

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09129

研究課題名（和文）消化管虚血再還流障害による癌転移促進のメカニズムの解明と転移抑制治療への応用

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of cancer metastasis by gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and its application to metastasis suppression therapy

研究代表者

若月 幸平（Wakatsuki, Kohei）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10405384

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：消化器癌の原発巣の手術後に、急激な転移巣の顕在化と増大を経験することがある。我々は、消化管の血流障害（虚血再還流障害：IRI）による反応が微小転移の増大を引き起こすとの仮説を立て、消化管のIRIによる転移巣増大のメカニズムを解明することを本研究の目的とした。腫瘍細胞をマウスの尾静脈に注入し、肺・肝転移モデルが作成されることを確認した。腫瘍細胞投与後約1週間で1cm程度の転移を起こすことがわかった。マウスに麻酔を施し開腹したのち顕微鏡下に腸間膜の血管を同定し、血管および腸管にクリップを装着し、虚血再還流が行えることを確認した。コントロール群とIRI群の比較実験は完結できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器癌の原発巣の手術後に、急激な転移巣の顕在化と増大を経験することがある。手術侵襲が微小転移巣に何らかの影響を与えている可能性が考えられるが、そのメカニズムの詳細は不明であった。消化器癌の手術では臓器を切除するために血管遮断を必要とすることが多く、温存される臓器にしばしば虚血が起こる。本研究の目的は消化管がん手術後の転移巣増大のメカニズムを解明することであったが、コロナ禍の影響もあり期間内に本研究を終了することは困難であった。引き続き研究を行うことにより消化器がん術後の転移抑制の治療に役立てればと考えている。

研究成果の概要（英文）：After surgery for gastrointestinal cancer, rapid growth of metastatic lesions may be experienced. We hypothesize that the reaction due to gastrointestinal blood flow disorder (ischemia-reperfusion injury: IRI) causes an increase in micrometastasis, and elucidate the mechanism of metastatic lesion increase due to IRI in the gastrointestinal tract. It was the purpose of. Tumor cells were injected into the tail vein of mice, and it was confirmed that a lung / liver metastasis model was prepared. It was found that metastasis of about 1 cm occurred about 1 week after the administration of tumor cells. After anesthetizing the mice and opening the abdomen, the mesenteric artery were identified under a microscope, and clips were attached to the blood vessels and the intestinal tract to confirm that ischemia-reperfusion can be performed. The comparative experiment between the control group and the IRI group could not be completed.

研究分野：消化器がん

キーワード：消化器がん 微小転移 虚血再還流障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化器癌の原発巣の手術後に、急激な転移巣の顕在化と増大を経験することがある。手術侵襲が微小転移巣に何らかの影響を与えている可能性が考えられるが、そのメカニズムの詳細はいまだ不明である。消化器癌の手術では臓器を切除するために血管遮断を必要とすることが多く、温存される臓器にしばしば虚血が起こる。血流の遮断と再還流による虚血再還流障害( IRI )は、その臓器障害により、様々なサイトカイン等のメディエーターの産生や自然免疫反応が惹起される。

### 2. 研究の目的

我々は、IRI による反応が微小転移の増大を引き起こすとの仮説を立て、「直接 IRI の障害を受けた消化管」および「直接 IRI の障害を受けていない転移巣」の両方で起こっている腫瘍増殖に関するメディエーターの産生と免疫応答を検討することにより消化管の IRI による転移巣増大のメカニズムを解明することが本研究の目的である。このメカニズムを解明することで消化器癌の手術後の転移もしくは転移巣増大を軽減することができるものと考えた。

### 3. 研究の方法

1. 腫瘍細胞をマウスの尾静脈もしくは脾臓に注入し、肝・肺転移モデルを作成する。同系モデル(マウスの癌細胞株と同系のマウスを使用)および異系モデル(ヒトの癌細胞株とヌードマウスを使用)で実験を行う。免疫系の実験では同系モデルを使用する。肝および肺転移巣が1cm前後になった時点で腸管の虚血再還流を行う。虚血時間は虚血によりマウスが死亡しない範囲内で数段階に分けて設定する(0-60 min)。IR直後の変化とIR後の腫瘍の増大の変化を検討するために、IR前、IR後すぐにsacrificeする検体とIR後数週間経過した後にsacrificeする検体を用意する。転移巣である肺・肝の肉眼的な腫瘍の個数、サイズおよび臓器の質量を測定し、虚血再還流を行わないコントロールマウスと腫瘍の個数、サイズおよび質量を比較する。

2. 次に、Sacrificeしたマウスより、免疫染色およびタンパク、RNA抽出用の腸管および転移組織切片を摘出する(腸管IR(+ )の組織、腸管IR(- )の組織、腸管IR(+ )の転移組織、腸管IR(- )の転移組織)。それぞれの組織でアポトーシス(Caspase3)や壊死(H&E)の状態を免疫染色で確認し、IRによる腸管障害度を検討する。CD4、CD8、CD68(マクロファージ)、IgMなどの抗体を用いて免疫染色することにより、IR直後およびIR後晩期の免疫系の変化を腸管および転移巣で検討する。また、回収したそれぞれの組織のホモゲナイゼーションによりRNAやタンパクを抽出し、ELISA法を用いてIR後の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6など)の変化を検討し、ネクローシスやアポトーシスなどによる産生された腸管組織のDAMPsをPCRやWesternで検討する。さらには、DAMPsによって活性化された腸管組織内マクロファージのinflammasomeの検出と定量化をPCRやWesternで行う。

3. vitroの実験では、細胞培養のインキュベーターのO<sub>2</sub>濃度を1-5%程度に下げることによりhypoxiaの状態とし、同時にglucose濃度を下げてlactate濃度を上げることにより、vitroにおいてIR後の生体内に近い環境を設定する。この環境下で、マウスおよびヒトの腸管上皮細胞株(たとえばMIE細胞:マウス,Caco-2:ヒト)を数日間培養し、細胞培養液を抽出する。培養時間は1時間、2時間、6時間、12時間、24時間と数段階に分けて設定し、腸管上皮細胞から産生されたサイトカイン等をELISA調べ、また培養した細胞のホモゲナイゼーションによりRNAや

タンパクを抽出し，PCR や Western で DAMPs の確認を行う．

4．以上の実験結果より，腸管 IRI による局所炎症と免疫応答，転移巣での免疫応答を腫瘍増大のメカニズムを解明することによりその抑制方法（メディエーターのアンタゴニストの投与や免疫応答の制御）を考察し，IRI による転移巣増大の抑制実験を行う．一方で，*vivo*，*vitro* において IR に対する保護作用を持つと考えられる PPAR- アゴニストや inflammasome インヒビターである small-molecule を投与することにより，*vivo* では局所の IRI の制御によって転移巣の腫瘍増大の抑制を検討する．*vitro* では，IR に近い環境下で PPAR- アンタゴニストや inflammasome インヒビターを投与することにより，炎症性サイトカインや DAMPs 発現の変化を検討する．

#### 4．研究成果

消化器癌の原発巣の手術後に，急激な転移巣の顕在化と増大を経験することがある．我々は，消化管の血流障害（虚血再還流障害：IRI）による反応が微小転移の増大を引き起こすとの仮説を立て，消化管の IRI による転移巣増大のメカニズムを解明することを本研究の目的とした．腫瘍細胞をマウスの尾静脈に注入し，肺・肝転移モデルが作成されることを確認した．腫瘍細胞投与後約 1 週間で 1cm 程度の転移を起こすことがわかった．マウスに麻酔を施し開腹したのち顕微鏡下に腸間膜の血管を同定し，血管および腸管にクリップを装着し，虚血再還流が行えることを確認した．コントロール群と IRI 群の比較実験は完結できなかった．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	右田 和寛  (Migita Kazuhiro)  (40570990)	奈良県立医科大学・医学部・研究員    (24601)	
研究分担者	國重 智裕  (Kunishige Tomohiro)  (70745801)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員    (24601)	
研究分担者	中出 裕士  (Nakade Hiroshi)  (90745796)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員    (24601)	

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