

機関番号：13701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591605
 研究課題名（和文） 術前化学療法後脂肪性肝炎に対する抗ヒトTNF α モノクローナル抗体療法の開発
 研究課題名（英文） The development of the human TNF α monoclonal antibody therapy for non-alcoholic steatohepatitis after the preoperative chemotherapy
 研究代表者
 山田 卓也 (YAMADA TAKUYA)
 岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：60324315

研究成果の概要（和文）：

C57BL/6 マウスとSD ラットを用い、Irinotecan の投与回数、投与量、コリン欠乏アミノ酸食の節食期間を多角的に調整して化学療法後脂肪性肝炎モデルを作成した。肝組織の脂肪蓄積、炎症、線維化、血清トランスアミナーゼ値、血清脂質、を計測した結果、肉眼的および顕微鏡的肝組織所見でNASHの発生が認められなかった。また、ELISA法で測定した血清中TNF α とIL6も、コントロール群に対する差異を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

We made a NASH model after the chemotherapy in C57BL/6 mouse and the SD rat, adjusted by the medication number of times of Irinotecan, applied dose and the administration period of Colin deficiency amino acid food. But, the occurrence of NASH wasn't recognized in macroscopically, and microscopical findings of the adiposity of the liver, the inflammation, and the fibrosis. Our models were no differences for a group of control in the serum transaminase level, the serum lipid, TNF α and IL6, either.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	300,000	90,000	390,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：転移性肝癌、化学療法、脂肪性肝炎、TNF α 抗体、肝切除

1. 研究開始当初の背景

大腸癌において、肝転移は最も高頻度にみ

られる転移形式で、同時性と異時性を合わせて25%に合併する。無治療だった場合の5年

生存率はほぼ 0%であるのに対し、肝切除後の 5 年生存率は 20-50%であるため、本邦の大腸癌治療ガイドラインでも根治切除可能な肝転移には肝切除が推奨されている。さらに、化学療法の進歩により肝転移に対する化学療法の効果が向上し、切除不能肝転移症例に対しても、術前化学療法を併用した肝切除が行われるようになってきた。現在の化学療法を行い切除可能となる場合は 20-35%であるが、切除不能肝転移症例では自然経過予後が 6 か月という状態に対し、化学療法併用肝切除の 5 年生存率は 20-40%で、切除可能肝転移に対する肝切除とほぼ同等な治療成績である。ただし、化学療法併用肝切除の増加に伴い、化学療法に伴う肝障害が、化学療法後の肝切除の合併症を引き起こす原因として指摘されている。その中でも、化学療法後の非アルコール性脂肪性肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis : NASH）、sinusoidal obstruction syndrome の発生は重要課題で、とくに、Irinotecan や 5-FU が引き起こす NASH は肝切除後合併症、死亡率を増加させている。

NASH の病因・病態はなお十分に解明されていないが、Day によって提唱された two hit theory は最も有力な発生機序として広く支持されている。First hit として肝細胞への中性脂肪沈着（脂肪肝）が起こり、さらに肝細胞障害因子である酸化ストレス、エンドキシン、アディポサイトカインなどの second hit が加わって、肝細胞の壊死やアポトーシスが生じ、NASH を発症するものと考えられている。また、NASH では血中の TNF α の亢進や TNF レセプター (p55, p75) の増加が認められ、TNF α は TNF レセプターと結合しインスリン抵抗性の誘導とともにミトコンドリアからのチトクローム C の放出や活性酸素種の産生を促進し、肝障害を引き起こすことが知られ

ている。現在のところ NASH の治療として確立された治療法はなく、さまざまな治療法が行われている。継続した食事運動療法を基本として、薬物療法としては、抗酸化療法やインスリン抵抗性改善薬、高脂血症改善薬、高血圧改善薬などが試みられているが、化学療法併用肝切除時に必要である即効性のある治療法は報告されていない。

一方、TNF α は Crohn 病や関節リウマチなどの免疫・炎症性疾患の病態形成に重要な役割を果たしているため、免疫・炎症性疾患の治療を目的として、Infliximab が開発された。Infliximab は遺伝子工学的手法により製作されたヒト・マウスキメラ型抗体で、ヒト TNF α に特異的なマウス・モノクローナル抗体 (mAb) の可変領域とヒト IgG1 の定常領域から構成されている。In vitro で確認されている薬理活性作用は、1. TNF α の種々の生物活性、即ち線維芽細胞の増殖や IL-6 産生、あるいは好中球のスーパーオキシド産生誘導などを中和する。2. 膜結合型 TNF α による E-セクレチン発現誘導作用などの生物活性を中和する。3. Infliximab の Fc 領域の機能に依存した補体依存性細胞障害作用 (CDC) や抗体依存性細胞媒介型細胞障害作用 (ADCC) により、膜結合型 TNF α 発現細胞を障害するなどがある。In vivo における作用は、TNF α トランスジェニックマウス (Tg211 マウス) の生存率改善や、体重増加抑制に対して用量依存的な改善傾向が認められている。Infliximab の臨床効果は、クローン病に対する緩解導入効果、クローン病における瘻孔治癒効果、クローン病に対する緩解維持効果、関節リウマチの症状・症候の軽減効果、関節リウマチにおける関節破壊進展の防止効果、関節リウマチにおける身体機能の改善効果が認められている。

以上の背景から、易刺激性となった脂肪肝

に Irinotecan や 5-FU が second hit として作用し、その結果、血中 TNF α の亢進が起きて NASH が形成されるという仮説が正しければ、抗 TNF α 療法は second hit をブロックし、化学療法後の NASH を予防しようという本研究の着想にいたった。

2. 研究の目的

化学療法によって引き起こされる NASH を、抗ヒト TNF α モノクローナル抗体療法によって予防し、化学療法併用肝切除の成績向上を目指す。

具体的には、

- (1) マウス脂肪肝モデルに Irinotecan を投与し、TNF α 、IL-1、IL-6 の上昇とともに、脂肪性肝炎が惹起されることを明らかにする (two hit theory の証明)。
- (2) ヒト TNF α トランスジェニックマウスで上記の脂肪肝炎モデルを作成し、Infliximab を投与し、TNF α が中和され、脂肪性肝炎の発生在抑制されることを確認する。
- (3) ヒト TNF α トランスジェニックマウス脂肪性肝炎モデルに 70%肝切除を行い、術前 Infliximab の投与で、生存率の向上が得られるか否かを明らかにする。以上とした。

3. 研究の方法

(1) Irinotecan 投与によるマウス脂肪性肝炎発生の確認 (Two hit theory の証明)

雄性 6 週齢 C57BL/6 マウスにコリン欠乏アミノ酸食 (CDAA diet) および、通常食 (chow diet) を自由摂取させ、3 週間目から、各に

Irinotecan (6mg/Kg/week) と生理食塩水を 4 回投与する。7 週目に犠死し、血清と肝組織を採取する。

評価項目：肝組織 (HE 染色、Azan-Mallory 染色) の脂肪蓄積、炎症、線維化、血清トランスアミナーゼ値、血清脂質、血清および肝組織中 (マウス由来の) TNF α 、IL-6

肝組織中、血中 TNF α 、IL-6 の測定は、Real time PCR 法で行い、 β -Actin mRNA の相対値として評価する。また、同時に、ELISA 法でも確認する。

(2) ヒト TNF α トランスジェニックマウスで上記の脂肪肝炎モデルを作成と、Infliximab による TNF α 中和効果、脂肪性肝炎が抑制効果の確認

Infliximab はラット、マウスなどに動物種の TNF α に交叉反応を示さないことから、in vivo における薬理作用はヒト TNF α トランスジェニックマウスを用いる。

3 週齢ヒト TNF α トランスジェニックマウス (TG211) にコリン欠乏アミノ酸食 (CDAA diet) を自由摂取させ、3 週間目から、Irinotecan (6mg/Kg/week) を 4 回投与する。さらに、3 週間目から Infliximab (8mg/Kg/week)、Infliximab (2mg/Kg/week)、生理食塩水を 4 回投与し、各群の体重と生存期間を計測する。また、犠死後の血清と肝組織を採取する。

評価項目：生存率、体重変化、肝組織 (HE 染色、Azan-Mallory 染色) の脂肪蓄積、炎症、線維化、血清トランスアミナーゼ値、血清脂質、血清および肝組織中 (ヒト由来の) TNF α 、IL-6

トランスジェニックマウスの入手、作製が困難な場合は、細胞移植法による TNF α 高発現マウスで代用する。すなわち、TNF α cDNA を安定導入した CHO 細胞を 8 週齢の ICR 系マウス

ードマウス背部皮下に移植することにより作製する。

(3) Infliximab 術前投与によるマウス脂肪性肝炎 70%肝切除モデルの生存率改善効果の確認

3週齢ヒト TNF α トランスジェニックマウスにコリン欠乏アミノ酸食(CDAA diet)を自由摂取させ、3週間目から、Irinotecan (6mg/Kg/week)を3回投与する。さらに、3週間目から Infiximab (8mg/Kg/week)、Infiximab (2mg/Kg/week)、生理食塩水を3回投与し、7週目に70%肝切除を行ない、各群の体重と生存期間を計測する。また、犠死後の血清と肝組織を採取する。

評価項目:生存率、体重変化、肝組織 (HE 染色、Azan-Mallory 染色) の脂肪蓄積、炎症、線維化

血清トランスアミナーゼ値、血清脂質、血清および肝組織中 (ヒト由来の) TNF α 、IL-6

4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスで、Irinotecan を 6mg/Kg/week を 4 回投与したモデルでは、肉眼的および顕微鏡的肝組織所見で NASH の発生が認められなかったため、NASH モデルとして確立されている SD ラットを用い、Irinotecan の投与回数、投与量、コリン欠乏アミノ酸食の節食期間を多角的に調整して化学療法後脂肪性肝炎モデルを作成した。肝組織の脂肪蓄積、炎症、線維化、血清トランスアミナーゼ値、血清脂質、血清中 TNF α を計測した結果、肉眼的および顕微鏡的肝組織所見で NASH の発生が認められなかった。血清トランスアミナーゼ値と ELISA 法で測定した血清中 TNF α も、コントロール群に対する

差異を認めなかった。

(2) Irinotecan の投与回数、投与量、コリン欠乏アミノ酸食の節食期間で行ったヒト TNF α トランスジェニックマウスにコリン欠乏アミノ酸食 (CDAA diet) を自由摂取させ、Infiximab の効果を判定する計画であったが、NASH モデルのコントロール作製が不可能であったため、実験計画は進行していない

(3) NASH モデルのコントロール作製が不可能であったので、実験計画を変更した。

少量の LPS を投与することにより、ラットにエンドトキシン耐性を獲得させ、その後80%大量肝切除を行う。肝切除 6 時間、24 時間の TNF α 等を測定し、エンドトキシン耐性によりサイトカインが制御されていることを確認する。さらに、肝切除後 7 日までの肝機能と肝再生率向上、さらに PCNA 染色による核分裂像の増加を確認する。

エンドトキシン耐性を獲得したラットは 80% 大量肝切除後の残肝再生重量が上昇、AST・ALT の低下を認めた。PCNA ラベリングインデックスが高値となり、肝再生増強効果が示唆された。また、術後 IL-6 の低下傾向がみられた。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 加藤喜彦, 山田卓也, 木村真樹, 名知祥, 松友将純, 關野考史, 竹村博文, エンドトキシン耐性獲得による肝切除後の肝再生促進、第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010 年 4 月 10 日、名古屋

(2)加藤喜彦, 山田卓也, 木村真樹, 名知祥, 松友将純, 關野考史, 竹村博文、エンドトキシン耐性獲得による肝切除後の肝再生の検討、第 64 回日本消化器外科学会総会、2009 年 7 月 18 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 卓也 (YAMADA TAKUYA)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：6 0 3 2 4 3 1 5

(2) 研究分担者

岩田 尚 (IWATA HISASHI)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：9 0 3 0 3 4 9 5

關野 考史 (SEKINO TAKAFUMI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：4 0 3 6 2 1 6 5

木村 真樹 (KIMURA MASAKI)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：2 0 4 2 2 7 2 7