

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462079

研究課題名(和文) 至適肝容積を超えた過大肝再生誘導における肝再生機構および肝幹・前駆細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the role hepatic hypertrophy and functional analysis of hepatic stem/progenitor cells after the induction of hypertrophy of the liver

研究代表者

加藤 厚 (KATO, ATSUSHI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70344984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：拡大肝切除を予定する胆道癌症例に対する門脈塞栓術は術前の減黄の有無にかかわらず肝再生が誘導され安全に施行できる手技であることを報告した。(Hepatogastroenterology. 61: 908-15, 2014) 門脈塞栓術後の肝再生に関する因子の検討では予定残肝容積、血清ALP値、血清CRP値が独立した因子として抽出され、胆管炎の有無が有意な肝再生抑制状態であることが示唆され、マウス胆管炎モデルにおける門脈結紮後の肝再生では非結紮葉の再生遅延が確認され、胆管炎モデルにおいて肝星細胞の活性化と類洞内皮障害、さらには肝幹・前駆細胞の機能解析などを行っている。

研究成果の概要(英文)：Portal vein embolization (PVE) in patients with elevated bilirubin levels dose not affect in hypertrophy of remnant liver and postoperative outcomes of subsequent major hepatectomy. Therefore, PVE can perform safely and effectively in patients with obstructive jaundice regardless of serum bilirubin concentration. (Hepatogastroenterology. 61: 908-15, 2014) In multivariate analysis, remnant liver volume, serum ALP levels, and serum CRP levels are independent predictive facts for hypertrophy of remnant liver after PVE. These results suggest that acute cholangitis could attenuate hypertrophy of remnant liver. We think about the challenges and future directions of the mechanisms of hypertrophy of remnant liver after PVE by assessing the activation of hepatic stellate cells, function of hepatic stem/progenitor cells.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：肝再生 門脈塞栓術 胆管炎 肝類洞内皮障害 肝幹・前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

1997年に臓器移植法が制定され、我が国においても脳死肝移植が行われるようになったが、いまだに脳死移植症例数は少ない状況の中、生体肝移植が広く施行されている。しかしながら、容量不足にともなうドナーの不適合や肝移植後の small-for-size による肝不全などが問題となっている。また、進行胆道癌や転移性肝癌などの根治切除を目的に拡大肝葉切除などの大量肝切除が必要な症例において、門脈塞栓術を行っても十分な残肝容積が確保できず手術適応とならない症例がある。このような肝容積の不足にともなう手術適応の限界を解決する手段の一つとして、再生限界を超えた過大肝再生誘導が考えられる。有効な再生肝機能をともなう過大肝再生が可能であれば、生体肝移植の適応拡大にともなうとともにドナーおよびレシピエント移植手術における安全性が高まると考えられ、また、肝胆道系腫瘍に対する適応の拡大と肝切除の安全性が飛躍的に向上する可能性がある。

2. 研究の目的

過大肝再生を誘導できるような臨床応用可能な手段を確立するために、本研究では、至適肝容積を超えた過大肝再生誘導における肝再生機構の解明、肝再生停止機構制御とその分子生物学的機序の解明、再生肝組織の機能分析などの基礎的検討を行うことを目的とする。

さらに拡大肝切除を予定している症例においては、残肝容積を増大させる目的で門脈塞栓術が広く施行されている。しかしながら、目的とする肝容積に到達するか、あるいは到達するまでの待機期間についての明らかなエビデンスのある報告は少ない。このため、門脈塞栓術後の肝再生に関する因子を、臨床的、基礎的にそのメカニズムと制御について検討する。

3. 研究の方法

臨床的に門脈塞栓術後の肝再生に関わる因子を網羅的に検討するとともに、血清サンプルを用いて、肝再生に関与すると考えられる各種サイトカイン、ホルモンなどの液性因子の測定を行い、再生の予測因子を多変量解析の手法にて検討する。抽出された因子について動物モデルにて再現した実験系を確立し、肝内に存在する類同内皮細胞、星細胞の機能と働きおよび細胞内シグナル伝達に関して検討する。

さらに動物実験モデルとして甲状腺ホルモンを投与し、至適肝容積を超えた過大肝再生誘導ラットを作成し、その機序を詳細に検討する。また、脾動脈門脈吻合モデルを作成して、shear stress における過大肝

再生の機序を解明する。これらのモデルにおいて肝再生に関与する各種液性因子の役割を解析するため、Bio-PlexTM サスペンションアレイシステムを用いて血清蛋白および肝組織中の蛋白発現を網羅的に解析する。また、シグナル伝達機構解明のため、STAT および Smad family などの転写因子の活性化および DNA 結合能について EMSA 法にて検討する。また、肝幹・前駆細胞を抗 EpCAM 抗体および抗 Trop2 抗体で同定。肝幹・前駆細胞の分化誘導に関する肝成熟誘導因子である Wnt/ β -catenin 経路を検討。さらに肝細胞肥大について免疫染色法にて検討する。

4. 研究成果

大量肝切除を予定した症例に対する門脈塞栓術後の肝再生に関する臨床的検討を行った結果、黄疸肝症例では減黄の有無に関わらず肝再生が誘導され、拡大肝切除を予定する胆道癌症例に対する門脈塞栓術は黄疸の有無にかかわらず安全に施行できる手技であることを報告した (Hepatogastroenterology. 61: 908-15, 2014)。さらに門脈塞栓術後の肝再生に関与する因子の検討では、単変量解析において予定残肝容積、全肝容積、血清 ALP 値、血清 GTP 値、血清 CRP 値が残り、さらに術前 IL-6 値、術前ヒアルロン酸値が有意な因子として抽出された。多変量解析では予定残肝容積、全肝容積の他、血清 ALP 値、血清 CRP 値が独立した因子として抽出された。特に門脈塞栓術前の3日以内の胆管炎の有無(急性胆管炎・胆嚢炎診療ガイドライン: TG13 に準拠した定義による)は有意な肝再生抑制状態であることが示唆された。

マウス胆管内に lipopolysaccharide (LPS) を注入して胆管炎モデルを作成したのちに70%領域の門脈結紮を行い、その後の肝再生についての検討を施行している。胆管炎モデルでは門脈結紮後の結紮葉の縮小が正常肝モデルと比較して遅延しているとともに、非結紮葉の再生遅延が確認されている。以前報告したマウス胆管結紮モデル (J Surg Res. 162: 46-53, 2010) では、肝星細胞の活性化と類洞内皮障害が肝阻血再灌流障害に関与していることを報告しており、胆管炎モデルにおいてエンドセリン1および肝星細胞の活性化の有無、さらには過大肝再生に関するメカニズムを探索するために、肝幹・前駆細胞の機能解析などを免疫組織染色および細胞内シグナル伝達の観点から検索を行っている。

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 7件)

1. Shinoda K, Kuboki S, Shimizu H,

- Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Pin 1 facilitates NF-kappaB activation and promotes tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 113: 1323-1331, 2015. (査読有り)
2. Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Nakadai E, Kishimoto T, Nakatani Y, Yoshidome H, Miyazaki M. Downsizing Chemotherapy for Initially Unresectable Locally Advanced Biliary Tract Cancer Patients Treated with Gemcitabine Plus Cisplatin Combination Therapy Followed by Radical Surgery. *Ann Surg Oncol*. 22: 1093-1099, 2015.(査読有り)
 3. Sakakibara M, Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Preoperative Portal Vein Embolization before Major Hepatectomy in Patients with Excess Bilirubin does not Affect Hypertrophy of Remnant Liver and Postoperative Outcomes. *Hepatology*. 61: 908-15, 2014. (査読有り)
 4. Shimizu H, Hosokawa I, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Clinical significance of anatomical variant of the left hepatic artery for perihilar cholangiocarcinoma applied to right-sided hepatectomy. *World J Surg*. 38: 3210-4, 2014. (査読有り)
 5. Hosokawa I, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Surgical strategy for hilar cholangiocarcinoma of the left-side predominance: current role of left trisectionectomy. *Ann Surg*. 259: 1178-85, 2014. (査読有り)
 6. Yoichi T, Takayashiki T, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Kuboki S, Okamura D, Suzuki D, Nakajima M, Miyazaki M. Protective effects of simultaneous splenectomy on small-for-size liver graft injury in rat liver transplantation. *Transpl Int*. 27: 106-13, 2014. (査読有り)
 7. Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Yoshidome H, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Kimura F, Miyazaki M. Surgical Resection after Downsizing Chemotherapy for Initially Unresectable Locally Advanced Biliary Tract Cancer: A Retrospective Single Center Study. *Ann Surg Oncol*. 20: 318-324, 2013.(査読有り)
- [学会発表](計 5件)
1. 大塚将之, 清水宏明, 加藤 厚, 吉富秀幸, 古川勝規, 高屋敷 吏, 久保木 知, 高野重紹, 岡村大樹, 鈴木大亮, 酒井 望, 賀川真吾, 宮崎 勝. 肝内胆管癌に対する外科切除を中心とした治療戦略. (ワークショップ) 第27回日本肝胆膵外科学会学術集会、ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京都港区、2015年6月12日
 2. Atsushi Kato, Hiroaki Shimizu, Masayuki Ohtsuka, Hideyuki Yoshitomi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Daiki Okamura, Daisuke Suzuki, Nozomu Sakai, Masayuki Nakajima, Masaru Miyazaki. Multidisciplinary approach with downsizing chemotherapy followed by

surgical resection for patients with initially unresectable locally advanced biliary tract cancer. (シンポジウム) 第 26 回日本肝胆膵外科学会学術集会、和歌山県民文化会館、和歌山県和歌山市、2014 年 6 月 12 日

3. 久保木 知, 清水宏明, 大塚将之, 加藤 厚, 吉富秀幸, 古川勝規, 高屋敷 吏, 宮崎 勝. 阻血障害肝切除術後の転写因子活性抑制に伴う肝再生遅延機序への Pin1 の関与の解明及びその対策.(シンポジウム) 第 23 回消化器とフリーラジカル研究会、京都府立医科大学、京都府京都市 2014 年 3 月 8 日
4. 加藤 厚, 清水宏明, 大塚将之, 吉富秀幸, 古川勝規, 高屋敷吏, 久保木知, 岡村大樹, 鈴木大亮, 酒井望, 中島正之, 宮崎 勝. 切除不能局所進行胆道癌に対する Downsizing chemotherapy による Conversion therapy の有用性とピットフォール. (パネルディスカッション) 第 75 回日本臨床外科学会総会、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市、2013 年 11 月 21 日
5. 久保木 知, 清水宏明, 大塚将之, 加藤 厚, 吉富秀幸, 古川勝規, 竹内男, 高屋敷 吏, 鈴木大亮, 中島正之, 相田俊明, 宮崎 勝. 阻血障害肝切除後の転写因子活性抑制に伴う肝再生遅延機序への Pin1 の関与の解明及びその対策.(パネルディスカッション) 第 113 回日本外科学会定期学術集会、福岡国際会議場、福岡県福岡市、2013 年 4 月 11 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 厚 (KATO ATSUSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70344984

(2)研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156

久保木 知 (KUBOKI SATOSHI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50571410

岡村 大樹 (OKAMURA DAIKI)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号：50375698