瘍生着を抑制するか

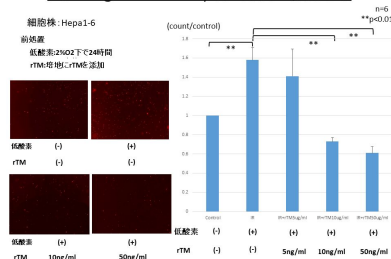


図6 Migration Assay(低酸素環境下)

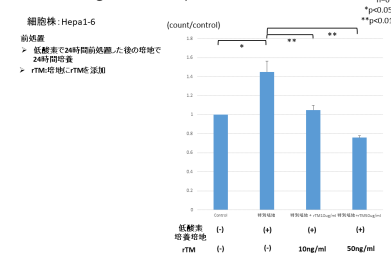


図7 Migration Assay(低酸素前処置培地)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- Iwako H, Kuroda S, et al., Antithrombin Insufficiency Promotes Susceptibility to Liver Tumorigenesis. J Surg Res. 2019 Apr;236:198-208. doi: 10.1016/j.jss.2018.11.026. (査読あり)
- Okimoto S, Kuroda S, et al., Vitamin A-coupled liposomal Rho-kinase inhibitor ameliorates liver fibrosis without systemic adverse effects. Hepatol Res. 2019 doi: 10.1111/hepr.13317. [Epub ahead of print] (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

- 「マウス脂肪肝部分肝虚血再灌流障害モデルに対する可溶性トロンボモジュリン製剤の腫瘍転移抑制効果の解析」  
山口恵美  
2019年4月 第119回日本外科学会総会
- 「可溶性トロンボモジュリンは脂肪肝虚血再灌流障害を軽減し肝腫瘍進展も抑制する」  
山口恵美  
2019年5月 第55回日本肝臓学会総会
- 「アンチトロンピンは抗炎症作用を介して肝癌進展を制御する」  
沖本将  
2018年 第118回日本外科学会定期学術集会
- 「アンチトロンピンによる肝癌進展制御の可能性」  
沖本将  
2018年 JDDW2018
- 「アンチトロンピンが肝癌進展に与える影響に関する基礎研究」  
沖本将  
2019年 第74回日本消化器外科学会総会
- 「肝星細胞を標的とする Drug Delivery System を用いた新たな肝線維化抑制法の開発」  
沖本将  
2019年 第60回広島肝疾患ゼミナール

[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:なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者:なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:田代 裕尊

ローマ字氏名:(TASHIRO, hirotaka)

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。