

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10664

研究課題名(和文)ALPPS手術後肝再生促進因子の同定と機能解析

研究課題名(英文)Analysis of promoting factor of liver regeneration in ALPPS

研究代表者

清水 明 (Shimizu, Akira)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：00447773

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文): Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy (ALPPS)手術における、門脈塞栓術を凌駕する迅速な肝再生現象の原因は明らかでない。我々は、ラット門脈結紮(PVL)モデルとALPPSモデル、ならびにALPPSモデルの虚血肝領域を切除する肝切除モデル(Hx)を確立して、それぞれの手術の動門脈血流動態の差とeNOSの関連に着目し、ALPPSの肝再生促進にeNOS活性化が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALPPS手術に関して、肝血流動態やeNOS活性化に着目した基礎研究報告はなく、本研究は極めて独創的であると考えられる。本研究の意義は、ALPPS手術でみられる迅速な肝再生促進因子を同定しその解析を行うことにより、(1) 現存する治療法よりも効率的な肝再生と代償性肥大を促す治療法の開発により、大量肝切除後の肝不全リスクを低減し、肝胆道癌手術の安全性・確実性の向上に貢献する点、(2) 肝移植以外に治療選択肢のない肝不全症例において、将来的に既存の肝細胞・肝組織の再生を促す移植代替療法、もしくは肝機能を維持し移植待機可能期間の延長をもたらす中継療法を開発するための端緒となりうる点、にある。

研究成果の概要(英文): Although Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy (ALPPS) has been reported to achieve future liver remnant liver (FLR) hypertrophy in a short period, the underlying mechanisms are unclear. We established rat portal vein ligation (PVL) model, ALPPS (ALP) model, and hepatectomy model (in which ischemic liver area was resected after ALPPS), and assess the relationship between activation or inhibition of eNOS and liver regeneration in FLR. Since inhibition of eNOS suppressed liver regeneration and activation of eNOS enhanced liver regeneration in FLR, eNOS activation might be pivotal for accelerated FLR regeneration after ALPPS.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：ALPPS NOS NO誘導 肝再生

1. 研究開始当初の背景

近年、肝悪性腫瘍に対する根治的大量肝切除を企図する際に、一次的切除では予定残肝容積が過小である場合、西欧を中心に Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy : ALPPS 手術¹⁾が、従来行われていた門脈塞栓術 (PVE)²⁾に代替する治療法として注目されている。この術式では、PVE をはるかに凌ぐスピードで、より大きな予定残肝容積の増大を得られることが示されている^{1), 3)}。この現象を引き起こす原因には、他領域に應用可能な肝再生促進因子に関するヒントがあると考えられ、複数の基礎研究が行われているが、それらの大半が肝再生初期における誘導因子として知られる炎症性サイトカイン (IL-6 など) の術後早期における上昇をその原因として結論づけている^{4), 5)}。

我々も、独自に門脈結紮 (PVL) モデルならびに ALPPS 手術のラットモデルを作製し、術後 2 日目での予定残肝重量増大が ALPPS モデルでは PVL モデルを有意に凌駕することを確認した。両モデルをもとに、術後 1 時間~24 時間の術後早期における血清および予定残肝内炎症性サイトカイン定量の実験を行ったが、上述の既知の報告とは異なる結果が得られた。すなわち、PVL と ALPPS モデル間で、術後早期のサイトカイン値に有意な差を認めなかった。また、VEGF, HGF, EGF 等の成長因子に関しても両モデルで有意差を認めなかった。我々はさらに、炎症性サイトカインの産生部位と考えられている、ALPPS の虚血肝領域を切除するモデルを作製し、同モデルにおいても ALPPS モデルと同等の残肝容積増大が得られることを確認、術後早期の炎症性サイトカイン定量においても両モデルで差がないことを確認した。これらの基礎実験の結果から、虚血肝領域の存在ならびに術後早期における炎症性サイトカインの誘導は、ALPPS 手術後の迅速な肝再生現象をもたらす主要因子でない可能性が高いとの結論に至った。

一方、過去の肝切除後/PVL 後の肝再生機序に関する研究で、ずり応力 (shear stress) ならびにそれによる内皮一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 活性化と一酸化窒素 (NO) 誘導が肝再生促進因子であることが報告されている^{6), 7)}。ALPPS と PVL の間にも虚血肝領域の有無により肝流入動脈血流動態に差が生じていると考えられることから、我々は shear stress ならびに eNOS 活性化と ALPPS 術後の肝再生現象との関連に着目した。

2. 研究の目的

我々は、ALPPS と PVL との術式の相違から、肝再生における動脈血流動態変化とそれに基づく NO 誘導の関連に着目し、ALPPS と PVL における肝再生速度の相違は、肝内血流動態変化の差が原因であり、ALPPS 術後の肝再生促進に eNOS 活性化と NO 誘導が関与している、という作業仮説をたてた。本研究の目的は、各モデル間における予定残肝の血流動態変化と eNOS 活性化の相違を検証することにある。

3. 研究の方法

上記の作業仮説を立証するため、以下の実験系を構築した。

- (1) ALPPS, PVL モデルにおける予定残肝内動脈血流動態評価
小動物用超音波検査機器を用いて、PVL, ALPPS, ALPPS モデルの虚血肝領域を切除したモデル (Hx) における術直後、術後 1 時間後、24 時間後の予定残肝動脈血流速、血管径を測定し、測定値から血流量を算出して比較検討する。
- (2) 予定残肝内 eNOS, Akt 活性化評価
PVL, ALPPS, Hx モデルにおける術後 1, 4, 6 時間後の予定残肝組織内での eNOS タンパク量、ならびに NO 産生を促進する Ser1177 リン酸化 eNOS タンパク量、ならびに NO 産生を抑制する Thr495 リン酸化 eNOS タンパク量の評価を western blotting を用いて行い、比較検討する。さらに、肝血流動態の変化に伴う eNOS 活性化の原因として eNOS の上流にある Akt 活性化に着目し、Akt タンパク量、eNOS 活性化を促す Ser473 リン酸化 Akt タンパク量の評価を western blotting を用いて行い、PVL, ALPPS, ならびに Hx 各モデル間で比較検討する。
- (3) eNOS 阻害による肝再生現象抑制の検証
NOS 阻害剤である L-NAME (N-nitro-arginine methyl ester) 100mg/体重 Kg を ALPPS 手術 24 時間前および手術直前に腹腔内投与するモデル (L-NAME 投与 ALPPS モデル) を作製し、PVL, L-NAME 投与 ALPPS, 非投与 ALPPS モデル間で、術後 48 時間後における予定残肝重量ならびに Ki67 標識率を比較し、L-NAME 投与による NOS 阻害で予定残肝容積増大現象、肝細胞増殖率上昇の抑制の有無を検証する。
- (4) NO 誘導剤である Molsidomine 投与による肝再生促進の検証
Molsidomine 100mg/体重 Kg を PVL 手術 24 時間前および手術直前に腹腔内投与するモデル (Molsidomine 投与 PVL モデル) を作製し、Molsidomine 非投与 PVL, Molsidomine 投与 PVL, ALPPS モデル間で、予定残肝重量ならびに Ki67 標識率を比較し、Molsidomine 投与による NO 誘導で、PVL 単独を凌駕する予定残肝重量増大現象、肝細胞増殖率上昇の有無を検証する。

4. 研究成果

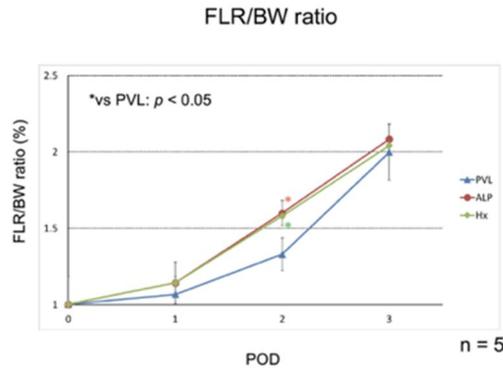


図1 予定残肝重量体重比の推移

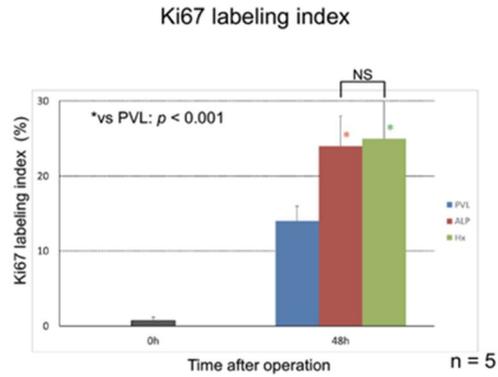


図2 予定残肝内 Ki67 標識率

(1) ALPPS, PVL モデルにおける予定残肝内動脈血流動態評価

上記検証の前段階として, PVL, ALPPS, Hx 各モデルを作製し, 術後2日目における ALPPS, Hx 群の有意な予定残肝重量/体重比の増加を確認した(図1)。また術後2日目における Ki67 標識率を比較し, ALPPS 群, Hx 群で, PVL 群と比較して標識率が有意に高率であることを確認した(図2)。

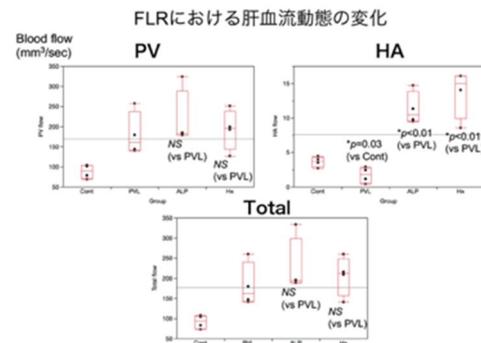


図3 予定残肝内血流動態変化

続いて, コントロール, PVL, ALPPS, 及び Hx モデルにおける, 予定残肝内肝動脈・門脈の血管径と血流流速を測定し, 血流量を算出して比較検討した。その結果, 上記3群間で門脈血流量には差はないものの, 肝動脈血流は PVL モデルで低下していた。ALPPS, Hx モデルでは, PVL と比較して肝動脈血流量は有意に増加していた(図3)。

(2) 予定残肝内 eNOS, Akt 活性化評価

PVL, ALPPS, ならびに Hx の各モデルにおける術後1, 4, 6時間後の予定残肝組織内での total eNOS 量ならびにリン酸化 eNOS (Ser1177) 量を western blotting を用いて評価した(図4)。ALPPS ならびに Hx では, PVL と比較し, total eNOS 量は同等であったものの, 特に術後1, 4時間後の術後早期の段階で, Ser1177 リン酸化 eNOS 量の増加を認められた。一方, Thr495 リン酸化には変化を認めなかった。同様に, PVL, ALPPS, ならびに Hx の各モデルにおける術後1, 4, 6時間後の予定残肝組織内での, eNOS 活性化を促進する Ser473 リン酸化 Akt 量の評価を western blotting を用いて評価した。ALPPS ならびに Hx では, PVL と比較し, 特に術後1, 4時間後の術後早期の段階で, Ser473 リン酸化の亢進を認められた(図4)。

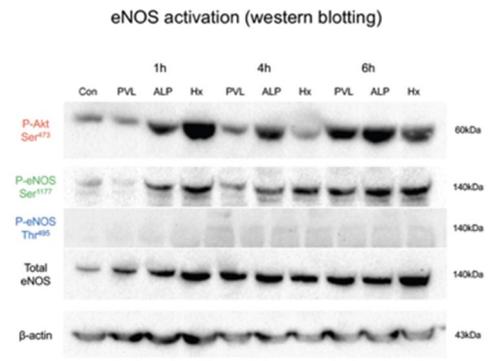


図4 予定残肝内 eNOS, Akt リン酸化評価

(3) eNOS 阻害による肝再生現象抑制の検証

PVL, eNOS 阻害剤である L-NAME 投与 ALPPS, L-NAME 非投与 ALPPS モデルで, 術後48時間後における予定残肝重量を比較したところ, L-NAME 投与 ALPPS モデルでは, 非投与 ALPPS モデルと比較して有意に予定残肝重量が軽量であり, PVL モデルとほぼ同等であった。また, 術後48時間後における Ki67 標識率を比較したところ, L-NAME 投与 ALPPS モデルでは, 非投与 ALPPS モデルと比較して有意に標識率が低値であり, PVL と同等であった(図5)。

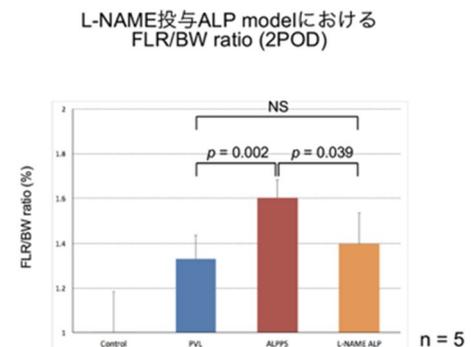


図5 L-NAME 投与/非投与モデルの比較

(4) NO 誘導剤である Molsidonine 投与による肝再生促進の検証
 NO 誘導剤である Molsidonine 投与 PVL , Molsidonine 非投与 PVL ならびに ALPPS モデルで , 術後 48 時間後における予定残肝重量を比較したところ , L-NAME 投与 ALPPS モデルでは , 非投与 ALPPS モデルと比較して有意に予定残肝重量が軽量であり , PVL モデルとほぼ同等であった . また , 術後 48 時間後における Ki67 標識率を比較したところ , Molsidonine 投与 PVL モデルでは , 非投与 PVL モデルと比較して有意に標識率が高率であり , ALPPS と同等であった (図 6) .

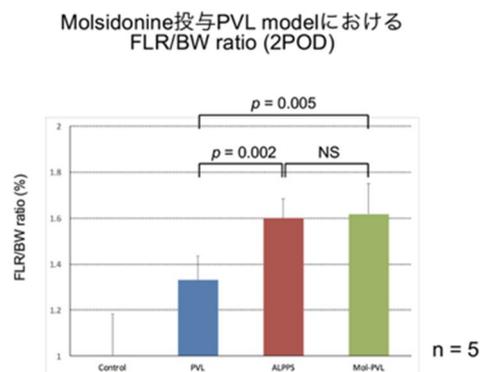


図 6 Molsidonine 投与/非投与モデルの比較

以上の結果から , ALPPS モデルの術後 48 時間後の迅速な予定残肝重量増加の要因は , 肝血流動態変化に基づく術後早期の eNOS 活性による NO 産生亢進であると考えられ , それには eNOS 上流にある Akt 活性化が関与していると考えられた .

< 引用文献 >

- 1) Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size setting. *Ann Surg.* 2012;255:405-414.
- 2) Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery.* 1990;107:521-7.
- 3) Knoefel WT, Gabor I, Rehders A, et al. In situ liver transection with portal vein ligation for rapid growth of the future liver remnant in two-stage liver resection. *Br J Surg.* 2013; 100: 388-394.
- 4) Yao L, Li C, Ge X, et al. Establishment of a rat model of portal vein ligation combined with in situ splitting. *PLoS One.* 2014 Aug 21;9(8).
- 5) Schlegel A, Lesurtel M, Melloul E, et al. ALPPS: from human to mice highlighting accelerated and novel mechanisms of liver regeneration. *Ann Surg.* 2014 Nov;260(5):839-46.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水明
2. 発表標題 ラットALPPSモデルの肝再生過程における虚血肝領域と炎症性サイトカインの影響
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水明
2. 発表標題 ラットALPPSモデルの肝再生過程における再生促進因子の検討
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本山 博章 (Motoyama Hiroaki) (20569587)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教 (13601)	
研究分担者	宮川 眞一 (Miyagawa Shinichi) (80229806)	信州大学・医学部・特任教授 (13601)	

