

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~2010

課題番号：21791292

研究課題名 (和文) 肝癌に対する肝移植後の再発・転移機構の解明とその制御に関する研究

研究課題名 (英文) Mechanism of recurrence in hepatocellular carcinoma after liver transplantation

研究代表者 居村 暁 (IMURA SATORU)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：90380021

研究成果の概要 (和文)：

肝移植後の再発は circulating cancer cell あるいは肝移植時すでに存在する micrometastasis による再発であり制御困難である。今回、脾注肝転移 (経門脈的) モデルを作成して癌細胞の肝転移メカニズムを検討した。MH134 マウス肝癌細胞脾注 1 週間後、IFN 投与群ではコントロールと比較し著明に肝転移個数が減少した。また、IFN 投与群の転移腫瘍内 MVD はコントロールと比較し有意に減少した。非癌部肝組織における接着因子発現の程度による肝転移促進効果は認めなかった。今後、肝切除+虚血再灌流を施行し、肝移植後の脾注肝転移による肝転移増強の有無につき研究を継続する。

研究成果の概要 (英文)：

The aim of this study was to clarify the mechanism of liver metastasis after liver transplantation. Splenic injection model was used as micrometastasis setting via portal vein. Macroscopic metastasis was observed in all mice, but IFN administration significantly decreased number of liver metastasis (19.3 versus 6.0, $p < 0.05$). Microvessel density was quantified using CD34 immunostaining and IFN significantly suppressed angiogenesis compared with control. Expression of adhesion molecules such as VCAM and ICAM did not correlate with IFN treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

肝機能不良肝癌あるいはコントロール不能な肝癌に対して、癌そのもののみならず背景にある肝硬変をも同時に治癒させ得る究極の肝癌治療である肝移植は、一部の肝癌では保険適応となり、施行例数は年々増加している。しかし移植後の再発・遠隔転移の予測

や予防法は未だ確立されていない。

肝移植後の肝癌再発を規定する因子を考える上で、肝切除やラジオ波治療のような局所治療後の再発と異なる点は、肝移植後の再発では多中心性発癌や肝内転移再発は存在せず、すべて循環血中に浮遊する癌細胞あるいは移植時、既に肝以外の臓器に存在してい

た micrometastasis (微小転移巣) による再発であるという点である。肝移植後の肝癌再発は、コントロール不能なグラフト内再発、他臓器転移が難治化の重要な一因としてあげられる。実際に我々はミラノ基準内肝癌に対する肝移植後、3年経過時にグラフト内再発をきたし肝切除を施行した症例を経験した。肝癌に対する肝移植後の再発危険因子として AFP や PIVKA-II 高値が報告されている (Transplantation, 2007) が、micrometastasis を術前に検索しうる方法は現在のところ確立されたものはなく、肝癌特に進行肝癌に対する肝切除後の再発予測・防止と同様に早急に解明すべき課題である。

2. 研究の目的

我々はこれまでに IFN による癌転移抑制、腫瘍増殖抑制に関する研究を行い、invasion assay やマウスを用いた実験で IFN の抗腫瘍効果に関する知見を得た。しかしながら癌細胞と接着分子との関連といった転移臓器への癌細胞着床のメカニズムを明らかにするには至っておらず本研究課題にて解明する。

3. 研究の方法

(1) 肝転移制御性の確立

肝癌細胞を脾注したマウスに IFN を投与し、細胞接着-浸潤、増殖といった癌転移の過程を抑制するか検討する。

※脾注肝転移モデル：マウスを用いた大腸癌肝転移モデルに分子科学的手法を用いて、微小肝転移巣の形成・検出を行い、臨床的意義につき報告しており (J Surg Res, 2002)、肝転移モデル作製は既に確立している。

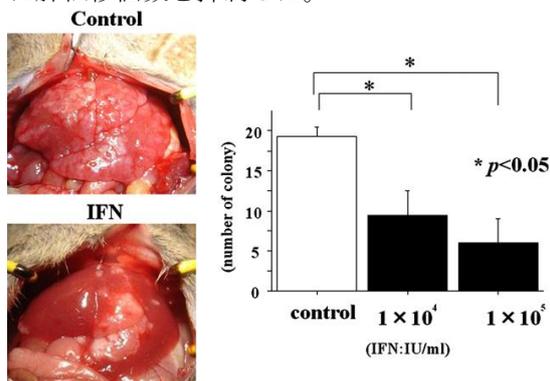
(2) 肝虚血再灌流モデル

肝転移機構解明とともに IFN による肝転移抑制効果について検討する。

4. 研究成果

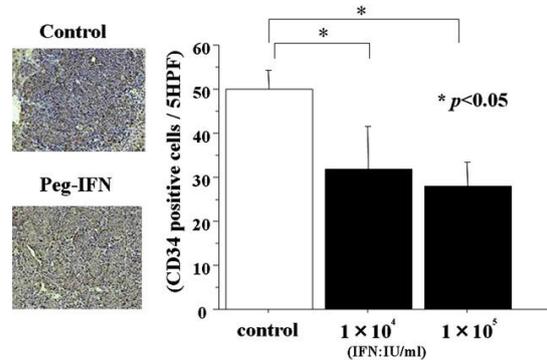
<肝転移抑制効果>

腫瘍コロニー形成数評価：マウス肝癌細胞 MH134 1×10^5 個を脾注後 24 時間後に IFN を皮下注した IFN 投与群では対照群と比較し有意に肝転移個数を抑制した。



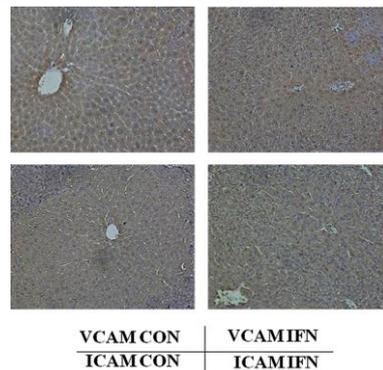
<血管新生抑制効果>

CD34 抗体を用いた免疫染色により転移腫瘍内部の microvessel density (MVD) を評価したところ、IFN 投与群では転移腫瘍内の MVD が対照群と比較し、有意に減少していた。



<接着因子発現の検討>

マウス非癌部肝組織における VCAM、ICAM の発現を検討したが IFN 投与群、対照群で差は認めなかった。

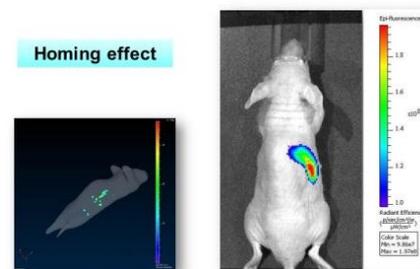


<転移臓器特異性の検討>

脾注肝転移モデルで肝転移巣を継代して高転移株を作成し、臓器親和性遺伝子を同定することは今回できなかった。しかし、Adipose tissue-derived regenerated cells (ADRC) をマウス肝切除モデルに尾静脈投与すると再生過程にある肝に強く集積することを Bio-imaging system で確認した。

大量肝切除後の再生肝に ADRC は集積する

70%Hx24hr後のADRCの体内分布



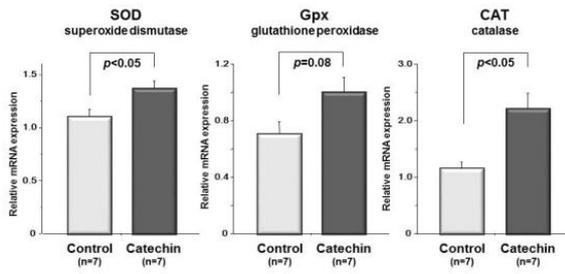
尾静脈から投与されたADRCは術後再生肝に強く集積

homing effect を示した。循環する癌細胞の場合、大量肝切除後の再生過程にある残肝や肝移植におけるグラフト再生期における臓器特異性集積についても同様の分子機構が関与している可能性が考えられ、今後検討したい。またその際に、この bio-imaging system は有用な評価法として応用可能と考える。

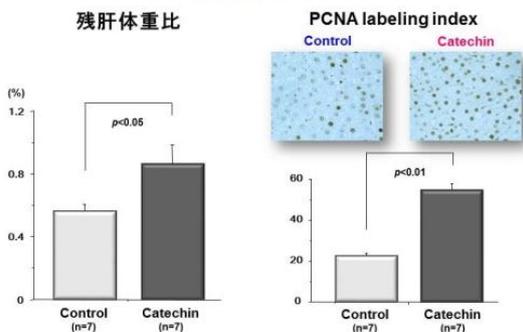
<肝再生と癌増殖の制御>

移植後肝再生と肝癌増殖との関係も重要な検討課題である。抗酸化・抗炎症作用、抗癌作用、抗動脈硬化作用、抗菌・抗ウイルス作用など様々な作用を示すポリフェノール的一种である Catechin は、肝切除後あるいは肝移植後の脾注肝転移モデルにおいて肝癌増殖抑制効果を示すことが予想される。

我々はこれまでに 90%肝切除モデルに Catechin を投与し、preliminary ではあるが、肝再生、抗酸化作用を増強するという知見を得ており、肝転移モデルでの検討を計画している。



Catechin投与により残肝組織中抗酸化マーカーが上昇



Catechin投与により残肝再生率が上昇

<非癌部肝組織の遺伝子発現の解析>

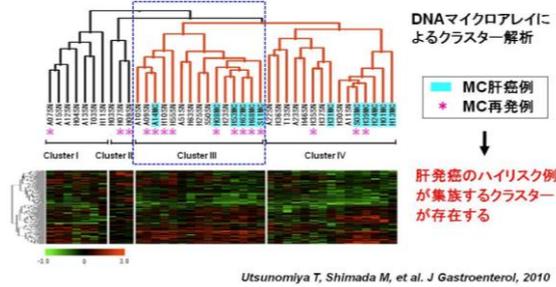
肝癌症例の非癌部肝組織における遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析し、スタスミンなどの Oncoprotein 発現が増強している肝癌ハイリスク例が存在する、すなわち肝発癌リスクに関与する分子遺伝学的特徴が存在することを明らかにした。

したがって肝転移モデルの肝組織で遺伝子発現を網羅的に解析し、これらの発現結果と対比することで、肝移植後の肝癌再発はすべて循環血中に浮遊する癌細胞あるいは移

植時、既に肝以外の臓器に存在していた micrometastasis (微小転移巣) による再発であることが確認できると考える。

非癌部肝組織の遺伝子発現と肝発癌

~多中心性発癌の遺伝子発現パターン~



<今後の予定>

肝切除+虚血再灌流を施行し、肝移植後の脾注肝転移による肝転移増強の有無につき研究を継続する。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori M. Molecular signatures of noncancerous liver tissue can predict the risk for late recurrence of hepatocellular carcinoma. J Gastroenterology 2010;45(2):146-152. (査読有り)

2. Arakawa Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T. Effects of Pegylated Interferon α 2b on Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. J Surg Res 2010, in press (査読有り)

3. Kanamoto M, Shimada M, Morine Y, Yoshizumi T, Imura S, Ikegami T, Mori H, Arakawa Y. Beneficial Effects of Follistatin in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injuries in Rats. Dig Dis Sci 2010, in press (査読有り)

[学会発表] (計 16 件)

1. 齋藤裕、居村暁、(12 名中 10 番目). 肝細胞癌の術後再発予測における術前 AFP-L3 分画の役割
第 72 回日本臨床外科学会総会
平成 22 年 11 月 21-23 日

2. 居村暁. 成人生体肝移植施行例の短期成績

第 72 回日本臨床外科学会総会
平成 22 年 11 月 21-23 日

3. 宇都宮徹、居村暁 (9 名中 3 番目) .
臨床病理学および分子遺伝学的特徴から
みた非 B 非 C 型肝癌発生のメカニズム
第 21 回日本消化器癌発生学会総会
平成 22 年 11 月 18 日

4. 居村暁.
肝癌再発形式からみたサルベージ肝移植の
可能性
第 21 回日本消化器癌発生学会総会
平成 22 年 11 月 18 日

5. 居村暁.
進行肝癌に対する補助療法としての IFP 療法
の有用性およびソラフェニブの適応提案
第 48 回日本癌治療学会総会
平成 22 年 10 月 28-30 日

6. 岩橋衆一、居村暁 (13 名中 10 番目) .
再発肝癌に対する肝移植の可能性
第 48 回日本癌治療学会総会
平成 22 年 10 月 28-30 日

7. 居村暁.
肝切除後、長期生存のための条件およびサル
ベージ肝移植施行のタイミングの検討
第 48 回日本癌治療学会総会
平成 22 年 10 月 28-30 日

8. 居村暁.
再発肝癌に対するサルベージ肝移植の可能
性
平成 22 年 10 月 20-22 日

9. 齋藤裕、居村暁 (10 名中 4 番目) .
マウス切除肝における脂肪由来幹細胞の肝
細胞へ分化
第 69 回日本癌学会学術総会
平成 22 年 9 月 22-24 日

10. 宇都宮徹、居村暁 (7 名中 3 番目) .
非 B 非 C 肝癌の臨床病理学および分子遺伝
学的特徴に関する検討
第 69 回日本癌学会学術総会
平成 22 年 9 月 22-24 日

11. 森大樹、居村暁 (10 名中 4 番目) .
ミラノ外肝癌切除後の再発様式からみた肝
移植適応と補助化学療法としての IFP 療法の
有用性
第 65 回日本消化器外科学会総会
平成 22 年 7 月 14-16 日

12. 宇都宮徹、居村暁 (5 名中 3 番目) .

非癌部肝組織の遺伝子発現解析に着目した
肝細胞癌分子マーカーの探索
第 46 回日本肝臓学会総会
平成 22 年 5 月 27-28 日

13. 居村暁.
肉眼的脈管侵襲陽性肝癌に対する IFP 療法
の効果および切除不能肝癌に対するソラフ
ェニブの使用経験
第 96 回日本消化器病学会総会
平成 22 年 4 月 22-24 日

14. 森大樹、居村暁 (11 名中 3 番目) .
肝移植後の再発肝癌に対する治療戦略と肝
移植後 Follow up の問題点
第 96 回日本消化器病学会総会
平成 22 年 4 月 22-24 日

15. 宇都宮徹、居村暁 (3 名中 3 番目)
非癌部肝組織における遺伝子発現解析に基
づく新規分子マーカーの探索
第 96 回日本消化器病学会総会
平成 22 年 4 月 22-24 日

16. 西正暁、居村暁 (12 名中 10 番目) .
=肝細胞癌における IFI27 遺伝子発現の臨床
病理学的特徴
第 110 回日本外科学会定期学術集会
平成 22 年 4 月 8-10 日

6. 研究組織
(1) 研究代表者
居村 暁 (IMURA SATORU)
徳島大学・病院・助教
研究者番号 : 90380021

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
島田光生 (SHIMADA MITSUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・教授
研究者番号 : 10216070

森根裕二 (MORINE YUJI)
徳島大学・病院・助教
研究者番号 : 60398021