

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：30120

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14615

研究課題名(和文)肝特異的BrafV600変異による微小血管障害発現の解析

研究課題名(英文)The pathology of thrombotic microangiopathy induced by liver specific Brat mutation

研究代表者

山崎 弘資 (Yamazaki, Kohsuke)

日本赤十字北海道看護大学・看護学部・教授

研究者番号：20281884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞特異的に変異型Braf遺伝子を発現するマウスは肺や腎臓で血栓性微小血管障害(TMA)を引き起こし死亡する。本研究では腫瘍随伴症候群として知られるTMAの原因を解析し、病態を明らかにすることを目的とした。変異型Braf遺伝子を発現するマウス(TGマウス)の肝組織ではthrombopoietin(TPO)の発現が亢進していた。また、肝組織内のクッパー細胞では血小板の活性を促進するpodoplaninの発現が亢進していた。これらのことは肝腫瘍では腫瘍細胞からのTPO分泌過多により血小板数が増加し、podoplaninがその活性化に関与することでTMAの病態に関与していることを示している。

研究成果の概要(英文)：The Braf mutation plays a pivotal role in hepatocarcinogenesis. The liver of transgenic mice with a hepatocyte-specific human BRAFV600E mutation was entirely consisted of preneoplastic hepatocytes. These transgenic mice died due to thrombotic microangiopathy (TMA). This study was aimed to clarify the causes of TMA. Blood/tissue specimens collected from the transgenic mice were analysed haematologically/pathologically. In the transgenic mice, the liver showed thrombopoietin (TPO) overexpression, which is associated with thrombocytosis, and platelets were activated in hepatic sinusoids. Podoplanin was expressed in the Kupffer cells in the liver of the transgenic mice, indicating that platelet activation occurred via the interaction of podoplanin. TPO overproduction by BRAFV600E-mutated hepatocytes may contribute to thrombocytosis, platelet activation, while TMA due to aberrant platelet activation led to spontaneous death in some of the transgenic mice.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：肝癌 TMA

1. 研究開始当初の背景

血栓性微小血管障害 (TMA) は様々な癌で腫瘍随伴症候群としてしばしば起こるが、適切な動物モデルがないために、そのメカニズムが不明で予防法・治療法の開発は進んでいない。我々はマウス肝腫瘍で高頻度に見られる Braf 変異を肝細胞特異的に発現する transgenic mice を作製したところ、これらの肝細胞では補体成分を過剰産生するとともに自然に TMA 様症状を示して死亡した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BrafV600E/Alb-cre TG マウス (以下 TG マウス) に起こる TMA 様病態について病理形態学的所見、血液学的所見を詳細に検討し、その特性を明らかにする。

3. 研究の方法

TG マウスを系時的に屠殺し血清および全身の臓器を採取する。特に TMA の症状が顕著に形態に現れる腎糸球体、肺について病理組織学的に観察を行うとともに、末梢血血球算定、血清中のサイトカイン等の定量を行なう。

4. 研究成果

① TG マウス肺、腎における TMA 様病変の組織学的解析

TG マウス腎の糸球体では多数の血小板が膠着しており、糸球体の podocyte の形態が変化、糸球体の線維化が認められた (図 1 D~G)。また、肺では肺泡毛細血管内に血小板が多数膠着しており肺泡壁が肥厚し、肺泡が虚脱していた (図 1 J~L)。

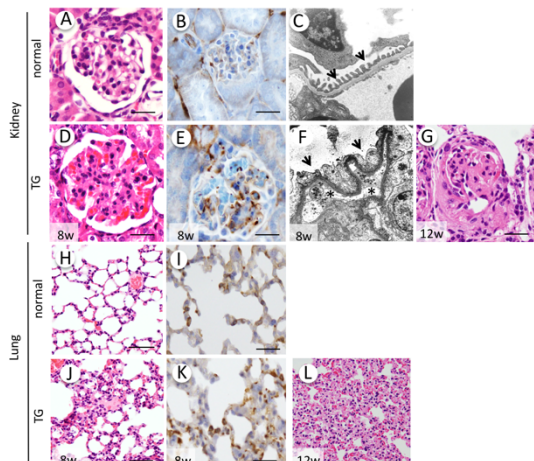


図 1 TG マウスの腎および肺組織

A~C: 正常マウスの糸球体 (HE 染色、CD61 免疫染色による血小板の染色、透過型電子顕微鏡像)。D~G: TG マウスの糸球体 (HE 染色、CD61 免疫染色による血小板の染色、透過型電子顕微鏡像、繊維化した糸球体)。H, I: 正常マウスの肺泡 (HE 染色、CD61 免疫染色による血小板の染色)。J~L: TG マウスの肺泡 (HE 染色、CD61 免疫染色による血小板の染色、虚脱した肺泡)

マウスより採取した血液の血球算定を行うと、正常マウスと比較して TG マウスの血小板数が増加していた (図 2 A)。また、骨髄、脾臓組織内において巨核球が増加していた (図 2 B)。

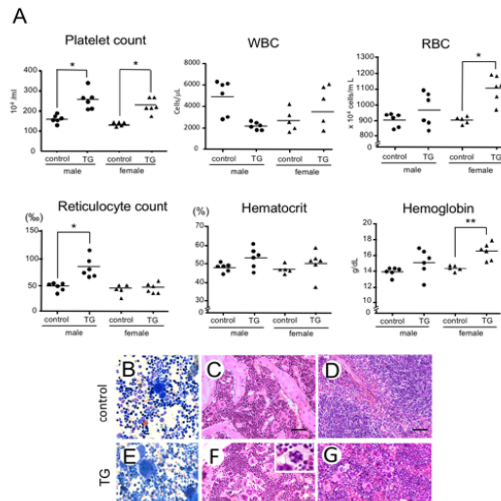


図 2 TG マウスの血液学的解析

A: 末梢血血球数算定。B~G: 骨髄、脾臓における巨核球の観察 (B, E: 骨髄塗抹標本のギムザ染色像、C, F: 骨髄の HE 染色、D, G: 脾臓の HE 染色)

③ TG マウスの肝細胞からの Thrombopoietin (TPO) 産生亢進

巨核球が多数見られたことから、その産生を促進する TPO の発現について解析を行うと、TG マウスの肝臓では TPO mRNA およびタンパク質の発現が亢進していた (図 3 A, B)。さらに、血清中の TPO 量も増加していた (図 3 C)。また、TG マウスから分離培養した肝細胞の培養上清中にも高濃度の TPO が含まれていた (図 3 D)。次に、肝臓での TPO 発現亢進には転写因子である STAT3 の活性が重要であることが報告されているため TG マウスの肝臓における STAT3 活性を解析すると亢進していることが明らかとなった (図 3 E)。

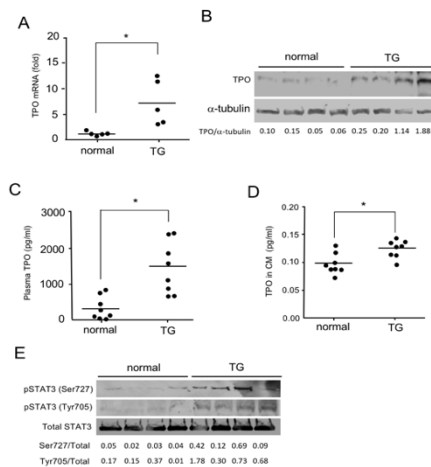


図 3 TG マウスにおける TPO 発現の解析

A: 肝組織での TPO mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 法)。B: 肝組織での TPO タンパク質発現 (ウエスタンブロット法)。C, D: TPO タンパク質の ELISA 法による定量 (マウス血清中 TPO, マウス肝細胞培養上清)。E: ウエスタンブロット法によるリン酸化 STAT3 の解析

#### ④ TG マウス肝類洞内における podoplanin の発現

末梢血血小板数は増加だけではなく、活性化することで血栓形成に関わるため、TG マウスの肝組織内における血小板の活性化に関連する解析を行った。活性化した血小板は肝組織において類洞内の類洞内皮細胞やクッパー細胞に膠着しており（図4）、これらの細胞が血小板の活性化に関与していることが明らかとなった。次に、血小板活性化蛋白質である podoplanin の発現について解析を行うと、TG マウス肝組織類洞内の一部のクッパー細胞に血小板活性化タンパク質である podoplanin 発現亢進が認められた（図5）。

以上の結果から、TG マウス肝組織では腫瘍化した肝細胞が STAT3 の活性化を介して TPO、血小板産生を促進し、一方で類洞内のクッパー細胞での podoplanin が血小板活性化に関与することで TMA を引き起こしていると考えられた。これらの結果は腫瘍随伴症候群として起こる TMA の原因の一端を示しており、臨床における予防法・治療法の開発につながる重要な知見となると思われる。

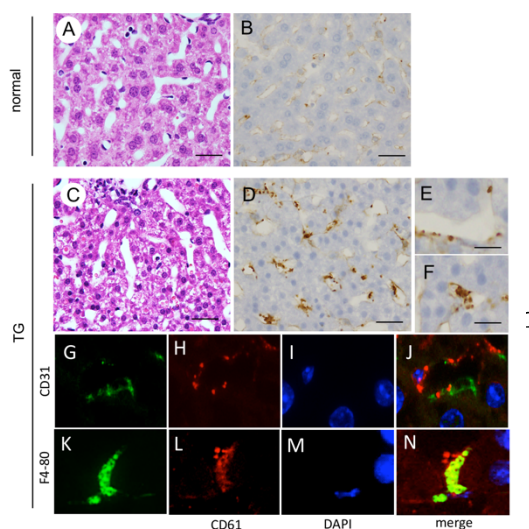


図4 TG マウス肝組織内における血小板の解析  
A, B: 正常マウス肝組織 (HE 染色、CD61 免疫染色による血小板の染色)。C~F: TG マウス肝組織 (HE 染色、CD61 免疫染色による血小板の染色)。G~J: TG マウス肝組織における CD31 抗体 (緑) による類洞内皮の染色と CD61 抗体 (赤) による血小板の染色。K~N: TG マウス肝組織における F4-80 抗体 (緑) によるクッパー細胞と CD61 抗体 (赤) による血小板の染色。

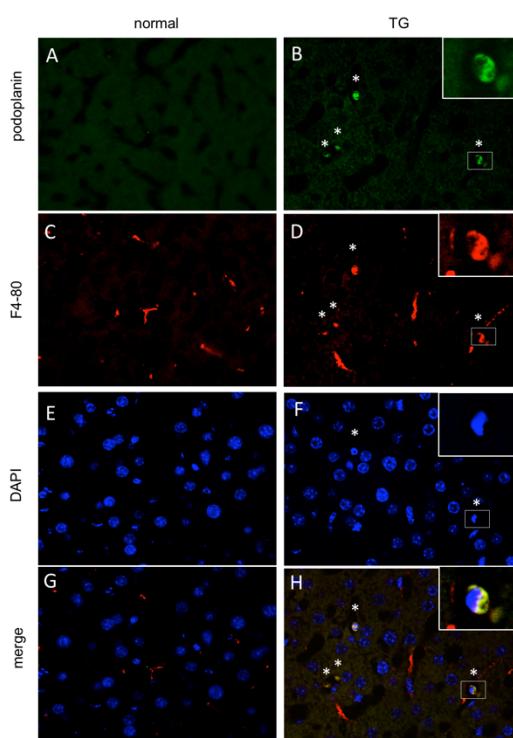


図5 TG マウスクッパー細胞における podoplanin の発現  
A, C, E, G: 正常マウス肝組織。B, D, F, H: TG マウス肝組織。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Hiroki Tanaka, Kie Horioka, Masahiro Yamamoto, Masaru Asari, Katsuhiko Okuda, Seiji Ohtani, Kosuke Yamazaki, Keiko Shimizu, Katsuhiko Ogawa  
Podoplanin expression in Kupffer cells and platelet deposition on the hepatic sinusoidal cells in the liver of transgenic mice with a hepatocyte-specific human BRAFV600E mutation  
AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
- ② Hiroki Tanaka, Kie Horioka, Masahiro Yamamoto, Masaru Asari, Katsuhiko Okuda, Seiji Ohtani, Kosuke Yamazaki, Keiko Shimizu, Katsuhiko Ogawa  
Over-production of thrombopoietin in the liver of transgenic mice with liver-specific human BrafV600E expression  
AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 弘資 (YAMAZAKI, Kosuke)  
日本赤十字北海道看護大学・  
看護学部・教授  
研究者番号：20281884

### (2) 研究協力者

田中 宏樹 (Tanaka, Hiroki)