

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591635

研究課題名(和文) 肝予備能把握法の確立と肝切除後残存肝機能の分子生物学的解析。

研究課題名(英文) Establishment of the hepatic reserve and molecular biological analyses of liver function after hepatectomy.

研究代表者

千々岩 一男 (CHIJIWA KAZUO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90179945

研究成果の概要(和文): 進行胆嚢癌や肝門部胆管癌では拡大肝切除を行うことがあるが, 残存肝予備能の限界に近い大量肝切除は術後の肝不全の誘因となりうる。特に閉塞性黄疸や肝機能障害を有する病態肝の場合はさらに術後肝不全の発生率が高い。

今回、大量 90%肝切除術後の有機アニオントランスポーターの発現の変化とビリルビンおよび胆汁酸代謝との関係について解析した。また、アジアロシチによる肝切除後の機能回復や Glypican-3, HAI-1 など肝癌予後規定因子を同定した。

研究成果の概要(英文): Excessive hepatectomy close to the hepatic reserve function has a risk to induce postoperative liver failure. The mechanisms inducing hyperbilirubinemia with respect to anion transporters were examined in rats after 90% hepatectomy and found that excreting transporter expression (Bsep, Mrp3) but not the uptake transporters (NTCP, OATP) showed a significant difference compared to 70% hepatectomy. Moreover, Biomarkers (Glypican-3, HAI-1) influencing prognosis were established in hepatocellular carcinoma.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：大量肝切除、閉塞性黄疸、肝不全、トランスポーター、門脈塞栓

1. 研究開始当初の背景

肝門部胆管癌や胆嚢癌に対する拡大肝切除や肝切除 + 臍頭十二指腸切除 (HPD) で根治手術をめざす場合、残存肝予備能の把握と術後肝不全の防止は依然として重要な課題である。肝予備能が低下した硬変肝や閉塞性黄疸肝において、肝切除後の再生能低下や肝機能障害の遷延が肝不全を誘発すると考えられる。肝細胞が増殖因子に反応、肝再生するためには肝切除直後に TNF- α や IL-6 らのサイ

トカイン刺激により転写因子 NF- κ B, STAT3, AP1 が活性化されることが必要である。増殖因子のシグナル伝達をになう MAP キナーゼである Extracellular signal-regulated kinase (ERK) は転写因子 AP-1 を活性化し、細胞周期促進蛋白 Cyclin D1 の発現を亢進する。また、転写因子 C/EBP β は代謝機能と再生の両方に重要な役割を果たしており、肝切除後は isoform C/EBP β 優位で移行し細胞周期促進蛋白 Cyclin-dependent

kinase を活性化する。硬変肝や閉塞性黄疸肝において肝切除前後でこれらの因子の変化を一部報告したが(BBR2001; 280:640-645, BBR2002; 292:474

-481) 未だ不明な点が多い。

また、術前門脈塞栓による再生肝と萎縮肝の細胞周期に關与する mRNA と蛋白の発現の違いや虚血再灌流臓器障害の分子生物学的機序の一部を報告したが(J Surg Res 2001;101:146-151) 未だ不明な点が残されている。

肝切除後肝再生および虚血性再灌流障害の分子生物学的機序は、近年欧米においてノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いて明らかにされつつあるが、病態肝と正常肝においてこの面から比較検討している施設は少ない。肝硬変合併肝癌や閉塞性黄疸合併胆道癌患者に対して積極的に治癒切除をめざす場合、これらの病態肝切除に伴う肝再生能低下や肝機能障害の機序を解明するは、臨床的な必要性はもとより、基礎研究面での貢献も大きいものと思われる。また、術前の正確な肝予備能把握と術前門脈枝塞栓術などにより残存肝予備能の改善が可能になれば、HPD などの拡大治癒切除を行う場合に術後合併症の危険性を低下させ肝胆道癌治療成績の向上に寄与できると考えられる。

一般的に過大肝切除術後には、血中のビリルビンや胆汁酸は高値を示し、不可逆性となれば、肝不全に至る。この機序として、肝臓の有機アニオントランスポーター(NTCP, OATP, BSEP, MRP2, MRP3 など)の発現が変化し、肝細胞への取り込みと排泄障害が考えられる。急性肝不全を惹起する90%肝切除モデルで術後早期に胆汁中への胆汁酸排泄が急激に減少することを発表(J Surg Res 2006;134:81-86)、また有機アニオントランスポーターである mrp2 は変化しなかったが、mrp3 の mRNA と蛋白発現が早期から低下していることを見出し発表した(研究業績 8)。また、胆道癌や膵頭部癌では閉塞性黄疸を呈することが多い、胆汁内瘻、外瘻による減黄法の違いによる肝切除後の肝再生能や肝組織中過酸化脂質などを検討すると胆汁内瘻による減黄法が有意に良好であることも報告したが(Annals of Surgery 1999;230:655-662, Surgery 2002; 131:564-573)、未だ充分な機序は解明されていない。

2. 研究の目的

1) 術前肝予備能の把握による肝不全予防。今までの科研究で施行してきた肝ミトコンドリア、ミクロゾーム、網内系機能の把握による肝予備能の総合評価法の確立、2) 肝予備能増加法としての門脈塞栓の意義を一部

分子生物学的に検討し報告した(研究業績 29)がさらにその意義を追求する。3) 肝切除前後におけるサイトカイン、増殖因子、転写因子、細胞周期調節蛋白、シグナル伝達系、活性酸素産物の変化を閉塞性黄疸肝、硬変肝と正常肝で詳しく検討し、病態肝の再生能低下や虚血再灌流肝障害に關与する因子を検討する。4) 閉塞性黄疸の術前内瘻の意義。肝切除前に胆汁内瘻で減黄した場合、外瘻による減黄と比較して肝切除後の残存肝機能と再生能の面で優れていることを報告した(Annals of Surgery 1999;230:655-62)。この差は胆汁が腸管内に存在するか否かであり、その機序の一部を報告したが(Surgery 2002;131:564-573) 更に腸管の免疫動態の違いを Toll-like receptor(TLR), IFN-, IL-10, TNF- の発現を測定し分子生物学的に検討する。5) 閉塞性黄疸肝の OATP, NTCP, BSEP, MRP2, MDR の発現の変化を検討し、胆汁内瘻と外瘻による減黄および減黄不良例のビリルビンや胆汁酸排出障害の機序を明らかにする。急性肝不全モデルである 90%肝切除を行い、これらトランスポーター発現の変化を検討する。6) 虚血再灌流肝障害の機序とその防止策を検討する。

これらにより術後死亡の最大要因である肝不全の機序と防止法の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) 障害肝(閉塞性黄疸、肝硬変)や拡大肝切除における肝予備能と再生能。

ラットで閉塞性黄疸を作成し、1週間後に70%肝切除を胆汁内瘻化と同時に施行し切除時と切除後経時的に残存肝を採取する。肝硬変ラットにおける肝切除を行い同様に残存肝を採取する。残存肝機能を肝ミクロゾーム、ミトコンドリア、網内系の3分画による肝機能の総合評価に加え、肝組織から核蛋白を抽出して Gel shift assay 法にて転写因子 NF- κ B, STAT3, AP-1, C/EBP の活性を、抗体を用いた Supershift assay 法でそれぞれの isoform の活性まで分析する。Cyclin-D1, -A, -B, p21^{WAF1}, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現は Western blot 法にて測定する。Cyclin-dependent kinase 活性や MAP キナーゼである ERK 活性は Immunocomplex kinase assay にて測定する。また、Total RNA を抽出して RT-PCR 法にてサイトカイン(TNF-, IL-1, IL-6)や増殖因子(HGF, TGF-)とその受容体(c-met, EGF receptor)の発現を分析する。DNA 合成能は [³H]-thymidine や BrdU 取り込み率で評価し、免疫染色や病理学的検索も行う。臨床でも障害肝の肝切除標本を用いて同様の検討を行う。

2) 胆汁内瘻と外瘻が肝再生に与える影響。

腸管内胆汁の存在が肝再生に与える影響を cell cycle や転写因子で検討すると共に、腸管の bacterial translocation や免疫能に関与している Toll-like receptor, IFN- γ , IL-10, TNF- α の発現変化を測定する。術前の胆汁内瘻・外瘻の効果比較を臨床でも手術時の肝組織を用い同様に検討する。

3) 減黄不良の機序の解明

外科臨床上腺道癌患者の多くは閉塞性黄疸を伴う。胆汁外瘻にしても内瘻にしても減黄良好例と不良例が存在し、減黄不良で血清ビリルビン値の減少が悪い場合は肝機能不良と考えられる。有機アニオンである胆汁酸やビリルビンの肝細胞への取り込みから毛細胆管膜を通して胆汁へ排泄させる ABC ファミリーの異常が減黄不良例で認められると思われるので、臨床例および動物実験で OATP、NTCP、MRP-2,3、MDP-1,3、BSEP の発現の変化をノーザンブロットと免疫染色で検討する。日常臨床で使用される ICG の胆汁中排泄試験を臨床で検討しているため、更に左右肝管や区域肝管内への胆汁中 ICG 排泄を検討し分肝機能評価法として検討する。MRP2 や MRP3 を調節し減黄不良に有効と考えられる Inchin-Koto やウルソデオキシコール酸(胆汁酸)の効果の検討を臨床例で開始する。

4) 門脈塞栓による肝機能と再生の分子生物学的検討を cell cycle の面から一部報告したが、更に臨床および動物実験で行う。

5) 各種病態肝における虚血再灌流障害の影響

上記病態肝モデルにおいて Pringle's maneuver を繰り返し、肝組織中の TNF- α , SIL-1, IL-6, iNOS, Mn-Superoxide dismutase (SOD), Xanthine oxidase (XOD), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) の発現を RT-PCR 法にて、また酵素学的に活性を分析する。過酸化脂質 MDA の定量は比色型を用いて測定する。Pringle の反復によりこれらの因子がどのように変化するかを分析し、ATP 含有量と Energy Charge で評価したエネルギー状態や組織学的障害度と比較する。更に上記モデルに 70% 肝切除を加え再生能との関係を検討する。また、全肝阻血・再灌流と選択的阻血再灌流障害を比較する。

6) 再生能と虚血再灌流障害の分子生物学的制御

上記の分析にて相違を認めた因子に関して、転写因子のデコイとして oligonucleotide や Mn-SOD, XOD, GSH-Px の遺伝子を HPV-liposome 法(現有設備:超遠沈器+申請備品:ロータリーエバポレーター)にて門脈より肝臓に導入し、肝再生や虚血再灌流障害

との関連を直接的に証明し、病態肝切除後の肝再生能低下や虚血再灌流障害の改善が可能か否かを検討する。

4. 研究成果

術前の正確な残存肝予備能の把握と術後肝不全の早期予知及びその防止は臨床上極めて重要な課題である。

大量 90% 肝切除術後や閉塞性黄疸における胆汁酸内瘻と外瘻による減黄法の違いによる有機アニオントランスポーター(取り込み系の ntcp, oatp, 排泄系の Bsep, Mrp2, Mrp3 など)の発現の変化とビリルビンおよび胆汁酸代謝との関係についてラットで解析した。現在以下のような結果を主要な学会ならびに一部は既に論文で発表し、現在も論文作成中である。

1) 90% 肝切除術後 48 時間の生存率は 50%, 70% 肝切除群は 100% であった。90% 肝切除群では 70% 肝切除群に比べて術後早期(6 時間)に胆汁流量および胆汁中胆汁酸排泄の有意な低下がみられた。また、90% 肝切除では一次胆汁酸である CA, CDCA の胆汁酸排泄が術後 6 時間で有意に減少していた。またトランスポーターの測定では、取り込み系のトランスポーターである ntcp と oatp1,2 には有意差を認めなかったが、排泄系トランスポーターでの検討では 90% 肝切除群では Bsep と Mrp3 の有意な発現亢進と Mrp2 の発現低下を認めたのに対し、70% 肝切除群では Bsep と Mrp3 の発現低下と Mrp2 の発現亢進を認めた。2) 閉塞性黄疸ラットモデルでは、胆管閉塞により Mrp2, Bsep, oatp および ntcp の発現低下と Mrp3 の発現亢進が認められた。1 週間の閉塞性黄疸後胆汁外瘻あるいは内瘻により減黄すると、発現が低下していた Mrp2 は亢進し、発現が亢進していた Mrp3 は低下した。胆汁外瘻と内瘻を比較すると内瘻の方が有意に Mrp2 と Mrp3 の発現が正常に復した。これらの結果は減黄の必要性和減黄する方法として胆汁内瘻の方が優れていることが示唆され、主要学会で発表するとともに、論文作成し発表予定である。

3) 閉塞性黄疸患者における Inchin-Koto の効果を臨床で検討中である。

4) 肝癌患者の予後規定因子として Glypican-3 と HAI-1 を同定(業績 1,2)すると共に肝胆膵外科の臨床研究を発表した(業績 3,5,6,7,9,10)。

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 10 件)

1. Yoritani, K., Takahashi, N., Takai, H., Kato, A., Suzuki, M., Ishiguro, T., Ohtomo, T., Nagaike, K., Kondo, K., Chijiwa, K.

and Kataoka, H.: Prognostic Significance of Circumferential Cell Surface Immunoreactivity of Glypican-3 in Hepatocellular Carcinoma. *Liver International* 31(1):120-131 (2011)

2. Funagayama, M., Kondo, K., Chijiwa, K. and Kataoka, H.: Expression of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type 1 in Human Hepatocellular Carcinoma and Postoperative Outcomes. *World Journal of Surgery* 34(7): 1563-1571, (2010)

3. Wakamatsu, H., Nagamachi, S., Kiyohara, S., Fujita, S., Kamimura, K., Nishi, R., Nagano, M., Kondou, K., Chijiwa, K. and Tamura, S.: Predictive Value of Tc-99m Galactosyl Human Serum Albumin Liver SPECT on the Assessment of Functional Recovery after Partial Hepatectomy: A Comparison with CT Volumetry. *Annals of Nuclear Medicine* 24(10): 729-734, (2010)

4. Maeda, Y., Naganuma, S., Niina, I., Shinohara, A., Koshimoto, C., Kondo, K. and Chijiwa, K.: Effects of Bile Acids on Rat Hepatic Mitochondrial Type 11 α -hydroxysteroid Dehydrogenase. *Steroids* 75(2): 164-168, (2010)

5. Takahashi, N., Fukushima, T., Yorita, K., Tanaka, H., Chijiwa, K. and Kataoka, H.: Dickkopf-1 is Overexpressed in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells and is Involved in Invasive Growth. *International Journal of Cancer* 126(7): 1611-1620, (2010)

6. Kondo, K., Chijiwa, K., Kai, M., Otani, K., Nagaike, K., Ohuchida, J., Hiyoshi, M. and Nagano, M.: Surgical Strategy for Hepatocellular Carcinoma Patients with Portal Vein Tumor Thrombus Based on Prognostic Factors. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 13(6): 1078-1083, (2009)

7. Chijiwa, K., Imamura, N., Ohuchida, J., Hiyoshi, M., Nagano, M., Otani, K., Kai, M. and Kondo, K.: Prospective Randomized Controlled Study of Gastric Emptying Assessed by ¹³C-Acetate Breath Test After Pylorus-Preserving Pancreaticoduodenectomy. Comparison between Antecolic and Vertical Retrocolic Duodenojejunostomy. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic*

Surgery 16(1): 49-55, (2009)

8. Sano, K., Chijiwa, K., Kai, M., Hidaka, Y. and Kanemaru, M.: Differential Expression of Organic Anion Transporters in Rats Subjected to 70% or 90% Hepatectomy. *Hepato-Gastroenterology* 56(89): 176-180, (2009)

9. Ikenaga, N., Chijiwa, K., Otani, K., Ohuchida, J., Uchiyama, S. and Kondo, K.: Clinicopathologic Characteristics of Hepatocellular Carcinoma with Bile Duct Invasion. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 13(1): 492-497, (2009)

10. Otani, K., Chijiwa, K., Kai, M., Ohuchida, J., Nagano, M., Tsuchiya, K. and Kondo, K.: Outcome of Surgical Treatment of Hilar Cholangiocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 12(6): 1033-1040, (2008)

[学会発表](計5件)

1. Yorita, K., Takahashi, N., Kato, A., Suzuki, M., Ishiguro, T., Ohtomo, T., Kondo, K., Chijiwa, K. and Kataoka, H.: Prognostic Significance of
1. Circumferential Cell Surface Immunoreactivity of Glypican-3 in Hepatocellular Carcinoma. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advance in Liver Cancer Research, Chiba (March 1-3, 2011)

2. 近藤千博, 千々岩一男, 甲斐真弘, 大谷和広, 長池幸樹, 大内田次郎, 旭吉雅秀, 永野元章: 肝細胞癌に対する胆癌領域門脈先行クランプによる系統的肝切除術. 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋 (2010.4.8-10)

3. 佐野浩一郎, 千々岩一男, 甲斐真弘, 日高淑晶, 金丸幹郎: ラット急性肝不全モデルにおける有機アニオントランスポーターの変動. 第64回日本消化器外科学会総会, 大阪 (2009.7.16-18)

4. 近藤千博, 千々岩一男, 甲斐真弘, 大谷和広, 長池幸樹, 大内田次郎, 旭吉雅秀, 永野元章, 長町茂樹: ミニシンポジウム3: 肝予備能の評価: ICG血中停滞率とGSA R-maxによる肝予備能評価と肝切除術後残肝機能との関連について. 第21回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 名古屋 (2009.6.10-12)

5. 甲斐真弘, 千々岩一男, 大内田次郎, 近藤千博, 大谷和広, 長池幸樹, 永野元章, 旭

吉雅秀, 今村直哉: シンポジウム 3: 胆道癌における進展度診断の新展開: 胆道癌の進展度診断と予後因子.
第 109 回日本外科学会定期学術集会, 福岡 (2009.4.2-4)

〔図書〕(計 2 件)

1. 近藤千博, 千々岩一男: 南江堂
消化器疾患の最新の治療 2009-2010. : 16.
肝良性腫瘍.

総頁数: 447 (pp. 342-344) 2009

2. 大内田次郎, 千々岩一男: メジカルビュー社

Digestive Surgery NOW No.4 胆・膵外科標準手術 操作のコツとトラブルシューティング.: 総胆管拡張症手術.

総頁数: 169 (pp.72-86) (2009)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/1surgery/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千々岩 一男 (CHIJI IWA KAZUO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 90179945

(2) 研究分担者

近藤 千博 (KONDO KAZUHIRO)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号: 10244196

甲斐 真弘 (KAI MASAHIRO)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号: 40264379

大内田 次郎 (OHUCHIDA JIRO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 10363590

日高 秀樹 (HIDAKA HIDEKI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 90398264

内山 周一郎 (UCHIYAMA SHUICHIRO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 50437935

長池 幸樹 (NAGAIKE KOKI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 70437937

(3) 連携研究者

研究者番号: