

令和元年5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16441

研究課題名(和文)肝動脈塞栓療法後の腫瘍新生/進展効果の評価および抑制方法の探索

研究課題名(英文)Oncogenesis after hepatic arterial embolization

研究代表者

上嶋 英介(Ueshima, Eisuke)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：40645561

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)：N1S1ラット肝癌モデルを用いて肝動脈塞栓術を施行した。塞栓48時間後に屠殺し、病変検体を摘出した。組織の免疫染色では局所のTGF- β 1発現の増加が見られたが、末梢血中のTGF- β 1では上昇はなかった。肝動脈塞栓後のTGF- β 1産生のメカニズムを解明するため、細胞実験を行った。同肝癌細胞を48時間低酸素培養した結果、培養液中のTGF- β 1の上昇が見られた。また、低酸素培養下でのHIF-1 α 発現を抑えると、TGF- β 1の発現が有意に抑制された。以上より、TGF- β 1およびHIF-1の発現は低酸素によるものと思われるが、それぞれが共依存性に作用し合っている可能性が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝動脈塞栓術後の癌微小環境において、TGF- β 1およびHIF-1が有意に発現していることが分かった。これらは低酸素により発現が促されており、お互い共依存的に上昇することが示された。現在、TGF- β 1およびHIF-1の上昇から肝癌の再発・転移に繋がる複数の経路が判明している。これらの一部あるいは複数箇所に作用する阻害薬や抗体を用いることで、肝動脈塞栓術後の再発・転移を抑制し、予後の延長に寄与する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rats bearing N1S1 hepatoma cells underwent HAE. Animals were euthanized at 48h, and liver tissues were harvested. IHC and qPCR were performed to compare the expression of TGF- β 1. In vitro experiments with the N1S1 cell line were performed under hypoxic conditions for 48h, and the expression of TGF- β 1 and HIF-1 was assessed with western blotting and ELISA. IHC showed that both the TGF- β 1 and HIF-1-positive areas were larger in the HAE group than in the sham group. Similarly, qPCR showed that the mRNA expression levels of TGF- β 1 and HIF-1 were higher in the HAE group than those in the sham group. TGF- β 1 expression was suppressed when HIF-1 inhibitors were added, and HIF-1 expression was upregulated when exogenous TGF- β 1 was added in N1S1 cells.

研究分野：Interventional Oncology

キーワード：TGF- β 1 HIF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝癌は予後不良の疾患であり、世界的には悪性新生物における死因の第2位となっている。肝癌の原因はB型肝炎あるいはC型肝炎の持続感染による慢性肝疾患が主体で、わが国ではC型肝炎/肝硬変を背景とした発癌が非常に多い。肝癌に対する治療の主たるものとして、外科切除、焼灼療法および肝動脈塞栓療法が挙げられる。切除可能な症例では外科切除、腫瘍数が3個かつ最大径が3cm以下の症例では、焼灼療法が頻用され、これらに当てはまらない症例では、肝動脈塞栓療法が第一選択の治療となる。しかしながら、他の癌種とは異なり、肝発癌には背景の肝硬変が強く関わっており、肝内に新たな肝癌の発生が多く見られることが、治療を難しくしている。当初は外科手術や焼灼療法で対応していたものの、病気が進むにつれて肝内発癌が増え、肝動脈塞栓療法を用いる頻度および重要性が増してくる。

近年、外科手術や焼灼療法等の局所療法による侵襲が肝内に炎症反応を生じ、これに伴い新たな肝発癌が生じる機序が証明されてきた。炎症が生じることでマクロファージや炎症性サイトカインの働きが強まり、Transforming Growth Factor (TGF)- β の増加が見られ、これによりHepatic Stellate Cell (HSC) が活性化される。活性化した同細胞は、Hepatic Growth Factor (HGF) を産生するが、HGFの受容体であるc-Metは癌遺伝子であり、ここから癌新生が生まれることが新規発癌の機序の一つと考えられている。この機序以外にも、HSC細胞は肝再生を促すことで、血管新生や抗線維化作用を有する、あるいは制御系T細胞であるTregやProgrammed Death-Ligand1 (PD-L1) の増加による免疫抑制を生じることが知られている。これらの作用にも腫瘍の局所進展や転移を促進する作用が見られる。

臨床において肝動脈塞栓後に発熱・腹痛など塞栓後症候群が生じることが多く、焼灼療法よりも高度の炎症を生じていることが容易に想像される。そこで肝動脈塞栓療法後にも相応の侵襲が起きており、外科手術や焼灼療法と同様の癌新生・腫瘍進展効果が生じている可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

肝動脈塞栓術後の癌微小環境中の免疫抑制性サイトカインであるTGF- β 1発現の変化を評価することを主たる目的とした。

3. 研究の方法

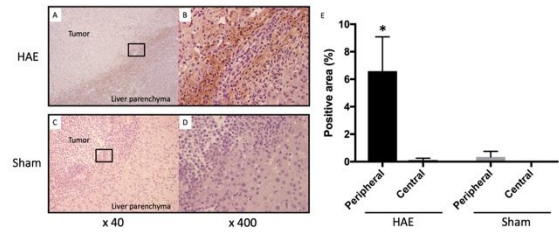
当初の予定では、VX2腫瘍担癌ウサギを使用する予定であったが、より臨床に近い条件にするため、ラット肝細胞癌(N1S1)を用いて研究を行うこととした。

まずin vivo studyとして、N1S1細胞をラット肝臓に移植し、1週間後に経カテーテル的動脈塞栓術を施行した。施行後48時間でサクリファイスを行い、採血および癌病変部を含めた肝検体を摘出した。これらの検体を用いて、免疫染色(TGF- β 1およびHIF-1 β)、ELISA (TGF- β 1)を行った。また、RT-PCRにてTGF- β 1およびHIF-1 β 、SMA、CollagenのmRNA発現量を測定した。

つづいて、in vivo studyの結果に繋がるメカニズム解明のため、In vitro studyを行った。同ラット肝細胞癌細胞(N1S1)を低酸素培養し、48時間後のTGF- β 1およびHIF-1 β の産生・放出能を調べた。また、TGF- β 1およびHIF-1 β それぞれの関係性を調べるため、HIF-1 α ブロッカーおよび外因性TGF- β 1による治療を行った。

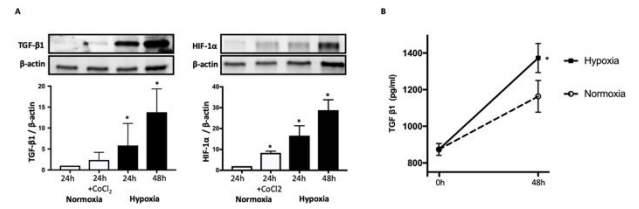
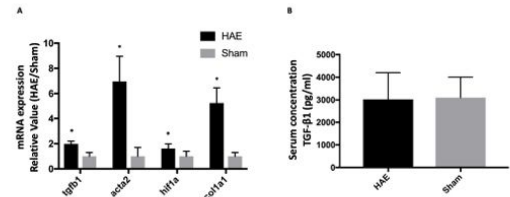
4. 研究成果

N1S1 ラット肝癌モデルを用いて肝動脈塞栓術を施行した。塞栓 48 時間後に屠殺し、病変検体を摘出した。組織の免疫染色では局所の TGF- β 1 および HIF-1 α 発現の増加が見られたが(右図上)、末梢血中の TGF- β 1 では上昇はなかった(右図下)。



肝動脈塞栓後の TGF- β 1 産生のメカニズムを解明するため、細胞実験を行った。同肝癌細胞を 48 時間低酸素培養した結果、培養液中の TGF- β 1 の上昇が見られた。また、低酸素培養下での HIF-1 α 発現を抑えると、TGF- β 1 の発現が有意に抑制された。

以上より、TGF- β 1 および HIF-1 α の発現は低酸素によるものと思われるが、それぞれが共依存性に作用し合っている可能性が推察された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 発表者名

上嶋 英介、岡田卓也、山口雅人、杉本幸司、高木治行、山門亨一郎

発表標題 低酸素刺激がサイトカイン産生に与える影響:ラット肝細胞癌株による検討

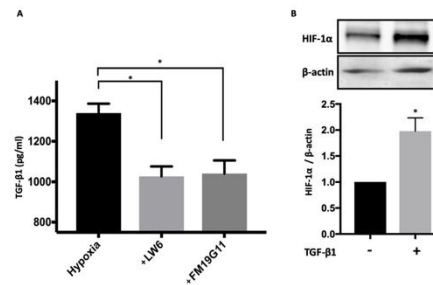
学会等名 第 63 回中部 IVR・第 64 回関西 IVR 合同研究会

発表年 2017 年

2. 発表者名 上嶋英介、岡田卓也、山口雅人、杉本幸司、村上卓道、西尾福英之、田中利洋、吉川公彦、高木治行、児玉大志、山門亨一郎

発表標題 肝動脈塞栓術が TGF- β 1 発現に与える影響 -ラット肝癌モデルによる検討-

学会等名 第 65 回関西 IVR 研究会



発表年 2018 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高木 治行，児玉 大志，西尾福 英之，平田 豊

ローマ字氏名：Haruyuki Takaki , Hiroshi Kodama, Hideyuki Nishiofuku , Yutaka Hirata

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。