

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24年 5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659239

研究課題名（和文） マルチオミクス統合解析アノテーションに基づく分子標的強化門脈塞栓術と肝肥大効率化

研究課題名（英文） Discovery omics for molecular targeted portal vein embolization and the efficiency of enlargement of the liver

研究代表者

小野川 徹 (ONOGAWA TOHRU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50431557

研究成果の概要（和文）：マウスの全肝容積の約 60%を占める左内側及び外側葉へ流入する門脈血行路を結紮遮断するモデルを作製、*Nrf2*^{-/-}、*Keap1*^{f/f-Alb}、Wild type マウスで行い非結紮葉の肥大の程度、mRNA 発現、タンパク質発現につき比較検討した。*Nrf2*^{-/-}、Wild type マウスに対して解析を行ったところ、PBL 施行群の非結紮葉において Wild type では *Nrf2*^{-/-} に比べ有意な肥大を認めた。また *Nrf2* の核での蓄積は認められなかったが、PBL 施行後の Wild type において、非結紮葉では結紮葉に比べ *Nrf2* の標的遺伝子 *Nqo1* の mRNA、タンパク質量ともに有意に増加し、術後 7 病日では門脈結紮に対する反応が終息しつつある事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Portal vein Branch Ligation model was raised, we examined the liver enlargement rate of non-ligation lobe, and expressions of mRNA and proteins of the target molecule of *Nrf2* in *Nrf2* knockout mouse, liver specific *Keap1* knockout mouse, and wild type. In the wild type showed enlargement of the liver in the non-ligation lobe significant compared to *Nrf2* knockout mice. In addition, expression of *Nqo1* in non-ligation lobe was significantly increased compared to the ligation lobe.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：肝臓外科学

キーワード：門脈塞栓、マルチオミクス、肝細胞、肝肥大

1. 研究開始当初の背景

肝臓がんや進行胆道がん症例は、拡大肝葉切除術によりその治療成績は向上しつつある。しかし、大量の肝切除により肝不全死などの合併症が多く引き起こされ、これが在院

死の主因のひとつとなっている。このため、現在の肝胆膵外科領域においては、大量の肝切除が予定される場合、術後肝不全を予防するための術前処置として、門脈塞栓術 (Portal vein embolization) が施行される。

門脈塞栓術は、1982年に幕内らによって始められた手法で、切除予定部の門脈を選択的に塞栓すると施行後2~3週間で塞栓肝が萎縮し、代償的な非塞栓肝の機能的・形態的再生が促されるために残肝機能の向上が得られる。塞栓肝が遮断され、非塞栓肝の血流が増加することが要因と考えられ、これまで、門脈塞栓前後の肝再生等の機能的・形態的検討の報告はあるが、なぜ門脈塞栓により非塞栓肝が増大するのか、その詳細な分子機構は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

ヒト門脈塞栓術は、非塞栓肝の再生を目的として、肝細胞がんや胆道がんにおける拡大肝葉切除手術の術前処置として行われる。この肝臓の再生メカニズムの解明を目的として、ヒト門脈塞栓術の代用としてマウスに門脈枝結紮を行い、非結紮肝の増殖における分子メカニズムを解析する。特に、肝切除マウスの解析により肝臓における増殖に寄与することが明らかとなった **Keap1-Nrf2** システムに着目する。最終的には、ヒトにおける門脈塞栓術への応用を目的として、非結紮肝の増殖促進、および肝予備能向上の効率化を図るために、鍵となる増強因子を特定する。

3. 研究の方法

近年、酸化ストレスや親電子性ストレスに対する生体防御系酵素群の発現制御にはたらく転写因子Nrf2は、分化・増殖シグナルであるNotch1を介して肝切除後の肝再生に寄与していること (Wakabayashi et al.) が報告され、細胞増殖におけるNrf2の役割が示された。そこで、Keap1-Nrf2システムが門脈塞栓後の肝増殖に関与するのではないかと考え、肝増殖分子機

構への関与を検討し、現行の手法における効果増強や効率化の可能性を探ることとした。

(1) マウス門脈枝結紮モデルの作製

実診療で最も施行される肝右葉内門脈塞栓 (全肝容積の60~70%) を想定したヒト門脈塞栓術の代用として、マウス全肝容積の70%を閉める左葉及び中葉へ流入する門脈血行路を結紮・遮断した門脈枝結紮モデルを作製した。

(2) マウス門脈枝結紮による肝病態の検討
各群を小動物CTにて経時的に撮影し、肝容積計算を行なった。また、血算生化学検査、肝重量増大率や組織学的変化、肝細胞のDNA合成量をBrdUの取り込みやKi-67で評価した。

(3) マウス門脈枝結紮による肝臓におけるKeap1-Nrf2 関連分子の発現変動

各群の結紮肝および非結紮肝よりRNAを抽出してDNAマイクロアレイ解析、Nrf2mの活性化 (核蓄積) をWestern blotにて評価する。また、Nrf2 標的因子の発現をリアルタイムPCRによりmRNAレベルで、Western blot 及び組織切片を用いた免疫染色によりタンパク質レベルで検討する。

4. 研究成果

マウスの全肝容積の約60%を占める左内側葉および左外側葉へ流入する門脈血行路を結紮遮断するモデル (Portal vein Branch Ligation; PBL) を作製し、コントロールとして単開腹モデル (sham) も同時に作製、上記手技を *Nrf2*^{-/-}マウス (*Nrf2* ノックアウトマウス)、*Keap1*^{f/f-Alb}マウス (肝特異的 *Keap1* ノックアウトマウス)、Wild type マウスで行い非結紮葉の肥大の程度、mRNA 発現、タンパク質発現につき比較検討した。

個体数を確保できた *Nrf2*^{-/-}マウス、Wild type マウスに対して解析を行ったところ、

PBL 施行群の非結紮葉において Wild type マウスでは *Nrf2*^{-/-} マウスに比べ有意な肥大を認めた。また *Nrf2* の核での蓄積は認められなかったが、PBL 施行後の Wild type マウスにおいて、非結紮葉では結紮葉に比べ *Nrf2* の標的遺伝子 *Nqo1* の mRNA の発現、タンパク質量ともに有意に増加し、術後 7 病日の段階では門脈結紮に対する反応が終息しつつある事が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yoshida H, Katayose Y, Rikiyama T, Motoi F, Onogawa T, Egawa S, Unno M. Segmentectomy of the liver. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2012 Jan;19(1):67-71. DOI: 10.1007/s00534-011-0448-8
- ② Maeda S, Motoi F, Onogawa T, Morikawa T, Shigeru O, Sakata N, Takadate T, Naitoh T, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Paclitaxel as second-line chemotherapy in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer: a retrospective study. Int J Clin Oncol. 2011 Oct;16(5):539-45. DOI: 10.1007/s10147-011-0220-8
- ③ Sakata N, Egawa S, Rikiyama T, Yoshimatsu G, Masuda K, Ohtsuka H, Ottomo S, Nakagawa K, Hayashi H, Morikawa T, Onogawa T, Yamamoto K, Yoshida H, Akada M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Unno M.

Computed tomography reflected endocrine function of the pancreas. J Gastrointest Surg. 2011 Mar;15(3):525-32.

DOI: 10.1007/s11605-010-1406-5

- ④ Abe M, Toyohara T, Ishii A, Suzuki T, Noguchi N, Akiyama Y, Shiwaku HO, Nakagomi-Hagihara R, Zheng G, Shibata E, Souma T, Shindo T, Shima H, Takeuchi Y, Mishima E, Tanemoto M, Terasaki T, Onogawa T, Unno M, Ito S, Takasawa S, Abe T.

The HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin stimulates insulin secretion through organic anion transporter polypeptides.

Drug Metab Pharmacokinet.

2010;25(3):274-82.

DOI:10.2133/dmpk.25.274

- ⑤ Egawa S, Motoi F, Sakata N, Kitamura Y, Nakagawa K, Ohtsuka H, Hayashi H, Morikawa T, Omura N, Ottomo S, Yoshida H, Onogawa T, Yamamoto K, Akada M, Rikiyama T, Katayose Y, Matsuno S, Unno M.

Assessment of Frey procedures:

Japanese experience.

J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2010

Nov;17(6):745-51.

DOI: 10.1007/s00534-009-0185-4

[学会発表] (計 9 件)

- ① Takadate T, Onogawa T, et al. Proteomic Forecast of Postoperative Prognosis of Pancreatic Cancer using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. American Pancreatic Association

- Annual Meeting 2011 平成 23 年 11 月 4 日 (Chicago, アメリカ)
- ② 高舘達之, 小野川徹ら
膵癌診療情報アーカイブと FFPE 組織プロテオーム解析からの外科治療抵抗性予測
第 16 回日本外科病理学会学術集会 平成 23 年 9 月 29 日 (大阪)
- ③ 前田晋平, 小野川徹ら
胆管癌 FFPE 組織からの癌特異的プロテオーム解析データに基づく新規診断戦略
第 16 回日本外科病理学会学術集会 平成 23 年 9 月 29 日 (大阪)
- ④ 前田晋平, 小野川徹ら
Discovery Proteomics using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues of Cholangiocarcinoma.
第 69 回日本癌学会総会 平成 22 年 9 月 12 日 (大阪)
- ⑤ 高舘達之, 小野川徹ら
Proteomic Analysis of Pancreatic Cancer Prognosis using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue.
第 69 回日本癌学会総会 平成 22 年 9 月 12 日 (大阪)
- ⑥ 前田晋平, 小野川徹ら
胆道癌 FFPE 組織を用いた網羅的プロテオーム解析による新規バイオマーカーの探索と検証
日本プロテオーム学会 2010 年会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 平成 22 年 7 月 26 日 (舞浜)
- ⑦ 小野川徹, 高舘達之ら
ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片の臨床プロテオーム解析における基礎パラメータの検討-JHUPO FFPE

- Clinical Proteome Initiative-
日本プロテオーム学会 2010 年会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 平成 22 年 7 月 26 日 (舞浜)
- ⑧ Takadate T, Onogawa T, Motoi F, et al.
Discovery of Prognostic Factor using Proteomic Analysis with Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues of Pancreatic Cancer.
第 14 回国際膵臓学会 平成 22 年 7 月 11 日 (福岡)
- ⑨ Maeda S, Motoi F, Onogawa T, et al.
The effectiveness of paclitaxel for gemcitabine-refractory pancreatic cancer.
第 14 回国際膵臓学会 平成 22 年 7 月 11 日 (福岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称: 膵臓癌診断・予後予測バイオマーカー

発明者: 小野川徹、海野倫明、元井冬彦、高舘達之

権利者: 国立大学法人 東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-137320

出願年月日: 平成 23 年 6 月 21 日

国内外の別: 国内

②名称: 胆道癌診断バイオマーカー

発明者: 小野川徹、海野倫明、前田晋平

権利者: 国立大学法人 東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-107624

出願年月日: 平成 23 年 5 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野川 徹 (ONOGAWA TOHRU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50431557

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし