

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08645

研究課題名(和文) プタモデルを用いた化学療法誘導性肝障害の薬物による克服～大腸癌予後改善に向けて～

研究課題名(英文) Overcoming Chemotherapy-Induced Liver Failure Using a Pig Model

研究代表者

瀬尾 智 (Seo, Satoru)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70646546

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)：我々が確立したFOLFOX誘導性SOSプタモデルを用いて大建中湯およびベバシズマブを併用することがSOS予防に有効かを検証した。大建中湯併用モデルでは大建中湯入りの餌の摂食を継続しながらFOLFOX療法を2頭で実施した。経時的な肝生検で病理学的な評価を行い、肝障害の進行を認めなかった。インドシアニングリーン(ICG)を用いて血中消失率を測定することで肝機能評価を行ったが悪化を認めず、予防効果が確認された。ベバシズマブ併用モデルではFOLFOX療法施行時にベバシズマブを投与を1頭で施行した。大建中湯併用モデルと同様に肝生検と血液検査で肝障害の進行を認めず、予防効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いたSOSプタモデルでは病理組織所見に着目した。SOSの特徴である類洞の拡張や肝細胞索の狭小化、電子顕微鏡所見での血管内皮細胞の脱落や類洞内の出血を経時的に評価することで、SOSの診断が早期に可能であることを見出した。またICG消失率検査を肝生検時に行うことで、病理学的な肝障害の進行とICG消失率が相関することも確認された。予防モデルでも同様の評価を行い、大建中湯およびベバシズマブの効果を検証することが可能であった。実臨床では困難な経時的变化を確認することが可能であった点において、本研究は意義を持つと考える。

研究成果の概要(英文)：Using the FOLFOX-induced SOS pig model we have established, we examined whether the combined use of daikenchuto and bevacizumab is effective in preventing SOS.

In the daikenchuto combined model, FOLFOX therapy was performed on two pigs while continuing to eat the food containing daikenchuto. Pathological evaluation was performed by liver biopsy over time, and no progression of liver damage was observed. Liver function was evaluated by measuring ICG test, but no deterioration was observed, and the preventive effect was confirmed. In the bevacizumab combination model, bevacizumab was administered to one animal at the time of FOLFOX therapy. Similar to the Daikenchuto combined model, liver biopsy and blood test showed no progression of liver damage, confirming the preventive effect.

研究分野：肝癌の基礎研究および臨床

キーワード：FOLFOX誘導性SOS 大建中湯 ベバシズマブ プタモデル

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の肝転移は遠隔転移として最も頻度が高いが、完全切除が出来れば治癒が期待できる。診断時に切除不能と判断されても化学療法により病変が縮小して切除が可能となれば、高い生存率が得られることから、オキサリプラチン(L-OHP)を含む化学療法施行後に肝切除を行う例が増加している。当科でも、肝転移を有する治癒切除不能な結腸・直腸癌患者に対する bevacizumab または cetuximab 併用 mFOLFOX6 療法の検討(BECK study)で、化学療法により切除不能肝転移が切除可能となる割合が 67.6%という報告を行い(Hatano, J Hepatobiliary Pancreat Sci 2015)、mFOLFOX6 療法の有用性を明示してきた。

一方で、L-OHP は sinusoidal obstructionsyndrome (SOS) と呼ばれる特有の薬剤性肝障害を引き起こすことがある。SOS は肝切除後の術後合併症(Nakano, Ann Surg 2008)、早期再発(Tamandl, Ann Surg Oncol.2011)との関連が報告されており、大腸癌肝転移に対する集学的治療において大きな問題の一つである。肝転移が縮小したものの SOS による肝機能障害によって肝切除が不可能となることや周術期合併症により致命的となることがあるが、SOS の予防が可能となれば、これらを回避できる。

我々のグループからも、ラットの SOS に対して予防や抑制に効果があると予想される薬剤を用いた複数の報告を行ってきた。遺伝的・解剖学的にヒトに最も近く、取り扱いが容易なマイクロミニブタを用いた SOS モデルの作成に我々のグループは世界で初めて成功しており(基盤研究B ブタプロテオミクスによる FOLFOX 誘導性 SOS の病態解明と診断バイオマーカーの開発 16H05414)、これを用いることでラットの SOS の予防や抑制に効果があった薬剤が、FOLFOX 誘導性ブタ SOS モデルでも同様に効果があるのかを検証することが可能となり、ひいてはヒト SOS の予防や、SOS の発症メカニズムの解明が叶うと考えられる。

本研究により、肝転移を有する大腸癌患者に集学的な治療を行う際に、SOS の予防に最適な治療法を見出すことが出来るのかどうか、が最大の問いかけである。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの SOS 研究では用いられたことがないブタ SOS モデルを使用しており、ラットでは困難な皮下ポートの埋め込みをブタを行うことで、高容量の抗がん剤を長時間持続投与することが可能である。FOLFOX をヒトと同様の投与量・投与スケジュールで長期間に渡って投与することで SOS を発生させる慢性 SOS モデルのため、SOS の予防効果が見込まれる薬剤の投与に関しても、よりヒト SOS の病態に近い結果を反映すると考えられる。

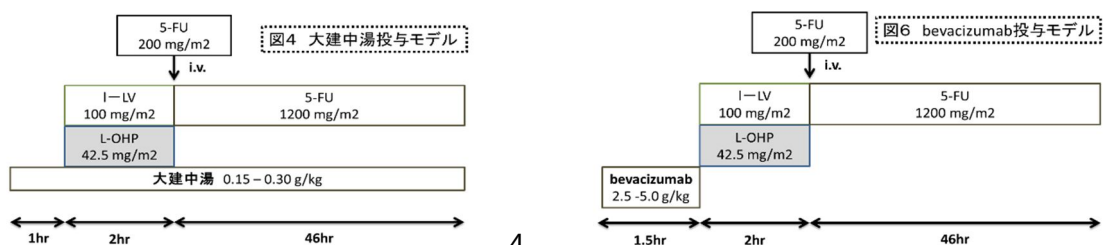
このため、ブタ SOS モデルへの薬物による治療効果の検討によって、FOLFOX 誘導性 SOS の予防法が確立されれば、他の動物モデルよりもよりスムーズな臨床応用が可能である。ヒト SOS が予防可能となれば、実臨床において十分な抗がん剤治療後に肝切除を実施したり、肝切除後の合併症を減少させたりといったことが可能となり、大腸癌肝転移の切除率の向上ひいては予後の改善に寄与することが期待される。

以上より、ブタ SOS モデルを用いることと、最適なヒト SOS の予防法を新たに見出すことが、本研究の目的である

### 3. 研究の方法

12 か月齢の雄性マイクロミニブタを使用し、ヒトで大腸癌に対して用いられている化学療法レジメン mFOLFOX6 療法 (oxaliplatin + 5-FU + Leucovorin) と同じ投与量・投与スケジュールを用いる。観察期間は 24 週とし、FOLFOX は 2 週間ごとに計 12 回皮下ポートより投与する。FOLFOX 投与時に血液検査を、0・4・8・12・18・24 週に開腹肝生検を行う。大建中湯、olprinone 及び bevacizumab は FOLFOX と併用して投与する。得られた血清・肝臓標本にて SOS の評価を経時的に追求する。肝臓病理標本に関しては、SOS の診断に主に用いられるスコアリングを中心に研究分担者の病理医である鶴山と、獣医兼病理医である川口の両名で確認を行い、その妥当性を高める。

大建中湯では 0.15g/kg 投与群 0.30g/kg 投与群を作成、bevacizumab では 2.5g/kg 投与群 5.0g/kg 投与群 7.5g/kg 投与群を作成し、データの解析を行い、研究分担者の上本と共に至適な投与量を検討する



## 研究成果

### 大建中湯投与群

マイクロミニプタを用いた FOLFOX 誘導性 SOS モデルでは、4 週目ごろから類洞の拡張などの SOS に特異的な所見が HE 標本で観察され、8 週ごろから電子顕微鏡で類洞内皮細胞の脱落や Disse 腔の拡張といった所見が見られた。また血液検査では SOS の進行に伴い ICGK 値の低下が見られた。

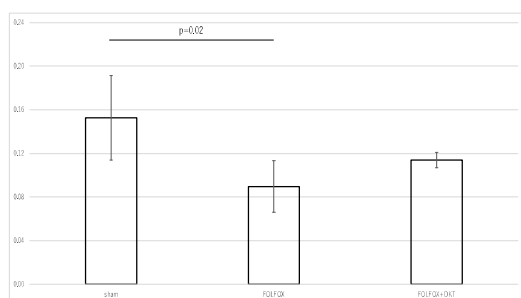
大建中湯投与群では試験期間中を通して ICGK 値は保たれており、コントロール群と比較して有意な低下は見られなかった (Fig. 1)。HE 標本では類洞拡張や類洞内の出血などの SOS を示唆する所見は見られなかった。電子顕微鏡にて 12 週目に類洞内皮細胞の脱落や Disse 腔の拡張所見が認められたが広範な所見ではなく、その後の電子顕微鏡所見では、これらの改善を認めた (Fig. 2)。コントロール群として用いた大建中湯のみを投与した群では、試験期間中の肝生検は正常肝の所見であり、生化学検査においても異常値は確認されなかった。

また大建中湯による SOS 発症予防のメカニズムとして、大建中湯の生薬成分により体内で発現が誘導されるアドレノメジュリン (ADM) に着目した。ADM は抗炎症作用等を有するペプチドで、炎症性疾患等の分野においれその抗炎症作用に関する研究が進んでおり、NF- $\kappa$ B を介した炎症性サイトカイン産生抑制、抗炎症性サイトカインの発現亢進等の作用によって、抗炎症作用を発揮すると言われている物質である。本研究でも SOS の進行抑制に ADM の抗炎症作用が関与しているとの仮説を立て、そのメカニズム解明にも着手した。

今回の研究期間中には血清検体を用いて ELISA による ADM の評価を行なったが、末梢血検体であったため十分な濃度が得られず正確な測定結果を得られなかった。また肝生検検体による免疫染色を合わせて施行したが、肝臓組織での ADM 陽性所見は得られなかった。

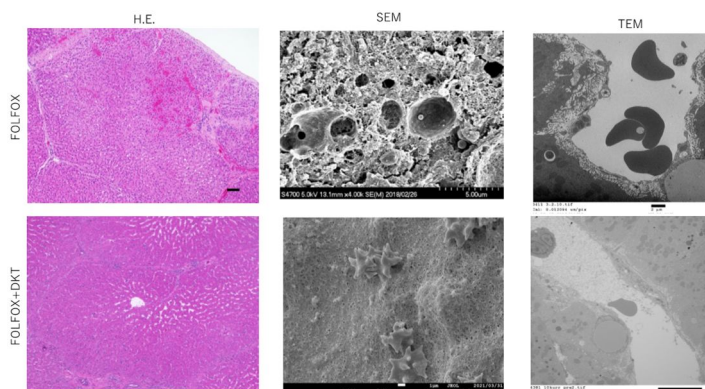
以上の結果より、大建中湯投与によって SOS の抑制効果が示されたと考えられるが、そのメカニズムについては現時点のサンプルでは十分な評価ができなかった。今後、様々な評価手法を駆使し、詳細なメカニズム解明につなげたいと考えている。

Fig. 1: ICGK 値



ICG K 値は DKT 群では有意な低下は認めなかった。

Fig. 2: 病理学的所見 (HE および電子顕微鏡)



### bevacizumab 投与群

今回の実験における前提としてマイクロミニプタに対して、bevacizumab が作用するのかという懸念事項があった。この点に関しては、これまでにプタ網膜際動脈の血管拡張を抑制したという報告 (Su EN, et al. BMC Ophthalmol. 2012; 12:10.) があるものの、肝臓に対して投与した報告は無かった為、まず 1 頭で bevacizumab 投与を行うこととした。FOLFOX 誘導性 SOS モデルにおいては、ヒトと同用量、および 75%用量では生存が難しく、

50%用量では24週間の抗癌剤投与が可能であった。これを根拠として bevacizumab についても同様に50%用量(2.5mg/kg)での投与で実験を行った。

その結果、実験期間を通して ICGK 値の低下を認めず、HE 標本で類洞拡張や類洞内の出血、中心静脈周囲の線維化など SOS を示唆する所見はみられなかった。電子顕微鏡においても類洞内皮細胞の脱落や Disse 腔の拡張は見られなかった。また、懸念された bevacizumab の有害事象である創傷治癒遅延や出血傾向は認めなかった。今回の実験結果より bevacizumab はマイクロミニプタにおいても作用すると判断した。

SOS の key molecule として、Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) が挙げられる。当グループでは過去に、VEGF によって活性化される JNK 経路をソラフェニブでブロックすることで MMP9 の活性が抑制されることを報告しており、同様に抗 VEGF 抗体である bevacizumab の投与でも同じ結果が予想される。今後 MMP9 の活性を計測することを足がかりにメカニズム解明に繋げていきたいと考えている。

以上、我々が確立した FOLF0X 誘導性 SOS プタモデルを用いて大建中湯およびベバシズマブ投与による SOS 予防有効が示唆された。今後は更にメカニズムの解明を行い、臨床現場での応用に繋げていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 R Toda, S Seo, M Sato, M Okuno, K Taura, E Hatano, S Uemoto,
2. 発表標題 MICRO-MINIPIG MODEL OF FOLFOX-INDUCED SINUSOIDAL OBSTRUCTION SYNDROME
3. 学会等名 ESSR2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田 怜, 瀬尾 智, 上本 裕介, 森野 甲子郎, 西野 裕人, 中村 直彦, 奥野 将之, 井口 公太, 佐藤 元彦, 祝迫 恵子, 田浦 康二郎, 鶴山 竜昭, 川口 博明, 池川 雅也, 波多野 悦朗, 上本 伸二
2. 発表標題 ブタを用いたFOLFOX誘導性Sinusoidal Obstruction Syndromeモデルに対するリコモジュリンの予防効果の検証
3. 学会等名 第56回日本肝臓研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toda R, Seo S, Uemoto Y, Nishino H, Nakamura N, Okuno M, Sato M, Iguchi K, Iwaisako K, Taura K, Tsuruyama T, Kawaguchi H, Ikegawa M, Hatano E, Uemoto S,
2. 発表標題 ESTABLISHMENT OF FOLFOX-INDUCED SINUSOIDAL OBSTRUCTION SYNDROME MODEL IN MICROMINIPIG
3. 学会等名 DDW2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田 怜, 瀬尾 智, 上本 裕介, 西野 裕人, 中村 直彦, 奥野 将之, 井口 公太, 佐藤 元彦, 祝迫 恵子, 田浦 康二郎, 鶴山 竜昭, 川口 博明, 池川 雅也, 波多野 悦朗, 上本 伸二,
2. 発表標題 SOSの病態解明に向けたFOLFOX誘導性マイクロミニブタSOSモデルの確立
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田 怜, 井口 公太, 中村 直彦, 瀬尾 智, 中川 貴之, 黒木 康生, 池川 雅哉, 上本 伸二
2. 発表標題 オキサリプラチン誘導性肝障害ブタモデルを使用した肝組織における金属元素の質量分析イメージング
3. 学会等名 第66回質量分析総合討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸田 怜, 瀬尾 智, 上本 裕介, 西野 裕人, 中村 直彦, 奥野 将之, 井口 公太, 佐藤 元彦, 祝迫 恵子, 田浦 康二郎, 鶴山 竜昭, 川口 博明, 池川 雅也, 波多野 悦朗, 上本 伸二
2. 発表標題 SOSの病態解明に向けたFOLFOX誘導性マイクロミニブタSOSモデルの確立
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toda R, Seo S, Uemoto Y, Nishino H, Nakamura N, Okuno M, Sato M, Iguchi K, Iwaisako K, Taura K, Tsuruyama T, Kawaguchi H, Ikegawa M, Hatano E, Uemoto S
2. 発表標題 ESTABLISHMENT OF FOLFOX-INDUCED SINUSOIDAL OBSTRUCTION SYNDROME MODEL IN MICROMINIPIG
3. 学会等名 DDW 2019
4. 発表年 2019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	上本 伸二  (Uemoto Shinji)  (40252449)	滋賀医科大学・医学部・学長   (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鶴山 竜昭  (Tsuruyama Tatsuaki)  (00303842)	公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究員    (74314)	
研究分担者	川口 博明  (Kawaguchi Hiroaki)  (60325777)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授    (17701)	
研究分担者	田浦 康二郎  (Taura Kojiro)  (80378629)	京都大学・医学研究科・准教授    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関