

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09072

研究課題名（和文）新規肝再生調節因子としてのReg発現制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Reg expression control mechanism as a novel regulatory factor of liver regeneration

研究代表者

山本 雄造（Yamamoto, Yuzo）

秋田大学・名誉教授・名誉教授

研究者番号：70281730

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）：ALPPS手術というのは手術前に術後の残肝となる部分を前もって急速に再生・育成しておくための技術です。この技術は肝臓手術で患者さんを肝不全から守りつつ、根治性のある手術を実現するために使用されます。本研究では分子生物学的なメカニズムを解明する事を目標とし、Reg3遺伝子の発現がその中心的な役割を果たしていることを世界で初めて解明しました。メカニズムが解明されたことで、今後、ALPPS手術の欠点を補いながら、より安全な肝切除ができるようになる事が期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝切除は術後肝不全を発症させない事が最低要件です。従来、門脈塞栓術で術前に予定残肝を再生肥大させるという対策を講じてきましたが全ての患者さんで有効とは限らないことが問題でした。2012年にドイツでALPPS手術という技術が開発され、わずか1週間で残肝体積を1.5倍程に再生・肥大させられるようになりましたが、この方法は外科医の経験のみによって開発されたため、その急速再生メカニズムは不明なままで、2度の手術を必要とします。本研究成果はこの急速肝再生を惹起する未知のメカニズムの一端を解明した事に学術的意義があり、将来この再生惹起経路をトリガーする手法を開発すれば患者さんの負担を減らすことができます。

研究成果の概要（英文）：ALPPS surgery is a technology that rapidly regenerates and nurtures the postoperative residual liver before surgery. This technique is used to realize curative hepatectomy while protecting the patient from liver failure. We conducted research aimed at elucidating the molecular biological mechanism of this procedure, and revealed for the first time that the expression of the Reg3 gene plays a central role. By elucidating the mechanism, it will be possible to perform safer liver resection in the future while compensating for the shortcomings of ALPPS surgery.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝再生 ALPPS手術 Reg3 JAK2/STAT3経路 肝切除 門脈塞栓 Muse細胞

### 1. 研究開始当初の背景

肝再生に関する多くの因子やシグナル伝達経路が明らかにされてきたが、実臨床で応用される段階には今1つ達していない。そのような中、術前に急速に残肝容量を増加させることのできるALPPS手技(門脈結紮に加えて、肝のある一定部分に離断を加える手技)が2012年に報告された。しかし、この再生メカニズムの詳細は依然不明である。先行研究において「肝離断による炎症性サイトカインの増加」がメカニズムであるとされてきたが、サイトカイン増加が理由であれば肝離断部位によって効果が異なる説明がつかない。我々はラットのALPPSモデルにおいて、microarrayで網羅的遺伝子解析を行い、Reg3と3がALPPS手技を忠実に守ったときだけ増幅しており、肝離断部位を変えると増幅しない減少を捕まえていた。

### 2. 研究の目的

門脈結紮のみによる肝再生とALPPS手技による肝再生、門脈結紮にALPPS手技とは異なる部位にて肝離断をおいた場合の肝再生モデルでReg遺伝子発現を基軸とした肝再生関連因子の発現解析と肝再生率を検討する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

ラットモデルは右図のようにした。ALPPS群は臨床に即して、門脈結紮による分水嶺に肝離断をおいた。

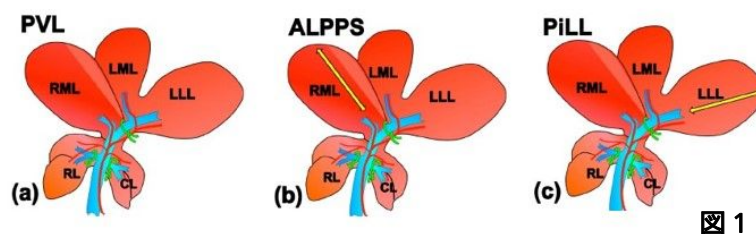


図1

PVLは門脈結紮のみ、PiLL群は肝離断をALPPSとは異なる、肝離断葉内においた。

このモデルで検討した項目は以下の通りである。

(1) 各群における肝再生率(肝重量・PCNA・pH3)とサイトカイン産生量(IL-6・TNF・HGF)の比較検討。

(2) 各群におけるReg3と3の遺伝子(PCR)、蛋白発現(IHC)の検討。

(3) 各群におけるJAK/STAT3経路の検討(JAK2阻害実験・pSATA3のIHC)。

(4) Reg3と3の遺伝子発現部位とMuse細胞のhomingに関する検討(抗S1PR2抗体によるIHC)。

これらに加えて、

(5) アシアロシンチ取り込み局線の解析による肝の区画別肝機能指標パラメーターの開発を行った。

### 4. 研究成果

(1) 各群における肝再生率とサイトカイン産生量の比較検討。

図2に見る如く、肝再生率はALPPS群でのみ優れており、PiLL群ではPVL群と同等でしかなかった。これをサポートするように細胞増殖のマーカであるPCNAやpH3もALPPS群でのみ亢進していた。

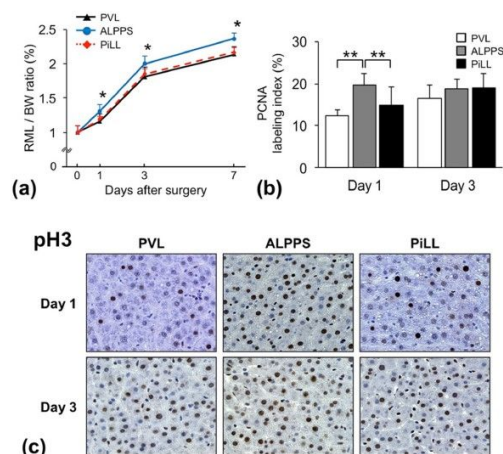


図2

既報にあるサイトカインの増加は PiLL 群でも ALPPS 群と同様に亢進しており、このことはサイトカインの増加があっても PiLL 群では肝再生率が呼応していないことを示しており、サイトカインの増加は ALPPS 再生のメカニズムの本質ではないことを物語っている。炎症性サイトカイン下流の HGF 発現においても同様であった (図 3)。

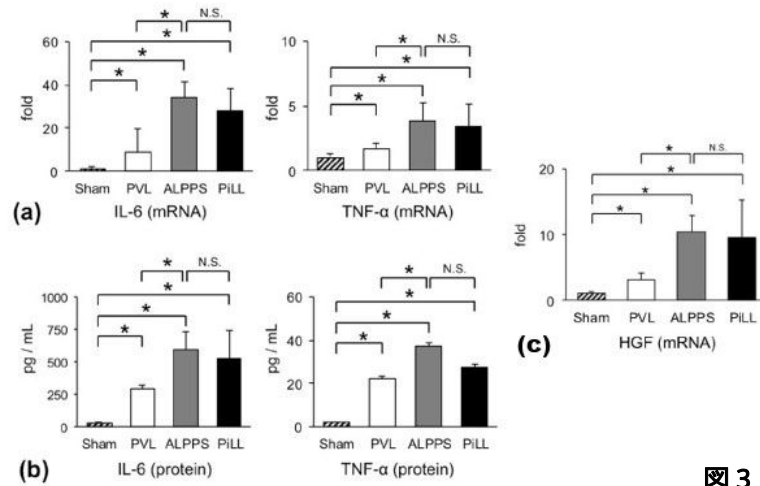


図 3

(2) 各群における Reg3 と 3 の遺伝子、蛋白発現の検討。

3 群における遺伝子発現量を図 4 に示すが、両遺伝子は ALPPS 群でのみ際立っており、図 2 の肝再生率と良く相関していた。これはサイトカイン量と異なり、Reg の発現が ALPPS の肝再生を支配している可能性を強く示唆するものである。

図 5 に Reg3 と 3 の蛋白発現を免疫組織染色で検討したものを示すが、双方ともに ALPPS 群でのみ強く発現が見られ、特に Reg3 の発現が ALPPS 群でのみ強く現われた。また、その発現部位は ALPPS 群の肝離断面に接して強く、PiLL 群の離断面には出現しなかった。

これは肝離断をどこにおいても ALPPS 手技の成果がえられる訳ではないことを示し、単に肝の組織破壊による炎症が再生の切っ掛けになっている訳ではないことを如実に示している。

(3) 各群における JAK/STAT3 経路の検討。  
IL-6 による細胞増殖は JAK 2 /STAT3 経路の活性化を介していることが有名であるため、ALPPS 群での肝再生に JAK 2 /STAT3 経路がどれだけ関与するのかを見るため、JAK2 の阻害実験を追加した(図 6)。意外なことに PVL と PiLL 群では JAK 2 阻害の影響は出ず、ALPPS 群では

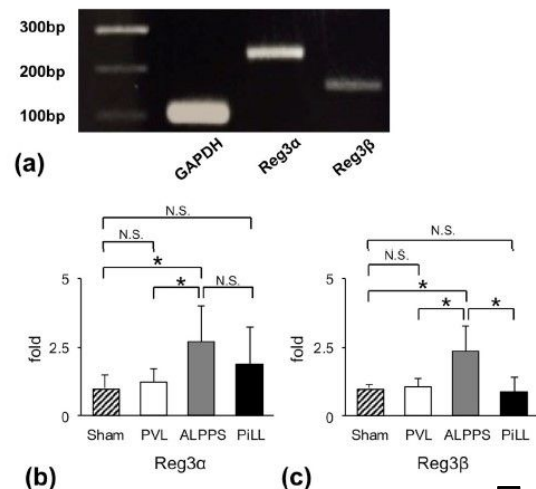


図 4

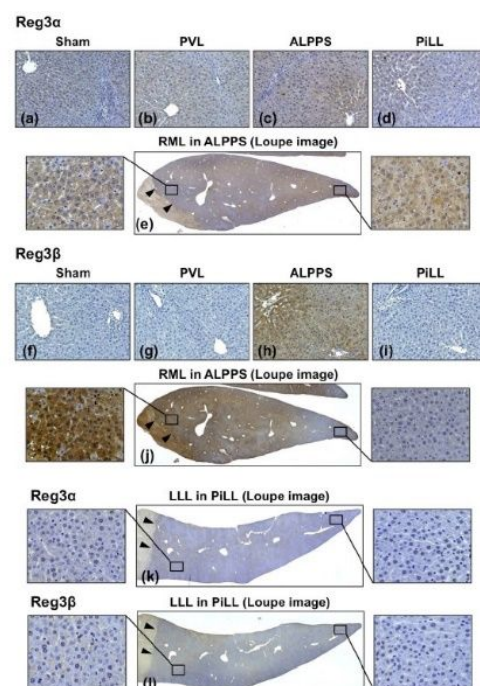


図 5



JAK2 の阻害によって PVL や PiLL 群を上回る分の肝再生のみが抑制された。

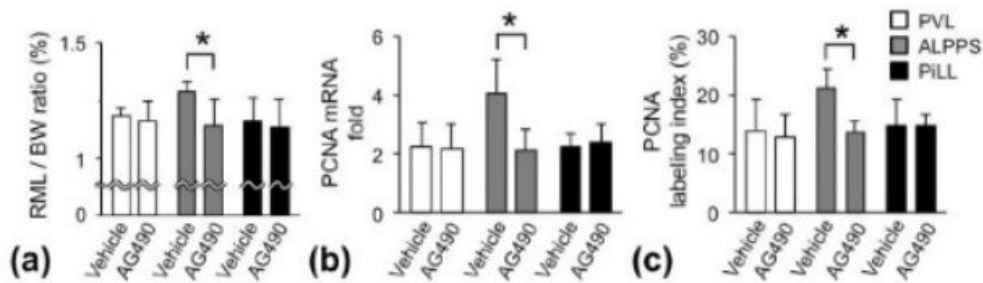


図 6

ALPPS 群における JAK2 活性化の裏をとるためにリン酸化 STAT3 を染色したところ(図 7) PVL や PiLL 群での染色はなく、ALPPS 群でのみ発現が見られ、その部位は興味深いことに Reg3 の染色域と一致していた。Reg3 が JAK2/STAT3 経路を活性化すると諸家の報告と考え合わせると、ALPPS 手技における肝再生はサイトカイン増加を基本としたメカニズムよりも、Reg-JAK2/STAT3 経路の活性化が本質をなしていると考えられる。

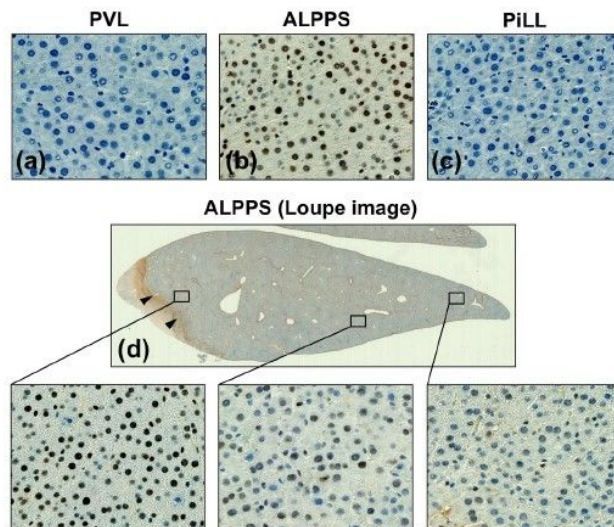


図 7

(4) Reg3 と 3 の遺伝子発現部位と Muse 細胞の homing に関する検討。

最近、各種障害細胞の再生の根幹となる幹細胞である Muse 細胞には障害部位への高いホーミング機能があり、組織の分化・修復能を有することが報告された。Reg 蛋白発現部位での JAK2/STAT3 活性が高かったことや、その部位が肝離断面付近に集中していたことから、本研究においても、肝離断による肝組織障害と Muse 細胞の影響を検討する必要があると考えられた。

Muse 細胞のホーミングは S1P 受容体 2 を介しているとの報告に従い、抗 S1PR2 抗体(ab235919)を用いて各群で S1PR2 の発現を免疫組織染色で検討したが、我々の系ではいずれにも S1PR2 の発現は見られず(図 8) ALPPS 手技による肝再生は Muse 細胞による再生とは独立したメカニズムであると考えられた。



図 8

(5) アシアロシンチ取り込み局線の解析による肝の区画別肝機能指標パラメーターの開発。

本研究では肝の再生能力に関して核分裂能などの指標で評価してきたが、臨床で体積再生に比して、肝機能が劣っている可能性も指摘されていることから、肝の部位による機能評価を行える指標が必要である。現在のところ、動物モデルで領域別の肝機能の評価する方法はなく、アシアロシンチが一番可能性を秘める。しかし、現状臨床でのパラメーターではこの目的に不十分なため、肝へのアシアロ蛋白取り込み率を time activity curve から直接評価する KrGSA を考案し、まずは、臨床で検証した。図9のように KrGSA を計算したところ、KICG と極めて良い相関で肝機能を測定できた(図10)、ICG 検査との違いは全肝機能のみならず、シンチの ROI 設定部位によって部分肝の領域機能を個別に評価できる基盤ができた事である。

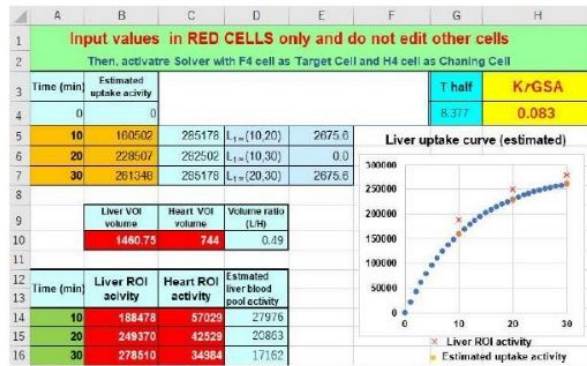


図9

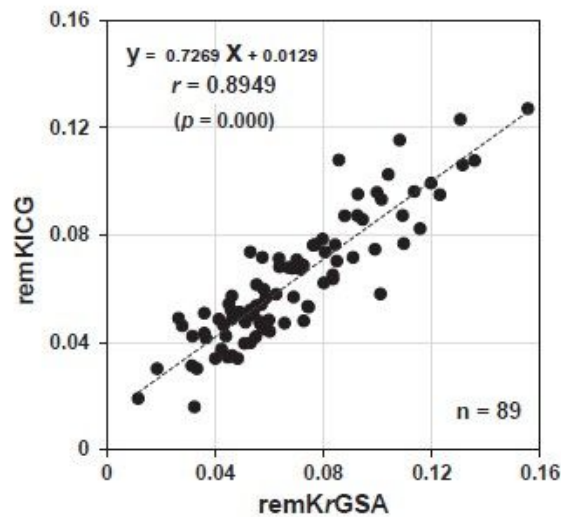


図10

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamamoto Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 Evaluation of Liver Function and the Role of Biliary Drainage before Major Hepatic Resections.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Visc Med	6. 最初と最後の頁 10-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iida M, Yamamoto Y, Kato H, Taniguchi N, Abe Y, Kumagai K, Uchinami H.	4. 巻 8
2. 論文標題 99mTc-GSA scintigraphy for assessing the functional volume ratio of the future liver remnant in the routine practice of liver resection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery Open Science	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sopen.2021.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Otsuka N, Yoshioka M, Abe Y, Nakagawa Y, Uchinami H, Yamamoto Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Reg3 and Reg3 expressions followed by JAK2/STAT3 activation play a pivotal role in the acceleration of liver hypertrophy in a rat ALPPS Model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 4077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21114077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Y, Abukawa Y, Sato K, Watanabe G, Nakagawa Y, Hashimoto M, Iida M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Usefulness of Liver Uptake Rate Constant in 99mTc-GSA Scintigraphy for the Risk Stratification of Patients Undergoing Hepatectomy: A New Method for Calculation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Visceral Medicine	6. 最初と最後の頁 400 ~ 407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000525892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yamamoto Y.
2. 発表標題 Liver Parenchyma Dissection Technique.
3. 学会等名 Modern Liver Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 打波宇、飯田正毅、渡辺剛、中川康彦、阿部ゆき、熊谷健太、佐藤公彦、山本雄造
2. 発表標題 当科における肝胆膵癌に対する切除成績の推移
3. 学会等名 第34回秋田県肝胆膵癌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Otsuka N, Yoshioka M, Yamamoto Y.
2. 発表標題 Characteristic expression of Reg3 and Reg3 in a rat ALPPS model.
3. 学会等名 55th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR). (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto Y, Katoh H, Abukawa Y, Taniguchi N, Uchinami H, Iida M, Nakagawa Y, Abe Y, Otsuka N, Hashimoto M.
2. 発表標題 Reappraisal of old and new parameter, uptake rate constant for $^{99m}\text{Tc}$ -GSA scintigraphy in evaluating liver function.
3. 学会等名 55th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR). (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Otsuka N, Yoshioka M, Yamamoto Y.
2. 発表標題 Characteristic expression of Reg3 and Reg3 in a rat ALPPS model.
3. 学会等名 55th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR). (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本雄造、打波宇、飯田正毅、渡辺剛、中川康彦、阿部ゆき、熊谷健太、渡邊翼
2. 発表標題 残肝機能予備力の判定をICG検査から99mTc-GSAシンチグラフィに替えられるか？
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020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	打波 宇  (Uchinami Hiroshi)  (40400486)	秋田大学・医学系研究科・准教授   (11401)	
研究 分担者	南條 博  (Nanjo Hiroshi)  (70250892)	秋田大学・医学部附属病院・准教授   (11401)	

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
---------	---------