

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591410

研究課題名（和文） 4次元生体内顕微鏡検査法を用いた新たな肝癌微小環境観察と肝癌増殖、転移の抑制

研究課題名（英文） A new model for studies of microenvironment in hepatocellular cancer using 4-dimensional intravital microscopy and the inhibition of the development and the metastasis of HCC.

研究代表者

武市 卒之（TAKEICHI TAKAYUKI）

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00380999

研究成果の概要（和文）：

本研究は、マウスを用いた肝癌同所性移植モデルで、4次元生体内顕微鏡検査法を用いて、宿主生存状態の肝癌組織における微小血管システムや腫瘍細胞、白血球との関係を real time に映像化、分析することにより、肝癌治療につなげることを目的とした。腫瘍内の血管数は正常肝の血管数に比べ有意に増加し、腫瘍内へ流入する血管内の白血球は、ランダムに遊走していた。この検査法は微小循環での肝癌組織における癌の増殖、浸潤、転移の病態の解明に寄与できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We describe the use of 4D intravital microscopy which represents an advantageous technology for the investigation of the microvascular system and leukocyte migration in HCC. We showed that although vessel density in HCC was lower than in normal liver, tumor tissue was moderately infiltrated with leukocytes. Most tumor-infiltrating leukocytes migrated in a random manner frequently changing direction of migration in the tumor tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・外科学一般

キーワード：肝癌、移植、蛍光顕微鏡、微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) は我が国の悪性新生物による死因第 4 位であり、年間 35000 人以上が死亡している。HCC に対する治療法は、外科手術を中心に良くなっている一方で、5 年生存率はまだ満足いくものではなく、さらなる新しい治療法が求められている。

近年、癌細胞の研究は、癌細胞そのものの研究から、癌を取り巻く微小環境、すなわち癌細胞と各種免疫担当細胞 (T 細胞、B 細胞、マクロファージ、好中球など)、間質細胞 (血管内皮細胞など) の相互作用の重要性が認識されてきた。HCC においても腫瘍免疫反応は、癌の増殖、浸潤、転移において多大な影響を与えていることがわかってきており、HCC 組織において、IL-10 の過剰産生や樹状細胞の機能活性の低下のような免疫抑制機構が指摘されたり、制御性 T 細胞と細胞障害性 T 細胞の間の腫瘍内での balance が、HCC 患者の再発、生存率に関連するとの報告もみられる。また、HCC 患者での血中および腫瘍中の骨髓由来細胞の増加も指摘されている。

一方で、癌微小環境における炎症細胞が、癌の発育、増殖に関与していることがわかりつつあり、これまで炎症のマーカーであった白血球は、癌免疫細胞としての重要な役割をもつことが示唆されている。特に、循環白血球が組織へ入り込む白血球動員 (leukocyte recruitment) は、血管内皮への rolling に伴う抗癌免疫反応の重要な step を表すことがわかってきた。しかし、HCC 組織での白血球動員の正確なメカニズムは、これまでほとんど検討されていなかった。これまでの多くの研究が、in vitro あるいは免疫組織学的な検討が中心であり、組織への白血球侵入の動的な検討は、技術的な限界もあり施行されて

いなかった。我々は、この点に着目しハイデルベルク大学外科教室と共同研究で、これまで HCC 微小環境での白血球動員、遊走につき研究し、新たな 4 次元経時的デジタル生体顕微鏡検査法を考案し、生存状態での長期間の HCC 微小環境での血管系と白血球の動的变化を 4 次元 (3 次元+時間) で映像化することに成功した。

この方法では、EGFP トランスジェニックマウスを用い、肝癌細胞株を同所性にこのマウスに移植し、癌が増殖した後、観察前に蛍光試薬を投与し、共焦点顕微鏡にて励起光を当て観察することで、血管系および白血球を、同時に生きたまま real time に観察できる。この方法を発展させ、特に正常肝組織と腫瘍組織との境界での微小環境を解析・分析することで、HCC の増殖、転移を解明する key となるのではないかと考えた。また、免疫抑制剤、抗血管新生剤、抗炎症剤の投与し、観察することで、肝癌の増殖、浸潤を抑制させる因子を解明する可能性もあると考える。これらが、肝がん患者の肝切除後の予後予測因子、肝癌に対する肝移植適応基準の再考などの臨床応用へつながることができればと考える。

## 2. 研究の目的

本研究は、小動物 (マウス) を用いた肝癌同所性移植モデルにおいて、新たに考案した 4 次元生体内顕微鏡検査法を用いて、生存状態の肝癌組織における微小環境での腫瘍細胞、白血球との関係を real time に映像化、分析することにより、癌の増殖、浸潤、転移の病態解明を行い、最終的にそれらを分子免疫学的治療を含めた肝癌治療につなげることを目的としている。

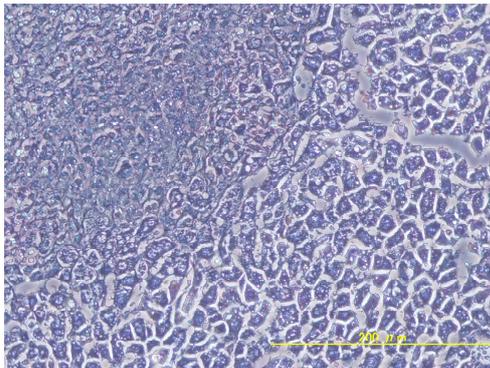
## 3. 研究の方法

①マウス肝癌移植モデルの作成

- ②共焦点蛍光レーザー顕微鏡による観察
- ③正常組織とHCCとの境界での微小環境の検討
- ④免疫組織学検査との比較検討

#### 4. 研究成果

- (1) 腫瘍内の血管数は正常肝の血管数に比べ有意に増加していた。(図1)
- (2) 腫瘍内へ流入する血管内の白血球は、ランダムに遊走していた。
- (3) 腫瘍内と腫瘍外での白血球の遊走速度に関しては有意差を認めなかった。
- (4) Hepa1-6を用いた癌移植モデルでは、腫瘍の増殖が不良であった。



(図1)

4次元生体内顕微鏡検査は、今後、肝癌微小環境観察を行う上での検査法の一つとして、期待できると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等 (雑誌論文) (計 10 件)

1. [Takeichi T](#), Asonuma K, Narashimhan G, Lee KJ, [Yamamoto K](#) & [Yukihiro Inomata](#). Rescue for the steroid resistant rejection after living donor liver transplantation by temporary use of sirolimus. Hepatogastroenterology. in press.
2. [Honda M](#), Asonuma K, Hayashida S, Suda H, Ohya Y, [Lee KJ](#), [Yamamoto H](#), [Takeichi T](#),

- [Inomata Y](#). Incidence and risk factors for new-onset diabetes in living-donor liver transplant recipients. Clin Transplant. 2013.
- 3. Ohya Y, Isono K, Obayashi K, Hayashida S, [Lee KJ](#), [Yamamoto H](#), [Takeichi T](#), Asonuma K, Ando Y, Inomata Y. Peritransplant Gastrointestinal Symptoms in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Exp Clin Transplant. 2013.
- 4. [Honda M](#), [Takeichi T](#), Asonuma K, Tanaka K, Kusunoki M, [Inomata Y](#). Intravital imaging of neutrophil recruitment in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. Transplantation. 95:551-8, 2013
- 5. [Takeichi T](#), Asonuma K, [Yamamoto H](#), Ohya Y, Okumura K, [Lee KJ](#), [Inomata Y](#). Liver Transplant From an ABO-Incompatible and Hepatitis C Antibody-Positive but an HCV-RNA Negative Living Donor in a Familial Amyloid Polyneuropathy Patient. Exp Clin Transplant. 10, 2012.
- 6. [Takeichi T](#), Narita Y, [Lee KJ](#), [Yamamoto H](#), Asonuma K, [Inomata Y](#). Sclerosing encapsulating peritonitis after living donor liver transplantation: a case successfully treated with tamoxifen: report of a case. Surg Today. 26, 2012
- 7. Asonuma K, Ohya Y, Isono K, [Takeichi T](#), [Yamamoto H](#), [Lee KJ](#), Okumura K, Ando Y, Inomata Y. Current state of domino transplantation in Japan in terms of surgical procedures and de novo amyloid neuropathy. Amyloid. 19 :75-7, 2012
- 8. [Honda M](#), [Takeichi T](#), Ohya Y, Okumura K, [Lee KJ](#), [Yamamoto H](#), Asonuma K, [Inomata Y](#). A thoracoabdominal approach in revision of the hepatic hilum after left lobe living donor liver transplantation. J Pediatr Surg. 47:13-6, 2012

9. Honda M, Yamamoto H, Hayashida S, Suda H, Ohya Y, Lee KJ, Takeichi T, Asonuma K, Inomata Y. Factors predicting persistent thrombocytopenia after living donor liver transplantation in pediatric patients. *Pediatr Transplant.* 15:601-5,2011.
10. Honda M, Lee KJ, Hashimoto S, Hayashida S, Suda H, Ohya Y, Yamamoto H, Takeichi T, Asonuma K, Inomata Y. Development of hepatic angiomyolipoma accompanied with focal nodular hyperplasia long after treatment of pelvic rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Surg.* 46:1267-70, 2011

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武市 卒之 (TAKEICHI TAKAYUKI)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00380999

##### (2) 研究分担者

猪股裕紀洋 (INOMATA YUKIHIRO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：50193628

##### (3) 連携研究者

山本 栄和 (YAMAMOTO HIDEKAZU)  
熊本大学・医学薬学研究部・助教  
研究者番号：10378101

李 光鐘 (LEE KWANG-JONG)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00467995

##### (4) 研究協力者

本田 正樹 (HONDA MASAKI)  
熊本大学・医学部附属病院・病院教員  
研究者番号：なし