

氏 名（本籍）	くら た まさ なお 倉 田 昌 直（茨 城 県）
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 4089 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	ラット肝における虚血再灌流後肝転移の成立機序の解明と転移制御 ーアンチトロンビンの転移抑制効果の検討ー

主 査	筑波大学教授	医学博士	兵 頭 一之介
副 査	筑波大学教授	歯学博士	吉 田 廣
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	三 好 浩 稔
副 査	筑波大学講師	医学博士	正 田 純 一

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### 目的：

血行性転移は担癌患者の予後を左右する最も重要な因子である。肝切除を伴う消化器癌手術時には、プリングル法など肝虚血再灌流を要し転移を生じやすい環境となる。転移が促進される機序として、サイトカインによる類洞内皮細胞障害により接着分子の発現が亢進したり類洞内血栓形成による微小循環障害が生じるため、癌細胞の着床が促進すると考えられている。肝虚血再灌流後ラット大腸癌肝転移モデルを作成してセリンプロテアーゼインヒビターである Antithrombin (AT) と Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) の肝転移抑制効果ならび肝転移成立における類洞内皮細胞障害、微小循環障害への影響を解明し、癌細胞の着床のメカニズムについて検討した。

### 対象と方法：

8 週齢 Fisher344 雄性ラットに 30 分間 70% 肝虚血・非虚血肝切除の侵襲を加えた。ラットは以下の 6 群に分類した。再灌流前に AT 500 U/kg を静注する I/R+AT 群、PGI<sub>2</sub> の阻害剤である indomethacin (IM) で前処置した I/R+AT+IM 群、PGI<sub>2</sub> analogue である OP-2507 1μg/kg を静注する I/R+OP-2507 群、また転移形成に微小血栓が関与しているかどうか調べるために抗凝固剤である argatroban で前処置した I/R+argatroban 群、生理食塩水を投与した I/R+saline 群、虚血操作を加えない Sham 群を設定した。ラット大腸癌高肝転移細胞株 RCN-H4 を脾注し肝転移モデルを作成し、術後 7 日目に残肝の全割切片を作成し単位面積あたりの肝転移数を算出し比較検討した。また再灌流後の肝組織中の TNF-α、E-selectin の mRNA 発現、Prostacyclin の代謝産物 (6-keto-PGF<sub>1α</sub>) を再灌流後、経時的に測定しピーク時において各群を比較検討した。血栓形成の判定は血清 FDP 値で評価した。更に AT 活性がワイルドタイプマウスと比較して 50% であることが知られている AT ノックアウトマウスを用いて同様に術後 7 日目の肝転移数を算出した。

#### 結果：

I/R+saline 群は Sham 群と比較して有意に術後 7 日目の残肝転移数は増加した。I/R+AT, I/R+OP-2507 群は I/R+saline 群に比べ有意に転移数を減少させたが I/R+IM 群, I/R+argatroban 群では転移数は減少しなかった。虚血再灌流後 30 分における肝組織中の TNF- $\alpha$  mRNA 発現量は I/R+saline 群と比較して I/R+AT, I/R+OP-2507 群では有意に低かった。肝組織中の E-selectin の mRNA 発現量は I/R+AT, I/R+OP-2507 群では I/R+saline 群に比べ有意に低下した。血清 FDP 値は再灌流後 90 分でピークに達し, I/R+AT, I/R+AT+IM, I/R+argatroban 群で I/R+saline 群と比較して有意に低値を示した。また 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  値は saline, I/R+AT+IM 群と比較して I/R+AT 群で有意に高かった。AT ノックアウトマウスを用いた転移実験においては, ノックアウトマウスの肝転移数はワイルドタイプと比較して有意に多かった。また AT ノックアウトマウスに AT を投与したマウスでは投与しなかった群と比べ有意に転移数を減少させた。

#### 考察：

AT, PGI<sub>2</sub> の肝転移抑制効果は, 単球, Kupffer 細胞からの TNF- $\alpha$  の産生を抑制させ, 類洞内皮細胞からの PGI<sub>2</sub> の産生を促し E-selectin の発現を抑制させ転移抑制効果を発現させると考えられた。また AT の転移抑制効果は PGI<sub>2</sub> を介した cytoprotection 作用であり, 抗凝固作用に起因するものではないと考えられた。

#### 結論：

今回の検討の結果から AT, PGI<sub>2</sub> の消化器癌術後早期投与は, 肝転移予防に効果があることが示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

セリンプロテアーゼを抑制する Antithrombin (AT) は, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) を誘導することにより TNF- $\alpha$  の産生を抑制し, 抗炎症作用を示す。この様な経路で AT は肝虚血再灌流による肝障害を軽減することが知られている。また虚血によって生じる種々のサイトカインは癌の血行性転移と密接に関与している。本論文ではラット大腸癌転移モデルを用いて AT あるいは PGI<sub>2</sub> が肝虚血再灌流時の肝転移を抑制し, その機序に TNF- $\alpha$  や接着分子である E-selectin が関与していることを明らかにしている。本論文では臨床応用へ向けた今後の課題も考察されている。新しい着眼点に基づく独創的な研究である。審査では虚血時間や薬剤投与時期, 各実験群の比較法, E-selectin の発現状態, 用いた癌細胞におけるリガンドである sialyl-Lewis x の発現状態, 等につき討論された。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。