

令和 3 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：2018～2020

課題番号：18K06912

研究課題名(和文) 血小板CLEC-2を介した動脈硬化進展の機序を解明する

研究課題名(英文) Mechanism of atherosclerosis progression by platelet CLEC-2

研究代表者

井上 修 (INOUE, Osamu)

山梨大学・大学院総合研究部・特任教授

研究者番号：00432154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血小板は動脈硬化の進行にも関与する。頸動脈プラーク内に集積したマクロファージには、血小板活性化受容体CLEC-2のリガンドであるポドプランニン(PDPN)が発現する。高脂肪食で動脈硬化を起こすApoE欠損マウスに抗CLEC-2抗体を投与したところ対照群に比べて有意にプラーク面積が抑制された。また、血小板CLEC-2欠損により動脈硬化層へのマクロファージの浸潤が抑制された。高脂肪食ApoE欠損マウスでは全単核球に占める単球の割合が増加し、単球の20-50%が血小板と結合していた。血小板CLEC-2が単球PDPNと結合し、内皮下への浸潤とマクロファージへの分化を経て動脈硬化を増悪させると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化病変は進行すると脂質に富むプラークとなるが、脆弱なため破綻した場合血栓症を引き起こす。血小板は、プラーク破綻時の血栓形成だけでなく動脈硬化自体の進行にも関与することが知られている。これまでにGPIbに代表されるいくつかの血小板活性化受容体の抗体やノックアウトマウスで動脈硬化進展抑制効果が確認されているが、出血傾向の助長という問題があった。血小板活性化受容体CLEC-2欠損マウスは、病的血栓形成は抑制されるが、出血傾向の有意な増悪は認められない。CLEC-2は、出血傾向のない抗動脈硬化薬剤のターゲット蛋白となりうる。

研究成果の概要(英文)：Platelets play a role in progression of atherosclerosis. Podoplanin, which is a ligand for a platelet activation receptor CLEC-2, is expressed on the surface of macrophages infiltrated into atherosclerotic lesion. CLEC-2 depletion inhibited atherosclerotic lesion and macrophage infiltration into the lesion in ApoE-deficient mice fed with high fat diet. These mice also showed increased percentage of monocytes in mononuclear cells and 20-50% of these monocytes bound to platelets. These findings suggest that platelet CLEC-2 binds to PDPN in monocytes, which facilitates monocyte infiltration into the subendothelial lesion and differentiation into macrophages, thereby atherosclerosis is aggravated.

研究分野：血小板生物学、感染制御学

キーワード：血小板 CLEC-2 podoplanin 動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化病変は進行すると脂質に富むプラークとなるが、脆弱なため破綻した場合血栓症を引き起こす。血小板は、プラーク破綻時の血栓形成だけでなく動脈硬化自体の進行にも関与することが知られている。これまでに GPIb に代表されるいくつかの血小板活性化受容体の抗体やノックアウトに動脈硬化進展抑制効果が確認されているが、出血傾向の助長という問題があった。私たちが同定した血小板活性化受容体 CLEC-2 は、そのノックアウトマウスにおいて、血栓形成は抑制されるものの出血傾向は認められないという大きな利点がある。加えて、ヒトおよびマウスの頸動脈プラーク内に集積したマクロファージには、CLEC-2 のリガンドである Podoplanin や S100A13 が発現しており、プラーク形成に血小板 CLEC-2 が関与している可能性を考えた。高脂肪食によりアテローム性動脈硬化を起こす ApoE 欠損マウスに抗 CLEC-2 抗体を投与したところコントロール抗体投与群に比べて有意にプラーク面積が減少したことから血小板 CLEC-2 の動脈硬化進展への関与が示唆された。

## 2. 研究の目的

抗 CLEC-2 抗体投与 ApoE 欠損マウスでプラーク形成が抑制されたことから、血小板 CLEC-2 が“出血傾向を伴わない動脈硬化抑制”のターゲットになる可能性が示唆された。そこで本研究では、遺伝的血小板 CLEC-2 欠損を導入した ApoE 欠損マウスで動脈硬化進展抑制が認められるかを確認したのち、血小板 CLEC-2 欠損が動脈硬化進展を抑制するメカニズムを、リガンドである Podoplanin との相互作用に特に注目して明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝的 CLEC-2/ApoE 二重欠損マウスにおけるプラーク形成の評価

血小板 CLEC-2 の動脈硬化進展への寄与を調べるために、遺伝的 CLEC-2 欠損を ApoE マウスに導入した。CLEC-2 は血小板が主たる発現細胞だが、好中球などいくつかの白血球には状況によって CLEC-2 が発現する。血小板 CLEC-2 の重要性を明らかにするため全身 CLEC-2 欠損および PF4-Cre による血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスを用いた。しかし全身 CLEC-2 欠損マウスは肺発生異常により出生直後に死亡してしまう。そこで、全身 CLEC-2 欠損マウスおよび血小板特異的 CLEC-2 欠損の胎仔肝臓由来造血幹細胞を放射線照射骨髄破壊 ApoE 欠損マウスに移植し、骨髄のみ CLEC-2 欠損となった骨髄キメラマウスを用いた。全血球 CLEC-2 欠損および血小板特異的 CLEC-2 欠損の骨髄キメラ ApoE 欠損マウスに高脂肪食を与えてプラーク形成を観察し、CLEC-2 野生型骨髄キメラ ApoE 欠損マウスと比較した。

### (2) 血小板 CLEC-2 欠損がプラーク形成を抑制するメカニズムの解明

#### 組織学的検討

(1) で使用したマウスについて大動脈起始部に形成されたプラークの組織標本を作製し、プラークの性状の指標である脂質コアのサイズ、マクロファージの浸潤、被膜厚をオイルレッド-O 染色、CD68 免疫染色、 $\alpha$ -SMA 免疫染色により解析する。さらにプラーク内の微小血管形成や血小板の侵入についてそれぞれ CD31、CD41 の免疫染色により解析する。アテローム性動脈硬化病変に蓄積するマクロファージは CLEC-2 のリガンドである Podoplanin を強く発現している。血小板 CLEC-2 とマクロファージ Podoplanin の相互作用がプラーク形成を促進していると考え、*in vitro* でマクロファージの遊走に血小板が関与するか実験する予定だったが、生体での血小板と単球の相互作用(接着)を示すデータが必要であると考え、*in vivo* での解析を優先した。高脂肪食を与えた ApoE 欠損マウスの頸動脈血管内皮への血小板および白血球(主に単球)の接着をライブイメージングで観察した。さらに血流中の白血球の Podoplanin の発現および血小板との接着についてフローサイトメトリーで解析した。

## 4. 研究成果

CLEC-2 欠損の放射線骨髄キメラ ApoE 欠損マウス(以下キメラマウスと略す)に高脂肪食を与えたところ、血小板 CLEC-2 欠損キメラマウスでは CLEC-2 野生型キメラマウスに比べプラーク面積が有意に減少したのに対し、全血球 CLEC-2 欠損キメラマウスでは有意な減少は認められなかった。以上より血小板 CLEC-2 欠損がプラーク形成抑制に働くことが判明した。さらに全血球 CLEC-2 欠損ではプラーク形成は抑制されなかったことから、他の CLEC-2 発現血球が血小板 CLEC-2 とは逆の影響をもたらす可能性も示唆された。血小板 CLEC-2 欠損キメラマウスについてさらに解析を進めたところ、血小板 CLEC-2 欠損によりマクロファージ(CD68)の浸潤が抑制されていることも見出した(次項図 1)。一方被膜厚( $\alpha$ -SMA)について明らかな違いは認められず、プラーク内微小血管(CD31)やプラーク内侵入血小板(CD41)も認められなかった。以上の結果より、血小板 CLEC-2 がマクロファージの浸潤を促進することでプラーク形成に関与している可能性が示唆された。

次に in vivo での頸動脈内皮への血小板および白血球の接着をライブイメージングで解析することを試みた。本学工学部ものづくり教育実践センターの協力のもと、総頸動脈内を流れる蛍光標識した血小板と白血球が血管内皮に接触する瞬間を観察する血管保定器を作製した。しかしながら、素材や蛍光の透過性、サイズの小さによる保定不良など複数の問題があり、最終的に本実験は断念せざるを得なかった。次に、

血流中の白血球での Podoplanin の発現や血小板/白血球の接着について解析を行った。CLEC-2 野生型 ApoE 欠損マウスの単核球 (単球、Tリンパ球、Bリンパ球) での Podoplanin の発現および血小板の接着をフローサイトメトリーで解析した。高脂肪食により動脈硬化を誘導した ApoE 欠損マウスでは単球の 10-20% に Podoplanin の発現が認められ、20-50% の単球が血小板と接着していた。また、全単核球に占める単球の割合が増加していた。一方 T および B リンパ球では Podoplanin の発現や血小板の接着はほとんど認められなかった。これらの結果から、血小板 CLEC-2 が単球 Podoplanin と結合し、血小板活性化及び血小板/単球接着を誘導して内皮下への浸潤を起し動脈硬化を増悪させるという新たな動脈硬化進展のメカニズムが考えられた。

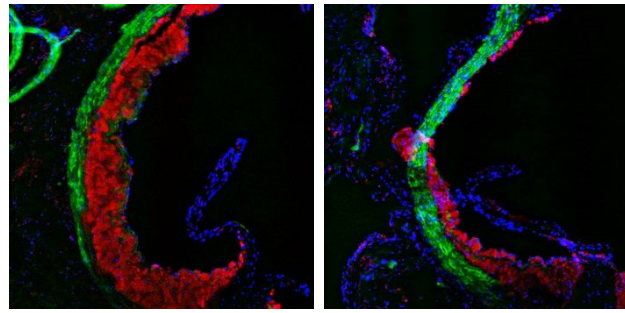


図1：血小板 CLEC-2 欠損によるプラークの減少  
左：CLEC-2 野生型キメラマウス  
右：血小板 CLEC-2 欠損キメラマウス  
大動脈起始部プラークでの CD68 (赤)、 $\alpha$ -SMA (緑) の発現  
青は核 (DAPI)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ichikawa Jiro, Ando Takashi, Kawasaki Tomonori, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Kimura Yujiro, Aoki Kaoru, Hayakawa Keiko, Suzuki Inoue Katsue, Saitoh Masao, Haro Hirota	4. 巻 35
2. 論文標題 Role of Platelet C Type Lectin Like Receptor 2 in Promoting Lung Metastasis in Osteosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1738 ~ 1750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Inoue Katsue, Tsukiji Nagaharu, Otake Shimon	4. 巻 18
2. 論文標題 Crosstalk between hemostasis and lymphangiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 767 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Inoue Katsue, Tsukiji Nagaharu	4. 巻 4
2. 論文標題 Platelet CLEC 2 and lung development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 481 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rth2.12338	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 -
1. 著者名 Tsukiji Nagaharu, Inoue Osamu, Morimoto Mitsuru, Tatsumi Norifumi, Nagatomo Hiroaki, Ueta Koji, Shirai Toshiaki, Sasaki Tomoyuki, Otake Shimon, Tamura Shogo, Tachibana Toshiaki, Okabe Masataka, Hirashima Masanori, Ozaki Yukio, Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 132
2. 論文標題 Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1167 ~ 1179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-12-823369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukiji Nagaharu, Osada Makoto, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Satoh Kaneo, Inoue Osamu, Umetani Norihiko, Mochizuki Chihiro, Saito Tamio, Kojima Soichi, Shinmori Hideyuki, Ozaki Yukio, Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 2
2. 論文標題 Cobalt hematoporphyrin inhibits CLEC-2?podoplanin interaction, tumor metastasis, and arterial/venous thrombosis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2214 ~ 2225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018016261	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 -

1. 著者名 Maruyama Suguru, Kono Hiroshi, Furuya Shinji, Shimizu Hiroki, Saito Ryo, Shoda Katsutoshi, Akaike Hidenori, Hosomura Naohiro, Kawaguchi Yoshihiko, Amemiya Hidetake, Kawaida Hiromichi, Sudo Makoto, Inoue Shingo, Shirai Toshiaki, Suzuki-Inoue Katsue, Ichikawa Daisuke	4. 巻 190
2. 論文標題 Platelet C-Type Lectin-Like Receptor 2 Reduces Cholestatic Liver Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1833 ~ 1842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 134
2. 論文標題 Platelets and cancer-associated thrombosis: focusing on the platelet activation receptor CLEC-2 and podoplanin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1912 ~ 1918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Yuki, Sasaki Tomoyuki, Mochizuki Chihiro, Ishimaru Kayoko, Koizumi Schuichi, Shinmori Hideyuki, Suzuki-Inoue Katsue, Nakao Atsuhito	4. 巻 9
2. 論文標題 Snake venom rhodocytin induces plasma extravasation via toxin-mediated interactions between platelets and mast cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52449-2	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 -

1. 著者名 井上 克枝、築地 長治	4. 巻 60
2. 論文標題 血小板の止血機能を越えた役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1283 ~ 1291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.1283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Osamu, Osada Makoto, Nakamura Junya, Kazama Fuminori, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Sasaki Tomoyuki, Yokomichi Hiroshi, Dohi Tomotaka, Kaneko Makoto, Kurano Makoto, Oosawa Mitsuru, Tamura Shogo, Satoh Kaneo, Takano Katsuhiko, Miyauchi Katsumi, Daida Hiroyuki, Yatomi Yutaka, Ozaki Yukio, Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 110
2. 論文標題 Soluble CLEC-2 is generated independently of ADAM10 and is increased in plasma in acute coronary syndrome: comparison with soluble GPVI	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 285 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02680-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 S. Otake, T. Shirai, N. Tsukiji, T. Sasaki, K. Satoh, S. Tamura, K. Takano, Y. Ozaki, K. Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Platelet C-type Lectin-Like Receptor 2 (CLEC-2) is Required for Optimal Regulation of Erythropoiesis
3. 学会等名 第27回国際血栓止血学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N. Tsukiji, S. Oishi, S. Otake, T. Sasaki, K. Takano, K. Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Heme Induces Platelet Aggregation via Two ITAM Receptors: Implications in Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury
3. 学会等名 第27回国際血栓止血学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築地長治, 大竹志門, 佐々木知幸, 吉河佑莉, 高野勝弘, 井上克枝
2. 発表標題 へム惹起血小板凝集及び横紋筋融解誘導性急性腎障害における血小板CLEC-2の関与
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大竹志門, 白井俊光, 築地長治, 佐々木知幸, 田村彰吾, 尾崎由基男, 井上克枝
2. 発表標題 血小板・巨核球上のC型レクチン様受容体 (CLEC-2) が、赤血球造血に及ぼす役割
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Oishi, N. Tsukiji, S. Otake, N. Oishi, T. Sasaki, T. Shirai, Y. Yoshikawa, K. Takano, T. Kondo, K. Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Heme Activates Platelets and Exacerbates Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury via CLEC-2 and GPVI/FcR
3. 学会等名 ISTH 2020 Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木知幸, 白井俊光, 築地長治, 小山賢介, 田村彰吾, 大竹志門, 長田誠, 佐藤金夫, 波呂浩孝, 尾崎由基男, 井上克枝
2. 発表標題 血小板受容体CLEC-2による関節リウマチの病態形成への関与
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石沙織、築地長治、大竹志門、大石直輝、佐々木知幸、白井俊光、吉河佑莉、高野勝弘、近藤哲夫、井上克枝
2. 発表標題 横紋筋融解症に併発する腎障害における血小板CLEC-2およびGPVIの役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大竹志門、白井俊光、築地長治、佐々木知幸、田村彰吾、高野勝弘、尾崎由基男、井上克枝
2. 発表標題 巨核球・血小板上C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)の赤血球造血における役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 築地長治
2. 発表標題 Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimon Otake, Toshiaki Shirai, Nagaharu Tsukiji, Tomoyuki Sasaki, Kaneo Satoh, Shogo Tamura, Yukio Ozaki, Katsue Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Essential role of platelet-expressed C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) in erythropoiesis
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 佐々木知幸、白井俊光、築地長治、大竹志門、田村彰吾、長田誠、佐藤金夫、尾崎由基男、井上克枝
2. 発表標題 血小板受容体GPVI アゴニスト蛇毒コンバルキシンの遺伝組換体の作製とその機能解析
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagaharu Tsukiji, Osamu Inoue, Mitsuru Morimoto, Norifumi Tatsumi, Hiroaki Nagatomo, Koji Ueta, Toshiaki Shirai, Tomoyuki Sasaki, Shimon Otake, Shogo Tamura, Toshiaki Tachibana, Masataka Okabe, Masanori Hirashima, Yukio Ozaki, Katsue Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Platelets as a novel key player in organogenesis: Clec-2/podoplanin interaction regulates fetal lung development
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 築地長治
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第42回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学大学院医学工学総合研究部臨床検査医学講座 <a href="https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin01ab/">https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin01ab/</a>
---

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
研究分担者	井上 克枝  (SUZUKI-INOUE Katsue)  (10324211)	山梨大学・大学院総合研究部・教授    (13501)	
研究分担者	築地 長治  (TSUKIJI Nagaharu)  (20710362)	山梨大学・大学院総合研究部・講師    (13501)	

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