

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462083

研究課題名(和文) 肝再生・肝線維化における新規血小板活性化受容体CLEC-2の役割に関する検討

研究課題名(英文) Role of CLEC-2 in hepatic regeneration and fibrosis

研究代表者

雨宮 秀武 (AMEMIYA, Hidetake)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：70377547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CLEC-2欠損骨髄キメラマウスモデル(KO)を作成した。Wild-type(WT)キメラマウスは、C57BL/6Nマウス骨髄を照射後に移植した。70%肝切除(Hpx)を施行し、肝再生を検討した。WT群ではHpx後の肝体重比は漸増し、7日目にHpx前値にまで回復した。KO群ならびにKO群は肝再生有意に遅延し、Ki67ならびにPCNA発現も有意に減少した。TNF- α ならびにIL-6 mRNA発現はWT群において有意に増加し、KO群では有意に低下した。STAT3とIL-6発現はWT群と比較しKO群で有意に低下した。CLEC-2は類洞内皮細胞に発現するポドプランリンを介し肝再生に関与していた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the role of CLEC-2 in liver regeneration following partial liver resection in mice. Irradiated chimeric mice transplanted with the fetal liver cells from wild-type (WT) or CLEC-2 deleted specifically from platelets (flKO) mice were generated. Mice underwent 70% of partial hepatectomy (PH). Liver/body weight ratio and the expression of all cell proliferation markers were significantly lower in the flKO group than in the WT group. The expression of pSTAT3 was significantly greater in the WT group than in the flKO group. The expression of IL-6 was significantly greater in the WT group than in the flKO group. The expression of podoplanin was detected in the hepatic sinusoids of both two groups. The extent to which platelets accumulated in hepatic sinusoids was significantly less in the flKO group than in the WT group. CLEC-2 was involved in hepatic regeneration after liver resection.

研究分野：肝免疫

キーワード：肝類洞壁細胞 肝再生 肝障害 マクロファージ 肝腫瘍

1. 研究開始当初の背景

肝再生にはさまざまな因子が関与している。これまで申請者らは、M-CSFにより誘導された成熟肝マクロファージが肝再生を促進する事実を報告してきた (Amemiya and Kono et al. J. Surg. Res. 2011;165:59-67.)。一方、血小板は増殖因子や生理活性物質を多量に含んでおり肝再生を促進させる (セロトニン、hepatocyte growth factor、platelet-derived growth factor、epidermal growth factor)。実際、マウスの肝再生モデルでは、血小板減少マウスおよび血小板機能を阻害する clopidogrel を投与されたマウスでは肝再生が障害される事実は、血小板が肝再生に不可欠な役割を果たしていることを示している。

2. 研究の目的

近年発見された血小板活性化・凝集を惹起する新しいクラスの血小板上受容体 c-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)の肝類洞での発現を、ヒト肝切除検体より肝類洞壁細胞群を分離し同定する。

さらに、肝再生・肝線維化における CLEC-2 の役割を CLEC-2 chimera knockout mouse model を使用し特異的に解析する。

3. 研究の方法

(1) CLEC の肝内発現と肝再生の検討

CLEC-2 の肝内での発現の検討

ヒト肝切除検体を用いて、肝類洞に存在する肝マクロファージ (Kupffer 細胞)、類洞内皮細胞、肝星細胞をコラゲナーゼ還流法とニコデントズを用いた比重遠心法で分離する。さらに、エルトリエーターを使用し purify する。これらの細胞を用いて Kupffer 細胞は抗 CD68 と抗 CLEC-2 抗体、類洞内皮細胞は抗 CD34 抗体と抗 CLEC-2 抗体、肝星細胞は抗 ADAMTS 13 抗体と抗 CLEC-2 抗体を用いた 2 重免疫染色による FACS 法で

発現細胞を同定する。

部分肝切除後肝再生における CLEC-2 の役割の解明:

- CLEC-2 chimera knockout mouse あるいは Wild type mouse (C57BL/6N)を用い、70% (medial largest lobe)部分肝切除モデルを作成する。
- 血清セロトニン、HGF、EGF 値を測定する。
- 肝切除後 7 日目に肝組織を採取し、肝体重比を測定し肝再生を比較する。BrdU 抗体を用いた免疫組織染色法で細胞増殖を検討する。
- 肝細胞増殖促進因子 hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- α (TGF- α), heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)と、肝細胞増殖抑制因子 TGF- β の発現を Western blotting 法で検討する。
- 肝再生に関するサイトカイン (IL-6 と TNF- α) の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討する。
- 肝細胞の Akt のリン酸化を Western blotting 法で検討する。

(2) 硬変に至る肝線維化発症機序における CLEC-2 の役割の解明

- CLEC-2 chimera knockout mouse ならびに wild-type mouse に四塩化炭素を週 3 回腹腔内投与し肝線維化モデルを作成する。
- 1 週間投与後に犠牲死させトランアミナーゼ (ALT) 値と血小板を測定する。
- 肝組織の線維化面積を病理組織学的に検討する。
- 肝星細胞の活性化を検討する目的で α -SMA を免疫組織染色法

で検討する。

- 肝組織の HGF と IGF-1 発現を検討する。
- 肝組織の PCNA(proliferating cell nuclear antigen)陽性率を測定する。

(3)肝障害・肝線維化後の肝再生における CLEC-2 の役割の解明

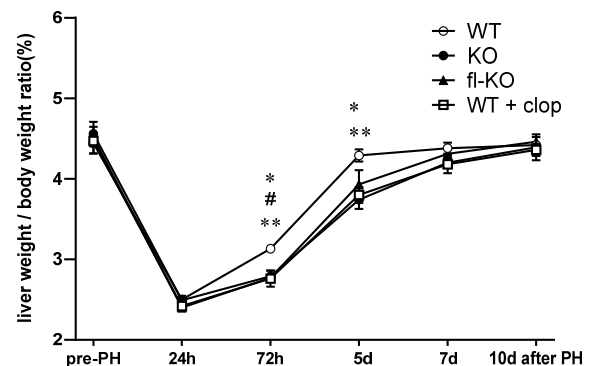
- CLEC-2 chimera knockout mouse ならびに wild-type mouse に四塩化炭素（オリーブオイル混合液）を週 3 回腹腔内投与し、3 週間後に 50% 肝切除（medial largest lobe）を施行する。対象群は、オリーブオイルのみを投与する。
- 血清セロトニン、HGF、EGF 値を測定する。
- 肝切除後 7 日目に肝組織を採取し、肝体重比を測定し肝再生を比較する。BrdU 抗体を用いた免疫組織染色法で細胞増殖を検討する。
- 肝組織の HGF と IGF-1 発現を検討する。
- 肝組織の PCNA(proliferating cell nuclear antigen)陽性率を測定する。
- 肝細胞増殖促進因子 hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- α (TGF- α), heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)と、肝細胞増殖抑制因子 transforming growth factor- β (TGF- β)の発現を Western blotting 法で検討する。
- 肝再生に關与するサイトカイン（IL-6 と TNF- α ）の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討する
- 肝障害時の肝再生に關与する Jak / STAT3 signal cascade と PDK1 / Akt signal cascade の肝細胞での発

現を Western blotting 法で検討する。

4 . 研究成果 肝再生での検討結果

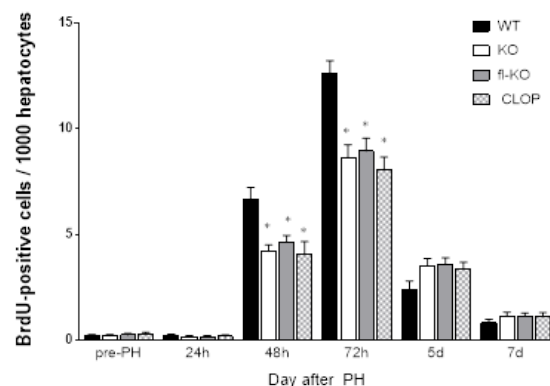
WT 群では Hpx 後の肝体重比は漸増し、7 日目に Hpx 前値にまで回復した。KO 群ならびに flox/flox KO 群は肝再生有意に遅延し、Ki67 ならびに PCNA 発現も有意に減少した。TNF- α ならびに IL-6 mRNA 発現は WT 群において有意に増加し、flox/flox KO 群では有意に低下した。p Akt ならびに p ERK1/2 は WT 群において Hpx 後に有意に発現が増加、また、flox/flox KO 群においても増加を認め両群間で有意差を認めなかった。一方、STAT3 発現は WT 群と比較し flox/flox KO 群で有意に低下した。

肝切除後の肝体重比

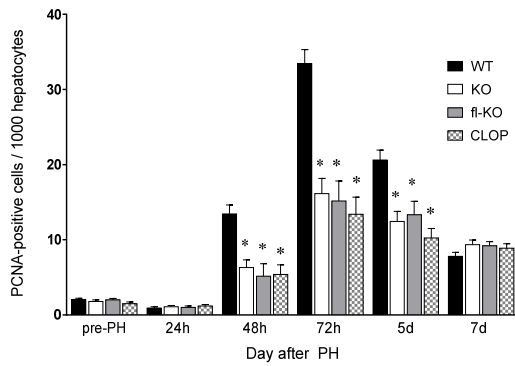


細胞増殖の解析

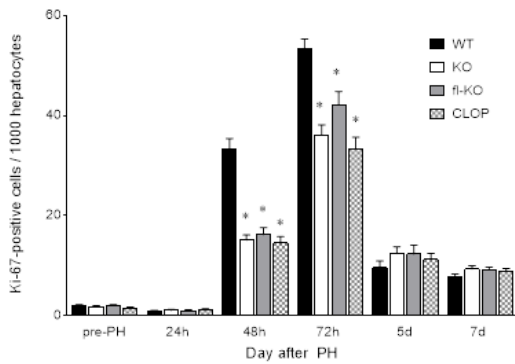
1 BrdU



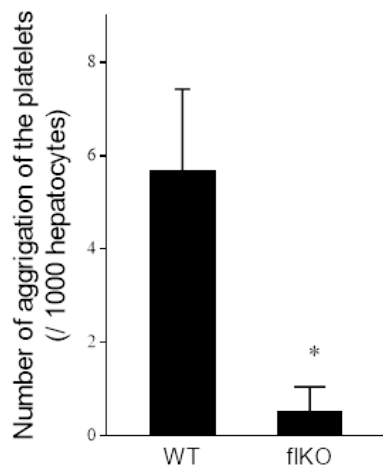
2 PCNA



3 Ki67

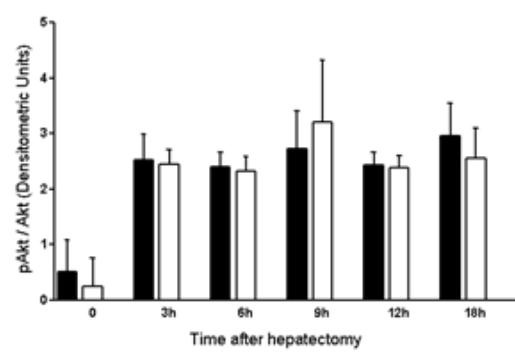


血小板凝集について

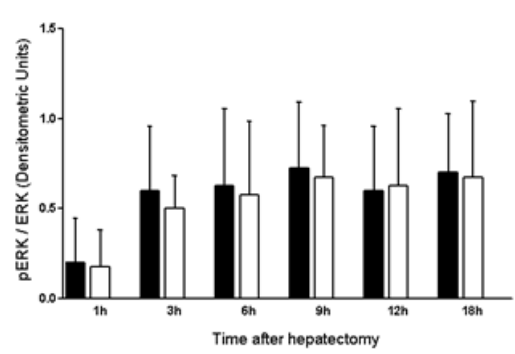


細胞内シグナルの解析

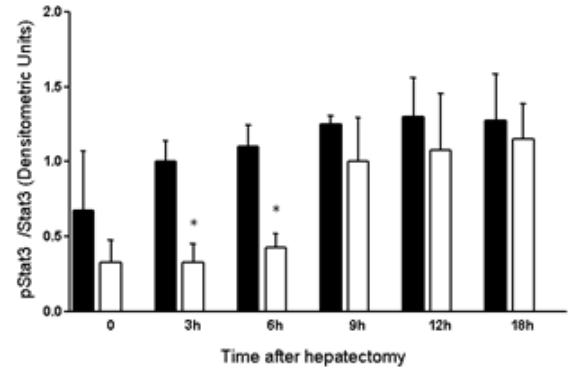
1 Akt



2 ERK



3 Stat3



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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

河野寛、古屋信二、原倫生、平山和義、藤井秀樹 新規クラス血小板上受容体 c-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) は類洞内皮との相互作用で肝切除後肝再生の早期に重要な役割を果たす 第 36 回日本炎症再生学会 2015 年 7 月 21 日から 22 日 六本木ヒルズ (東京都港区)
河野寛、古屋信二、原倫生、土屋雅人、藤井秀樹 肝切除後肝再生における新規クラス血小板上受容体 c-type lectin-like

receptor 2 (CLEC-2)の役割 第 51 回日本
肝臓学会総会 2015 年 5 月 21 日～22 日
ホテル日航熊本(熊本県熊本市)
河野寛、藤井秀樹 新規クラス血小板上
受容体 c-type lectin-like receptor 2
(CLEC-2)は肝切除後肝再生において重
要な役割を果たす 2015 年 第 101 回
日本消化器病学会総会 2015 年 4 月 23
日～25 日 仙台国際センター(宮城県仙
台市)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

雨宮 秀武 (AMEMIYA, Hidetake)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：70377547

(2)研究分担者

河野 寛 (KONO, Hiroshi)
山梨大学・総合研究部・講師
研究者番号：40322127