

令和元年6月4日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19572

研究課題名(和文)血小板の新たな機能：新規血小板活性化受容体CLEC-2による肺胞形成機構の解明

研究課題名(英文) Platelets have an essential role in lung development via CLEC-2/podoplanin signaling

研究代表者

築地 長治 (TSUKIJI, Nagaharu)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：20710362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血小板活性化受容体のCLEC-2を欠損すると出生直後に呼吸不全で死亡するという現象から、血小板そして血小板CLEC-2が肺発生に必須であること、さらに血小板から放出されるTGF- $\beta$ が重要であることを発見した。CLEC-2のリガンドpodoplaninについては胎仔肺に複数あるpodoplanin発現細胞のうちリンパ管内皮のpodoplaninが重要であることを明らかにした。本研究により血小板が肺発生に必須であるという全く新しい臓器形成メカニズムを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題において、血小板CLEC-2とリンパ管内皮Pdpnの相互作用が肺発生に必須であること、さらにその相互作用による血小板活性化とそれに伴って放出されるTGF- $\beta$ が重要であることが明らかとなった。これまで、臓器発生はその臓器内の組織間相互作用や隣接する組織からの影響により進むと考えられてきた。本課題により示された、全身を流れる血球(血小板)が特定の臓器(肺)の発生に必須であるという事実は、これまでの臓器発生の考え方に新たなコンセプトを提示したと考えている。このような新しい生命現象の発見は、新たな研究領域の創生や疾患の治療戦略の開発につながる可能性があり、学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：CLEC-2 deficiency in mice causes neonatal death by lung developmental abnormality and respiratory failure. These phenotypes were also seen in platelet-depleted fetuses and platelet-specific CLEC-2 deleted fetuses. We found that TGF- $\beta$  in platelets and podoplanin (a CLEC-2 ligand) on lymphatic endothelial cells was important for CLEC-2-dependent lung development. These results suggest that interaction between platelet CLEC-2 and lymphatic endothelial cell podoplanin activates platelets and TGF- $\beta$  released from activated platelets contributes normal lung development.

研究分野：血液学(血栓止血)、発生生物学

キーワード：血小板 肺発生 CLEC-2 podoplanin TGF-

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

以前我々は血小板活性化受容体 CLEC-2 とそのリガンド podoplanin を同定した。近年血栓止血以外の血小板機能が注目されており、CLEC-2 が注目を浴びている。CLEC-2 発現後 CLEC-2 欠損マウスが我々を含め複数のグループで作られたが、CLEC-2 欠損マウスは出生直後に死亡することが分かった。我々は CLEC-2 欠損胎仔及び血小板特異的 CLEC-2 欠損胎仔の肺発生に注目して解析を進めたところ、後期肺発生の肺胞形成に異常を認め、血小板 CLEC-2 が肺発生に必須であることが判明した。特に肺胞間質の myofibroblast がほぼ欠損することが判明した。しかしながら血小板 CLEC-2 がどのように肺発生に関与するかは不明であった。

### 2. 研究の目的

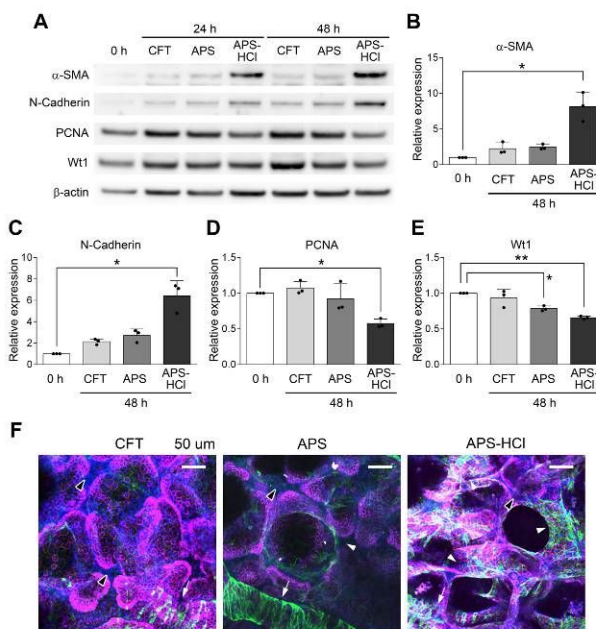
本研究では、まず血小板 CLEC-2 による肺胞形成機構を解明する。具体的には、肺胞 myofibroblast への分化における血小板の役割を解明し、血小板 CLEC-2 と作用する podoplanin 発現細胞を同定する。次に CLEC-2 欠損胎仔の肺発生異常のレスキュー実験を行い、胎児・新生児医療及び再生医療等、臨床応用に寄与する研究基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

血小板が myofibroblast 分化を促進する機序として血小板顆粒内容に注目した。強制的に活性化させた血小板から放出された顆粒内容を myofibroblast 前駆細胞である肺中皮細胞の培養細胞 (in vitro) や摘出した肺葉 (ex vivo) に添加して myofibroblast 分化が促進されるか検証し、促進因子の同定を試みた。さらに同定した因子について in vivo で肺発生への関与を調査した。次にマウス胎仔肺における podoplanin 発現細胞は肺胞上皮、肺中皮、リンパ管内皮であったため、その3種の組織特異的な podoplanin 欠損マウスを作製して表現型を解析することで肺発生に必要な podoplanin 発現細胞の同定を試みた。最後に CLEC-2 欠損マウスの肺発生異常 (myofibroblast 分化異常) を胎仔胸腔への血小板、血小板顆粒内容、同定した顆粒内因子の投与によりレスキューできるか検討した。

### 4. 研究成果

血小板顆粒内容 (APS: activated platelet supernatant) を肺中皮培養細胞に添加したところ、myofibroblast マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin や N-cadherin の発現が増強すると共に中皮マーカーである Wilm's tumor 1 (Wt1) の発現が低下した。肺葉への添加でも myofibroblast の分化が促進された。TGF- $\beta$  が中皮を myofibroblast に分化させるという報告があり、血小板顆粒内容には多量の TGF- $\beta$  が含まれている。しかしながら血小板顆粒内 TGF- $\beta$  は不活性なラテント型である。酸処理により強制的に活性化させることが可能であるため、酸性処理した顆粒内容 (APS-HCl) で培養したところ培養細胞、肺葉共に未処理の顆粒内容よりも非常に強い myofibroblast 分化促進効果が認められた。in vivo でも TGF- $\beta$  中和抗体により肺発生異常が誘発されたことから血小板 CLEC-2 を介した血小板活性化により放出された TGF- $\beta$  の重要性が示唆された。



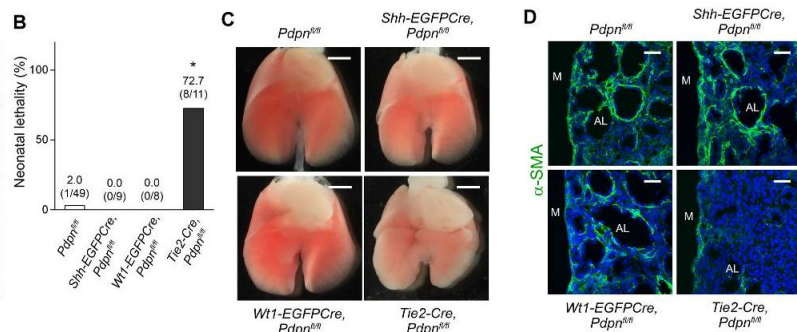
Tsukiji et al., Blood 2018 より抜粋

A-E: 肺中皮培養細胞に対する APS 及び APS-HCl の myofibroblast 分化促進効果 CFT はコントロール

F: 肺葉培養に対する APS 及び APS-HCl の myofibroblast 分化促進効果

肺胞上皮、肺中皮、リンパ管内皮特異的な podoplanin (Pdpn) 欠損マウスとして *Shh-Cre, Pdpn<sup>fl/fl</sup>*

マウス、*Wt1-Cre, Pdpn<sup>fl/fl</sup>* マウス、*Tie2-Cre, Pdpn<sup>fl/fl</sup>* マウスを作製した。出生後の死亡率や肺発生異常を解析したところ、リンパ管内皮特異的 podoplanin 欠損マウスのみが CLEC-2 欠損と酷似した表現型を示し、他の 2 種は全く正常であった。以上よりリンパ管内皮 podoplanin が肺発生に必須であり、血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮 podoplanin の相互作用が肺発生に関与していることが示唆された。



Tsukiji et al., Blood 2018 より抜粋

B:組織特異的 podoplanin 欠損マウスの出生当日の死亡率

C:組織特異的 podoplanin 欠損マウスの肺葉

D: 組織特異的 podoplanin 欠損マウスの myofibroblast ( $\alpha$ -SMA) の分布

レスキュー実験は肺発生異常が認められる胎生 17.5 日の 2 日前の 15.5 日の CLEC-2 欠損胎仔胸腔に子宮外からガラスキャピラリを刺入し、野生型血小板や血小板顆粒内容、TGF- $\beta$  を投与し、呼吸機能が回復するか調査した。しかし、出生前に子宮内で死亡してしまう個体が多く、解析することができなかった。胎仔がかなり成長しているため胸腔までキャピラリを刺入する際に貫く組織が厚く、ガラスキャピラリの直径を太くせざるをえなかったため胚への損傷が大きかったのではないかと推測した。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. [Tsukiji N](#), Inoue O, Morimoto M, Tatsumi N, Nagatomo H, Ueta K, Shirai T, Sasaki T, Otake S, Tamura S, Tachibana T, Okabe M, Hirashima M, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction. *Blood*. 132(11):1167-79, 2018. DOI: 10.1182/blood-2017-12-823369. 査読有
2. [Tsukiji N](#), Osada M, Sasaki T, Shirai T, Satoh K, Inoue O, Umetani N, Mochizuki C, Saito T, Kojima S, Shinmori H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. Cobalt-hematoporphyrin inhibits CLEC-2-podoplanin interaction, tumor metastasis, and arterial/venous thrombosis in mice. Cobalt-hematoporphyrin inhibits CLEC-2-podoplanin interaction, tumor metastasis, and arterial/venous thrombosis in mice. *Blood Advances*. 2:2214-25, 2018. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018016261. 査読有
3. Suzuki-Inoue K, [Tsukiji N](#), Shirai T, Osada M, Inoue O, Ozaki Y. Platelet CLEC-2: Roles Beyond Hemostasis. *Semin Thromb Hemost*. 44(2): 126-34, 2018. DOI: 10.1055/s-0037-1604090. 査読有
4. Sasaki T, Shirai T, [Tsukiji N](#), Otake S, Tamura S, Ichikawa J, Osada M, Satoh K, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. Functional characterization of recombinant snake venom rhodocytin: rhodocytin mutant blocks CLEC-2/podoplanin-dependent platelet aggregation and lung metastasis. *J Thromb Haemost*. 16(5):960-72, 2018. DOI: 10.1111/jth.13987. 査読有
5. Kono, H, Fujii, H, Suzuki-Inoue, K, Inoue, O, Furuya, S, Hirayama, K, Akazawa, Y, Nakata, Y, Sun, C, [Tsukiji, N](#), Shirai, T, Ozaki, Y. The platelet-activating receptor C-type lectin receptor-2 plays an essential role in liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Thromb Haemost*. 15(5): 998-1008, 2017. DOI: 10.1111/jth.13672. 査読有
6. Shirai T, Inoue O, Tamura S, [Tsukiji N](#), Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. CLEC-2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost*. 15(3): 513-25, 2017. DOI: 10.1111/jth.13604. 査読有

7. 築地長治, 井上克枝. 血小板による器官形成・再生メカニズム - CLEC-2/Podoplanin 研究が明らかにした新たな血小板機能 - 日本血栓止血学会誌. 28(5):589-96, 2017. DOI :10.2491/jjsth.28.589. 査読無
8. 築地長治, 井上克枝. あらたな血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓止血における多彩な役割 医学のあゆみ. 257(7):748-52, 2016. 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 築地長治, 井上修, 森本充, 辰巳徳史, 長友啓明, 植田康司, 白井俊光, 佐々木知幸, 大竹志門, 田村彰吾, 立花利公, 岡部正隆, 平島正則, 尾崎由基男, 井上克枝. Platelets as a novel key player in organogenesis: Clec-2/podoplanin interaction regulates fetal lung development . 第 40 回日本血栓止血学会, 2018 年 6 月 28-30 日 (札幌市), 招待講演
2. 築地長治, 井上修, 森本充, 辰巳徳史, 長友啓明, 植田康司, 白井俊光, 佐々木知幸, 大竹志門, 田村彰吾, 立花利公, 岡部正隆, 平島正則, 尾崎由基男, 井上克枝. リンパ管内皮 podoplanin と血小板 Clec-2 の相互作用が関与する肺発生機構 . 第 42 回日本リンパ学会, 2018 年 6 月 22-23 日 (弘前市)
3. Tsukiji N, Inoue O, Shirai T, Tamura S, Otake S, Sasaki T, Satoh K, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K . Platelet activation by CLEC-2-Podoplanin interaction is essential for lung development . 第 25 回国際血栓止血学会, 2017 年 7 月 8-13 日 (ドイツ, ベルリン)
4. 築地長治, 井上修, 辰巳徳史, 岡部正隆, 森本充, 植田康司, 平島正則, 佐々木知幸, 白井俊光, 田村彰吾, 大竹志門, 佐藤金夫, 尾崎由基男, 井上克枝. 血小板による CLEC-2-Podoplanin シグナルを介した新たな肺胞形成メカニズム . 第 39 回日本血栓止血学会, 2017 年 6 月 8-10 日 (名古屋市)
5. 築地長治, 井上修, 田村彰吾, 白井俊光, 佐々木知幸, 佐藤金夫, 井上克枝, 尾崎由基男. 血小板 CLEC-2 は肺中皮細胞分化を介して呼吸機能獲得に寄与する . 第 38 回日本血栓止血学会学術集会, 2016 年 6 月 16-18 日 (奈良市)
6. Tsukiji N, Inoue O, Tatsumi N, Morimoto M, Tamura S, Shirai T, Sasaki T, Sato K, Okabe M, Ozaki Y and Suzuki-Inoue K. Clec-2 on platelets is essential for alveogenesis and respiratory function by regulating differentiation of lung mesothelial cells. JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology Hosted by JSDB, 2016 年 6 月 2 日 (東京)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：井上 克枝

ローマ字氏名：SUZUKI-INOUE Katsue

研究協力者氏名：尾崎 由基男

ローマ字氏名：OZAKI Yukio

研究協力者氏名：森本 充

ローマ字氏名：MORIMOTO Mitsuru

研究協力者氏名：佐々木 知幸

ローマ字氏名：SASAKI Tomoyuki

研究協力者氏名：白井 俊光

ローマ字氏名：SHIRAI Toshiaki

研究協力者氏名：福田 初菜

ローマ字氏名：FUKUDA Uina

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。