

## F344/DU ラット門脈遮断後の再灌流は 脾臓皮膜下注入 ACL-15大腸癌細胞の肝転移を促進させる

山本 誠 麻沼和彦\*

信州大学医学部組織発生学講座

### Portal Vein Clamp and Subsequent Blood Reflow Enhance Liver Metastasis of Colon ACL-15 Cells Administered Intrasplenically in F344/DU Rats

Makoto YAMAMOTO and Kazuhiko ASANUMA

Department of Histology and Embryology, Shinshu University School of Medicine

We explored the relationship between transient portal vein clamping (TPVC)-induced adhesion molecule expression in the liver and liver metastasis. TPVC was achieved by clamping the portal vein of male F344/DU rats for 15 min. For the investigation of liver metastasis, the portal vein was clamped in experimental rats and simple laparotomy was performed in control rats at the first operation. All rats were injected 6 and 18 h post-first surgery with  $4.0 \times 10^6$  ACL-15 colon carcinoma cells intrasplenically. The number of tumor nodules on the liver surface was determined 14 days later. For the investigation of gene and protein expression in the liver, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were determined 6 or 18 h after the first operation by quantitative RT-PCR for m-RNAs and immunohistochemical staining for proteins. Portal vein-clamped rats had significantly more liver metastatic foci than did unclamped controls. TPVC enhanced mRNA and protein expression of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 on the liver in experimental rats, except for m-RNA ICAM-1 expression at 18h post surgery. It is supposed that factors produced by TPVC can upregulate the mRNA and protein expression of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 on the liver, which may facilitate liver metastasis. *Shinshu Med J* 59 : 249–257, 2011

(Received for publication April 11, 2011 ; accepted in revised form May 24, 2011)

**Key words** : liver metastasis, portal vein clamp, colon cancer cell, congestion of the intestine

肝転移, 門脈遮断, 大腸癌細胞, 腸管鬱血

#### I 緒 言

大腸癌は肝転移の比率が高く, 進行大腸癌において初回手術時に肝転移は10-30%前後に認められ, また, 肝転移は大腸癌の予後不良の大きな因子である<sup>1)2)</sup>。

癌の肝転移を促進させる要因として, ストレス<sup>3)</sup>, carcinoembryonic antigen<sup>4)</sup>, 肝虚血後の再灌流<sup>5)-8)</sup>などがあげられている。特に細静脈の血管内皮細胞の虚血再灌流現象の研究を目的とした肝虚血再灌流の動物実験モデルについては数多くの検討がなされている。これらのモデルにおいて, 門脈系臓器の鬱血の影響を排

除する目的で門脈本幹を遮断しない方法がとられることがある<sup>9)-8)</sup>が, 門脈遮断と肝転移についての検討はほとんどなされていない。今回われわれは門脈遮断の肝転移に及ぼす影響を, 癌細胞を経脾臓門脈注入する動物モデル<sup>4)-11)</sup>を用いて検討した。また大腸癌肝転移モデルで転移との関与が推察されている接着因子である E-selectin, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), および intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)<sup>10)-12)</sup>の肝臓における m-RNA および蛋白の発現についても検討した。

#### II 材料と方法

##### A 実験 1 : 門脈遮断と肝転移

\* 別刷請求先: 麻沼 和彦 〒390-8621

松本市旭 3-1-1 信州大学医学部組織発生学講座

## 1 実験動物と癌細胞

動物はチャールズリバー(株) (横浜) より購入した12週雄性 F344/DU ラットを用いた。総ての動物実験は、研究動物実験計画書の承認を信州大学動物実験委員会および学長により得た後、信州大学実験動物取り扱い指針を遵守して行った。

ラットの飼育は信州大学医学部附属動物実験施設のアイソラックで行い、滅菌した水と飼料を与えた。

腫瘍細胞は ACL-15ラット大腸腫瘍株 (理化学研究所, 埼玉) を用いた。腫瘍細胞の培養は37°C CO<sub>2</sub> インキュベーターオートクレーブ内で、100 mm 組織培養ディッシュに10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) -RPMI 1640 (100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 添加) を培養液として行った。

## 2 実験モデルおよび実験群

コンフルエントになった細胞を trypsin 処理し、細胞濃度が4.0×10<sup>6</sup> cells/ml となるように生理食塩水で調整した。

ラットには2度の開腹術を行ったが、2度とも前夜より絶食とし、sodium pentobarbitone (50 mg/kg) を腹腔内注入した後エーテル麻酔下に腹部正中切開で開腹した。

コントロール群は C6群 (n=10) と C18群 (n=10) よりなり、1回目の手術は開腹術のみを行った。実験群は P6群 (n=15) と P18群 (n=15) よりなり、1回目の手術の際にブルドッグ鉗子を用い15分間の一時的門脈血流遮断を行った後に閉腹した。2回目の手術では C6群と P6群は、1回目の手術終了より6時間後に、C18群と P18群は1回目の手術の終了より18時間後に、1回目と同様な方法で開腹し、総てのラットに1.0 ml の ACL-15細胞浮遊液を脾臓皮膜下に注入し閉腹した。

ラットは14日後に犠牲死させた後肝臓を摘出し、肝表面に認められる転移結節数および肝重量の計測を行っ

た。

## B 実験2: E-selectin, VCAM-1, ICAM-1の肝臓における m-RNA および蛋白の発現

### 1 実験動物

実験1と同様の12週雄性 F344/DU ラットを用い同様に飼育を行った。

### 2 実験モデルおよび実験群

術前処置および麻酔は実験1と同様に行った。

コントロール群は C6'群 (n=5) と C18'群 (n=5) からなり、1回目の手術は開腹術のみを行った。実験群は P6'群 (n=5) と P18'群 (n=5) で、1回目の手術の際ブルドッグ鉗子にて15分間の門脈血流遮断を行った後に閉腹した。2回目の手術は、C6'群と P6'群は1回目の手術の6時間後、C18'群と P18'群は1回目の手術の18時間後に開腹し門脈よりカニューレションを行い生理食塩水100 cc で灌流後、肝臓を摘出した。RNA の抽出用には肝尾状葉を切り出し液体窒素中に投入し、冷凍後-80°C で保管した。免疫染色用には右葉肝門部を約1 cm 角で切り出した。

### 3 RNA の抽出と E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の半定量 reverse transcription (RT) -PCR

Total RNA の精製は Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA, USA) を用いて行った。5 μg の total RNA の RT-PCR は SuperScript II (Invitrogen, CA, USA) を用いてプロトコール通りに行った。RTで得られた first-Strand cDNA 反応液(全量50 μl) 2 μl を用いて、E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, それに加えてそれぞれと同時に beta-actin の増幅を、プラトーに至らぬサイクル数を検討後、行った(表1)。プライマーは Bertini のデザインに従い<sup>13)</sup>, Sigma-Aldrich Com. Japan (東京) により作成されたものを使用した。増幅された PCR 産物10 μl を1.5% アガロースゲルに泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、NIH Image を用いて (NIH, Bethesda, MD, USA),

表1 PCR のプライマーおよび PCR 条件

| Gene       | Primer  | Sequence                               | Annealing conditions | Cycles |
|------------|---------|--|----------------------|--------|
| E-selectin | Forward | 5'-TGC GAT GCT GCC TAC TTG TG-3'       | 65 °C, 1 min         | 25     |
|            | Reverse | 5'-AGA GAG TGC CAC TAC CAA GGG A-3'    |                      |        |
| VCAM-1     | Forward | 5'-GGCTCG TAC ACC ATC CGC-3'           | 65 °C, 1 min         | 25     |
|            | Reverse | 5'-CGG TTT TCG ATT CAC ACT CGT-3'      |                      |        |
| ICAM-1     | Forward | 5'-AAA CGG GAG ATG AA T GGT ACC TAC-3' | 64 °C, 1 min         | 25     |
|            | Reverse | 5'-TGC ACG TCC CTG GTG ATA CTC-3'      |                      |        |

表2 各実験群における転移頻度、肝重量および肝表面に認められた転移結節数。肝重量の測定値は mean  $\pm$  SEM

|         | C6             | C18            | P6             | P18            |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 転移頻度    | 0/10 (0%)      | 0/10 (0%)      | 8/15 (53%)     | 9/15 (60%)     |
| 肝重量 (g) | 7.7 $\pm$ 0.11 | 7.6 $\pm$ 0.11 | 8.9 $\pm$ 0.58 | 7.8 $\pm$ 0.09 |
| 転移結節数   |                |                |                |                |
| 0       | 10             | 10             | 7              | 6              |
| 1-5     | 0              | 0              | 0              | 9              |
| 6-10    | 0              | 0              | 0              | 0              |
| 11以上    | 0              | 0              | 8              | 0              |

それぞれのサンプルの beta-actin との intensity の比率 (relative intensity) 計算を行った。

#### 4 免疫組織学的検討

切り出した組織を10%リン酸緩衝ホルマリン (pH 7.4) を用いて約48時間固定後パラフィンに包埋した。このパラフィン包埋ブロックより4 $\mu$ mの薄切片を作成しスライドグラスに貼付した。キシレンにて脱パラフィンし、エタノール系列で親水化した後、室温で0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加メタノール溶液と30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化した。免疫染色は、抗体のプロッキングを行った後、goat polyclonal anti-E-selectin (diluted at 1:100), goat polyclonal anti-VCAM-1 (diluted at 1:200), mouse polyclonal anti-ICAM-1 (diluted at 1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA) を一次抗体として、室温で1時間反応させた後、ELITE ABC kit (Vector, Burlingame, CA, USA) を用い、Avidin-Biotin Peroxidase Complex 法 (ABC法) にて行った。E-selectin および VCAM-1 に対しては biotinylated rabbit anti-goat IgG, ICAM-1 に対しては biotinylated rabbit antimouse IgG と室温で30分反応させ、さらに ABC 溶液と60分間反応させた後、DAB 溶液と反応させ可視化した。ヘマトキシリンにて核染色を行い、E-selectin, VCAM-1, ICAM-1の陽性および陰性の類洞内皮の長さを強拡張で1検体あたり5視野を無作為に抽出して測定し、陽性割合を算出した。

#### C 統計学的検討

実験1における転移を認めたラットの数の各群間での比較は Fisher's exact test で、実験1での各群間の肝重量の比較、および実験2での relative intensity および免疫染色陽性比率の比較は Mann-Whitney U-test で行い、危険率5%以下をもって有意差ありと判

定した。

### III 結 果

#### A 実験1：肝表面の肉眼的転移および肝重量

肝表面に転移結節が認められたラットの数の割合 (表2) は対照群間 (C6群とC18群) および実験群間 (P6群とP18群) で有意差は認められなかった。一方、対照群と実験群においては総ての群間 (C6群とP6群, C6群とP18群, C18群とP6群, C18群とP18群) で有意差を認めた。肝重量はP6群と他群間においてのみ (P6群とC6群, P6群とC18群, P6群とP18群) 有意差を認めた。P6群の転移結節数10以上の8例うち4例においては大きな転移結節が融合しており、転移結節数個数は数えられなかった。またその4例中3例において腹水を認めた。

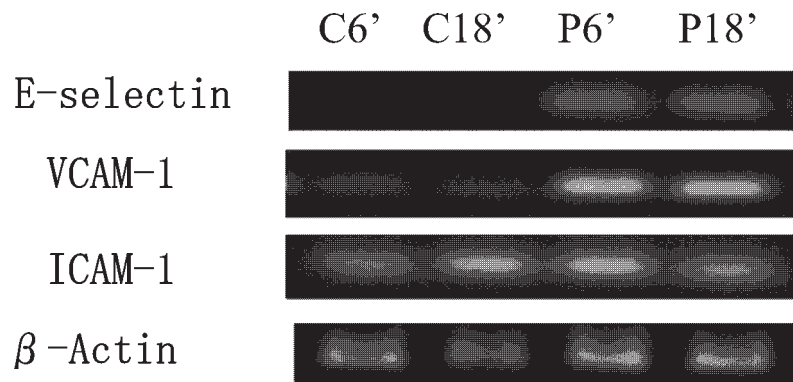
#### B 実験2：E-selectin, VCAM-1, および ICAM-1の遺伝子発現

E-selectin mRNA の発現はP6'群およびP18'群とも、コントロール群の2群 (C6'群およびC18'群) より有意に高かった (図1A, B)。VCAM-1 mRNA の発現はP6'群およびP18'群とも、コントロール群の2群より有意に高く、実験群間の比較においてもP6'群がP18'群より有意に高かった (図1A, C)。ICAM-1 mRNA は、P6'群がコントロール群の2群より有意に高かった (図1A, D)。そのほかの群間での比較において有意差は認めなかった。

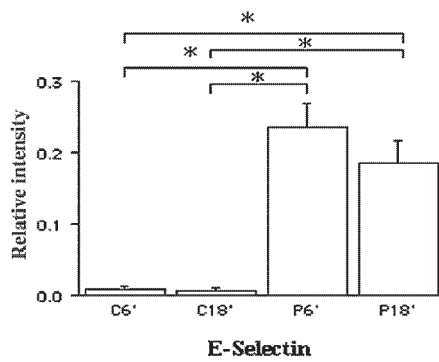
#### C 実験2：E-selectin, VCAM-1, および ICAM-1の蛋白発現

E-selectin, VCAM-1, および ICAM-1の蛋白質の肝類洞内皮における発現はP6'群およびP18'群とも、コントロール群の2群 (C6'群およびC18'群) より有意に高かった (図2)。

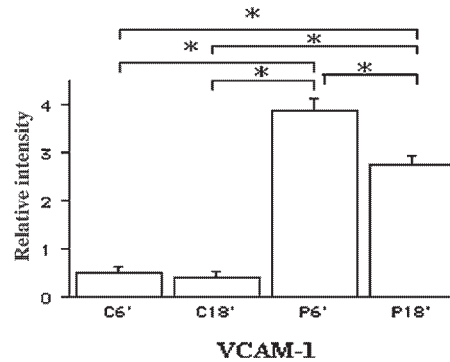
A



B



C



D

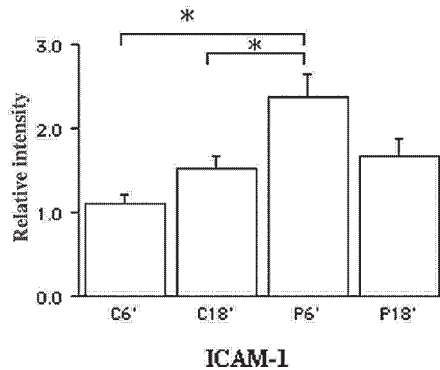


図1 肝臓における E-Selectin, VCAM-1, および ICAM-1 の mRNA の発現  
 遺伝子発現の典型的泳動像 (A)。C6'群, C18'群, P6'群, P18'群における, E-selectin (B),  
 VCAM-1 (C), ICAM-1 (D) と beta-actin との intensity の比 (relative intensity)。測定  
 値は mean ± SEM (n=5) で, \* は危険率 5%以下をもって有意差ある群間を示す。

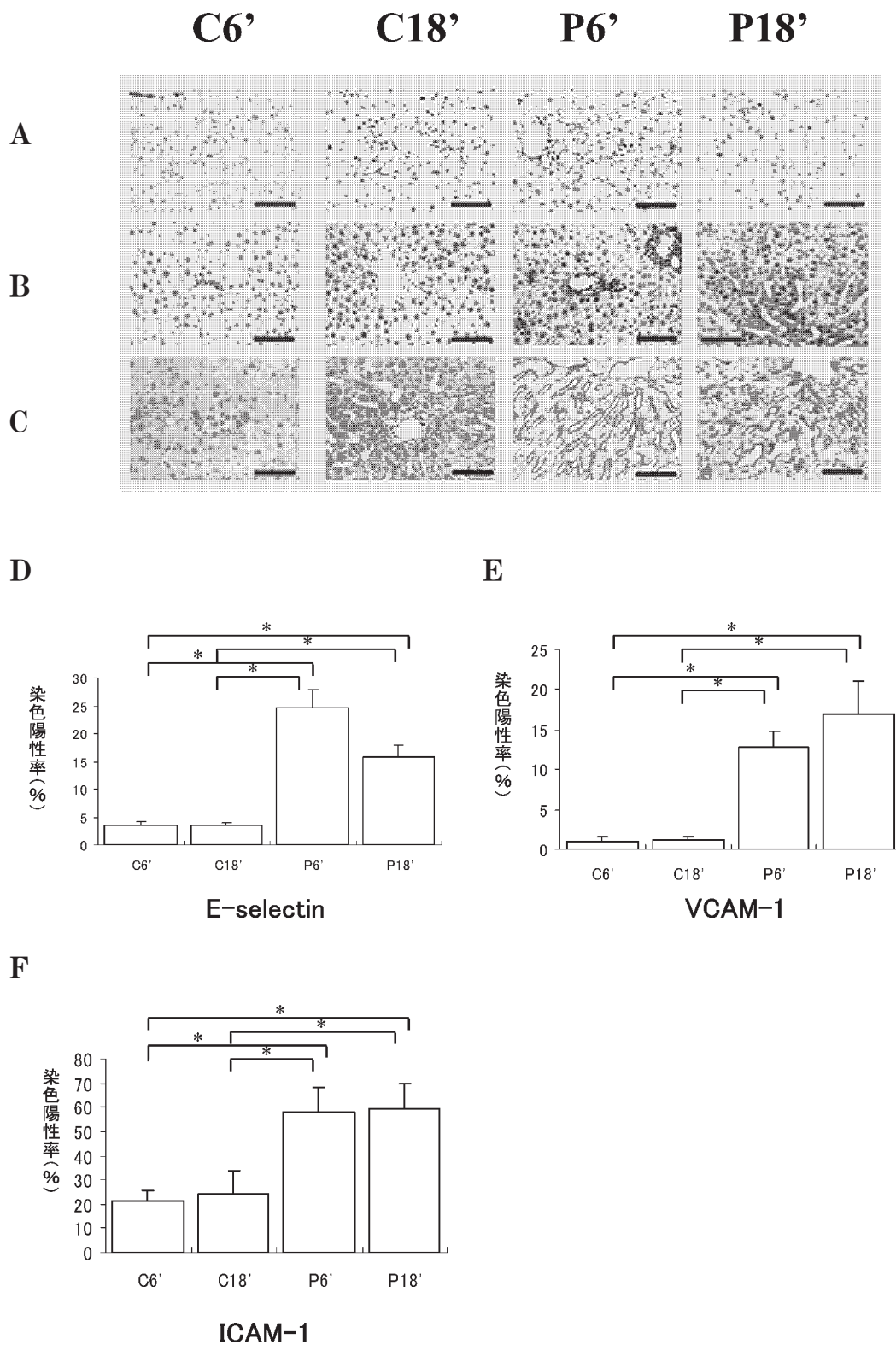


図2 肝臓における E-Selectin, VCAM-1, および ICAM-1 の蛋白の発現

C6'群, C18'群, P6'群, P18'群における E-Selectin, VCAM-1, および ICAM-1 の E-selectin (A), VCAM-1 (B), ICAM-1 (C) 免疫染色の典型的染色像。bars=100  $\mu$ m。C6'群, C18'群, P6'群, P18'群における, E-selectin (D), VCAM-1 (E), ICAM-1 (F) の陽性肝臓類洞内皮の割合。測定値は mean  $\pm$  SEM (n=5) で, \* は危険率 5% 以下をもって有意差ある群間を示す。

## IV 考 察

肝転移モデルにおける癌細胞投与方法には、盲腸に癌細胞を移植する方法（同所移植）、門脈に直接癌細胞を注入する方法（門脈内投与）、脾臓を介して門脈に注入する方法（脾臓被膜下投与）が主に行われている。盲腸に移植する手法は主にヌードマウスを用いて行われているが、癌細胞の進展にとどまらず、癌細胞と臓器特異的な微小環境条件における宿主側要因の影響、さらにパラクライン作用による相互反応が発癌する臓器環境の中で解析できる点で優れている。しかしそれらの要因のため、転移を標的としたその作用機序の解明には複雑すぎるという欠点があり、肝、肺、骨などの多臓器転移の研究には静脈内への癌細胞注入による転移モデルが用いられることが多い。門脈に癌細胞を注入する手法において肝転移数にはばらつきが大きく、本研究のコントロール群として用いることができなかつたこと（結果は未発表）、および脾臓被膜下投与による門脈内への癌細胞の注入は大腸癌肝転移モデルでは広く行われていること<sup>4)-11)</sup>から、本研究では脾臓被膜下投与による門脈内注入肝転移モデルを用いた。

癌の血行性転移は癌細胞の原発巣からの離脱と血管内への遊離、血管内での移動、末梢血管内皮への接着、基底膜および結合組織内への浸潤、という段階を経て成立すると考えられている<sup>14)-16)</sup>。

細胞が癌化すると、その表面に正常細胞には見られない抗原が出現する<sup>17)</sup>。E-セレクトインは、シアリル Le<sup>a</sup>抗原やシアリル Le<sup>x</sup>抗原を発現した癌細胞が血管内皮細胞へ接着する最初の段階での重要な役割を果たしている<sup>18)</sup>。E-セレクトイン m-RNA は、IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  などのサイトカインの刺激で血管内皮表面に発現し、およそ2から4時間で最大になり24時間で元に戻る<sup>19)</sup>。E-セレクトインによる細胞接着作用により静止後、癌細胞のインテグリン受容体である very late antigen-4 (VLA-4), lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) が活性化され、インターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), インターロイキン-1 (IL-1), 腫瘍壊死因子 (TNF) 等の炎症性サイトカインの刺激により血管内皮細胞表面のインテグリンファミリーである VCAM-1や ICAM-1が発現あるいは増強すると、より強固な細胞間接着が生じる<sup>19)</sup>。VCAM-1や ICAM-1は2時間でピークに至り少なくとも72時間程度続くが、ICAM-1の phorbol ester により引き

起こされる発現は4時間でピークに至りより長い時間発現する<sup>19)</sup>。E-セレクトインの発現増強は肝転移の重要な因子と報告されており<sup>5)</sup>、E-セレクトインの発現抑制は肝転移を抑制する<sup>10)20)</sup>との報告、VCAM-1の類洞細胞での発現は、脾臓注入肝転移モデルで肝転移を促進する主なる要因であるとの報告<sup>12)</sup>、および ICAM-1の発現亢進も肝転移を増幅させるとの報告がある<sup>8)21)</sup>。

一方ヒトの大腸癌の臨床における肝転移群と非肝転移群における各種接着分子の血清値の比較検討でも、肝転移群ではE-セレクトイン、VCAM-1、ICAM-1、糖鎖抗原のシアリル Le<sup>a</sup>やシアリル Le<sup>x</sup>などの接着分子が有意に高値である<sup>22)</sup>と報告されており、大腸癌肝転移における癌細胞と血管内の接着に、E-セレクトイン、ICAM-1、VCAM-1が重要だと考えられている。

われわれの検討でも肝転移が高度に認められた門脈遮断6時間後に癌細胞注入を行った群および門脈遮断18時間後に癌細胞注入を行った群に、コントロール群に比べ、多くの肝転移と、E-セレクトインおよびVCAM-1の m-RNA の発現増強が認められた。また ICAM-1の m-RNA に関しては門脈遮断6時間後に癌細胞注入を行った群に発現の増強が認められた。これらのことより、門脈遮断によりE-セレクトイン、VCAM-1、およびICAM-1の発現あるいは増強が認められ、また肝転移が促進されることが明らかになった。

免疫染色にても、肝類洞内皮におけるE-セレクトイン、VCAM-1、およびICAM-1蛋白の門脈遮断群におけるコントロール群に対する有意な発現が認められた。無酸素再酸素化による血管内皮における接着分子の発現は、無刺激の状態では発現していないE-セレクトイン蛋白は2時間位から発現し4から5時間後にピークとなり、VCAM-1蛋白も同様な発現パターンをとり4時間位から発現し約8時間ピークとなる。無刺激状態でもかなり多量な発現をしているICAM-1蛋白は2時間位から発現が増強し、それが長時間持続する<sup>23)</sup>と報告されている。またE-セレクトインは癌細胞を脾臓に注入した場合、1時間後に m-RNA はピークとなり、6時間後から48時間後に蛋白の発現が認められる<sup>11)</sup>。ICAM-1蛋白の発現は肝虚血再灌流2時間後および24時間後で増強が認められる<sup>8)</sup>。これらのことから、E-セレクトイン、VCAM-1、およびICAM-1蛋白の発現は m-RNA の発現から4時間以内には増強されると考えられ、本実験の蛋白発現の結果と一致する。

癌細胞を脾臓注入すると2時間以内でE-selectinが発現し肝転移が促進されるとの報告があるが<sup>11)</sup>、コントロール群では肝転移が認められなかった本研究の結果より、6および18時間の門脈遮断による門脈系臓器の鬱血が、虚血および再還流の暴露を受けていない肝臓類洞内皮に、E-セレクチン、VCAM-1、およびICAM-1蛋白の発現の増強をもたらす主要因であることが明らかとなった。

肝虚血再灌流障害とは、血流が途絶し虚血が遷延すると活性酸素など諸種の因子による微小循環系の障害が引き起こされ<sup>24)25)</sup>、血流再開後に進行性の臓器障害を来すことを言う。障害を引き起こす因子として、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素や、一酸化窒素などのフリーラジカル産生による障害、各種サイトカインや各種ケミカルメディエータ産生による障害、活性化好中球と血管内皮細胞の相互作用に基づく障害などが考えられ研究されている。肝虚血再灌流障害下におけるそれらの因子が肝転移に及ぼす影響の研究には、肝動脈および門脈の遮断が必要であるが、腸管鬱血による影響を排除するために門脈血流を保つ肝部分虚血再灌流モデルが用いられることが多い。しかしながらそれらの検討において、肝部分虚血実験群の非虚血肝領域にも、肝虚血を行わないコントロール群に比し肝転移の頻度が高いこと<sup>5)-8)</sup>が解明すべき問題点となっている。

腸管の急性の血行障害では流入動脈の遮断より静脈の遮断による組織障害の方が高度であり、灌流静脈の遮断は組織の微小循環系の障害を来することが知られている。小腸の鬱血に関する検討では、Xanthine-Oxidase系を介した活性酸素による障害は腸管壊死を起こした30分の鬱血より、10分間の鬱血の方が強く認められる<sup>26)</sup>。また、長時間の腸管鬱血では内因性エンドトキシンにより刺激を受けた単球-マクロファージ、血管内皮細胞、好中球などから産生されるサイトカイン、エイコサノイド、血小板活性化因子(PAF)、活性酸素、エラスターゼ、NOなどが微小循環障害や細胞障害を引き起こすことが知られている。腸管は門脈の遮断によって循環障害を引き起こしやすい臓器であり、本研究において、門脈遮断が、門脈系臓器、特に腸管の組織障害を引き起こし、それによって発現された諸種の因子が、虚血および鬱血に暴露されていない肝臓類洞内皮における接着因子の発現をもたらしたと考えられる。この結果は、肝虚血再灌流モデルで虚血再還流に暴露された部分の肝臓類洞内皮の障害によっ

て生じた諸因子が、非虚血再灌流肝臓類洞内皮の接着因子の発現を増強させた可能性があることを強く示唆している。腸管鬱血で引き起こされた微小循環障害によって生じた諸因子が大循環に入り多臓器にその影響を与える可能性は、大腸癌手術での、腫瘍摘出に先立つ支配動静脈の結紮による腸管鬱血によって産生された因子が辺縁静脈を通して門脈血流に流入し肝臓類洞内皮を刺激する可能性を与えている。

本研究で使用したACL-15大腸癌細胞は脾臓内注入により高率に肝転移を認める1,2-dimethylhydrazine誘発ラット大腸癌細胞で、組織学的には印環細胞を有する低分化腺癌である。しかしながらACL15細胞を脾臓注入した園田ら<sup>8)</sup>の報告では、2週間後の肝転移はコントロール群で12例中3例であり、われわれの研究ではコントロール群20例すべてにおいて肝転移を認めなかった。肝転移を認める頻度の要因は移植細胞数と癌細胞投与からの観察期間であるが、本研究での脾臓注入細胞数は $4.0 \times 10^6$ であり、また注入細胞の生存率は90パーセント以上であり、常に脾臓に癌結節を認めていることより、癌細胞数が少なかったとは考えにくい。

本研究より、肝転移を増強させる宿主側の要因の一つは門脈系臓器、特に腸管の鬱血によって引き起こされたE-セレクチン、VCAM-1、およびICAM-1蛋白の肝臓類洞内皮における発現だと考えられた。だが、本実験において門脈遮断6時間の実験ラットでは、肝転移結節が10以上か、結節を認めないか、の2群に分かれたことは、これらの接着分子の発現の違いからだけでは説明がつかない。血管内皮と癌細胞との接着には癌細胞側の要素も重要である。血管内に侵入した癌細胞は、癌細胞が互いに集塊を作る、あるいは血小板やリンパ球と混ざり合って集塊を作り、遠隔臓器の毛細血管床での着床や生存、増殖が促進されると考えられている。ほぼ同じ世代の癌細胞を同じ手法で用いているにもかかわらず癌細胞移植転移実験においては、実験群とコントロール群の有意差はありながら必ず転移数にばらつきがみられる<sup>3)-9)12)</sup>。肝転移実験モデルの欠点は総ての実験を同一日に行えないことであり、本研究において、癌細胞の、生育速度の違い、培養ディッシュからの剥離に要する時間の違い、浮遊液とした場合に連鎖傾向の強さの違いが認められた。本研究では、同一細胞浮遊液をコントロール群と実験群に投与しており、この癌細胞の要因は本研究の目的である、門脈遮断が肝臓転移に及ぼす影響についての検討に影響を

与えることではなく、また本研究の結果である癌転移は肝臓の接着分子発現が関与するという結論に抵触する事項でもないが、転移モデルにおける詳細な分析には移植癌細胞の移植時の解析も行わなければならないことを示唆しており、肝臓転移率を議論する際に考慮されなければならない事項であると考えられる。

門脈遮断6時間と18時間の実験群の転移を認める群での癌結節の数の相違は、癌細胞の増殖速度は門脈遮断18時間の実験群に比し極めて速いことだと考えられる。これは癌細胞の因子だけからでは説明ができない。また、本研究においてE-セレクトイン、VCAM-1、ICAM-1のm-RNAおよび蛋白の門脈遮断実験群の発現ではICAM-1のm-RNAのみに有意差が認められただけであることから、これらの接着因子の発現の違いからでも説明がつかない。手術のみでも肝転移は促進される<sup>27)28)</sup>こと、肝臓のKupffer細胞を軸とした腫瘍に対する防御活性は手術侵襲により低下すること<sup>29)</sup>より、手術侵襲に伴う肝臓および全身の腫瘍免疫の低下が動物肝転移モデルに関与している可能性が推測されている。転移腫瘍細胞の接着および増殖には様々な因子が関与していることを示しており、経門脈

肝転移モデルにおいても転移増殖の機序は複雑と考えられ、今後の検討課題である。

## V 結 語

門脈遮断による腸管鬱血動物モデルの検討により、門脈遮断による門脈系臓器の鬱血が、虚血および鬱血に暴露されない肝臓類洞内皮での、Eセレクトイン、vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 のmRNAや蛋白の発現を促進させ、その発現増強は肝転移の主要な要因であることが明らかとなった。また転移した癌組織の成長が肝臓および全身の腫瘍免疫の低下をもたらし、腫瘍の増大をきたすことが推測された。

## VI 謝 辞

本研究に御指導を頂きました、安達 互厚生連富士見高原病院長、藤森 実東京医科大学茨城医療センター乳腺科教授、天野 純信州大学医学部第2外科教授、佐々木克信州大学医学部組織発生学教授に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) 森谷宣皓, 小山靖夫, 北條慶一: 大腸癌肝転移の検討—転移巣の切除とその遠隔成績を中心に—. 日本大腸肛門病会誌 36: 1-6, 1983
- 2) 椎木滋雄, 淵本定儀, 岩垣博巳, 安井義政, 佐々木章公, 大倉充博, 浦久保直澄, 浜田史洋, 三村 久, 折田薫三: 大腸癌同時性肝転移症例の臨床病理学的検討. 日本大腸肛門病会誌 44: 1107-1112, 1991
- 3) Wu W, Yamaura T, Murakami K, Murata J, Matsumoto K, Watanabe H, Saiki I: Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. Life Sci 66: 1827-1838, 2000
- 4) Kim JC, Roh SA, Park KC: Adhesive function of carcinoembryonic antigen in the liver metastasis of KM-12c colon carcinoma cell line. Dis Colon Rectum 40: 946-953, 1997
- 5) Doi K, Horiuchi T, Uchinami M, Tabo T, Kimura N, Yokomachi J, Yoshida M, Tanaka K: Hepatic ischemia-reperfusion promotes liver metastasis of colon cancer. J Surg Res 105: 243-247, 2002
- 6) Ku Y, Kusunoki N, Shiotani M, Maeda I, Iwasaki T, Tominaga M, Kitagawa T, Fukumoto T, Suzuki Y, Kuroda Y: Stimulation of haematogenous liver metastases by ischaemia-reperfusion in rats. Eur J Surg 165: 801-807, 1999
- 7) Tamagawa K, Horiuchi T, Uchinami M, Doi K, Yoshida M, Nakamura T, Sasaki H, Taniguchi M, Tanaka K: Hepatic ischemia-reperfusion increases vascular endothelial growth factor and cancer growth in rats. J Surg Res 148: 158-163, 2008
- 8) 園田一郎, 青木達哉, 葦沢龍人: 肝転移成立における肝虚血再灌流の影響. 日消外会誌 34: 177-188, 2001
- 9) Giavazzi R, Jessup JM, Campbell DE, Walker SM, Fidler IJ: Experimental nude mouse model of human colorectal cancer liver metastases. J Natl Cancer Inst 77: 1303-1308, 1986
- 10) Kobayashi K, Matsumoto S, Morishima T, Kawabe T, Okamoto T: Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. Cancer Res 60: 3978-3984, 2000



- 11) 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* 59 : 1356-1361, 1999
- 12) Kitakata H, Nemoto-Sasaki Y, Takahashi Y, Kondo T, Mai M, Mukaida N : Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer Res* 62 : 6682-6687, 2002
- 13) Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC : Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22 : 1068-1079, 2002
- 14) Fidler IJ : Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nat New Biol* 242 : 148-149, 1973
- 15) Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM : Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Patol* 190 : 310-329, 2000
- 16) Zetter BR : Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 4 : 219-229, 1993
- 17) Hakomori S, Kannagi R : Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 71 : 231-251, 1983
- 18) Sawada R, Tsuboi S, Fukuda M : Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J Biol Chem* 269 : 1425-1431, 1994
- 19) Carlos TM, Harlan JM : Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84 : 2068-2101, 1994
- 20) Mannori G, Santoro D, Carter L, Corless C, Nelson RM, Bevilacqua MP : Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol* 151 : 233-243, 1997
- 21) Maio M, Gulwani B, Langer JA, Kerbel RS, Duigou GJ, Fisher PB, Ferrone S : Modulation by interferons of HLA antigen, high-molecular-weight melanoma associated antigen, and intercellular adhesion molecule 1 expression by cultured melanoma cells with different metastatic potential. *Cancer Res* 49 : 2980-2987, 1989
- 22) 葦沢龍人, 山崎達之, 長手基義, 鈴木芳明, 園田一郎, 多村幸之進, 中島 厚, 鈴木和信, 青木達哉, 小柳泰久 : 消化器癌の肝転移成立における接着分子の役割. *消癌の発生と進展* 9 : 305-308, 1997
- 23) Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY : Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res* 81 : 922-931, 1997
- 24) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN : Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery* 94 : 428-432, 1983
- 25) McCord JM : Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312 : 159-163, 1985
- 26) 森脇義弘, 片村 宏, 市川靖史, 山本俊郎, 杉山 貢 : ラット小腸の虚血, うっ血およびその解除における組織障害と活性酸素種の関連. *日消外会誌* 25 : 2938-2943, 1992
- 27) Mizutani J, Hiraoka T, Yamashita R, Miyauchi Y : Promotion of hepatic metastases by liver resection in the rat. *Br J Cancer* 65 : 794-797, 1992
- 28) Eggermont AM, Steller EP, Sugarbaker PH : Laparotomy enhances intraperitoneal tumor growth and abrogates the antitumor effects of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Surgery* 102 : 71-78, 1987
- 29) Oka M, Hazama S, Suzuki M, Wang F, Shimoda K, Iizuka N, Wadamori K, Suzuki T, Attwood S : Depression of cytotoxicity of nonparenchymal cells in the liver after surgery. *Surgery* 116 : 877-882, 1994

(H 23. 4. 11 受稿 ; H 23. 5. 24 受理)