

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670583

研究課題名(和文) 癌進展及び創傷治癒における脾臓由来マクロファージを用いた革新的治療法の開発

研究課題名(英文) The role of macrophage of spleen in wound healing and cancer progression

研究代表者

調 憲 (Shirabe, Ken)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：70264025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：創傷治癒における脾臓マクロファージの役割を明らかにする目的で、マウス皮膚欠損モデルを作成し、FACSscanにて創傷治癒に関連があるとされたマクロファージであるLy6Cの単球を採取、分離することが可能となった。皮膚欠損モデルに脾臓摘出を併設したが、創の縮小には脾摘群とコントロール群では明らかな差はなかった。

肝臓に対する肝切除成績は、肝切除と脾臓摘出を同時に行った症例では脾腫のない症例と同等の生存率、無再発生存率で、脾摘により改善していた。免疫抑制性の環境を作り出している脾臓を摘出することで肝臓に対する免疫応答が改善した可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In terms of wound healing study, skin defect mice model was established. And Ly6C macrophage, which was reported to be related to wound healing, was harvested from spleen. Although splenectomy in skin defect mice model was performed, there was no significant difference in wound healing between mice with and without splenectomy.

In terms of cancer progression, our clinical data showed that splenomegaly was significant poor prognostic factor after hepatectomy for hepatocellular carcinoma (HCC). The prognosis after hepatectomy for HCC and simultaneous splenectomy for splenomegaly was same as that in those who underwent hepatectomy for HCC and without splenomegaly. Splenectomy may improve long term prognosis after hepatectomy. We showed that the number of immunosuppressive cells increased in the spleen in the patients with liver cirrhosis (LC). Therefore, in the patients with LC, the cause of immunosuppressive state may be spleen.

研究分野：肝臓外科学

キーワード：脾臓 創傷治癒 肝臓 免疫

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ(M ϕ)は重要な免疫担当細胞として認識されてきたが、最近二面的な働きが明らかになってきた。すなわち、異物の貪食や抗原提示を行う免疫促進的(Th1)M1M ϕ

と、免疫抑制的(Th2)M2M ϕ とが一般的に知られている。創傷治癒の場においてはM1M ϕ はIL-6、TNF α 、IL-23、IL-12のケモカインやサイトカインを生産することで貪食細胞を遊走し損傷組織のクリーンアップを行い、M2M ϕ はVEGFなどを生産することで間質や血管新生によるモデリングを行う。一方、M2M ϕ は腫瘍関連M ϕ (TAM)として腫瘍進展に大きな役割を担っていることが報告されている(J Immunol 2009, 2010, PLoS Med 2006, 2008)。

今回我々は、創傷治癒および肝細胞癌進展における脾臓由来の単球の役割に関する仮説を検証し、治療への応用を図る。

2. 研究の目的

創傷治癒と癌、とくに肝細胞癌の進展における脾臓のマクロファージの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)創傷治癒における脾臓の役割

マウスにおける皮膚欠損モデルを作成する。ついで、創傷治癒に重要とされるLy6Cの単球を単離する。皮膚欠損マウスにおいて脾臓を摘出し、皮膚欠損面積を経時的に測定する。この方法により、創傷治癒を客観的に測定し、影響を検討する。さらに脾臓摘出後にLy6C単球を腹腔内に散布し、その皮膚欠損マウスに与える影響を明らかにする。

(2)肝細胞癌進展における脾臓の役割

肝細胞癌切除例における脾臓の役割を明らかにする目的で、以下の臨床的検討を行う。まず、肝細胞癌に対する肝切除症例(n=208)で術前の脾臓の容積をCTにおいて3Dvolumetryで測定する。

脾臓容積 300ml以上を脾腫と定義し、脾

腫のあり(n=25)、なし(n=162)の症例で術後生存率、無再発生存率を算定し、脾腫が予後因子となるか、否かを明らかにする。

ついで肝切除と同時に脾摘術を行った症例(n=21)の予後を検討し、脾摘の予後に与える意義を生存率、無再発生存率の上から明らかにする。これによって脾摘出が癌の再発、生命予後に関与するかを明らかにすることを目的とする。

4. 研究成果

(1)創傷治癒における脾臓の役割

創傷治癒に関する研究ではマウス皮膚欠損モデルを作成し、FACScanにて創傷治癒に関連があるとされたマクロファージであるLy6Cの単球を採取、分離することが可能となった。皮膚欠損モデルに脾臓摘出を併設したが、創傷の縮小には脾臓群とコントロール群では明らかな差はなかった。単離したLy6C陽性細胞の腹腔内注入でも明らかな効果は認められなかった。

(2)肝細胞癌進展における脾臓の役割

一方、肝細胞癌に対する肝切除成績の検討で、CT画像を用いた3次元構築における脾臓容積 300ml以上を脾腫と定義した。脾容積 300ml未満の症例に比べて、術後の生存率、無再発生存率ともに脾腫合併症例では有意に不良であった。多変量解析でも脾臓容積 300ml以上は有意な予後不良因子であった。

肝切除と脾臓摘出を同時に行った症例では脾臓容積 300ml未満の症例と同等の生存率、肝細胞癌の無再発生存率であり、肝細胞癌の再発を含めて長期予後は脾摘により改善していた(論文投稿中)。

臨床の場において脾臓の役割については不明な点が多い。正常の脾臓を摘出すると、小児において感染症の発生頻度が高まることが報告されていた。さらに近年、成人においても感染症の頻度が高まることが報告されている(Theilacker C, et al. Clin Infect Dis. 2016 Apr 1;62(7):871-8.)。

すなわち、細菌に対する抗体産生の場としての脾臓の重要性が指摘されている (OPSI: overwhelming post-splenectomy infection)。

一方、感染防御の臓器以外の役割がとくに肝臓との連関において報告されている。以前われわれは肝硬変症例で脾臓を摘出することで、肝機能が改善すること (Anegawa G, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2009 ;24(9):1554-8.) や脾臓摘出によって肝再生が促進されること (Tomikawa M, et al. J Am Coll Surg. 1996 ;182(1):12-6). を示した。また、血小板由来のセロトニンが肝再生の促進因子となりえることを示した (Yoshizumi T, et al. Transplant Proc. 2015 ;47(3):683-5.)。これは脾臓摘出で増加する血小板によって肝再生が促進される可能性を示唆している。

しかしながら、今回の肝細胞癌に対する肝切除成績の向上は脾摘による肝機能改善効果や再生促進によっては十分説明されない。なぜなら、肝細胞癌の再発をも脾摘出が減少させ、結果として生存率を改善しているからである。

われわれは脾臓が肝硬変症例においては免疫抑制的に機能している可能性をその原因として考えている。以前、C型肝硬変症例で摘出された脾臓の組織では免疫抑制性の CD4 陽性の regulatory T cell や PD-L1, L2 陽性細胞が増加していることを報告した。さらに脾臓を摘出後は末梢血中の PD-1 陽性の細胞が減少していることを見出した (Hashimoto N, Shirabe K, et al. Clin Exp Immunol. 2011 ;165(2):243-50)。

さらに、われわれの検討では、肝硬変では脾臓のみならず、末梢血中の regulatory T cell や PD-L1 陽性細胞が増加していた。脾臓摘出後は、このような免疫抑制系の T 細胞が減少した。

このような免疫抑制性の環境を作り出し

ている脾臓を摘出することで肝細胞癌に対する免疫応答が改善し、予後が改善した可能性があると考えている。

仮説として今後とも研究をすすめていく予定である。

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 1 件)

1. Kawanaka H, Akahoshi T, Kinjo N, Harimoto N, Itoh S, Tsutsumi N, Matsumoto Y, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Laparoscopic Splenectomy with Technical Standardization and Selection Criteria for Standard or Hand-Assisted Approach in 390 Patients with Liver Cirrhosis and Portal Hypertension. J Am Coll Surg. 2015 Aug;221(2):354-66.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 木村光一、武石一樹、川中博文、坂田一仁、下川雅弘、吉田佳弘、今井大祐、別城悠樹、伊藤心二、播本憲史、池上 徹、吉住朋晴、調 憲、前原喜彦。第 22 回日本門脈圧亢進症学会 「肝細胞癌肝切除における脾容積の意義と脾摘術の効果」パシフィコ横浜アネックスホール、2015 年 9 月 10-11 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

調 憲 (SHIRABE Ken)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：70264025

(2) 研究分担者

副島 雄二 (SOEJIMA Yuji)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：30325526

池田 哲夫 (IKEDA Tetsuo)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：60585701

吉住 朋晴 (YOSHIZUMI Tomoharu)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80363373

池上 徹 (IKEGAMI Toru)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80432938

(3) 連携研究者

()

研究者番号：