

機関番号：12102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791240

研究課題名 (和文) トロンボポエチン/血小板による新しい肝細胞癌予防治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of new prophylactic reagent of hepatocellular carcinoma using thrombopoietin/platelets

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的はトロンボポエチン投与による血小板増加によって肝障害抑制、肝線維化抑制効果を持続させ、肝細胞癌を抑制することである。ヒト肝癌細胞株にトロンボポエチンを添加し、明らかな増殖効果のないことを確認した。また肝細胞癌の自然発癌モデルである Pten 肝臓特異的ノックアウトマウスを用いてトロンボポエチンの肝細胞癌抑制効果を検討した。その結果メスにおいてのみ有意に発癌を抑制したため、トロンボポエチンによる血小板増加効果およびエストロゲン増加作用が考えられた。トロンボポエチンは肝細胞癌抑制効果を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this research is to develop new prophylactic method of hepatocellular carcinoma using thrombopoietin to induce thrombocytosis. We clarified that thrombopoietin has no effect of proliferating hepatocellular carcinoma cell lines. We also investigated the prophylaxis of hepatocellular carcinoma in Pten liver conditional knockout mice by administrating thrombopoietin. As a result, thrombopoietin reduce hepatocellular carcinoma in female mice. Thrombopoietin has some effect of prophylaxis of hepatocellular carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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，外科学一般

キーワード：トロンボポチン，血小板，肝細胞癌，Pten

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の原因疾患として最も多いのが C 型肝炎である。現在約 170 万人が慢性肝炎となっており、そのうちの 30% は肝硬変から肝細胞癌を発生する。我が国の C 型肝炎ウイルスの特徴は抗ウイルス療法に反応しにくい

1b 型が大多数を占めることであり、線維化の進行と共に発癌の可能性が高まってくる。また、メタボリックシンドロームの一種である非アルコール性脂肪性肝疾患は成人の 15～30% が有する疾患であり、そのうち約 10% は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に進

行する。NASH は肝臓への脂肪沈着に加えて壊死炎症性変化を示し、肝硬変から肝細胞癌を発症する。C型慢性肝炎、NASHともに発癌を抑制する治療法は全くないのが現状であり、その開発が社会的に強く求められている。これまでの線維化抑制の研究は遺伝子導入や SiRNA を用いた研究が多く、実用化に至っていない。また肝細胞癌の予防的治療法はいまだ実現していない。

我々は血小板の肝臓に対する作用に着目してきた。血小板を増加させる増殖因子であるトロンボポエチンに注目し、体内の血小板を増加させることによってマウス 70%、90% 肝切除モデルで血小板に肝再生促進作用があることを世界で初めて明らかにした。またトロンボポエチンによる血小板増加によってマウスおよびラット慢性肝炎モデルの肝線維化を有意に抑制することを世界で初めて明らかにした。さらに血小板が劇症肝炎における肝細胞障害を著明に抑制することを報告した。以上に述べた結果から、慢性 C 型肝炎および NASH の患者に対し持続的なトロンボポエチン投与を行うと血小板が肝臓に作用して肝障害抑制と肝線維化抑制、肝再生が起り、最終的には肝細胞癌の発癌抑制療法を確立できると考えた。

2. 研究の目的

肝細胞癌は慢性肝炎、肝硬変を背景に多段階の発癌様式を示すことが明らかになってきた。肝炎の治療法としてはインターフェロンや核酸アナログ製剤を中心とした抗ウイルス療法が用いられているが、効果的な発癌予防策はないのが現状である。本研究の目的は肝癌の発生母地である線維化肝に対してトロンボポエチンの継続投与による血小板増加によって肝障害抑制、肝線維化抑制効果を持続させ、肝細胞癌の発癌抑制効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 肝組織と各種肝癌細胞におけるトロンボポエチン受容体 c-Mpl の発現

本研究の目的は肝癌の発生母地である線維化肝に対してトロンボポエチンの継続投与による血小板増加によって肝障害抑制、肝

線維化抑制効果を持続させ、肝細胞癌の発癌抑制効果を明らかにすることである。そのためまずトロンボポエチンが肝細胞癌にどのような影響を与えるか検討する必要がある。

研究の第一段階として正常ヒト肝組織、肝硬変、ヒト肝細胞癌組織に対するトロンボポエチン受容体 c-Mpl の発現を RT-PCR にて検討する。また HepG2、Huh7、Hep3B の 3 つのヒト肝癌細胞株に対する c-Mpl の発現を検討する。

(2) トロンボポエチンのヒト肝細胞癌に対する細胞増殖効果の検討

トロンボポエチンがヒト肝細胞癌に対して過剰な細胞増殖を起こさないことを①の検討で癌細胞のうち最も c-Mpl 発現が多かった Huh7 を用いて明らかにする。主な検討項目は増殖関連のシグナル伝達系の解析、BrdU 取り込み試験および CCK-8 試験である。また Huh7 の癌の進展がトロンボポエチンによって増悪するか invasion assay および migration assay にて検討する。

(3) トロンボポエチンの Pten CKO モデルにおける自然発癌抑制効果の検討

Pten (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) は、多くの悪性腫瘍においてその DNA 変異が認められる癌抑制遺伝子である。またその DNA 変異のみならず、蛋白発現低下～消失が全悪性腫瘍の約半数で認められる。Pten の肝臓特異的ノックアウトマウス (Pten CKO マウス) は脂肪肝から 40~70 週で肝細胞癌が発生するため、ヒト肝細胞癌の発癌モデルとして極めて有用である。40 週齢の Pten CKO マウスの雄および雌を用いて週一回トロンボポエチンを腹腔内投与するトロンボポエチン群と投与しない対照群を作成し、35 週間経過を観察する。検討項目は血小板数、肝機能、生存率、肝癌発生率である。

4. 研究成果

(1) 肝組織と各種肝癌細胞におけるトロンボポエチン受容体 c-Mpl の発現

正常ヒト肝組織、肝硬変、ヒト肝細胞癌組

織中の c-Mpl の発現を RT-PCR にて確認した (図 1)。

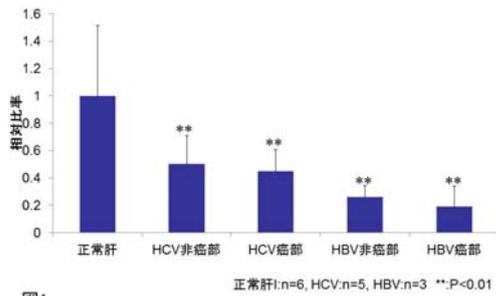


図1

非癌部の比較では正常肝組織が C 型肝炎および B 型肝炎を背景とした肝硬変より c-Mpl の発現が高く、また非癌部が癌部より c-Mpl の発現が高い傾向にあった。c-Mpl の免疫染色では非癌部が肝細胞癌より有意に染まる傾向が認められた (図 2)。

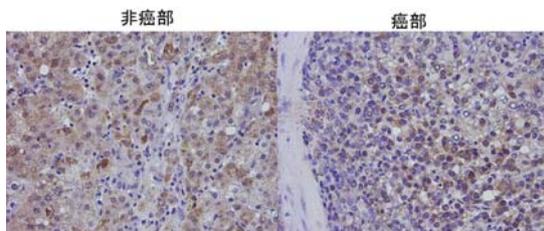


図2

次に HepG2, Huh7, Hep3B の 3 つのヒト肝癌細胞株および不死化ヒト肝類洞内皮細胞 TMNK-1、不死化ヒト肝星細胞 TWNT-1、ヒト肝細胞に対するトロンボポエチン受容体 c-Mpl の発現を RT-PCR にて検討した (図 3)。

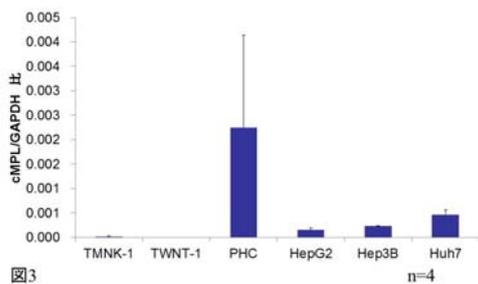


図3

c-Mpl 発現量はヒト肝細胞が最も高く、TMNK-1 と TWNT-1 ではほとんど発現していなかった。肝癌細胞株では Huh7 の c-Mpl 発現量が最も高かった。

(2) トロンボポエチンのヒト肝細胞癌に対する細胞増殖効果の検討

検討で c-Mpl 発現が多いことが分かった Huh7 を用いて、トロンボポエチンの肝細胞癌

に対する細胞増殖作用を検討した。Huh7 にトロンボポエチンを添加すると Akt と ERK1/2 の活性化が認められた (図 4)。

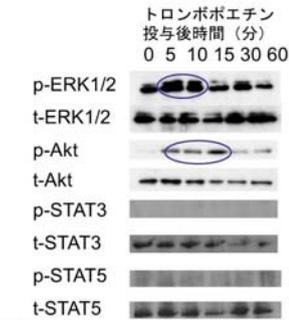


図4

トロンボポエチンの Huh7 に対する増殖促進作用を BrdU 取り込み試験および WST-8 試験 (図 5) の 2 つの方法で検討したところ、明らかな増殖促進作用は認められなかった。

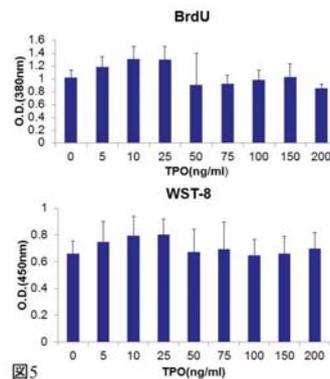


図5

また Huh7 の癌の進展がトロンボポエチンによって増悪するか invasion assay および migration assay にて検討したが、いずれもトロンボポエチンによる明らかな浸潤や転移は起こらなかった (図 6)。

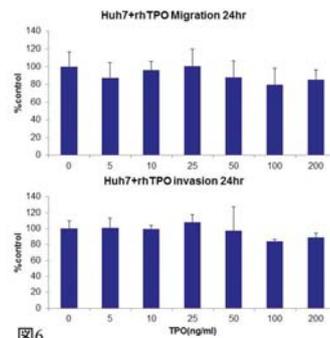
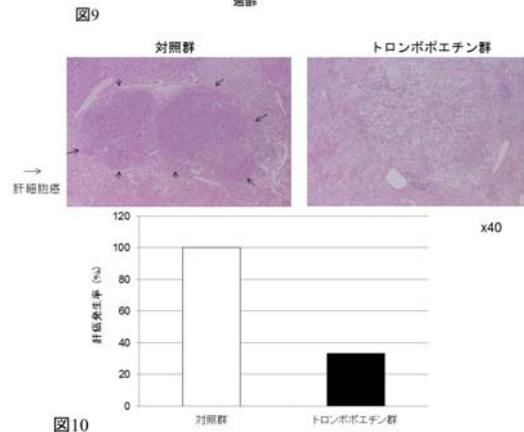
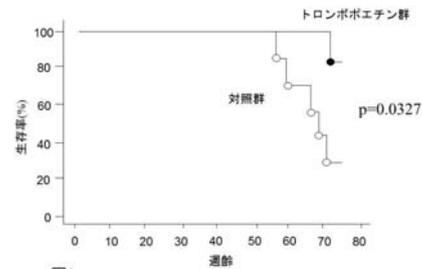
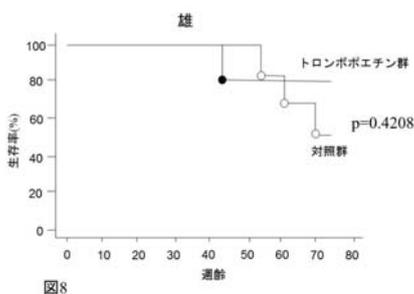
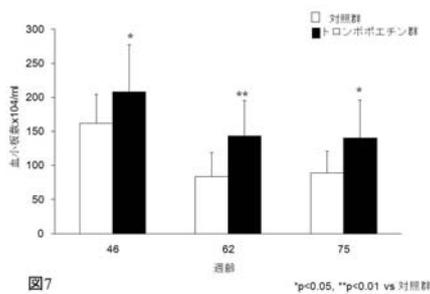


図6

(3) トロンボポエチンの Pten CKO モデルにおける自然発癌抑制効果の検討

40 週齢の Pten CKO マウスの雄および雌を用いて週一回トロンボポエチンを腹腔内投与するトロンボポエチン群と投与しない対照群を作成し、35 週間経過を観察した。検討項目は血小板数、肝機能、生存率、肝癌発生率である。トロンボポエチン投与によって血小板数は有意に増加した (図 7)。肝機能は 2 群間で有意差を認めなかった。生存率は雄では有意差が認められなかったが (図 8)、雌では TPO 群の生存率が有意に向上した (図 9)。肝癌発生率は雄では両群とも全例に肝癌が認められたが、雌ではトロンボポエチン群の肝癌発生率が減少した (図 10)。肝細胞癌の一例を図 10 に示す。卵巣細胞にトロンボポエチン受容体である c-Mpl が発現し、トロンボポエチンが卵巣細胞を増殖させるという報告がある (Sirotkin AV et al, J Endocrinology 2004)。またエストロゲンは非アルコール性脂肪性肝炎の抑制作用 (Sephner T et al, Cancer 2009)、肝癌細胞の増殖抑制作用 (Huang EJ et al, MCB 2006) があることが報告されている。今回トロンボポエチン投与によって雌の生存率に有意差を認めた要因としてトロンボポエチンの血小板増加効果およびエストロゲン増加作用が考えられた。トロンボポエチン投与は限定的ではあるが肝癌抑制効果を有する可能性が示唆された。



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 8 件)

- ① 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
- ② 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.2011 査読有
- ③ 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 sinu

soidal endothelial cell by human platelets induces hepatocyte proliferation. *Journal of Hepatology*. 53(4):648-654.2010 査読有

- ④ 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 hepatobiliary-pancreatic surgery*. 17(6):855-864.2010 査読有
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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

[学会発表] (計 12 件)

- ① 川崎卓也、村田聡一郎、田村孝史、丸山岳人、大城幸雄、柴崎佑樹、高橋一広、野崎礼史、池田直哉、朴秀吉、福永 潔、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、川崎卓也、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、村田聡一郎、高橋一広、野崎礼史、大城幸雄、池田直哉、朴 秀吉、Myronovych Andriy、久倉勝治、福永 潔、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、村田聡一郎、福永 潔、安部井誠人. 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, Murata S, Takahashi K, Nozaki R, Ohshiro Y, Ikeda N, Pak 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. 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、村田聡一郎、高橋一広、大城幸雄、川崎卓也、Andriy Myronovych、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、村田聡一郎、柴崎佑樹、大城幸雄、高橋一広、池田直哉、朴 秀吉、Andriy Myronovych、久倉勝治、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, S Murata, K Takahashi, Y Ohshiro, T Kawasaki, A Myronovych, 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 池田直哉、村田聡一郎、川崎卓也、アンドリーミロノヴィチ、久倉勝治、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

- ⑩ 村田聡一郎, 渡辺基信, 久倉勝治, アン
ドリーミロノヴィチ, 福永 潔, 齋藤敏
之, 安江 博, 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
- ⑪ 池田直哉, 村田聡一郎, 柴崎佑樹, アン
ドリーミロノヴィチ, 川崎卓也, 久倉勝
治, 小林直哉, 大河内信弘. 血小板は肝星
細胞の α SMA発現を抑制する. 第45回
日本肝臓学会総会.2009.6.4 神戸
- ⑫ 川崎卓也, 村田聡一郎, 柴崎佑樹, 池田
直哉 アンドリーミロノヴィチ, 久倉勝
治, 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

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○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

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