

2) GPC3 特異的ヒト CTL によるヒト HCC に対する抗腫瘍効果のマウスモデルにおける検証

日本人の HLA-クラス I 対立遺伝子のうち、HLA-A24(A*2402)は日本人の約 60%が所有し、HLA-A2(A*0201)は約 20%が所有する、ありふれた対立遺伝子である。そこで昨年度の研究により、同定した HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド A2-3;GPC3₁₄₄₋₁₅₂ と、結合ペプチドの構造モチーフが HLA-A24 のそれとほぼ同一である、H-2K^d に拘束性を示す CTL エピトープペプチド K^d-8:GPC3₂₉₈₋₃₀₆ を用いて、HLA-A2 または HLA-A24 陽性の HCC 患者の末梢血単核細胞(PBMC)から、ペプチド特異的 CTL を誘導した。まず患者 PBMC から CD14 陽性単球を分離して、これを GM-CSF で刺激して DC を分化誘導した。この DC に GPC3 ペプチドを負荷した後に、患者 PBMC 由来の CD8⁺T 細胞を IL-2 存在下に共培養し、GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導した。

さらに、NOD/SCID マウスに HLA-A2 および-A24 を共に発現し、ヒト GPC3 遺伝子を強制発現させたヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下移植して生着させた後に、HCC 患者より誘導した HLA-A2 あるいは HLA-A24 拘束性で GPC3 特異性を示す、複数のヒト CTL 株を混合した後に静脈注射により養子免疫した。その後、腫瘍の大きさを経時的に測定して、抗腫瘍効果を観察した。

3) 抗原特異的にヒト T 細胞を活性化するヒト ES-DC 細胞ワクチンの開発

本研究は、京都大学再生医学研究所において樹立されたヒト ES 細胞株 (KhES-1 および KhES-3) を用いて行った。ヒト ES 細胞の血球細胞系への分化誘導には、これまでのマウスおよびカニクイザルの ES 細胞を用いた研究の経験を生かして、以下のようなフィーダー細胞共培養法を採用した。

まず、未分化状態のヒト ES 細胞をマイトマイシン C 処理を行った OP9 フィーダー細胞上へ播種し、3 日に一度培養液を交換しつつ 14-18 日間培養を継続した。その後、出現する非付着性の細胞を、新たに調整した OP9 フィーダー細胞上へ播種し、GM-CSF と M-CSF を添加した。7-10 日間の培養を継続することにより、浮遊性あるいは弱付着性の球形の細胞が出現し、徐々にその数が増加した。さらに浮遊細胞をピペッティングにより回収し、GM-CSF と IL-4 を含む培養液に浮遊させて細菌培養用のディッシュへ播種し

た。2-4 日間培養すると、浮遊細胞の形態は球形から突起を有する不規則な形態へと徐々に変化するが、その後に ES-DC の成熟誘導因子として TNF- α と LPS を加えた。

ヒト ES 細胞に発現する HLA-DR53 分子に効率良く GAD65 抗原ペプチドを提示させるために、ヒト・インバリアント鎖の CLIP 領域を GAD65 ペプチドに置換したキメラ分子をコードする遺伝子を作製し、ES 細胞に導入して発現させた。作製した遺伝子改変ヒト ES 細胞より、上記の方法を用いて ES-DC を分化誘導した。ES-DC の T 細胞への抗原提示機能については、上記の遺伝子改変ヒト ES-DC を、I 型糖尿病患者由来の GAD65 ペプチド特異的 HLA-DR53 拘束性 CD4⁺T 細胞クローンと共培養し、その後の T 細胞増殖反応の誘導を観察することにより検討した。

[倫理面への配慮]

本研究において、ヒト検体を利用した研究を行う際には、事前に研究内容と被験者への倫理的配慮について記載した研究計画書を熊本大学倫理委員会に提出し、その承認を得た。その後、被験者個人のプライバシーの保護、検体提供の任意性、検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度などについて、被験者あるいは、その代諾者に十分に説明した上で、文書による同意を得た上で研究を実施した。マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

またヒト ES 細胞使用研究の遂行にあたっては、熊本大学倫理委員会および文部科学省ヒト ES 細胞倫理委員会から、ヒト ES 細胞を使用した研究計画書を申請し承認を得た。さらに、文部科学省のヒト ES 細胞指針および熊本大学の倫理規定を遵守しつつ、熊本大学倫理委員会ヒト ES 細胞分科会の監視のもとに、承認された使用計画書に沿って研究を行なった。

C. 研究結果

1) 血清 GPC3 測定用 ELISA キットの検定

バイオモザイク社の GPC3 ELISA キットを用いて、組み換えヒト GPC3 の段階希釈液を測定したところ、数 10 pg/ml ~ 4 μ g/ml の範囲において計測の直線性が得られ、その信頼性が示された。そこで、新たに 67 名の HCC 患者血清について GPC3 濃度を測定したところ、14 名 (20.9%) が健

康対照群と比較して有意に高値を示した。

2) GPC3 特異的ヒト CTL によるヒト HCC に対する抗腫瘍効果のマウスモデルにおける検証

A2-3;GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを用いて HLA-A2 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 8 名中 5 名の PBMC より、また、K^d-8;GPC3₂₉₈₋₃₀₆ ペプチドを用いて HLA-A24 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 6 名中 4 人の PBMC より、各 CTL エピトープに特異的な CTL を誘導できた。これら複数の GPC3 ペプチド特異的ヒト CTL 株を静脈内に投与した NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは生理食塩水のみを投与したマウス群と比較して有意差をもって、皮下移植された GPC3 発現ヒト HCC 細胞株の増殖が抑制された。

3) 抗原特異的にヒト T 細胞を活性化するヒト ES-DC 細胞ワクチンの開発

我々が開発した培養法により、ヒト ES 細胞より樹状細胞としての形態、細胞表面分子 (CD80、CD86、CD40、HLA-DR)、およびアロ T 細胞への一次 MLR 刺激活性と、CD4⁺T 細胞クローンへの蛋白質ならびにペプチド抗原の提示機能を有する ES-DC を分化誘導できた。さらに、ES 細胞の段階で抗原遺伝子を導入することにより、抗原を自ら発現するヒト ES-DC を樹立できた。このような遺伝子改変 ES-DC を、抗原特異的 HLA-DR 拘束性ヒト CD4⁺T 細胞クローンと共培養することにより、T 細胞に増殖応答を誘導することができた。

D. 考察

HCC 患者やウイルス性肝炎・肝硬変患者などの HCC 発症ハイリスク群における、HCC 発生の早期診断、治療効果の判定、ならびに治療後の HCC 再発の早期発見に際して、血清 GPC3 測定の有用性を確立するためには多数の患者を対象とした大規模研究の実施が重要である。これに際しては、信頼性の高い血清 GPC3 測定キットを確立する必要がある。しかし、我々の努力にも拘わらず、GPC3 の ELISA による測定に適した単クローン抗体を作製することはできなかった。その理由として、GPC3 がヘパラン硫酸プロテオグリカンに属する糖鎖修飾が強い蛋白質であるために、特異的な抗体の作製が困難である可能性が示唆される。いずれにしても、今回使用したバイオ

モザイク社の GPC3-ELISA キットは測定の信頼性が高く、今後ともこのキットを利用して、HCC の腫瘍マーカーとしての血清 GPC3 測定の意義について、大規模な研究を推進する予定である。

昨年度は、BALB/c マウスを用いて GPC3 ペプチドワクチンを用いた癌免疫療法の有用性を証明した。今年度は臨床試験を目指して、HCC 患者の PBMC から誘導した GPC3 特異的 CTL の抗腫瘍効果を、免疫不全マウスの *in vivo* において検討した。NOD/SCID マウスは獲得免疫系を担う T 細胞および B 細胞を欠き、さらに自然免疫系の NK 細胞の活性が弱いため、ヒトの CTL や腫瘍細胞を拒絶することなく受け入れる性質を持つので、これを利用して前臨床試験の最後の課題である *in vivo* 腫瘍免疫実験を実施した。

CTL は HLA クラス I 分子に結合した形で腫瘍抗原ペプチドを認識して、癌細胞を特異的に破壊する性質がある。しかし、人類集団中には数百種類に及ぶ HLA クラス I 分子の多型が存在し、HLA クラス I 分子の型が異なれば、これに結合する抗原ペプチドのアミノ酸配列も異なってくる事が知られている。つまり、癌免疫療法に利用する癌抗原ペプチドは、癌患者が所有する HLA クラス I 分子の種類に合わせて、オーダーメイドで作製する必要がある。そこで、我々は日本人集団で高頻度に観察される、ごくありふれた HLA クラス I 分子である、HLA-A2 (A*0201) と HLA-A24 (A*2402) を標的として選んだ。日本人の 80% は、これらの HLA クラス I 分子のうちの、少なくとも一つを所有しているからである。その結果、当該 HLA を有する HCC 患者の約 50% において、該当する HLA により提示される GPC3 ペプチドで CD8+CTL を刺激することにより、ペプチド特異的な CTL が誘導できたため、これらの GPC3 ペプチドは HCC の免疫療法に利用可能であると考えた。なお、同時に HCC 組織における GPC3 と HLA クラス I 分子の発現状況を免疫組織化学的に解析したところ、いずれも約 80% の症例で発現が観察されたことも GPC3 免疫療法の有用性を支持するものと考えられる。

一方、約 50% の HCC 患者からは、GPC3 特異的 CTL が誘導できなかったが、このような患者にも GPC3 ペプチドを適当なアジュバントと共に能動免疫することにより、GPC3 特異的 CTL が誘導される可能性が十分に考えられる。また、昨年度の研究成果により、HLA-A2 Tgm に HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチドを免疫しても有害事象が観察

されなかったこと、ならびに今年度の成果として NOD/SCID マウスの *in vivo* において、GPC3 特異的ヒト CTL がヒト HCC の増殖を抑制できたことは、GPC3 免疫療法の安全性と有効性を支持するものである。

以上の前臨床試験の成果を踏まえた上で、現在、国立癌センター東病院にて、木下主任研究者、古瀬分担研究者および中面分担研究者らにより、HLA-A2 あるいは-A24 陽性の HCC 患者を対象にして、これらの GPC3 ペプチドを用いた癌免疫療法の臨床第 1 相試験が実施されている。本臨床試験により本療法の安全性が確認された後に、HCC 患者の治療後の再発予防、HCC 発癌リスクが高い慢性肝炎および肝硬変患者を対象とした、有効な HCC の予防ならびに治療法が開発されることが期待される。

モデル抗原の遺伝子を発現させたヒト ES 細胞から、当該抗原に特異的なヒト CD4⁺T 細胞に抗原提示機能を有する、樹状細胞の分化誘導が可能であることを示した。これまでのマウスを用いた ES-DC の *in vivo* 投与による免疫制御の研究結果と合わせ、本研究により、ヒト ES-DC による抗原特異的な T 細胞性免疫応答を誘導する方法の臨床応用に向けて、一歩前進したものと考えている。今後の実用化への課題として、技術的には、アロ反応の問題の解決と GMP 対応の培養技術の開発が求められる。また、ES 細胞由来の分化細胞のヒトへの投与について、倫理的な観点からの議論を行う必要があると考えられる。

E. 結論

バイオモザイク社の血清 GPC3 測定用 ELISA キットの信頼性が確認され、今後の多数検体測定の目処が付いた。昨年同定した HLA-A2 (A*0201) および-A24 (A* 2402) 拘束性 CTL エピトープペプチドを用いて、当該 HLA 陽性 HCC 患者から樹立した複数の CTL 細胞株を、ヒト HCC 細胞株を皮下移植した NOD/SCID マウスの静脈内に投与することにより、*in vivo* において腫瘍の増殖を抑制できることを証明し、その臨床応用の可能性を示した。さらに、抗原遺伝子を導入したヒト ES 細胞から誘導した ES-DC が、抗原特異的ヒト CD4⁺T 細胞を活性化できることを示し、その腫瘍免疫誘導細胞ワクチンへの応用の可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., Uemura, Y., Hirata, S., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Shimomura, M., Haruta M., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furuya, M., Nakatsuji, N., and Nishimura, Y. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Submitted.*
- 2) Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Beppu, T., Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H. and Nishimura, Y. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12: 2689-2697, 2006.
- 3) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and Nishimura, Y. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Research.* 66: 2414-2422, 2006.
- 4) Hosaka, S., Nakatsura, T., Tsukamoto, H., Hatayama, T., Baba, H., and Nishimura, Y. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces the apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Science.* 97: 623-632, 2006.
- 5) Yokomine, K., Nakatsura, T., Minohara, M., Kira, J-I., Kubo, T., Sasaki, Y., and Nishimura, Y. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 343: 269-278, 2006.
- 6) 小森宏之、中面哲也、別府透、西村泰治、馬場秀夫 Glypican-3 (GPC3) を標的とした免疫療法の有用性の検討 癌と化学療法 33(12) : 1742-1744 癌と化学療法社 (東京) 2006 年
- 7) 影下登志郎、福島聡、尹浩信、西村泰治、中面哲也 悪性黒色腫の新しい血清マーカー glypican-3 と SPARC 臨床皮膚科 60(5) 増刊号 : 169-172 医学書院 (東京) 2006 年

- 8) 小森宏之、中面哲也、本村 裕、別府 透、石河隆敏、馬場秀夫、西村泰治 新規がん胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした肝細胞がんの免疫療法分子細胞治療 6(2) : 57-61 先端医学社 (東京) 2007 年
- 9) 小森宏之、中面哲也、本村 裕、別府 透、西村泰治、馬場秀夫 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした癌ワクチン療法 Biotherapy 21(1) : 62-68 癌と科学療法社 (東京) 2007 年

2. 学会発表

- 1) Senju, S., Suemori, H., Hirata, S., Matsuyoshi, H., Uemura, Y., Fukuma, D., Shimomura, M., Chen Yu-Zhen, Furuya, M., Nakatsuji, N., Nishimura, Y. Generation of immune-competent dendritic cells from human embryonic stem cells. 第36回日本免疫学会総会・学術総会 (大阪) 2006年12月11日～13日
- 2) Nishimura, Y. Usefulness of a Novel Oncofetal Antigen Glypican-3 for Diagnosis and Immunotherapy of Cancers. The 3rd China-Japan Cooperative Life Science Symposium in Kumamoto (Kumamoto), Oct.24, 2006.
- 3) 千住 覚、栗崎朱里、平田真哉、福間大喜、松吉秀武、下村真菜美、西村泰治 腫瘍抗原特異的ヘルパーT細胞の活性化を目的としたインバリアント (Ii) 鎖融合抗原提示ベクターの開発 第65回日本癌学会学術総会 (横浜) 2006年9月28日～30日
- 4) 本村 裕、生田義明、小森宏之、下村真菜美、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭、馬場秀夫、西村泰治、江角浩安、中面哲也 肝細胞がんに対するGlypican-3由来ペプチドワクチンを用いた臨床試験のプロトコール作成のためのマウスでの前臨床試験 第65回日本癌学会学術総会 (横浜) 2006年9月28日～30日
- 5) 西村泰治、消化器系癌の診断と治療に有用な新規癌特異抗原 第2回熊本分子消化器病学会 (熊本) 2006年6月9日 (招待)
- 6) 西村泰治、小森宏之、Chen Yu-Zhen、横峰和典、Gang Liu、中面哲也、松井政則、中瀧直己、千住 覚 遺伝子操作マウスを利用したT細胞活性化ワクチンの開発 日本人類遺伝学会第51回大会 (シンポジウム2) (米子) 2006年10月17日～20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度研究によるものはない。

[謝辞]

本研究の遂行に際しては、熊本大学医学薬学研究部・免疫識別学分野の平田真哉助手、ならびに大学院学生である小森宏之、生田義明、福間大喜、横峰和典、福島 聡君らの協力を得た。また臨床検体の提供に際しては、熊本大学医学薬学研究部・消化器内科学分野の佐々木 裕教授、ならびに葦原 浩医員の御協力を得たものであり、ここに深謝いたします。

酸化ストレスによる細胞応答の分子基盤の解明

分担研究者 佐々木 裕 熊本大学大学院医学薬学研究部 消化器内科学分野（教授）

研究要旨

内因性あるいは外因性に発生する活性酸素種 (ROS) が消去系を凌駕すると酸化ストレスとなり、さまざまな細胞応答を惹起する。その分子基盤を明らかにするために、肝癌細胞株を対象に酸化ストレスである過酸化水素 (H₂O₂) 刺激下に遺伝子発現、蛋白質発現の網羅的解析を行った。細胞株は H₂O₂ 刺激によりアポトーシスに陥った。Gene Chip を用いた遺伝子発現の網羅的解析では、刺激後早期の 1 時間、3 時間で 1.5 倍以上の発現亢進を認めた遺伝子はそれぞれ約 150 個、約 520 個であった。それらの中にはアポトーシス関連遺伝子、細胞内情報伝達関連遺伝子、転写関連遺伝子などが含まれていた。一方、刺激前後で cell lysate を調整して 2 次元ダイファレンシャル電気泳動にて蛋白質発現あるいはリン酸化の変化を評価した。リン酸化蛋白質の発現量の変化は約 40-180% であり、質量分析器にてこれらリン酸化蛋白質が主に細胞骨格や分子シャペロンに関与する蛋白質であることが判明した。これらの結果を統合した Key Molnet による pathway 解析から、酸化ストレス刺激後早期から転写や細胞接着に関連する分子群が誘導され、細胞応答としてのアポトーシスを誘導することが示唆された。

A. 研究目的

生体内ではミトコンドリアやミクロソームにおいて、内因性の活性酸素種 (ROS) が発生している。また外因性刺激である炎症性サイトカイン、アルコール、薬剤なども細胞内に ROS を産生する。このような ROS が増加し細胞内の消去系を凌駕すると酸化ストレスとなり、さまざまな細胞応答を惹起する。しかしながら、酸化ストレスによる細胞応答の分子基盤の詳細は不明である。今回は、遺伝子発現や蛋白質発現の網羅的解析から酸化ストレスに対する細胞応答の分子基盤を解析した。

B. 研究方法

肝細胞癌株 (HepG2, Huh7) を用い、酸化ストレスとして過酸化水素にて刺激し、細胞内 caspase 活性を測定すると共に、FACS を用いて細胞死を評価した。次に刺激前後で RNA を抽出した上で cDNA を作製し、Gene Chip (Human genome U133 Plus 2.0 Array) を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。一方、刺激前後で cell lysate を調整し、多重蛍光色素標識法 (Cy3/5) を用いた

2 次元ダイファレンシャル電気泳動を行った。さらに蛋白質検出を高感度に行うために SYPRO Ruby を、リン酸化を検討するために ProQ Diamond を使用して特殊染色を施行し、刺激前後での蛋白質発現あるいはリン酸化の変化を評価した。さらに蛋白質スポットを切り出し質量分析器 (MS/MS) にてリン酸化蛋白質を同定した。最終的には情報統合プラットフォームを用いて、遺伝子発現解析と蛋白質発現解析の結果を統合することで、酸化ストレスによる細胞応答を担う分子群の絞込みを行った。

C. 研究結果

アポトーシス実行分子である Caspase 群の活性化と FACSscan の結果から、過酸化水素刺激により誘導された細胞死はアポトーシスであることが確認された。2 種類の細胞株にて比較すると、HepG2 が Huh7 に比べて細胞死には“より抵抗性”を示した。HepG2 を用いた遺伝子発現解析では、刺激後早期の 1 時間で 1.5 倍以上の発現亢進を認めた遺伝子は約 150 個、3 時間では約 520 個であった。それらの中で、アポトーシス関連遺伝子では刺激後 1 時間で 8 遺伝子、3 時間後で 14

遺伝子の発現が亢進していた。細胞内情報伝達関連ではそれぞれ 19 遺伝子、35 遺伝子、転写関連ではそれぞれ 14 遺伝子、39 遺伝子の発現亢進が認められた。この中には GPC-3 の発現を調節する転写因子 AP-1 も含まれていた。一方、刺激後 1 時間で非刺激を対象としてダイファレンシャル蛋白質発現解析を行った。磷酸化を示す ProQ Diamond 陽性スポットは全部で 27 個であり、これら蛋白質の刺激前後での発現量の変化は 38-177%であった。27 個の磷酸化スポットを同定した結果、主に細胞骨格や分子シャペロンに関与する蛋白であった。これらの結果を統合して Key Molnet による pathway 解析を行った。その結果、酸化ストレス刺激後早期から、転写や細胞接着に関連する分子群が誘導されアポトーシスを惹起することが明らかとなった。

D. 考察、E. 結論

酸化ストレスによる細胞死の分子機構を担う候補責任分子群やその pathway が絞り込まれた。細胞死の誘導は同一刺激であっても細胞株により異なっており、責任分子群やその pathway に普遍性と特異性が存在することが示唆された。今後、siRNA などを用いて候補責任分子の機能を制御することで、責任分子の同定と重み付けを行う予定である。一方、抗がん剤の効果発現には癌細胞内での酸化ストレスの発生が関与することが報告されていることから、上述の責任分子が抗がん剤の効果発現を規定している可能性がある。本研究の成果は、責任分子の機能制御を介して抗がん剤の効果を増強するという新たな治療戦略に発展するものと期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokomine, K., Nakatsura, T., Monohara, M., Kira, J., Kubo, T., Sasaki, Y., Nishimura, Y. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343: 269-278, 2006.
- 2) Goto, H., Oda, Y., Murakami, Y., Tanaka, T., Hasuda, K., Goto, S., Sasaki, Y., Sakisaka, S., Hattori, M. Proportion of de novo cancers among colorectal cancers in Japan. *Gastroenterology.* 131: 40-46, 2006.

- 3) Sasaki, Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *J Gastroenterol.* 41: 1135-1148, 2006.
- 4) 長岡克弥、佐々木 裕 特集 肝癌の診療 -最新の進歩- 肝細胞癌における遺伝子異常 臨床消化器内科 増刊号 21 : 73-81 2006 年
- 5) 佐々木 裕 「別冊 医学のあゆみ 酸化ストレス -フリーラジカル医学生物学の最前線 -」 吉川敏一 編、消化器疾患 NASH と酸化ストレス (分担) pp294-298 医歯薬出版 (東京) 2006 年
- 6) 佐々木 裕 「別冊 医学のあゆみ 消化器疾患 Ver.3」 - state of arts II. 肝・胆・膵 - 竹井謙之、川崎誠治 編、肝障害とその機序 酸化ストレスと肝疾患 (分担) pp76-80 医歯薬出版 (東京) 2006 年

2. 学会発表

- 1) 永濱裕康、葦原浩、佐々木 裕 酸化ストレスによりミトコンドリアを介して誘導される肝細胞死の新たな評価法 第 92 回日本消化器病学会総会 (シンポジウム 1) 「消化器疾患における酸化ストレスの関与と counterstrategy」 (北九州) 2006 年 4 月 20 日
- 2) 永濱裕康、星田陽明、佐々木 裕 酸化ストレスによる肝細胞障害の分子機構の解明どのように肝細胞死を修飾するか? 第 10 回日本肝臓学会大会 (ワークショップ 14) 「トランスクリプトーム・プロテオーム解析の肝疾患への応用」 (札幌) 2006 年 10 月 12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度研究によるものはない。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
主任研究者 木下 平					
Gotohda, N., <u>Kinoshita, T.</u> , Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Furuse, J., et al.	New Indication for Reduction Surgery in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma with Major Vascular Involvement.	World Journal of Surgery.	30(3)	431-438	2006
Gotohda, N., Iwasaki, H., Ozeki, M., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Yagi, T., <u>Kinoshita, T.</u> , et al.	The Role of a Protease Inhibitor against Hepatectomy.	Hepato- gastroenterology.	53	115-119	2006
Gotohda, N., Ishii, H., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Furuse, J., Yoshino, M., and <u>Kinoshita, T.</u>	Selection Criteria for Reduction Hepatectomy in Multiple Advanced Hepatocellular Carcinoma.	Anticancer Research.	26	4671-4674	2006
後藤田直人、小西 大、中郡 聡夫、高橋進一郎、 <u>木下 平</u>	バリエーション解析からみた肝切除 クリニカルパスの適応	日本消化器外科学 会雑誌	39(1)	9-15	2006
中郡聡夫、 <u>木下 平</u> 、小西 大、 高橋進一郎、後藤田直人	膵癌・胆道癌の診断と治療 肝内胆管癌の手術	日本臨牀	64(1)	469-475	2006
分担研究者 古瀬 純司					
Ueno, H., Sato, T., Yamamoto, S., Tanaka, K., Ohkawa, S., Takagi, H., Yokosuka, O., <u>Furuse, J.</u> , Saito, H., Sawaki, A., Kasugai, H., Osaki, Y., Fujiyama, S., Sato, K., Wakabayashi, K., Okusaka, T.	Randomized, double-blind, placebo -controlled trial of bovine lactoferrin in patients with chronic hepatitis C.	Cancer Sci.	97	1105-1110	2006
Gotohda, N., Kinoshita, T., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., <u>Furuse, J.</u> , Ishii, H., Yoshino, M.	New indication for reduction surgery in patients with advanced hepatocellular carcinoma with major vascular involvement.	World J Surg.	30	431-438	2006
Gotohda, N., Ishii, H., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., <u>Furuse, J.</u> , Yoshino, M., Kinoshita, T.	Selection criteria for reduction hepatectomy in multiple advanced hepatocellular carcinoma.	Anticancer Res.	26	4671-4674	2006
<u>古瀬純司</u> 、鈴木英一郎、仲地 耕平、清水怜、石井浩、吉野 正曠	肝内胆管癌の化学療法(動注を含 む)	肝胆膵	53	1001-1007	2006

分担研究者 中面 哲也						
Komori, H., <u>Nakatsura, T.</u> , Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Beppu, T., Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H., Nishimura, Y.	Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma.	Clin. Cancer Res.	12	2689-2697	2006	
Motomura, Y., Senju, S., <u>Nakatsura, T.</u> , Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and Nishimura, Y.	Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10.	Cancer Research.	66	2414-2422	2006	
Hosaka, S., <u>Nakatsura, T.</u> , Tsukamoto, H., Hatayama, T., Baba, H., and Nishimura, Y.	Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces the apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo.	Cancer Science.	97	623-632	2006	
Yokomine, K., <u>Nakatsura, T.</u> , Minohara, M., Kira, J-I., Kubo, T., Sasaki, Y., and Nishimura, Y.	Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	343	269-278	2006	
影下登志郎、福島聡、尹浩信、西村泰治、 <u>中面哲也</u>	悪性黒色腫の新しい血清マーカー—glypican-3 と SPARC	臨床皮膚科増刊号	60(5)	169-172	2006	
小森宏之、 <u>中面哲也</u> 、別府透、西村泰治、馬場秀夫	Glypican-3(GPC3)を標的とした免疫療法の有用性の検討	癌と化学療法	33(12)	1742-1744	2006	
小森宏之、 <u>中面哲也</u> 、本村裕、別府透、西村泰治、馬場秀夫	癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした癌ワクチン療法	Biotherapy	21(1)	62-68	2007	
小森宏之、 <u>中面哲也</u> 、本村裕、別府透、石河隆敏、馬場秀夫、西村泰治	新規がん胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした肝細胞がんの免疫療法	分子細胞治療	6(2)	57-61	2007	
分担研究者 千住 覚、 研究協力者 西村 泰治						
<u>Senju, S.</u> , Suemori, H., Zembutsu, H., Uemura, Y., Hirata, S., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Shimomura, M., Haruta M., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furuya, M., <u>Nakatsuji, N.</u> , <u>Nishimura, Y.</u>	Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function.	Submitted.				
Komori, H., Nakatsura, T., <u>Senju, S.</u> , Ikuta, Y., Yokomine, K., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Beppu, T., Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H., <u>Nishimura, Y.</u>	Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma.	Clin. Cancer Res.	12	2689-2697	2006	

Motomura, Y., <u>Senju, S.</u> , Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and <u>Nishimura, Y.</u>	Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10.	Cancer Research.	66	2414-2422	2006
Hosaka, S., Nakatsura, T., Tsukamoto, H., Hatayama, T., Baba, H., and <u>Nishimura, Y.</u>	Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces the apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo.	Cancer Science.	97	623-632	2006
Yokomine, K., Nakatsura, T., Minohara, M., Kira, J-I., Kubo, T., Sasaki, Y., and <u>Nishimura, Y.</u>	Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	343	269-278	2006
小森宏之、中面哲也、別府透、 <u>西村泰治</u> 、馬場秀夫	Glypican-3(GPC3)を標的とした免疫療法の有用性の検討	癌と化学療法	33(12)	1742-1744	2006
影下登志郎、福島聡、尹浩信、 <u>西村泰治</u> 、中面哲也	悪性黒色腫の新しい血清マーカー-glypican-3 と SPARC	臨床皮膚科増刊号	60(5)	169-172	2006
小森宏之、中面哲也、本村裕、別府透、 <u>西村泰治</u> 、馬場秀夫	癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした癌ワクチン療法	Biotherapy	21(1)	62-68	2007
小森宏之、中面哲也、本村裕、別府透、石河隆敏、馬場秀夫、 <u>西村泰治</u>	新規がん胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした肝細胞がんの免疫療法	分子細胞治療	6(2)	57-61	2007
分担研究者 佐々木 裕					
Yokomine, K., Nakatsura, T., Monohara, M., Kira, J., Kubo, T., <u>Sasaki, Y.</u> , Nishimura, Y.	Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	343	269-278	2006
Goto, H., Oda, Y., Murakami, Y., Tanaka, T., Hasuda, K., Goto, S., <u>Sasaki, Y.</u> , Sakisaka, S. and Hattori, M.	Proportion of de novo cancers among colorectal cancers in Japan.	Gastroenterology.	131	40-46	2006
<u>Sasaki, Y.</u>	Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma?	J Gastroenterol.	41	1135-1148	2006
長岡克弥、 <u>佐々木 裕</u>	肝臓の診療- 最新の進歩- 肝細胞癌における遺伝子異常	臨床消化器内科増刊号	21	73-81	2006

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	出版社名	出版年
		書籍名	出版地	ページ
佐々木 裕	消化器疾患 NASH と酸化ストレス	吉川敏一	医歯薬出版	2006
		別冊「医学のあゆみ 酸化ストレス」- フ リーラジカル医学生 物学の最前線 -	東京	pp294-298
佐々木 裕	肝障害とその機序酸化ストレ スと肝疾患	竹井謙之、 川崎誠治	医歯薬出版	2006
		別冊「医学のあゆみ 消化器疾患 Ver. 3」 - state of artsII. 肝・胆・膵-	東京	pp76-80

V. 研究成果の刊行物・別刷

主任研究者	木下	平
分担研究者	古瀬	純司
	中面	哲也
	千住	覚
	佐々木	裕
研究協力者	西村	泰治

The Role of a Protease Inhibitor against Hepatectomy

Naoto Gotohda¹, Hiromi Iwagaki², Michitaka Ozaki³, Masaru Konishi¹, Toshio Nakagohri¹, Shinichiro Takahashi¹, Takahito Yagi², Taira Kinoshita¹, Noriaki Tanaka²

¹Department of Surgery, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa;

²Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry Okayama; ³Department of Organ Transplantation and Regenerative Medicine

Hokkaido University Graduate School of Medicine, Faculty of Medicine, Sapporo, Japan

Corresponding Author: Naoto Gotohda, MD, Department of Surgery, National Cancer Center Hospital East 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan

Tel: +81 4 7133 1111, Fax: +81 4 7131 4724, E-mail: ngotohda@east.ncc.go.jp

ABSTRACT

Background/Aims: Nafamostat Mesilate (NM) is a synthetic serine protease inhibitor that is capable of inhibiting the various coagulation factors. To determine whether NM may also be useful in attenuating operative invasiveness, we investigated the effects of perioperative administration of NM on postoperative serum levels of proinflammatory cytokine IL-6 and hepatocyte growth factor (HGF).

Methodology: Thirty patients undergoing hepatectomy with hepatocellular carcinoma, biliary carcinoma and metastatic colorectal cancer were enrolled in this study. These patients were separated into two groups; high invasive group (resected liver volume: 1000cm³ <) and less invasive group (resected liver volume: 1000cm³ >). The high invasive group of 11 patients received perioperative administration of NM (Group NM), while the less invasive group of 19 patients did not (Group C). Serum levels of IL-6, HGF and soluble IL-6 receptor (sIL-6R) were simultaneously measured on preoperative and postoperative day ('day 0', 'day 7').

Results: Serum IL-6 levels on day 0 were significantly elevated and returned to preoperative levels on day 7 in both groups, and the serum IL-6 level in Group NM on day 0 was significantly lower than that in Group C on day 0. Serum HGF levels on day 0 and day 7 were significantly higher in Group NM than those in Group C. Compared with healthy control subjects, the higher serum level of HGF on the preoperative day in all patients was attributable to tumor-burden. The sIL-6R levels on day 0 decreased in both groups, and their levels in Group NM were significantly lower than those in Group C, suggesting that increased synthesis of IL-6/sIL-6R complex which could accelerate liver regeneration.

Conclusions: These results suggested that perioperative administration of NM may attenuate surgical stress by decreasing production of proinflammatory cytokine IL-6, and may accelerate liver regeneration through stimulation with the IL-6/sIL-6R complex and possible involvement of increased production of HGF.

KEY WORDS:

Protease inhibitor; Nafamostat mesilate; Hepatectomy; Interleukin-6; soluble Interleukin-6 receptor; Hepatocyte growth factor

ABBREVIATIONS:

Nafamostat Mesilate (NM); Hepatocyte Growth Factor (HGF); Soluble Interleukin-6 Receptor (sIL-6R); Hepatocellular Carcinoma (HCC); C-Reactive Protein (CRP)

INTRODUCTION

Nafamostat mesilate (6-amino-2-naphthyl p-guanidinobenzoate dimethansulfonate, NM) is a synthetic protease inhibitor generated during the coagulation cascade as well as in the inflammatory process (1,2). NM inhibits coagulation factors such as factor VIIa and thrombin (3), and has been found to be effective in treating animals with induced sepsis (4,5). Moreover, regarding its anticoagulant effects, recent reports demonstrated that NM had inhibitory effects on the production of polymorphonuclear leukocyte elastase and Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 in human monocytes (6,7).

In liver, IL-6 is secreted by non-parenchymal cells such as Kupffer cells. Secreted IL-6 acts on neighboring hepatocytes to stimulate liver regeneration and repair (8). It also acts on cells by binding the soluble IL-6 receptor (sIL-6R), either in its membrane-bound or soluble form. And this IL-6/sIL-6R complex binds and

induces liver regeneration and hepatoprotection (9).

To determine whether NM may also be useful in attenuating surgical stress and has a hepatoprotective effect or stimulates liver regeneration, we investigated the effects of perioperative administration of NM on postoperative serum levels of proinflammatory cytokine against hepatectomy.

METHODOLOGY

Thirty consecutive patients undergoing hepatectomy with hepatocellular carcinoma (HCC), biliary tract carcinoma and metastatic colorectal cancer were enrolled in this study.

All liver resections were performed under conditions of continuous hepatic pedicle occlusion. Hepatic parenchymal transection was performed with clamp crushing methods. Liver resections were included in 9 major hepatectomies (2 ≤ segment), 11 minor hepatectomies (1 ≥ segment) and 10 partial resections.

These patients were separated into two groups; high invasive group (resected liver volume: $1000\text{cm}^3 <$) and less invasive group (resected liver volume: $1000\text{cm}^3 >$). The high invasive group of 11 patients received perioperative administration of NM (Group NM), while the less invasive group of 19 patients did not (Group C). In group NM, NM was continuously administered at a dosage of 0.1mg/kg/hr through a peripheral vein starting 30 minutes before the operation for 24 hours.

Eleven patients in group NM included 6 with HCC, 1 with biliary tract carcinoma and 4 with metastatic colorectal carcinoma. Nineteen patients in

group C included 13 with HCC, 3 with biliary tract carcinoma and 3 with metastatic colorectal carcinoma (Table 1). There were no significant differences in age and gender between groups.

In all patients peripheral blood samples were collected before operation ('preop'), immediately after operation ('day 0'), and on day 7 after operation ('day 7'). Plasma concentrations of IL-6 (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan), sIL-6R (R&D systems, Minneapolis, MN), hepatocyte growth factor (HGF, Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) were simultaneously measured on preoperative and postoperative day ('day 0' and 'day 7') using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. Moreover, the preoperative serum levels of HGF in all patients were compared with 109 healthy control subjects.

Percent recovery of liver size was calculated with resected liver mass and volumetric analysis by computed tomography of preoperative and postoperative (4 wk after hepatectomy) liver mass. A: [surgically resected liver volume] was considered as 'an expected liver mass of full recovery', and B: [resected liver mass - (preoperatively measured liver mass - postoperatively measured liver mass)] was considered as 'a real recovery of liver'. B divided by A provides recovery ratio of liver, which was expressed as percent recovery of liver.

Statistical Analysis

All data were expressed as means \pm SE. The Mann-Whitney's U test and the Chi-square test were used to analyze samples, respectively. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

General Comparison of Patients in Preoperative Liver Function, Surgical Stresses, Postoperative Liver Function and Liver Recovery Ratio

There was no significant difference between group C and group NM in preoperative liver function. All factors of surgical stress in group NM were significantly higher than those in group C (Table 2). The postoperative rise of C-reactive protein (CRP) and postoperative morbidity in group C was significantly lower than those in group NM. No significant differences were observed between the two groups in postoperative other liver function, mortality and hospitalization (Tables 2 and 3). In liver recovery ratio, there was no significant difference between both groups (Figure 1).

Comparison of Serum Levels IL-6 and sIL-6R between Group C and Group NM

Serum IL-6 levels on day 0 were significantly elevated and returned to preoperative levels on day 7 in both groups, and the serum IL-6 level in group NM on day 0 was significantly lower than that in group C on day 0. The sIL-6R levels on day 0 decreased in both groups, and their levels in group NM were significantly lower than those in group C (Table 4).

TABLE 1 Patient Profile

	Group C	Group NM	<i>P</i>
No. of patients	19	11	
Age (years)	68 \pm 1.8	68 \pm 2.5	*NS
Sex (M/F)	15/4	7/4	§NS
Viral Hepatitis	10	5	§NS
	(Type B: 1, Type C: 9)	(Type B: 4, Type C: 1)	§NS
Disease			
Hepatocellular carcinoma	13	6	
Biliary tract carcinoma	3	1	
Liver metastases of colorectal carcinoma	3	4	
Liver Resection			§ <i>P</i> =0.0021
Partial Resection	10	0	
Minor $1 \geq$ Segment	7	4	
Major $2 \leq$ Segment	2	7	

NM: Nafamostat Mesilate.

Values represent (mean \pm SE. NS: Not significant); *Statistical significance between groups was analyzed by Mann-Whitney's U test. §Statistical significance between groups was analyzed by Chi-square test.

TABLE 2 General Comparison of Patients in Preoperative, Surgical and Postoperative States

	Group C	Group NM	<i>P</i>
Preoperative liver function			
Alanine aminotransferase (ALT) (IU/dL)	68 \pm 16	50 \pm 10	*NS
Total bilirubin (T-Bil) (mg/dL)	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	*NS
Albumin (Alb) (g/dL)	3.7 \pm 0.1	3.8 \pm 0.1	*NS
Prothrombin time (PT) (%)	12 \pm 0.1	12 \pm 0.2	*NS
ICGR ₁₅ (%)	15 \pm 2.3	13 \pm 1.6	*NS
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	17 \pm 2.2	21 \pm 1.4	*NS
C-reactive protein (mg/dL)	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	*NS
Surgical stress			
Operative time (min)	200 \pm 32	370 \pm 49	*0.0055
Hepatic ischemic time (min)	52 \pm 6.0	98 \pm 15	*0.0034
Blood loss (mL)	880 \pm 190	3500 \pm 1300	*0.0133
Resected liver weight (g)	110 \pm 30	430 \pm 68	*0.0002
Resected liver volume (cm^3)	250 \pm 59	1400 \pm 83	* $<$ 0.0001
Postoperative liver function (day 7)			
Alanine aminotransferase (ALT) (IU/dL)	71 \pm 7.9	91 \pm 17	*NS
Total bilirubin (T-Bil) (mg/dL)	1.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.3	*NS
Albumin (Alb) (g/dL)	3.4 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1	*NS
Prothrombin time (PT) (%)	12 \pm 0.1	12 \pm 0.2	*NS
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	20 \pm 2.0	21 \pm 2.2	*NS
C-reactive protein (mg/dL)	3.2 \pm 0.6	7.4 \pm 1.5	*0.0059

Values represent (mean \pm SE. NS: Not significant), *Statistical significance between groups was analyzed by Mann-Whitney's U test.

Serum Level HGF in All Patients with Each Disease

In preoperative serum level of HGF, there was a significant difference between all patients enrolled in this study and healthy control subjects. All serum HGF levels on preop, day 0 and day 7 in group NM were higher than those in group C (Table 5).

DISCUSSION

A synthetic protease inhibitor has an inhibitory effect on various serine proteases such as trypsin, thrombin, activated factor X, kallikrein, neutrophil elastase, and activated complement components (1). Effects of synthetic protease inhibitors on microcirculatory and coagulation disorder and on organ failure such as septic ARDS have also been reported (10-14).

Recently, preoperative administration of protease inhibitor substantially ameliorated hepatocyte injury induced by ischemia and reperfusion in human patients when liver resection was performed under continuous inflow occlusion (15). Moreover, there were some reports that serine protease inhibitors may play an important role in liver regeneration (16,17).

These many studies using animal models have demonstrated that hepatically-derived cytokines are produced in the process of hepatic ischemia and reperfusion (18-21). IL-6 is a proinflammatory cytokine that mediates the acute-phase inflammatory response to tissue injury. The greater the surgical stresses, the higher the elevation of serum IL-6 (22-24). Although the precise role of IL-6 in hepatocyte injury remains to be clarified, at least excess production of IL-6 may be associated with adverse events after liver resection in humans because there were many reports that the over-production of plasma IL-6 is followed by major postoperative elevation of plasma transaminase activities after prolonged hepatic inflow occlusion (25-27). However, recent reports have demonstrated that HGF and IL-6 could promote hepatic survival by stimulating liver regeneration and providing hepatoprotection in a variety of liver injury models, including Fas-mediated injury, toxic damage caused by hepatotoxins (such as tetrachlorocarbonide), and ischemic liver injury (28-32). Particularly, IL-6 is a critical proregenerative factor and acute-phase inducer in the liver that also confers resistance to liver injury by hepatic toxins, ischemia, and Fas. Its effects are mediated almost exclusively on hepatocytes within the liver (33). Secreted IL-6 acts on neighboring hepatocytes in a paracrine fashion to stimulate liver regeneration and repair (8). IL-6 bound to the sIL-6R signals via gp130 and Janus kinase-1 (JAK-1), leading to activation of the Stat3 transcription factor and the MAPK signal transduction cascade (33,34). In this way, the IL-6 signal transduction pathway in liver injury and regeneration was clarified. Our results would also suggest that increased synthesis of IL-6/sIL-6R complex which could accelerate liver regeneration.

HGF could be produced in many organs or released from the extracellular matrix of the liver. HGF is a potent stimulator of DNA synthesis in hepa-

TABLE 3 General Comparison of Patients in Postoperative Outcomes

	Group C	Group NM	P
Postoperative mortality	1/19	0/11	§NS
Postoperative morbidity	1/19	4/11	§0.0288
Wound infection	1	1	
Pulmonary infarction	0	1	
Bile leakage	0	1	
Paralytic ileus	0	1	
Postoperative hospitalization (days)	15±3.9	20±4.6	§NS

Values represent (mean ± SE. NS: Not significant), *Statistical significance between groups was analyzed by Mann-Whitney's U test. §Statistical significance between groups was analyzed by Chi-square test.

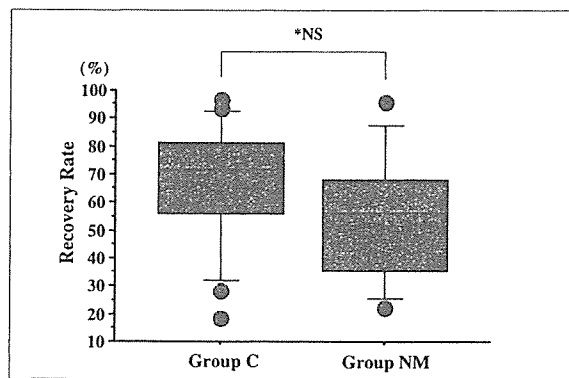


FIGURE 1 Percent recovery of liver size 4 weeks after hepatectomy. Percent recovery of liver size was calculated by volumetric analysis by resected liver volume, computed tomography of liver preoperatively and 4 wk after hepatectomy. *Statistical significance between groups was analyzed by Mann-Whitney's U test.

TABLE 4 Comparison of Serum Levels of IL-6, sIL-6R, HGF With/Without Nafamostat Mesilate

		Group C	Group NM	P
IL-6 (pg/mL)	Preop	4.3±1.2	3.0±0.7	NS
	Postop (day 0)	240±170	180±51	0.0454
	Postop (day 7)	23±6.1	49±15	NS
sIL-6R (pg/mL)	Preop	29000±2000	24000±1700	NS
	Postop (day 0)	26000±1500	17000±850	0.0007
	Postop (day 7)	28000±1800	24000±2100	NS

Values represent mean ± SE. Statistical significance between groups was analyzed by Mann-Whitney's U test.

toocytes and interacts with other growth factors. After partial hepatectomy, the increased tyrosine phosphorylation of c-MET/HGF-receptor is seen in the hepatocytes. The HGF/c-MET system is also involved in liver regeneration. There is increased synthesis of HGF by nonparenchymal cells after partial hepatectomy (35,36), and therefore, increased HGF production is expected on liver injury and has been described as stimulating liver regeneration factor. And its supportive roles in liver regeneration are expected in many clinical situations.

In the other hand, HGF may well be an important factor in tumor propagation and development of distant metastases because of its profound impact on cell proliferation and motility (37). And then, it has already been reported that HGF has been a useful

TABLE 5 Comparison of Serum Level of HGF in Preoperative Patients and Normal Control, Comparison of Serum Levels of HGF With/Without Nafamostat Mesilate in Postoperative Patients

HGF (pg/mL)	All patients (n=30)	Normal control (n=109)	P
Preop	445±61	293±5.2	0.0002
	Group C	Group NM	P
Postop (day 0)	500±80	900±390	NS
Postop (day 7)	460±44	640±80	0.0210

Values represent mean ± SE. Statistical significance between all patients and normal control was analyzed by Mann-Whitney's U test.

indicator for predicting the status of HCC, colorectal cancer and cholangiocellular carcinoma (36,38-42). Compared with group C, our results demonstrated that the serum level of HGF was higher in group NM. However, the preoperative serum level of HGF was high in group NM, and we wondered whether that result was reflected by the activity of cancer cell. We evaluated the difference between the serum levels of HGF in cancer patients and healthy control subjects. We found a significant difference between patients enrolled in this study and healthy control subjects, which was consistent with a previous report that the serum HGF concentration of patients with colorectal cancer was significantly higher than that in healthy normal control level of 174 ± 14 pg/mL as means ± SE (40). The HGF level in the healthy control in our study of 293 ± 5.2 pg/mL was higher than that in a previous report (40), which was attributable to ELISA kits used.

Excluding the role of the serum HGF concentration as predicting index of tumor propagation, we considered that the effect to liver regenerative rate was reflected by the serum levels of HGF on day 0 and day 7. In the serum levels of HGF on day 0 and day 7, the

level of HGF in group NM was higher than that in group C, we considered that these levels of HGF were increased because the synthesis of HGF was stimulated by the administration of NM. Shimomura *et al.* (43) also reported that blood-coagulation factor XIIa and HGF activator activated HGF, and the HGF-converting activity of the HGF activator was not prevented by the serine protease inhibitors. Though there were some reports that liver regeneration was influenced by the loss of liver volume by liver resection (44,45), these results might insinuate that the higher level of HGF, the better the liver regeneration. And then, protease inhibitor may have a good role in the liver regeneration.

The present study demonstrated that although no significant difference was observed between both groups in the liver regenerative rate, this result seemed to be affected by the high incidence of postoperative morbidity in group NM. Indeed, the postoperative CRP level was significantly higher in group NM in the present research. Weiss *et al.* (46) reported that the growth rate of hepatic regeneration was lower in fulminant sepsis than in mild sepsis. The postoperative morbidity is very susceptible to surgical stresses, all indicators of the surgical stress were higher in group NM than in group C. Despite the high incidence of postoperative morbidity and high surgical stresses in group NM, postoperative recovery rate of liver in group NM was equivalent to that of liver in group C. These results suggested that the perioperative administration of NM may attenuate surgical stress by decreasing production of proinflammatory cytokine IL-6, and may accelerate liver regeneration through increased production of HGF and stimulation with the IL-6/sIL-6R complex. It would be possible that much better liver regeneration is induced by the administration of NM if we could improve our surgical techniques and keep the lower incidence of postoperative morbidity in the liver surgery.

REFERENCES

- 1 Paques EP, Romisch J: Comparative study on the in vitro effectiveness of antithrombotic agents. *Thromb Res* 1991; 64:11-21.
- 2 Okajima K, Uchiba M, Murakami K: Nafamostat mesilate. *Cardiovasc Drug Rev* 1995; 13:51-65.
- 3 Uchiba M, Okajima K, Abe H, Okabe H, Takatsuki K: Effect of nafamostat mesilate, a synthetic protease inhibitor, on tissue factor-factor VIIa complex activity. *Thromb Res* 1994; 74:155-161.
- 4 Takahashi H, Takizawa S, Tatewaki W, Nagai K, Wada K, Hanano M, et al: Nafamostat mesilate (FUT-175) in the treatment of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1989; 62:372.
- 5 Yoshikawa T, Murakami M, Furukawa Y, Kato H, Takemura S, Kondo M: Effects of FUT-175, a new synthetic protease inhibitor on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats. *Hemostasis* 1983; 13:374-378.
- 6 Kikuchi M, Endo S, Inada K, Yamashita H, Takakuwa T, Nakae H, et al: Inhibitory effect of FUT-175 on the production of interleukin-8 and polymorphonuclear leukocyte elastase. *Res Comm Mole Path & Pharm* 1995; 87:269-274.
- 7 Sugita H, Ishiko T, Ikei S, Hirota M, Ogawa M: FUT-175 inhibits the production of IL-6 and IL-8 in human monocytes. *Res Comm Mole Path & Pharm* 1999; 103:57-64.
- 8 Zimmers TA, Mckillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG: Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* 2003; 38:326-334.
- 9 Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R: STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-2488.
- 10 Shimada M, Matsumata T, Shirabe K, Kamakura T, Taketomi A, Sugimachi K: Effect of nafamostat mesilate on coagulation and fibrinolysis in hepatic resection. *J Am Coll Surg* 1994; 178:498-502.
- 11 Suzuki M, Suematsu M, Miura S, Oshio C, Oda M, Tsuchiya M: Microcirculatory disturbances in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. The effects of heparin and gabexate mesilate on locomotive and metabolic changes of neutrophils. *Adv Exp Med Biol* 1988; 242:135-141.
- 12 Tamaki S, Wada H, Hiyoyama K, Shimura M, Minamikawa K, Wakita Y, et al: Treatment of disseminated intravascular coagulation with gabexate mesilate. *Clin Ther* 1993; 15:1076-1084.
- 13 Okumura Y, Inoue H, Fujiyama Y, Bamba T: Effects of

- serine protease inhibitors on accumulation of polymorphonuclear leukocytes in the lung induced by acute pancreatitis in rats. *J Gastroenterol* 1995; 30:379-386.
- 14 Iwagaki H, Yagi T, Urushihara N, Kobayashi K, Morimoto Y, Isozaki H, et al: Modulatory effect of a serine protease inhibitor on surgical stress: its clinical implications. *Acta Med Okayama* 1999; 53:239-244.
 - 15 Kim YI, Hwang YJ, Song KE, Yun YK, Lee JW, Chun BY: Hepatocyte protection by a protease inhibitor against ischemia/reperfusion injury of human liver. *J Am Coll Surg* 2002; 195:41-50.
 - 16 Fausto N, Laird AD, Webber EM: Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995; 9:1527-1536.
 - 17 Bhanumathy CD, Tang Y, Monga SP, Katuri V, Cox JA, Mishra B, et al: Itih-4, a serine protease inhibitor regulated in interleukin-6-dependent liver formation: role in liver development and regeneration. *Dev Dyn* 2002; 223:59-69.
 - 18 Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA: Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85:1936-1943.
 - 19 McCurry KR, Campbell DA Jr, Scales WE, Warren JS, Remick DG: Tumor necrosis factor, interleukin 6, and the acute phase response following hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1993; 55:49-54.
 - 20 Kawano K, Kim YI, Kai T, Ishii T, Tatsuma T, Morimoto A, et al: Evidence that FK506 alleviates ischemia/reperfusion injury to the rat liver. In vivo demonstration for suppression of TNF- α production in response to endotoxemia. *Eur Surg Res* 1994; 26:108-115.
 - 21 Suzuki S, Toledo-Pereyra LH: Interleukin 1 and tumor necrosis factor production, as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994; 57:253-258.
 - 22 Ozawa A, Konishi F, Nagai H, Okada M, Kanazawa K: Cytokine and hormonal responses in laparoscopic-assisted colectomy and conventional open colectomy. *Surg Today* 2000; 30:107-111.
 - 23 Iwagaki H, Yagi T, Urushihara N, Morimoto Y, Jikuhara A, Isozaki H, et al: Blood transfusion and post-operative plasma cytokine antagonist levels in colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology* 2001; 48:1351-1354.
 - 24 Sadamori H, Yagi T, Kanaoka Y, Morimoto M, Inagaki T, Ishikawa H, et al: The analysis of the usefulness of laparoscopic microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma in patients with poor hepatic reserve by serial measurements of IL-6, cytokine antagonists, and C-reactive protein. *Surg Endosc* 2003; 17:510-514.
 - 25 Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Yu WC, et al: Tolerance of the liver to intermittent pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors. *Arch Surg* 1999; 134:533-539.
 - 26 Sugawara Y, Kubota K, Ogura T, Esumi H, Inoue K, Takayama T, et al: Increased nitric oxide production in the liver in the perioperative period of partial hepatectomy with Pringle's maneuver. *J Hepatol* 1998; 28:212-220.
 - 27 Kim YI, Song KE, Ryeon HK, Hwang YJ, Yun YK, Lee JW, et al: Enhanced inflammatory cytokine production at ischemia/reperfusion in human liver resection. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1077-1082.
 - 28 Taub R, Greenbaum LE, Peng Y: Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and independent pathways in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 1999; 19:117-127.
 - 29 Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R: Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* 2000; 31:149-159.
 - 30 Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R: Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J Biol Chem* 2001; 276:26605-26613.
 - 31 Galun E, Zeira E, Pappo O, Peters M, Rose-John S: Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J* 2000; 14:1979-1987.
 - 32 Ozaki M, Haga S, Zhang H, Irani K, Suzuki S: Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ* 2003; 10:508-515.
 - 33 Rebecca T: Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest* 2003; 112:978-980.
 - 34 Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, et al: Interleukin-6/Glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* 2003; 278:11281-11288.
 - 35 Fausto N: Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32:19-31.
 - 36 Dluzniewska J, Zolich D, Polanski J, Zajac L, Sitkiewicz D, Lukomska B: Hepatocyte growth factor levels in liver and blood, and post-operative liver cell proliferation in patients with benign and malignant liver tumors after partial hepatectomy. *Med Sci Monit* 2002; 8:CR690-696.
 - 37 Boros P, Miller CM: Hepatocyte growth factor: a multi-functional cytokine. *Lancet* 1995; 345:293-295.
 - 38 Yamagami H, Moriyama M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Saito T, et al: Serum concentrations of human hepatocyte growth factor is a useful indicator for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas in C-viral chronic liver diseases. *Cancer* 2002; 95:824-834.
 - 39 Wu T, Han C, Lunz JG 3rd, Michalopoulos G, Sheldahl JH, Demetris AJ: Involvement of 85-kd cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in the proliferation of human cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2002; 36:363-373.
 - 40 Fukuura T, Miki C, Matsumoto K, Suzuki H: Serum hepatocyte growth factor as an index of disease status of patients with colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1998; 78:454-459.
 - 41 Imai Y, Kubota Y, Yamamoto S, Tsuji K, Shimatani M, Shibatani N, et al: Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: an in vitro study. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20:287-293.
 - 42 Daveau M, Scotte M, Francois A, Coulouarn C, Ros G, Tallet Y, et al: Hepatocyte growth factor, transforming growth factor α , and their receptor as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2003; 36:130-141.
 - 43 Shimomura T, Miyazawa K, Hiraoka H, Naka D, Morimoto Y, Kitamura N: Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* 1995; 229:257-261.
 - 44 Nagino M, Ando M, Kamiya J, Uesaka T, Sano T, Nimura Y: Liver regeneration after major hepatectomy for biliary cancer. *Br J Surg* 2001; 88:1084-1091.
 - 45 Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E, Kato T, Oriyama T, Fujimoto J, et al: Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology* 1993; 18:79-85.
 - 46 Weiss YG, Bellin L, Kim PK, Andrejko KM, Haaxma CA, Raj N, et al: Compensatory hepatic regeneration after mild, but not fulminant, intraperitoneal sepsis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G968-973.

New Indication for Reduction Surgery in Patients
with Advanced Hepatocellular Carcinoma with
Major Vascular Involvement

Naoto Gotohda, MD
Taira Kinoshita, MD
Masaru Konishi, MD
Toshio Nakagohri, MD
Shinichiro Takahashi, MD
Junji Furuse, MD
Hiroshi Ishii, MD
Masahiro Yoshino, MD

Reprinted from World Journal of Surgery
Volume 30, No. 3, 2006

New Indication for Reduction Surgery in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma with Major Vascular Involvement

Naoto Gotohda, MD,¹ Taira Kinoshita, MD,¹ Masaru Konishi, MD,¹ Toshio Nakagohri, MD,¹ Shinichiro Takahashi, MD,¹ Junji Furuse, MD,² Hiroshi Ishii, MD,² Masahiro Yoshino, MD²

¹Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, Japan

²Department of Hepatobiliary Pancreatic Medical Oncology, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, Japan

Abstract

Background: The prognosis of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) remains poor, particularly in patients with tumor thrombi (TT) in the major vessels.

Patients and Methods: From July 1992 to October 2004, 161 patients diagnosed as having advanced HCC with major vascular involvement were seen consecutively at our hospital. Among these patients, 32 (20%) underwent surgical resection [16 complete resection (CR), 16 reductive resection (RR)]. Eighteen patients (11%) received radiotherapy (RT), 73 (45%) underwent transcatheter arterial chemoembolization (TACE) or transcatheter arterial infusion chemotherapy (TAI), 8 (5%) with distant metastases received systemic chemotherapy, and 30 (19%) received palliative therapy.

Results: Excluding the CR group, the patients in the RR group had a higher 1-year survival rate than the other treatment groups. However, there was no significant difference in the overall survival rates of the RR, RT, and TACE/TAI groups. When we evaluated prognostic factors to clarify the indications for RR in the multidisciplinary treatment of patients with advanced HCC with TT, prothrombin activity (PA) was identified as a significant independent preoperative factor for overall survival in the RR group. The survival rate in patients with PA of $\leq 78\%$ was significantly lower than that of patients with PA of $>78\%$ ($P = 0.0004$). The median survival time of patients with serum PA of $>78\%$ who underwent RR was 13.9 months and that of patients who underwent CR was 9.1 months, with no survival difference between the groups.

Conclusion: In advanced HCC with major vascular involvement, patients who had RR with PA of greater 78% achieved a similar survival to those who had CR. The surgeon should still proceed with RR in those patients with serum PA of $>78\%$ if CR does not seem feasible on preoperative evaluation.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the world's most common malignancies, especially in East-

Asian countries. The prognosis of advanced HCC remains poor, particularly in patients with tumor thrombi (TT) in major branches of the portal vein (PV) and inferior vena cava (IVC).^{1–13} Hepatic resection has been accepted as the only means of cure for patients with HCC.^{14–27} However, the number of surgical candidates is

Correspondence to: Naoto Gotohda, MD, Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, Japan, e-mail: ngotohda@east.ncc.go.jp

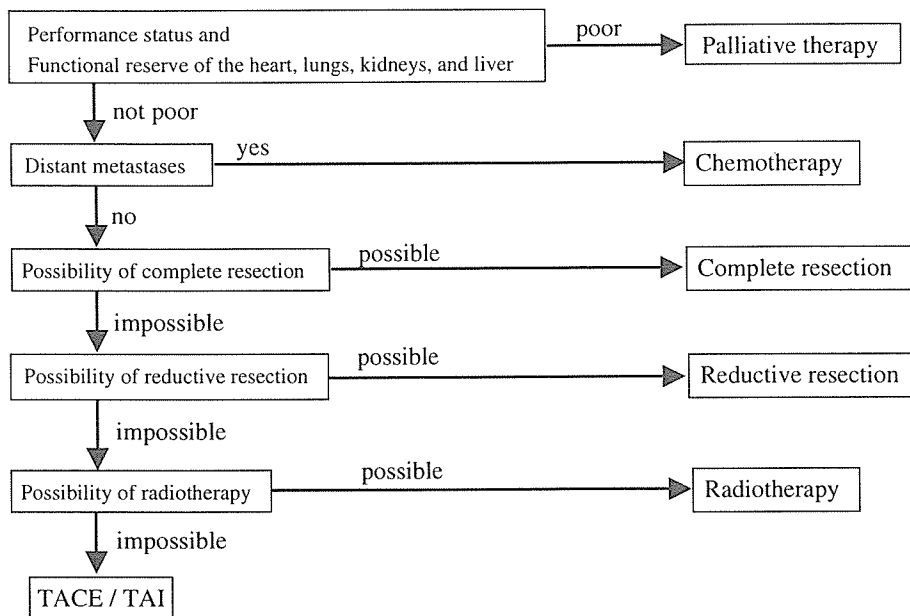


Figure 1. Strategy of treatment for advanced hepatocellular carcinoma (HCC) with major vascular involvement.

limited because of advanced HCC and/or poor hepatic reserve function of the liver as a whole at the time of diagnosis. In many cases, it is not possible to perform curative resection because of multiple intrahepatic metastases, vascular involvement, and/or distant metastases. Almost all patients with unresectable tumors die within several months.^{28–31} To overcome these poor results, several attempts have been made to perform reduction surgery with subsequent multidisciplinary treatment.^{32–37} However, there has been little investigation on the indications for reduction surgery for patients with advanced HCC.

The aim of this study was therefore to clarify the indications for reduction surgery in patients with advanced HCC with TT and to identify patient groups that might benefit from it.

PATIENTS AND METHODS

From July 1992 to October 2004, 161 patients with a diagnosis of advanced HCC with major vascular involvement were seen consecutively at the National Cancer Center Hospital East. We analyzed the prognostic factors and survival rates of these patients retrospectively. Briefly, advanced HCC with major vascular involvement is defined by the presence of TT in the first branches of the PV, the main PV, or the IVC via the hepatic vein (HV). Diagnosis of HCC, presence of tumor thrombi, and the presence of distant metastases were based on the images of ultrasonography, dynamic com-

puted tomography (CT), magnetic resonance imaging, and angiography. Various organ function was assessed by chest X-ray, serum biochemical examination, spirometry, and electrocardiography.

Our treatment strategy for advanced HCC with major vascular involvement is shown in Fig. 1. First, performance status and functional reserve of the heart, lungs, kidneys, and liver were evaluated, and patients with a poor condition were treated with palliative therapy (PT). Patients with distant (extrahepatic) metastases were treated with systemic chemotherapy (CT) if their condition was satisfactory. Patients with a good condition and no distant metastases were considered for complete resection (CR). Hepatectomy was indicated according to criteria based on tumor extension and hepatic functional reserve.^{1,2} If CR could not be performed, the possibility of reductive resection (RR) was considered. RR is defined in our institute as resection of the main tumor or the main tumor plus satellite tumors around the main tumor, with satellite tumors in the remnant liver classified as unresectable. In cases with TT in the PV or HV, TT are removed with the liver lobe containing the main tumor. If these surgical approaches are not possible, in the next phase, it is considered whether radiotherapy (RT) will be tolerated or not. Radiotherapy is indicated if there are gastroduodenal or small intestine inside the radiation field. Finally, if RT is indicated, patients are treated with transcatheter arterial chemoembolization (TACE) or transcatheter arterial infusion chemotherapy (TAI). TACE is performed by infusion of a mixture of lipiodol (5 ml) and farnarubicin (50 mg), followed by gelfoam embolization. If liver function becomes poor and portal vein flow is poor with tumor thrombi,