

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390350

研究課題名 (和文) 血小板製剤を用いた新規肝再生促進／線維化・障害抑制療法開発のための橋渡し研究

研究課題名 (英文) Translational research of developing liver regeneration and anti-agent derived from platelets

研究代表者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：40213673

研究成果の概要 (和文)：本研究は血小板製剤を用いた新規肝再生促進および線維化・障害抑制療法開発を行うことを目的としている。ヒト血小板中の ATP および代謝産物の adenosine が肝星細胞の活性化を直接的に阻害して肝臓の線維化を抑制することを明らかにした。また血小板の S1P が肝類洞内皮細胞に作用し、肝類洞内皮細胞が IL-6 を分泌することによって肝再生が促進されることを明らかにした。今後は adenosine や S1P を中心に新しい肝疾患治療薬の開発を行っていく予定である。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this research is to develop new reagent for liver regeneration and anti-fibrosis. We clarified that human platelets directly deactivate human stellate cell by ATP and adenosine derived from human platelets. We also clarified that S1P from human platelets activate human liver sinusoidal endothelial cells to secrete IL-6 and proliferate hepatocytes. From these results, we will develop new reagents for treating severe liver diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学，肝再生

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における肝疾患はウイルス性肝炎が約 500 万人と依然として多いが、近年非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) およびその予備軍が急激に増加し、その数は約 1,200 万人に達すると推定されている。世界に目を向けるとウイルス性肝炎はアジアで数億人、NASH も先進国を中心に急速に増加している疾患である。ウイルス性肝炎、NASH とも慢性肝炎から肝硬変を引き起こす。その肝硬

変は難治性、非可逆性であり、進行すると肝細胞癌、肝不全を発症し死に至る重篤な疾患である。難治性肝疾患治療法として肝細胞障害抑制療法、肝硬変への進展を防止する抗線維化療法、肝不全を抑制する肝再生療法、それに NASH 治療法が社会的に強く求められている。

肝再生の研究は肝細胞増殖因子 HGF や上皮細胞増殖因子 EGF などの増殖因子を中心に行われてきたが、これらの増殖因子は単独で

は癌細胞増殖効果も持っているため、臨床応用は断念された。肝線維化抑制の研究は骨髄細胞や血管内皮前駆細胞などの移植療法や HGF の投与実験が中心であるが、治験段階にとどまっておらず、臨床で一般的に用いられる簡便で効果のある治療法の確立には至っていない。NASH に関しては炎症性サイトカインの抑制を軸に研究が進められているが実用化には至っていない。

血小板は、血液中を循環する無核の血球であり破綻した血管に凝集して止血を行う。近年血小板には HGF や血小板由来増殖因子 PDGF、上皮細胞増殖因子 EGF などの増殖因子が含まれていることが明らかになった。また血小板は障害肝に集積することも報告されている。我々は血小板を増加させると、肝切除後の肝再生が促進されることを世界に先駆けて報告した (Murata S, World J Surg 2007)。その機序が“血小板→肝細胞→Akt のリン酸化→GSK3 beta のリン酸化→cyclin D1 発現→肝再生”であることを明らかにした。加えて血小板に含まれる物質のうち、HGF とインスリン様増殖因子 IGF-1 が特に重要な肝細胞増殖成分であることも世界で初めて同定した (Matsuo R, J Surg Res 2007)。血小板を増加させることにより 90% 肝切除術後の生存率が著明に改善した (Myronovych A, J Hep 2008)。血小板およびその成分を用いて、包括的に難治性肝疾患の治療に応用する研究は我々のグループ以外に世界のどの施設でも行われていないユニークなものである。

## 2. 研究の目的

本研究は生体材料を用いた新しい難治性肝疾患治療法の開発を行うことを目的とする。我々は生体材料として、血液中に豊富に存在し、増殖因子、生理活性物質を豊富に含んでいる血小板に着目し研究を行っている。具体的には肝硬変モデル動物における肝硬変状態での血小板による肝再生促進効果の検討、ヒト肝類洞内皮細胞およびヒト肝星細胞を用いた血小板による抗線維化効果および肝再生促進効果の詳細なメカニズム解析を行い、最終的に難治性肝疾患の新たな治療法の開発のための橋渡し研究を行う。全世界の難治性肝疾患患者に肝移植以外の治療法を提供することは、日本発の国際的に大きな価値のある研究開発になる。

## 3. 研究の方法

肝硬変モデル動物に対する血小板の肝硬変治療効果

これまで我々はマウス 70%および 90%肝切除モデルを用いて血小板に肝再生促進効果があることを報告してきた。これまでの検討は正常な肝臓を用いた解析であったが、実際の臨床では肝硬変を合併した肝細胞癌に対する治療が必要になってくる。肝硬変の肝切除において切除量が多すぎると肝不全から死亡する可能性があり、肝硬変の肝再生促進療法が求められている。そこで本研究ではラット肝硬変モデルの 70%肝切除後の血小板の肝再生促進効果を検討する。ジメチルニトロサミンによる肝硬変ラットに対して血小板の増殖因子であるトロンボポエチンを用いて正常の 2 倍に血小板を増加させた血小板増加群、トロンボポエチンを投与しない血小板正常群、さらにトロンボポエチン投与後に抗血小板抗体を用いて血小板数を正常の 10 分の 1 に減少させた血小板減少群を作成する。この 3 群に対し 70%肝切除を施行し、肝切除 48 時間後の肝再生および肝線維化の改善効果を検討する。

ヒト肝星細胞に対するヒト血小板の効果

### ①ヒト肝星細胞に対するヒト血小板の抑制効果の検討

血小板の肝線維化抑制効果のメカニズムをより詳細に解明するため、肝臓において線維を産生するヒト肝星細胞の不死化細胞株 TWNT-1 を岡山大学の小林先生より入手した。肝星細胞は通常はビタミン A 貯留細胞として機能しているが、活性化すると alpha SMA を発現する線維芽細胞様の細胞に変化し、コラーゲンを産生する。TWNT-1 は培養すると alpha SMA を産生する活性型の星細胞である。本研究では TWNT-1 にヒト血小板を添加し、その形態変化と、alpha SMA の発現変化を検討する。

### ②ヒト肝星細胞に対するヒト血小板の線維化抑制メカニズムの解析

ヒト血小板添加によるヒト不死化肝星細胞 TWNT-1 の遺伝子発現変化を、星細胞の活性化の指標とされる alpha SMA の mRNA である ACTA2、および星細胞の産生する線維成分の collagen I の mRNA である COL1A1 に関して検討する。また線維を溶解する MMP1 の mRNA も検討する。

### ③ヒト肝星細胞の活性化を抑制する血小板成分の同定

血小板中の様々な生理活性物質のうち有力な増殖因子である PDGF、VEGF、IGF-1 の阻害剤を添加して血小板の肝星細胞抑制効果を検討する。また血小板中に豊富に存在する ATP の分解酵素 Apyrase および ATP および ATP

の代謝産物である adenosine を投与して肝星細胞の抑制効果を検討する。

ヒト肝類洞内皮細胞に対するヒト血小板の効果の検討

①ヒト肝類洞内皮細胞に対するヒト血小板の効果の検討

血小板は肝臓内で肝類洞内皮細胞と最も多く接触するため、肝再生の早期において血小板が肝類洞内皮細胞を活性化させることが重要なキーになると考えられる。本研究では肝臓の毛細血管である類洞の内皮細胞に対して血小板がどのような刺激を与えるか検討した。岡山大学小林先生より供与していただいたヒト不死化肝類洞内皮細胞 TMNK-1 に対するヒト血小板の効果について検討する。具体的には血小板添加による TMNK-1 の増殖促進効果、IL-6、IGF-1、VEGF、PDGF、HGF などの増殖因子分泌効果を検討する。また添加後のヒト肝類洞内皮細胞の培養上清をヒト初代培養肝細胞に添加し、肝細胞の DNA 合成促進効果があるか検討する。

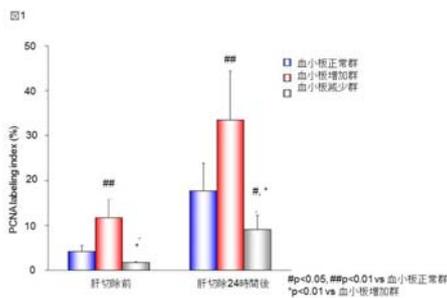
②ヒト肝類洞内皮細胞に対するヒト血小板の活性化メカニズムの解明

血小板の肝類洞内皮細胞の活性化メカニズムに関して詳細な検討を行う。ヒト血小板と培養ヒト肝類洞内皮細胞を共培養すると肝類洞内皮細胞が活性化され IL-6 が分泌されるが、その効果が血小板中の主要な増殖因子である PDGF、VEGF、IGF-1 の阻害剤を添加して抑制されるか検討する。また血小板中に含まれるリン脂質である SIP の阻害剤を添加した場合肝類洞内皮細胞の IL-6 分泌効果が抑制されるか検討する。

#### 4. 研究成果

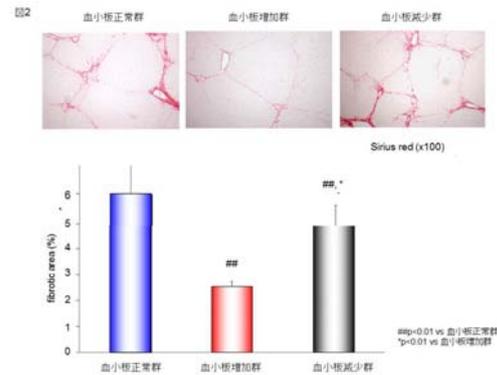
ラット肝硬変モデルに対する血小板の肝硬変治療効果

ジメチルニトロソミンによる肝硬変ラットに対して実験モデルとして血小板の増殖因子であるトロンボポエチンを用いて正常の 2 倍に血小板を増加させた血小板増加群、トロンボポエチンを投与しない血小板正常群、さらにトロンボポエチン投与後に抗血小板抗体を用いて血小板数を正常の 10 分の 1 に減



少させた血小板減少群を作成した。この 3 群に対し 70%肝切除を施行すると、肝切除 48 時間後の肝再生は血小板増加群が血小板正常群に対し有意に亢進した (図 1)。

また肝線維化の程度を評価するため sirius



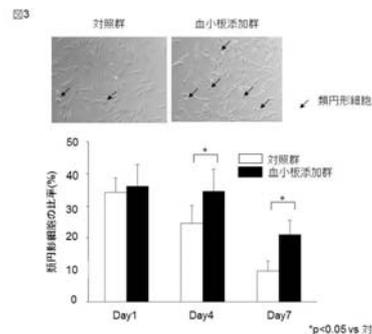
red 染色を行い、線維部分の面積を定量化した。その結果、血小板増加群は血小板正常群に比較して肝線維化の著明な改善を認めた (図 2)。

血小板減少群は血小板増加群に比較して肝再生の遅延と肝線維化の増悪を認めたことから、肝硬変における肝線維化の改善と肝再生の促進はトロンボポエチンではなく血小板の直接作用であることが明らかとなった。このことから肝硬変状態であっても一過性にトロンボポエチンを用いて血小板を増加させることにより、肝再生が促進されることが明らかになった。

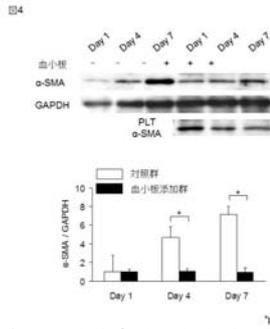
肝星細胞に対する血小板の効果の検討

①ヒト肝星細胞に対するヒト血小板の抑制効果の検討

星細胞は活性化すると線維を産生することが知られており、活性化の指標として alpha SMA の発現が知られている。これまでの研究で血小板を増加させることによって肝線維化モデル動物において線維化が軽快することを明らかにしてきた。今回、ヒト血小板を直接ヒト不死化肝星細胞 TWNT-1 に添加して血小板の直接作用を検討した。ヒト血小板を



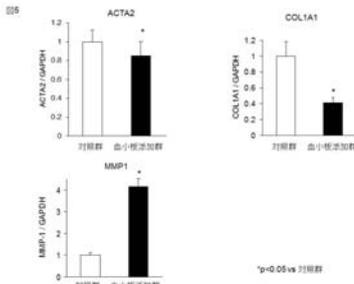
添加すると TWNT-1 の活性化型である紡錘形の細胞の比率が低下し、非活性化型である類円形の細胞の比率が増加した (図 3)。



さらに血小板添加により肝星細胞の alpha SMA が有意に抑制されることが明らかになった (図 4)。

### ②ヒト肝星細胞に対するヒト血小板の線維化抑制メカニズムの解析

ヒト血小板添加によるヒト不死化肝星細胞 TWNT-1 の遺伝子発現変化を、星細胞の活性化の指標とされる alpha SMA の mRNA である ACTA2、および星細胞の産生する線維成分の collagen I の mRNA である COL1A1 に関して検討した。血小板を添加することにより肝星細胞の ACTA2、COL1A1 の両方の mRNA を有意に抑制した (図 5)。

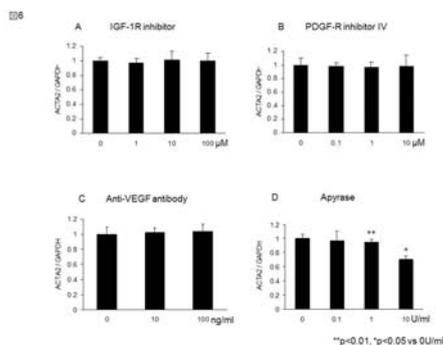


一方 MMP1 に関しては血小板添加群で有意に発現が増加した (図 5)。

### ③ヒト肝星細胞の活性化を抑制する血小板成分の同定

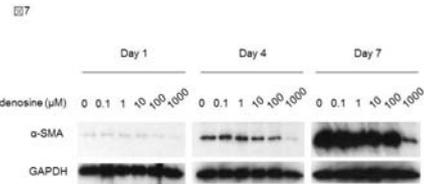
血小板中の様々な生理活性物質のうち有力な増殖因子である PDGF、VEGF、IGF-1 の阻害剤を添加して血小板の肝星細胞抑制効果を検討した結果、これらの阻害剤では血小板の効果を抑制できないことが明らかになった (図 6)。

また血小板中に豊富に存在する ATP の分解酵



素 apyrase を投与したところ、血小板の抑制効果はさらに増強された (図 6)。さらに ATP の代謝産物である adenosine を星細胞に添加

したところ肝星細胞の alpha SMA は有意に抑

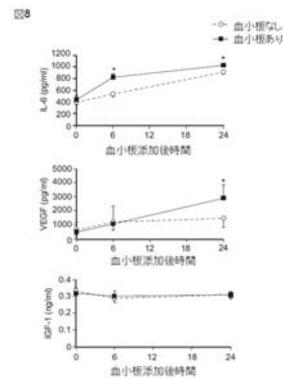


制された (図 7)。このことから血小板に含まれる ATP およびその代謝産物が肝星細胞を抑制していると考えられた。

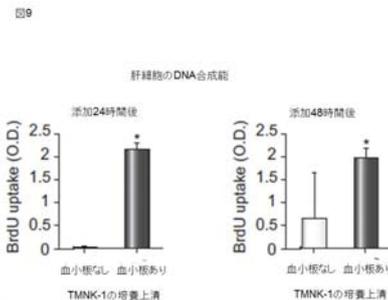
### ヒト肝類洞内皮細胞

#### ①ヒト肝類洞内皮細胞に対するヒト血小板の効果の検討

ヒト血小板を添加するとヒト肝類洞内皮細胞株 TMNK-1 は添加しない群と比較して有意差をもって増殖した。また血小板添加により



肝類洞内皮細胞は IL-6 および VEGF を分泌した (図 8) が HGF は検出感度以下であった。また添加後のヒト肝類洞内皮細胞の培養上清をヒト初代培養肝細胞に添加し、肝細胞の DNA 合成促進効果があるか検討した。血小板添加後のヒト肝類洞内皮細胞の培養上清をヒト初代培養肝細胞に添加すると肝細胞の DNA 合成が有意に促進され (図 9)、肝細胞のシグナル伝達系を解析すると IL-6 の下流のシグナルである STAT-3 の活性化が認められた (図 9)。このことから血小板が肝類洞内皮

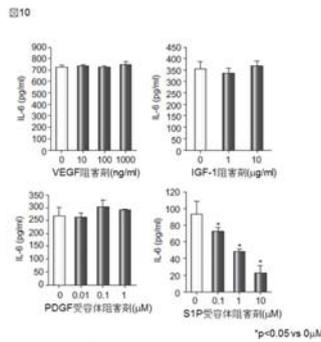


細胞を活性化させ IL-6 の分泌を促し IL-6 が肝細胞の増殖を促進していると考えられた。

#### ②ヒト肝類洞内皮細胞に対するヒト血小板の活性化メカニズムの解明

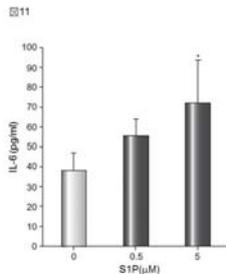
ヒト血小板のどの成分がヒト肝類洞内皮細胞を活性化するか検討するため、血小板中の主要な増殖因子である VEGF、IGF-1、PDGF の阻害剤を添加して肝類洞内皮細胞からの

IL-6 分泌量を測定した。VEGF は MAB293、IGF-1 は AF-291-NA、PDGFR は PDGFR Tyrosine kinase



inhibitor IV を用いた。これらの 3 つの増殖因子では IL-6 分泌量に変化が見られなかった (図 10)。

一方、血小板中に含まれるリン脂質であるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の阻害剤 JTE-013 を添加した場合肝類洞内皮細胞の IL-6 分泌量が有意に抑制された (図 10)。また肝類洞内皮細胞に S1P を添加すると IL-6 が分泌さ



れた (図 11)。このことから血小板による肝類洞内皮細胞活性化には血小板の S1P が作用していることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

- ① Matsuo R, Nakano Y, Ohkohchi N. Platelet administration via the portal vein promotes liver regeneration in rats after 70% hepatectomy. *Annals of surgery*. 235;1-5. 2011 査読有
- ② Hisakura K, Murata S, Matsuo R, Paku S, Ikeda N, Kawasaki T, Kohno K, Myronovych A, Nakano Y, Ikeda O, Watanabe M, Ohkohchi N. Platelets Prevent Acute Hepatitis Induced by Anti-Fas Antibody. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 26(2);348-355. 2011 査読有
- ③ Chiba M, Murata S, Myronovych A, Kohno K, Hiraiwa N, Nishibori M, Yasue H, Ohkohchi N. Elevation and characteristics of Rab30 and S100a8/S100a9 expression in an early phase of liver regeneration in the mouse. *International Journal of molecular medicine*. Epub ahead of print. 査読有
- ④ Ohkohchi N. Platelets play an important

role in the recovery of liver dysfunction after hepatic resection. *Annals of surgery*. 252(4);708-709. 2010 査読有

- ⑤ Kawasaki T, Murata S, Takahashi K, Nozaki R, Ohshiro Y, Ikeda N, Paku S, Myronovych A, Hisakura K, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Activation of human liver sinusoidal endothelial cell by human platelets induces hepatocyte proliferation. *Journal of Hepatology*. 53(4);648-654. 2010 査読有
- ⑥ Hisakura K, Murata S, Fukunaga K, Myronovych A, Tadano S, Kawasaki T, Kohno K, Ikeda O, Paku S, Ikeda N, Nakano Y, Matsuo R, Kohno K, Kobayashi E, Saito T, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets Prevent Acute Liver Damage after Extended Hepatectomy in Pigs. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 17(6);855-864. 2010 査読有
- ⑦ Paku S, Kondo T, Nakano Y, Murata S, Fukunaga K, oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Platelet adhesion in the sinusoid caused hepatic injury by neutrophils after hepatic ischemia reperfusion. *Platelets*. 21(4);282-288. 2010 査読有
- ⑧ Nakano Y, Kondo T, Matsuo R, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Prevention of leukocyte activation by the neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in the hepatic microcirculation after ischemia-reperfusion. *Journal of Surgical Research*. 155(2);311-317. 2009 査読有
- ⑨ Watanabe M, Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Ikeda O, Aoyagi Y, Matsuo R, Fukunaga K, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 24(1);78-89. 2009 査読有
- ⑩ Ikeda O, Ozaki M, Murata S, Matsuo R, Nakano Y, Watanabe M, Hisakura K, Myronovych A, Kawasaki T, Kohno K, Ohkohchi N. Autonomic regulation of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Journal of Surgical Research*. 152(2);218-223. 2009 査読有
- ⑪ Chiba M, Kizawa H, Hiraiwa N, Ohkohchi N, Yasue H. Existence of Pink1 antisense RNAs in mouse and their localization. *Cytogenetic and Genome Research*. 126;259-270. 2009 査読有
- ⑫ Myronovych A, Murata S, Chiba M, Matsuo R, Ikeda O, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Kohno K, Kawasaki T, Hashimoto I, Shibasaki Y, Yasue H, Ohkohchi N. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *Journal of Hepatology*. 49(3);363-372. 2008 査読有

- ⑬ Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Myronovych A, Watanabe M, Ohkohchi N. Single Administration of Thrombopoietin Prevents Progression of Liver Fibrosis and Promotes Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Cirrhotic Rats. *Annals of Surgery*. 248:821-828. 2008 査読有
- ⑭ Nakano Y, Kondo T, Matsuo R, Hashimoto I, Kawasaki T, Kohno K, Myronovych A, Tadano S, Hisakura K, Ikeda O, Watanabe M, Murata S, Ohkohchi N. Platelet dynamics in the early phase of post-ischemic liver in vivo. *Journal of Surgical Research*. 149(2);192-198. 2008 査読有
- ⑮ Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S, Ikeda O, Nakano Y, Watanabe M, Hisakura K, Myronovych A, Kubota T, Narimatsu H, Ozaki M. Platelets strongly induce hepatocyte proliferation with IGF-1 and HGF in vitro. *Journal of Surgical Research*. 145(2);279-286. 2008 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 川崎卓也, 大河内信弘. 血小板による肝類洞内皮細胞からの IL-6 分泌促進作用の検討. 第 24 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 2010.11.27 福島
- ② 村田聡一郎, 大河内信弘. 血小板による肝硬変の再生療法: 基礎から臨床. 第 14 回日本肝臓学会大会. 2010.10.13. 金沢
- ③ 川崎卓也, 大河内信弘. 血小板による肝類洞内皮細胞からの IL-6 分泌促進作用の検討. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010.5.27. 山形
- ④ 大河内信弘. 肝再生促進・線維化抑制療法に濃厚血小板輸血療法を行った肝硬変の 4 症例. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010.5.27. 山形
- ⑤ Kawasaki T, Ohkohchi N. Activation of human liver sinusoidal endothelial cell by human platelets induces hepatocyte proliferation. The International Liver Congress™ 2010 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 2010.4.14. Vienna, Austria
- ⑥ 池田直哉, 大河内信弘. 血小板は肝星細胞の活性化を抑制する. 第 110 回日本外科学会定期学術集会. 2010.4.8. 名古屋
- ⑦ 川崎卓也, 大河内信弘. 血小板は肝類洞内皮細胞を活性化しその結果肝細胞増殖を促進する (ヒト細胞を用いた in vitro でのメカニズムの検討). 第 110 回日本外科学会定期学術集会. 2010.4.8. 名古屋
- ⑧ N Ikeda, N Ohkohchi. Platelets keep human hepatic stellate cell in stable state by the ERK signaling pathway. International Symposium on Cellular Singaling~principles and functions~. 2009.11.18 tsukuba.

- ⑨ 大河内信弘. 血小板による肝硬変治療の臨床研究の経過報告. 第11回日本肝臓医生物学研究会. 2009.10.17. 東京
- ⑩ 池田直哉, 大河内信弘. 血小板は肝星細胞活性を抑制する. 第13回日本肝臓学会大会. 2009.10.14. 京都
- ⑪ 村田聡一郎, 大河内信弘. 脾摘による慢性肝炎モデルの肝線維化抑制効果と過大肝切除モデルの肝障害抑制効果の検討. 第64回日本消化器外科学会総会. 2009.7.16 大阪
- ⑫ 大河内信弘. 血小板による難治性肝疾患治療法開発のためのプロジェクトX. 第21回肝胆膵外科学会学術集会. 2009.6.10 名古屋
- ⑬ 池田直哉, 大河内信弘. 血小板は肝星細胞の  $\alpha$  SMA 発現を抑制する. 第45回日本肝臓学会総会. 2009.6.4 神戸
- ⑭ 川崎卓也, 大河内信弘. 血小板は肝類洞内皮細胞を活性化し肝細胞を増殖させる. 第45回日本肝臓学会総会. 2009.6.4 神戸
- ⑮ R Matsuo, N Ohkohchi. Platelet Infusion Therapy Promotes Liver Regeneration After An Extended Hepatectomy in Rats. 2009 EASL. 2009.4/22-4/26. Copenhagen

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 肝線維化抑制剤

発明者: 大河内信弘, 村田聡一郎, 渡辺基信中野順隆, 橋本育佳

権利者: 国立大学法人筑波大学

種類: 特許

番号: 特許第 4696247 号

取得年月日: 2011 年 3 月 11 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 40213673

(2) 研究分担者

村田 聡一郎 (MURATA SOICHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号: 40436275

近藤 匡 (KONDO TADASHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号: 00375495

池田 博 (IKEDA HIROSHI)

筑波大学・大学院数理工学物質科学研究科・准教授

研究者番号: 50272167

福永 潔 (FUKUNAGA KIYOSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号: 20361339