

## 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3月26日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591500

研究課題名（和文）脂肪肝グラフト適応拡大へのリン酸化シグナルの解明と血管内皮前駆細胞を応用した戦略

研究課題名（英文）A new perspective for extending use of steatotic liver graft by analyzing for phosphorylation signaling pathway and applying for endothelial progenitor cells.

研究代表者

吉留 博之（YOSHIDOME HIROYUKI）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10312935

研究成果の概要（和文）：脂肪肝グラフトの適応拡大として、脂肪肝における阻血再灌流障害の制御機構や肝切除後の肝再生につき検討した。脂肪肝阻血再灌流後早期にはアポトーシスが惹起され、肝がエネルギー不足となり結果として壊死を中心とした肝障害が強く惹起されることが判明した。また肝再生は拡大肝切除で遅延することが分かった。その機序の一つとしてニッチの関与を検討し、癌細胞を用いた検討ではその機序の解明として予備的な結果を得た。

研究成果の概要（英文）：The steatotic liver is vulnerable to hepatic ischemia/reperfusion, leading to significant hepatocyte apoptosis by the mitochondrial permeability transition, and thereby resulting in organ dysfunction. In addition, regeneration of the steatotic liver after extended hepatectomy is impaired by a decrease in ATP levels and a decrease in activation of phosphorylation of survival signal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・消化器外科

キーワード：脂肪肝・生体部分肝移植・肝再生・リン酸化シグナル

### 1. 研究開始当初の背景

生体部分肝移植は末期肝不全症例などの良性肝疾患のみでなく肝癌など悪性例にも適応が拡大されており、今後症例数は益々増加すると思われる。一方で脳死例からの肝移植ドナーの増加が見込めない現状では、ドナー不足に対して脂肪肝 graft を用いることはその一助となる。しかし脂肪肝 graft の利用は肝移植後の過小 graft (small for size graft) や primary graft nonfunction などの致死性肝不全

に陥るリスクがあり、この機序の解明と安全性の確立は重要な課題である。

### 2. 研究の目的

脂肪肝ドナーの肝切除術後の安全性の確立は、メタボリック・シンドローム時代における脂肪肝症例に対しての外科手術の安全性を確立する上からも重要である。本研究の目的は脂肪肝 graft の適応拡大のために、脂肪肝肝切除後の肝再生に関するリン酸化シグナ

ルの解明と正常肝との差異、またそれを modulation した肝再生促進と血管内皮前駆細胞を用いた類洞構築促進による新たな治療戦略の確立である。

### 3. 研究の方法

(1) 肝切除モデルとしてレプチン受容体遺伝子異常をもつ db/db マウスとその counter part のマウスを用いて 70%並びに 80%肝切除モデルを作成する。同様に C57BL/6 マウスに高脂肪食を投与することで脂肪肝を作成し、同様に肝切除モデルを作成する。経時的に肝組織ならびに血清を採取し Bio-Plex suspension array system を用いて、肝組織でのリン酸化シグナルの網羅的検索を行い、正常肝と脂肪肝での相違を検討することで脂肪肝でのシグナル伝達異常を同定する。次に血清を用いて同様に網羅的に検討する。

(2) 骨髄由来幹細胞の分離と niche より産生される因子を検索する。前駆細胞の分離は末梢血単核球を分離して CD34 陽性細胞を MACS 磁気細胞分離システム(Miltenyi Biotec)にて分離同定し、FACS 解析にて表面マーカーを同定する。さらに肝組織を homogenate して同様に行う。また niche より産生される因子として、末梢血と肝組織での SDF-1, VEGF, Angiopoietin, G-CSF などの発現の検討を real time PCR、western blotting、免疫組織化学染色にて行い、前駆細胞群の動態と制御につき検討する。

(3) vascular endothelial growth factor (VEGF)は血管新生に関与するが、肝再生に伴い上昇した VEGF により骨髄中の VEGFR1 をもつ細胞が肝局所に動員されることが推測される。これら骨髄由来造血前駆細胞や線維芽細胞・マクロファージなどから stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12)が発現することが推測される。採取した前駆細胞を培養し、その細胞の状態を経時的に観察する。VEGF, Angiopoietin, HGF, MMP-9 などの発現を real time PCR, ELISA, western blot にて検討する。また前駆細胞と肝の構成細胞を共培養して、産生される mediator の確認を ELISA, western blot にて検討し、細胞間相互作用を確認する。

### 4. 研究成果

(1) 脂肪肝における阻血再灌流後早期にはアポトーシス(caspases-3, 8, and 9の変動)が惹起され、NOS の imbalance な発現により、肝における ATP 産生低下によるエネルギー不足となり、壊死へと転換されることで肝障害が強くなり惹起されることが判明した。また同時に類洞で産生される保護的因子の低下を認め、それによりさらなる肝障害が惹起され

ることが判明した。このことから脂肪肝においては肝切除時に施行する Pringle 法などの阻血再灌流により、肝再生が遅延する可能性が考えられ、特に類洞の再構築の必要性が示唆された。これはドナー肝としての脂肪肝の適応拡大のみならず、ドナーの肝切除後の臨床的経過にも重要な結果と考えられた。

この内容は J Clin Biochem Nutr 2011;48:142 で accept され公表した。

脂肪肝症例に対する肝切除はドナーという観点からは臨床的には減量という手段が一般的におこなわれており減量後に CT にて脂肪肝が著明でないと判断されれば、手術適応となっている。しかし実際の肝組織での改善が得られなければ、肝障害や肝不全は容易に起こりうるということが判明したことは重要な点であると考えられた。

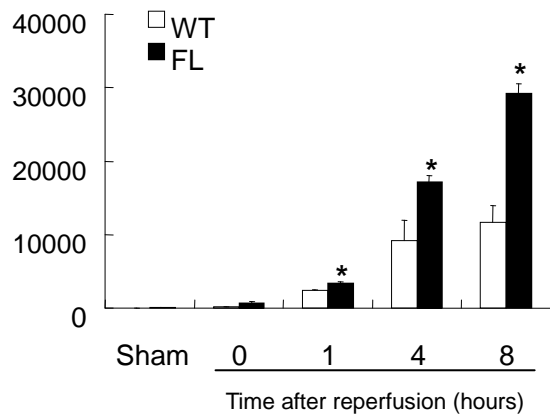


図1 脂肪肝では正常肝に比し有意に障害が増強した

(2) 脂肪肝肝切除後には肝切除量により肝再生が遅延することが基礎的・臨床的実験により判明した。特に 80%の拡大肝切除では肝再生が遅延し、生存率の低下が認められた。このことから Bioplex を用いたリン酸化シグナルを検討したところ、survival signal、特に PI3K/Akt pathway において脂肪肝では発現の低下があることが判明した。臨床例における末梢血中のリン酸化シグナルの検討においても、脂肪肝例では特に拡大肝切除術例で発現の低下が認められることが判明した。

(3) 肝再生時の類洞の remodeling に関して、血管新生における血管内皮前駆細胞の関与が報告されているが、これらは骨髄から動員され末梢血中に存在しており、微小環境(niche)が形成された部位に特異的に取り

込まれる。これらの機序を解明するために、癌細胞と切除標本を用いて CXCR4/CXCL12 の関与と微小環境と endothelial-mesenchymal-transition (EMT) につき検討した。

肝転移巣での発現を検討すると、癌細胞における CXCR4 の発現は細胞膜に発現するものと核内に発現するもので予後に差が出る事が判明した。このことから癌細胞を集積させるために ligand として CXCL12 の肝組織での発現パターンを検討すると、肝での発現が増強すると CXCR4 は核内での発現が増強し、予後が改善することが判明した。これは微小環境の形成により、ケモカインの相互作用により発現が modulation されることが示唆されたと考えられた。つまり、脂肪肝での endothelial progenitor cells を動員した結果も niche の発現パターンにより左右されることが推察され、その解明が重要であることが同時に示唆された。

本内容は Clin Exp Metastasis 2012;29:101 に accept され公表した。

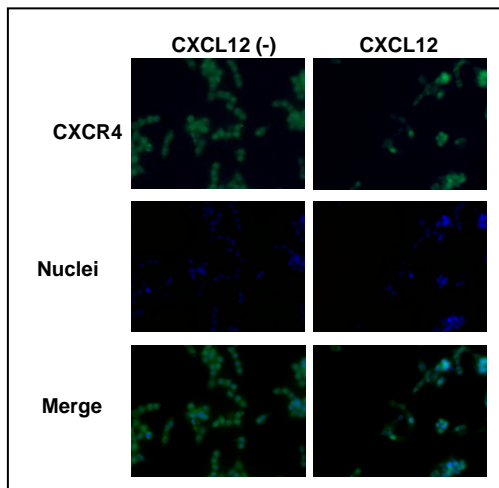


図 2 大腸癌細胞を用いた検討で、CXCL12 の発現パターンで CXCR4 が核内に移行することが判明した。

(4) 骨髄由来血管内皮前駆細胞の分離に関しては末梢血単核球を採取し、FACS 解析にて集積することができたが、それを用いた応用には収量をあげる必要があり、今後の検討が必要であることと考えられた。

## 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 6 件)

1. Sakai N, Yoshidome H, Kimura F, Takeuchi D, Miyazaki M, et al. CXCR4/CXCL12 expression profile is associated with tumor microenvironment and clinical outcome of liver metastases of colorectal cancer. Clin Exp Metastasis 2012;29:101-10. 査読あり
2. Kuboki S, Yoshidome H, Miyazaki M, et al. Chylous ascites after hepatopancreatobiliary surgery. Br J Surg 2012;100:522-7. 査読あり
3. Suzuki T, Yoshidome H, Kimura F, Takeuchi D, Miyazaki M, et al. Hepatocyte apoptosis is enhanced after ischemia/reperfusion in the steatotic liver. J Clin Biochem Nutr 2011;48:142-8. 査読あり
4. Yoshidome H, Takeuchi D, Kimura F, Miyazaki M, et al. Treatment strategy for hepatocellular carcinoma with major portal vein or inferior vena cava invasion: a single institution experience. J Am Coll Surg 2011;212:796-803. 査読あり
5. Yoshidome H, Kimura F, Takeuchi D, Miyazaki M, et al. Usefulness of preoperative partial splenic embolization in hepatocellular carcinoma and hypersplenic thrombocytopenia. Hepatogastroenterology 2011;58:2062-6. 査読あり
6. Iida A, Yoshidome H, Takeuchi D, Kimura F, Miyazaki M, et al. Hepatocyte nuclear factor-kappa beta (NF-kappaB) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. Surgery 2010;148:477-89. 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

Yoshidome H. Expression pattern of CXCR4/CXCL12 is a promising predictive marker for survival after hepatic resection for colorectal liver metastases. 10<sup>th</sup> IHPBA (Paris, France) 2012年7月4日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉留 博之 (YOSHIDOME HIROYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10312935

### (2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70166156

木村 文夫 (KIMURA FUMIO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：70334208

竹内 男 (TAKEUCHI DAN)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20400822

(3)連携研究者

なし