

筑波大学

博士（医学）学位論文

Kupffer cells decrease metastasis of
colon cancer cells to the liver
in the early stage

(クッパー細胞は大腸癌細胞肝転移の早期プロセス
を抑制する)

2015

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

松 村 英 樹

目次

I 序論	1
II 材料と方法	
(1) 実験動物	4
(2) 細胞株	4
(3) 肝転移モデルの作成	4
(4) クッパー細胞の除去法	5
(5) 生体蛍光顕微鏡観察実験群	6
(6) クッパー細胞の蛍光染色（生体蛍光顕微鏡）	6
(7) 腫瘍細胞の蛍光染色（生体蛍光顕微鏡）	7
(8) 生体蛍光顕微鏡観察	7
(9) クッパー細胞と腫瘍細胞の微小循環観察	9
(10) 生化学検査	9
(11) 電子顕微鏡観察	10
(12) 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去した実験群	10
III 結果	
1 実験モデルの評価	12
1-1 腫瘍細胞の投与経路	12
1-2 Cl_2MDP リポソームにおける類洞への影響	12
1-3 Cl_2MDP リポソームによるクッパー細胞の除去	13
2 生体蛍光顕微鏡観察	14
2-1 腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係	14
2-2 電子顕微鏡による腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係の評価	14
2-3 生体蛍光顕微鏡による腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係の評価	15

2-4	クッパー細胞活性化の評価	16
3	腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去した実験群における 転移結節数の評価	16
IV 考察		
(1)	本研究における肝転移モデルに関して	18
(2)	生体蛍光顕微鏡観察に関して	19
(3)	腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去したモデルに関して	20
(4)	クッパー細胞の活性化に関して	21
(5)	本研究の問題点に関して	22
V 結論		
V 結論		25
謝辞		54
文献		55
参考論文		巻末

図表の目次

図 1	本邦におけるがん部位別罹患率の推移	26
図 2	大腸癌肝転移に対する肝切除	27
表 1	大腸癌肝転移に対する手術成績	28
図 3	肝転移形成のステップ	29
図 4	肝類洞内を流れる腫瘍細胞	30
図 5	腫瘍細胞の動態	31
表 2	現在までに報告されているクッパー細胞と 腫瘍細胞の相互作用に関する既報	32
図 6	生体蛍光顕微鏡観察における実験群	33
図 7	生体蛍光顕微鏡システム	34
図 8	手術手技	35
図 9	腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去したモデルの実験群	36
図 10	腫瘍細胞の経門脈投与	37
図 11	腫瘍細胞の経頸動脈投与	38
図 12	クッパー細胞除去後の肝類洞構造 (ヘマトキシリン・エオジン染色)	39
図 13	クッパー細胞除去後の肝類洞内皮 (電子顕微鏡像)	40
図 14	Cl ₂ MDP リポソームによるクッパー細胞除去の評価	41
図 15	Cl ₂ MDP リポソームによるクッパー細胞除去の評価	42

図 16	生体蛍光顕微鏡観察像	43
図 17	クッパー細胞と腫瘍細胞の接着	44
図 18	類洞内接着腫瘍細胞数	45
図 19	クッパー細胞に接着した腫瘍細胞の割合	46
図 20	肝組織中の TNF- α	47
図 21	肝組織中の IL-1 β	48
図 22	クッパー細胞の肝転移結節形成への影響（腫瘍細胞投与 2 週間後）	49
図 23	クッパー細胞の肝転移結節形成への影響（拡大像）	51
図 24	転移結節数	52
図 25	生体蛍光顕微鏡観察における腫瘍細胞が接着した類洞内構成細胞の内訳	53

論文概要

目 的 :

大腸癌肝転移は、血液中に遊離した腫瘍細胞が肝類洞内皮に接着し、類洞外へ浸潤・増殖することで発生すると考えられている。肝類洞を構成する細胞の一つであるクッパー細胞を除去すると肝転移が増加したと報告された。一方でクッパー細胞が放出するサイトカインが肝類洞内皮への腫瘍細胞の接着・浸潤・増殖を促進するという報告もある。転移を形成するには血中を循環する腫瘍細胞が類洞内に接着することが必須となる。クッパー細胞が腫瘍細胞に与える影響を明らかとするには、*in vivo*において、両細胞を染色し類洞内を腫瘍細胞が循環している状況下で観察する必要がある。過去の実験では固定標本による組織学的評価が中心であった。本研究では、生体蛍光顕微鏡 (IVM) を用いてクッパー細胞と腫瘍細胞の動態を解析することにより、肝転移早期においてクッパー細胞が腫瘍細胞に与える影響を明らかとするを目的とした。

対象と方法 :

Fischer 344 (F344) 雄ラットにラット大腸癌細胞株である RCN-H4 5×10^6 個を頸動脈から投与する肝転移モデルを用いた。クッパー細胞の除去には、 Cl_2MDP リポソームを尾静脈から投与する方法を用いた。コントロール群 (KC+群) とクッパー細胞除去群 (KC-群) の 2 群を設定した (各群 $n=6$)。人工呼吸管理下で開腹後、肝葉の一部を脱転し特殊なステージに固定し、IVM を用いて肝類洞内動態をリアルタイムに観察した。腫瘍細胞は Rhodamine 6G で染色したものを、クッパー細胞は蛍光色素封入リポソームを貪食させることで染

色を行った。同部位の両細胞を IVM のフィルターを切り替えることで区別した。マス目に番号を振った特殊なスライドガラスを使用することで、同一部位を経時的に観察する事が可能となり、再現性を担保した。観察は腫瘍細胞投与 20 分後から 360 分後まで行い、類洞内接着腫瘍細胞数を評価した。また、クッパー細胞活性化の評価として肝内サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β) の測定を行った。接着腫瘍細胞数の差がその後の転移形成にどのような影響を与えるか明らかにするため、クッパー細胞を除去するタイミングを腫瘍細胞投与 2 日前から 7 日後の 5 群に分け、腫瘍細胞投与 14 日後に肝臓を摘出して肝切片を作成しそれぞれ 10 切片の転移結節数を計測した。

結 果 :

腫瘍細胞を経門脈的に投与すると、肝類洞で腫瘍塞栓を形成し類洞内皮細胞・クッパー細胞と接着する腫瘍細胞を観察する事は困難であった。腫瘍細胞を経頸動脈的に投与すると、投与開始 1 分 30 秒後より肝類洞を流れる腫瘍細胞を認めた。類洞内皮細胞とクッパー細胞に接着する腫瘍細胞を認め、接着した腫瘍細胞は時間経過とともに接着が解除された。KC-群において類洞構造の異常、類洞内皮の異常は認めなかった。腫瘍細胞投与 20 分後から 120 分後までは、KC+群と KC-群の両群間で類洞内接着腫瘍細胞数に差を認めなかった。腫瘍細胞投与 360 分後では KC+群と比較して KC-群の類洞内接着腫瘍細胞数は有意に多かった。また、KC+群において 74%の腫瘍細胞がクッパー細胞と接着していた。クッパー細胞と接着した腫瘍細胞を電子顕微鏡で評価したところ、腫瘍細胞はクッパー細胞に貪食されていた。肝組織中のサイトカインは、KC-群と比較して KC+群は有意に高値であり、クッパー細胞が活性化されていた。また、腫

瘍細胞投与 14 日後の肝転移結節巣は、クッパー細胞を除去しなかった群および腫瘍細胞を投与した後にクッパー細胞を除去した群と比較して、腫瘍細胞投与前にクッパー細胞を除去した群では著明に増加していた。

考 察：

本研究は、肝転移形成の早期においてクッパー細胞が腫瘍細胞に与える影響を明らかにするため、肝転移早期のステップである肝類洞における腫瘍細胞の接着に注目し、IVM を用いてリアルタイムに観察した。大腸癌肝転移では経門脈的に肝臓へ腫瘍細胞が到達することが知られている。経門脈的に腫瘍細胞を投与するモデルでは、容易に腫瘍塞栓を形成し、腫瘍細胞の接着を評価することは困難であった。そのため、既報を参考にした上で、頸動脈から腫瘍細胞の投与を行う肝転移モデルとした。投与した腫瘍細胞の一部は、類洞内皮細胞とクッパー細胞に接着し、電子顕微鏡で観察したところクッパー細胞と接着した腫瘍細胞はクッパー細胞に貪食されていた。類洞内接着腫瘍細胞数はクッパー細胞を除去すると有意に増加し、クッパー細胞の貪食によって類洞内接着腫瘍細胞数が減少したと示唆された。また、肝転移早期における類洞内接着腫瘍細胞数の差はその後の肝転移結節形成と深い関係があると考えられた。すなわち、クッパー細胞が肝転移抑制に働く重要なタイミングは、循環腫瘍細胞が肝臓に到達する時であることが示唆される。クッパー細胞の腫瘍細胞貪食とクッパー細胞の活性化には相関性があるとの既報があるが、本研究においても腫瘍細胞投与 6 時間後にクッパー細胞の活性化を認めた。一方で、クッパー細胞関連サイトカインによって接着分子は 6 時間後から 48 時間後に発現が増加すると報告されているが、本研究においては類洞内接着腫瘍細胞数の増加は認めなかった。

大腸癌に対して手術を行うと、手術操作で腫瘍細胞が血中に遊離し、血液中に循環腫瘍細胞が認められる。循環腫瘍細胞は肝転移再発の因子と報告されている。本研究の臨床応用を考慮すると、クッパー細胞の貪食機能を正に制御することにより、大腸癌術後肝転移再発を予防する新たな治療法に結びつく可能性がある。今回の研究における課題としては、 Cl_2MDP リポソームでクッパー細胞を除去した点と、使用した細胞株が 1 種類のみであった点が挙げられる。 Cl_2MDP リポソームは肝類洞構造に影響を与えず、類洞内皮にも影響を与えなかった。しかしながら、 Cl_2MDP リポソームはクッパー細胞だけではなく全身のマクロファージを除去することが報告されている。全てのマクロファージを除去することが循環腫瘍細胞数に与える影響に関しては定量化できていない。IVM 観察において、循環腫瘍細胞数は視覚的に両群間で差を認めなかったが、両群間の循環腫瘍細胞数を定量化する必要がある。また、本研究では細胞株を 1 種類しか用いていない。今回の結果が、細胞株特有の現象であるのか、普遍的な現象かを明らかにするため、異なる細胞株を用いたモデルでの検証が必要と考えられた。

結 論：

本研究では、IVM により腫瘍細胞とクッパー細胞との接着をリアルタイムで観察することが出来た。腫瘍細胞はクッパー細胞と接着し、その後腫瘍細胞は貪食された。クッパー細胞を除去することで接着腫瘍細胞数・転移結節数は増加した。今回の研究では、クッパー細胞は腫瘍細胞の肝転移早期プロセスを抑制する事が明らかとなった。

I 序論

近年、本邦においては、大腸癌の罹患者数は増加傾向である(図 1)。国立研究開発法人がん研究センターがん対策情報センターの資料によると、2015 年の部位別がん統計予測(全年齢・男女計)では、胃癌・肺癌を超え、全てのがん種のなかで大腸癌が 1 位となると予測されている。大腸癌は肝転移を合併する頻度が高く、同時性肝転移・異時性肝転移を合わせると 23~29%の患者に肝転移が存在すると報告されている(1, 2)。肝転移に対する治療として外科切除が高い成績を上げているが(3-6)、切除不能肝転移は 77%であり、その 5 年生存率は 0~5%と低いのが現状である(7-13)(図 2)。また大腸癌肝転移に対する手術成績においては、再発率が高く、中でも肝転移の再発率が最も高いと報告されている(2, 14-19)(表 1)。大腸癌肝転移再発の一因としては、手術操作によって増加する血中循環腫瘍細胞の存在が挙げられる。実際に、動物実験でも臨床研究でも、手術操作により循環腫瘍細胞が増加し、循環腫瘍細胞が予後に影響を与えると報告されている(20-24)。

大腸癌肝転移は、血液中に遊離した腫瘍細胞が肝類洞内に接着し、類洞外へ浸潤・増殖することで発生すると考えられている(25)(図 3)。肝類洞は、類洞内皮細胞とクッパー細胞が主な構成細胞であり、類洞内を流れる腫瘍細胞はこの両者のどちらかに接着すると考えられる(図 4)。1993 年に肝類洞を構成する細胞の一つであるクッパー細胞を除去すると肝転移が増加したと報告された(26)。肝転移の増加は著明であり、クッパー細胞は肝転移に対して抑制的に働いてい

ると考えられるようになった。クッパー細胞が肝転移に対して抑制的に働いているという報告は他にも多数認められる(27-36)。クッパー細胞に接着した腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し、あるいは貪食を行い、接着した腫瘍細胞を排除する。また、他の免疫細胞を動員し、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するのがクッパー細胞の肝転移抑制の主な機序として挙げられる。その一方で、クッパー細胞が放出するサイトカインが肝類洞内皮への腫瘍細胞の接着・浸潤・増殖を促進すると報告されるようになった(25, 35, 37-50)。そのメカニズムの概略は以下の如くである。すなわち、腫瘍細胞から産生される CEA などの腫瘍産生物質がクッパー細胞のレセプターと結合し、クッパー関連サイトカインが分泌される。これらのサイトカインにより類洞内皮細胞に接着因子が発現し、腫瘍細胞が類洞内皮に接着する。腫瘍細胞が接着するとクッパー細胞と腫瘍細胞、肝星細胞よりタンパク質分解酵素が産生され、類洞内皮の細胞骨格が壊され、腫瘍細胞が類洞外に脱出する。腫瘍細胞は Fas リガンドを持ち、肝細胞のアポトーシスを誘導する。その一方で、腫瘍細胞やクッパー細胞が産生する VEGF が血管新生を促進する。これらの機転によってクッパー細胞の転移促進作用が生じるという説である。

転移形成をするには、血中に循環する腫瘍細胞が類洞内に接着することが必須となるが、類洞内を構成する主な細胞である類洞内皮細胞とクッパー細胞の両細胞に一度接着した腫瘍細胞は離れることがないのか、あるいは接着した細胞でその後の経過が異なるのかどうかは、*in vivo* において、両細胞を染色し類洞内を腫瘍細胞が循環している状況下で観察することで明らかとなる(図 5)。肝微小循環における腫瘍細胞動態に関しては既報があるが(51-59)、クッパー細胞

が腫瘍細胞に与える影響を *in vivo* で観察した報告は認められない。また、クッパー細胞と腫瘍細胞の相互作用を検討した過去の実験では固定標本による組織学的評価が中心であった(27, 35, 43, 44, 60)(表 2)。

筆者らの研究グループは、生体蛍光顕微鏡観察システムを構築し、各細胞の類洞内動態をリアルタイムに観察・解析する研究を行い報告してきた(61-66)。この肝微小循環を可視化する技術を用いて、クッパー細胞と腫瘍細胞をそれぞれ生体内で同時に蛍光観察することに成功し、肝転移早期における両細胞の動態を観察することが可能となった。

本研究では、生体蛍光顕微鏡を用いてクッパー細胞と腫瘍細胞の動態を解析することにより、肝転移早期においてクッパー細胞が腫瘍細胞に与える影響を明らかとすることを目的とした。

II 材料と方法

(1) 実験動物

Fischer 344 (F344) ラット雄性、200～250 g (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。動物実験に関しては、筑波大学動物実験委員会での承認を受け、筑波大学動物実験取扱規程に基づいて実験動物を取扱った。

(2) 細胞株

ラット大腸癌細胞株である RCN-H4 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) を用いた。RCN-H4 は F344 ラット由来の大腸癌細胞株であり高肝転移株である(67, 68)。細胞は、非働化した 10% FBS、ペニシリン G 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 g/ml を混和した RPMI-1640 培地を用いて、37°C、CO₂ 5%、湿度 95% の状況下で培養した。

(3) 肝転移モデルの作成

大腸癌肝転移は血液中に遊離した腫瘍細胞が経門脈的に肝臓に達し、転移を来することが知られている。一方で、動脈から腫瘍細胞を投与するモデルで肝微小循環を観察した報告がある(52, 54, 55, 57)。本研究で用いる肝転移モデルを決めるため、門脈から腫瘍細胞を投与するモデルと動脈から腫瘍細胞を投与するモデルを作成した。門脈投与モデルは、門脈にカテーテル (PE-10, 0.28 / 0.61 mm 内径 / 外径; Becton Dickinson,

Sparks, MD) を留置し、RCN-H4 を 1×10^6 個投与した。動脈投与モデルは、左頸動脈にカテーテル (PE-50, 0.58 / 0.96 mm 内径 / 外径; Becton Dickinson, Sparks, MD) を留置し、RCN-H4 を 5×10^6 個投与した。

(4) クッパー細胞の除去法

クッパー細胞の除去は、 Cl_2MDP リポソームを用いて Van Rooijen らが報告している方法で行った(69)。86 mg ホスファチジルコリン (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) と 8 mg コレステロール (Sigma-Aldrich Japan) を 10 ml のクロロフォルムに溶解した。37°C 下で rotary evaporator (Eyela N1000-S, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan) を用いて、フラスコ内で薄い膜を作成した。10 ml の PBS と 2 g の dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt (Cl_2MDP) (Sigma-Aldrich, Japan) をフラスコ内で混和した。2 時間静置した後に、5 μm のフィルター (Millex-SV, Millipore, Billerica) に通した。その後 3000 rpm、15 分、4°C で遠心し下清を破棄した。再度 PBS 10 ml に溶解し、3000 rpm、15 分、4°C で遠心し上清を破棄した後に PBS 4 ml に溶解した。作成したリポソームは 4 μm 前後のサイズであることが既報で報告されている(70)。また、最終的に Cl_2MDP は 20 mg 含まれており、濃度は 0.017 mol/L であると報告されている(71)。上記 Cl_2MDP リポソームをラット尾静脈から 1 ml/body で投与した。クッパー細胞は、 Cl_2MDP リポソーム投与 24 時間後にほぼ完全に除去され、投与 3 日後より増加が

始まり、投与 8 日後に除去前と同数となることが報告されている(72)。

(5) 生体蛍光顕微鏡観察実験群

ラットをコントロール群 (KC+群; n=6)、クッパー細胞除去群 (KC-群; n=6) の 2 群へ分けた (図 6)。KC+群は、生体蛍光顕微鏡観察 48 時間前に PBS を 1 ml/body 尾静脈から投与した。KC-群は生体蛍光顕微鏡観察 48 時間前に Cl₂MDP リポソーム 1 ml/body を尾静脈から投与した。

(6) クッパー細胞の蛍光染色 (生体蛍光顕微鏡)

蛍光色素を封入したホスファチジルコリンの作成方法は、すでに報告されている方法を用いた(73)。蛍光封入したリポソームをクッパー細胞に食べさせる方法を用いてクッパー細胞を蛍光染色した(74)。蛍光は、2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa 1,3-diazol-4-yl) amino) dodecanoyl-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (NBD-C₁₂-HPC; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いた。86 mg ホスファチジルコリン(Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)と 8 mg コレステロール(Sigma-Aldrich Japan)を 10 ml のクロロフォルムに溶解した。37°C 下で rotary evaporator (Eyela N1000-S, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)を用いて、フラスコ内で薄い膜を作成した。10 ml の PBS と 10 mg の NBD-C₁₂-HPC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)をフラスコ内で混和した。2 時間静置した後に、5 μm のフィルター(Millex-SV, Millipore, Billerica)に通した。その後 3000 rpm、15 分、4°C で遠心し上

清を破棄した。再度 PBS 10 ml に溶解し、3000 rpm、15 分、4°C で遠心し上清を破棄し、PBS 4 ml に溶解したものをクッパー細胞染色用の蛍光封入りリポソームとした。蛍光封入りリポソームを投与すると、生体蛍光顕微鏡観察において、ラット肝臓のクッパー細胞は明確に同定することが出来た。蛍光封入りリポソームの投与が、クッパー細胞の貪食活性に与える影響は、既報において、静脈内から投与された蛍光微小球の取り込み量で評価されている(73)。蛍光封入りリポソームはクッパー細胞の貪食活性に影響を与えず、リポソームを投与することで肝臓の組織学的変化も認めなかった(73)。腫瘍細胞投与 80 分前に蛍光封入りリポソーム (4 ml/kg) を頸動脈カテーテルから投与した。

(7) 腫瘍細胞の蛍光染色 (生体蛍光顕微鏡)

腫瘍細胞株 RCN-H4 をトリプシン処理した後に、PBS で洗浄した。蛍光色素である Rhodamine 6G (10^{-7} M; Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) と血清を加えていない RPMI-1640 培地で腫瘍細胞を 60 分間培養し、細胞膜を再構成させた。上記の方法を用いて腫瘍細胞を蛍光染色した後に、トリパンブルー法を用いて生細胞の割合が 90%以上であることを確認した。再度 PBS で洗浄した後に、細胞を 5×10^6 個/ml の濃度となるように PBS で再懸濁した。

(8) 生体蛍光顕微鏡観察

生体蛍光顕微鏡観察は、当研究室で確立されている方法を用いた

(74)(図 7)。ラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与することで麻酔した後に、気管切開を行った。自発呼吸を抑制するために人工呼吸器管理とし(MK-V100; Muromachi Kikai Co. Ltd, Tokyo, Japan)、イソフルランを用いて吸入麻酔で維持した。ラットを仰臥位とし、背中には温度板を入れ、体温を 37°C に保持した。血圧モニタリング、薬剤投与、採血、維持輸液投与目的に左頸動脈と左頸静脈にそれぞれカテーテル (PE-50; Becton Dickinson, Sparks, MD) を留置した。腹部に横切開を加えて開腹を行い、肝臓を固定する間膜に切開を加え、肝左葉が固定されていない状態とした。観察領域が呼吸性変動に伴って動くのを防ぐため、肝左葉を脱転し、肝左葉の形に加工した粘土で固定し平面を作成した。グリッドにナンバリングが施されている特殊なカバーガラス(Olympus Corporation, Tokyo, Japan) (75)を肝表面に載せ、レンズを介して観察を行った(図 8)。グリッド上の数字を記録することで、経時的に同一部位の類洞を観察可能となる。腫瘍細胞(5×10^6 個)は頸動脈から 60 秒かけて投与した(55)。類洞を流れる腫瘍細胞は、腫瘍細胞投与開始 1 分 30 秒後から観察された。観察は、100 W の水銀ランプに特定の波長をブロックするフィルターを装着できるように改良を加えた顕微鏡(BX 30 FLA-SP; Olympus, Tokyo, Japan)を用いた。肝微小循環は CCD カメラ(DVC-0; DVC, Austin, TX, USA)とデジタルビデオレコーダー(GV-HD 700/1; Sony, Tokyo, Japan)を用いて録画し、録画動画で解析した。対物レンズ(10 x 0.3 – 20 x 0.7; Olympus Corporation)を使用し、最終倍率は x 325 – x 650 とし

た。各々のラットにおいて、10 腺房をランダムに選択し、腫瘍細胞を投与して 20 分後、40 分後、60 分後、120 分後、360 分後の肝微小循環を観察した。1 回の観察時間は 30 秒とした。最初にランダムに選択した 10 腺房のグリッド番号を記録し、経時的に同一部位を観察した。

(9) クッパー細胞と腫瘍細胞の微小循環観察

評価項目は以下の通りとした。(i) 接着腫瘍細胞数 (接着腫瘍細胞は、類洞に 20 秒以上留まっているものを接着と定義) : 観察視野は 0.2 mm² 以下であり、その視野に含まれる 1 腺房の接着腫瘍細胞数をカウントした。

(ii) クッパー細胞と接着した腫瘍細胞数 (クッパー細胞と同部位に接着した腫瘍細胞) (iii) 1 腺房中のクッパー細胞数

(10) 生化学検査

腫瘍細胞投与 6 時間後に肝組織中の tumor necrosis factor (TNF)- α と interleukin (IL)-1 β をクッパー細胞活性化の指標として測定した。腫瘍細胞を頸動脈から投与して 6 時間後のラットを犠牲死させ、肝臓を摘出した。RPMI-1640 培地 50 ml と 1% CHAPS Lysis Buffer 500 μ l を混和したものをサンプルバッファーとした。肝サンプルの重量を測定し、その重量の 9 倍のサンプルバッファーと混和し、ソニケーターで破碎した。2000 g、25 分で遠心し、3 層に分離した中層を採取し-20°C で保管したものをサンプルとして用いた。測定キットは、TNF- α と IL-1 β enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (R&D Systems,

Minneapolis, MN, USA)を用いた。

(11) 電子顕微鏡観察

腫瘍細胞を投与した後のクッパー細胞を電子顕微鏡で形態学的に評価した。腫瘍細胞を投与して 2 時間後、ラットの肝臓を速やかに切除した。右葉から採取したサンプルを 1 mm³ の立方体に切り、2.5%グルタルアルデヒド中で保存した。その後検体を四酸化オスミウムで固定し、段階的に濃度の濃い無水アルコールで脱水し、エポン混合物で包埋した。超薄切片は、Ultracut S microtome (Leica Aktien-gesellschaft, Vienna, Austria) を用いて作成し、銅製グリッドにマウントした。標本は酢酸ウラニルで処理した後に、コントラストをつけるためにクエン酸で処理した。標本は、日立 H-7000 電子顕微鏡 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

(12) 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去した実験群

クッパー細胞の除去と腫瘍細胞の投与のタイミングがその後の転移形成にどのような影響を与えるのか検討するため、ラットを以下の 5 群 (n=6) に分けた(図 9)。

(i) コントロール群 (KC+群) ; 腫瘍細胞投与 2 日前に PBS をラット尾静脈から投与した。

(ii) 腫瘍細胞投与 2 日前にクッパー細胞を除去する群 (KC-群) ; 腫瘍細胞投与 2 日前に Cl₂MDP リポソームをラット尾静脈から投与した。

(iii) 腫瘍細胞投与 1 日後にクッパー細胞を除去する群 (KC1D-群) ; 腫瘍細胞投与 1 日後に Cl_2MDP リポソームをラット尾静脈から投与した。

(iv) 腫瘍細胞投与 3 日後にクッパー細胞を除去する群 (KC3D-群) ; 腫瘍細胞投与 3 日後に Cl_2MDP リポソームをラット尾静脈から投与した。

(v) 腫瘍細胞投与 7 日後にクッパー細胞を除去する群 (KC7D-群) ; 腫瘍細胞投与 7 日後に Cl_2MDP リポソームをラット尾静脈から投与した。

すべての群で、 5×10^6 個の RCN-H4 ラット大腸癌細胞株を左頸動脈から投与した。腫瘍細胞投与 2 週間後にラット肝臓を摘出し、10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。左葉と中葉をそれぞれ均等に 10 スライスし、4 μm に切った切片に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行った。各々の切片における転移結節数を計測した。

III 結果

1 実験モデルの評価

1-1 腫瘍細胞の投与経路

腫瘍細胞の投与経路の違いが、生体蛍光顕微鏡観察にどのような影響を与えるのか検討した。門脈から腫瘍細胞を投与したモデルを図 10 に示し、頸動脈から腫瘍細胞を投与したモデルを図 11 に示す。門脈から投与したモデルでは、腫瘍細胞を投与すると類洞内で速やかに腫瘍塞栓を形成した。塞栓により類洞内の血流が停止し、循環不全に陥る個体も存在した。類洞に接着する腫瘍細胞は僅かであった。一方で、頸動脈から腫瘍細胞を投与したモデルでは、腫瘍細胞を投与開始した 1 分 30 秒後から類洞内を流れる腫瘍細胞を認めた。類洞での腫瘍塞栓は認めず、循環不全に陥る個体は認めなかった。類洞内に接着する腫瘍細胞を観察することが可能であった。

1-2 Cl_2MDP リポソームにおける類洞への影響

Cl_2MDP リポソームによるクッパー細胞の除去方法が、肝臓に与える影響を検討するため、 Cl_2MDP リポソームを投与して 2 日後の肝組織切片を形態学的に評価した。その結果を図 12 に示す。 Cl_2MDP リポソーム投与によって類洞の狭小化は認めず、索状構造の異常も認めなか

った。類洞の構造に影響を与えない事が示されたため、更に類洞を構成する細胞に影響がないか電子顕微鏡を用いて検討した。図 13 に Cl_2MDP リポソームを投与して 2 日後の肝類洞内を電子顕微鏡で評価した画像を示す。類洞内皮細胞は保たれており、 Cl_2MDP リポソーム投与は類洞内皮細胞には影響を与えないという結果が得られた。

1-3 Cl_2MDP リポソームによるクッパー細胞の除去

Cl_2MDP リポソームによってクッパー細胞が除去されているかどうか検討するため生体蛍光顕微鏡で評価した。正常群・クッパー細胞除去群にそれぞれ PBS と Cl_2MDP リポソームを投与し、2 日後に生体蛍光顕微鏡観察を行った。その結果を図 14 に示す。蛍光封入リポソーム 80 分後、クッパー細胞を除去していない正常群では蛍光封入リポソームを取り込んだクッパー細胞を認めた。クッパー細胞を除去した群ではクッパー細胞を認めず、クッパー細胞が除去されている事が明らかとなった。視覚的にクッパー細胞が除去されている事が明らかとなったため、正常群である KC+群とクッパー細胞を除去した KC-群における 1 腺房あたりのクッパー細胞数を定量化した。KC+群では 32.3 ± 0.7 個/腺房、KC-群では 0.7 ± 0.1 個/腺房であり、KC-群で有意 ($p < 0.001$) にクッパー細胞が除去されている事が明らかとなった (図 15)。

2 生体蛍光顕微鏡観察

2-1 腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係

クッパー細胞が腫瘍細胞へ与える影響を検討するには、同一部位の腫瘍細胞とクッパー細胞を観察する必要がある。生体蛍光顕微鏡で腫瘍細胞とクッパー細胞が同時に観察可能か検討した(図 16)。腫瘍細胞とクッパー細胞は、フィルターを切り替えることで、同一視野の両細胞が観察可能となる。黒色の枝状の線が類洞を表す。肝微小循環の最小単位である腺房はラグビーボール状に示すことができ、血流は門脈領域から中心静脈領域へ流れる。クッパー細胞と腫瘍細胞は各々同定できた。類洞を流れる腫瘍細胞は、類洞に接着するもの、類洞に接着しないもの、類洞に接着した後に離れるものが存在した。類洞に接着する腫瘍細胞は、クッパー細胞と別部位に接着する細胞、クッパー細胞と同部位に接着する細胞が存在した。

2-2 電子顕微鏡による腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係の評価

前の実験によりクッパー細胞と同部位の類洞に接着する腫瘍細胞を認めたため、腫瘍細胞投与 2 時間後の肝類洞内におけるクッパー細胞と腫瘍細胞を電子顕微鏡で詳細に観察した(図 17)。類洞内には腫瘍細胞とクッパー細胞を認め、両者は接着していた。拡大すると腫瘍細胞はクッパー細胞の細胞膜に覆われており、クッパー細胞に貪食されていることが明らかとなった。生体蛍光顕微鏡で同部位に観察された両細

胞は、腫瘍細胞がクッパー細胞に接着している現象を観察していることが明らかとなった。

2-3 生体蛍光顕微鏡による腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係の評価

類洞内に腫瘍細胞が接着することが明らかとなったため、クッパー細胞の存在が、腫瘍細胞の接着に影響を与えるか検討した (図 18)。クッパー細胞を除去していない KC+群では、腫瘍細胞投与 20 分、40 分、60 分、120 分、360 分後の類洞内接着腫瘍細胞数は、それぞれ 3.75 ± 0.24 、 2.23 ± 0.16 、 2.19 ± 0.14 、 2.08 ± 0.13 、 1.03 ± 0.1 個/腺房であり、時間経過とともに減少した。クッパー細胞を除去した KC-群では、腫瘍細胞投与 20 分、40 分、60 分、120 分、360 分後の類洞内接着腫瘍細胞数はそれぞれ、 3.29 ± 0.20 、 2.52 ± 0.20 、 2.33 ± 0.24 、 2.19 ± 0.25 、 1.55 ± 0.14 個/腺房であり、KC-群でも時間経過とともに減少した。腫瘍細胞投与 20 分後から 120 分後までは、KC+群と KC-群の類洞内接着腫瘍細胞数は両群間で差を認めなかった。腫瘍細胞投与 360 分後、KC+群と KC-群で類洞内接着腫瘍細胞数に有意な差を認めた。クッパー細胞の有無が、類洞内に接着する腫瘍細胞数に影響をあたえることが明らかとなったため、KC+群において、類洞内に接着した腫瘍細胞のうちクッパー細胞に接着した腫瘍細胞がどれくらいの割合存在するのか検討した (図 19)。20 分後から 360 分後にかけて、 $18.6 \pm 2.5\%$ 、 $43.6 \pm 4.8\%$ 、 $47.5 \pm 4.8\%$ 、 $54 \pm 4.7\%$ 、 $74.4 \pm 5.2\%$ と時間経過とともにクッパー細胞と接着した腫瘍細胞の割合は増加していた。

2-4 クッパー細胞活性化の評価

腫瘍細胞投与によってクッパー細胞が活性化しているかどうか評価するため、肝組織中の TNF- α および IL-1 β を測定した (図 20、図 21)。クッパー細胞を除去していない KC+群において、腫瘍投与前と腫瘍細胞投与 360 分後の TNF- α は 16.4 ± 5.2 、 53.7 ± 2.81 pg/ g liver であり有意に増加を認めた ($P<0.05$)。IL-1 β は 2700 ± 223 、 3990 ± 262 pg/ g liver であり、増加傾向を示した。一方で KC-群においては、TNF- α は 9.9 ± 6.25 、 8.5 ± 2.07 pg/ g liver と腫瘍細胞投与による増加は認めず、IL-1 β においても 223 ± 39.5 、 280 ± 76.6 pg/ g liver と増加を認めなかった。腫瘍細胞投与前の KC+群と KC-群を比較すると、TNF- α では両群間に差を認めなかったが、IL-1 β は KC+群が有意に高かった ($P<0.05$)。

3 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去した実験群における 転移結節数の評価

クッパー細胞の存在により生じた、腫瘍注入 360 分後における類洞内接着腫瘍細胞数の差が、その後の転移形成にどのような影響をあたえるのか、また、クッパー細胞はどのタイミングで転移の制御に深く関わっているのか検討するため、コントロール群である KC+群、腫瘍細胞投与 2 日前にクッパー細胞を除去した KC-群、腫瘍細胞投与 1 日後にクッパー細胞を除去した KC1D-群、腫瘍細胞投与 3 日後にクッパー細胞を除去した KC3D-群、腫瘍細胞投与 7 日後にクッパー細胞を除去

した KC7D-群の 5 群に分け、クッパー細胞が肝転移結節形成に与える影響を検討した。上記 5 群において、腫瘍細胞投与 2 週間後の肝臓を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色したルーペ像を示す (図 22)。肝転移結節は、500~1000 μm の転移結節としてヘマトキシリンで青く染色され、容易に同定することが可能であった。腫瘍細胞投与前にクッパー細胞を除去した KC-群で多数の転移結節を認めた。群間で転移結節像に差があるか拡大像を検討した (図 23)。転移結節を拡大したところ、転移結節は、zone1 である門脈 area に多く認めた。各群で転移結節の構造に明らかな違いは認めなかった。各群における転移結節数をグラフにしたものを示す (図 24)。KC+群、KC-群、KC1D-群、KC3D-群、KC7D-群は、それぞれ、 0.15 ± 0.04 、 57.6 ± 4.4 、 3.9 ± 0.4 、 0.19 ± 0.04 、 0.19 ± 0.05 個/切片であった。腫瘍細胞を投与した後にクッパー細胞細胞を除去した群 (KC1D-群~KC7D-群) では、KC-群と比較して著明に転移結節数は減少していた ($p<0.05$)。

IV 考察

(1) 本研究における肝転移モデルに関して

大腸癌肝転移では、局所から遊離した腫瘍細胞は経門脈的に肝臓へ到達することが知られている。本研究では、当初、大腸癌の肝転移様式に従って経門脈的に腫瘍細胞を投与した。腫瘍細胞を投与すると肝門部において容易に腫瘍塞栓を形成した。生体蛍光顕微鏡では、呼吸性変動の影響は肝門部が強く、肝末梢は呼吸性の変動の影響が少ない。腫瘍細胞の経門脈投与モデルを用いて、生体蛍光顕微鏡で腫瘍細胞接着を評価することは困難であった。大腸癌肝転移の早期段階における研究では、1998年から2003年までは、腫瘍細胞の投与は、回結腸静脈、門脈、脾臓などから行われている(35, 51, 53, 76-80)。2003年に Haier らが、Sprague-Dawley ラットとヒト大腸癌細胞 HT29、ラット大腸癌細胞 CC531 を用いた *in vivo* の実験で、腫瘍細胞の投与経路が肝転移に与える影響を検討した(52)。腫瘍細胞の動脈投与モデル、門脈投与モデルにおける肝微小循環を評価したところ、動脈投与モデルが、類洞を流れる腫瘍細胞を最も容易に同定できた。門脈投与モデルでは、肺塞栓や循環不全を生じ、さらに門脈血流の低下を認めた。この報告以降、腫瘍細胞の肝微小循環は動脈投与による報告が散見されるようになった(54, 55, 57)。我々も、既報を参考にし、頸動脈から腫瘍細胞の投与を行うと、single cell の腫瘍細胞が類洞内に接着する画像を得ることが可能となったため、頸動脈から腫瘍細胞を投与するモデルを今回の研究で用いた。

(2) 生体蛍光顕微鏡観察に関して

転移形成をきたすには、類洞内皮に血中循環腫瘍細胞が接着することが必須となる(25)。循環する腫瘍細胞全てが肝類洞内皮に接着するわけではなく、また接着した腫瘍細胞が全て転移を形成するわけではない。また、転移形成に重要な影響を与えるクッパー細胞が腫瘍細胞接着にどのように関わっているか検討するには、*in vivo* において、クッパー細胞を染色し、腫瘍細胞が類洞内を循環している状況下で観察することで明らかになる。しかしながら、現在までに肝転移早期における腫瘍細胞とクッパー細胞の相互作用を生体蛍光顕微鏡で見たという報告はない。我々が構築した生体蛍光顕微鏡システムでは、腫瘍細胞およびクッパー細胞の両者を同時に蛍光染色し、同部位・同視野を経時的に観察できる。本研究では、肝類洞に接着する腫瘍細胞数を経時的に観察した。図 25 で類洞内皮細胞とクッパー細胞のそれぞれに接着した腫瘍細胞の割合を示す。KC+群では、クッパー細胞と接着する腫瘍細胞は増加する一方で、類洞内皮と接着する腫瘍細胞は減少した。この作用の詳細を解明するために電子顕微鏡を用いて観察したところ、クッパー細胞が腫瘍細胞を貪食していることが分かった。*in vitro* 研究において、クッパー細胞と癌細胞と共培養すると、クッパー細胞は偽足を出して腫瘍細胞と接着していると報告されており(81)、また、クッパー細胞の偽足によって捉えられた腫瘍細胞はその後貪食され、破壊されると報告されている(33)。クッパー細胞と接着した腫瘍細胞はクッパー細胞の偽足にとらえられ離れにくい

め、時間経過に従ってその割合が増加していると推測された。その後クッパー細胞と接着した腫瘍細胞は引き続き貪食されると考えられる。類洞内接着腫瘍細胞数は時間経過と共に減少した。その数は KC+群では KC-群と比較し、腫瘍細胞投与 360 分後で有意に低値であったが、腫瘍細胞がクッパー細胞に貪食された結果であると考えられた。肝転移早期においてクッパー細胞は循環腫瘍細胞を貪食し、肝転移形成を抑制していると考えられた。

(3) 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去したモデルに関して

我々は、肝転移巣形成におけるクッパー細胞の役割を明らかにするため、異なるタイミングでクッパー細胞を除去した。その結果、腫瘍細胞を投与した時にクッパー細胞が存在しないと著明に転移結節数は増加した。肝転移形成早期においてクッパー細胞は肝転移を抑制していると考えられた。既報では、腫瘍細胞の投与前にクッパー細胞を除去すると転移が増加したと報告されている(26)。また、腫瘍細胞投与前にクッパー細胞を活性化することにより肝転移が減少したと報告されている(82)。以上の結果より、肝転移早期にクッパー細胞が転移を著明に抑制していることが明らかとなった。血液中を循環する腫瘍細胞は手術操作により増加すると報告されている。Nishizaki らは、ウサギと VX-2 細胞株を使った *in vivo* の実験において、手術操作によって血流に腫瘍細胞が流れ出ることを報告した(20)。Ito らは、切除可能大腸癌患者を対象とした臨床研究において、手術操作により血中循環腫瘍細胞が増加し、その循環腫瘍細胞

は予後に影響を与えたと報告した(21)。大腸癌肝転移患者を対象にした臨床研究では、術前におよそ 2 割～3 割の患者に循環腫瘍細胞を認め、手術中では循環腫瘍細胞を認めた患者は約 5 割に増加した(22, 23)。術中に循環腫瘍細胞が陽性であった患者は **disease-free survival** が悪く(24)、その理由は手術操作で血流に腫瘍細胞が出て、再発したことが原因であると考察している(23)。術後 24 時間以内の循環腫瘍細胞の存在が再発の有意な因子と述べている報告もある(23, 83, 84)。このように手術操作によって増加した循環腫瘍細胞が、術後肝転移再発の一因であると考えられており、この循環腫瘍細胞に対してクッパー細胞は重要な肝転移抑制因子だと考えられる。

(4) クッパー細胞の活性化に関して

クッパー細胞が腫瘍細胞を貪食するためにはクッパー細胞が活性化する必要がある(33)。クッパー細胞が活性化しているかどうかを調べるために、クッパー細胞の活性化の指標となるサイトカイン(85-87)である **TNF- α** と **IL1- β** を肝組織で測定した。KC+群では、**TNF- α** と **IL1- β** の上昇が認められた。腫瘍細胞の投与により、クッパー細胞が活性化したと考えられた。腫瘍細胞がクッパー細胞を活性化したという報告は *in vivo* のモデルで CX-1 (ヒト大腸癌細胞株) を用いた研究や(43)、*in vitro* のモデルで CX-1 や H-59 (マウス肺癌細胞株) を用いた研究(44)においても報告されている。また、AH130 (ラット肝癌細胞) を用いたラット肝転移モデルにおいて、免疫賦活剤である OK432 はクッパー細胞を活性化し、肝

転移数を減少させたという報告(88)がある。クッパー細胞の活性化によって殺腫瘍細胞活性を増強し、T細胞への抗原提示能を増強したため転移が減少したと考察されている。MiseらもAH130を用いた*in vitro*の実験で、OK432によって肝マクロファージからのTNF産生が増加し、肝マクロファージの抗腫瘍活性が増強したと報告をしている(89)。クッパー細胞の抗腫瘍活性を増強させることにより、血行性肝微小転移を防ぐ事ができる可能性があると著者は述べていた(88)。一方で、クッパー細胞関連サイトカインであるTNF- α やIL-1によって接着分子が発現すると報告されている(44, 47, 90)。腫瘍細胞を投与すると、接着分子であるEセレクトリンやPセレクトリンは6時間から12時間で発現が最大となり、ICAM-1やVCAM-1は24-48時間で発現が最大となると報告されている(45, 90)。本研究においては、最大6時間までの生体蛍光顕微鏡観察を行ったが、クッパー細胞由来のサイトカインが有意に増加したKC+群で接着腫瘍細胞が増加することはなかった。生体蛍光顕微鏡の性質上、長時間の観察を行うことは困難ではあるが、ICAM-1やVCAM-1の発現が最大となる、腫瘍細胞投与24時間後から48時間後における類洞内接着腫瘍細胞とクッパー細胞の相互作用を観察できれば、更に考察が深まると考えられる。

(5) 本研究の問題点に関して

また今回の研究における問題点としては、Cl₂MDPリポソームを用いたクッパー細胞の除去に関する点と、使用した細胞株が1種類である点が

挙げられる。Cl₂MDP リポソームによるクッパー細胞の除去方法は 1989 年に van Rooijen らが報告した(69)。また、Bogers らはラットと Cl₂MDP リポソームを用いてクッパー細胞を除去すると投与後 1 日から 2 日目はクッパー細胞が完全に除去され、6 日目で投与前の半数となり、8 日目で投与前と同数となることを報告している(72)。Cl₂MDP は骨転移などの溶骨性骨疾患で用いられる製剤であり、それ自体に毒性はない。しかし、リポソーム化した Cl₂MDP をマクロファージが貪食すると、マクロファージは不可逆性の変化を受け、アポトーシスが誘導される(71)。そのため、Cl₂MDP リポソームを用いると全身のマクロファージが除去される。マクロファージは肝臓以外の臓器では、脾臓や肺に多く分布している。今回の研究では、Cl₂MDP リポソームによるクッパー細胞の除去方法が生体に与える影響に関しては、形態学的にしか評価ができていない。Cl₂MDP リポソームの投与は肝類洞構造に影響を与えず、類洞内皮にも影響を与えなかった。しかしながら、Cl₂MDP リポソームによって全身のマクロファージを除去することが、循環する腫瘍細胞数にどのような影響を与えるのか本研究では定量化できていない。クッパー細胞の除去が循環腫瘍細胞数に与える影響は、生体蛍光顕微鏡観察において視覚的には認めなかったが、今後定量化する必要がある。データを示してはいないが、クッパー細胞の除去は肺転移結節数には影響を与えなかった。今回使用した細胞株が高肝転移株であることが原因である可能性が示唆される。肺転移しやすい細胞株を用いた場合、肺における転移結節数に差が生じた可能性はある。脾臓に関しては大腸癌転移の頻度は低いため、

検討していない。今回の実験では、1種類の細胞株のみでの検討となっている。他の大腸癌細胞株を用いた場合、今回と同様の結果が得られるか、あるいは今回用いた細胞株特異的な現象であるかは、今後検証が必要と考えられた。また、実際の大腸癌細胞を用いたモデルでも検証が必要である。

V 結論

本研究では、生体蛍光顕微鏡により腫瘍細胞とクッパー細胞との接着をリアルタイムで観察することが出来た。腫瘍細胞はクッパー細胞と接着し、その後腫瘍細胞は貪食された。クッパー細胞を除去することで接着腫瘍細胞数・転移結節数は増加し、クッパー細胞は肝転移を抑制する働きを持つことを示した。今回の研究では、クッパー細胞が腫瘍細胞の肝転移早期プロセスを抑制する事が明らかとなった。今後、クッパー細胞の腫瘍細胞貪食メカニズムをより詳細に解明することで、大腸癌術後肝転移再発予防する新たな治療法に結びつく可能性がある。

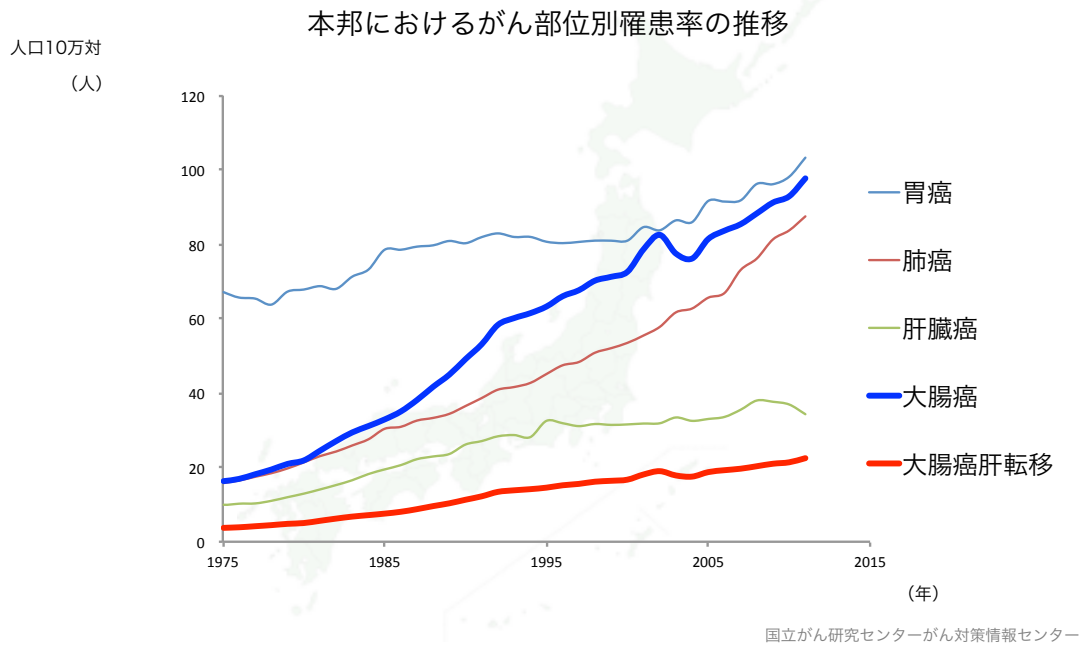


図1 本邦におけるがん部位別罹患率の推移

大腸癌罹患患者数は増加傾向にある。大腸癌において肝転移は23～29%に存在すると報告されており、大腸癌罹患患者数の増加に伴い、大腸癌肝転移の罹患率も上昇してきている。

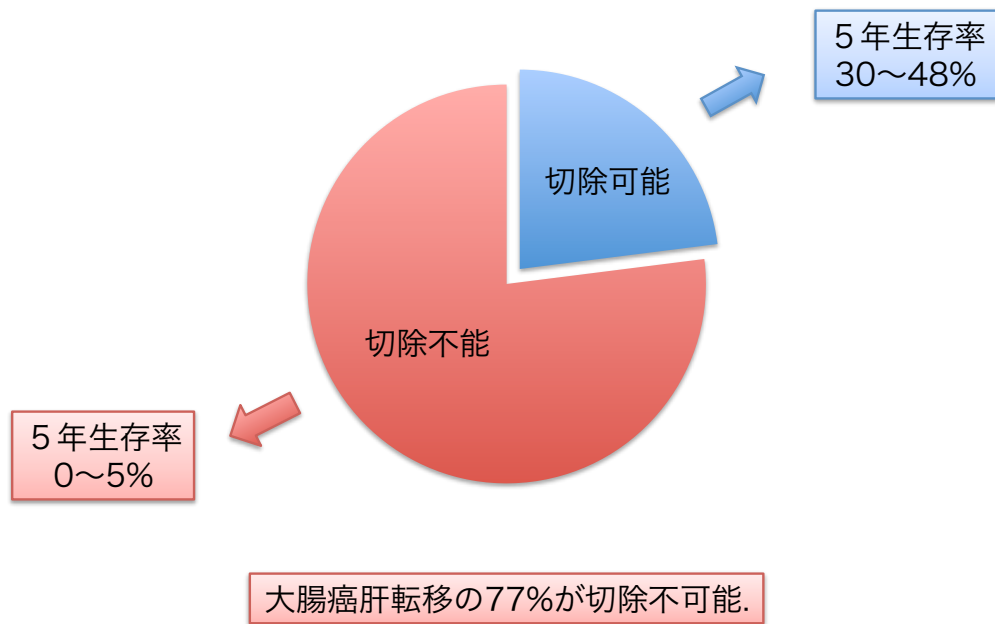


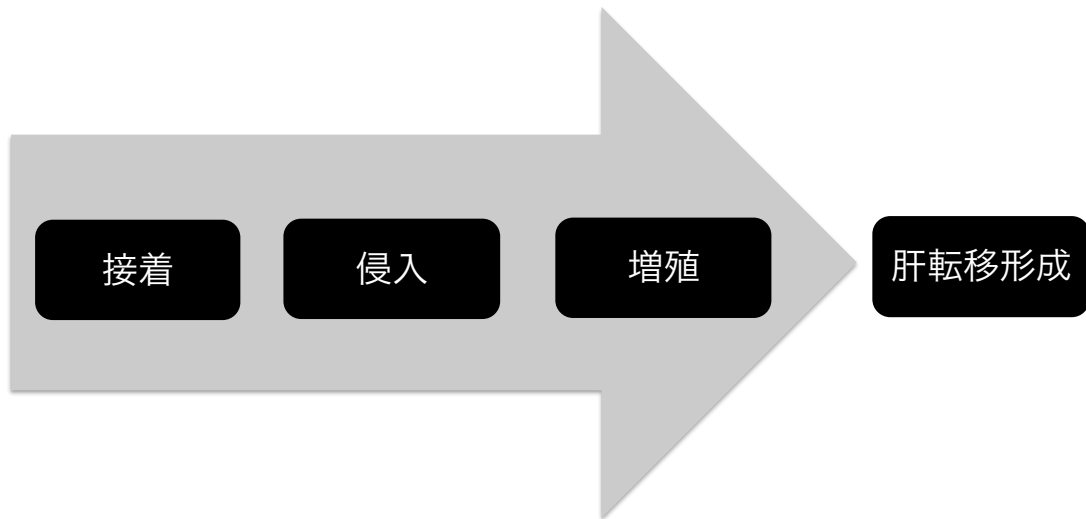
図2 大腸癌肝転移に対する肝切除

大腸癌肝転移のうち切除可能なのは23%で、5年生存率も30~48%と他の癌腫と比較して高い。しかしながら、切除不能肝転移は77%であり、5年生存率は0~5%と低いのが現状である。

表 1 大腸癌肝転移に対する手術成績(16)

著者	患者数	5年生存率 (%)	再発率(%)	肝転移再発率(%)
Scheele J, et al.	226	38	61	43
Doci R, et al	107	30	69	41
Rosen et al	280	25	-	-
Sugihara K, et al.	159	48	60	32
Gayowski TJ, et al	204	32	72	-
Fong Y, et al	456	38	52	25
Rees M, et al.	107	37	69	38

肝転移形成のステップ

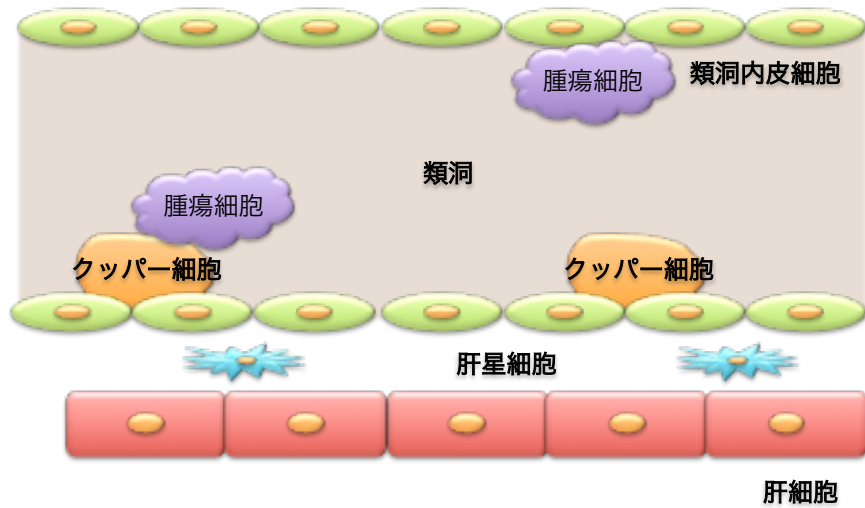


肝転移の最初のステップは「接着」である。

図3 肝転移形成のステップ

局所から遊離した腫瘍細胞は、血流に乗り、類洞に接着し、組織内へ侵入し、肝組織内で増殖するという様々なステップを経て肝転移を形成する。肝転移形成において「接着」は最初のステップであり、接着腫瘍細胞を抑制することが肝転移再発の予防につながる。

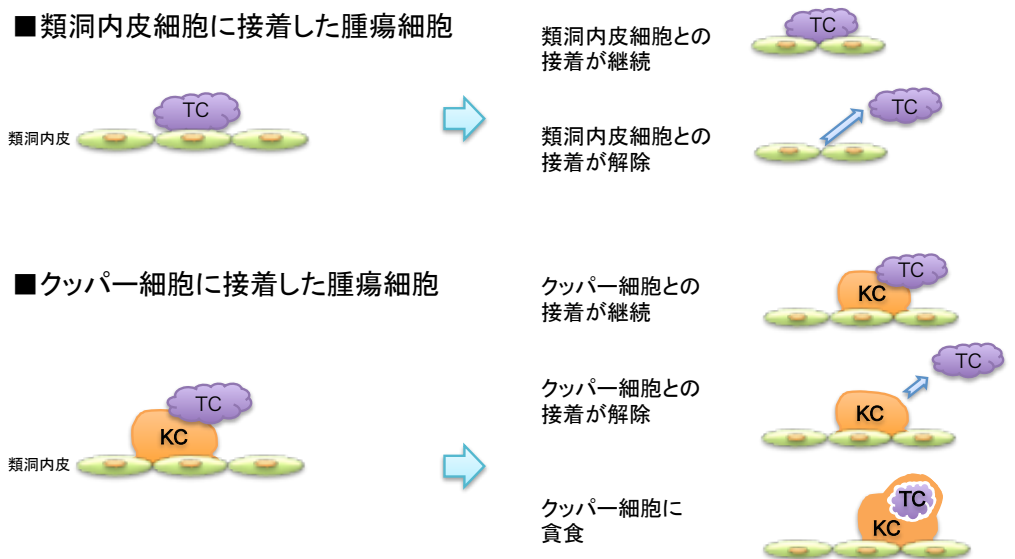
肝類洞内を流れる腫瘍細胞



類洞内を流れる腫瘍細胞は、類洞内皮細胞あるいはクッパー細胞に接着すると考えられる。

図 4 肝類洞内を流れる腫瘍細胞

類洞内を構成する主な細胞は、類洞内皮細胞とクッパー細胞であり、血中を循環する腫瘍細胞の一部がこの両細胞に接着すると考えられる。



in vivo でクッパー細胞と腫瘍細胞を染色し、腫瘍細胞が類洞内を循環している状況下で観察することで明らかとなる。

図 5 腫瘍細胞の動態

転移形成は、血中循環腫瘍細胞が類洞内に接着することが必須となる。類洞内を構成する主な細胞は、類洞内皮細胞とクッパー細胞であるが、この両細胞に一度接着した腫瘍細胞は離れることがないのか、あるいは接着した細胞でその後の経過が異なるのかどうかは、*in vivo* において、クッパー細胞を染色し、腫瘍細胞が類洞内を循環している状況下で観察することで明らかになると考えられる。

表 2 現在までに報告されているクッパー細胞と腫瘍細胞の相互作用に関する既報

著者	動物	投与方法	腫瘍数 (個)	観察方法	腫瘍投与後の 経過時間	結果
Bayon LG (Hepatology 1996)	Wag/Rij rats	腸間膜 静脈	1x10 ⁶	免疫染色	2days	腫瘍細胞の周囲をクッパー細胞が取り囲む.
Anirudha G (Clin. Exp Metastasis 2001)	In vitro	-	-	-	-	腫瘍細胞の接着はCEAによって活性化されたクッパー細胞が介在する.
Higashi (Clin. Exp Metastasis 2002)	C57BL/6 mice	脾注	1x10 ⁶	免疫染色	7days	クッパー細胞と腫瘍細胞の接触あり.
Sturm JW (IJC 2003)	Balb/c mice	門注	3x10 ⁵	免疫染色 IVM	0, 1, 4, 8 days	クッパー細胞からのTNF-αが腫瘍細胞の接着を促進する.
Khatib AM (Am J Pathol. 2005)	C57BL/6 mice	脾注	1x10 ⁶	免疫染色	2, 6, 10, 16 hours	クッパー細胞と腫瘍細胞の接触あり.
Kruskal (Radiology 2010)	Nude mice	脾注	2x10 ⁶	免疫染色 IVM	0, 1, 3, 6 days	腫瘍細胞の周囲をクッパー細胞が取り囲む.

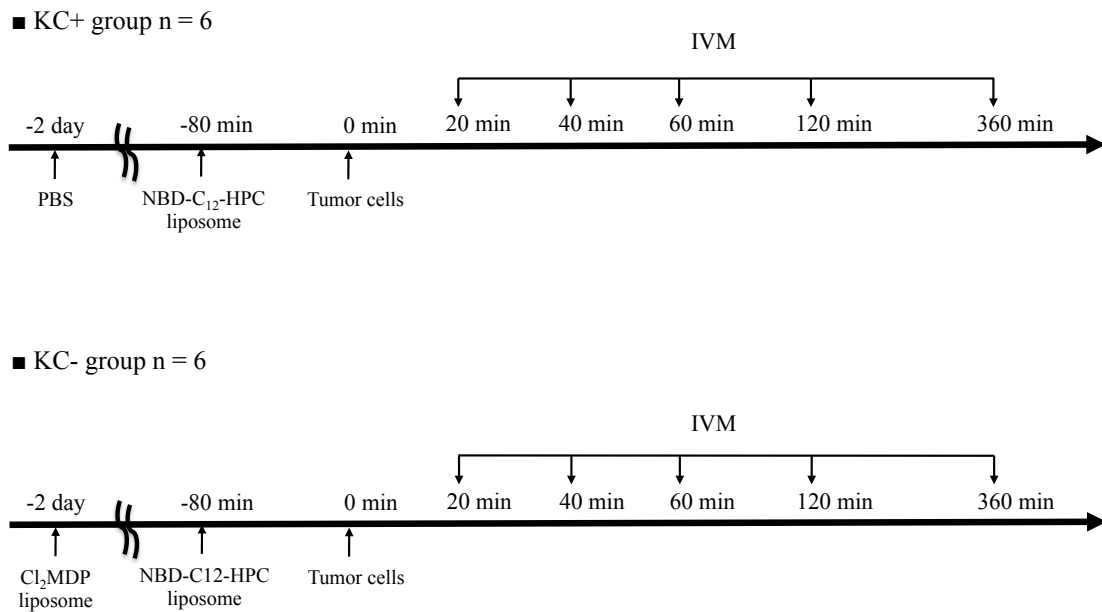


図 6 生体蛍光顕微鏡観察における実験群(91)

クッパー細胞を除去していない KC+群とクッパー細胞を除去した KC-群の 2 群を設定した。生体蛍光顕微鏡観察は 20 分後、40 分後、60 分後、120 分後、360 分後に行った。観察終了後に犠牲死を行い、肝組織を採取した。

生体蛍光顕微鏡システム

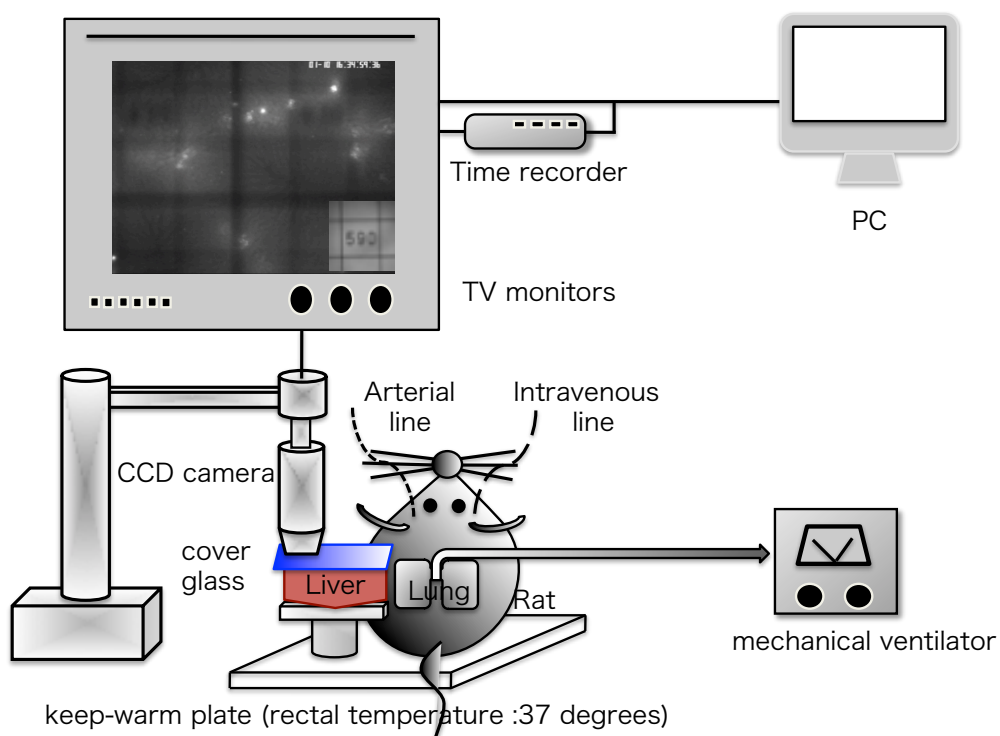


図7 生体蛍光顕微鏡システム(92)

当研究室で使用している生体蛍光顕微鏡システムである。ラットは人工呼吸器管理とした。肝を露出し、特製の固定具で肝を固定し観察した。観察された肝表面の微小循環は CCD カメラを介して PC へ記録される。マス目が書かれた特殊なスライドガラスを用いることで、経時的に同一部位の類洞が観察可能となる。

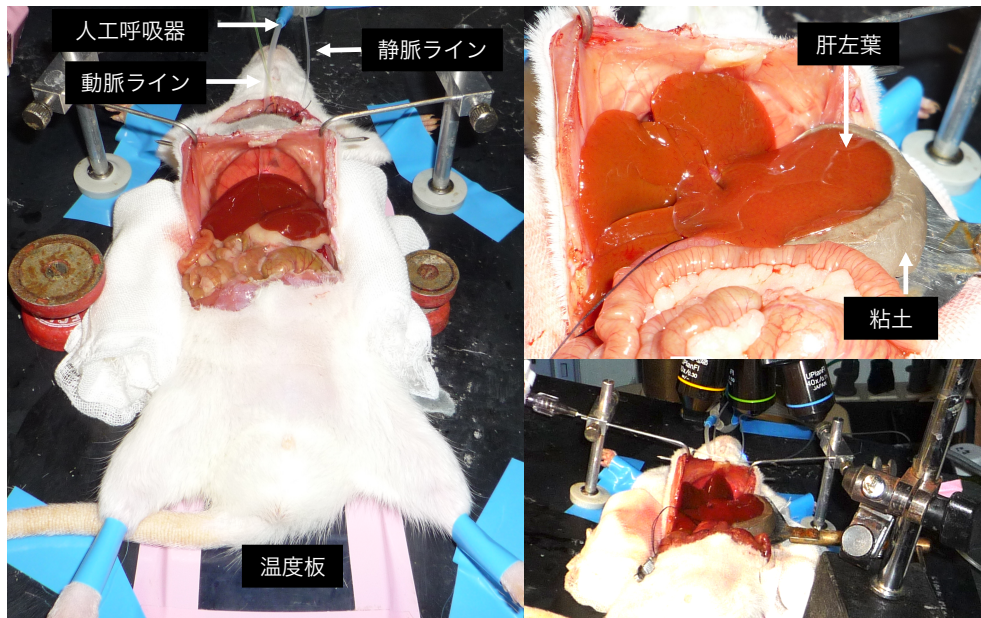


図 8 手術手技

ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与にて麻酔した後に気管切開を行い、人工呼吸器管理とし、吸入麻酔で維持した。背中には温度板を入れ、体温を保持した。血圧モニタリング、薬剤投与、採血目的に動脈ライン、静脈ラインを確保した。上腹部横切開で開腹し、肝臓を露出した。肝左葉を脱転し特殊な粘土を用いて平面を作成した。肝臓表面にカバーガラスをかけ、レンズを介して観察を行った。

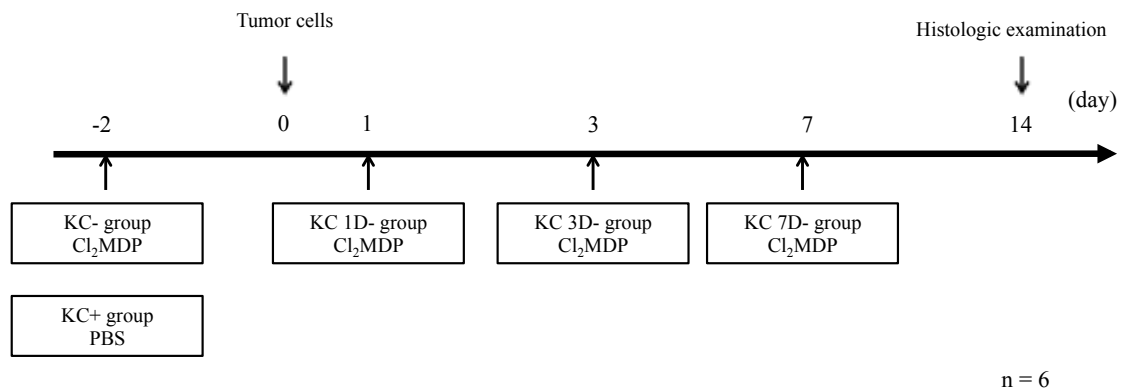


図 9 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去したモデルの実験群(91)

腫瘍投与から異なるタイミングでクッパー細胞を除去する 5 群を設定し、腫瘍細胞を投与して 2 週間後に犠牲死を行い、肝組織を採取した。

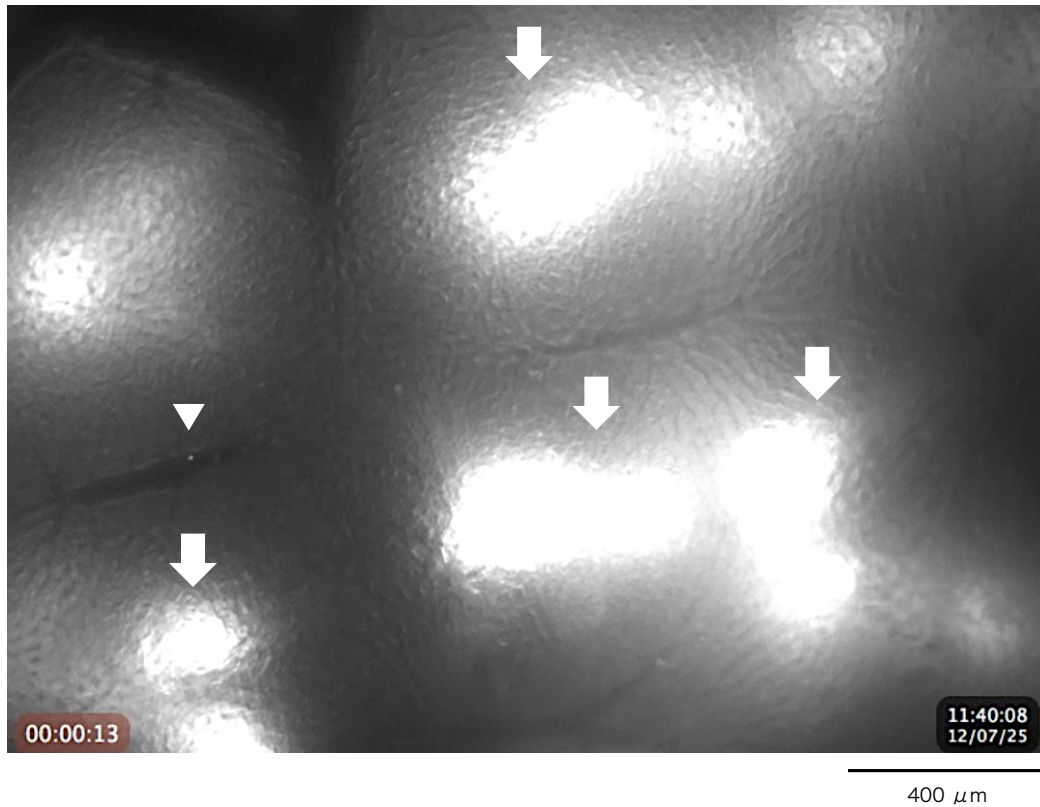


図 10 腫瘍細胞の経門脈投与

門脈にカテーテルを留置し、ラット大腸癌細胞株 RCNH-4 1×10^6 個を投与した。投与直後より肝類洞内で腫瘍塞栓を形成した（矢印）。類洞内を流れる腫瘍細胞、接着する腫瘍細胞（矢頭）は少数であり、腫瘍塞栓形成が主であった。腫瘍塞栓により循環不全をきたす個体を認めた。

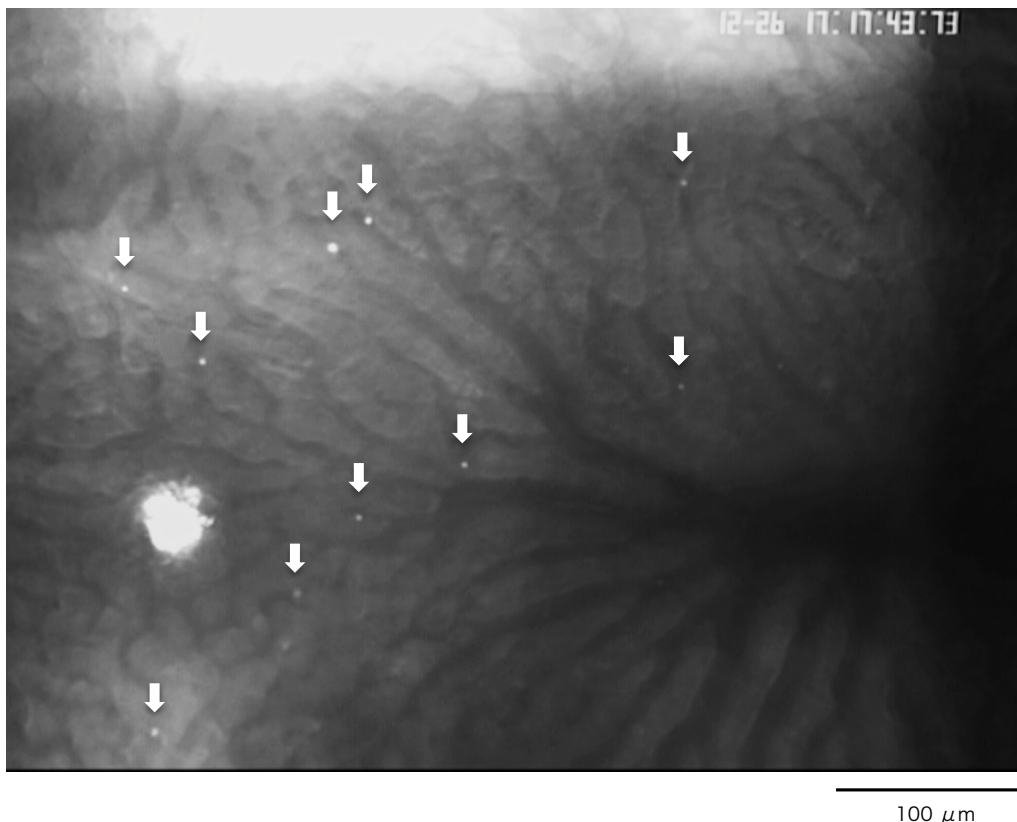
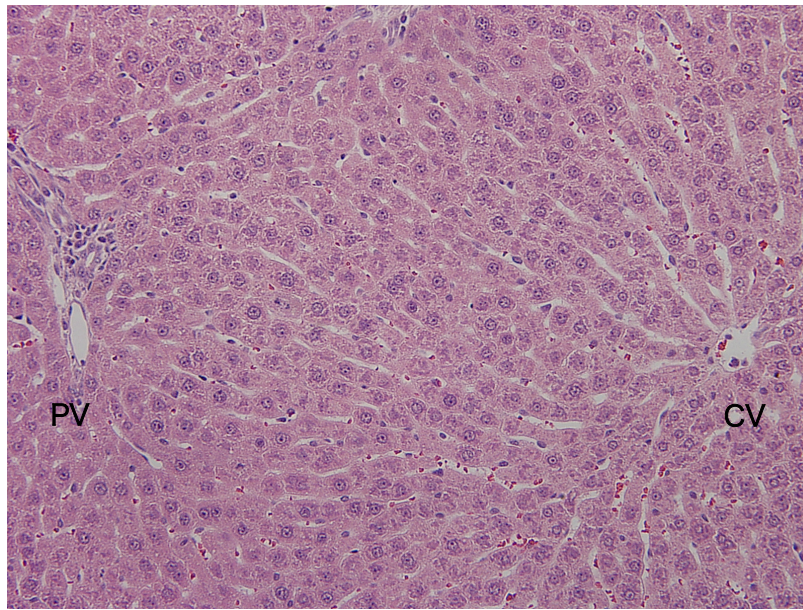


図 11 腫瘍細胞の経頸動脈投与

左頸動脈にカテーテルを留置し、ラット大腸癌細胞株 RCNH-4 5×10^6 個を投与した。投与開始 1 分 30 秒後より類洞内を流れる腫瘍細胞を認めた。類洞内を流れる腫瘍細胞は類洞へ接着するものが存在した。図中で光っているのが腫瘍細胞である（矢印）。single cell の腫瘍細胞が類洞内を流れ、類洞に接着した。

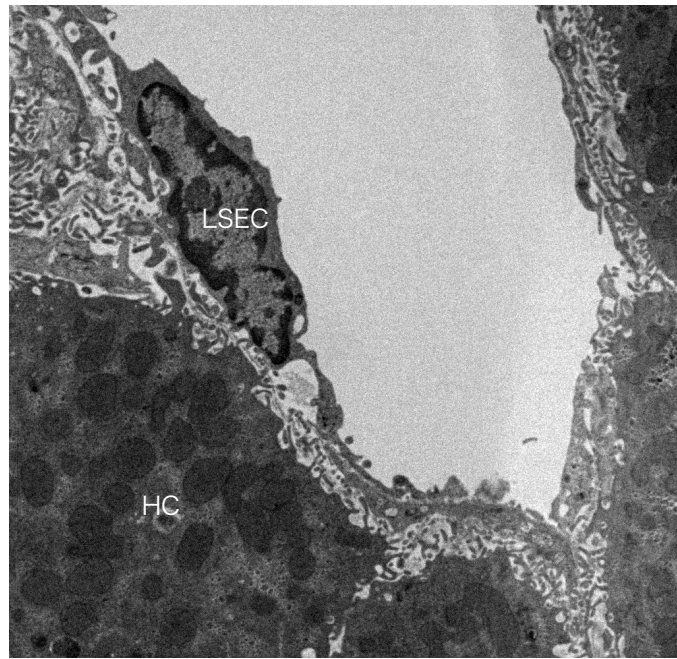


PV: portal vein
CV: central vein

50 μ m

図 12 クッパー細胞除去後の肝類洞構造 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

Cl₂MDP リポソームを投与しクッパー細胞を除去した。投与 2 日後の肝臓をヘマトキシリン・エオジン染色したものである。索状構造の乱れは認めず、類洞の狭小化も認められなかった。



LSEC: liver sinusoidal endothelial cell
HC: hepatocyte

図 13 クッパー細胞除去後の肝類洞内皮（電子顕微鏡像）

Cl₂MDP リポソームを投与し、2 日後の肝類洞を電子顕微鏡で評価したものである。類洞内皮細胞は保たれていた。

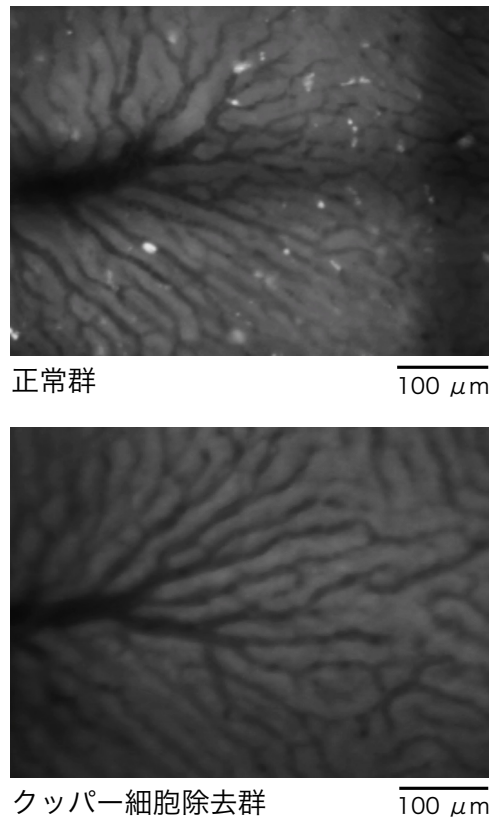


図 14 Cl_2MDP リポソームによるクッパー細胞除去の評価(91)

Cl_2MDP リポソーム投与 2 日後のラットに蛍光封入リポソームを投与し、クッパー細胞の除去を生体蛍光顕微鏡で評価した。正常群ではクッパー細胞が蛍光を取り込んでクッパー細胞が光っており、クッパー細胞除去群では、クッパー細胞が存在しないため蛍光が取り込まれなかった。

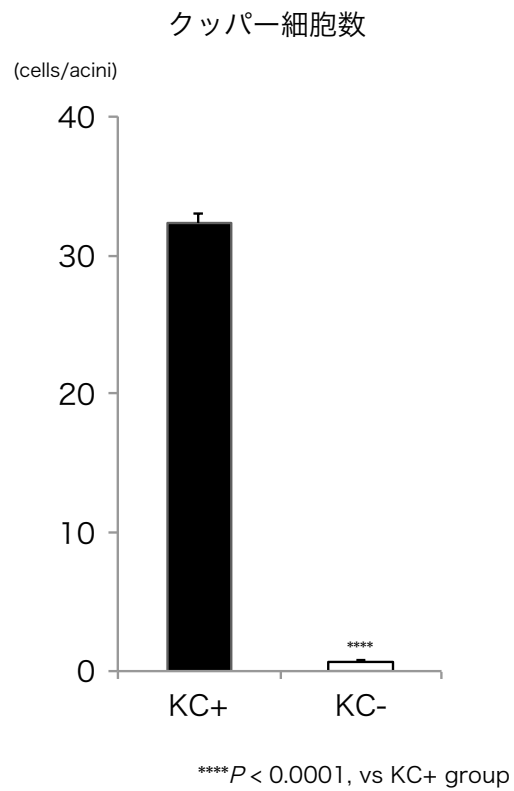


図 15 Cl_2MDP リポソームによるクッパー細胞除去の評価(91)

正常群である KC+群と比較して、 Cl_2MDP リポソームを投与してクッパー細胞を除去した KC-群では有意に 1 腺房あたりのクッパー細胞数の減少を認めた。

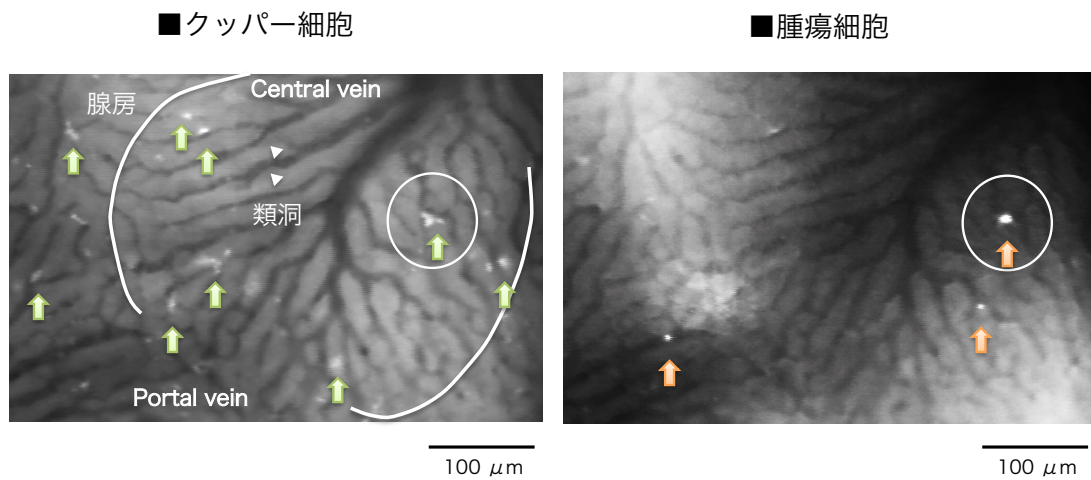


図 16 生体蛍光顕微鏡観察像(91)

同一部位のクッパー細胞と腫瘍細胞の生体蛍光顕微鏡像である。類洞は黒い枝状で示される（矢頭）。血流は門脈領域から中心静脈領域へ流れる。左側で光っているのがクッパー細胞、右側で光っているのが腫瘍細胞を示す。白い円の部位で、クッパー細胞と腫瘍細胞を同部位に認めた。

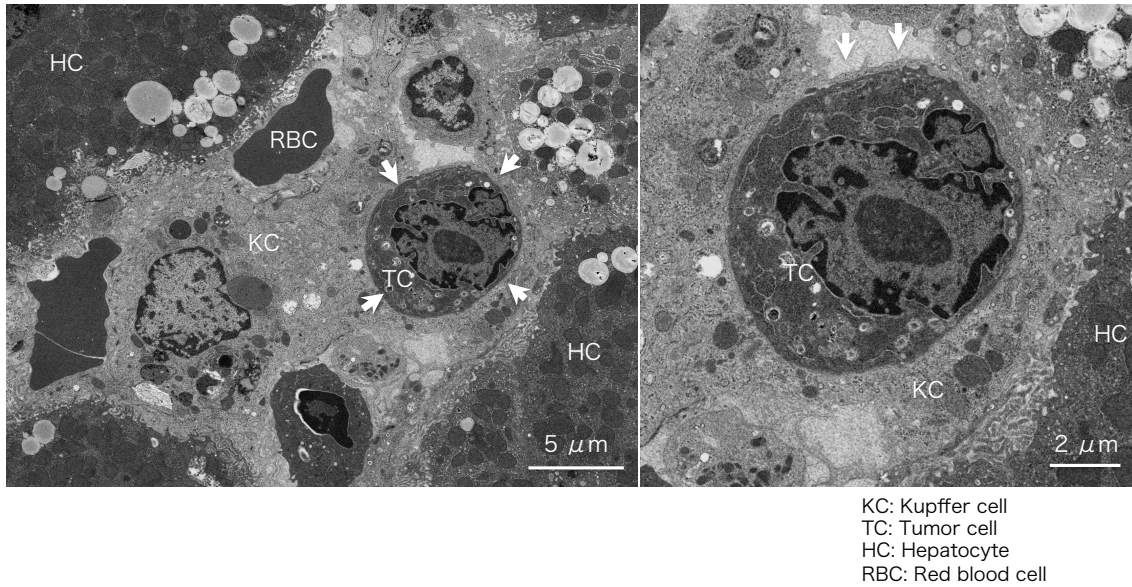


図 17 クッパー細胞と腫瘍細胞の接着(91)

左図は、腫瘍細胞投与 2 時間後の肝類洞内の電子顕微鏡像である。類洞内には、クッパー細胞と腫瘍細胞（矢印）を認め、両細胞は接触していた。右図は左図の拡大である。腫瘍細胞はクッパー細胞の細胞膜（矢印）に覆われており、貪食されていた。

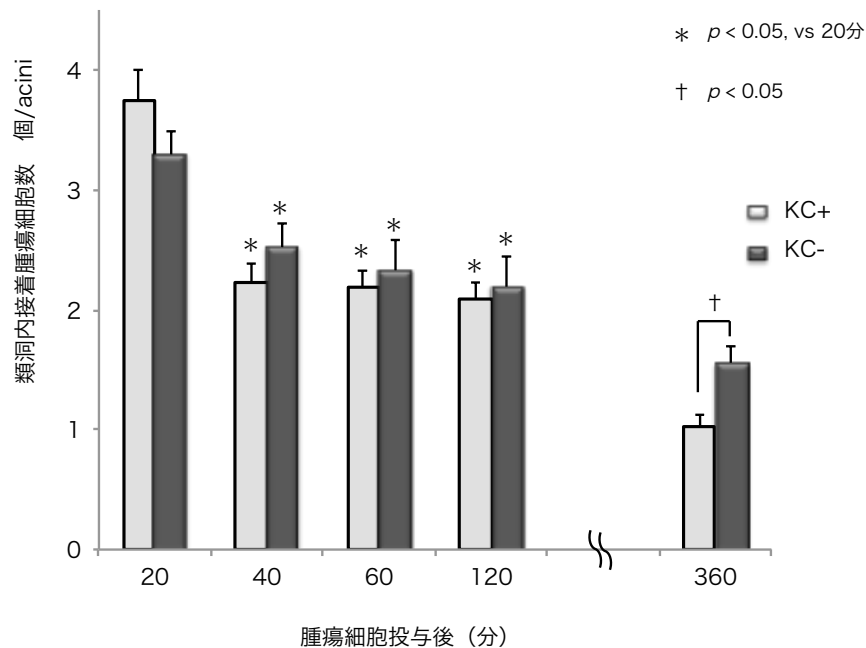


図 18 類洞内接着腫瘍細胞数(91)

類洞内に接着した腫瘍細胞数を示す。横軸が腫瘍注入後の経過時間、縦軸は1腺房あたりの接着腫瘍細胞数である。クッパー細胞を除去していない KC+群とクッパー細胞を除去した KC-群の両群とも、時間経過とともに接着腫瘍細胞数は減少した。腫瘍投与 360 分後、KC+群と KC-群で類洞内接着腫瘍細胞数に有意な差を認めた。

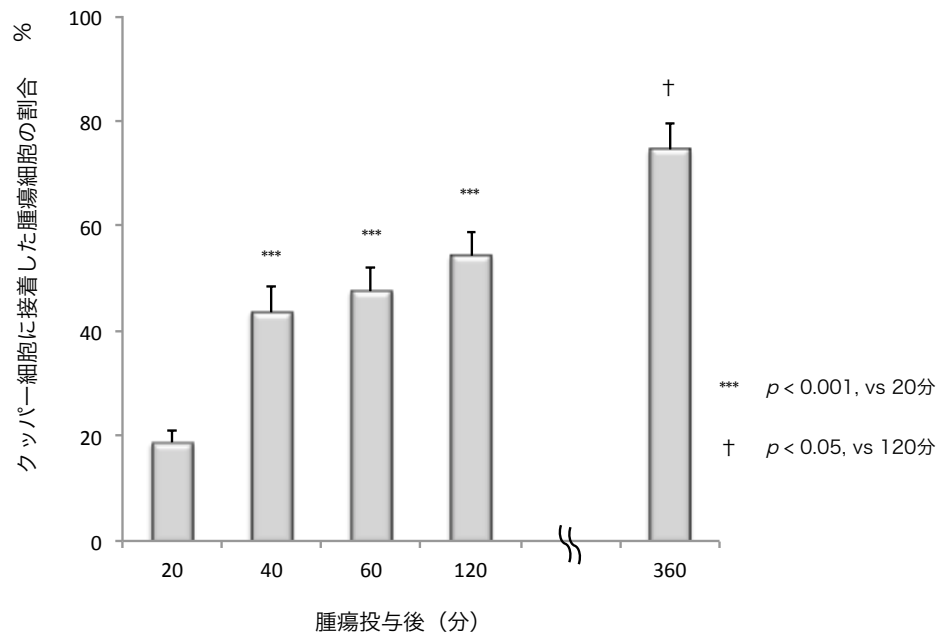


図 19 クッパー細胞に接着した腫瘍細胞の割合(91)

クッパー細胞を除去していない KC+群において、クッパー細胞と接着した腫瘍細胞の割合を示す。クッパー細胞と接着した腫瘍細胞の割合は徐々に増加した。

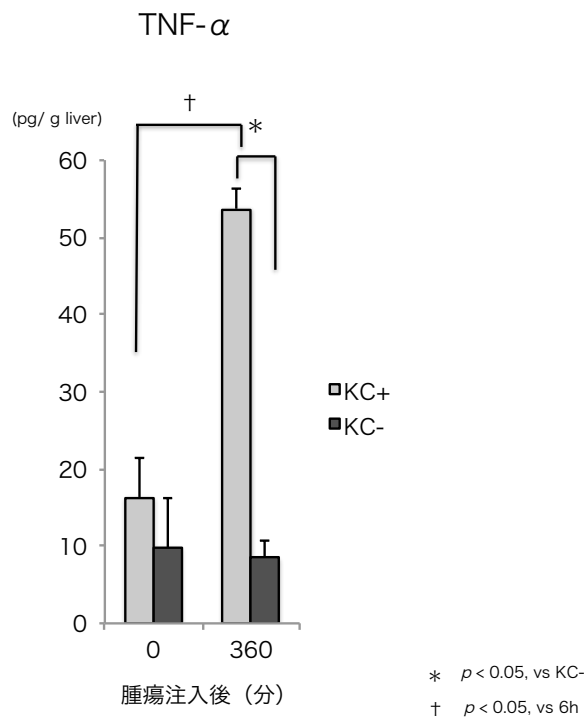


図 20 肝組織中の TNF- α (91)

クッパー細胞の活性化を検討する指標として、腫瘍細胞を投与する前と腫瘍細胞を投与した 6 時間後の肝組織中の TNF- α を測定した。KC+群では腫瘍細胞投与によりクッパー細胞の活性化を認めた。KC-群では、クッパー細胞が存在しないため、TNF- α の値は腫瘍細胞投与前後で変化しなかった。

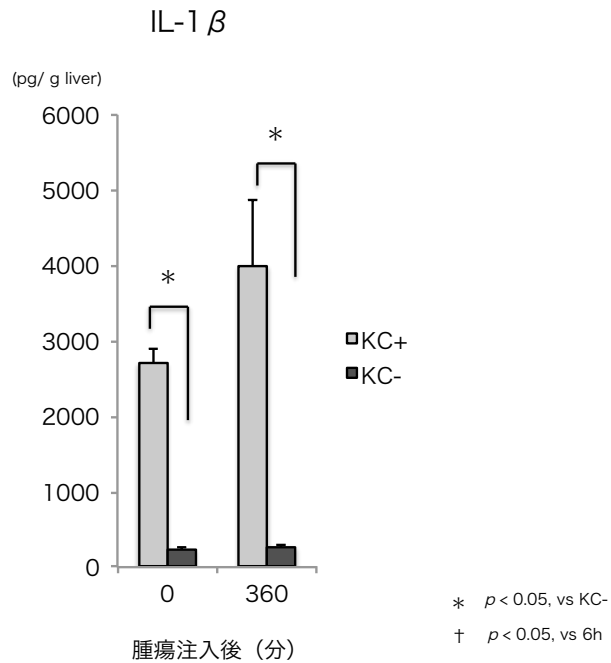


図 21 肝組織中の IL-1 β (91)

クッパー細胞の活性化を検討する指標として、腫瘍細胞を投与する前と腫瘍細胞を投与した 6 時間後の肝組織中の IL-1 β を測定した。KC+群では腫瘍細胞投与により増加する傾向があったが、有意差は認めなかった。IL-1 β は、腫瘍細胞を投与する前でも、クッパー細胞が存在しない KC-群で低下していた。KC-群において、腫瘍細胞の投与で IL-1 β の値に変化を認めなかった。

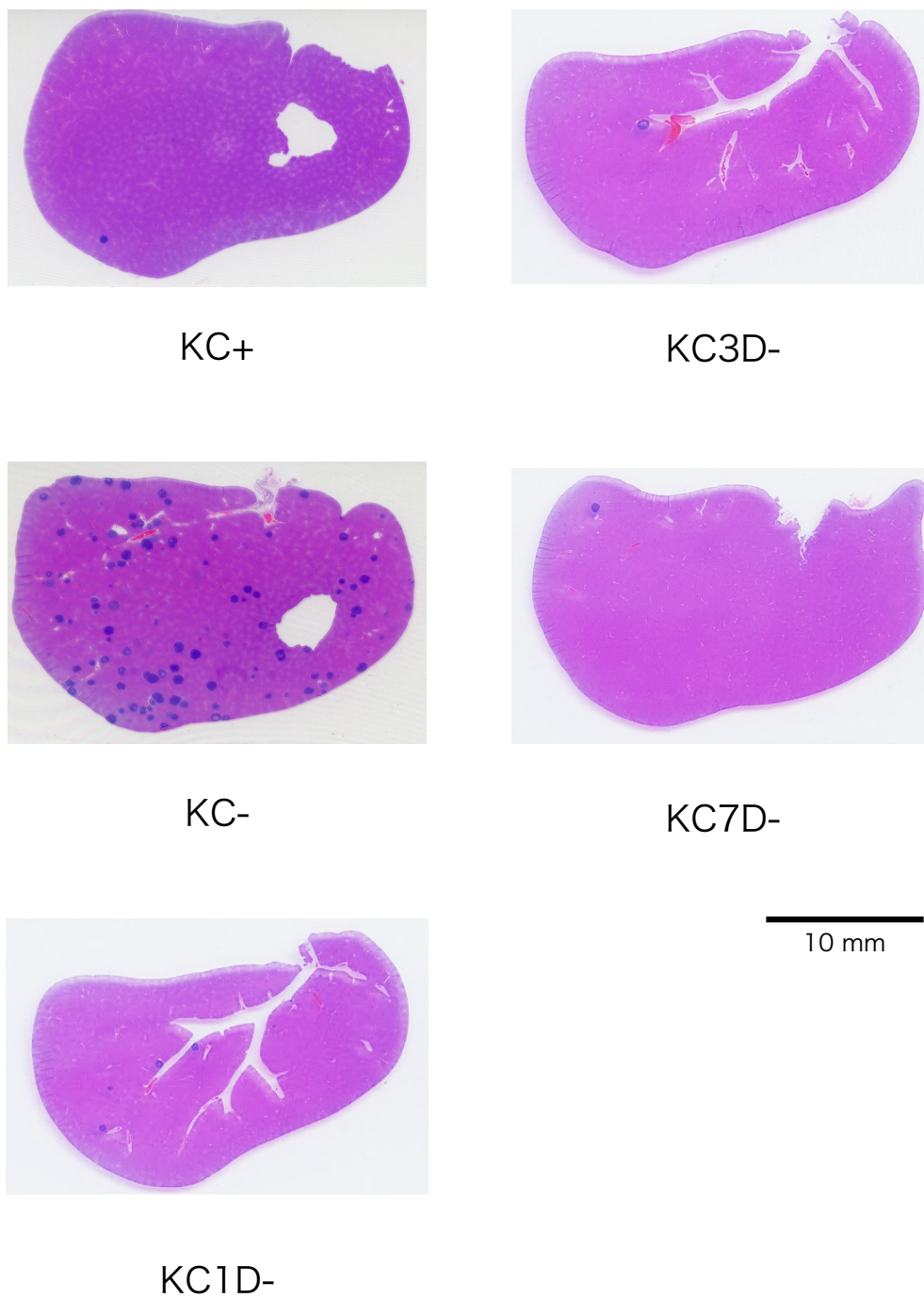
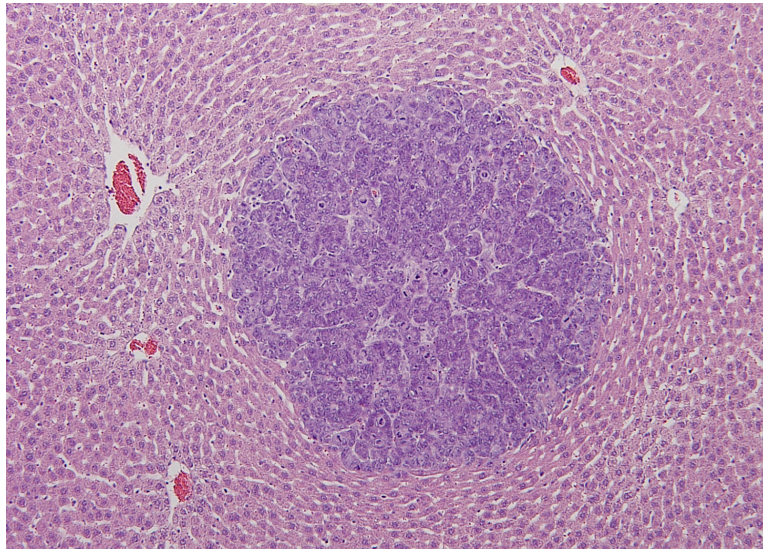


図 22 クッパー細胞の肝転移結節形成への影響（腫瘍細胞投与 2 週間後）(91)

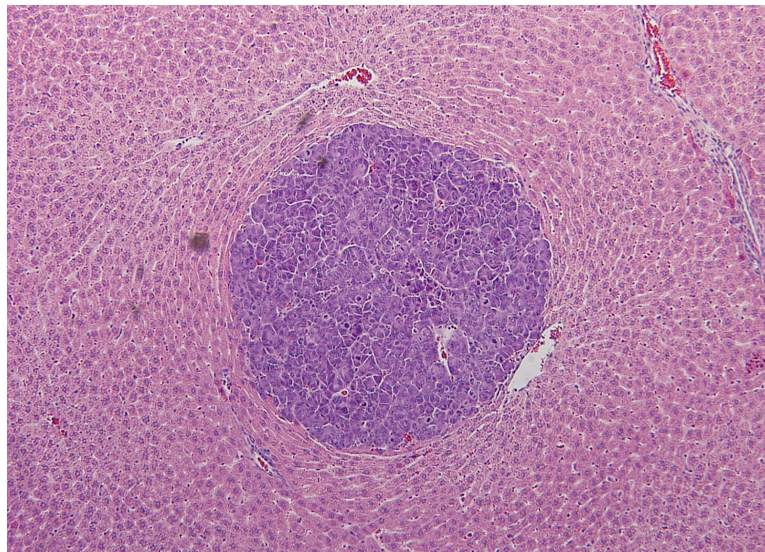
(i) コントロール群 (KC+群) (ii) 腫瘍細胞投与 2 日前にクッパー細胞を除去する群 (KC-群) (iii) 腫瘍細胞投与 1 日後にクッパー細胞を除去する群 (KC1D-

群) (iv) 腫瘍細胞投与 3 日後にクッパー細胞を除去する群 (KC3D-群) (v) 腫瘍細胞投与 7 日後にクッパー細胞を除去する群 (KC7D-群) の 5 群を設定した。腫瘍細胞投与 2 週間後の肝臓を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色した切片を示す。肝転移結節は、ヘマトキシリンで青く染められた。KC-群で著明に転移結節が増加していた。



KC+

200 μ m



KC-

200 μ m

図 23 クッパー細胞の肝転移結節形成への影響（拡大像）(91)

クッパー細胞の除去で転移結節巣の構造に差は認めなかった。

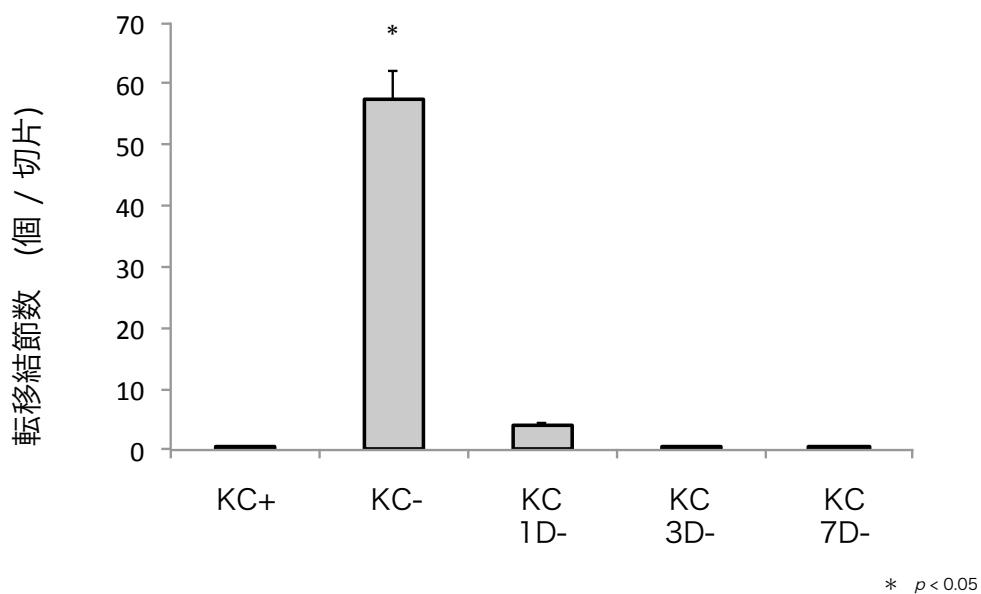


図 24 転移結節数(91)

腫瘍細胞投与から異なるタイミングでクッパー細胞を除去した 5 群における、2 週間後の転移結節数を示す。腫瘍細胞投与前にクッパー細胞を除去した KC-群では、腫瘍細胞投与時にクッパー細胞が存在したその他の群と比較して、著明に転移数が増加した。腫瘍細胞投与 3 日後以降にクッパー細胞を除去しても転移結節数に対しては影響を与えなかった。

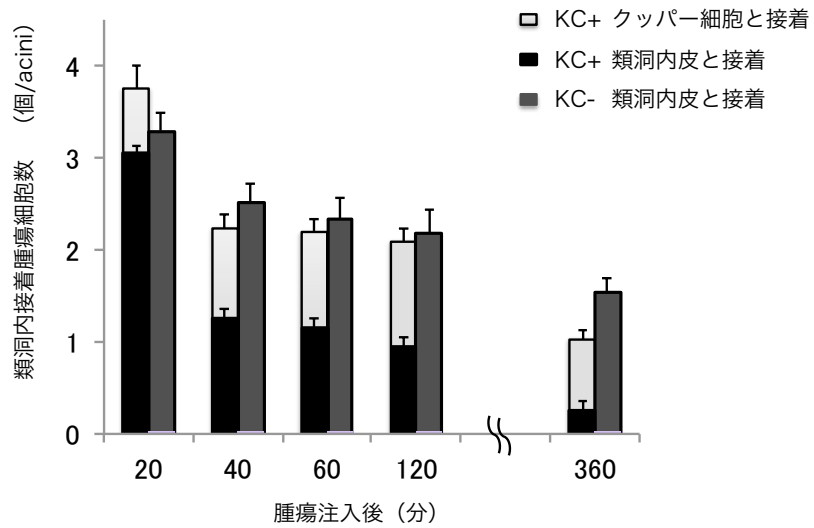


図 25 生体蛍光顕微鏡観察における腫瘍細胞が接着した類洞内構成細胞の内訳

生体蛍光顕微鏡で観察した接着腫瘍細胞において、類洞内皮と接着した腫瘍細胞、クッパー細胞と接着した腫瘍細胞を示す。腫瘍細胞投与 120 分まではクッパー細胞の有無にかかわらず類洞内の接着腫瘍細胞数に差は認めなかった。類洞内皮と接着した腫瘍細胞はクッパー細胞と接着した腫瘍細胞と比較して離れやすい傾向であった。

謝辞

本研究を進め、本論文をまとめるにあたっては多くの先生方にお世話になりました。

指導教官として多大なご配慮を頂きました筑波大学臨床医学系、大河内信弘教授、近藤匡教授、小川光一講師、田村孝史講師に心からの感謝を捧げます。皆様には、研究に対する情熱と真摯な態度および合理的な考え方の重要性を教えて下さいました。

本研究をまとめるに際し種々のご配慮を頂きました「独立行政法人 国立病院機構 霞ヶ浦医療センター」の福永潔外科医長、「横浜市立大学学術院医学群」村田聡一郎准教授に感謝致します。

文献

1. Wade TP, Virgo KS, Li MJ, Callander PW, Longo WE, Johnson FE. Outcomes after detection of metastatic carcinoma of the colon and rectum in a national hospital system. *J Am Coll Surg*. 1996;182(4):353-361.
2. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg*. 1990;77(11):1241-1246.
3. Rodgers MS, McCall JL. Surgery for colorectal liver metastases with hepatic lymph node involvement: a systematic review. *Br J Surg*. 2000;87(9):1142-1155.
4. Martin LW, Warren RS. Current management of colorectal liver metastases. *Surg Oncol Clin N Am*. 2000;9(4):853-876; discussion 877-858.
5. Penna C, Nordlinger B. Colorectal metastasis (liver and lung). *Surg Clin North Am*. 2002;82(5):1075-1090, x-xi.
6. Kato T, Yasui K, Hirai T, Kanemitsu Y, Mori T, Sugihara K, Mochizuki H, Yamamoto J. Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(10 Suppl):S22-31.
7. 河原 正, 加藤 知, 森 武, 望月 英, 杉原 健, 亀岡 信, 亀山 雅, 小林 薫, 北條 慶, 武藤 徹. 本邦における大腸癌同時性肝転移に対する治療の現況

(第 2 報)

全国アンケート追跡調査結果. 日本大腸肛門病学会雑誌. 2003;56(2):55-61.

8. 山口達郎, 武生 森, 高橋慶一. 大腸癌肝転移病期分類. 癌の臨床. 2006;52:245-248.

9. Gray BN. Colorectal cancer: the natural history of disseminated disease - a review. Aust N Z J Surg. 1980;50(6):643-646.

10. Wood CB, Gillis CR, Blumgart LH. A retrospective study of the natural history of patients with liver metastases from colorectal cancer. Clin Oncol. 1976;2(3):285-288.

11. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. Bmj. 1993;306(6880):752-755.

12. Simmonds PC. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Colorectal Cancer Collaborative Group. Bmj. 2000;321(7260):531-535.

13. Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, Heikkila R, Johannesen TB, Starkhammar H, Topham CA, Awad L, Jacques C, Herait P. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. Lancet. 1998;352(9138):1413-1418.

14. Doci R, Gennari L, Bignami P, Montalto F, Morabito A, Bozzetti F.

One hundred patients with hepatic metastases from colorectal cancer treated by resection: analysis of prognostic determinants. *Br J Surg.* 1991;78(7):797-801.

15. Rees M, Plant G, Bygrave S. Late results justify resection for multiple hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg.* 1997;84(8):1136-1140.

16. 杉原 健. 大腸癌肝転移の外科治療. *日本消化器外科学会雑誌.* 2000;33(1):128-133.

17. Sugihara K, Hojo K, Moriya Y, Yamasaki S, Kosuge T, Takayama T. Pattern of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Br J Surg.* 1993;80(8):1032-1035.

18. Gayowski TJ, Iwatsuki S, Madariaga JR, Selby R, Todo S, Irish W, Starzl TE. Experience in hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of clinical and pathologic risk factors. *Surgery.* 1994;116(4):703-710; discussion 710-701.

19. Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, Enker WE, Turnbull AD, Coit DG, Marrero AM, Prasad M, Blumgart LH, Brennan MF. Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol.* 1997;15(3):938-946.

20. Nishizaki T, Matsumata T, Kanematsu T, Yasunaga C, Sugimachi K. Surgical manipulation of VX2 carcinoma in the rabbit liver evokes enhancement of metastasis. *J Surg Res.* 1990;49(1):92-97.

21. Ito S, Nakanishi H, Hirai T, Kato T, Kodera Y, Feng Z, Kasai Y, Ito

K, Akiyama S, Nakao A, Tatematsu M. Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a LightCycler. *Cancer Lett.* 2002;183(2):195-203.

22. Weitz J, Koch M, Kienle P, Schrodel A, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. Detection of hematogenic tumor cell dissemination in patients undergoing resection of liver metastases of colorectal cancer. *Ann Surg.* 2000;232(1):66-72.

23. Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg.* 2005;241(2):199-205.

24. Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg.* 2000;232(1):58-65.

25. Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron.* 2008;1(1):69-83.

26. Heuff G, Oldenburg HS, Boutkan H, Visser JJ, Beelen RH, Van Rooijen N, Dijkstra CD, Meyer S. Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1993;37(2):125-130.

27. Bayon LG, Izquierdo MA, Sirovich I, van Rooijen N, Beelen RH, Meijer S. Role of Kupffer cells in arresting circulating tumor cells and controlling metastatic growth in the liver. *Hepatology*. 1996;23(5):1224-1231.
28. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*. 1994;35(11):1509-1516.
29. Gardner CR, Wasserman AJ, Laskin DL. Differential sensitivity of tumor targets to liver macrophage-mediated cytotoxicity. *Cancer Res*. 1987;47(24 Pt 1):6686-6691.
30. Heuff G, van de Loosdrecht AA, Betjes MG, Beelen RH, Meijer S. Isolation and purification of large quantities of fresh human Kupffer cells, which are cytotoxic against colon carcinoma. *Hepatology*. 1995;21(3):740-745.
31. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*. 1987;79(2):319-326.
32. Decker T, Lohmann-Matthes ML, Karck U, Peters T, Decker K. Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages. *J Leukoc Biol*. 1989;45(2):139-146.
33. Gardner CR, Wasserman AJ, Laskin DL. Liver macrophage-mediated cytotoxicity toward mastocytoma cells involves phagocytosis of tumor targets. *Hepatology*. 1991;14(2):318-324.

34. Timmers M, Vekemans K, Vermijlen D, Asosingh K, Kuppen P, Bouwens L, Wisse E, Braet F. Interactions between rat colon carcinoma cells and Kupffer cells during the onset of hepatic metastasis. *Int J Cancer*. 2004;112(5):793-802.
35. Sturm JW, Magdeburg R, Berger K, Petruch B, Samel S, Bonninghoff R, Keese M, Hafner M, Post S. Influence of TNFA on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model. *Int J Cancer*. 2003;107(1):11-21.
36. Song E, Chen J, Ouyang N, Wang M, Exton MS, Heemann U. Kupffer cells of cirrhotic rat livers sensitize colon cancer cells to Fas-mediated apoptosis. *Br J Cancer*. 2001;84(9):1265-1271.
37. Gassmann P, Haier J. The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(2):171-181.
38. Zipin-Roitman A, Meshel T, Sagi-Assif O, Shalmon B, Avivi C, Pfeffer RM, Witz IP, Ben-Baruch A. CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res*. 2007;67(7):3396-3405.
39. Thomas P, Hayashi H, Zimmer R, Forse RA. Regulation of cytokine production in carcinoembryonic antigen stimulated Kupffer cells by beta-2 adrenergic receptors: implications for hepatic metastasis. *Cancer Lett*. 2004;209(2):251-257.

40. Gangopadhyay A, Lazure DA, Thomas P. Carcinoembryonic antigen induces signal transduction in Kupffer cells. *Cancer Lett.* 1997;118(1):1-6.
41. Meterissian S, Steele GD, Jr., Thomas P. Human and murine Kupffer cell function may be altered by both intrahepatic and intrasplenic tumor deposits. *Clin Exp Metastasis.* 1993;11(2):175-182.
42. Aarons CB, Bajenova O, Andrews C, Heydrick S, Bushell KN, Reed KL, Thomas P, Becker JM, Stucchi AF. Carcinoembryonic antigen-stimulated THP-1 macrophages activate endothelial cells and increase cell-cell adhesion of colorectal cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(3):201-209.
43. Kruskal JB, Azouz A, Korideck H, El-Hallak M, Robson SC, Thomas P, Goldberg SN. Hepatic colorectal cancer metastases: imaging initial steps of formation in mice. *Radiology.* 2007;243(3):703-711.
44. Khatib A-M, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogiannea M, Meterissian S, Brodt P. Characterization of the Host Proinflammatory Response to Tumor Cells during the Initial Stages of Liver Metastasis. *Am J Pathol.* 2005;167(3):749-759.
45. Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Burnier J, Bikfalvi A, Brodt P. The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1781-1792.
46. Minami S, Furui J, Kanematsu T. Role of carcinoembryonic antigen in the progression of colon cancer cells that express carbohydrate antigen.

Cancer Res. 2001;61(6):2732-2735.

47. Gangopadhyay A, Lazure DA, Thomas P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. Clin Exp Metastasis. 1998;16(8):703-712.

48. Christophi C, Harun N, Fifis T. Liver regeneration and tumor stimulation--a review of cytokine and angiogenic factors. J Gastrointest Surg. 2008;12(5):966-980.

49. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. Liver Int. 2006;26(10):1175-1186.

50. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. J Hepatol. 1999;30(1):48-60.

51. Ding L, Sunamura M, Kodama T, Yamauchi J, Duda DG, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. In vivo evaluation of the early events associated with liver metastasis of circulating cancer cells. Br J Cancer. 2001;85(3):431-438.

52. Haier J, Korb T, Hotz B, Spiegel HU, Senninger N. An intravital model to monitor steps of metastatic tumor cell adhesion within the hepatic microcirculation. J Gastrointest Surg. 2003;7(4):507-514; discussion 514-505.

53. Steinbauer M, Guba M, Cernaianu G, Kohl G, Cetto M, Kunz-Schughart LA, Geissler EK, Falk W, Jauch KW. GFP-transfected

tumor cells are useful in examining early metastasis in vivo, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(2):135-141.

54. Enns A, Gassmann P, Schluter K, Korb T, Spiegel HU, Senninger N, Haier J. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J Gastrointest Surg*. 2004;8(8):1049-1059; discussion 1060.

55. Enns A, Korb T, Schluter K, Gassmann P, Spiegel HU, Senninger N, Mitjans F, Haier J. Alpha5beta1-integrins mediate early steps of metastasis formation. *Eur J Cancer*. 2005;41(7):1065-1072.

56. von Sengbusch A, Gassmann P, Fisch KM, Enns A, Nicolson GL, Haier J. Focal Adhesion Kinase Regulates Metastatic Adhesion of Carcinoma Cells within Liver Sinusoids. *Am J Pathol*. 2005;166(2):585-596.

57. Schluter K, Gassmann P, Enns A, Korb T, Hemping-Bovenkerk A, Holzen J, Haier J. Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. *Am J Pathol*. 2006;169(3):1064-1073.

58. Robertson JH, Yang SY, Iga AM, Seifalian AM, Winslet MC. An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver. *Int J Exp Pathol*. 2008;89(6):447-457.

59. Robertson JH, Sarkar S, Yang SY, Seifalian AM, Winslet MC. In vivo models for early development of colorectal liver metastasis. *Int J Exp*

Pathol. 2008;89(1):1-12.

60. Higashi N, Ishii H, Fujiwara T, Morimoto-Tomita M, Irimura T. Redistribution of fibroblasts and macrophages as micrometastases develop into established liver metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(7):631-638.

61. Nakano Y, Kondo T, Matsuo R, Hashimoto I, Kawasaki T, Kohno K, Myronovych A, Tadano S, Hisakura K, Ikeda O, Watanabe M, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Platelet dynamics in the early phase of postischemic liver in vivo. *J Surg Res*. 2008;149(2):192-198.

62. Pak S, Kondo T, Nakano Y, Murata S, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Platelet adhesion in the sinusoid caused hepatic injury by neutrophils after hepatic ischemia reperfusion. *Platelets*. 2010;21(4):282-288.

63. Tamura T, Kondo T, Pak S, Nakano Y, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Interaction between Kupffer cells and platelets in the early period of hepatic ischemia-reperfusion injury-An in vivo study. *J Surg Res*. 2012.

64. Tamura T, Kondo T, Ogawa K, Fukunaga K, Ohkohchi N. Protective effect of heme oxygenase-1 on hepatic ischemia-reperfusion injury through inhibition of platelet adhesion to the sinusoids. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(4):700-706.

65. Ogawa K, Kondo T, Tamura T, Matsumura H, Fukunaga K, Oda T, Ohkohchi N. Influence of Kupffer cells and platelets on ischemia-reperfusion

injury in mild steatotic liver. *World J Gastroenterol.* 2013;19(9):1396-1404.

66. Ogawa K, Kondo T, Tamura T, Matsumura H, Fukunaga K, Murata S, Ohkohchi N. Interaction of kupffer cells and platelets determines the severity of ischemia-reperfusion injury in steatosis. *The Tohoku journal of experimental medicine.* 2014;232(2):105-113.

67. Inoue Y, Kashima Y, Aizawa K, Hatakeyama K. A new rat colon cancer cell line metastasizes spontaneously: biologic characteristics and chemotherapeutic response. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82(1):90-97.

68. Okuno K, Hirai N, Lee YS, Kawai I, Shigeoka H, Yasutomi M. Involvement of liver-associated immunity in hepatic metastasis formation. *J Surg Res.* 1998;75(2):148-152.

69. van Rooijen N, Kors N. Effects of intracellular diphosphonates on cells of the mononuclear phagocyte system: in vivo effects of liposome-encapsulated diphosphonates on different macrophage subpopulations in the spleen. *Calcif Tissue Int.* 1989;45(3):153-156.

70. Ohara Y, Oda T, Yamada K, Hashimoto S, Akashi Y, Miyamoto R, Kobayashi A, Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N. Effective delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host Kupffer cells. *Int J Cancer.* 2012;131(10):2402-2410.

71. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods.* 1994;174(1-2):83-93.

72. Bogers WM, Stad RK, Janssen DJ, Prins FA, van Rooijen N, van Es LA, Daha MR. Kupffer cell depletion in vivo results in clearance of large-sized IgA aggregates in rats by liver endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1991;85(1):128-136.
73. Watanabe R, Munemasa T, Matsumura M, Fujimaki M. Fluorescent liposomes for intravital staining of Kupffer cells to aid in vivo microscopy in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007;29(5):321-327.
74. Tamura T, Kondo T, Pak S, Nakano Y, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Interaction between Kupffer cells and platelets in the early period of hepatic ischemia-reperfusion injury--an in vivo study. *J Surg Res.* 2012;178(1):443-451.
75. Kondo T, Okamoto S, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K. Application of a novel method for subsequent evaluation of sinusoids and postsinusoidal venules after ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Eur Surg Res.* 1998;30(4):252-258.
76. Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Bucana CD, Gallick GE, Nickols MA, Westlin WF, Ellis LM. Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res.* 2003;63(9):2079-2087.
77. Kikkawa H, Kaihou M, Horaguchi N, Uchida T, Imafuku H, Takiguchi A, Yamazaki Y, Koike C, Kuruto R, Kakiuchi T, Tsukada H, Takada Y, Matsuura N, Oku N. Role of integrin alpha(v)beta3 in the early

phase of liver metastasis: PET and IVM analyses. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(8):717-725.

78. Ito S, Nakanishi H, Ikehara Y, Kato T, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A, Tatematsu M. Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int J Cancer*. 2001;93(2):212-217.

79. Naumov GN, Wilson SM, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC, Hoffman RM, Chambers AF. Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy, to monitor steps in tumor metastasis. *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 12):1835-1842.

80. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998;153(3):865-873.

81. Yonei Y, Kurose I, Fukumura D, Saito H, Miura S, Tsukada N, Oda M, Tsuchiya M. Evidence of direct interaction between Kupffer cells and colon cancer cells: an ultrastructural study of the co-culture. *Liver*. 1994;14(1):37-44.

82. Pearson HJ, Anderson J, Chamberlain J, Bell PR. The effect of Kupffer cell stimulation or depression on the development of liver metastases in the rat. *Cancer Immunol Immunother*. 1986;23(3):214-216.

83. Allen-Mersh TG, McCullough TK, Patel H, Wharton RQ, Glover C,

Jonas SK. Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. *Br J Surg.* 2007;94(1):96-105.

84. Patel H, Le Marer N, Wharton RQ, Khan ZA, Araia R, Glover C, Henry MM, Allen-Mersh TG. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann Surg.* 2002;235(2):226-231.

85. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem.* 1990;192(2):245-261.

86. Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol.* 2001;70(2):163-170.

87. Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klaunig JE. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 2007;96(1):2-15.

88. Zhang W, Arii S, Sasaoki T, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H, Fujita S, Furutani M, Mise M, Ishiguro S, et al. The role of Kupffer cells in the surveillance of tumor growth in the liver. *J Surg Res.* 1993;55(2):140-146.

89. Mise M, Arii S, Higashitsuji H, Furutani M, Monden K, Adachi Y, Funaki N, Fujita S, Ishiguro S, Kitao, et al. Augmented local immunity in the liver by a streptococcal preparation, OK432, related to antitumor activity of hepatic macrophages. *Immunopharmacology.* 1994;27(1):31-41.

90. Khatib AM, Kontogiannea M, Fallavollita L, Jamison B, Meterissian S, Brodt P. Rapid induction of cytokine and E-selectin

expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res.* 1999;59(6):1356-1361.

91. Matsumura H, Kondo T, Ogawa K, Tamura T, Fukunaga K, Murata S, Ohkohchi N. Kupffer cells decrease metastasis of colon cancer cells to the liver in the early stage. *Int J Oncol.* 2014;45(6):2303-2310.

92. Tamura T, Kondo T, Fukunaga K, Ohkohchi N. Platelet Dynamics in the Sinusoid of the Liver after Ischemia-Reperfusion. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research.* 2012;1(7):114-118.