

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05229

研究課題名(和文) 無核の血小板・赤血球のプログラム細胞死の動態解析と病態検査学への導入展開

研究課題名(英文) Analysis for programmed cell death of anuclear platelets and erythrocytes for application of laboratory medicine

研究代表者

橋口 照人 (Hashiguchi, Teruto)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70250917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：血小板の凝集能以外の血小板の形質変化について種々の病態において研究を重ねた。肝臓における癌摘出術の前後における血小板の形質応答の解析と予後予測としての検査医学への応用を主目的とした。肝臓摘出後における血小板のセロトニン含有量と肝臓再発に有意な“負”の関係を見出し、核を有さない細胞における新規概念として「癌環境における血小板の“疲労のプロセス”の存在」について提唱した(J Cancer, 2017)。“疲労血小板”という新規の概念は、既存の概念である tumor educated platelets とは独立して考えることが可能である。我々の報告に対して、欧文誌3報より更なる解析が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板の凝集能以外の形質応答において、血小板生物学の見地から、血小板VEGF-A、血小板セロトニンを軸に“疲労血小板”という新規の概念を提唱し、既存の tumor educated platelets とは独立して考察できることに学術的意義を有すると考える。肝臓摘出後における血小板のセロトニン含有量と肝臓再発に有意な“負”の関係を見出し、核を有さない細胞における新しい概念として「癌環境における血小板の“疲労のプロセス”の存在」に検討を加え、癌摘出後の血小板セロトニンの低下と予後に関する我々の報告は、今後の癌治療において、血小板形質の変化に着目した臨床検査への応用に繋がる可能性を有すると考える。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the diversity of platelet character except for the function of platelet aggregation in several pathological conditions for laboratory medicine. The content of serotonin in platelets after surgery of hepatocellular carcinoma (HCC) are negatively correlated to the recurrence of HCC at significant manner. From this observation, we proposed the presence of exhausting process of platelets under the cancer environment. The new concept of exhausting platelet can be considered by independent from the already known concept of "tumor educated platelets". Several clinical and translational studies have facilitated a platform for platelet-based therapy to enhance liver regeneration. While some of these therapies are effective to augment liver regeneration, the others have had some detrimental outcomes. The existing evidence represents a challenge for future projects that are focused on directly incorporating platelet-based therapies to induce liver regeneration.

研究分野：臨床検査

キーワード：platelet VEGF-A serotonin hepatocellular carcinoma exhaust platelet prognosis prognosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで血小板に存在する血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A)に関する一連の研究を通して血小板の形質と連動する骨髄環境ならびに種々の病態との関連について報告してきた。本申請では血小板の形質の変化に血小板のプログラム細胞死の新規概念を加え、血小板と同様に無核の細胞である赤血球のプログラム細胞死と対比させながら、その動態解析と病態検査学への応用・展開を目指した。

【国際的背景 - 血小板の細胞死】 - “無核の細胞”血小板のプログラム細胞死 (apoptosis & necrosis) - 無核の細胞における apoptosis のプロセスの存在が2007年に血小板において最初に報告された (Mason, KD, et al. *Cell*. 2007)。血小板は pro-apoptosis シグナルと anti-apoptosis シグナルのバランス上にあり、血小板の aging により anti-apoptosis 分子が pro-apoptosis 分子の結合から解除されると、血小板は循環血中からアポトーシスによりクリアランスされる。この無核の血小板の細胞内における pro-apoptosis 分子 (Bak, Bax) と anti-apoptosis 分子 (Bcl-x_L, Bcl-2) のバランスについて “Molecular Clock (分子時計)” の概念として提唱されているが、病態検査学として疾患との関わりは未熟である。血小板におけるアポトーシスは default signaling system であり、組織環境に “炎症” を惹起するものではない。一方、血小板には necrosis のシグナルも存在する (Jackson SP, et al. *Blood*. 2010)。従って、循環血中の血小板のサブグループには、Resting platelets, Activated platelets, Apoptotic platelets, Necrotic platelets のフェノタイプが存在することになる。“Necrotic platelets” は凝集能に比較して高い pro-coagulant 活性を有し “Pro-coagulant platelets” とも呼ばれている。“Necrotic platelets” は “Apoptotic platelets” と異なり炎症を誘導し、組織修復に関わる。これらの細胞死のプロセスから観た血小板の4つのフェノタイプと臨床病態との関連解析を行い病態検査として位置付けることを「主目的の一つ」とする。

2. 研究の目的

無核の細胞に apoptosis と同様の細胞死のプロセスの存在することが、血小板において最初に報告された (Mason KD, et al. *Cell*. 2007)。そして、同じく無核の細胞である赤血球に apoptosis と同様のプロセス (Eryptosis) の存在することが近年報告されている。血小板の細胞死には壊死のプロセス (Necrotic platelets) も存在することが報告され、血栓・塞栓の質に関与することが知られるようになった。血小板・赤血球の細胞死のプロセスは炎症等の様々な生体内環境を反映するとともに、その後の免疫応答にも影響を与えることから、これらを将来の検査室レベルの解析対象とする基盤研究は重要であると予見される。本研究においては、新規概念である無核の細胞 (血小板・赤血球) のプログラム細胞死と病態との関連を解析して臨床病態検査学への応用として具体的に展開することを目的とする。

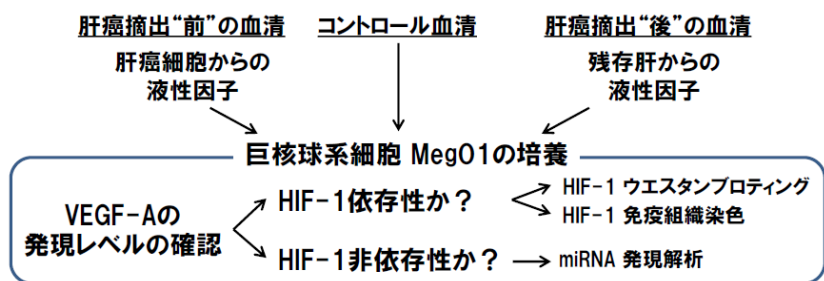
3. 研究の方法

肝癌患者の癌摘出前後の血小板の含有する増殖因子の定量解析を行い、血小板の形質変化と術後経過のパラメーターの比較検討を行った。

4. 研究成果

血小板の凝集能以外の形質に関して種々の病態 (POEMS 症候群、動脈硬化、糖尿病、再生不良性貧血など) において、特に血小板の含有する VEGF-A (血管内皮細胞増殖因子-A) と病態との関連について研究してきた。その一連の成果の中で、近年、2つの知見を報告した。一つは肝癌患者の癌摘出前後の血小板の含有する VEGF-A 量 (血小板 VEGF-A) に関するもの (*PLoS One*. 2016;11(3):e0150446) であり、一つは血小板の含有するセロトニン量 (血小板セロトニン) に関するもの (*J Cancer*. 2017;8(19):3984-3991) である。肝癌摘出前において血小板 VEGF-A は有意に高

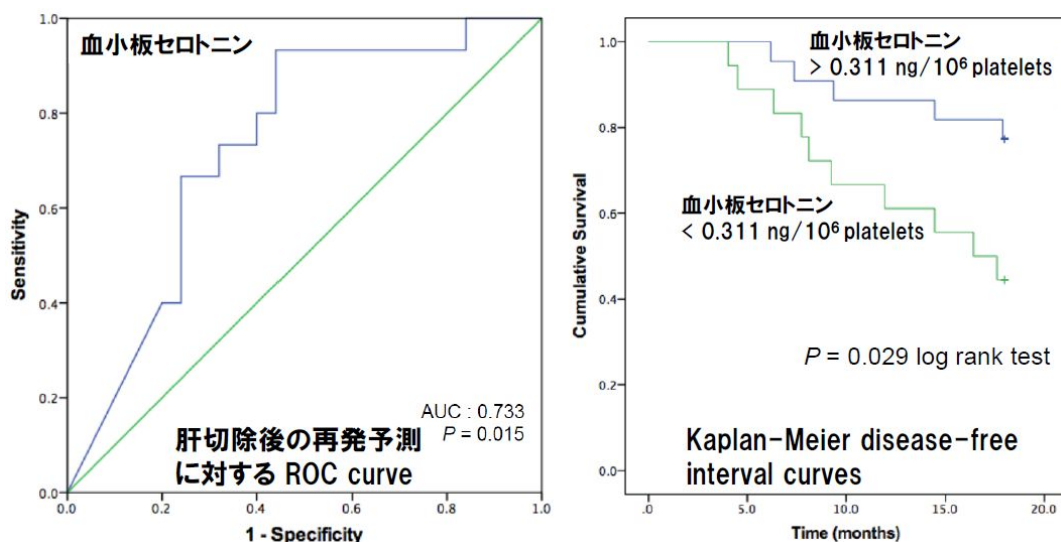
値であり、また肝癌摘出 4 週後の血小板 VEGF-A は摘出肝の体積に相関する。この結果は、骨髓巨核球における VEGF-A の産生亢進のメカニズムに低酸素刺激を介さないメカニズムのあることが示唆された。また、肝癌摘出前の血小板セロトニンは高値となるが、肝癌摘出後の血小板セロトニンは摘出前よりも低値となるも、



肝癌摘出後の血小板セロトニンと肝癌の再発、予後が“負”に相関していることを報告した。これまで、肝癌摘出前の血小板セロトニンは高値であることが肝癌の再発に“正”に相関することが報告されていた。今回の我々の“肝癌摘出後の血小板セロトニンの検討”の結果は 2018 年に欧文誌 J Hepatol. (IF: 15.040) より 2 回、J Cancer より 1 回のコメントが報告され、肝癌摘出後における血小板セロトニンの予後予測指標としての役割について明確にすることが求められた。この学術的背景には、以前に報告された「血小板セロトニンによるウイルス性肝炎の増悪 (Lang PA, et al. Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin. Nat Med 2008;14:756-761) がある。この Lang らの報告とは逆に我々の肝癌摘出後の検討では、血小板セロトニンの少ない群に有意に再発が多く予後不良であった。このことより、血小板生物学の見地から肝癌摘出後の“血小板の疲労”の概念を立てた。

肝癌患者において血小板 VEGF-A の増加するメカニズムは、腫瘍から分泌される液性因子の骨髓巨核球への作用による VEGF-A の産生亢進と考えられる。VEGF-A を豊富に有する血小板は肝癌細胞との相互作用において癌の増大に寄与すると考えられ、骨髓は肝癌に合目的にドライブされていることになる。一方、セロトニンは、ヒトでは 95% 以上が消化管の腸クロム親和性細胞から産生、放出され、血小板および脳に貯蔵されている。血小板および脳では血中遊離セロトニンを細胞膜表面のセロトニントランスポーターにより選択的に細胞内に取り込んで集積している。血小板では濃染顆粒に脳ではセロトニン作動性神経に貯蔵されている。従って肝癌摘出後の血小板のセロトニンの取り込みの低下が肝癌の再発率の増加、予後不良に繋がっていることになる。

(J Cancer. 2017;8(19):3984-3991 より)



上記を踏まえ次の疑問を得た。

- (1) 肝癌摘出前の肝癌細胞からの液性因子、あるいは摘出後の残存肝からの液性因子が骨髓巨核球の VEGF-A を産生亢進させる機序は何か？ HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1、低酸素誘導因

子-1) 依存性が否か？

- (2) 肝癌摘出前に、血小板のセロトニンの取り込みが亢進する機序は何か？血小板膜上のセロトニントランスポーターの発現が増加しているのか？肝癌細胞は液性因子により、骨髄巨核球のセロトニントランスポーターの発現量を増加させるのか？
- (3) 肝癌摘出後に、血小板セロトニンのより少ない群の再発率が高く、予後不良である機序は何か？ Lang PA, et al. Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin. Nat Med 2008 の報告とどの様に関連するのか？
- (4) 肝癌摘出後のリキッドバイオプシーによる血小板セロトニンは再発・予後の指標となり得るか？

【今後解決する課題】

- (1) VEGF-A は生理的血管新生ならびに腫瘍の血管新生における鍵分子である。血小板 VEGF-A は肝癌摘出前においては、腫瘍の産生する液性因子により、摘出後は残存肝の産生する液性因子により上方制御され、そのターゲット細胞は骨髄巨核球である。そこで、肝癌摘出前後における血小板 VEGF-A の産生亢進の機序を解析する。
- (2) 肝癌細胞からの液性因子が血小板のセロトニンの取り込みを、摘出前に亢進させる機序を明らかにするために、肝癌症例の血小板膜上のセロトニントランスポーター (5-HT transporter; 5-HTT) の発現を確認する。
- (3) 肝癌摘出後の血小板セロトニンのより少ない群が再発率が有意に高く予後不良であり、肝癌摘出後の血漿セロトニン量は再発群と非再発群において差を認めなかったことから、肝癌摘出後の血小板の血漿からのセロトニンの取り込み量は低下しており、その低下する機序と再発との関連を明らかにする。そのために、肝癌症例の摘出後における血小板のセロトニントランスポーターの発現量をフローサイトメトリーならびにウエスタンブロッティングにて解析する。
- (4) 肝癌摘出後の血小板の形質を血小板 VEGF-A、血小板セロトニンに加え、顆粒に含まれる他の分子群について多角的に検証する。
- (5) 血小板 VEGF-A、血小板セロトニンを含む血小板形質のリキッドバイオプシーによる解析が肝癌摘出後の再発・予後予測の指標となり得るかを検討する。

【結果からの考察のまとめ】

血小板の凝集能以外の形質応答において、血小板生物学の見地から、血小板 VEGF-A、血小板セロトニンを軸に“疲労血小板”という新規の概念を、既存の概念である tumor educated platelets とは独立して考えることが可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Komatsu K, Kinai E, Sakamoto M, Taniguchi T, Nakao A, Sakata T, Iizuka A, Koyama T, Ogata T, Inui A, Oka S; HIV-Associated Neurocognitive Disorders in Japanese (J-HAND) Study Group (The J-HAND Study Group). Various associations of aging and long-term HIV infection with different neurocognitive functions: detailed analysis of a Japanese nationwide multicenter study. J Neurovirol. 2019 ;25(2):208-220. (査読有)
2. Aryal B, Yamakuchi M, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Gejima K, Komokata T, Koriyama C, Hashiguchi T, Imoto Y. Predictive Value of Diminished Serum PDGF-BB after Curative Resection of Hepatocellular Cancer. J Oncol. 2019 Jan 6;2019:1925315. (査読有)
3. Aryal B, Yamakuchi M, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Gejima K, Komokata T, Hashiguchi T, Imoto Y. Therapeutic implication of platelets in liver regeneration -hopes and hues. Expert

Rev Gastroenterol Hepatol. 2018 ;12(12):1219-1228. (査読有)

4. Koriyama T, Yamakuchi M, Takenouchi K, Oyama Y, Takenaka H, Nagakura T, Masamoto I, Hashiguchi T. Legionella pneumophila infection-mediated regulation of RICTOR via miR-218 in U937 macrophage cells. Biochem Biophys Res Commun. 2019 ;508(2):608-613. (査読有)

5. Aryal B, Yamakuchi M, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Gejima K, Komokata T, Hashiguchi T, Imoto Y. Deciphering Platelet Kinetics in Diagnostic and Prognostic Evaluation of Hepatocellular Carcinoma. Can J Gastroenterol Hepatol. 2018 Jun 27;2018:9142672. doi: 10.1155/2018/9142672. eCollection 2018. (査読有)

6. Yamakuchi M, Hashiguchi T. Endothelial Cell Aging: How miRNAs Contribute? J Clin Med. 2018;7(7). (査読有)

7. Ohno S, Kohjitani A, Miyata M, Tohya A, Yamashita K1, Hashiguchi T, Ohishi M, Sugimura M. Recovery of Endothelial Function after Minor-to-Moderate Surgery Is Impaired by Diabetes Mellitus, Obesity, Hyperuricemia and Sevoflurane-Based Anesthesia. Int Heart J. 2018;59(3):559-565. (査読有)

8. Higashi Y, Yamakuchi M, Fukushige T, Ibusuki A, Hashiguchi T, Kanekura T. High-fat diet exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice. Exp Dermatol. 2018 ;27(2):178-184. (査読有)

9. Takagi K, Yamakuchi M, Matsuyama T, Kondo K, Uchida A, Misono S, Hashiguchi T, Inoue H. IL-13 enhances mesenchymal transition of pulmonary artery endothelial cells via down-regulation of miR-424/503 in vitro. Cell Signal. 2018;42:270-280. (査読有)

10. Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Kawano H, Sonoda S, Yamaguchi M, Hashiguchi T, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. PERMEABILITY AND ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EFFECTS OF BEVACIZUMAB, RANIBIZUMAB, AND AFLIBERCEPT IN POLARIZED RETINAL PIGMENT EPITHELIAL LAYER IN VITRO. Retina. 2017 ;37(1):179-190. (査読有)

11. Panta S, Yamakuchi M, Shimizu T, Takenouchi K, Oyama Y, Koriyama T, Kojo T, Hashiguchi T. Low grade inflammation inhibits VEGF induced HUVECs migration in p53 dependent manner. Biochem Biophys Res Commun. 2017;483(2):803-809. (査読有)

12. Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, Aryal B, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I. HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin. Obesity (Silver Spring). 2016;24(9):1913-21. (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

1. 上田英昭, 松本和久, 山口宗一, 竹之内和則, 大山陽子, 橋口照人, 井本 浩 .大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血、凝固系の検討 . 第 13 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム 2019 年

2. アリアル・ビベック, 清水 利昭, 門野 潤, 風呂井 彰, 槐島 健太郎, 菰方 輝夫, 郡山 千早, 山口 宗一, 橋口 照人, 井本 浩 . PDGF-BB 低値は HCC 切除後再発のリスク因子なのか、単なる指標なのか? 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会 2018 年

3. Namino F, Yamakuchi M, Iriki Y, Okui H, Ichiki H, Maenosono R, Masamoto I, Hashiguchi T, Ohishi M, Maruyama I The impact of endothelial marker on catheter ablation in patients with atrial fibrillation. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (国際学会) 2018 年

4. Yamakuchi M, Takagi K, Matsuyama T, Kondo K, Uchida A, Misono S, Takenouchi K, Oyama Y, Inoue

H, Hashiguchi T The role of IL-13 in regulating pulmonary artery endothelial cell migration. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (国際学会) 2018年

5. Bibek Aryal、清水利昭、門野 潤、風呂井 彰、山口宗一、菰方輝夫、橋口照人、井本 浩 Platelet derived growth factors predict HCC recurrence after partial hepatectomy in humans 第62回日本臨床検査医学会九州地方会 第28回日本臨床化学会九州支部総会 2017年

6. 古城 剛、山口宗一、吉村明子、竹之内和則、伊藤隆史、清水利昭、大山陽子、郡山豊泰、波野史典、Sushil Panta、松下昌風、丸山征郎、高嶋 博、橋口照人 CaIDAG-GEFI分子異常による血小板機能異常症 第62回日本臨床検査医学会九州地方会第28回日本臨床化学会九州支部総会 2017年

7. Sushil Panta、山口宗一、清水利昭、竹之内和則、大山陽子、郡山豊泰、古城 剛、橋口照人 Tracking the signaling pathway for the anti-angiogenic activity of proinflammatory factor TNF alpha 第62回日本臨床検査医学会九州地方会 第28回日本臨床化学会九州支部総会 2017年

8. 山口宗一、郡山豊泰、古城 剛、竹之内和則、清水利昭、大山陽子、松下昌風、橋口照人、L.pneumophila感染マクロファージ系細胞におけるmiRNAの役割. 第38回日本血栓止血学会学術集会 2016年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

山口 宗一 (YAMAKUCHI MUNEKAZU)
鹿児島大学・医歯学域医学系・
准教授
研究者番号: 20260680

大山 陽子 (OYAMA YOKO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
特任助教
研究者番号: 20583470

竹之内 和則 (TAKENOUCHI KAZUNORI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
医員
研究者番号: 30646758

宇都 由美子 (UTO YUMIKO)
鹿児島大学・医歯学域医学系・
准教授
研究者番号: 50223582

村永 文学 (MURANAGA FUMINORI)
鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・
講師
研究者番号: 00325812

丸山 征郎 (MARUYAMA IKUROU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
特任教授
研究者番号: 20082282

原田 陽一郎 (HARADA YOUICHIROU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
特任准教授
研究者番号: 80464147

(2) 研究協力者

研究協力者無し