

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591980

研究課題名(和文)脾臓摘出による新しい肝細胞癌発癌抑制治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new therapy of hepatocellular carcinoma by splenectomy

研究代表者

渡辺 基信(WATANABE, MOTONOBU)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00568959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脾臓摘出が肝臓に与える長期的な治療成績は不明である。本研究の目的は脾臓摘出による肝臓抑制・治療効果を明らかにすることである。マウスの脾臓に肝臓を移植し脾臓摘出に近い群として脾門部を結紮した群を対照群と比較した。線維化刺激を継続して3週後の肝臓を評価すると脾門部の血流を遮断することによりその増殖は有意に抑制された。肝臓が発症した後であっても脾臓摘出を行うことは腫瘍抑制に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The relationship between splenectomy and progression of HCC is still unclear. The purpose of this research is to evaluate the effect of splenectomy on progression of HCC and to develop a new therapy of HCC by splenectomy. One week after injecting murine HCC to wild type mouse liver through spleen, spleen ligation group mimicking splenectomy and control group were determined. Three weeks later, livers of both groups were removed. In the spleen ligation group, volume of HCC was significantly reduced compared to control group. This study suggests the suppressive effect of splenectomy on HCC progression.

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：脾臓 肝細胞癌 免疫 発癌 癌発育

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の原因疾患として最も多いのが C 型肝炎である。現在 170 万人が慢性肝炎となっているが 30% は肝硬変から肝細胞癌を発生する。我が国の HCV の特徴は抗ウイルス療法に反応しにくい 1b 型が大多数を占めることであり、線維化の進行と共に発癌の可能性が高まってくる。また、メタボリックシンドロームの一種である非アルコール性脂肪性肝疾患は成人の 15~30% が有する疾患であり、そのうち約 10% は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に進行する。NASH は肝臓への脂肪沈着に加えて壊死炎症性変化を示し、肝硬変から肝細胞癌を発生する。C 型肝炎、NASH とともに発癌を抑制する治療法は皆無であり、その開発が社会的に強く求められている。

2. 研究の目的

肝細胞癌の多くは慢性肝炎、肝硬変を背景に多段階の発癌様式を示すことが明らかになってきた。我々は世界に先駆けて血小板を増加させる増殖因子であるトロンボポエチンとそれによって増加した血小板による肝線維化抑制効果を発見した。肝硬変患者に対し脾臓を摘出することによって持続的な血小板増加状態を維持することができ、肝機能改善効果が得られることが臨床においても報告されている。しかし、脾臓摘出が肝細胞癌に与える長期的な治療成績は不明である。本研究の目的は脾臓摘出による肝細胞癌抑制・治療効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)脾臓摘出による生体内環境の変化

癌抑制遺伝子 Pten の肝臓特異的ノックアウトマウス (Pten CK0 マウス) は脂肪肝を背景に肝細胞癌を自然発癌することが知られている。脾臓摘出による生体への影響につ

いて、我々はすでに肝線維化マウスを用いて線維化抑制効果があることを明らかにしているが、今回の実験で Pten CK0 マウスに対する脾臓の影響について検討した。PTE CK0 マウスを脾臓摘出群、対照群に分け、8~9 週齢で脾臓を摘出した。脾臓摘出から 10 週、20 週、30 週で犠牲死し、肝組織とリン酸化 Akt のシグナルの発現を評価した。

(2)脾臓摘出による肝細胞癌の変化・腫瘍増殖に与える影響

脾臓摘出による肝癌抑制効果を検討するため、原発性肝癌モデルの作成を試みた。C57BL/6 マウスの肝左葉に同マウス由来肝癌細胞株である Hepa1-6 を 100 万個局所注入した。

正常肝状態の SCID マウスに対し、ヒト由来肝癌細胞株である Hep G2 をマトリゲルに溶解し 500 万個を肝左葉に局注した。

C57BL/6 マウスの肝臓に 30 秒間の虚血再灌流障害を加えて、マウス肝癌細胞 Hepa1-6 を脾臓より注入した。脾臓に残存する腫瘍の影響を考慮して、脾臓を結紮することで脾臓摘出の代用とした群 (便宜的に脾臓摘出群とよぶ) としない群 (対照群) を作成し、3 日毎計 4 回の四塩化炭素刺激によって肝線維化を作成した。腫瘍注入より 3 週間後にマウスを犠牲死させ肝臓を摘出した。検討項目は腫瘍重量、肝組織像である。

4. 研究成果

(1)脾臓摘出による生体内環境の変化

Pten CK0 マウスに脾臓摘出を行って 30 週間経過を観察したが、肝臓の脂肪化、線維化に著変なく、脾臓摘出群でも腫瘍形成が認められた (Figure 1)。また Pten CK0 マウスの特徴として Akt の過剰発現が肝臓の脂肪化、線維化、腫瘍形成に関与している。本実験では脾臓摘出による Akt の抑制効果は認められ

なかった (Figure 2)。

Figure 1 脾臓摘出による Pten CK0 マウスの組織学的変化

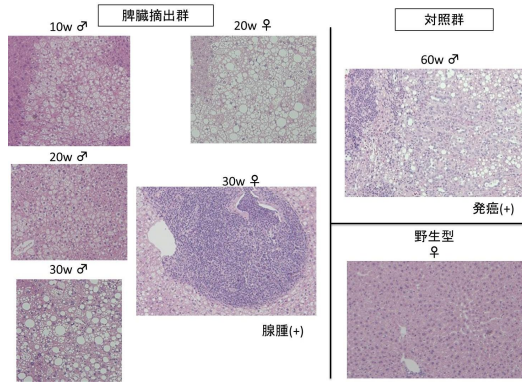
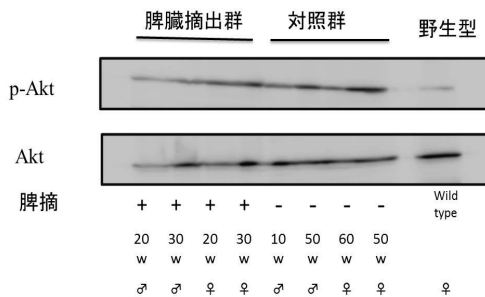


Figure 2 脾臓摘出による Pten CK0 マウスの p-Akt 抑制効果の検討

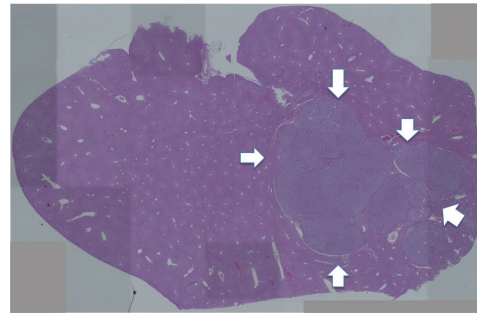


(2) 脾臓摘出による肝細胞癌の変化・腫瘍増殖に与える影響

C57BL/6 マウスの肝左葉に Hepa1-6 を 100 万個注入したが、明らかな腫瘍形成は認められなかった。

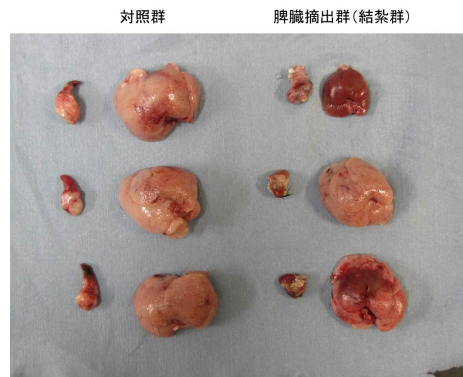
HepG2 を 500 万個マトリゲルに溶解し SCID マウス左葉に注入して腫瘍生着を認めた (Figure 3)。矢印で囲まれている部位が腫瘍である。再現性の問題と免疫能の問題から今回はモデル作成にとどめた。

Figure 3 マトリゲルに溶解したヒト肝癌細胞株の SCID マウスへの移植モデル



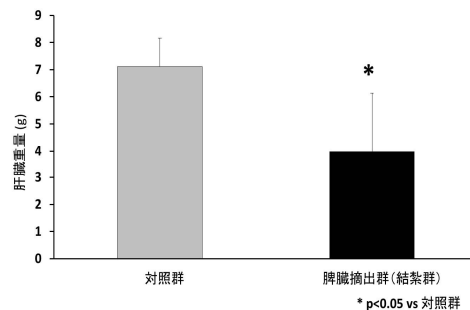
C57BL/6 マウスに Hepa1-6 を移植し、1 週間後に脾臓を結紮することで脾臓摘出の代用とした。結紮しない対照群と比較した。両群とも腫瘍の生着が著明であった (Figure 4)。

Figure 4 対照群と脾臓摘出群の肝臓



脾臓摘出群は対照群に比べて肝重量が有意に低下し、腫瘍重量が低下していた (Figure 5)。

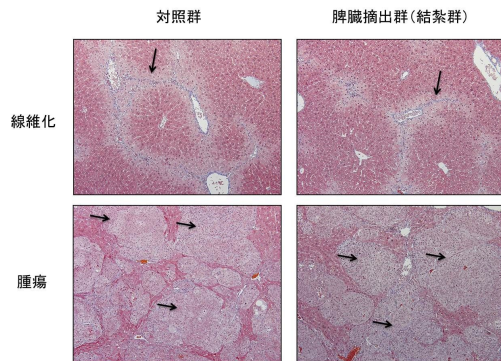
Figure 5 肝臓重量



マッソントリクローム染色では腫瘍周囲の

線維化の程度に大きな違いは認められなかった(Figure 6)。

Figure 6 脾臓摘出群と対照群の組織学的変化



これらの検討によって脾臓摘出は肝細胞癌の予防には寄与しないものの、肝細胞癌の進行にある程度抑制的な作用をもたらすことが示唆された。肝硬変に合併した肝細胞癌の手術治療を行う際、脾臓摘出もしくは部分的脾動脈塞栓術（PSE）のような低侵襲の治療を組み合わせることで肝機能の改善に加えて肝細胞癌の抑制効果も合わせて期待できるのではないかと考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 基信 (WATANABE MOTONOBU)

筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：00568959

(2)研究分担者

久倉 勝治 (HISAKURA KATSUJI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60550168

(3)連携研究者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673