

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893156

研究課題名(和文)肝発癌における脾臓の役割解明に関する研究

研究課題名(英文)A study on the role of the spleen in liver carcinogenesis

研究代表者

齋藤 裕 (SAITO, Yu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50548675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変患者は、脾臓内TGF- β 1発現が亢進しており、それは脾臓内マクロファージ由来のものであった。さらに、肝硬変患者の脾臓内IL-6、TNF- α 、MCP-1発現は低下しており、HGF発現は逆に亢進していた。また、脾摘患者において、肝癌合併・非合併例で比較した結果、肝癌合併例において、肝発癌に關与するIL-6、HGF、IL-8の脾臓内発現が有意に亢進しており、また、HGFの受容体であるc-Metの肝非癌部における発現も有意に増強していた。肝線維化・肝発癌ともに肝脾連関の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In Cirrhotic patients, the expressions of TGF- β 1 derived from splenic macrophage in were significantly higher than those in normal liver patients. In addition, the splenic IL6, TNF- α , and MCP-1 expressions were lower and HGF expressions were higher. In the patients with splenectomy accompanied with liver cancer, the splenic IL-6, HGF and IL-8 expressions were significantly higher than those in the patients with splenectomy accompanied without liver cancer. Hepatic c-Met, the receptor of HGF, expression were also higher. The relationship between spleen and liver had a critical role in liver fibrosis and carcinogenesis.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 脾摘 HGF c-Met

1. 研究開始当初の背景

脾臓は門脈系に介在する末梢最大のリンパ装置で、B 細胞成熟の場としてだけでなく、胸腺外分化 T 細胞などの細胞性免疫にも関与し、癌の転移抑制に働くことが報告されている。外科領域においても、肝硬変に伴う脾機能亢進症に対する脾臓摘出(脾摘)など、さまざまな病態で脾摘の機会に遭遇する。肝硬変症モデルで、脾臓由来、門脈血中の TGF-β が高値となることが報告されており(*J Gastroenterol Hepatol*, 2002)、脾臓による肝線維化促進の機序が解明されつつある。しかしながら、硬変肝から発生する肝細胞癌において、その発生に脾臓が果たす役割はこれまでほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、肝硬変症における(1)脾臓中の TGF-β1 発現(2)脾臓中サイトカイン発現、(3)肝発癌に与える脾臓の作用を検討することで、線維化ならびに発癌における肝脾連関を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脾臓中 TGF-β1 発現

当科で脾摘を施行した 22 例(肝硬変症例 13 例、正常肝症例 9 例)を対象とした。脾臓内の TGF-β1 発現を real time PCR 及び免疫組織染色で定量化し、比較検討した。さらに、TGF-β1 産生細胞の同定をするべく、TGF-β1, CD68 二重染色も行った。

(2) 脾臓中サイトカイン発現

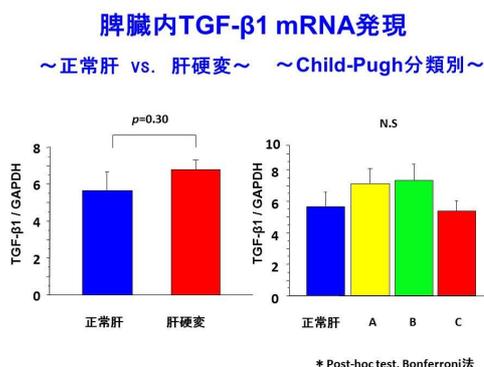
当科で脾摘を施行した 22 例(肝硬変症例 13 例、正常肝症例 9 例)を対象とした。脾臓内の IL-6, HGF, TNF-α, IL-8, VEGF, MCP-1, MMP2/9 発現を real time PCR で定量化し比較検討した。

(3) 肝発癌に与える脾臓の作用

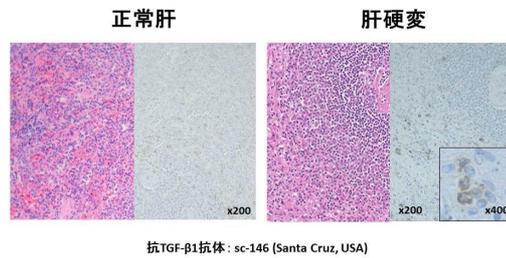
当科で肝硬変症に対して脾摘を施行した肝硬変症例 13 例を対象とした。肝癌合併症例と脾合併症例に分類し、脾臓内の IL-6, HGF, IL-8 を real time PCR で定量化し、cMet 発現を免疫組織染色で定量化し、比較検討した。

4. 研究成果

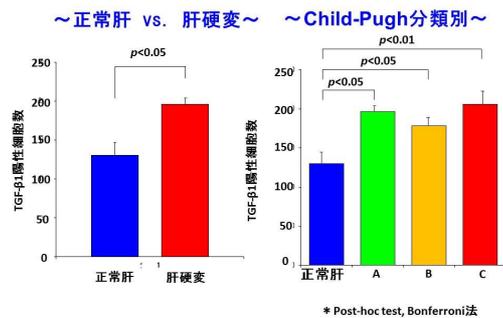
(1) 脾臓中 TGF-β1 発現



免疫組織化学染色 ~TGF-β1~



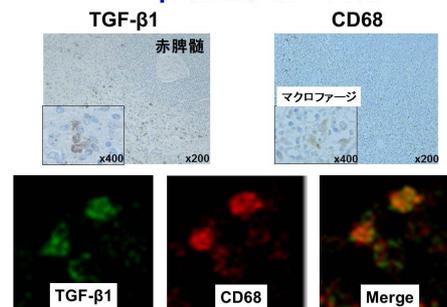
脾臓内 TGF-β1 蛋白発現



real time PCR では、両群間での TGF-β1 発現に有意差を認めなかったが、免疫染色では、肝硬変症例で有意に高発現であり、Child A, B, C 別にみても、正常肝と比して高発現していた。

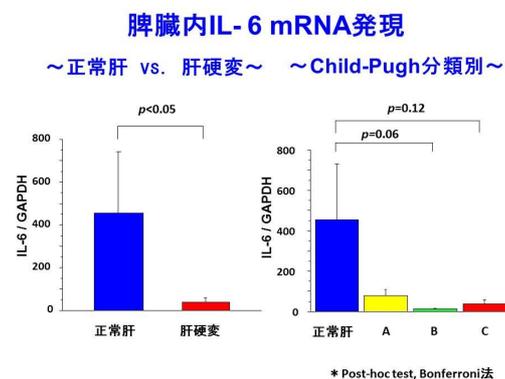
TGF-β1 とマクロファージマーカーである

TGF-β1 産生細胞の同定



CD68 の免疫染色結果からは、TGF-β1 産生細胞として脾臓中マクロファージが同定された。

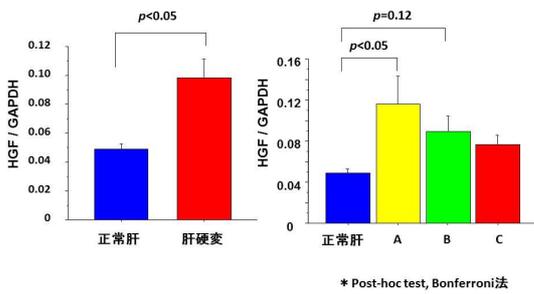
(2) 脾臓中サイトカイン発現



肝硬変症例で脾臓中 IL-6 発現は低下。

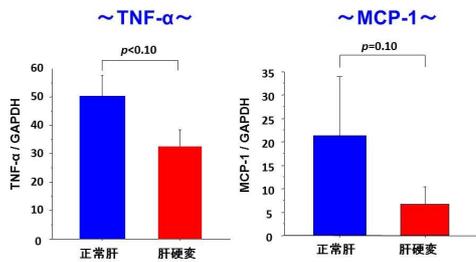
脾臓内HGF mRNA発現

～正常肝 vs. 肝硬変～ ～Child-Pugh分類別～



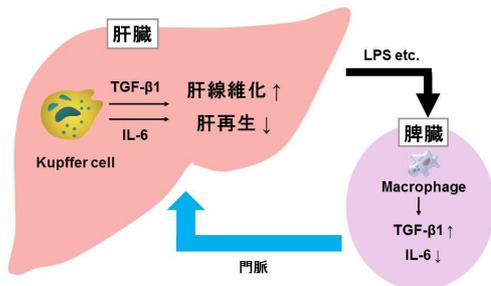
脾臓内 HGF 発現は上昇

脾臓内TNF- α , MCP-1 mRNA発現



脾臓内 TNF- α 、MCP-1 は低下傾向
その他 VEGF、IL-8、MCP2/9 に関しては両群間に有意差を認めなかった。

慢性肝障害と肝脾連関

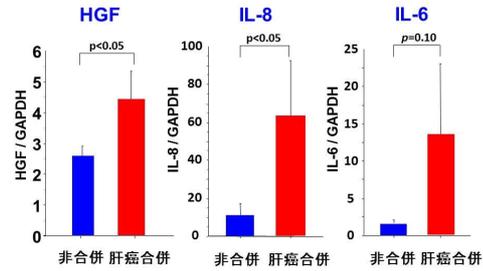


脾臓内で産生されたサイトカインが門脈血を介し肝再生、肝線維化に関与。

以上の結果より、肝障害により活性化された脾臓中マクロファージの TGF- β 1 産生が亢進し、門脈を介して肝線維化を促進させた。肝再生を抑制する TGF- β 1 の発現亢進、肝再生を促進する IL-6 の発現低下などが、同様に門脈血を介して肝臓に作用し、肝再生抑制へとつながるといふ “肝脾連関” が一機序として考えられた。

(3) 肝発癌に与える脾臓の作用

脾臓中発癌関連サイトカイン

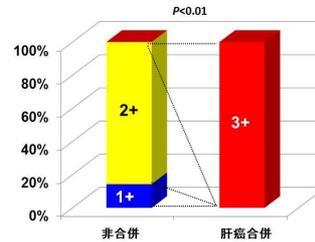


肝癌合併例では脾臓内HGF, IL-8が有意に高発現

過去に肝発癌に關与すると報告されている HGF(*Oncogene. 2002*) IL-6(*Science. 2007*)、IL-8 (*Hepatology. 2012*) の脾臓中発現が、全て肝癌合併症例で高値であった。

c-Met発現強度 (肝非癌部)

～免疫組織化学染色～



肝癌合併例では肝非癌部のc-Metが有意に高発現

また、HGF の受容体である c-Met 発現に関して免疫組織化学染色の発現強度で比較したところ、肝非癌部において、c-Met 発現は肝癌合併例で有意に増強しており、肝発癌における肝脾連関の関与も示唆された。

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 6 件)

- Enkhbold C, Morine Y, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, Arakawa Y, Saito Y, Yamada S, Ishikawa D, Shimada M. Dysfunction of liver regeneration in aged liver after partial hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Feb 13. doi: 10.1111/jgh.12930. in press. 査読有
- Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Takasu C. Homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014;21(12):873-880. doi: 10.1002/jhbp.147. 査読有
- Asanoma M, Ikemoto T, Mori H, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Shimada M. Cytokine

expression in spleen affects progression of liver cirrhosis through liver-spleen cross-talk. *Hepatol Res.* 2014;44(12):1217-1223. doi: 10.1111/hepr.12267. 査読有

4. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Saito Y, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S. Trophic effect of adipose tissue-derived stem cells on porcine islet cells. *J Surg Res.* 2014;187(2):667-672. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.031. 査読有
5. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y. CXC receptor 4 and stromal cell-derived factor 1 in primary tumors and liver metastases of colorectal cancer. *J Surg Res.* 2014 Mar;187(1):107-112. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.030. 査読有
6. Saito Y, Mori H, Takasu C, Komatsu M, Hanaoka J, Yamada S, Asanoma M, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Shimada M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol.* 2014;49(4):692-701. doi: 10.1007/s00535-013-0799-9. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S. Usefulness of 3D-virtual hepatectomy and intraoperative navigation system in liver resection. **第28回国際コンピュータ支援放射線医学・外科学会(ARS)** 2014年6月25日-28日福岡国際会議場(福岡県福岡市)
2. Saito Y. The organ-specific protective effects of human adipose derived stem cells. **International Hepato-Pancreato-Biliary Association 11th World Congress(IHPBA)** 2014年5月22日-27日 Coex(韓国ソウル)
3. Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y, Takasu C, Yamada S. Recent Advancements in Liver Surgery: Assessment of Functional Reserve, Simulation and Navigation. **International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists 2013 (IASGO)** 2013年9月18日-21日 The Palace of the Parliament(ルーマニア ブカレスト)
4. Arakawa Y, Shimada M, Ishikawa D, Yamada S, Saito Y, Takasu C, Iwahashi S, Kanamoto M, Mori H, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Utsunomiya T, Sato H, Miyake H. The gene profile in the spleen under rat small-for-size graft model using cDNA microarray and pathway analysis. **The 13th Congress of the Asian Society Of**

Transplantation 2013 (CAST) 2013年9月2日-6日 国立京都国際会館(京都府京都市)

5. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Takasu C. The homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: The shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. **The 13th Congress of the Asian Society Of Transplantation 2013 (CAST)** 2013年9月2日-6日 国立京都国際会館(京都府京都市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 裕 (SAITO, Yu)
徳島大学・大学院ヘルスケア工学研究部・助教
研究者番号: 50548675

(2) 研究協力者

居村 暁 (IMURA, Satoru)
徳島大学・病院・特任教授
研究者番号: 90380021

森根 裕二 (MORINE, Yuji)
徳島大学・大学院ヘルスケア工学研究部・講師
研究者番号: 60398021

池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)
徳島大学・大学院ヘルスケア工学研究部・助教
研究者番号: 20398019