

**Enhanced tumor growth in the remaining lung  
after major lung resection**

(肺切除後の残存肺における腫瘍増殖促進効果  
に関する実験的検討)

山口大学大学院医学系研究科 応用医工学系専攻

器官制御医科学講座 博士後期課程

器官病態外科学 (外科学第一)

佐野 史歩

平成 28 年 1 月

## 目次

第 1 章 背景-----	3
第 2 章 方法-----	4
2.1 実験動物-----	4
2.2 肺転移モデル-----	4
2.3 手術手技-----	4
2.4 ELISA-----	4
2.5 組織学的分析-----	5
2.6 肺重量測定-----	5
2.7 統計学的分析-----	5
第 3 章 結果-----	6
3.1 左肺全摘後の代償性肺成長-----	6
3.2 左肺全摘後の残存右肺での腫瘍進展-----	7
3.3 肺細胞から放出される MCP-1-----	8
3.4 腫瘍辺縁部に集積する CD68+細胞-----	9
第 4 章 考察-----	11
第 5 章 結語-----	12
第 6 章 謝辞-----	13
第 7 章 参考文献-----	13

## 第1章 背景

原発性肺癌は、多くの先進国における癌死の主因である。さらに、肺は、様々な悪性疾患の転移先臓器である。外科的切除は、腫瘍学的に完全切除可能な原発性肺癌または転移性肺腫瘍症例における根治の可能性を秘めた唯一の治療法である。しかし、完全切除が達成されたにも関わらず術後1年以内に残存肺にしばしば再発する。MartiniらはI期肺癌の完全切除後の残存肺転移および第二癌の高い発症率を報告している[1]。我々が行った多発肺癌患者の研究において、病変の一つを切除することにより、CT検査で増大傾向のなかったスリガラス陰影を呈する他方の病変の増大が惹起されることを報告した[2]。他にも多くの研究者は、外科的介入が腫瘍進展の契機になる機序について報告している。例えば、腫瘍自体によって産生され、血管新生阻害作用を有するアンギオスタチンが、腫瘍の切除により枯渇することで、結果的に残存腫瘍の増殖を促進させることを我々は見出した[3]。また、外科的侵襲が刺激となって骨髄由来細胞が末梢血中に動員され、腫瘍内へ集積することで、血管新生を介して腫瘍進展に寄与することも報告した[4]。その他の研究者による報告では[5]、外科的侵襲は免疫抑制を招来し、残存腫瘍の進展をもたらすとしている。興味深いことに、Brownらはマウスの片肺全摘モデルにおいて、皮下移植した腫瘍の増大は促進されないが、残存肺に移植した腫瘍の増大は促進されることを報告している[6]。この結果は、手術侵襲によるものではなく、片肺全摘後の対側残存肺の局所環境が、手術によって修飾され、腫瘍の進展に好都合な環境となっていることが示唆されるが、具体的な分子機序については不明のままである。また、片肺全摘後に見られる残存肺の代償性成長を抑制することが、残存肺における腫瘍進展効果を抑制できるか否かについても議論の余地がある。片肺全摘後における残存肺の代償性成長は主に、本来の胸郭と残存肺とのサイズの不一致を解決するために惹起される。Hsiaらは犬において片肺全摘後の胸郭内の空洞を人工物により充填することで、対側肺の代償性成長が鈍化されることを報告している[7]。したがって、我々は、肺切除後の残存肺は腫瘍にとって好適な環境となるが、残存肺の成長を抑制することでそのよう修飾反応が解除されるという仮説を立てた。

## 第2章 方法

### 2.1 実験動物

実験動物として、8~10週齢の *C57BL/6* マウスを日本エスエルシー(日本、静岡)から購入した。すべての動物実験は、山口大学と国内のガイドラインに従い、動物倫理に十分な配慮を行った上で施行した。

### 2.2 肺転移モデル

先行研究[8]に従い、以下のように *C57BL/6* マウスで腫瘍モデルを確立した。まず、*Lewis* 肺癌(*3LL*)細胞に対して 10%ウシ胎児血清を加えたダルベッコ改変イーグル培地(*DMEM*)で培養し増殖させた。細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水(*PBS*)中で単一細胞懸濁液とした。*3LL* 細胞( $3 \times 10^5$ 個)を 0.2mL の *PBS* に懸濁し、尾静脈より注射した。注射後 3 日目に片肺全摘術(後述)を施行した。術後 21 日目に、肺を摘出し、肺表面上の転移巣を確認し、手術用顕微鏡(倍率 4 倍)を用いて計測した。

### 2.3 手術手技

マウスはペントバルビタールを 100mg/kg で麻酔した。20G のサーフロー®留置針(テルモ株式会社、東京、日本)で気管内挿管を行い、齧歯類用人工呼吸器と接続し、呼吸数毎分 100 回、一回換気量 10ml/kg、吸入酸素 21%を維持した。20mm の皮膚切開による後側方開胸を第 5 肋間で行った。対照群(*SHAM*群)では、肺全摘を行わず開胸のみ行った。手術群(充填術のない肺全摘群)では、左肺が摘除された。すなわち、左肺動脈と左肺静脈、左主気管支を、肺全摘前に肺門で縫合糸により結紮した。第 5 肋間は 1 箇所ですべて結紮して閉じ、皮膚と筋肉は 3 針で縫合した。その他の手術群(充填術を行った肺全摘群)では、ポリプリピレン製のビーズ状人工物(PP 球:アズワン株式会社、大阪、日本)を肺摘除後の腔に充填した。人工物は重量 50mg、直径 3/16 インチで、残存右肺が術後に成長することを抑制するように左肺全摘後の左胸腔に充填した。これらの人工物が生理的な右肺容量に相当するように、それぞれのマウスに 5 個のビーズ状人工物を充填した。決められた期日ごとにペントバルビタール麻酔の後に下大静脈より失血させることで犠牲死させた。

### 2.4 ELISA

肺から放出される monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1/CCL2)(ケモカイン調節マクロファージ)を定量評価するために、術後 7 日目に右肺の切除を行い、メスを用いて細切し、10%ウシ胎児血清を加えた *DMEM* 中で 12 時間培

養を行った。その後、培地を回収し、マウス酵素結合免疫吸着アッセイキット (R&D システムズ社、ミネアポリス、アメリカ) を使い、規定の方法に従い MCP-1 の濃度を測定した。それぞれの MCP-1 値は、湿潤肺重量で補正した。

## 2.5 組織学的分析

組織学的分析のため、残存右肺は 15cmH<sub>2</sub>O の圧力で 10%緩衝ホルマリンを気管内より注入し伸展固定した。圧力をかけたまま気管支を結紮し 24 時間固定した。残存右肺の容積は volume displacement 法 [9] を用いて測定した。その後、肺組織はパラフィンで固定し、5  $\mu$  m の切片を作成した。すべての肺泡領域から無作為に 10 視野(倍率 200 倍)を選び、Image J pro を用いて、視野当たりの肺泡数、総肺泡面積を測定した。平均肺泡面積は総肺泡面積を肺泡数で割ることで算出した。CD68 免疫染色は次のように行った。一次抗体は抗 CD68 マウスモノクローナル抗体(Abcam, ケンブリッジ、イギリス)を使用した。二次抗体は、抗ラビット Ig ImmPRESS(Dako、グロストラップ、デンマーク)を用いた。染色は 3, 39-diaminobenzidine を用いて発色させた。少なくとも 5 つの無作為に選択した視野(倍率 200 倍)を用いて CD68 陽性細胞をカウントし、その平均値を統計解析に用いた。そのスライドはコード化され、群別が識別できない状態で 2 名 (佐野、上田) により評価された。

## 2.6 肺重量測定

切除された残存右肺は、湿重量を測定した後に、95°C 24 時間の乾燥オーブンをを用いて乾燥させ、再び測定し乾燥重量とした。

## 2.7 統計学的分析

全てのデータは平均値±標準誤差で表し、統計的有意差は対応のない t 検定を用いた。p<0.05 をもって統計学的有意差ありとした。

## 第3章 結果

### 3.1 左肺全摘後の代償性肺成長

**SHAM** 群と比べて、左肺全摘のみでは術後 7 日目の残存肺の湿重量( $0.20 \pm 0.04$  g vs.  $0.41 \pm 0.06$  g,  $P < 0.001$ , **Fig. 1A**)、乾燥重量( $94.3 \pm 2.1$  mg vs.  $183.0 \pm 2.0$  mg,  $P < 0.001$ , **Fig. 1B**)、肺容積 ( $0.25 \pm 0.06$  mL vs.  $0.44 \pm 0.04$  mL,  $P < 0.001$ , **Fig. 1C**) が有意に増加した。一方で、肺胞数( $63.9 \pm 12.8$ /field vs.  $59.1 \pm 10.7$ /field,  $P > 0.1$ , **Fig. 2A**)、総肺胞面積 ( $2436 \pm 213$   $\mu\text{m}^2$ /field vs.  $2341 \pm 182$   $\mu\text{m}^2$ /field,  $P > 0.1$ , **Fig. 2B**)、平均肺胞面積  $40.0 \pm 10.4$   $\mu\text{m}^2$ / alveolus vs.  $41.3 \pm 10.2$   $\mu\text{m}^2$ /alveolus,  $P > 0.1$ , **Fig. 2C**)は群間で差がなかった。充填術を行った左肺全摘群では、術後 7 日目の残存肺の湿重量 ( $0.23 \pm 0.04$  g, **Fig. 1A**)、乾燥重量 ( $103.5 \pm 18.4$  mg, **Fig. 1B**)、肺容積 ( $0.28 \pm 0.03$  mL, **Fig. 1C**) の増加は抑制された(いずれも **SHAM** 群との間で有意差なし)。また、肺胞数 ( $59.7 \pm 13.5$ /field, **Fig. 2A**)、総肺胞面積 ( $2479 \pm 224$   $\mu\text{m}^2$ /field, **Fig. 2B**)、平均肺胞面積 ( $43.7 \pm 11.3$   $\mu\text{m}^2$ /alveolus, **Fig. 2C**) はいずれの群間とも差がなかった。

Fig 1

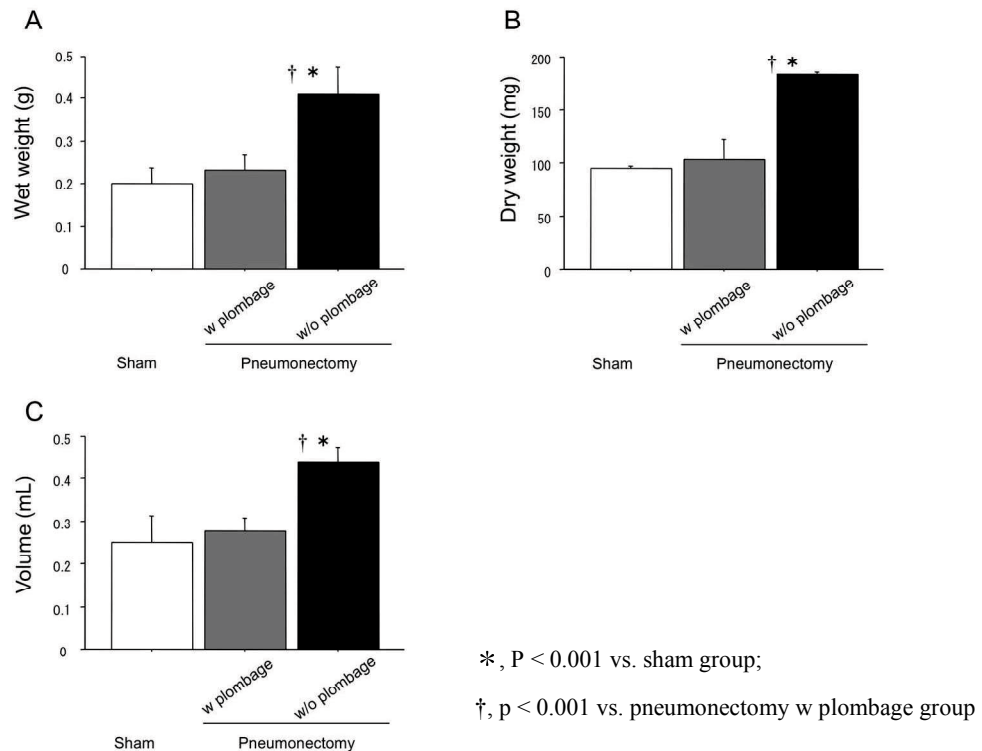


Fig 1. 術後 7 日目の残存肺の湿重量(A)、乾燥重量(B)、肺容積(C)

**SHAM** 群と比べて左肺全摘のみ(w/o plombage)では有意な湿重量( $p = 0.001$ )、乾燥重量( $p < 0.001$ )、肺容積( $p < 0.001$ )の増加を認めた。充填術を行った左肺全摘群(w plombage)では **SHAM** 群と比べて湿重量、乾燥重量、肺容積いずれも増加を認めなかった(いずれも  $p > 0.1$ )。

Fig 2

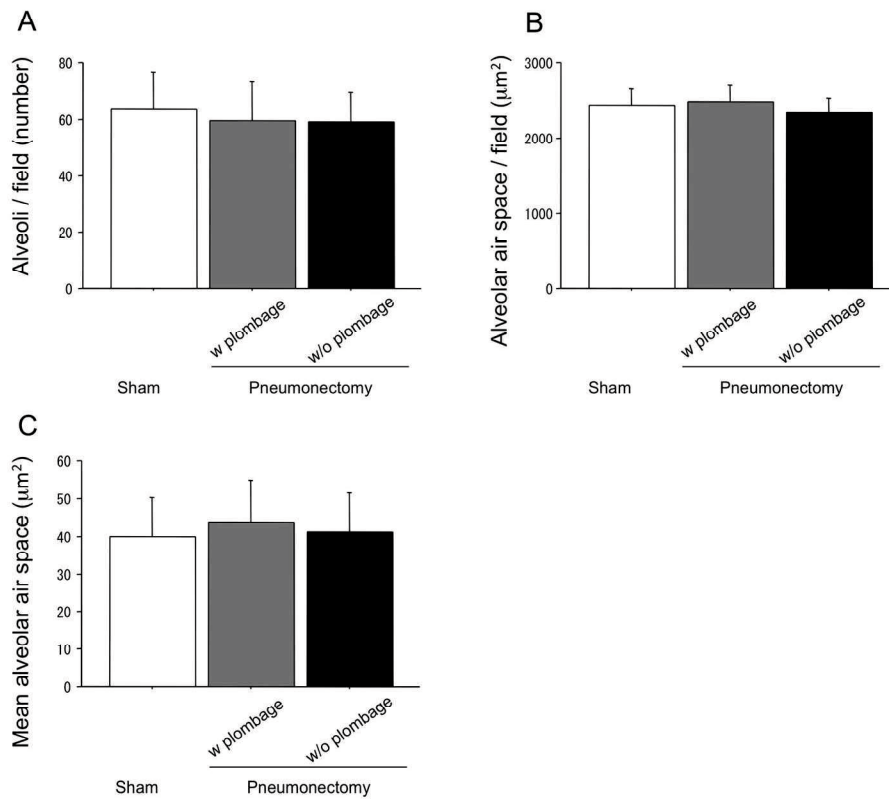


Fig 2. 術後 7 日目の残存肺の肺胞数(A)、総肺胞面積(B)、平均肺胞面積(C)

SHAM 群と比べて左肺全摘のみ(w/o plombage)と充填術を行った左肺全摘群(w plombage)ともに、肺胞数、総肺胞面積、平均肺胞面積に有意な差はなかった(いずれも  $p>0.1$ )

### 3.2 左肺全摘後の残存右肺での腫瘍進展

手術の 3 日前に尾静脈より 3LL 細胞を静注すると、術後 21 日目に SHAM 群と比べて左肺全摘群では、残存肺において有意に多数の転移巣が形成された ( $14.2 \pm 7.8$  vs.  $47.7 \pm 10.7$ ,  $P<0.001$ , **Fig 3**)。充填術を行った左肺全摘群では、充填術を行わない群と比べて転移巣の数は少なかった ( $22.0 \pm 14.3$  vs.  $47.7 \pm 10.7$ ,  $P=0.006$ , **Fig 3**)。

Fig 3

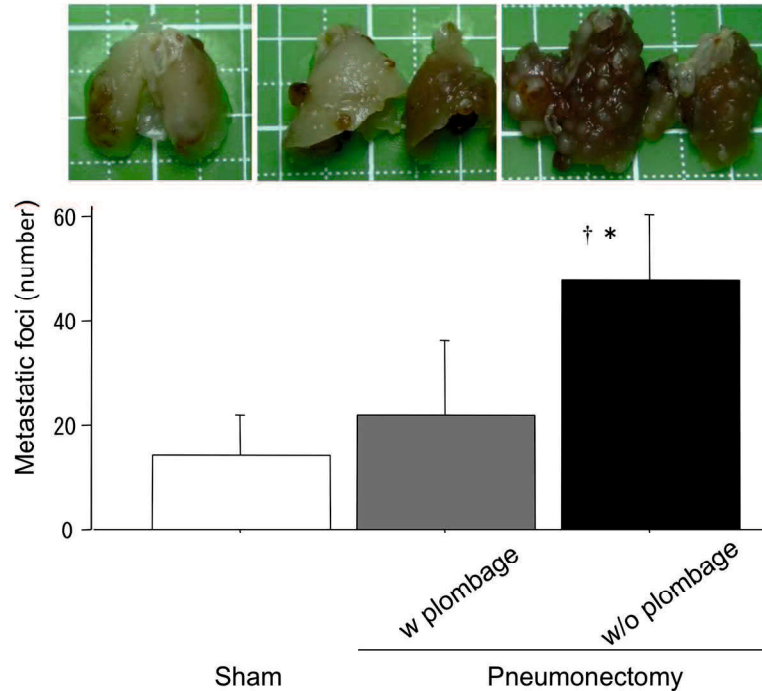


Fig 3. 術前に経静脈的に 3LL 細胞( $3 \times 10^5$  個)を投与された術後の残存肺。

手術 3 日前に 3LL 細胞が投与され、術後 21 日目に SHAM 群と比べて左肺全摘群(w/o plombage)では有意に多数の転移巣を認めた(\*,  $14.2 \pm 7.8$  vs.  $47.7 \pm 10.7$ ,  $P < 0.001$ )。充填術を行った左肺全摘群(w plombage)は左肺全摘群と比べて転移巣の数は少なかった(†,  $22.0 \pm 14.3$  vs.  $47.7 \pm 10.7$ ,  $p = 0.006$ )。

### 3.3 肺細胞から放出される MCP-1

術後 7 日目の右肺から放出される MCP-1 値を **Figure 4** に示す。術後 7 日目の MCP-1 値は、左肺全摘のみの群において SHAM 群と比べて有意に高値であった ( $73.2 \pm 17.7$  ng/g tissue vs.  $12.2 \pm 4.3$  ng/g tissue,  $P < 0.001$ , **Fig. 4**)。充填術を行った左肺全摘群では左肺全摘のみの群と比べて MCP-1 値は低値であった ( $45.0 \pm 10.4$  ng/g tissue vs.  $73.2 \pm 17.7$  ng/g tissue,  $P = 0.015$ , **Fig. 4**)。



Fig 4

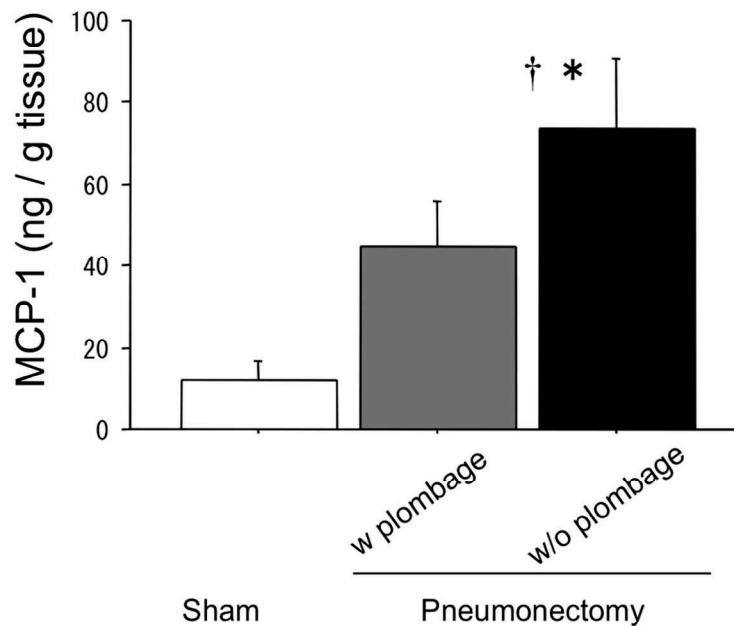


Fig 4. 術後7日目の残存肺から放出される MCP-1

左肺全摘群(w/o plombage)では Sham 群と比べて有意に高値であった(\*, 73.2 ± 17.7 ng/g tissue vs. 12.2 ± 4.3 ng/g tissue p<0.001)。充填術を行った左肺全摘群(w plombage)では左肺全摘のみと比べて有意に低値であった(†, 45.0 ± 10.4 ng/g tissue vs. 73.2 ± 17.7 ng/g tissue, P=0.015)。

### 3.4 腫瘍辺縁部に集積する CD68+細胞

免疫組織学的分析では、腫瘍関連マクロファージが示唆される CD68 陽性細胞が腫瘍辺縁部において観察された。SHAM 群と比較すると、左肺全摘のみの群では CD68 陽性細胞の集積が顕著であった (55.4 ± 28.1/field vs. 9.4 ± 8.2/field, P<0.001, Fig. 5)。充填術を行った左肺全摘群では、左肺全摘群と比べて CD68 陽性細胞の集積が軽減した (20.3 ± 8.7/field vs. 55.4 ± 28.1/field, P=0.010, Fig. 5)。

Fig 5

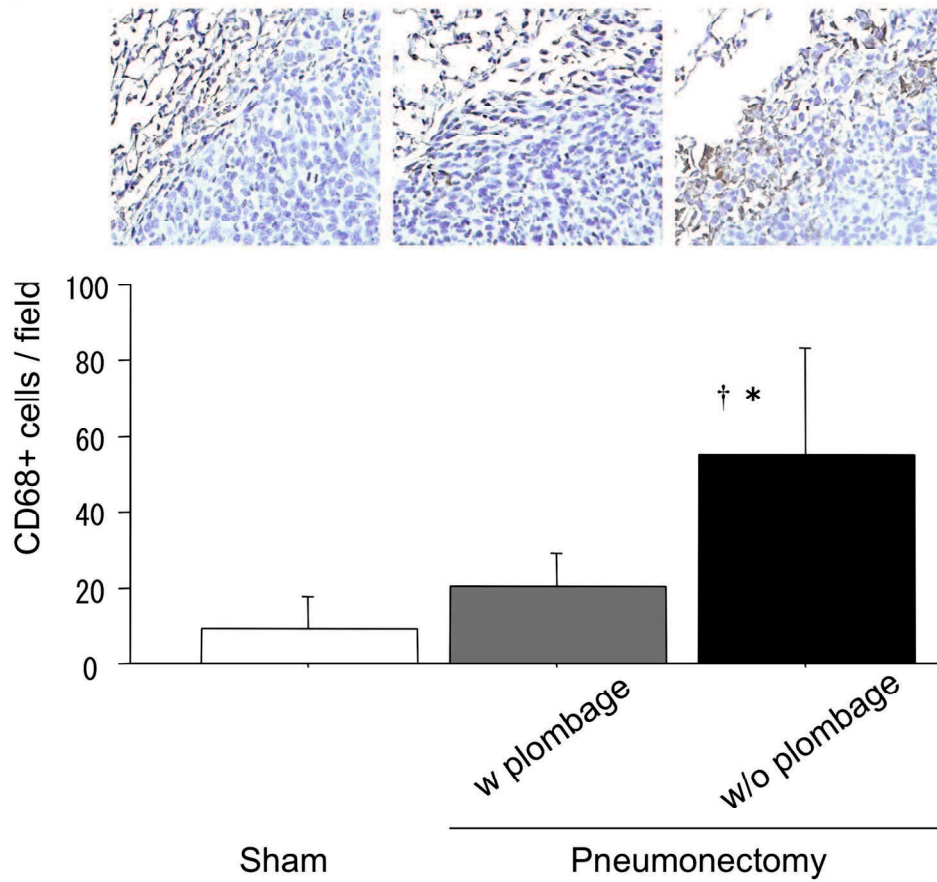


Fig 5. 残存肺の腫瘍周辺に集積する CD68 陽性細胞

SHAM 群と比較して左肺全摘群(w/o plombage)では CD68 陽性細胞の集積が多かった(\*,  $55.4 \pm 28.1/\text{field}$  vs.  $9.4 \pm 8.2/\text{field}$ ,  $P < 0.001$ )。充填術を行った左全摘群(w plombage)では左肺全摘群と比べて CD68 陽性細胞の集積が少なかった(†,  $20.3 \pm 8.7/\text{field}$  vs.  $55.4 \pm 28.1/\text{field}$ ,  $P=0.010$ )。

## 第4章 考察

代償性の臓器成長は、臓器の一部が損傷したり切除されたり、その機能が低下した後に引き起こされる反応である [10]。代償性成長は、機能的な需要が増すことによっても惹起される [11]。代償性成長は、細胞単位のサイズの増加(肥大)や細胞分裂による細胞数の増加(過形成)、もしくはその両方によってもたらされる。肺切除後の代償性成長は、主として肺葉切除後の残存肺に負荷される物理的伸展刺激の増加により惹起される [12]。本研究では、肺切除後の胸腔を人工物で充填することによって、残存肺への物理的伸展刺激を解除したモデルを確立した。このモデルでは、片肺全摘術後 7 日目において明らかに代償性成長が抑制された。このモデルを用いることで、肺全摘後に惹起される肺成長は、主として物理的伸展刺激によって惹起されるのであり、手術侵襲ではなく、成長肺そのものが腫瘍にとって好適な環境であることを検討することができた。その結果、肺成長は肺細胞からの MCP-1 の放出を介して腫瘍進展に寄与している可能性が示唆された。この結果は、肺切除後の肺内再発の予防戦略において MCP-1 に着目すること意義を支持するものである。

近年では、成人においても代償性肺成長が起こることが報告されている [13]。しかし、肺成長の程度は加齢によって減少すると考えられている。加えて、肺成長を惹起させるには相当量の肺切除が必要とされていることを考えると、高齢の肺癌患者における単一肺葉切除では肺成長を期待することは難しいかもしれない。一方で、肺癌患者における 10 亜区域切除を超える肺葉切除では、残存肺に代償性肺成長に準じた代償性反応を惹起することが報告されている。このような残存肺の代償反応は単なる肺の過膨張ではなく、CT 値によって推測された肺重量の増加およびスパイロメトリーで測定される肺機能の改善を伴っていた [14]。また、実験動物において、閾値に満たない肺切除では代償性肺成長を認めないものの、肺胞上皮細胞の増加による残存肺の重量増加を明らかにしている [15]。このような残存肺の代償反応は肺成長に類似していることを考えると、肺癌術後の患者における MCP-1 測定は意義深いものと考えられる。

MCP-1 は単球/マクロファージの集積や浸潤を調節する重要なケモカインの一つである [16]。MCP-1 は、線維芽細胞および内皮細胞、上皮細胞、平滑筋、メサンギウム、星状細胞、単球、および小グリア細胞など多数の細胞により生理的環境下で産生されるが、酸化ストレス、サイトカイン、または成長因子によって産生が刺激される [17]。MCP-1 は直接的または間接的に血管新生に関与することで腫瘍の進展に寄与していることが知られている [18]。例えば、腫瘍細胞における MCP-1 の発現は、乳癌患者における腫瘍関連マクロファージの浸潤やマクロファージによる血管新生、及び低い生存率と正の相関がある [19]。興味深いことに、我々の結果では腫瘍細胞そのものではなく、腫瘍周辺の環境における

MCP-1 の発現が、マクロファージの腫瘍内浸潤や腫瘍の進展に関与していることが示唆された。この推察を実証するためには MCP-1 に対する抑制試験が必要ではあるが、腫瘍の増殖は MCP-1 によって直接的に、もしくは、MCP-1 によって集積したマクロファージを介して間接的に促進されていることが示唆される。

我々の結果では、残存肺組織から放出される MCP-1 の増加は肺への物理的伸展刺激によって活性化された肺成長反応を反映していると推察される。MCP-1 は主に線維芽細胞や内皮細胞から放出されるとされているが、物理的伸展刺激から強く影響を受けると思われる肺胞上皮細胞も MCP-1 分泌を調整していると考えられる。In vitro において伸縮自在な培養皿を用いた、周期的伸展刺激を負荷した培養により肺胞上皮や血管平滑筋からの様々なサイトカインと成長因子を分泌促進させ細胞増殖を導くことが報告されている[20.21]。MCP-1 の産生の基本的な伝達経路を明らかにすることは、肺の微小転移を有する患者に対する良い治療標的を同定するのに役立つ。

本研究は、幾つかの問題点がある。第一に、残存肺からの MCP-1 の放出を阻害することで、腫瘍の進展を抑制することができるか、もしくは代償性肺成長が抑制されるかどうかは不明のままである。この問題は、MCP-1 を治療標的であると結論付ける前に明らかにする必要がある。第二に、CD68 陽性細胞は主に大きな腫瘍の辺縁部に集積したが、CD68 陽性細胞には腫瘍進展を促進、または抑制する亜型が存在することを考えると、CD68 細胞が腫瘍進展に真に寄与したか否かを証明する必要がある。これらのマクロファージの詳細を明らかにすることで我々の結果はより信用深いものとなるであろう。

## 第5章 結語

肺切除による物理的伸展刺激は肺成長を活性化させ、そのことによって腫瘍に好適な微小環境を作っていると示唆された。手術侵襲の低減化と同様に局所の微小環境へ修飾を加えることは、肺癌手術後の治療成績を向上させるための意義深い戦略となり得る。

## 第6章 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜った山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）、上田和弘先生、濱野公一教授に深謝申し上げます。また、実験のご指導を頂きました西本新先生（山口大学大学院器官病態外科学講座）、上野耕司先生（山口大学大学院器官病態外科学講座）、細山徹先生（山口大学大学院器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

## 第7章 参考文献

1. Martini N, Bains MS, Burt ME, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 109: 120-9.
2. Ueda K, Sano F, Murakami J, et al. Does pulmonary resection promote the progression of unresected ground-glass nodules? *Anticancer Res.* 2014; 34: 7401-6.
3. Li TS, Kaneda Y, Ueda K, Hamano K, Zempo N, Esato K The influence of tumour resection on angiostatin levels and tumour growth--an experimental study in tumour-bearing mice. *Eur J Cancer.* 2001; 37: 2283-8.
4. Takemoto Y, Li TS, Kubo M, et al. Operative injury accelerates tumor growth by inducing mobilization and recruitment of bone marrow-derived stem cells. *Surgery.* 2011; 149: 792-800.
5. Kondo E, Koda K, Takiguchi N, et al. Preoperative natural killer cell activity as a prognostic factor for distant metastasis following surgery for colon cancer. *Dig Surg.* 2003; 20: 445-51.
6. Brown LM, Welch DR, Rannels SR B16F10 melanoma cell colonization of mouse lung is enhanced by partial pneumonectomy. *Clin Exp Metastasis.* 2002; 19: 369-76.
7. Hsia CC, Wu EY, Wagner E, Weibel ER Preventing mediastinal shift after pneumonectomy impairs regenerative alveolar tissue growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281: L1279-87.
8. Li TS, Kaneda Y, Ueda K, Hamano K, Zempo N, Esato K The influence of tumour resection on angiostatin levels and tumour growth--an experimental study in tumour-bearing mice. *Eur J Cancer* 2001;37: 2283-8.
9. Scherle W A simple method for volumetry of organs in quantitative

- stereology. *Mikroskopie* 1970;26:57-60.
10. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. (2006). *Vander's Human Physiology: The Mechanisms Of Body Function* (10 ed.). Boston, Mass: McGraw-Hill Companies. pp 383.
  11. Goss RJ Kinetics of compensatory growth. *Q Rev Biol.* 1965; 40: 123-46.
  12. ad hoc Statement Committee, American Thoracic Society. Mechanisms and limits of induced postnatal lung growth. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 319-43.
  13. Butler JP, Loring SH, Patz S, Tsuda A, Yablonskiy DA, Mentzer SJ Evidence for adult lung growth in humans. *N Engl J Med.* 2012; 367: 244-7.
  14. Mizobuchi T, Wada H, Sakairi Y, et al. Spirometric and radiological evaluation of the remnant lung long after major pulmonary resection: can compensatory phenomena be recognized in clinical cases? *Surg Today.* 2014; 44: 1735-43.
  15. Hsia CC, Herazo LF, Fryder-Doffey F, Weibel ER Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy. *J Clin Invest.* 1994; 94: 405-12.
  16. Leonard EJ, Yoshimura T Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today.* 1990;11: 97-101.
  17. Yoshimura T, Takeya M, Takahashi K, Kuratsu J, Leonard EJ Production and characterization of mouse monoclonal antibodies against human monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol.* 1991; 147: 2229-33.
  18. Conti I, Rollins BJ CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14: 149-54.
  19. Ueno T, Toi M, Saji H, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6: 3282-9.
  20. Yamashita O, Yoshimura K, Nagasawa A, et al. Periostin links mechanical strain to inflammation in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One.* 2013; 8: e79753.
  21. Wang Y, Huang Z, Nayak PS, Sanchez-Esteban J An experimental system to study mechanotransduction in fetal lung cells. *J Vis Exp.*

2012;(60). pii: 3543.