

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461913

研究課題名(和文) 分子標的薬Bevacizumabの肝再生制御に関する研究

研究課題名(英文) A study about a novel influence and elucidation of Bevacizumab, molecular targeted drug, on liver regeneration after massive hepatectomy

研究代表者

森 大樹 (MORI, Hiroki)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：70448330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではBev投与後の大量肝切除術後の創傷治癒時に与える影響と術後における虚血再灌流傷害時の小胞体ストレス応答の関与を90%肝切除モデルを用いて検討した。Bev投与群で術後1日目の肝機能上昇の軽減、肝再生率の増加、炎症性サイトカインmRNA発現のdown-regulationを認め、肝切除術前の肝内小胞体ストレス応答関連遺伝子mRNA発現のup-regulationを認めた。以上によりBevacizumab投与によるpositiveな肝細胞保護効果のひとつの機序として小胞体ストレス応答の関与が考えられ、Bevacizumabは小胞体ストレス応答を介して肝切除術後肝機能障害の改善が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the influence on liver function after hepatectomy after Bev administration and the involvement of endoplasmic reticulum stress response during postoperative ischemia-reperfusion injury using 90% hepatectomy model. In the Bev administration group, reduction of liver injury, increase of liver regeneration rate, down-regulation of inflammatory cytokine mRNA expression was observed on the first day after hepatectomy, and furthermore, up-regulation of endoplasmic reticulum stress response-related mRNA expression was confirmed before hepatectomy. Our results suggested that endoplasmic reticulum stress response was involved as a mechanism of positive hepatocyte protection effect by Bevacizumab administration and Bevacizumab improved hepatic dysfunction after hepatectomy via endoplasmic reticulum stress response.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子標的薬 Bevacizumab 大量肝切除 肝再生 小胞体ストレス応答

### 1. 研究開始当初の背景

切除不能大腸癌は従来の化学療法のみでは非常に予後不良であったが、分子標的薬である Bevacizumab (Bev) の登場により、現行の化学療法に併用することで予後の改善が得られるようになり、また、その高い治療効果により切除不能から切除可能へ conversion できる症例も増えてきた。しかし、血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) に対するモノクローナル抗体である Bev は、VEGF の働きを阻害することにより、血管新生を抑え腫瘍の増殖や転移を抑制する作用を持つが、創傷治癒的に問題視されている。即ち Bev 投与後 6 週間以内の手術は推奨されておらず、neoadjuvant chemotherapy からのタイミングを逸することのない早期肝切除術に悪影響を及ぼすことが懸念されている。一方で、Bev を併用することで、抗腫瘍効果は向上するだけでなく、Bev 以外の化学療法による非癌部の類洞拡張障害までも軽減される (Cancer 2007) といった報告もなされてきており、一概に悪影響を与えないとは言えない部分もあるのが現在の topic である。

小胞体ストレス応答は生体内での恒常性を維持する作用を持ち、近年、肝に対して細胞の保護作用および apoptosis 作用を持つことが示され、肝障害時の小胞体ストレスの関与が報告されている (Science 2009, Mol Med 2009)。また心筋および脳の虚血再灌流傷害に対する小胞体ストレス応答の関与が報告されているが (J Biol Chem 2009)、依然として大量肝切除術後における肝再生・虚血再灌流傷害制御に対する小胞体ストレス応答の関与は明らかになっていない。しかし、最近の我々の研究結果では大量肝切除術後における肝再生・虚血再灌流傷害制御に小胞体ストレス応答の関与が示唆され、70%肝切除後では小胞体ストレス応答は正常反応を示し細胞保護的に働き、90%大量肝切除後では小胞体ストレス応答が破綻し術後肝不全に陥るといった結果が得られ、現在、投稿予定中である。また preliminary data として、Bev 投与 1 週間後に 90%肝切除術をラットに行い、術後 1 日目の肝再生率を Bev 非投与群と比較検討したところ、予想に反して Bev 投与群で有意な肝再生促進を認めている。

これらのことから、Bev 投与後の早期肝切除時の肝再生・虚血再灌流傷害制御に対して小胞体ストレス応答が細胞保護的に働く可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

Bev 投与後の早期肝切除術後における創傷治癒 (肝再生・虚血再灌流傷害制御) について、さらに新たな調節因子となりうる小胞体ストレス応答の作用機序について解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

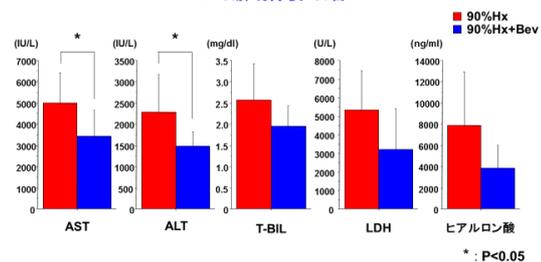
90%大量肝切除術後肝不全モデルにおける Bev 投与後の影響と小胞体ストレス応答の関与：正常ラットと Bev 投与ラットに 90%大量肝切除を行い術後肝再生における小胞体ストレス応答の役割とともに再生の経時的変化の程度による違いについて、real time RT-PCR による肝内小胞体ストレス応答関連遺伝子 (XBP1、ATF6、CHOP、GRP78、HSP70) の mRNA 発現量の経時的変化を比較検討する。

### 4. 研究成果

90%大量肝切除術後肝不全モデルにおいて、術後 1 日目の血液生化学検査は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で有意に術後 AST、ALT の改善を認め、術後肝機能上昇を軽減した (GOT :  $4994.9 \pm 1430.8$  IU/L vs  $3427.9 \pm 1225.7$  IU/L,  $P < 0.05$ 、GPT :  $2287.1 \pm 890.9$  IU/L vs  $1471.4 \pm 351.4$  IU/L,  $P < 0.05$ 、T-BIL :  $2.57 \pm 0.86$  mg/dl vs  $1.94 \pm 0.51$  mg/dl,  $P = 0.11$ 、LDH :  $5351.2 \pm 2125.0$  IU/L vs  $3229.1 \pm 2173.5$  IU/L,  $P = 0.07$ 、ヒアルロン酸 :  $7862.2 \pm 5070.7$  ng/ml vs  $3865.7 \pm 2120.0$  ng/ml,  $P = 0.07$ )。

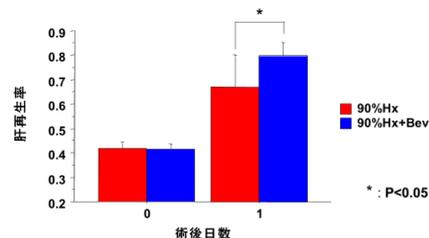
血液生化学検査

- 90%肝切除後1日目 -



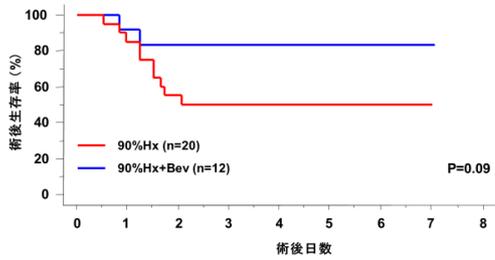
術後 1 日目の肝再生率は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で有意に増加した ( $0.672 \pm 0.131$  vs  $0.798 \pm 0.054$ ,  $P < 0.05$ )。

90%肝切除術後肝再生率



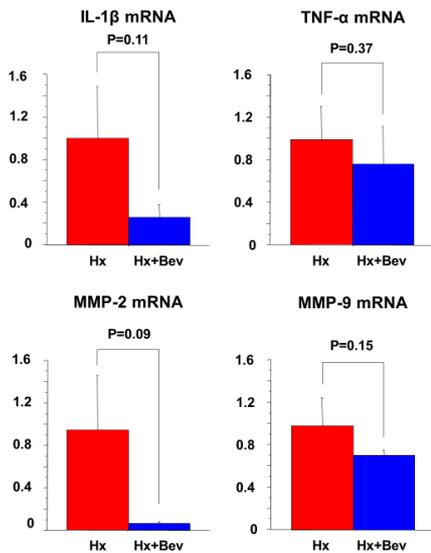
術後生存率は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で生存率の改善傾向を認めた (83% vs 50%,  $P = 0.09$ )。

### 90%肝切除術後生存率



術後 1 日目の炎症性サイトカイン mRNA 発現は、IL-1 mRNA 発現は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で down-regulate される傾向を認めた ( $0.84 \pm 0.91$  vs  $0.22 \pm 0.27$ ,  $P=0.11$ ) が、TNF- mRNA 発現は、両群間に有意差は認めなかった ( $0.86 \pm 0.60$  vs  $0.66 \pm 0.81$ , N.S.)。MMP-2、MMP-9 mRNA 発現はともに、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で down-regulate される傾向を認めた (MMP-2:  $281.39 \pm 345.51$  vs  $17.68 \pm 13.27$ ,  $P=0.09$ , MMP-9:  $0.57 \pm 0.34$  vs  $0.40 \pm 0.08$ ,  $P=0.15$ )。

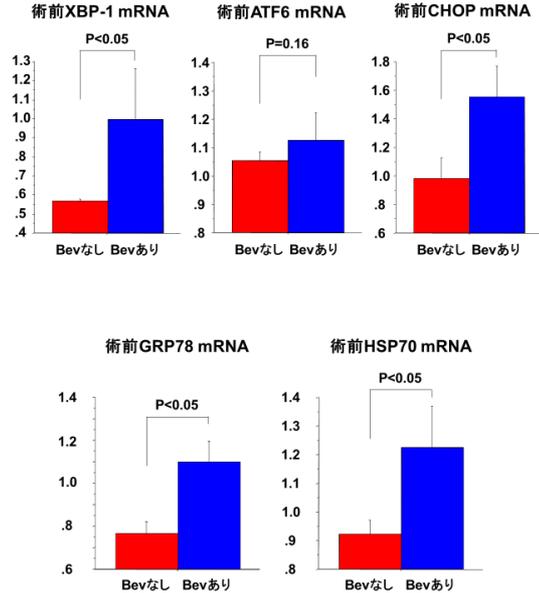
### 炎症性サイトカイン mRNA 発現 - 90%肝切除後1日目 -



肝切除術前の肝内小胞体ストレス応答関連遺伝子の mRNA 発現量については、XBP1 mRNA 発現は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で有意に up-regulate された ( $0.57 \pm 0.01$  vs  $1.00 \pm 0.27$ ,  $P<0.05$ )。ATF6 mRNA 発現は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で up-regulate される傾向を認めた ( $1.05 \pm 0.03$  vs  $1.12 \pm 0.10$ ,  $P=0.16$ )。CHOP mRNA 発現は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で有意に up-regulate された ( $0.984 \pm 0.141$  vs

$1.553 \pm 0.214$ ,  $P<0.05$ )。GRP78 mRNA 発現は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で有意に up-regulate された ( $0.766 \pm 0.054$  vs  $1.100 \pm 0.094$ ,  $P<0.05$ )。HSP70 mRNA 発現は、コントロール群と比較して Bevacizumab 投与群で有意に up-regulate された ( $0.92 \pm 0.05$  vs  $1.23 \pm 0.14$ ,  $P<0.05$ )。

### 小胞体ストレス応答マーカー mRNA 発現



小胞体ストレス応答は、protein homeostasis を維持しようとして heat shock protein を誘導して細胞保護したり、不要な異常変性蛋白をアポトーシスに誘導したりする positive な反応であるが、過度のストレスがかかると正常蛋白までアポトーシスに誘導してしまう可能性を含んだ反応でもある。今回の肝切除術前の小胞体ストレス関連の mRNA 発現についての検討では、小胞体ストレス応答の転写因子である XBP1 mRNA は Bevacizumab 投与群で有意に up-regulate されており ( $P<0.05$ )、細胞保護効果を有する HSP70 mRNA も不要な異常変性蛋白をアポトーシスに誘導する CHOP mRNA も共に up-regulate されていた ( $P<0.05$ )。すなわち、Bevacizumab を術前投与することで、肝臓で低酸素・低エネルギー状態が起こり、XBP1、ATF6、CHOP が動いていることから小胞体ストレス応答が誘導され、その結果 GRP78、HSP70 が up-regulate され、肝臓に細胞保護効果が蓄えられた状態で大量肝切除を施行したため、術後肝障害が軽減され、肝再生が促進したと考えられた。いわゆる Bevacizumab による preconditioning 効果が起こっている可能性があると考えられた。

以上より、Bevacizumab 投与による positive な肝細胞保護効果のひとつの機序として、小胞体ストレス応答の関与が考えられ、Bevacizumab は、小胞体ストレス応答を介し

て肝切除術後肝機能障害を改善したことが示唆された。

今後の研究計画としては、肝特異遺伝子の術後の経時的な発現変化を検討し、上述の仮説を検証し、さらに、肝臓でのみ小胞体ストレス応答を抑制・促進するマウスを用いて Bevacizumab 術前投与の肝再生への影響を 70%肝切除モデル(術後肝再生モデル)と 90%肝切除モデル(術後肝不全モデル)で検討し、小胞体ストレス応答の肝再生への関与をより selective に解明する予定である。

#### 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 18 件)

1. Mori H, Ishibashi H, Shimada M, Utsunomiya T, Asanoma M, Yamada S, Saito Y, Iwahashi S, Ikemoto T, Imura S, Morine Y. Risk of carcinogenesis in the biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction through the epigenetic regulation. *Hepatogastroenterology*. in press.2017.査読有
2. Yada K, Ishibashi H, Mori H, Morine Y, Zhu C, Feng R, Kono T, Shimada M. The Kampo medicine "Daikenchuto (TU-100)" prevents bacterial translocation and hepatic fibrosis in a rat model of biliary atresia. doi: 10.1016/j.surg.2016.02.002. *Surgery*. 2016; 159: 1600-1611.査読有
3. Yada K, Ishibashi H, Mori H, Shimada M. Intrascrotal lipoblastoma: report of a case and the review of literature. doi: 10.1186/s40792-016-0160-7. *Surg Case Rep*. 2016; 2: 34-38.査読有
4. Asanoma M, Mori H, Ikemoto T, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Hanaoka J, Kanamoto M, Saito Y, Yamada S, Shimada M. Clinical role of Foxp3+ regulatory T cell in Living donor related liver transplantation for prediction of life-threatening complications. doi: 10.2152/jmi.62.37. *J Med Invest*. 2015; 62: 37-40.査読有
5. Kanamoto M, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Mori H, Arakawa Y, Takasu C, Shimada M. Homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. doi: 10.1002/jhbp.147. *Asian J Endosc Surg*. 2015; 8: 91-94.査読有
6. Saito Y, Mori H, Takasu C, Komatsu M,

Hanaoka J, Yamada S, Asanoma M, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Shimada M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. doi: 10.1007/s00535-013-0799-9 *J Gastroenterol*. 2014; 49: 692-701. 査読有

7. Ikemoto T, Shimada M, Iwahashi S, Saito Y, Kanamoto M, Mori H, Morine Y, Imura S, Utsunomiya T. Changes of immunological parameters with administration of Japanese Kampo medicine (Juzen-Taihoto / TJ-48) in patients with advanced pancreatic cancer.

doi: 10.1007/s10147-013-0529-6. *Int J Clin Oncol*. 2014; 19: 81-86. 査読有

8. Arakawa Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y, Takasu C. Gene profile in the spleen under massive partial hepatectomy using complementary DNA microarray and pathway analysis. doi: 10.1111/jgh.12573. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014; 29: 1645-1653. 査読有

9. Asanoma M, Ikemoto T, Mori H, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Shimada M. Cytokine expression in spleen affects progression of liver cirrhosis through liver-spleen cross-talk. doi: 10.1111/hepr.12267. *Hepatol Res*. 2014; 44: 1217-1223. 査読有

10. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Takasu C. Homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. doi: 10.1002/jhbp.147. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014; 21: 873-880. 査読有

11. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y. CXC receptor 4 and stromal cell-derived factor 1 in primary tumors and liver metastases of colorectal cancer. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.030. *J Surg Res*. 2014; 187: 107-112. 査読有

12. Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Sugimoto K, Saito Y, Yamada S, Asanoma M. Beneficial effects of enteral nutrition containing with hydrolyzed whey peptide on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver.

doi: 10.1111/hepr.12097. *Hepatol Res.* 2014; 44: 114-121. 査読有

13. Sugihara K, Yamanaka-Okumura H, Teramoto A, Urano E, Katayama T, Mori H, Utsunomiya T, Shimada M, Takeda E. Recovery pattern of non-protein respiratory quotient and non-esterified fatty acids after liver resection. doi: 10.1016/j.nut.2013.09.012. *Nutrition.* 2014; 30: 443-448. 査読有

14. Ishibashi H, Oshio T, Sogami T, Nii A, Mori H, Yada K, Shimada M. Iliopsoas Abscess in an Infant. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705769> *J Med Invest.* 2014; 61: 213-216. 査読有

15. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Saito Y, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S. Trophic effect of adipose tissue-derived stem cells on porcine islet cells. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.031. *J Surg Res.* 2014; 187: 667-672. 査読有

16. Tovuu LO, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Mori H, Hanaoka J, Kanamoto M, Sugimoto K, Saito Y, Yamada S, Asanoma M, Shimada M. The role of Aurora B expression in non-tumor liver tissues of patients with hepatocellular carcinoma. doi: 10.1007/s10147-013-0593-y. *Int J Clin Oncol.* 2014; 19: 622-628. 査読有

17. Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Mori H, Kanamoto M, Yamada S. Laparoscopic hepatic resection for metastatic liver tumor of colorectal cancer: comparative analysis of short- and long-term results. doi: 10.1007/s00464-013-3165-3 *Surg Endosc.* 2014; 28: 80-84. 査読有

18. Ishibashi H, Mori H, Yada K, Shimada M, Sogami T, Nii A. Dye-assisted lymphatic sparing laparoscopic Palomo varicocelelectomy in children. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dye-assisted+lymphatic+sparing+laparoscopic+Palomo+varicocelelectomy+in+children> *J Med Invest.* 2014; 61: 151-155. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 森大樹、石橋広樹、矢田圭吾、島田光生. 慢性炎症下にある小児先天性胆道拡張症の胆道上皮における発癌関連遺伝子発現の検討 第 27 回日本消化器癌発生学会総会 2016 年 9 月 15 日-16 日 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

2. 森大樹、樋渡勝平、河島茉澄、野村美緒子、井深奏司、清水真理子、平野恭悠、稲村昇、萱谷太、井上雅美、奈良啓悟、曹英樹、臼井規朗. 全身状態不良な critical AS に合併した肝芽腫 (PRETEXT ) に対して全摘除術 (肝左葉切除術) を施行し得た 1 例 第 53 回日本小児外科学会学術集会 2016 年 5 月 24 日-26 日 ヒルトン福岡シーフォーク (福岡県福岡市)

3. 矢田圭吾、石橋広樹、森大樹、島田光生. 小児肝外性門脈体循環シャント (2 型) に対する腹腔鏡下手術の有用性に関する検討 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016 年 4 月 14 日-16 日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

4. 森大樹、樋渡勝平、河島茉澄、野村美緒子、井深奏司、奈良啓悟、曹英樹、臼井規朗. 当院で腹腔鏡下胆嚢摘出術を施行した小児胆石症例の検討 第 28 回日本内視鏡外科学会総会 2015 年 12 月 10 日-12 日 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府大阪市)

5. 森大樹、曹英樹、田附裕子、野村元成、児玉匡、野口侑記、臼井規朗. 当院で経験した小児消化管異物誤飲症例の検討 第 52 回日本小児外科学会総会 2015 年 5 月 28 日-30 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

6. 矢田圭吾、石橋広樹、森大樹、島田光生. 大建中湯(TU-100)は胆道閉鎖症ラットモデルにおける肝線維化を抑制する 第 52 回日本小児外科学会総会 2015 年 5 月 28 日-30 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

7. 矢田圭吾、石橋広樹、森大樹、島田光生. 重傷心身障害児(者)の GERD に対する腹腔鏡下噴門形成術の予後と術式変遷に関する検討 第 52 回日本小児外科学会総会 2015 年 5 月 28 日-30 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

8. 森大樹、石橋広樹、矢田圭吾、山田眞一郎、島田光生. 腹腔鏡下 Palomo 法術後の陰嚢水腫予防に対する少数リンパ管温存の妥当性 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015 年 4 月 16 日-18 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

9. 森大樹、石橋広樹、矢田圭吾、佐藤宏彦、新居章、島田光生. 小児先天性胆道拡張症

の胆道上皮における発癌関連遺伝子発現の  
検討 第 51 回日本小児外科学会総会 2014  
年 5 月 8 日-10 日 大阪国際会議場(大阪府大  
阪市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森 大樹 (MORI, Hiroki)  
徳島大学・大学病院・助教  
研究者番号: 70448330

### (2)研究分担者

石橋 広樹 (ISHIBASHI, Hiroki)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師  
研究者番号: 20314867

森根 裕二 (MORINE, Yuji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号: 60398021

居村 暁 (IMURA, Satoru)  
徳島大学・大学病院・特任教授  
研究者番号: 90380021

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)  
徳島大学・先端酵素学研究所・教授  
研究者番号: 90502534