

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590330

研究課題名(和文) 肺胞上皮細胞の発生、分化における血小板受容体CLEC-2の役割の解明

研究課題名(英文) Platelet activation receptor CLEC-2: The role for lung development.

研究代表者

井上 修 (INOUE, Osamu)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：00432154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CLEC-2欠損マウスは出生直後に死亡するがその原因は不明であった。本研究ではCLEC-2欠損と肺形成の関連に注目して表現型解析を行った。CLEC-2欠損マウスでは肺胞形成に重要なmyofibroblastの分化や分布に異常があること、さらに血小板特異的CLEC-2欠損マウスを用いて、血小板上のCLEC-2が肺胞形成に重要であることを明らかにした。In vitroでは血小板顆粒内容が肺中皮細胞からmyofibroblastへの分化を促進することも見出した。本研究によって、肺胞形成にはCLEC-2を介した血小板活性化が肺胞形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mice deficient in CLEC-2 die just after birth. We found that the newborn mice deficient in CLEC-2 have severe abnormalities in lung structure, and these neonates also have abnormalities in the distribution of myofibroblasts in lung. The conditional knockouts that do not express CLEC-2 on platelets also have these abnormalities in lung, indicating that the CLEC-2 on platelets, but not the CLEC-2 on other hematocytes plays a role in lung development. In vitro study, we confirmed that the granule contents secreted by platelets upon activation facilitate a development of myofibroblasts from lung mesothelial cells. In this study, we clarified the novel mechanism that blood platelets regulate the development of lung through the C-type lectin-like receptor, CLEC-2.

研究分野：血小板生物学

キーワード：CLEC-2 血小板 肺 発生 myofibroblast

1. 研究開始当初の背景

血小板は血栓止血の要であるが、近年この主要な役割に加え、蛋白合成、炎症、免疫、腫瘍の増殖・血行性転移、そして胎児循環に必要な動脈管を出生後に閉鎖する役割など、“beyond clotting”な機能の発見報告が相次いでいる⁽¹⁾。

CLEC-2 発見 我々の研究対象である血小板 C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2)は、2006 年に我々が同定した血小板膜上の活性化受容体である⁽³⁾。当初その生体内リガンドは不明であったが、2007 年にはポドプラニン⁽⁴⁾を同定した。ポドプラニンはある種の腫瘍細胞やリンパ管内皮に発現が認められ、抗ポドプラニン抗体によりポドプラニン-CLEC-2 結合を阻害すると腫瘍の血行性転移が抑制される⁽⁵⁾。

CLEC-2 欠損マウス 我々が 2009 年に作成に成功した CLEC-2 欠損マウスには、コラーゲン上での血栓の不安定化が認められ、CLEC-2 が血栓の安定化に寄与していることが判明した。また胎仔にはリンパ管-血管分離に異常が生じ、胎生致死または出生後直ちに死亡する phenotype を認めた⁽²⁾。この出生直後の死亡原因の一つに、出生後に胎生期から大きく変化する生理機能である外呼吸の異常に伴う呼吸不全が疑われる。

このような、個体発生に関わる“beyond clotting”な役割を血小板 CLEC-2 が担っているという新しい発見は 2010 年 7 月に JBC 誌の Papers of the Week に選ばれるなど注目を集めている⁽²⁾。

ポドプラニン欠損マウスに見られる phenotype 一方で、CLEC-2 の生理的リガンドのポドプラニンは、リンパ管内皮細胞に加え I 型肺胞上皮細胞にも発現が認められる。ポドプラニン欠損マウスは CLEC-2 欠損マウスと同様に血管リンパ管分離異常を来すが、肺には I 型肺胞上皮細胞の分化異常が認められ、胎仔は出生直後に重度の呼吸不全で死亡する⁽⁶⁾。

2. 研究の目的

近年血小板が血栓止血以外にも重要な役割を担っていることが相次いで報告されている⁽¹⁾。我々も胎生期のリンパ管血管分離において、リンパ管内皮細胞膜上のポドプラニンと、その血小板側受容体である C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2)を介した血小板との結合が必要不可欠であることを発見した⁽²⁾。ポドプラニンは肺胞上皮にも発現し、ポドプラニン欠損マウスは出生直後に肺胞上皮の分化異常に伴う呼吸不全で死亡すること、CLEC-2 欠損マウスも出生直後に死亡することから、肺の分化成熟にポドプラニンと CLEC-2 を介した血小板の

活性化が重要な役割を担っている可能性が示唆される。今回の研究では肺の発生における血小板 CLEC-2 の役割解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) CLEC-2 欠損マウスは出生後短時間で呼吸不全により死亡することから、肺の形成及び機能に異常があると考えられた。そこで、発生段階を追って肺全体の形態観察及び組織学的解析を行った。

胎生 14.5 日 (E14.5) から出生当日 (P0) までの野生型及び CLEC-2 欠損マウスの肺を摘出し、実体顕微鏡下で形態を観察した。

E16.5 から P0 までの野生型及び CLEC-2 欠損マウスの肺についてパラフィン切片を作製し、HE 染色で肺内部の形態を観察した。

E17.5、E18.5、P0 の野生型、及び CLEC-2 欠損マウスの肺において、肺胞を形成する細胞のマーカータンパク質の発現や細胞外マトリックスをそれぞれ免疫染色とエラスチカワンギーソン染色を行い観察した。

(2) CLEC-2 欠損マウスは致死的な肺胞形成異常を示すが、血小板特異的 CLEC-2 欠損マウス (Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl}) の肺胞形成異常は非常に軽度もしくは野生型と同様に生存可能な個体が多い。血小板が肺胞形成に重要なかどうかを以下の方法で解析した。

胎生期に肺において CLEC-2 を発現する血小板以外の細胞が存在するか免疫染色で検出する。

Pf4-Cre による血小板特異的 CLEC-2 欠損が完全かどうかフローサイトメトリー及び免疫染色を行い解析した。

前述の解析の結果、Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl} マウスの軽度な表現型の原因は Cre による組換えが不十分だったことが判明した。そこで flox アレルの一方を全身欠損にした Pf4-Cre, CLEC-2^{-/-} が産まれる交配を行いその表現型を解析した。

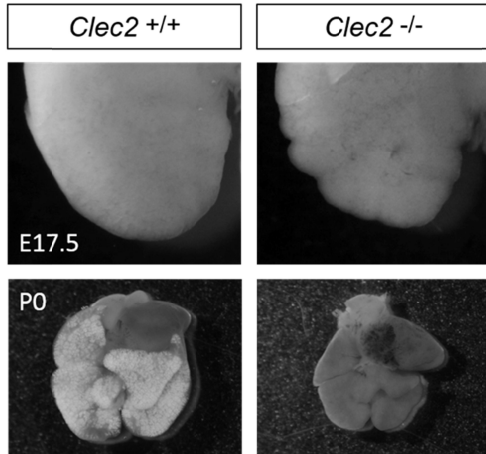
(3) CLEC-2 のリガンド Podoplanin の欠損マウスや、血小板で CLEC-2 の下流で活性化される Syk の欠損マウスは CLEC-2 欠損マウスと同様に出生後致死を示す。これは Podoplanin による CLEC-2 を介した血小板活性化が肺胞形成に関与していることを示唆している。また、CLEC-2 欠損肺で異常が見られた myofibroblast は(研究成果(1)参照)肺中皮に由来する。そこで肺中皮細胞に対する血小板顆粒内容物質の効果を調査した。洗浄血小板を CRP で刺激し血小板を活性化させ、顆粒内容を放出させる。遠心分離によって活性化血小板を沈殿させた後の上清を血小板活性化上清とした。

ラット肺中皮細胞 (CCL-216) に血小板活性化上清を添加し、タンパク質の発現変化をウェスタンブロットで解析した。

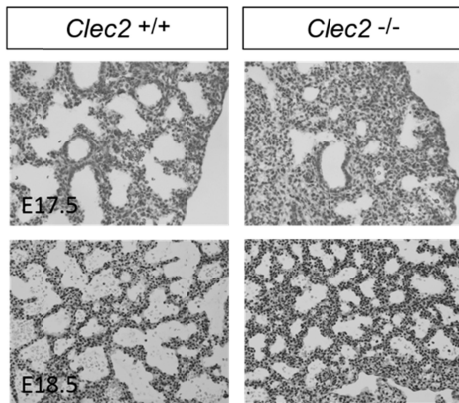
4. 研究成果

(1) CLEC-2 欠損マウスの表現型解析

CLEC-2 欠損マウスの肺で形態異常が見られ始めるのは E17.5 であることが判明した。形態は、野生型は表面が滑らかなのに対し、CLEC-2 欠損ではコブ状の構造体が多数観察された。また、P0 において野生型では空気を取り込み(微細な気泡)が見られるが、CLEC-2 欠損では全く見られなかった。

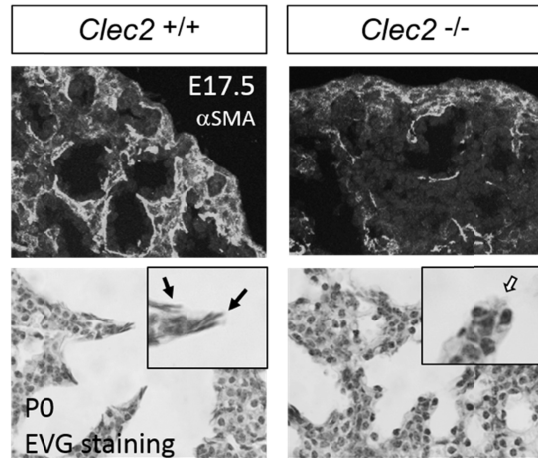


肺全体の形態異常と同様内部構造の異常も E17.5 から認められ始めることがわかった。E17.5 は肺胞が形成され始め、内腔が拡大する時期であり、E18.5 では肺胞の構造が明瞭に見られる。E17.5 の CLEC-2 欠損マウスでは肺胞内腔が非常に狭く、さらに E18.5 では肺胞中隔が野生型に比べて厚くなっていることが判明した。



肺胞を構成する細胞として I 型及び II 型肺胞上皮細胞と筋繊維芽細胞(myofibroblast)に注目し、それぞれ Aquaporin5、Pro-surfactant protein-C、alpha smooth muscle actin(α SMA)の発現を免疫染色で検出した結果、myofibroblast の分布に違いが見られた。野生型では肺胞中隔に myofibroblast が万遍なく存在するのに対し、CLEC-2 欠損では myofibroblast がほとんど存在していないことがわかった。Myofibroblast は肺胞中隔に elastin などの ECM を分泌し、肺胞に機械的強度や柔軟性を与えることが知られている。エラスチカワンギーソン染色(EVG staining)を行ったとこ

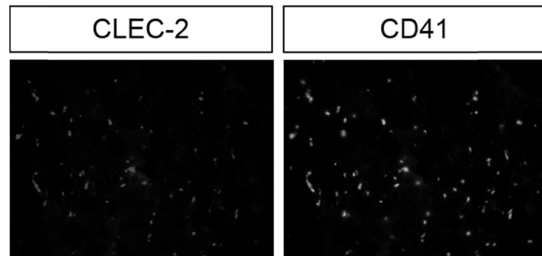
ろ、野生型では elastin 繊維が明瞭に観察されるのに対し(黒矢印) CLEC-2 欠損ではほとんど見られなかった(白矢印)。



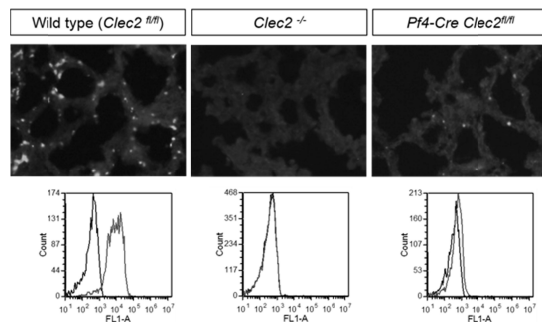
以上より、CLEC-2 欠損は肺胞形成異常を引き起こすが、その原因は myofibroblast の分化あるいは分布の異常による ECM の形成不全であることが示唆された。

(2) 血小板特異的 CLEC-2 の表現型解析

胎生期肺で血小板以外の CLEC-2 発現細胞が無いかが調査した。血小板マーカーとして CD41 と二重染色したところ、CLEC-2 の発現と完全に重なり、肺発生中の CLEC-2 発現細胞は血小板のみであることが示された。

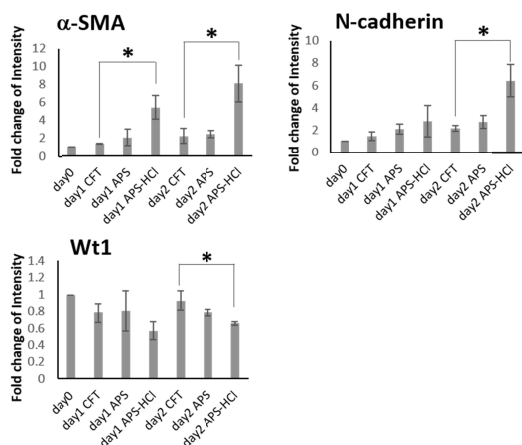


血小板特異的 CLEC-2 欠損マウス(Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl})は CLEC-2 全身欠損(CLEC-2^{-/-})に比べて肺胞形成異常が非常に軽度か全く見られない場合が多く、P0 死亡率は 23%程度である。それに対し、CLEC-2^{-/-}は 100%であり表現型に解離があった。Cre による組換えが完全に起こっているか確認するためにフローサイトメーター及び免疫染色で Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl} の血小板での CLEC-2 の発現を確認した。予想通り Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl} 胎仔では、僅かに CLEC-2 陽性の血小板が存在することが判明した。



の結果を受け、胎仔期の CLEC-2 陽性血小板を Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl} より少なくすることで表現型が重篤化すれば血小板 CLEC-2 が肺胞形成に重要であることが示される。そこで Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl} と CLEC-2^{+/-} を交配し、Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl} 胎仔の P0 死亡率を調査した。前述したように Pf4-Cre, CLEC-2^{fl/fl} の P0 死亡率は 23% に対し、Pf4-Cre, CLEC-2^{+/-} の P0 死亡率は 50% と倍以上に増加した。CLEC-2 のヘテロマウスは全く異常がみられないことから、P0 死亡率の上昇は CLEC-2 陽性血小板がさらに減少したためであり、肺胞形成には血小板が関与していることを強く示唆している。

(3) 肺中皮培養細胞 CCL-216 に対し、血小板活性化上清(Activated Platelet Supernatant: APS)を添加して myofibroblast への分化が促進されるか調査した。血小板顆粒内には TGF-β が多く含まれていることが知られている。TGF-β は様々な細胞種に対し、遊走能を上昇させ αSMA の発現を上昇させることが知られている。TGF-β は通常ラセント型という不活性化状態で存在するが、ある種のプロテアーゼや酸性条件で活性化する。そこで、APS を酸性処理した APS-HCl についても同様の検討を行った。



CFT(control)、APS 及び APS-HCl 添加培養液で 2 日間培養し、αSMA、N-cadherin (間充織マーカー)、Wt1 (中皮マーカー) についてウェスタンブロットを行ったところ、αSMA、N-cadherin の発現上昇と Wt1 の発現低下が認められた。この発現変化はまさに肺発生において中皮細胞が myofibroblast に分化する際に起こっている現象であり、この結果は、肺発生中の myofibroblast の分化や遊走に血小板活性化が関与している可能性を示している。

<引用文献>

Leslie et al., Science 2010; 328: 562-4

Suzuki-Inoue et al., Journal of Biological Chemistry 2010; 285: 24494-507

Suzuki-Inoue et al., Blood 2006; 107: 542-9

Suzuki-Inoue et al., Journal of Biological Chemistry 2007; 282: 25993-6001

Kato et al., Cancer Science 2008; 99: 54-61

Ramirez et al., Developmental Biology 2003; 256: 61-72

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 6 件)

築地長治, Unexpected role of blood platelets in lung development depending on a novel platelet activation receptor, CLEC-2. 第25回国際血栓止血学会、2015年6月20日～2015年6月25日、トロント(カナダ)

築地長治, A novel concept for organogenesis: an essential role of platelets in lung development. 第48回日本発生物学会、2015年6月2日～2015年6月5日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

築地長治, Unexpected role of blood platelets in lung development depending on a novel platelet activation receptor, CLEC-2. 第37回日本血栓止血学会、2015年5月21日～2015年5月23日、甲府市市民会館(山梨県・甲府市)

築地長治, Unexpected role of blood platelets in lung development depending on a novel platelet activation receptor, CLEC-2. 第9回 Aso International Meeting. 2015年5月14日～2015年5月16日、ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本県・阿蘇郡)

築地長治、Unexpected role of blood platelets in lung development depending on a novel platelet activation receptor, CLEC-2. TGF- β ファミリーシグナル国際共同研究拠点第4回国際シンポジウム、2015年1月12日～2015年1月13日、つくば国際会議場（茨城県・つくば市）

築地長治、Unexpected role of blood platelets in lung development depending on a novel platelet activation receptor, CLEC-2. 第47回日本発生生物学会、2014年5月27日-2014年5月30日、ウイנק愛知（愛知県・名古屋市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 修 (INOUE, Osamu)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：00432154

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

井上 克枝 (SUZUKI-INOUE, Katsue)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：10324211

築地 長治 (TSUKIJI, Nagaharu)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20710362