

**【要約】**

A new proposal of criteria for future remnant liver volume  
in older patients undergoing major hepatectomy for biliary tract cancer  
– Based on the clinical and experimental aspects –

(高齢胆道癌患者に対する拡大肝切除術における  
術前予測残肝率の検討

— 臨床的・基礎的研究に基づく新たな手術適応基準の提唱 —)

千葉大学大学院医学薬学府  
先端医学薬学 専攻

(主任：大塚 将之 教授)

渡邊 善寛

【目的】近年多くの術式で高齢者でも若年と同等に安全に手術を施行可能であると報告されている。しかし、基礎研究では加齢による術後肝再生抑制や加齢による免疫抑制が報告されている。また、胆道癌に対する根治術である胆管切除を伴う拡大肝切除においては加齢による周術期リスクの報告は少ない。そこで、本研究では加齢に伴う肝切除後の肝再生抑制機序を基礎的に解明するとともに、加齢に伴う拡大肝切除後の術後重症合併症のリスクを証明し、年齢を考慮した術前予測残肝率(%FLV)の新基準を提唱することを目的とした。

【方法】C57BL/6 マウス(若年マウス:10-12 週齢, 高齢マウス:24-30 月齢)に肝切除を施行し、術後 4 時間、24 時間、48 時間、96 時間で残肝と血清を回収、残肝は核タンパクと全肝タンパクに精製、NF- $\kappa$ B や STAT3 をはじめとする肝再生シグナルを測定した。高齢マウスの肝切除実験では 12-20 月齢の使用報告が多いが、人間の 60-80 歳相当と考えられる 24-30 月齢のマウスを使用することで十分な加齢リスクを評価できると考えた。また AML-12 細胞における Pin1 ノックダウンの肝再生シグナルへの影響を検討した。さらには 2000 年から 2013 年に当科で胆管切除を伴う拡大肝切除を施行した 225 例を対象とし、術後重症合併症発生に関するリスクを評価した。拡大肝切除の定義は 2 区域以上の切除とし、術前予測残肝率(%FLV)が 40%未満では原則門脈塞栓術を施行した。術後重症合併症は Clavien-Dindo 分類の Grade IV 以上と定義した。

【結果・考察】HE 染色における肝障害を Suzuki 分類によりスコア化すると、若年マウスでは 24 時間をピークに軽度の肝細胞障害を認めるのみであったが高齢マウスでは 24 時間以降も肝障害が遷延し、特に高度な空胞変性と necrosis を認めた。また、肝細胞障害の指標である血清 ALT 値も若年マウスと比較して高齢マウスにおいてより上昇しており、術後 24 時間で有意差を認めた。また、炎症反応の指標であり、肝切除後早期の肝再生シグナルでもある TNF- $\alpha$  および MIP-2 も、高齢マウスにおいて術後 4 時間で著明に上昇していた。これらの結果より、高齢マウスでは若年マウスと比較して肝障害がより強く持続することが示唆された。残肝の増大率をみると、高齢マウスでは若年マウスに比較し有意に残肝増大が抑制されていた。PCNA 免疫染色を行ったところ、若年マウスでは術後 4 時間から発現が増強し、術後 24 時間以降 96 時間まで高発現が持続したが、高齢マウスでは術後 96 時間でも弱い発現を認めるのみであった。次に cell cycle を促進する代表的なシグナルである cyclin D1 と、cyclin D1 発現を上昇させると報告される Pin1 の発現をウェスタンブロットで調べた。若年マウスでは Pin1 は術後 4 時間で急上昇し、術後 96 時間でも高発現を維持しており、それに一致して cyclinD1 発現の上昇も認めた。しかし、高齢マウスでは Pin1 は術後を通してほとんど上昇を認めず、cyclin D1 発現も高齢マウスと比較して有意に低下しており、これが加齢に伴う肝再生遅延の一因であると考えられた。

次に EMSA にて、肝再生の主要な因子である NF- $\kappa$ B 活性を調べると、若年マウスでは術後 24 時間以降、NF- $\kappa$ B 活性は著明に上昇していたが、高齢マウスでは術後の NF- $\kappa$ B 上昇が認められなかった。この NF- $\kappa$ B 活性の結果は Pin1 発現と一致していた。さらに Pin1 を介した NF- $\kappa$ B 活性を評価するため、Pin1 による NF- $\kappa$ B 活性亢進の指標であるリン酸化 NF- $\kappa$ B-

p65(ser276)の発現をウェスタンブロットで確認すると、EMSAの結果と同様に、若年マウスと比較して高齢マウスでは有意に上昇が抑制されていた。

次に、NF- $\kappa$ B同様に肝再生を促進する転写因子であるSTAT3の活性をEMSAにて評価した。NF- $\kappa$ B同様に、若年マウスでは術後24-48時間でSTAT3活性の上昇を認めたが、高齢マウスでは活性上昇を認めなかった。さらには、Pin1によるSTAT3活性亢進の指標であるリン酸化STAT3(ser727)の発現は、高齢マウスでは若年マウスに比較して有意に抑制されていた。次にマウス正常肝細胞株であるAML12細胞におけるPin1ノックダウンモデルを作成し、Pin1のNf- $\kappa$ B活性亢進を介した細胞増殖作用をin vitroにて確認した。Pin1ノックダウン72時間後における細胞増殖およびNf- $\kappa$ B活性を評価すると、BrdUの取り込みは有意に低下し、細胞増殖数も抑制されていた。またNF- $\kappa$ B活性は有意に低下しており、肝細胞におけるNF- $\kappa$ B活性亢進にはPin1が必要であることがin vitroでも示された。

臨床においては、年齢と合併症発生の関係をROCカーブで解析すると、CDIII以上の合併症発生は年齢と相関を認めなかったが、CDIV以上・CDVの合併症発生は年齢と有意な相関を認めた。CDIV以上の重症合併症発症における年齢のカットオフ値は69歳であったため、69歳以上の高齢群と68歳以下の非高齢群の2群に分けた。次に、術後の最大トータルビリルビン(T-Bil)と合併症発生の関係をROCカーブにて解析したところ、術後最大T-Bil値はCDIV以上およびCDVの合併症発生と強い相関を認めた。重症合併症発生に関するT-BilのCut off値は6.9mg/dlであったため、術後高ビリルビン血症をT-Bil 6.9mg/dl以上と定義した。患者背景では二群間に差は認めなかった。

術後合併症を比較すると、術後出血・胆汁漏・縫合不全など手術関連合併症は二群間に差を認めなかったが、高ビリルビン血症・肝不全・呼吸不全・敗血症・重症合併症・在院死亡の発生率が高齢群で有意に高率だった。術後重症合併症発生の予測因子を明らかにするために、術前・術中因子を対象として単変量解析・多変量解析を施行すると、高齢、術前予測残肝率低値、術中大量出血の3因子が重症合併症の独立したリスクファクターとして抽出された。拡大肝切除後の残肝増大率を比較検討すると、切除率は2群間で同等であるものの、術後1週間ですでに高齢群では肝再生率が有意に低く、術後6か月でさらにその差は増大した。この結果は前述の高齢マウス拡大肝切除モデルにおける肝再生遅延に一致する結果であり、臨床でも高齢者では拡大肝切除術後に肝再生遅延が生ずることが明らかとなった。術前予測残肝率(%FLV)と重症合併症発生の関連をROCカーブにて検討した。非高齢群を対象とすると重症合併症の発生と%FLVとの間に相関は認めなかったが、高齢群では重症合併症の発生と%FLVとの間に有意な相関を認め、そのカットオフ値は45.3%であった。そこで、%FLVが45%以上であった群と45%未満であった群で術後重症合併症の発生率を比較した。高齢群において、%FLV $\geq$ 45%の群は%FLV $<$ 45%の群と比較して術後重症合併症の発生率が有意に低下しており、非高齢群の発生率とほぼ同等にまで抑えられた。よって、69歳以上では術

前予測残肝率を 45%以上に設定することで術後重症合併症の発生を低下させることが可能であることが示された。

術前予測残肝不足の際には門脈塞栓術が有用となる。門脈塞栓術における加齢の影響を検討するため塞栓後の予定残肝の増大率を CT volumetry にて比較検討したところ、高齢群でも非高齢群と同等の残肝増大率を得ることができており、門脈塞栓術のような軽度の侵襲に対しては高齢でも非高齢と同様に肝再生を誘導できるが、高侵襲手術後は、加齢により肝再生遅延が起こることが示唆された。また、術前の門脈塞栓術が拡大肝切除術後の肝再生に影響を及ぼすかを検討すると、肝切除術後の肝再生率は門脈塞栓術施行群においても未施行群と同等であり、術前門脈塞栓術により増大した残肝が術後、さらに増大することが可能であることが示された。

**【結論】** 加齢による Pin1 機能低下は NF- $\kappa$ B 及び STAT3 の活性抑制を介して肝再生を抑制し、それが胆管切除を伴う肝切除における術後重症合併症の増加につながると考えられた。よって、我々は 69 歳以上の症例における胆管切除を伴う肝切除に際しては、%FLV を 45%以上に設定する新たな手術適応基準を提唱する。

主論文：Annals of Surgery (in press)

平成 28 年 11 月 15 日 WEB 公表済み、平成 29 年 2 月 15 日現在印刷中