

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16266

研究課題名（和文）肝類洞閉塞症候群における血小板活性化受容体CLEC-2の役割解明

研究課題名（英文）Role of the platelet-activated receptor CLEC-2 in hepatic sinusoidal obstruction syndrome

研究代表者

大竹 志門 (OTAKE, Shimon)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50813060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：SOSは化学放射線療法後に生じる合併症であり、肝類洞内皮細胞障害を発端とする循環障害性肝障害を特徴とする。CLEC-2は血小板に発現する他マウスにおいては肝類洞内皮細胞にも発現が報告されており、CLEC-2がSOS病態に何らかの影響をもつ可能性について検証した。モノクロタリン投与SOSモデルマウスを使用し、事前にCLEC-2抗体でCLEC-2を血小板上から除去したところ、肝障害の程度や血小板数の低下が有意に改善した。肝切片では組織障害スコアが改善し、組織内の血小板をCD42bに対する免疫染色で評価したところ陽性域が低下した。また、病勢に関連するとされるPAI1の発現にも有意な低下がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝類洞閉塞症候群は主に強力な化学放射線療法を行う造血幹細胞移植後に生じる治療に関連した合併症である。重症例では致死率は極めて高く、移植治療における大きな問題となっている。本研究では血小板上に発現するCLEC-2という分子に着目し、CLEC-2を除去することで重症化を抑制できる可能性について検証した。その結果、マウスモデルにおいては血小板CLEC-2の除去が明らかに重症化抑制を示しており、有望な結果が得られた。ヒトにおいても同様の結果が得られるかはさらなる検討が必要であるが、肝類洞閉塞症候群の有効な治療法開発にむけ研究を進展させていきたい。

研究成果の概要（英文）：SOS is a complication that occurs after chemotherapy, and is caused by hepatic sinusoidal obstruction resulting from vascular injury. CLEC-2 is known to have a variety of pathophysiological roles beyond clotting, and is also reported to be expressed on sinusoidal endothelial cells. Based on these findings, we hypothesized that CLEC-2 may have some role in the pathogenesis of SOS. SOS model was created by administration of monocrotaline (MCT) to mice, and CLEC-2 antibody (Ab) was administered to deplete CLEC-2. Ab treatment attenuated the increase in Bil/AST levels and the decrease in platelet counts. Evaluation of liver tissue sections also showed a decrease in tissue severity scores. To investigate the cause of thrombocytopenia, we compared CD42b-positive areas and found that the positive areas were reduced in Ab-treated mice. Finally, we examined the expression of PAI1, which correlate with the severity of SOS, by RT-qPCR and found that it was reduced by Ab treatment.

研究分野：血液内科学、臨床検査医学、血栓止血学

キーワード：肝類洞閉塞症候群 血小板 CLEC-2

1. 研究開始当初の背景

肝類洞閉塞症候群は種々の化学療法・放射線療法の後に生じる肝障害であり、類洞内皮細胞障害を発端とし、類洞内皮が膨化する移動そのものが閉塞することで循環障害性肝障害をきたすことによって生じる。治療強度が発症率に関わることから、特に強力な化学療法・放射線療法を行う造血幹細胞移植後の合併症として知られている。

また、より強力な骨髄破壊的前処置においてはおよそ 10%、非破壊的前処置においてはおよそ 2%の発症率であることがこれまでに報告されている。

ひとたび肝類洞閉塞症候群を発症すると、重症例では 80%の死亡率を示すことも報告されており、安全な移植医療を行う上でも克服すべき重要な合併症の一つである。

CLEC-2 は蛇毒ロドサイチンの受容体として山梨大学の井上らによって報告された血小板活性化受容体である。またその生体内リガンドが腎足細胞やリンパ管内皮細胞、I 型肺胞上皮細胞などに発現するポドプラニンであることも報告されている。さらに、CLEC-2 はマウスにおいて血小板や巨核球に発現する一報、肝類洞内皮細胞にも発現することが報告されている。

私はこれらの知見から、血小板と肝類洞内皮細胞にともに発現する CLEC-2 が、なんらかの相互作用をもち病態に何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えて検証を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝類洞閉塞症候群における血小板活性化受容体 CLEC-2 の役割解明である。

3. 研究の方法

肝類洞閉塞症候群モデルについては、ICR マウスに 200 mg/kg のモノクロタリン (MCT) を投与することで作製した。事前に CLEC-2 抗体をマウスに投与することで、血小板上から CLEC-2 を除去することが可能であり、CLEC-2 抗体を週に 1 回、2 回投与したのちに MCT を腹腔内投与した。

その後、主に以下について検討を行った。1. 血清サンプルを用いた生化学データ。2. 肝切片について HE 染色による組織重症度スコアリング。3. 免疫染色を用いて肝類洞内皮細胞 (ICAM-1) 血小板 (CD42b) の陽性域。4. 肝臓から tRNA を抽出し PAI1 や関連する経路を RT-qPCR 法で相対定量。

4. 研究成果

(1). 血清サンプルを用いた生化学データ

ビリルビン値、トランスアミナーゼ値、LDH 値、アルブミン値などヒトにおいても肝類洞閉塞症候群発症にともない変化がみられる各種検査値を比較した。その結果、抗体投与群においていずれの項目も有意な改善がみられた。

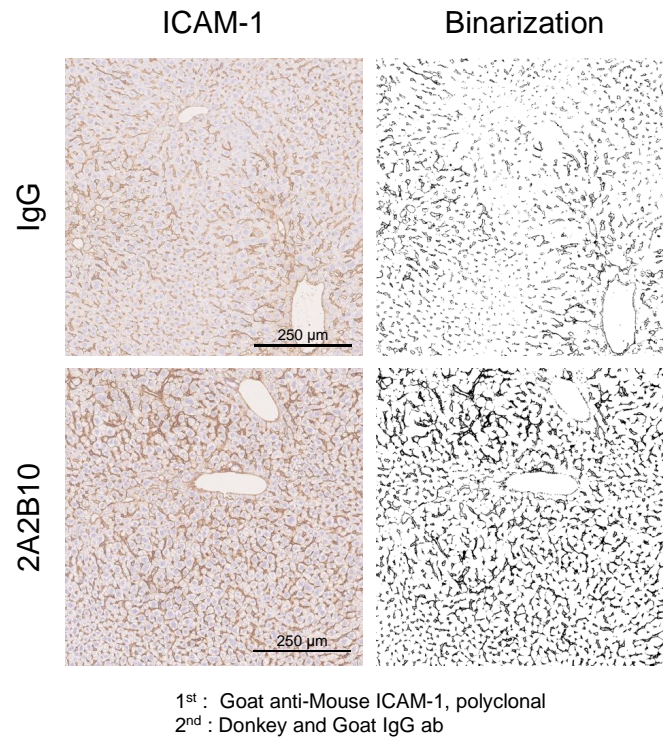
(2). 肝切片について HE 染色による組織重症度スコアリング

肝切片については類洞の出血、肝細胞の壊死、類洞の拡張、中心静脈の内皮細胞障害の 4 点について、0-3 のスコアをつけて評価した。

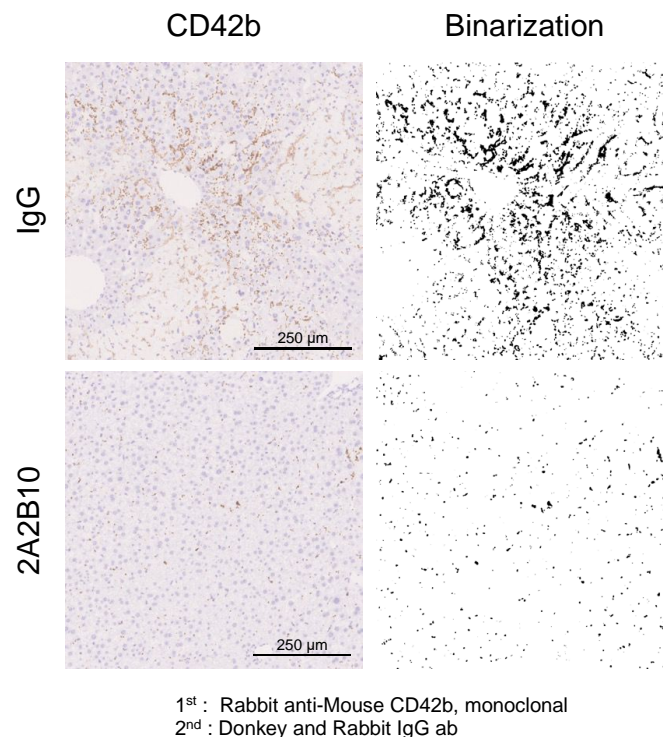
Variable (range)	IgG	2A2B10	P-value
Sinusoidal dilatation (0-3)	1.3 ± 1.0	0.1 ± 0.3	0.0078
Coagulative necrosis of hepatocytes (0-3)	1.9 ± 1.3	0.2 ± 0.7	0.0078
Endothelial damage of the central vein (0-3)	1.1 ± 0.6	0.4 ± 0.5	0.0605
Sinusoidal hemorrhage (0-3)	2.1 ± 1.2	0.2 ± 0.4	0.0024
Total SOS score (0-12)	6.4 ± 2.4	1.0 ± 1.0	0.0001

その結果、上記の通り有意な軽減がみられた。

(3). 肝切片を用いた ICAM-1 および CD42b に対する免疫染色
 まず、肝類洞内皮細胞の脱落の程度を確認するため、ICAM-1 をターゲットとした免疫染色を行った。以下に示す通り画像を Black/White の二値化して定量化したところ、抗体投与群において ICAM-1 陽性域は有意に保たれていた。



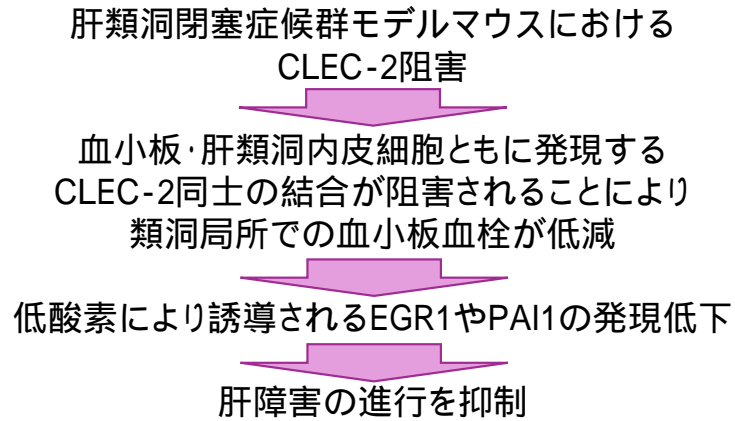
血小板数の低下は抗体投与群において有意な抑制がみられたことから、CD42b をターゲットとした免疫染色を行った。ICAM-1 と同様の方法で定量化したところ、抗体投与群において CD42b 陽性域は有意に低下した。



血小板数と、CD42b 陽性域は統計学的に逆相関がみられており、局所での血小板血栓の多さが血小板数低下に寄与しているものと考えられた。

(4). 肝臓を対象とした RT-qPCR

PAI1 の発現が肝類洞閉塞症候群モデルの重症度に関連していると報告されていることから、これについて測定を行った。その結果、PAI1 は有意な低下がみられ、その周辺のパスウェイについても検討を行ったところ、Hif1a, Hif2 については変化がない一方で Egr1 については Pai1 と同程度の低下がみられた。さらに、TGF /SMAD の経路についても検討したが、これについては変化がみられなかった。上記の通りこれまで得られた研究結果から、以下に示すように肝類洞閉塞症候群における CLEC-2 の役割が解明された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hamada Takashi, Takahashi Hiromichi, Nakagawa Masaru, Nukariya Hironao, Ito Shun, Endo Toshihide, Kurihara Kazuya, Koike Takashi, Iizuka Kazuhide, Ohtake Shimon, Ichinohe Takashi, Maebayashi Toshiya, Miura Katsuhiko, Hatta Yoshihiro, Nakamura Hideki	4. 巻 16
2. 論文標題 Pulmonary Venous Occlusive Disease after Autologous Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncology	6. 最初と最後の頁 338 ~ 346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000530265	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shimon Otake, Tomoyuki Sasaki, Toshiaki Shirai, Nagaharu Tsukiji, Katsuhiko Takano, Shogo Tamura, Yukio Ozaki, Katsue Suzuki-Inoue
2. 発表標題 CLEC-2 promotes IGF-1 secretion from PDPN+ stromal cells and positively regulates erythropoiesis
3. 学会等名 第83回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大竹 志門、小池 隆、白井 俊光、築地 長治、大石 沙織、佐々木 知幸、井上 克枝、三浦 勝浩、中村 英樹
2. 発表標題 肝類洞閉塞症候群モデルマウスにおける血小板活性化受容体CLEC-2の役割
3. 学会等名 第46回 日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------