

特集：肝臓の発生・再生

血小板と肝再生

丸 山 岳 人, 大河内 信 弘

肝再生のメカニズムについてこれまで様々な研究が行われ、肝再生に関わる重要なサイトカイン、増殖因子として IL-6, TNF- α , HGF などが報告され、肝再生は様々な因子が協調しながら進行すると考えられている。血小板に存在する α 顆粒や濃染顆粒には HGF, EGF, VEGF, セロトニンなどの様々な増殖因子や生理活性物質が含まれており、これらは創傷治癒に重要な働きをしている。近年、血小板が肝再生において重要な働きをしていることが報告され、血小板の持つ肝再生メカニズムが徐々に明らかになってきた。本稿では、肝再生における血小板の役割について概説する。

1. はじめに

肝臓は他の臓器と異なり、切除されても減少した肝容積・肝機能を代償するために再生し、ほぼ切除前の肝容積・肝機能に戻ることが古くから知られており、肝再生の機序について様々な研究が行われてきた。肝再生に関わる重要なサイトカイン、増殖因子としてインターロイキン 6 (interleukin-6: IL-6), 腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α : TNF- α), 肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) などが報告されており¹⁾, 肝再生はこれらの因子が協調しながら進行すると考えられているが、そのメカニズムの全容については十分に解明されていない。また、これらのサイトカインや増殖因子の肝再生促進作用を劇症肝炎、肝硬変、肝切除後肝不全の予防などの治療に用いる試みは実験段階にとどまっており、実用化には至っていない。

血小板は巨核球から細胞質断片が放出されたもので、2~4 μ m の円盤状の構造をしており、一次止血に重要な働きをしていることはよく知られている。血小板に存在する α 顆粒や濃染顆粒には HGF, 上皮増殖因子 (epidermal

growth factor: EGF), 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF), セロトニンなどの様々な増殖因子や生理活性物質が含まれており、創傷治癒に重要な働きをしている²⁾。また、これらの血小板に含まれる増殖因子や生理活性物質に肝再生を促進する働きがあることは報告されていたが¹⁾, 血小板自体が肝再生においてどのような働きをするのかは長い間不明であった。2006 年, Clavien らが血小板を減少させたマウスにおいて肝再生が障害されることを報告し³⁾, 血小板が肝再生において重要な働きをしていることが初めて示唆された。そこで、我々は血小板の持つ肝再生メカニズムを分子レベルで解明し、難治性肝疾患に対する新しい治療法の開発を目的とした研究を行っている。本稿では、肝再生における血小板の役割について我々の研究を中心に概説する。

2. 血小板による肝再生促進効果

小動物 (主としてマウス, ラット) を用いた肝切除後肝再生の実験では一般的に肝左葉・中葉を切除する 70% 肝切除モデルが用いられている⁴⁾。我々もマウス 70% 肝切除モデルを用いて、血小板の肝再生に与える影響を検討した。抗血小板抗体投与により血小板が減少したマウスの残肝組織では、細胞増殖マーカーである Ki67 染色比率が血小板正常群に比較して有意に減少したのに対し、トロンボポエチン (thrombopoietin: TPO) 製剤投与により血小板が増加したマウスでは、Ki67 染色比率は有意に増加した (図 1A)⁵⁾。この他にも、血小板増加マウスでは肝体重比、

筑波大学消化器外科 (〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

Platelets and liver regeneration

Takehito Maruyama and Nobuhiro Ohkohchi (Department of Surgery, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8575, Japan)

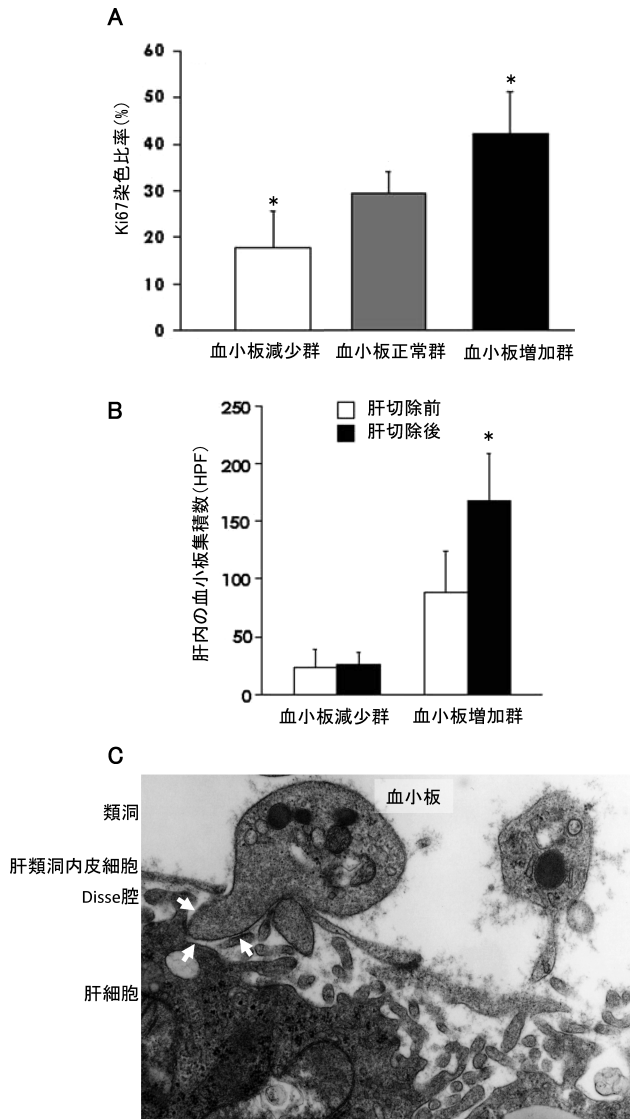


図1 血小板による肝再生促進効果

(A) 肝切除後の残肝組織において、血小板正常群と比較して血小板減少群ではKi67染色比率が有意に減少したのに対し、血小板増加群では有意に増加した。 $*p<0.05$ vs 血小板正常群。(B) 血小板減少群では肝切除前後での肝に集積する血小板数は変わらないが、血小板増加群では肝切除後の集積血小板数が有意に増加した。 $*p<0.05$ vs 肝切除前。(C) 電子顕微鏡では血小板が類洞からDisse腔に移行し、肝細胞と接触している像が観察された。(文献5より引用、一部改変)

細胞分裂指数、増殖マーカーである増殖細胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen: PCNA) 染色比率の有意な増加を認めている⁵⁾。さらに、24時間以内に全マウスが死亡する90%肝切除マウスにおいても、血小板増加マウスでは肝体重比やPCNA染色比率の有意な増加を認め、肝切除後の生存率も有意に改善した⁶⁾。これらの結果から、血小板が肝再生を促進していることが明らかとなった。肝切除前後の肝組織を観察すると、血小板減少マウスでは肝切除後の残肝に集積する血小板数がほとんど変化しなかった

のに対し、血小板増加マウスでは肝切除後の残肝に集積する血小板数が有意に増加していた(図1B)⁵⁾。電子顕微鏡では血小板が類洞からDisse腔に移行し、肝細胞と接触している像が観察された(図1C)⁵⁾。肝障害時に血小板が肝臓に集積し、Disse腔や肝細胞内に移行することはこれまでも報告されており⁷⁻⁹⁾、肝切除後に血小板は肝臓に集積し、肝細胞と接触することで肝再生を促進していることが示唆された。

3. 血小板による肝再生促進のメカニズム

1) 血小板と肝細胞との関係

動物モデルで認められた血小板の肝再生促進効果のメカニズムを明らかにするため、マウス血小板とマウス初代培養肝細胞を用いて *in vitro* で検討した。血小板を肝細胞に添加すると肝細胞のDNA合成が有意に上昇し(図2A)、増殖関連シグナルのAkt、および、ERK1/2が活性化した(図2B)¹⁰⁾。これに対し、透過性膜で血小板が肝細胞と接触しない実験系ではDNA合成の上昇は認められなかった(図2A)¹⁰⁾。さらに、血小板を膜と内容物とに分離し、それぞれ肝細胞に添加したところ、血小板膜ではDNA合成が上昇しなかったのに対し、血小板内容物ではDNA合成の有意な上昇を認めた(図2C)¹⁰⁾。以上より、血小板が肝細胞と物理的に接触することで内容物を放出し、肝細胞を増殖させていることが示唆された。肝細胞増殖に寄与している血小板内因子を明らかにするためにゲルクロマトグラフィーを用いて分析すると、HGF、および、インスリン様増殖因子1 (insulin-like growth factor-1: IGF-1) を多く含む画分で肝細胞のDNA合成が促進していたことが明らかとなった(図2D)¹⁰⁾。これらの結果から、血小板は肝細胞に物理的に接触することで血小板に含まれるHGFやIGF-1などを放出し、Akt、および、ERK1/2を介して肝細胞の増殖を促進していることが示唆された(図3A)。

2) 血小板と肝類洞内皮細胞との関係

肝類洞内皮細胞は肝非実質細胞の一つで、IL-6やHGFを産生し、肝切除後の肝再生を促進する働きがあると報告されている¹¹⁾。しかし、肝再生において血小板が肝類洞内皮細胞にどのように関与しているかはこれまで不明であった。そこで、ヒト血小板とヒト肝類洞内皮細胞株TMNK-1を用いて *in vitro* で検討を行った。TMNK-1に血小板を添加すると、TMNK-1からIL-6の分泌が有意に増加したのに対し、透過性膜で血小板がTMNK-1と接触しない実験系ではIL-6の分泌の上昇は認めなかった(図4A)¹²⁾。血小板を添加しなかったTMNK-1の培養上清と比較して、血小板添加後のTMNK-1の培養上清をヒト初代培養肝細胞に加えると、肝細胞のDNA合成が有意に促進され(図4B)、IL-6の下流のシグナルであるsignal transducer and ac-

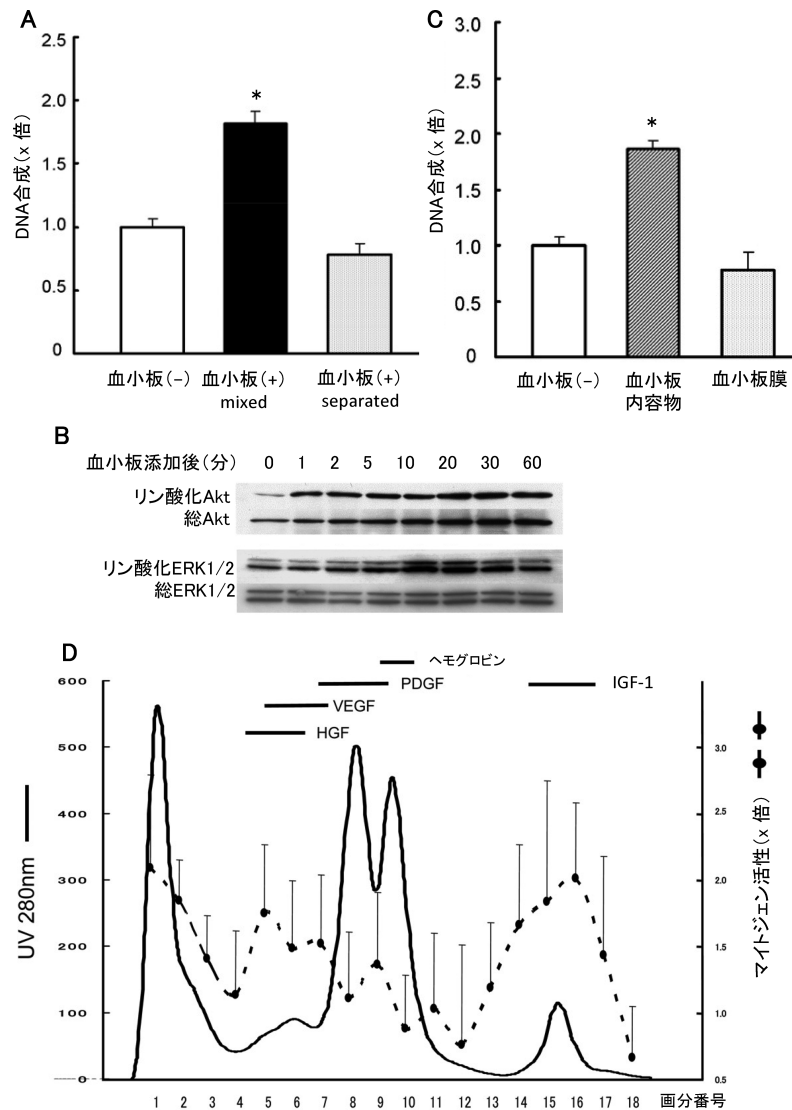


図2 血小板による肝細胞増殖効果

(A) 血小板を添加しなかった肝細胞 [血小板 (-)] と比較して、血小板を添加した肝細胞 [血小板 (+) mixed] ではDNA合成が有意に上昇したが、透過性膜を用いて血小板と肝細胞が接触しない実験系 [血小板 (+) separated] では肝細胞のDNA合成は上昇しなかった。* $p < 0.05$ vs 血小板 (-)。 (B) 血小板を肝細胞に添加すると、肝細胞のAkt、および、ERK1/2が活性化した。 (C) 血小板を添加しなかった肝細胞 [血小板 (-)] と比較して、血小板内容物を添加した肝細胞ではDNA合成が有意に上昇したが、血小板膜を添加した肝細胞ではDNA合成は上昇しなかった。* $p < 0.05$ vs 血小板 (-)。 (D) ゲルクロマトグラフィーの分析から、血小板内のHGF、IGF-1を多く含む画分で肝細胞のDNA合成が促進された。(文献10より引用、一部改変)

tivator of transcription 3 (STAT3) の活性化が認められた (図4C)¹²⁾。肝類洞内皮細胞からIL-6の分泌を促進させている血小板内因子を明らかにするために、血小板中の主な増殖因子、生理活性物質の阻害剤を添加して肝類洞内皮細胞からのIL-6分泌量を測定すると、スフィンゴシン1-リン酸 (sphingosine 1-phosphate: S1P) の阻害剤添加でIL-6分泌量が有意に抑制された (図4D)¹²⁾。S1Pは血小板に豊

富に含まれている脂質メディエーターの一つで¹³⁾、ある種の細胞からIL-6の分泌を促すことが報告されている^{14,15)}。以上の結果から、血小板が肝類洞内皮細胞に物理的に接触することで血小板からS1Pが放出され、肝類洞内皮細胞からIL-6分泌を促し、STAT3を介して肝細胞の増殖を促進していることが示唆された (図3B)。

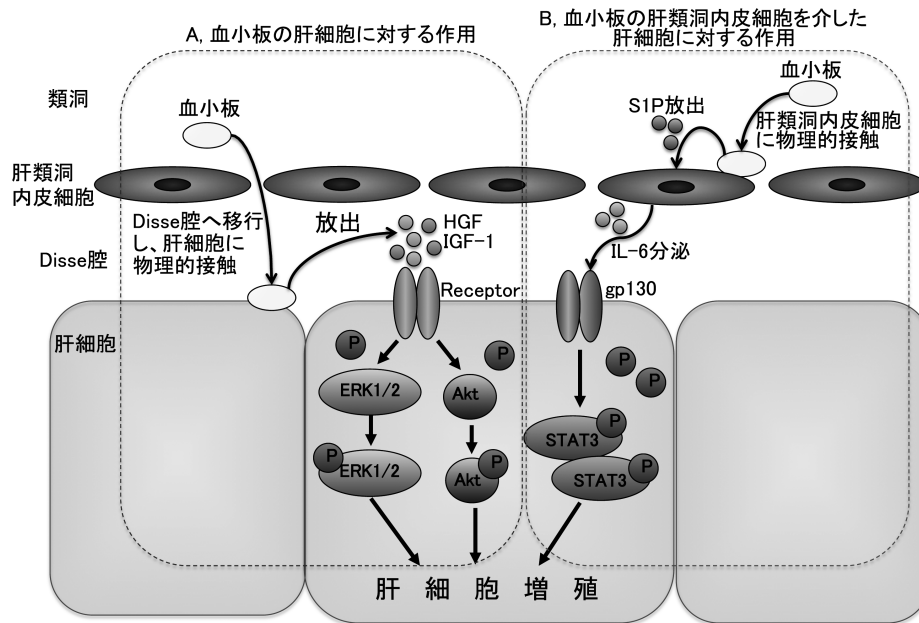


図3 血小板による肝再生促進のメカニズム

(A) 血小板の肝細胞に対する作用. 肝切除時に血小板は類洞からDisse腔に移行し、肝細胞との物理的接触が刺激となりHGFやIGF-1などを放出し、Akt、および、ERK1/2を介して肝細胞増殖を促進する。(B) 血小板の肝臓内皮細胞を介した肝細胞に対する作用. 血小板と肝臓内皮細胞との物理的接触が刺激となり、血小板からS1Pが放出され、肝臓内皮細胞のIL-6分泌を促し、STAT3を介して肝細胞増殖を促進する。

4. 線維化した肝臓での血小板による肝再生促進効果

正常肝と比較して、硬変肝では肝再生は障害されており、肝切除後の肝不全のリスクが高いことが知られている¹⁶⁾。そこで、線維化した肝臓でも血小板を増加させることによって肝再生が促進されるかを検討するために、ラットにジメチルニトロソアミン (dimethylnitrosamine : DMN) を投与した肝線維化モデルを作製し¹⁷⁾、70%肝切除後の肝再生を検討した。肝線維化群と比較して、TPOを用いて血小板数を増加させた肝線維化+血小板増加群では、肝切除後の残肝組織の細胞分裂指数、および、PCNA染色比率が有意に増加した(図5A, B)¹⁸⁾。これらの結果から、血小板は線維化した肝臓においても肝再生促進効果を有することが明らかとなった。

5. 肝硬変患者に対する血小板増加療法の効果

以上に述べてきたように、我々はこれまでの研究で正常な肝臓はもちろんのこと、線維化した肝臓でも血小板が肝再生促進効果を有すること、および、そのメカニズムについて明らかにしてきた。現在、肝硬変に対する根治的治療は肝移植以外にはない¹⁹⁾。しかし、肝移植にはドナー不足、手術合併症、拒絶反応などの様々な問題があり²⁰⁻²³⁾、それに代わる肝再生療法の確立が求められている。そこで、血小板増加療法がヒトにおいても肝機能を改善するか

検討するために、肝硬変患者に濃厚血小板を輸血する探索的臨床試験を施行した。対象は成人のChild-Pugh分類A、もしくはBの肝硬変患者で、血小板数が5~10万/ μ lの症例とした。プロトコルの概略は図6Aに示す。週1回10単位の血小板輸血を計12回施行し、肝機能の評価、有害事象の有無を観察した。血小板輸血不応で2症例、搔痒で1症例、輸血終了後の追加治療で1症例、計4症例は解析から除外したものの、臨床治験を最後まで完遂できた6症例を解析すると、肝合成能の指標である血清アルブミン値は、輸血前と比較すると輸血後1, 3ヵ月でそれぞれ有意な改善を認めた(図6B)。また、血清コリンエステラーゼ値は、輸血後1週間、3ヵ月でそれぞれ有意な改善を認めた(図6C)。血小板輸血は肝硬変患者の肝機能を改善させ、血小板増加療法が肝硬変に対する新たな治療戦略となり得ることが示唆された。

6. おわりに

血小板が持つ肝再生促進効果について基礎から臨床試験に至るまで概説した。本稿では紹介できなかったが、血小板には肝再生促進効果だけではなく、肝線維化抑制効果^{18, 24)}や急性肝炎軽減効果²⁵⁾があることを我々は報告してきており、血小板は様々な肝疾患の治療に応用できる可能性を秘めている。今回の臨床試験で用いた血小板製剤は高価で慢性的な不足状態であるため、現在筑波大学では血小

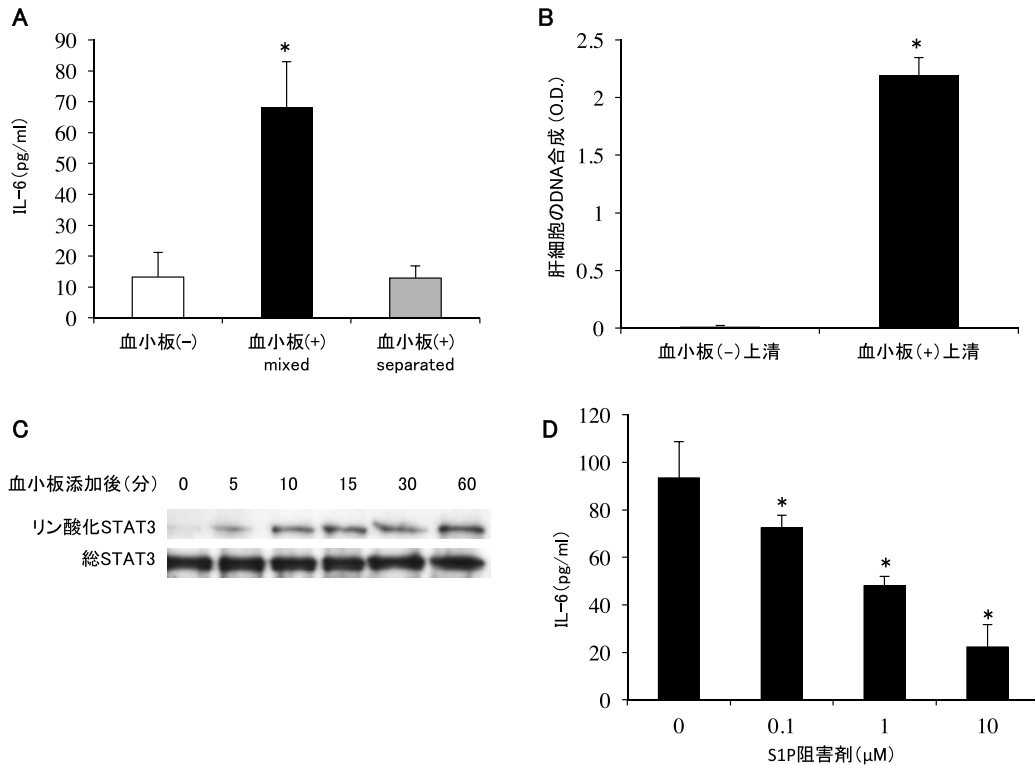


図4 血小板による肝類洞内皮細胞を介した肝細胞増殖効果

(A) 血小板を添加しなかった TMNK-1 [血小板 (-)] と比較して、血小板を添加した TMNK-1 [血小板 (+) mixed] では IL-6 の分泌が有意に上昇したが、透過性膜を用いて血小板と TMNK-1 が接触しない実験系 [血小板 (+) separated] では IL-6 の分泌は上昇しなかった。* $p < 0.05$ vs 血小板 (-)。 (B) TMNK-1 に血小板を添加せずに培養した上清 [血小板 (-) 上清] を肝細胞に加えても、肝細胞の DNA 合成の促進は認められなかったが、TMNK-1 に血小板を添加して培養した上清 [血小板 (+) 上清] を肝細胞に加えると、肝細胞の DNA 合成は有意に上昇した。* $p < 0.05$ vs 血小板 (-) 上清。 (C) TMNK-1 に血小板を添加して培養した上清を肝細胞に添加すると、肝細胞で STAT3 が活性化した。 (D) S1P 阻害剤を添加しなかった TMNK-1 と比較すると、S1P 阻害剤を添加した TMNK-1 では血小板による IL-6 分泌促進効果が有意に抑制された。* $p < 0.05$ vs S1P 0 μM 。(文献 12 より引用、一部改変)

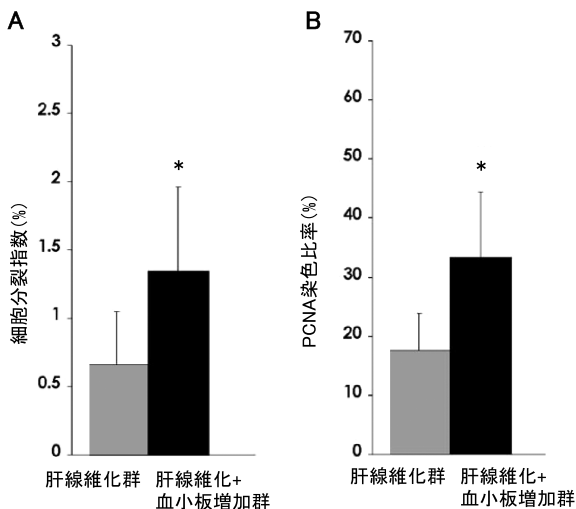


図5 線維化した肝臓での血小板による肝再生促進効果
肝線維化群と比較して、肝線維化+血小板増加群では、肝切除後の残肝組織での細胞分裂指数 (A)、PCNA 染色比率 (B) が有意に増加した。* $p < 0.05$ vs 肝線維化群。(文献 18 より引用、一部改変)

板輸血に頼らない脾臓摘出や TPO 製剤投与による臨床応用を検討している。今後、血小板の持つ肝疾患制御メカニズムがさらに解明され、劇症肝炎・術後肝不全・肝硬変などの難治性肝疾患に対する血小板を用いた治療法が早期に確立されることが期待される。

文 献

- 1) Clavien, P.A. (2008) *Swiss Med. Wkly.*, 138, 361-370.
- 2) Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., & Nurden, A.T. (2004) *Thromb. Haemost.*, 91, 4-15.
- 3) Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., & Clavien, P.A. (2006) *Science*, 312, 104-107.
- 4) Higgings, G.M. & Anderson, R.M. (1931) *Arch. Pathol.*, 12, 186-202.
- 5) Murata, S., Ohkohchi, N., Matsuo, R., Ikeda, O., Myronovych, A., & Hoshi, R. (2007) *World J. Surg.*, 31, 808-816.
- 6) Myronovych, A., Murata, S., Chiba, M., Matsuo, R., Ikeda, O.,

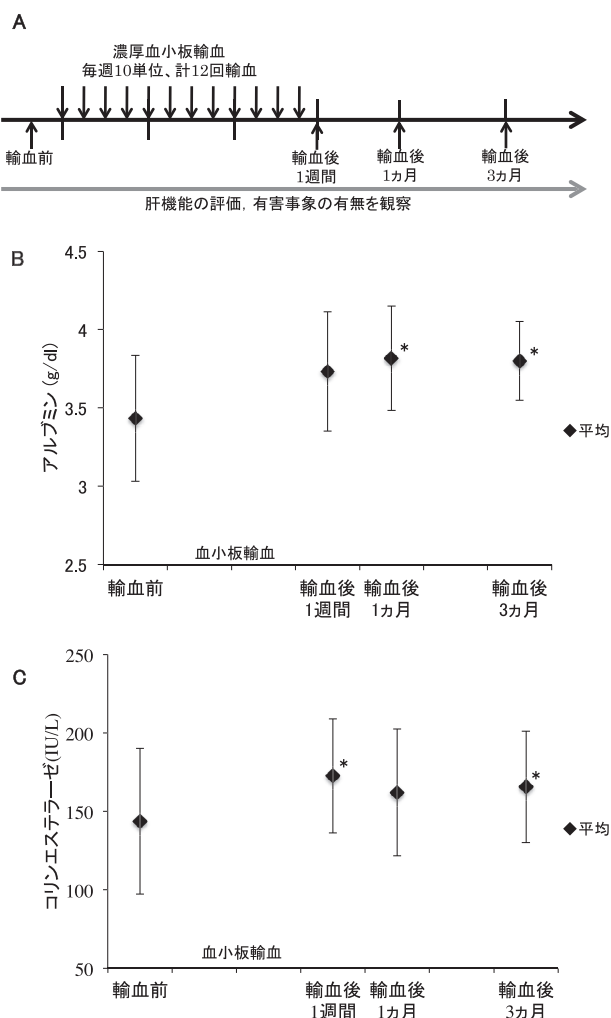


図6 肝硬変患者に対する血小板増加療法の効果

(A) プロトコルの概略. 週1回10単位の血小板輸血を計12回施行し, 肝機能の評価, 有害事象の有無を観察した. (B) 血清アルブミン値は, 輸血前と比較すると輸血後1, 3ヵ月で有意に改善した. * $p < 0.05$ vs 輸血前. (C) 血清コリンエステラーゼ値は, 輸血前と比較すると輸血後1週間, 3ヵ月で有意に改善した. * $p < 0.05$ vs 輸血前.

- Watanabe, M., Hisakura, K., Nakano, Y., Kohno, K., Kawasaki, T., Hashimoto, I., Shibasaki, Y., Yasue, H., & Ohkohchi, N. (2008) *J. Hepatol.*, 49, 363–372.
- 7) Endo, Y. & Nakamura, M. (1992) *Br. J. Pharmacol.*, 105, 613–619.
- 8) Endo, Y. & Nakamura, M. (1993) *Gen. Pharmacol.*, 24, 1039–1053.
- 9) Nakamura, M., Shibasaki, M., Nitta, Y., & Endo, Y. (1998) *J. Hepatol.*, 28, 991–999.
- 10) Matsuo, R., Ohkohchi, N., Murata, S., Ikeda, O., Nakano, Y., Watanabe, M., Hisakura, K., Myronovych, A., Kubota, T., Narimatsu, H., & Ozaki, M. (2008) *J. Surg. Res.*, 145, 279–286.
- 11) Ping, C., Xiaoling, D., Jin, Z., Jiahong, D., Jiming, D., & Lin, Z. (2006) *Arch. Med. Res.*, 37, 576–583.
- 12) 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. (2010) *J. Hepatol.*, 53, 648–654.
- 13) Yatomi, Y., Ohmori, T., Rile, G., Kazama, F., Okamoto, H., Sano, T., Satoh, K., Kume, S., Tigyi, G., Igarashi, Y., & Ozaki, Y. (2000) *Blood*, 96, 3431–3438.
- 14) Oz-Arslan, D., Ruscher, W., Myrtek, D., Ziemer, M., Jin, Y., Damaj, B.B., Sorichter, S., Idzko, M., Norgauer, J., & Maghazachi, A.A. (2006) *J. Leukoc. Biol.*, 80, 287–297.
- 15) Sindram, D., Porte, R.J., Hoffman, M.R., Bentley, R.C., & Clavien, P.A. (2001) *FASEB J.*, 15, 1230–1232.
- 16) Nagasue, N., Yukaya, H., Ogawa, Y., Kohno, H., & Nakamura, T. (1987) *Ann. Surg.*, 206, 30–39.
- 17) Jezequel, A.M., Mancini, R., Rinaldesi, M.L., Macarri, G., Venturini, C., & Orlandi, F. (1987) *J. Hepatol.*, 5, 174–181.
- 18) Murata, S., Hashimoto, I., Nakano, Y., Myronovych, A., Watanabe, M., & Ohkohchi, N. (2008) *Ann. Surg.*, 248, 821–828.
- 19) Merion, R.M., Schaubel, D.E., Dykstra, D.M., Freeman, R.B., Port, F.K., & Wolfe, R.A. (2005) *Am. J. Transplant.*, 5, 307–313.
- 20) Neuberger, J. & James, O. (1999) *Lancet*, 354, 1636–1639.
- 21) Taylor, M.C., Greig, P.D., Detsky, A.S., McLeod, R.S., Abdoh, A., & Krahn, M.D. (2002) *Can. J. Surg.*, 45, 425–434.
- 22) Mueller, A.R., Platz, K.P., & Kremer, B. (2004) *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 18, 881–900.
- 23) Porrett, P.M., Hsu, J., & Shaked, A. (2009) *Liver Transpl.*, 15, S12–18.
- 24) Watanabe, M., Murata, S., Hashimoto, I., Nakano, Y., Ikeda, O., Aoyagi, Y., Matsuo, R., Fukunaga, K., Yasue, H., & Ohkohchi, N. (2009) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 24, 78–89.
- 25) Hisakura, K., Murata, S., Takahashi, K., Matsuo, R., Pak, S., Ikeda, N., Kawasaki, T., Kohno, K., Myronovych, A., Nakano, Y., Ikeda, O., Watanabe, M., & Ohkohchi, N. (2011) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 26, 348–355.