

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：37409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17597

研究課題名（和文）血小板製剤を使用した肝疾患における新規治療法確立を目指した基礎研究

研究課題名（英文）Basic research for treating liver disease by using platelet concentrates

研究代表者

登尾 一平（Noboru, Ipei）

熊本保健科学大学・保健科学部・講師

研究者番号：00832007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、輸血用血小板製剤中の血小板が肝機能を改善させるメカニズムを解明することを目的としている。まず、保管血小板の血小板機能や表面マーカーなどの経時変化を解析したところ、脱シアル化血小板が経時的に増加することを見出した。さらに、脱シアル化血小板がヒト肝癌細胞由来株である HepG2 細胞に及ぼす影響を検討したところ、脱シアル化血小板添加により HepG2 細胞の増殖が促進され、HepG2 細胞内の ERK1/2 や p38 MAPK がリン酸化された。これらの結果より、脱シアル化血小板は肝細胞の増殖促進作用をもつ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、肝再生に血小板が関与することは報告されているが、本研究により、血小板を保管することにより増加した老化血小板（脱シアル化血小板）が肝細胞の増殖を促進する効果があることが明らかとなった。これらの研究成果は、血小板または血小板製剤を用いた肝疾患に対する新規治療法につながる可能性があり、社会的意義は高いと言える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the mechanism by which platelets in transfusion platelet preparations improve liver function. First, we analyzed the temporal changes in platelet function and surface markers of stored platelets, revealing an increase in desialylated platelets over time. Furthermore, we examined the impact of desialylated platelets on the human liver cancer cell line HepG2. The addition of desialylated platelets promoted the proliferation of HepG2 cells and led to the phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK within these cells. These results suggest that desialylated platelets may have a proliferative effect on liver cells.

研究分野：内科学一般関連

キーワード：脱シアル化血小板 HepG2細胞 ERK1/2 p38 MAPK

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血小板は外傷などで損傷した血管の損傷部位に粘着・凝集し、止血を行うことが主な役割であるが、血小板から放出された **serotonin** や血管内皮増殖因子によって創傷治癒や組織再生にも関与する。**Ohkohchi** らのグループによる先行研究では、血小板が肝細胞に及ぼす影響について詳細に検討を行い血小板輸血による慢性肝疾患患者の肝機能改善効果を報告している (**Maruyama T, et al. Tohoku J. Exp. 2013**)。しかしながら、慢性肝疾患患者に対して **thrombopoietin (TPO)** 受容体作動薬を投与し内因性に血小板を増加させても肝機能改善は認められなかった (**Kurokawa T, et al. Tohoku J. Exp. Med. 2016**) ことから **ex vivo** における血小板自体の質的变化、特に膜表面の構造および機能的変化が肝機能改善に重要であると推測しているが、その詳細は不明である。

一方、申請者らは、重炭酸塩の止血薬としての可能性を検証する過程で、保管血小板製剤中に血小板膜蛋白である **glycocalicin (GC)** が増加すること、老化マーカーである **phosphatidylserine (PS)** が陽性である血小板および **microparticle (MP)** が保管とともに増加し、凝固促進させることを見出した。また、これらの成果に加え、肝切除したマウスに血小板輸血を行ったところ、血小板が肝再生を促進することも明らかにしている。

これらの研究結果を踏まえ、血小板による肝機能改善には、保管に伴う血小板自体の質的变化、特に膜表面の構造および機能的変化が重要であると予測される。近年、glycoprotein (GP) Iba の先端のシアル酸が喪失された脱シアル化血小板が肝細胞上の **Ashwell-Morell receptor (AMR)** に結合しクリアランスされるとともに、肝細胞より **TPO** が産生されるという新たなクリアランス機構が報告された (**Grozovsky R, et al. Nat Med. 2015**)。

我々は、血小板製剤による肝機能改善効果は、血小板製剤中の脱シアル化血小板が肝細胞に影響を及ぼす可能性を考え、保管血小板の **PS** や脱シアル化血小板の経時変化や **GC** などその他糖タンパクの機能を解析するとともに、血小板が肝細胞の再生を促進する分子メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

本研究は、肝疾患における新規分子標的治療薬開発のための基礎研究および新規治療法の確立を目指すことを最終目的としている。そこで、保管血小板中の血小板の経時変化を詳細に解析し、保管血小板の質的または機能変化が肝細胞増殖を促進するか否かを検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 血小板保管後の血小板機能解析

健常者より採血し、**platelet rich plasma (PRP)** を作成し、専用バッグに保管後、以下の評価を行った。

血小板機能 (血小板惹起物質: **ADP**、**collagen** など) や血小板粘着能 (**collagen**、**fibrinogen** などへの血小板接着・形態変化を蛍光顕微鏡で観察)、血小板活性化マーカーである **P-selectin** や **PS** の露出、血小板膜糖タンパクである **GPIIb/IIIa (CD42b)**、**GPIIb (CD41)** の発現を解析した。血小板老化の測定は血小板の脱シアル化を **Ricinus communis Agglutinin 1 (RCA-1)** で染色し、**flow cytometry** を用いて解析した。

本研究はヒト血液を用いるため熊本保健科学大学 人を対象とする医学系研究に関する倫理審査に申請し、既に承認済み (承認番号: **18055**) である。

(2) 脱シアル化血小板添加による肝細胞増殖効果

保管後の血小板は経時的に脱シアル化していたことから、脱シアル化血小板が肝細胞へ及ぼす影響を検討する。まず、**Clostridium perfringens** 由来の **Neuraminidase** を用いて血小板の脱シアル化誘導を検討する。次に作製した脱シアル化血小板をヒト肝がん由来細胞株 (**HepG2** 細胞株) に添加し、増殖能や細胞周期を解析する。

さらに、脱シアル化血小板による肝細胞内の細胞情報伝達系を **JAK2** や **STAT3**、**ERK1/2**、**p38 MAPK** のリン酸化を **western blotting** で検討する。

4. 研究成果

(1) 保管血小板の **ex vivo** における機能的変化や膜糖タンパク発現の解析

保管血小板の血小板凝集能は経時的に低下しており、**P-selectin** 発現血小板や **PS** 露出血小板、さらに脱シアル化血小板は経時的に増加した (図 1)。また、**CD41** の発現に変化はみられなかったが、**CD42b** の発現は経時的に低下した。

保管血小板の **CD42b** の発現が保管するに従い低下していたことから、保管血小板上清には **CD42b** の断片 (**GC**) が存在する可能性が示唆された。

そこで上清中の GC 濃度を **ELISA** を用いて測定したところ、保管するにつれて増加していることが明らかとなった。

(2) 脱シアル化血小板の機能解析

脱シアル化血小板の血小板凝集能は、対照と比較して **collagen** や **ristocetin**、**ADP**、全ての惹起物質に対して凝集能は増強していた。脱シアル化血小板の粘着能は、**collagen**、**fibrinogen** をコートしたチャンバースライドに脱シアル化血小板を添加し、粘着率を測定したところ、**fibrinogen** コートしたチャンバースライドで粘着能が亢進した。健常者 30 名の脱シアル化血小板を解析したところ、陽性率の平均は $7.1 \pm 11.7\%$ であった。年齢、性別との相関は認められなかったが、血小板数と正の相関がみられた。

(3) 脱シアル化血小板は HepG2 細胞を増殖させる

HepG2 細胞に脱シアル化血小板を添加し、その増殖能を **WST** アッセイで検証した。その結果、脱シアル化血小板添加群は、血小板添加群および未添加群と比較して有意に増殖した(図 2)。さらに、**Cell Cycle** アッセイを用いた **HepG2** 細胞内の細胞周期解析では、脱シアル化血小板を添加して 6 時間後に **G2/M** 期の細胞が有意に増加した。これらの結果から、脱シアル化血小板が **HepG2** 細胞の増殖を促進する可能性が示唆されたため、**HepG2** 細胞内の情報伝達経路を解析した。

解析の結果、脱シアル化血小板添加による **JAK2** と **STAT3** のリン酸化は認められなかったが、**ERK1/2** および **p38 MAPK** がリン酸化されたことが明らかになった(図 3,4)。さらに、**ERK1/2** および **p38 MAPK** の阻害剤を用いて増殖能を検討したところ、脱シアル化血小板添加による増殖促進効果は抑制された。

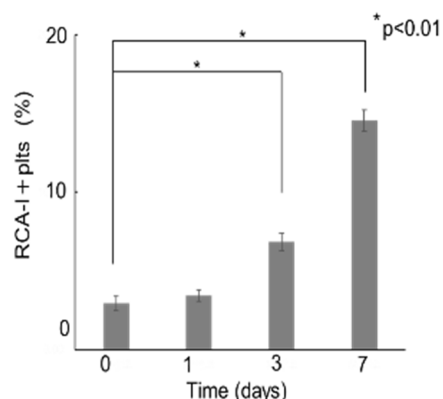


図 1. 脱シアル化血小板陽性率の経時変化

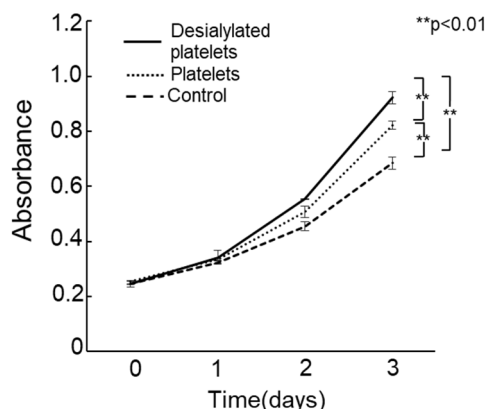


図 2. HepG2 細胞の増殖

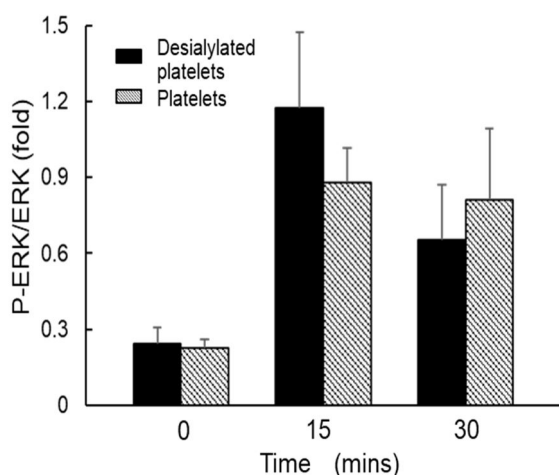


図 3. Phospho-ERK1/2 の経時変化

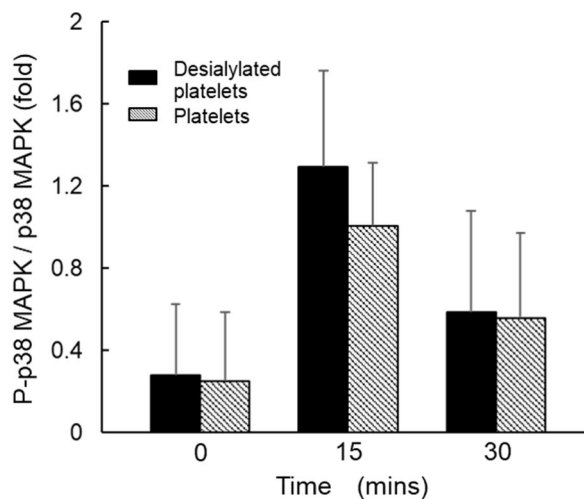


図 4. Phospho-p38 MAPK の経時変化

5. 今後の展望

以上の結果より、脱シアル化血小板が **HepG2** 細胞の増殖を促進させるメカニズムとして、**ERK** や **p38 MAPK** 経路が関与する可能性が示唆された。今後は **in vivo** モデルを確立し、慢性肝炎や肝切除後の肝再生などの治療に応用できるか否か検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryosuke Suzuki, Yukinori Kozuma, Chisako Inoue, Kano Tanabe, Ippei Noboruo, Hohomi Arao, Tatsuya Kawaguchi, Nobuyuki Shimizu, Tetsuya Yamamoto	4. 巻 165
2. 論文標題 Artificial cerebrospinal fluid restores aspirin inhibited physiological hemostasis through recovery of platelet aggregation function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Neurochirurgica	6. 最初と最後の頁 1269-1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00701-022-05471-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 登尾 一平、田邊 香野、山本 隆敏、南部 雅美、橋原 真二、川口 辰哉、上妻 行則	4. 巻 14
2. 論文標題 Bernard-Soulier 症候群様疑似検体を用いた 血小板凝集能検査実習の試み	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床検査学教育	6. 最初と最後の頁 18～23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 登尾 一平、田山 親吾、小寺 千聡、松岡 雅雄、上妻 行則、内場 光浩
2. 発表標題 血小板無力症症例における血小板輸血管理の新たな試み
3. 学会等名 第71回日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 登尾 一平、内場 光浩、川口 辰哉、松岡 雅雄、上妻 行則
2. 発表標題 脱シアル化血小板が HepG2 細胞の増殖に及ぼす影響
3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ippei Noboruo, Mitsuhiro Uchiba, Tatsuya Kawaguchi, Masao Matsuoka, Yukinori Kozuma
2. 発表標題 Desialylated platelets are involved in the proliferation of HepG2 cells.
3. 学会等名 the 31st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 登尾 一平, 上妻 行則, 内場 光浩
2. 発表標題 肝細胞増殖における脱シアル化血小板の関与の可能性
3. 学会等名 Thrombosis Hemostasis Research Seminar
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 登尾 一平, 内場 光浩, 川口 辰哉, 松岡 雅雄, 上妻 行則
2. 発表標題 脱シアル化血小板がHepG2 細胞の増殖に及ぼす影響
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒尾 ほほみ, 登尾 一平, 古垣 達也, 田邊 香野, 川口 辰哉, 鈴木 保之, 平松 祐司, 上妻 行則
2. 発表標題 体外式膜型人工肺 (ECMO) 内に生ずる血栓の原因を探る ~ 模擬体外循環時に増加する脱シアル化血小板の機能解析 ~
3. 学会等名 第60回 日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 登尾 一平
2. 発表標題 Significance of measuring microparticles derived from stored platelets
3. 学会等名 The 6th Allied Health Sciences International Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登尾 一平、山本 隆敏、田邊 香野、南部 雅美、川口 哉也、内場 光浩、上妻 行則
2. 発表標題 Bernard-Soulier 症候群様疑似検体を用いた血小板凝集能検査実習の試み
3. 学会等名 第15回 日本臨床検査学教育学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登尾 一平、山本 隆、田邊 香野、川口 辰哉、上妻 行則
2. 発表標題 保管血小板におけるMPの経時的変化とその役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ippei Noboruo</I>, Takatoshi Yamamoto, Kano Tanabe, Tatsuya Kawaguchi, Katsuyoshi Ikeda, Yukinori Kozuma
2. 発表標題 Microparticles released from stored platelet increase coagulation ability.
3. 学会等名 the XXVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------