

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17678

研究課題名(和文) 肝疾患根治術の為の肝組織の統合的理解と肝再生療法への展開

研究課題名(英文) Comprehensive Understanding of Liver Tissue for Curative Treatment of Liver Diseases and Development of Liver Regeneration Therapies

研究代表者

安川 紘矢 (Yasukawa, Koya)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：30868071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ALPPSにおける肝再生の詳細な機序は不明であり、解明するためにALPPSモデルでの肝再生を研究した。

ALPPS群では術後48時間でPVL群に比べ有意な肝再生が認められた。ALPPS群では、GdCl<sub>3</sub>を用いてPVL群と同程度に血清中のIL-6が抑制された。しかし、FLR/BW比およびKi-67は、GdCl<sub>3</sub>を投与したALPPS群でPVL群より有意に高かった。L-NAME投与では、FLR/BW比とKi-67に差はなかった。モルシドミンを投与したPVL群では、FLR/BW比とKi-67はALPPS群と同レベルまで上昇した。Akt-eNOS経路の活性化はFLRの再生促進に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALPPS手術における肝の早期再生に関わる因子はいまだ未解明であり、何が重要な因子として寄与しているかをつきとめた研究はない。我々はALPPSモデルならびに従来の門脈結紮法との肝再生に関わる因子を比較・同定するために研究を行った。結果から、従来炎症性サイトカインの早期誘導がALPPS後のFLRの再生促進には重要と考えられていたが、Akt-eNOS経路の活性化はFLRの再生促進に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although the associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) induces more rapid liver regeneration than portal vein embolization, the mechanism remains unclear.

The ALPPS group showed significant FLR regeneration compared with that observed in the PVL group 48 h after surgery. In the ALPPS group, serum interleukin-6 expression was suppressed using GdCl<sub>3</sub> to the same extent as that in the PVL group. However, the FLR/BW ratio and Ki-67 labeling index were significantly higher in the ALPPS group administered GdCl<sub>3</sub> than in the PVL group. Phospho-Akt Ser473 and phospho-eNOS Ser1177 levels were enhanced in the ALPPS group. In the PVL group treated with molsidomine, the FLR/BW ratio and Ki-67 labeling index increased to the same level as in the ALPPS group.

Early induction of inflammatory cytokines may not be pivotal for accelerated FLR regeneration after ALPPS, whereas Akt-eNOS pathway activation may contribute to accelerated regeneration of the FLR.

研究分野：肝胆膵外科学分野

キーワード：ALPPS 肝再生 eNOS 炎症性サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

世界, 特にアジア地域でその革新的な開発が待ち望まれている肝疾患根治術分野において, 肝切除域を最小限に留め, 積極的な肝再生を促すことを企図する Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy (ALPPS) 手術が近年多く実施されるようになってきている. その際に, 従来の術式より迅速な肝再生が促進される理由としては, IL-6 など炎症性サイトカインの上昇が掲げられているが, これを否定する知見も得られつつあって依然として決着していない.

### 2. 研究の目的

本研究の目的は ALPPS 手術における肝再生促進の機序解明である. 具体的には, 1) 肝組織内の低酸素状態が肝再生を促進させること, 2) その機序は炎症性サイトカインではなく, NOS 活性化と NO 誘導にあること, の2点を解明し, 肝再生療法への展開を図る.

本研究により, 現存する療法に対してより効率的かつ信頼性の高い肝再生療法が確立され, 大量肝切除後の肝不全リスクが劇的に低減すること, 将来的には ALPPS 手術に代替するような肝再生促進薬物療法や新規手術術式の開発につながることを期待される.

### 3. 研究の方法

1. ALPPS, PVL モデルにおける予定残肝組織内酸素化の定量と比較

組織内酸素分圧測定装置を使用し, ALPPS モデル, PVL モデルにおける予定残肝組織内の酸素分圧を測定し比較する. また, L-NAME 投与 ALPPS モデル, ならびに Molsidomine 投与 PVL モデルにおいても同様に酸素分圧測定を行う.

2. p53, PTEN, AMPK などの低酸素関連因子のリン酸化亢進の有無と, Akt/eNOS リン酸化との関連の検証

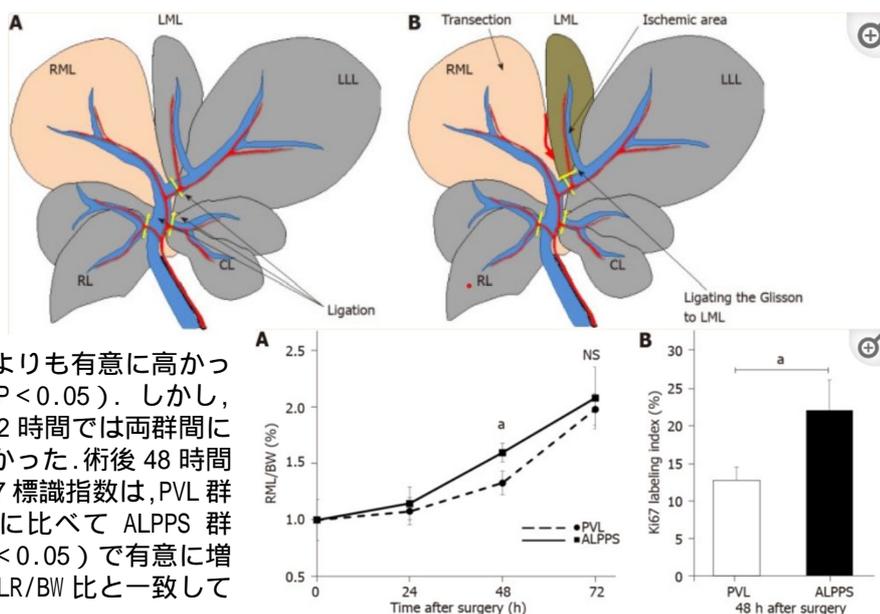
ALPPS モデルと PVL モデルとの間で, 低酸素化に基づくシグナル伝達の亢進の有無と, Akt ならびに sNOS リン酸化亢進との関連性を western blotting で比較検討する. L-NAME 投与 ALPPS モデル, Molsidomine 投与 PVL モデルでも同様にを行う.

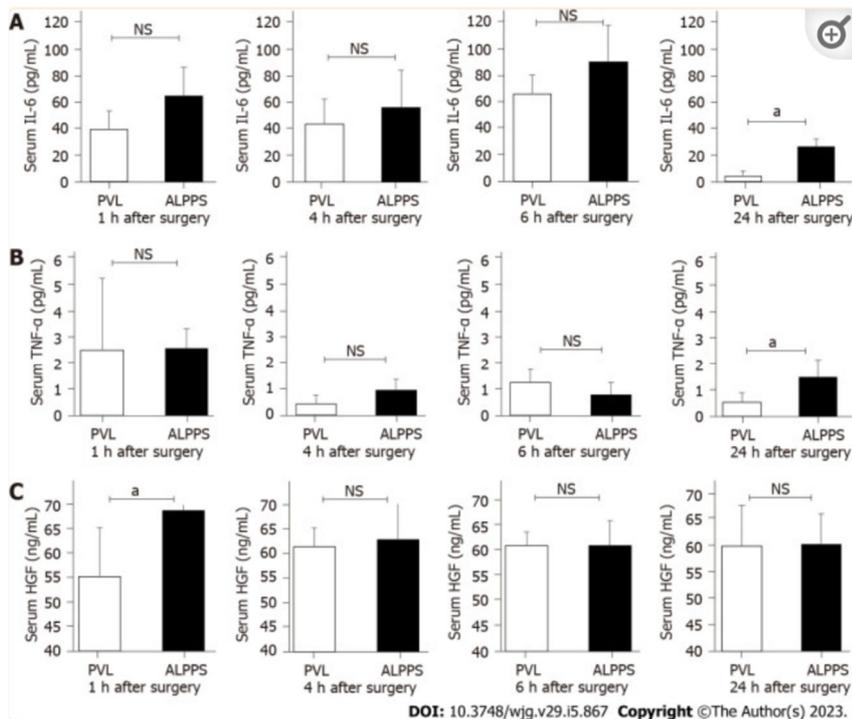
3. Molsidomine 投与 PVL モデルにおける細胞増殖シグナル亢進の評価と術後肝機能評価  
ALPPS モデル, PVL モデル, ならびに Molsidomine 投与 PVL モデルにおける, 免疫染色による Ki-67 labeling index, ならびに western blotting による cyclin E, cyclin A, PCNA などの細胞周期関連タンパクの亢進の評価, ならびに胆汁産生能・肝細胞内 ATP 濃度測定による術後肝機能の評価を行う.

### 4. 研究成果

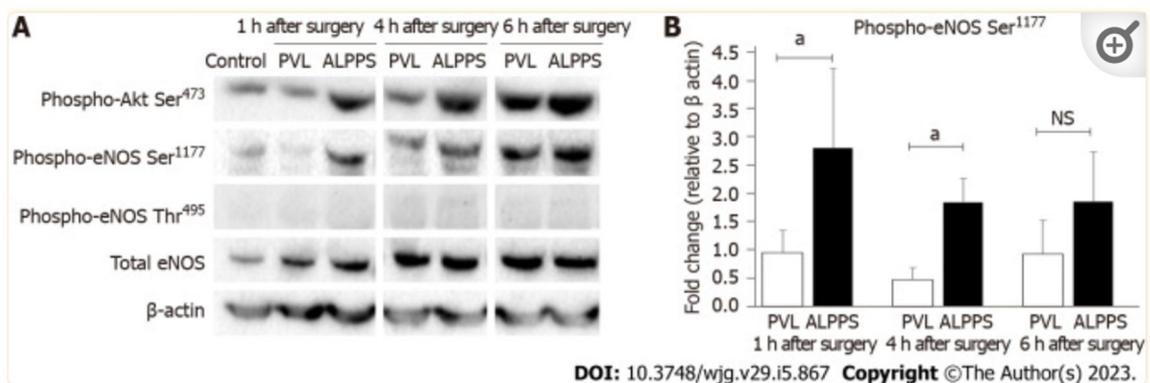
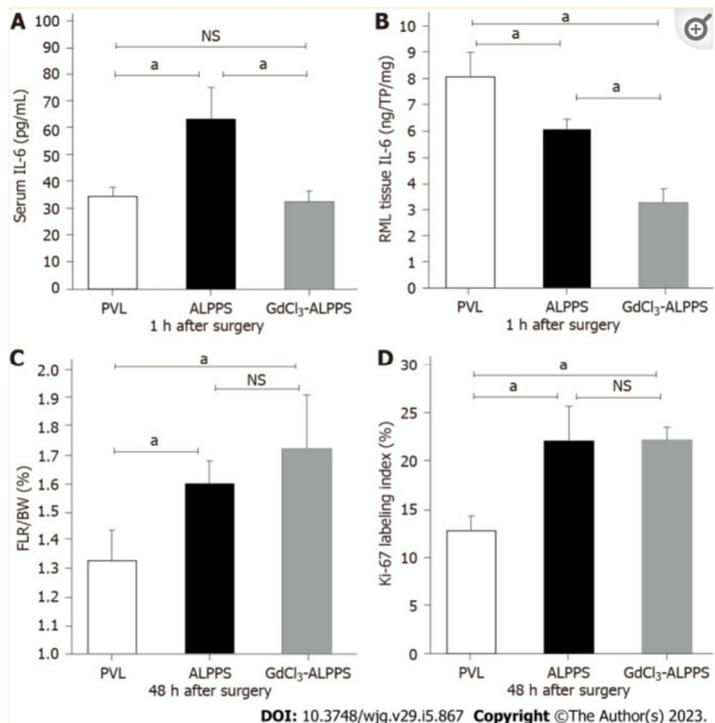
右図のようなシェーマを用いて, ALPPS モデルと PVL モデルにおける肝再生モデルを確立した(右図 AB). 術後 48 時間では, ALPPS 群の FLR/BW 比は PVL 群 ( $1.33\% \pm 0.11\%$ ) よりも有意に高かった ( $1.60\% \pm 0.08\%$ ,  $P < 0.05$ ). しかし, 術後 24 時間および 72 時間では両群間に有意差は認められなかった. 術後 48 時間における RML の Ki-67 標識指数は, PVL 群 ( $12.8\% \pm 1.73\%$ ) に比べて ALPPS 群 ( $22.1\% \pm 4.01\%$ ,  $P < 0.05$ ) で有意に増加しており, これは FLR/BW 比と一致していた(右図 AB).

続いて, RML における IL-6, TNF- $\alpha$ , HGF の血清中濃度を, 術後 1, 4, 6, 24 時間後に測定した. 血清中の IL-6 と TNF- $\alpha$  濃度は, 両群とも術前に比べて術後に上昇した. しかし, 術後 1, 4, 6 時間では両群に差はみられなかった. 術後 24 時間後の IL-6 および TNF- $\alpha$  濃度は, PVL 群 ( $4.11 \pm 3.99\text{pg/mL}$  および  $0.54 \pm 0.38\text{pg/mL}$ ) に比べ, ALPPS 群 ( $25.91 \pm 6.05\text{pg/mL}$ ,  $P < 0.05$  および  $1.52 \pm 0.68\text{pg/mL}$ ,  $P < 0.05$ ) で有意に高かった. 術後 1 時間の血清 HGF 濃度は, PVL 群 ( $55.34 \pm 9.97\text{ng/mL}$ ) に比べ, ALPPS 群 ( $68.86 \pm 4.89\text{ng/mL}$ ,  $P < 0.05$ ) で有意に高かった. しかし, 4, 6, 24 時間後の血清 HGF 濃度には有意差は認められなかった(下図 A-C).

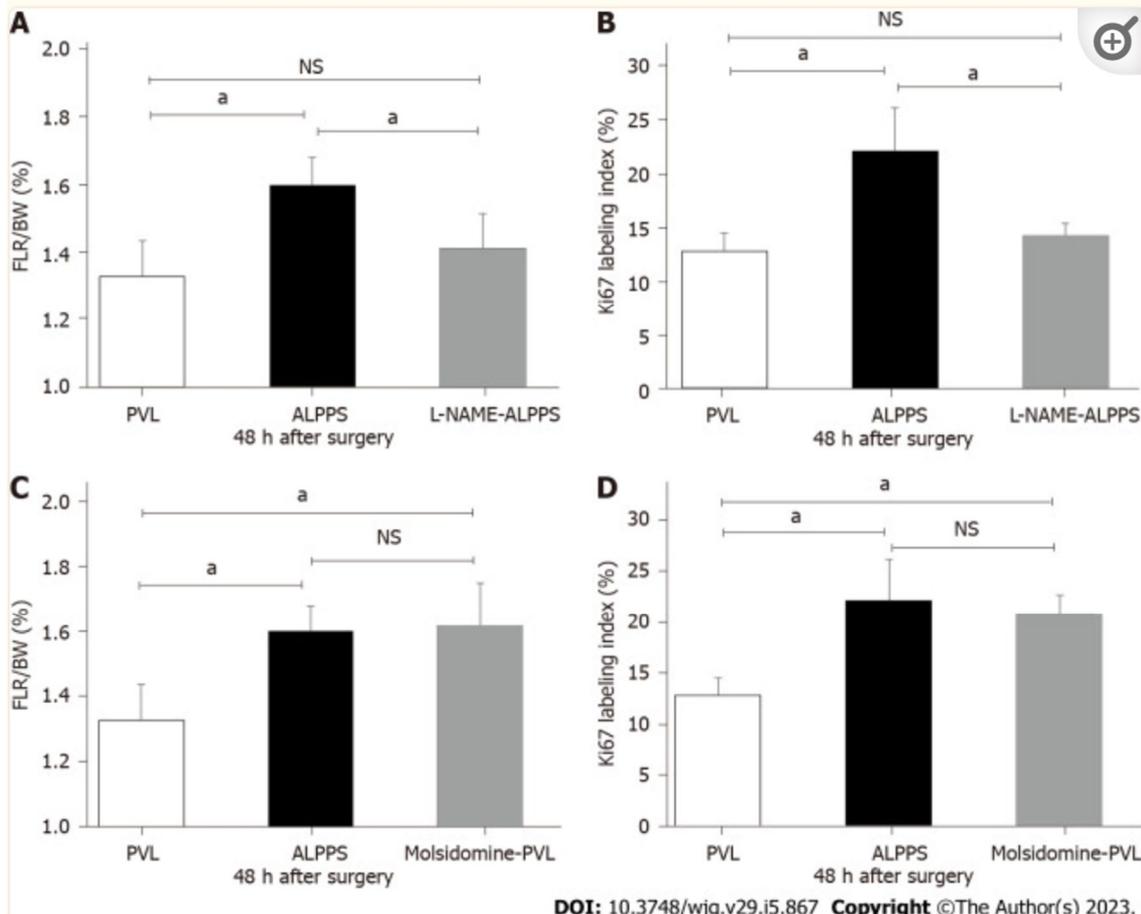




肝再生に対する IL-6 の影響を評価するため、ALPPS ラットに GdCl<sub>3</sub> を投与し、肝臓のクッパー細胞の活性化を抑制した。GdCl<sub>3</sub>-ALPPS 群では、術後 1 時間の血清中 IL-6 濃度 ( $40.3 \pm 11.3 \text{ pg/mL}$ ,  $P < 0.05$ ) および RML 組織中 IL-6 濃度 ( $3.27 \pm 0.54 \text{ ng/TP } 1\text{g}$ ,  $P < 0.05$ ) は、GdCl<sub>3</sub> を投与しなかった対応する群の濃度と比較して有意に低下した (右図 AB)。しかし、術後 48 時間の FLR/BW 比や Ki-67 標識指数には、GdCl<sub>3</sub> 投与の有無にかかわらず、ALPPS 群で有意差は認められなかった (右図 CD)。

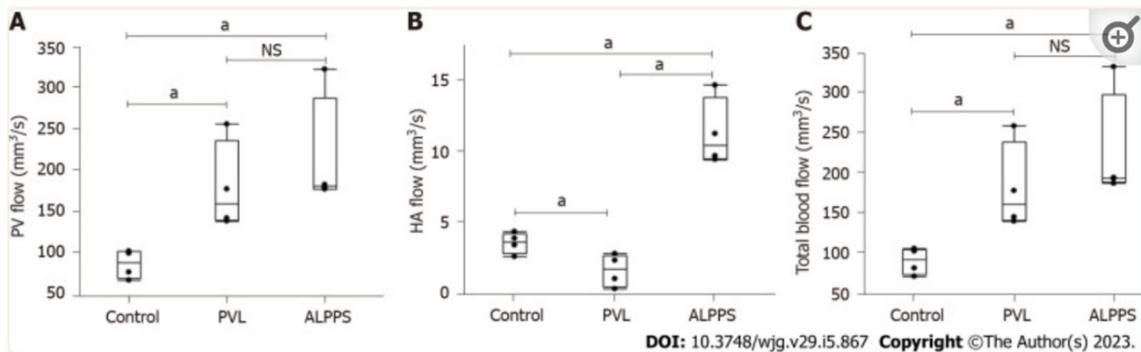


次に、術後 1, 4, 6 時間の RML 組織における Akt と eNOS のリン酸化をウェスタンブロッティングで評価した (上図 A)。リン酸化 Akt Ser473 およびリン酸化 eNOS Ser1177 レベルは、PVL 群と比較して ALPPS 群で増加した。定量測定の結果、術後 1 時間および 4 時間では、ALPPS 群の eNOS Ser1177 のリン酸化レベルは PVL 群より有意に高かった。しかし、術後 6 時間では有意差はなかった (上図 B)。



DOI: 10.3748/wjg.v29.i5.867 Copyright ©The Author(s) 2023.

NOS 阻害剤である L-NAME をラットに投与し, eNOS の抑制が肝再生に影響を及ぼすかどうかを検討した. L-NAME-ALPPS 群の術後 48 時間における FLR/BW 比および Ki-67 標識指数は, L-NAME を投与しない ALPPS 群に比べ有意に低く, PVL 群と同程度であった (上図 AB). さらに, eNOS 活性化を誘導する molsidomine をラットに投与し, eNOS 活性化が肝再生に影響するかどうかを検討した. molsidomine を投与した PVL (molsidomine-PVL) 群の術後 48 時間における FLR/BW 比および Ki-67 標識指数は, molsidomine を投与しなかった PVL 群に比べ有意に高く, ALPPS 群と同等であった (上図 CD). しかし, 術後 7 日目の長期的な FLR/BW 比には, PVL 群, ALPPS 群, モルシドミン投与 PVL 群の間で有意差はなかった.



DOI: 10.3748/wjg.v29.i5.867 Copyright ©The Author(s) 2023.

PVL 群と ALPPS 群の PV 流量は対照群のそれより有意に速かったが, PVL 群と ALPPS 群の PV 流量に有意差はなかった ( $180.1 \pm 54.4, 216.6 \pm 71.4 \text{ mm}^3/\text{s}$ ) (上図 A). PVL 群の HA 血流は, 外科的介入を行わないコントロール群より有意に遅かった ( $1.73 \pm 1.14$  vs  $3.66 \pm 0.74 \text{ mm}^3/\text{s}$ ,  $P < 0.05$ ) が, ALPPS 群のそれはコントロール群および PVL 群より有意に速かった ( $11.32 \pm 2.40 \text{ mm}^3/\text{s}$ ,  $P < 0.05$ ) (上図 B). 全血流, すなわち PV と HA の合計は PVL 群と ALPPS 群で有意差はなかった (上図 C).

以上から ALPPS における Akt-eNOS 経路の活性化は, 早期の肝再生を促進する重要な因子であると考えられる. NO 産生剤と PVL または PVE を併用することで, 術後短期間で肝再生が可能になれば, ALPPS に代わる低侵襲手術として臨床応用が期待される.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masuo Hitoshi, Shimizu Akira, Motoyama Hiroaki, Kubota Koji, Notake Tsuyoshi, Yoshizawa Takahiro, Hosoda Kiyotaka, Yasukawa Koya, Kobayashi Akira, Soejima Yuji	4. 巻 29
2. 論文標題 Impact of endothelial nitric oxide synthase activation on accelerated liver regeneration in a rat ALPPS model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 867 ~ 878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v29.i5.867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------