

# 論文内容要旨

Antithrombin insufficiency promotes susceptibility to liver tumorigenesis

(アンチトロンビン活性の低下は肝腫瘍の進行を促進する)

Journal of Surgical Research, 2019, in press.

主指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：安達 伸生教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

副指導教員：田邊 和照准教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

岩子 寛

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

## 背景

肝切除術は肝細胞癌に対する根治的治療であるが、切除後の再発率は50～70%と高く、再発の予防、その診断・治療は臨床上大きな課題である。以前、我々は肝細胞癌の術後予後因子を検討し、術前血漿アンチトロンビン(AT)値の低下(70%以下)が予後不良因子・再発因子となることを報告した。ATは、主に肝臓で生合成され、血液凝固反応を制御するセリンプロテアーゼインヒビターである。また、ATには抗凝固作用のみならず抗炎症作用も有している事が知られている。しかしながら、ATが、直接抗腫瘍作用を示すか否かは不明である。そこで、血漿AT低下が、肝腫瘍の発症と関連するか否かを検討するため、血漿AT低値マウスを用いて、ジエチルニトロサミン(DEN)と四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)による慢性肝障害からの肝腫瘍を誘発しATの抗炎症作用と抗腫瘍効果を検討した。

## 方法

AT低値マウス((B6;129-Serpin c1<sup>tm1</sup>) (血漿AT活性値約60%)及び、B6wild typeマウス(血漿AT活性値約120%)を用い、生後6週目に、DENを10 mg/kg、8週目より2週間間隔で60週までCCl<sub>4</sub>を0.5ml/kgを腹腔内投与し、肝腫瘍の発症を比較した。また肝組織を用い、肝細胞死はTUNEL法にて、Cleaved caspase-3とKI-67は免疫染色法で、炎症は血清のIL-6とTNF- $\alpha$ をELISA法で、肝好中球浸潤は好中球エラストラーゼ染色で評価し、さらに8-OHdG(8-hydroxy-2-deoxyguanosine) (酸化ストレスマーカー)は免疫染色および肝組織からDNAを抽出しELISA法により測定した。また、急性期(生後6週目にDENを10 mg/kg、8週目より2週間間隔でCCl<sub>4</sub>を2回投与)における肝障害は血清トランスアミナーゼ値で評価し、AT(500U/kg、3回/週、腹腔内)投与し肝機能の改善効果を検討した。

## 結果

まず、肝腫瘍モデルにおいて実験マウスを56週で犠牲死させるとAT低値マウス群(n=6)では、5匹に肝腫瘍の発生を認めたが、wild typeにおいて肝腫瘍は認めず、AT低値マウスでは肝腫瘍の発症が有意に見られた。さらに60週で犠牲死させると、wild type(n=7)では5匹に、AT低値マウス群(n=8)では8匹に肝腫瘍を認めたが、最大肝腫瘍径および腫瘍個数は有意にAT低値マウスにおいて高値であった。また、発症した肝腫瘍は多くが肝腺腫であり、一部肝細胞癌の組織像を呈していた。次に急性肝障害モデルでのマウスでは、AT低値マウスで、血清ASTおよびALTは有意に高値であり、血清IL-6およびTNF- $\alpha$ も有意に亢進していた。また肝組織においてはAT低値マウス群でTUNEL陽性細胞、Cleaved caspase-3陽性細胞、8-OHdG陽性細胞はそれぞれ有意に増加していた。さらに60週でも同様にAT低値マウス群でTUNEL陽性細胞、Cleaved caspase-3陽性細胞、8-OHdG陽性細胞、エラストラーゼ陽性細胞(好中球)、Ki-67indexはそれぞれ有意に増加し、ELISA法による8-OHdG値もまた有意にAT低値マウスにおいて高値であった。最後に、AT低値マウスにおける急性肝障害モデルにおいてATを腹腔

内投与し、肝障害を検討した。AT 低値マウスに AT(500U/kg)を 投与すると、投与後 2 4 時間で約 AT 活性値は 142%に上昇し、3 日目には元に復した。そのため、AT は週 3 回投与とした。AT 投与群において血清 A S T および A L T は有意に低下し、血清 IL-6 および TNF-a も有意に低下した。

#### 考察

過去の報告では、AT は好中球の活性化を抑制し抗炎症作用を有する事が報告されている。本実験においても、DEN と CCl<sub>4</sub> による急性肝障害モデル（1 0 週での犠牲死）では、AT 低値マウスは wild type に比較し、肝障害、肝細胞死、炎症が増長され、AT の投与によりその肝障害、炎症が軽減された事より、AT は抗炎症作用を有するものと考えられた。また DEN と CCl<sub>4</sub> の長期投与による肝腫瘍モデルでは、AT 低値のマウスにおいて、肝腫瘍の発症・進展が促進され、さらに好中球の浸潤が亢進していた。また肝内 8-OHdG も増加しており、AT 低値のマウスでは、慢性炎症が誘発する酸化ストレスにより DNA 損傷が増幅し、肝腫瘍の発症および進展が促進されたものと考えられた。しかしながら、AT の抗腫瘍作用に関する詳細な機序に関して不明であり、in vitro の実験を含んだ今後の研究が待たれる。また本実験での肝腫瘍モデルにおいて発症した肝腫瘍の多くは肝腺腫のため、肝細胞癌発症モデルでの検討が必要であり、さらに AT の投与により肝腫瘍の発症・進展が抑制されるか否かも検討が必要であると考えられた。

#### 結語

内因性 AT 活性の低下は、化学誘発肝障害を増長させ、AT の投与により肝障害が軽減できる事が示唆された。さらに内因性 AT 活性低下は、化学誘発肝腫瘍の進展を増長させる可能性がある事が示唆された。