

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293132

研究課題名(和文) 血小板生理活性ペプチド定量測定による骨髄環境予測と横断的病態検査への応用展開

研究課題名(英文) Intra-platelet peptide as a diagnostic molecule of bone marrow function

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：末梢組織のイベントは骨髄へのシグナル応答を介してお互いにポジティブあるいはネガティブにフィードバック調節されているものと予測される。従って止血栓の大きさと質は部分的には骨髄機能によって制御されていると考える。本研究による最も顕著な実績として、肝細胞癌による肝切除後の肝再生過程における血小板VEGF-Aの動態について明らかにして論文発表した(Aryal B, et al. PLoS ONE 11(3):e0150446)。創傷治癒の骨髄へのシグナルは骨髄巨核球における血小板産生において血小板VEGF-Aの産生を調節して組織再生に寄与していることを明らかにすることにより本研究の目的を果たした。

研究成果の概要(英文)：Wound healing at the site of peripheral tissue signals to the bone marrow followed by regulating the function by each other. Even the quality of the thrombus is under the function of bone marrow. The most important work in this study is to publish the paper which showed dynamics of intra-platelet VEGF-A from cancer to the later phase of liver regeneration after partial hepatectomy in humans. The amount of intra-platelet VEGF-A changed dramatically under the course of liver regeneration which means the pivotal role of bone marrow function to modulate the platelet quality contributing to the wound healing. In this study, we clearly showed the cross-talk between peripheral event and bone marrow response in case of organ regeneration. Furthermore, we showed two distinct phases of liver regeneration after partial hepatectomy, an early inductive phase with rapid proliferation of hepatocytes followed by an angiogenic phase distinguished by the expansion of non-parenchymal compartment.

研究分野：止血凝固・血小板・血管代謝

キーワード：VEGF-A platelet bone marrow angiogenesis regeneration wound healing hepatectomy

1. 研究開始当初の背景

【背景 - 1】 - これまでの研究の流れ - VEGF-A の病態への関与における多様性
我々は POEMS 症候群の血中において VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A 以下 VEGF-A)が著明に上昇していることを報告 (Watanabe O, et al. Lancet, 1996) して以来、本症候群の病態における VEGF-A の関与について一連の研究を重ねてきた。その後、VEGF-A の生理活性がその 2 大活性である血管新生作用と血管透過性作用を軸として免疫系、凝固・血管代謝系・神経系に作用することにより生体内のホメオスターシスの維持に深く関わっていることを明らかにしてきた。更に血清にて測定される VEGF-A の抗原量は健常人においても 10 倍以上の差 (多様性があり) 血清 VEGF-A の殆どは血小板に含まれていることを報告して「血小板 VEGF」の概念が種々の病態を理解する上において重要であることを重ねて報告してきた。

【背景 - 2】VEGF-A の作用の組織特異性と機能的多様性 更に我々は Cre-loxP リコンビネーションシステムによる免疫 B 細胞特異的な VEGF-A 発現マウスを作出することにより、VEGF-A はリンパ節腫脹に伴う炎症性リンパ管新生においてリンパ節に特化した脈管構造である **High Endothelial Venules (HEVs)の増殖作用**を有し免疫環境の修飾に深く関わっていることを 2010 年に報告した(Shrestha B, et al. J Immunol.2010)。本報告は VEGF-A の主作用が血管新生と血管透過性の概念にとどまらず組織特異性を有することと、免疫系への機能的多様性を初めて示したものであった。

2. 研究の目的

これまでに報告してきた VEGF-A の種々の病態への関与ならびに血清 VEGF-A のほぼ全てが血小板 VEGF-A であること、そして血小板は骨髄巨核球より産生されることから、血小板 VEGF-A を軸として末梢病態と骨髄との応答様式に着目した新しい病態診断学としての概念を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの基盤研究により得られた知見を進展させ、骨髄環境と末梢組織の相互応答の観点から病態診断ツールとして統合する方向で臨床研究と基礎研究を行う。臨床研究は「新規の生理学的知見と病態との関連」の双方向にて進める。(1) 健常人の血小板 VEGF-A の集積データよりその多様性を求め動脈硬化感受性因子との関連を解析する。(2)Major surgery における術後の炎症・創傷治癒経過と血小板 VEGF-A の関連

解析を行う。(3) 再生不良性貧血における骨髄予備能としての血小板 VEGF-A の評価解析を行う。(4)糖尿病性神経障害における血小板 VEGF-A と病態との関連解析を行う。(5) 川崎病における血小板 VEGF-A の評価と予後調査を行う。基礎研究として、Cre-loxP システムを用いた骨髄巨核球(血小板)特異的 VEGF-A 発現 tg マウスにおける表現型の観察と炎症刺激に対する骨髄末梢の相互応答を組織変化・液性因子の変化の観点から解析する。

4. 研究成果

本研究による最も顕著な実績として、肝細胞癌による肝切除後の肝再生過程における血小板 VEGF-A の動態について明らかにして論文発表した (Aryal B, et al. PLoS ONE 11(3):e0150446, 2016)。創傷治癒の骨髄へのシグナルは骨髄巨核球における血小板産生において血小板 VEGF-A の産生を調節して組織再生に寄与していることを明らかにした。

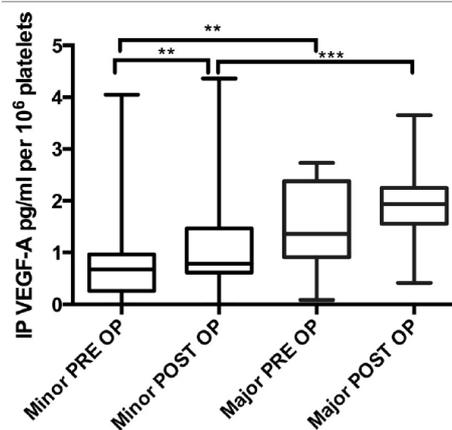
< 代表データの提示 >

RESEARCH ARTICLE

A Switch in the Dynamics of Intra-Platelet VEGF-A from Cancer to the Later Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Humans

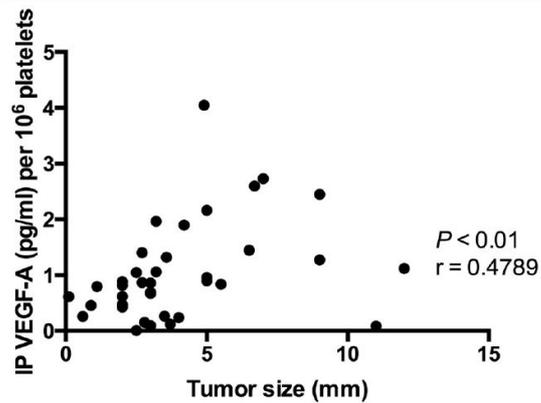
Bibek Aryal¹, Toshiaki Shimizu², Jun Kadono¹, Akira Furoi³, Teruo Komokata⁴, Maki Inoue⁵, Shunichiro Ikeda⁵, Yoshihiko Fukukura⁶, Masatoshi Nakamura⁷, Munekazu Yamakuchi², Teruto Hashiguchi^{2,8}, Yutaka Imoto^{1*}

1) 肝細胞癌における部分肝切除を施行された 37 症例の血小板 VEGF-A の抗原量は手術侵襲の大きい術後 4 週目の患者群において最も

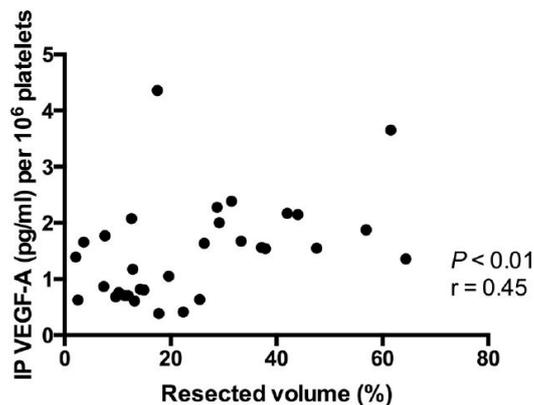


増加した (図右端)

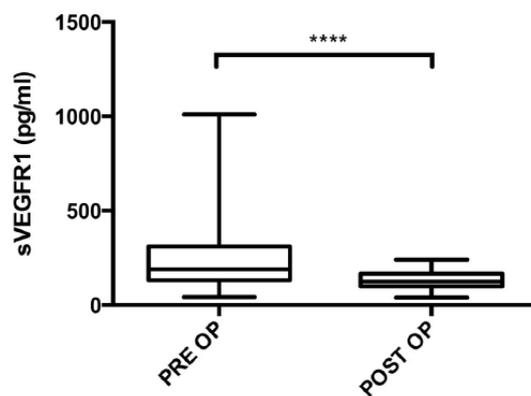
2) 肝細胞癌における部分肝切除を施行された 37 症例の血小板 VEGF-A の抗原量は、手術前において腫瘍の大きさと相関を示した。



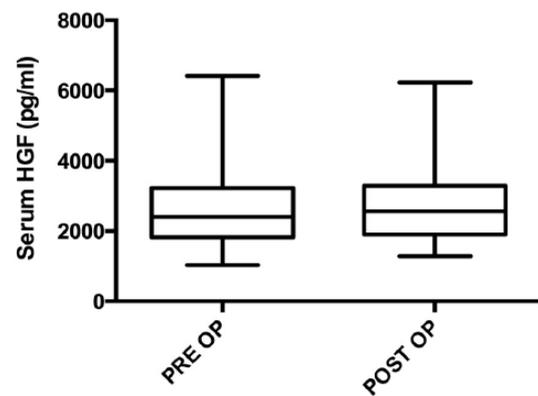
3) 肝細胞癌における部分肝切除を施行された37症例の術後4週目の血小板 VEGF-A の抗原量と切除された肝の体積は相関を認めた。



4) 肝細胞癌における部分肝切除を施行された37症例の術後4週目の sVEGFR-1 の抗原量は術後4週目に減少していた。



5) 肝の主要な再生因子として知られる HGF (Hepatocyte Growth Factor) の血清における抗原量は手術前と術後4週目において変化を認めなかった。



以上の結果より、肝部分切除後の肝再生の過程において血小板 VEGF-A の抗原量は増加しており、肝再生の過程に積極的に寄与していることが推測された。すなわち、組織侵襲・再生に伴う骨髄へのシグナルにより骨髄巨核球の VEGF-A の産生が亢進したと考えられる。術後4週目は既に術後の炎症は治まっており、組織修復・再生における骨髄へのシグナルによる血小板の刺激応答を示していると考ええる。

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11件)

1. Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Komokata T, Inoue M, Ikeda S, Fukukura Y, Nakamura M, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. A Switch in the Dynamics of Intra-Platelet VEGF-A from Cancer to the Later Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Humans. *PLoS One*. 2016 Mar 1;11(3):e0150446. (査読有)

2. Kawamura H, Tokuda K, Imuta N, Kubota T, Koriyama T, Miyanojara H, Hashiguchi T, Kawano Y, Nishi J. Epidemiological Analysis of Nosocomial MRSA Outbreaks Using Phage Open-Reading Frame Typing in a Tertiary-care Hospital. *Jpn J Infect Dis*. 2016 Jan 8. [Epub ahead of print] (査読有)

3. Amitani M, Cheng KC, Asakawa A, Amitani H, Kairupan TS, Sameshima N, Shimizu T, Hashiguchi T, Inui A. Allantoin ameliorates chemically-induced pancreatic -cell damage through activation of the imidazoline I3 receptors. *PeerJ*. 2015 Aug 6;3:e1105. (査読有)

4. Namino F, Iriki Y, Maenosono R, Ichiki H, Okui H, Yoshimura A, Oketani N, Matsushita M, Ohishi M, Hashiguchi T. The optimal setting of complex fractionated atrial electrogram software in substrate

ablation for atrial fibrillation. *J Arrhythm.* 2015 Feb;31(1):6-11. (査読有)

5. Kawano H, Sakamoto T, Ito T, Miyata K, Hashiguchi T, Maruyama I. Hyaluronan protection of corneal endothelial cells against extracellular histones after phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 2014 Nov;40(11):1885-1893. (査読有)

6. Hatanaka M, Higashi Y, Fukushige T, Baba N, Kawai K, Hashiguchi T, Su J, Zeng W, Chen X, Kanekura T. Cleaved CD147 shed from the surface of malignant melanoma cells activates MMP2 produced by fibroblasts. *Anticancer Res.* 2014 Dec;34(12): 7091-7096. (査読有)

7. Furukawa Y, Hashiguchi T, Minami R, Yamamoto M, Takashima H. Exacerbation of microcytic anemia associated with cessation of anti-retroviral therapy in an HIV-1-infected patient with beta thalassemia. *J Infect Chemother.* 2014 Jun;20(6):387-389. (査読有)

8. Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara K, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T. Upregulation of non-cell-derived vascular endothelial growth factor A increases small clusters of insulin-producing cells in the pancreas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 May;122(5):308-315. (査読有)

9. Kawano H, Ito T, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I, Hisatomi T, Nakamura M, Sakamoto T. Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment. *Lab Invest.* 2014 May;94(5):569-585. (査読有)

10. Ochiai R, Sugiura Y, Shioya Y, Otsuka K, Katsuragi Y, Hashiguchi T. Coffee polyphenols improve peripheral endothelial function after glucose loading in healthy male adults. *Nutr Res.* 2014 Feb;34(2):155-159. (査読有)

11. Kohjitani A, Miyata M, Iwase Y, Ohno S, Tohya A, Manabe Y, Hashiguchi T, Sugiyama K. Associations between the autonomic nervous system and the second derivative of the finger photoplethysmogram indices. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(5):501-508. Epub 2014 Jan 15. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1. Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Yamakuchi M, Komokata T, Hashiguchi T, Imoto Y. Platelet modulates the angiogenic phase of liver regeneration after partial hepatectomy in humans. 第60回日本臨床検査医学会九州地方会/第26回日本臨床化学会九州支部総会 2015年3月7日、鹿児島大学医学部鶴陵会館(鹿児島県鹿児島市)

2. Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Inoue M, Komokata T, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. Platelet mediated angiogenesis during liver regeneration after partial hepatectomy in humans. 第27回日本肝胆膵外科学会学術集会 2015年6月11日~13日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都港区)

3. Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Inoue M, Komokata T, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. A bidirectional role of platelet sequestered vascular endothelial growth factor-A in cancer and liver regeneration. 第62回日本臨床検査医学会学術集会 2015年11月19日~22日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

〔図書〕(計1件)

橋口照人: 血小板と炎症. 医学のあゆみ 251(2) 165-168, 2014

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

河野 嘉文 (KAWANO YOSHIFUMI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・
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

渡邊 修 (WATANABE OSAMU)
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: 30511802

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

清水 利昭 (SHIMIZU TOSHIAKI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号: 50468055