

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07357

研究課題名(和文)オキサリプラチン誘発性肝類洞閉塞症候群における血液凝固線溶系機構の解明と治療応用

研究課題名(英文)The role of blood coagulation and fibrinolysis system in the oxaliplatin-induced liver sinusoidal obstruction syndrome

研究代表者

辰巳 公平 (TATSUMI, Kohei)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70555432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：オキサリプラチンによる肝類洞閉塞症候群(SOS)の病態形成における凝固線溶因子の関与を明らかにすることを目的とした。

薬剤投与により肝臓でのPAI-1発現の増加が見られ、TF発現は低下した。PAI-1発現増加と体重減少率には有意な負の相関が見られ、PAI-1増加の病態悪化への関与が示唆された。PAI-1欠損マウスを用いた実験では、肝臓での炎症性サイトカインや線維化マーカーの発現増加が軽微であった。TF欠損マウスを用いた実験では、体重減少や死亡率が高かった。以上より、肝臓の炎症・線維化亢進に加え、PAI-1発現増加等により惹起される血栓傾向が病態増悪に関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to clarify the role of coagulation and fibrinolysis system, especially plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue factor (TF), in the diathesis of oxaliplatin-induced liver sinusoidal obstruction syndrome (SOS).

Repeated administration of oxaliplatin to the wild-type mice significantly increased PAI-1 mRNA levels in the liver, whereas TF mRNA levels were decreased. The increase rate of liver PAI-1 mRNA was significantly and negatively correlated with the rate of body weight loss of the mice. The increases of inflammatory cytokines and fibrosis markers in the liver of PAI-1 deficient mice were milder than WT mice. TF-deficient mice showed higher mortality and severe body weight loss compared with WT mice.

Therefore, in the SOS pathogenesis, PAI-1 may play an important role in accelerating liver injury by forming multiple microthrombi in the liver microcirculation, resulting in enhanced inflammation and fibrosis.

研究分野：血液学

キーワード：肝類洞閉塞症候群 凝固因子 線溶因子 PAI-1 組織因子 TF オキサリプラチン

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、全世界において2番目に多い癌で、癌死の原因としては4番目に多く、日本でも女性の癌死亡率の1位、男性では3位を占め増加傾向にある。転移は、肝臓、肺、脳への血行性転移が多い。大腸癌に対する最も一般的な化学療法プロトコルは、フルオロウラシル(5-FU)とフォリン酸(folinic acid)にオキサリプラチンを組み合わせたもの(FOLFOX)もしくはイリノテカンを組み合わせたもの(FOLFIRI)である。オキサリプラチンは、シスプラチン耐性の癌にも有効ことや腎毒性が少ないことから、その登場により特に切除不能大腸癌肝転移症例の予後は著明に改善した。しかし、オキサリプラチンを含む化学療法にはその副作用として、肝類洞拡張、肝細胞萎縮、類洞周囲の線維化等に特徴づけられる肝障害があり、**sinusoidal obstruction syndrome (SOS)**と総称される。肝転移症例の転移巣を切除する際、SOSは肝切除中の出血量増加や残肝機能の低下を引き起こしうるため、安全に肝切除を施行するためにもSOS発症を予防することが重要である。SOSは、投与薬剤による肝類洞内皮細胞の障害が本態とされているが、その詳細な機序は明らかにされていない。従って、SOS病態機序を解明しその制御法を確立することは、大腸癌全体の治療成績や予後改善において極めて重要である。

オキサリプラチン誘発性SOSは、適切な動物モデルが長年存在しなかったが、近年確立された実験プロトコルによりマウスモデルを用いた研究が可能となった(Robinson, J Hepatol. 2013)。報告論文内で著者らは、薬剤投与による類洞内皮障害が、抗線溶因子であるplasminogen activator inhibitor 1(PAI-1)や凝固因子である von Willebrand factor (VWF)等の発現増加

を惹起して肝臓内が**向凝固状態**になることが肝障害や肝線維化を亢進すると述べている(図1)。従って、SOS病態において、肝臓内で生じている向凝固状態を緩和することが病態の発症・進行の抑制につながると予想されるが、一方で、安易な抗凝固療法は逆に肝臓内の出血を増加させ病態を悪化させる可能性もある。

研究代表者はこれまで、慢性肝障害時の血栓傾向における組織因子の関与や、種々の肝病態における各種凝固・線溶因子動態に関する網羅的解析実験を行い、論文として複数報告してきた。以上の背景から、本研究において研究代表者は、SOSの病態解明および治療法確立に向け、PAI-1、組織因子(TF)、VWF等の向凝固因子の発現が欠損するマウスからSOSモデルを作製することで、SOSに最も関与する因子群を探索する。そして、同定された因子を抑制することを基盤とするSOS治療法の確立を目指すことにした。

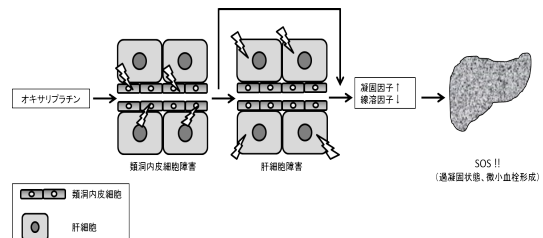


図1. 想定されるオキサリプラチン誘発性SOSの病態機序

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究は、オキサリプラチン誘発性SOSにおける血液凝固線溶系機構の解明に関する基盤的研究を完成し、その知見に基づいた新規の診断法や治療法の確立等、臨床応用展開に向けた基盤となる研究を行うことを目的とし研究を開始した。

(1) **野生型マウス**を用いた実験で、オキサリプラチン誘発性SOSにおける凝固・線溶系因子の動態を把握する。具体的には、SOS病態を組織学的に確認(肝炎症・線維化等)するとともに、肝臓および血液中の各種凝固・線

溶系因子レベルを遺伝子・タンパクレベルで網羅的に解析する。

(2) **PAI-1 欠損マウス**を用いた実験により、SOS 病態の発症・進展における線溶系因子の関与を、対照群と比較して明らかとする。

(3) **TF 欠損マウス**を用いた実験により、SOS 病態の発症・進展における凝固系因子の関与を、対照群と比較して明らかとする。

### 3. 研究の方法

オキサリプラチン誘発性 SOS マウスモデルは、既報の方法 (Robinson, J Hepatol. 2013) をベースに改変したものを採用した。まず、投与薬剤の効果を高める目的で、実験マウスの給餌を、薬剤投与 1 週間前から植物成分が除去されたものに変更する (D01060501 Research Diets Inc)。FOLFOX 化学療法を模倣する目的で、まず、蒸留水で溶解した Oxaliplatin (Sigma, 09512) を 6 mg/kg の用量で実験マウスに腹腔内投与する (投与用量は約 300  $\mu$ L)。次いで、その 2 時間後に、5-Fluorouracil (5-FU) と Folinic acid (FA) の混合溶液を同様に腹腔内投与する。5-FU (Sigma, F6627) は 50 mg/kg、FA (Sigma, F7878) は 90 mg/kg の用量で投与されるよう調整し、投与用量は 400-500  $\mu$ L とする。この 3 薬剤の投与を週 1 回の頻度で行い、SOS 発症・進展を誘導する。

実験開始後、定期的にマウスの生存状態の確認と体重測定を行い、実験終了時には各種サンプリングを行う。すなわち、下大静脈からクエン酸加での全採血を行い、血球数算定 (Sysmex XT-1800) 施行。その後、遠心分離 (4500rpm, 4°C, 15 分) にて血漿サンプルを分離して凍結保存する。摘出臓器としては、肝臓以外に、必要に応じて脾臓・腎臓・肺も摘出する。摘出臓器サンプルは、一部はホルマリン浸漬して固定した後、脱水処理施行の上、パラフィン包埋して組織ブロックを作成する。残りの臓器部分は碎切した上で凍結チュ

ーブに入れて液体窒素内で急速凍結し保管する。パラフィン包埋下組織からは組織標本を作成し、HE 染色やその他必要に応じて各種免疫染色を行うことで臓器の微細構造の形態観察を行う。凍結臓器サンプルは、Trizol を用いて total RNA を抽出し、その溶液内 RNA 濃度を NanoDrop2000 にて測定した上で、1  $\mu$ g の RNA を鋳型に cDNA を逆転写して合成する。その cDNA サンプルと TaqMan プローブを用いて real time PCR (Step One plus, Applied Biosystem) を行うことで、SOS マウスモデル内での各種遺伝子発現の変化を評価する。評価遺伝子としては、各種の炎症性サイトカイン、ケモカイン、線維化マーカー、凝固線溶因子を中心に定量評価を行う。凍結臓器サンプルは、必要に応じて、Western blotting 等のタンパク解析にも用いる。

### 4. 研究成果

#### (1) FOLFOX 投与回数についての基礎検討

C57BL/6 (8 週齢・雄) を 6 群に分け (各群 5 匹)、それぞれに FOLFOX を 0, 1, 2, 3, 4, 5 回投与し、最終投与 1 週後に屠殺した。結果、投与回数依存性に体重の減少を認め、4 回投与群にて 5 匹 1 匹、5 回投与群にて 5 匹中 4 匹の死亡個体が見られた (図 2)。

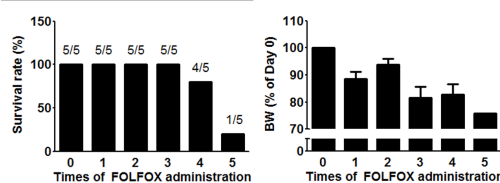


図 2. FOLFOX 投与後の生存率および体重変化

また、下大静脈採血検体を用いた血球数算定では、投与回数依存性の明らかな汎血球減少が認められた。肝臓サンプルを用いたリアルタイム PCR 解析では、FOLFOX 投与により PAI-1 mRNA の増加が見られ、非投与群に比べ、3 回投与群では 22 倍、4 回投与群では 164 倍、5 回投与群では 2600 倍の発現増加が観察された (図 3)。さらには、PAI-1 mRNA 発現増加と体重減少率には有意な相関関係が認められ、PAI-1 発現増加の病態悪化への関与が示

唆された。他の凝固関連因子としては、凝固第 X 因子 (F10)、VWF、ADAMTS13、TF の肝 mRNA 発現を解析したが、F10 と VWF は FOLFOX 複数回投与にて軽度増加傾向を示し、ADAMTS13 は FOLFOX 投与にて発現低下する傾向にあった。TF については既報論文の結果に反して低下する傾向が見られた。炎症性サイトカインについては、IL-6、TNF  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$  の発現が FOLFOX 投与にて増加した。線維化マーカーとして解析した TGF  $\beta$  1、Col1a1、 $\alpha$  SMA についても FOLFOX 投与により増加した。

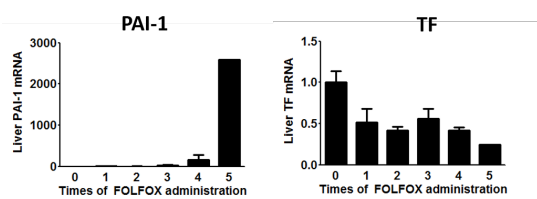


図 3. FOLFOX 投与後の肝臓での PAI-1 および TF の mRNA 発現変化

以上の変化をもたらしているのが Oxaliplatin であることを確認するため、4 群の C57BL/6 マウスを準備し、それぞれを Oxaliplatin 投与のみ、5-FU&FA 投与のみ、Oxaliplatin & 5-FU&FA 投与、PBS 投与、と割り付け、週 1 回の投与を計 3 回行い、最終投与の 1 週後に屠殺した。Oxaliplatin & 5-FU&FA 投与群では約 20%の体重減少が見られたが、Oxaliplatin のみ投与群の体重減少は約 5%で、5-FU&FA 投与群や PBS 投与群では体重減少は認めなかった。なお、死亡個体は見られなかった。血球数算定においては、Oxaliplatin のみの投与群と 3 剤投与群において汎血球減少が観察され、5-FU&FA 投与群では赤血球のみ軽度減少する傾向があった。肝臓での mRNA 発現についても、PAI-1 増加、TF 低下、炎症性サイトカイン・線維化マーカーの増加が認められたのは 3 剤投与群のみであった。以上の結果から、FOLFOX 投与により形成される病態は Oxaliplatin が主体となり形成されるものであり、5-FU や FA はその効果を増強する補助的役割を果たすものと

考えられた。

## (2) PAI-1 欠損マウスを用いた検討

PAI-1-WT (野生型) マウスおよび PAI-1-KO (欠損) マウス対して、FOLFOX もしくは PBS の投与を計 5 回施行し、最終投与 1 週後に屠殺した。5 回の投与にて WT マウスでは 7 匹中 2 匹が死亡し、KO マウスでは 10 匹中 3 匹が死亡したが、死亡率に 2 群間で有意差は認めなかった。体重減少率についても 2 群間で明らかな差は認めなかった。末梢血中の血球数算定で見られる汎血球減少や、肝臓組織標本の HE 染色にて観察される類洞拡張レベルにおいても、両群間で有意な差は見られなかった。肝臓サンプルを用いたリアルタイム PCR 解析では、WT マウス、KO マウスともに FOLFOX 投与にて炎症性サイトカイン (IL-6、TNF  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$ ) の増加を認めたが、その増加は KO マウスで緩徐であった。同様に、F10 や VWF の発現は増加したが、その増加は KO マウスにおいて緩徐であり、また、ADAMTS13 発現の低下は KO マウスで緩徐であった。なお、FOLFOX 投与による TF 発現低下は両群において見られたが、両群間での差は明らかでなかった。以上の結果は、FOLFOX 投与による肝臓 SOS の病態形成において PAI-1 欠損状態が抑制的に働いていることを示すものである。

## (3) TF 欠損マウスを用いた検討

TF-WT (野生型) マウスおよび TF-KO (欠損) マウス対して、FOLFOX もしくは PBS の投与を計 5 回施行し、最終投与 1 週後に屠殺した。なお、TF は完全欠損だと胎性致死であるため、TF 活性が正常の 1-5%残存している Low TF マウスを KO マウスとして実験に使用した。結果、5 回の投与後に、WT マウスは 5 匹中 1 匹が死亡、KO マウスは 7 匹中 4 匹が死亡し、KO マウスにて有意に高い死亡率が見られた。また体重減少についても KO マウスの方が大きい傾向にあった。

## (4) まとめ・展望

以上の結果から、FOLFOX 投与により誘導さ

れる肝臓 S0S 病態においては、薬剤投与により誘導される肝臓の炎症や線維化の亢進に加え、線溶阻止因子である PAI-1 の発現増加、凝固因子である F10 や VWF の発現増加、血栓形成制御因子である ADAMTS13 の低下、により惹起される向血栓傾向が肝臓内の多発性微小血栓形成をもたらし、炎症・線維化病態をさらに増悪させるものと推察された。各種炎症病態下ではその発現が増加することが知られている TF については、本病態においては逆に発現低下したことは興味深く、その詳細な機序解明については今後の研究課題とする。また、PAI-1 欠損マウスにおいて S0S 病態の軽減が観察されたことは非常に意義のある所見であり、PAI-1 阻害薬などで線溶系を制御することが S0S 治療に繋がることを示唆するものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Shimoide T, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Horiuchi Y, Okumoto K, Kurashimo S, Ishida M, Tatsumi K, Matsuo O, Kaji H. Role of Macrophages and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Delayed Bone Repair in Diabetic Female Mice. **Endocrinology**. 159(4):1875-1885. 2018. (DOI: 10.1210/en.2018-00085.) 査読あり
2. Kawao N, Moritake A, Tatsumi K, Kaji H. Roles of Irisin in the Linkage from Muscle to Bone During Mechanical Unloading in Mice. **Calcif Tissue Int**. 2018 in press. (DOI: 10.1007/s00223-018-0387-3.) 査読あり
3. Kawao N, Morita H, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Role of follistatin in muscle and bone alterations induced by gravity change in mice. **J Cell Physiol**. 233(2):1191-1201. 2018 (DOI: 10.1002/jcp.25986.) 査読あり
4. Kawao N, Morita H, Nishida K, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Effects of hypergravity on gene levels in anti-gravity muscle and bone through the vestibular system in mice. **J Physiol Sci**. 2017 in press. (DOI: 10.1007/s12576-017-0566-4.) 査読あり
5. Utoh R, Komori J, Kuge H, Tatsumi K, Yamada M, Hirohashi S, Tsutsumi M, Amanuma T, Yoshioka A, Nakajima Y, Wake K, Okano T, Lagasse E, Ohashi K. Adult hepatocytes direct liver organogenesis through non-parenchymal cell recruitment in the kidney. **J Hepatol**. 2017 in press. (DOI: 10.1016/j.jhep.2017.12.016.) 査読あり
6. Tatsumi K, Okano T. Hepatocyte Transplantation: Cell Sheet Technology for Liver Cell Transplantation. **Curr Transplant Rep**. 4(3):184-192. 2017. (DOI: 10.1007/s40472-017-0156-7.) 査読あり
7. Moritake A, Kawao N, Okada K, Tatsumi K, Ishida M, Okumoto K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency enhances subchondral osteopenia after induction of osteoarthritis in mice. **BMC Musculoskelet Disord**. 18(1):392. 2017. (DOI: 10.1186/s12891-017-1752-5.) 査読あり
8. Antoniak S, Tatsumi K, Bode M, Vanja S, Williams JC, Mackman N. Protease-Activated Receptor 1 Enhances Poly I:C Induction of the Antiviral Response in Macrophages and Mice. **J Innate Immun**. 9(2):181-192. 2017 (DOI: 10.1159/000450853.) 査読あり
9. 辰巳公平、大橋一夫. 細胞シート工学を用いた血友病新規治療. **Frontiers in Haemophilia**. 4巻 1号. 19-24. 2017
10. 辰巳公平、大橋一夫. 肝細胞移植による血友病治療. **Frontiers in Haemophilia**. 4巻 2号. 17-22. 2017

11. **Tatsumi K**, Antoniak S, Subramaniam S, Gondouin B, Neidich SD, Beck MA, Mickelson J, Monroe DM 3rd, Bastarache JA, Mackman N. Anticoagulation increases alveolar hemorrhage in mice infected with influenza A. *Physiol Rep.* 4(24). pii: e13071. 2016. (DOI: 10.14814/phy2.13071.) 査読あり
12. Kasuda S, **Tatsumi K**, Sakurai Y, Shima M, Hatake K. Therapeutic approaches for treating hemophilia A using embryonic stem cells. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 9(2):64-70. 2016 (DOI: 10.1016/j.hemonc.2016.04.002.) 査読あり
13. Rondina MT, **Tatsumi K**, Bastarache JA, Mackman N. Microvesicle Tissue Factor Activity and Interleukin-8 Levels are Associated with Mortality in Patients with Influenza A/H1N1 Infection. *Crit Care Med.* 44(7):e574-8. 2016 (DOI: 10.1097/CCM.0000000000001584.) 査読あり
14. Antoniak S, **Tatsumi K**, Hisada Y, Milner JJ, Neidich SD, Shaver CM, Pawlinski R, Beck MA, Bastarache JA, Mackman N. Tissue factor deficiency increases alveolar hemorrhage and death in influenza A virus-infected mice. *J Thromb Haemost.* 14(6):1238-48. 2016 (DOI: 10.1111/jth.13307.) 査読あり
3. **辰巳公平**. The role of hepatocyte tissue factor in the hypercoagulable state observed in chronic liver injury. 第 94 回日本生理学会. 2017
4. **辰巳公平**. Role of coagulation factors in a mouse model of influenza virus infection. 第 39 回日本血栓止血学会 (招待講演). 2017
5. **Kohei Tatsumi**. Anticoagulants increase alveolar hemorrhage after influenza A infection in mice. 第 26 回国際血栓止血学会 (International Society on Thrombosis and Hemostasis). 2017
6. **辰巳公平**. Hepatocyte tissue factor contributes to the hypercoagulable state in chronic liver injury of mice. 第 79 回日本血液学会. 2017
7. **辰巳公平**. 慢性肝障害時に見られる血栓傾向には肝細胞が発現する組織因子が関与する. 第 23 回肝細胞研究会. 2016
8. **辰巳公平**. The role of tissue factor for pulmonary hemostasis in influenza A virus infection. 第 78 回日本血液学会. 2016
9. **辰巳公平**. A 型インフルエンザウイルス感染による肺出血における tissue factor の役割. 第 109 回近畿生理学談話会. 2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辰巳 公平 (TATSUMI, Kohei)  
 近畿大学・医学部・講師  
 研究者番号 : 70555432

### (2) 研究協力者

梶 博史 (KAJI, Hiroshi)  
 近畿大学・医学部・教授  
 研究者番号 : 90346255

Nigel Mackman

University of North Carolina at Chapel Hill  
 Hill・Professor

〔学会発表〕 (計 9 件)

\* 筆頭演者としての演題のみ記す。

1. **辰巳公平**. 重症 H1N1 インフルエンザウイルス感染患者の予後予測マーカーとしての血漿中マイクロパーティクル由来組織因子活性値とインターロイキン-8 値の有用性. 第 17 回 TTM フォーラム. 2017
2. **辰巳公平**. 凝固因子発現からみた血管内皮積層化培養肝細胞の機能評価. 第 16 回日本再生医療学会. 2017