

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461399

研究課題名(和文)血小板受容体CLEC-2の関節リウマチにおける役割：抗リウマチ薬標的蛋白の可能性

研究課題名(英文) A role of the platelet activation receptor CLEC-2 in rheumatoid arthritis: a possible target protein for an anti-rheumatic drug

研究代表者

井上 克枝 (SUZUKI-INOUE, Katsue)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10324211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ患者の関節を構築する滑膜に血小板活性化受容体CLEC-2のリガンドである膜蛋白、ポドプランニンが発現すると報告された。

血小板巨核球でのみCLEC-2が欠損する骨髄キメラマウスあるいは野生型骨髄キメラマウスにK/BxNマウスの血清を腹腔内投与して関節炎を惹起したところ、CLEC-2欠損マウスで有意に関節炎の程度が減弱した。リウマチ患者滑膜細胞に組換えCLEC-2を添加したところ、炎症性サイトカインの産生や細胞増殖が促進した。炎症で毛細血管より漏出した血小板上のCLEC-2と滑膜細胞ポドプランニンの結合で生じる滑膜細胞の増殖、炎症性サイトカインの産生により、関節炎が増悪すると考えられた。

研究成果の概要(英文)： It has been reported that podoplanin, a ligand of the platelet activation receptor CLEC-2, is expressed on synovial cells in the joint of patients with rheumatoid arthritis. In the present study, we investigated a role of CLEC-2 in rheumatoid arthritis.

The extent of experimental arthritis is significantly decreased in CLEC-2-deficient bone marrow-chimeric mice. Podoplanin stimulation by recombinant CLEC-2 increased inflammatory cytokines and cell proliferation.

We proposed that platelets are leaked from hyper-permeabilized capillaries during inflammation and that the interaction between platelet CLEC-2 and podoplanin in synovial cells exacerbate arthritis by inflammatory cytokines and cell proliferation.

研究分野：血栓止血学

キーワード：CLEC-2 血小板 関節リウマチ ポドプランニン 滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は血小板活性化受容体 CLEC-2 を同定し (Blood 2006) その生体内リガンドが膜蛋白ポドプラニンであること (JBC 2007) を含め、様々な機能を明らかにした。最近、血小板マイクロパーティクルが関節リウマチ (RA) の増悪因子になるという報告と、RA 患者の滑膜にポドプラニンが発現するという報告がなされた。これより、血小板 CLEC-2 と滑膜のポドプラニンの結合で生じた活性化血小板から生じる何らかの物質が、関節炎を増悪させるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血小板 CLEC-2 と滑膜のポドプラニンの結合で生じた活性化血小板から生じる何らかの物質が、関節炎を増悪させるという仮説を検証し、すでに見出した CLEC-2 結合低分子化合物の抗関節炎効果を検討することである。

3. 研究の方法

リウマチモデルマウスを用いた実験：リウマチモデルマウスを用いた実験：CLEC-2 欠損マウスに KBx/N マウスの血清を投与することで惹起された関節炎の程度を野生型と比較する。具体的には、血小板・巨核球特異的 CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスに KBx/N マウスの血清を day 0, day 2 に腹腔内投与して関節炎を惹起し、day 8 まで継続的に四肢の周径を測定して合計した値を関節炎の程度とした。別の実験では、関節炎を惹起した野生型マウスに、CLEC-2 結合低分子化合物リガンドあるいは DMSO を 1 日おきに腹腔内投与し、同化合物による関節炎抑制効果を検討した。同化合物は、別の実験で、CLEC-2 に結合してポドプラニンの結合を抑制すること、CLEC-2 リガンドである蛇毒、ロドサイチン惹起血小板凝集をほぼ特異的に抑制することが示されている。

培養細胞を用いた In vitro での実験：ヒト RA 滑膜細胞とヒト変形性関節症 (OA) 滑膜細胞のポドプラニンの発現や、血小板やリコンビナント CLEC-2 添加により、滑膜細胞からのサイトカイン産生や遊走、増殖能を、RT-PCR, scratch assay, 細胞数計測により検討した。

臨床検体を用いた検討：RA 患者と OA 患者の滑膜でのポドプラニンの発現やリコンビナント CLEC-2 の結合を検討。RA 患者と OA 患者の血漿や関節液中の soluble CLEC-2 を測定する。

4. 研究成果

リウマチモデルマウスを用いた実験：当初、CLEC-2 欠損マウスに抗コラーゲン抗体カクテルして、関節炎を惹起するモデルについて検討した。CLEC-2 欠損マウスを作製した系統である C57BL/6 マウスに関節炎を惹起する場合、大量の抗体カクテルと共に LPS を投与しなければ関節炎を惹起できなかつ

た。LPS 投与により高度の血小板減少が生じたため、血小板の関節炎に及ぼす影響を検討する系としては不適切であり、別のモデルを検討した。

KRN マウスと NOD マウスを交配した F1 マウスである KBx/N マウスの血清には抗 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 抗体が含

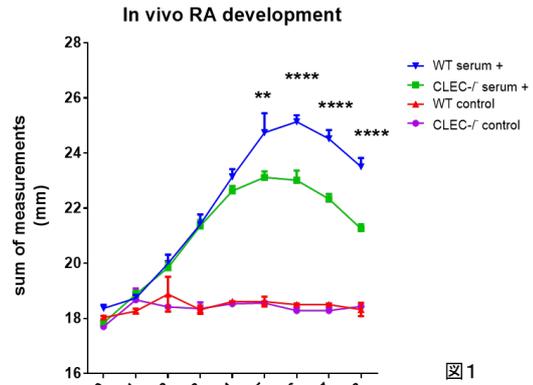


図1

まれ、これが関節の GPI に作用して関節炎を惹起するとされる。K/BxN マウスの血清は、C56BL/6 マウスにも LPS なしで関節炎を惹起できた。

図1に示すように、血小板・巨核球特異的 CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスあるいは野生型キメラマウスに K/BxN マウス血清を投与して関節炎を惹起したところ、CLEC-2 欠損マウスで有意に関節炎の程度が減弱していた。予想通り、野生型マウスの血清を投与された CLEC-2 欠損あるいは野生型骨髄キメラ

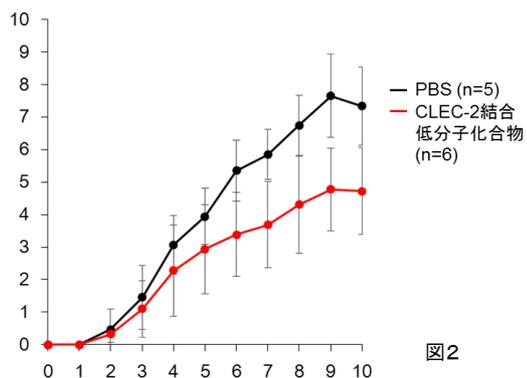


図2

マウスは関節炎が惹起されなかった。

関節炎の程度は、CLEC-2 結合低分子化合物リガンドを投与したマウスで有意に抑制された。

以上より、血小板 CLEC-2 は何らかの細胞に発現するポドプラニンと結合することで、関節炎を促進することが示された。

培養細胞を用いた In vitro での実験：

滑膜細胞に発現するポドプラニンと血小板の CLEC-2 の結合が何らかの要因で炎症を促進する作用を持つのではないかと考え、ヒト滑膜細胞を血小板あるいはリコンビナント CLEC-2 で刺激することで生じる変化を検討した。

まず、ヒト RA 滑膜細胞、ヒト変形性関節

症(OA) 滑膜細胞、ヒト正常繊維芽細胞のポドプラニンの発現をフローサイトメーターで検討したところ、既報と異なり、すべての細胞でポドプラニンの発現が認められ、院生コントロールとして使用できる細胞が得られなかった。

そこで、RA 患者由来滑膜細胞に、リコンビナント CLEC-2 を添加すると、IL-6、IL-8 といった炎症性サイトカインの産生が、コントロール蛋白と比較して有意に増加した(現在再検中)。野生型血小板あるいは CLEC-2 欠損血小板と共存させた場合、IL-6、IL-8 の産生は、野生型血小板で多い傾向が認められた。

滑膜細胞の遊走能の増加は、血小板、リコンビナント蛋白ともに認められなかった。

増殖能はリコンビナント CLEC-2 添加群で多い傾向が認められたが、再検を要する。

臨床検体を用いた検討： RA 患者の血漿 soluble CLEC-2 は有意な増加は認められず、関節液中の soluble CLEC-2 は関節液が粘調であり、測定できなかった。

以上より、血小板 CLEC-2 は滑膜細胞の CLEC-2 と結合して、炎症性サイトカインの産生を促進することで炎症を増悪させると考えられた。

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 13 件)

1) Suzuki-Inoue K. CLEC-2/podoplanin and thromboinflammation. **Blood**. 2017;129:1896-1898. (IF 10.542)

2) 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**. 2017;15:1-11 (IF 5.720)

3) Furuya F, Ishii T, Tamura S, Takahashi K, Kobayashi H, Ichijo M, Takizawa S, Kaneshige M, Suzuki-Inoue K, Kitamura K. The ligand-bound thyroid hormone receptor in macrophages ameliorates kidney injury via inhibition of nuclear factor- κ B activities. **Sci Rep**. 2017;7:43960. (IF 5.578)

4) Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, Suzuki-Inoue K, Kanayama N, Umemura K, Urano T. **Thromb Haemost**. Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerisation. 2017 in press (IF 5.255)

5) 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. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. **J Thromb Haemost**. 2017;15:513-525. (IF 5.720)

6) Suzuki-Inoue K, Osada M, Ozaki Y. Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. **J Thromb Haemost**. 2017;15(2):219-229. (IF 5.720)

7) Ozaki Y, Tamura S, Suzuki-Inoue K. New horizon in platelet function: with special reference to a recently-found molecule, CLEC-2. **Thromb J**. 2016 Oct 4;14(Suppl 1):27. (IF 1.24)

8) Tamura S, Suzuki-Inoue K(corresponding author), Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Ozaki Y. Podoplanin-positive periarteriole stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. **Blood**. 2016;127:1701-10

9) Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Wada M, Nakamura N, Takenaka H, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Katoh N. Platelets regulate the migration of keratinocytes via podoplanin/CLEC-2 signaling during cutaneous wound healing in mice. **Am J Pathol** 2016;186:101-8 (IF 4.591)

10) Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Ando

N, Katoh R, Suzuki-Inoue K, Koyanagi S, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nakao A. Inhibition of IgE-mediated allergic reaction by pharmacologically targeting the circadian clock. **J Allergy Clin Immunol.** 2016;137;1226-35 (IF 11.476)

11) Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. CLEC-2 in Megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. **J Exp Med** 2015;212;2133-46 (IF 12.515)

12) Inoue O, Hokamura K, Shirai T, Osada M, Tsukiji N, Hatakeyama K, Umemura K, Asada Y, Suzuki-Inoue K (corresponding author), Ozaki Y. Vascular Smooth Muscle Cells Stimulate Platelets and Facilitate Thrombus Formation through Platelet CLEC-2: Implications in Atherothrombosis. **PLoS One.** 2015 Sep 29;10(9):e0139357 (IF 3.234)

7) Kazama F, Nakamura J, Osada M, Inoue O, Oosawa M, Tamura S, Tsukiji N, Aida K, Kawaguchi A, Takizawa S, Kaneshige M, Tanaka S, Suzuki-Inoue K, Yukio Ozaki. Measurement of soluble C-type lectin-like receptor 2 in human plasma. **Platelets** 2015;26;711-9 (IF 2.982)

13) Jin JW, Inoue O, Suzuki-Inoue K, Nishikawa G, Kawakami Y, Hisamoto M, Okuda T, Ozaki Y. Grape seed extracts inhibit platelet aggregation by inhibiting protein tyrosine phosphatase. **Clin Appl Thromb Hemost.** 2014; 20: 278-84 (IF 2.392)

〔学会発表〕(計 11 件)

1) 井上克枝 「血栓止血を超えた血小板の役割」

第 34 回 日本臨床化学会甲信越支部総会 招待講演(教育講演) 2016 年 6 月 11 日(土) 石和温泉 ホテル甲斐路

2) 井上克枝 「血小板活性化受容体

CLEC-2 の血栓止血以外の役割」 第 6 回 血栓止血研究会 - Tokyo 招待講演(特別講演) ベルサール飯田橋ファースト 2016 年 7 月 2 日(土)

3) 井上克枝 「へびが教えてくれた血小板の意外な役割」 山梨大学・山梨医科大学同窓会総会 招待講演 2016 年 7 月 9 日(土) 古名屋ホテル

4) 井上克枝 「血小板活性化受容体 CLEC-2 の発見から将来展望まで: 血栓止血を超えた血小板の役割」 第 3 回長崎血液凝固セミナー 招待講演(特別講演) 2016 年 9 月 29 日(木)

長崎大学医学部 良順会館

5) 井上克枝 血栓止血関連検査の基礎と血小板研究の新展開 第 11 回安曇野シンポジウム 2016.10.16 安曇野(特別講演)

6) 井上克枝 血栓形成の基礎中の基礎と血小板研究の新展開 積水メディカル東日本営業所研修会 2016.3.14 TOC 有明イーストタワー (特別講演)

7) Katsue Suzuki-Inoue. Roles of a platelet Clec-2 within and beyond clotting. Proteases in Hemostasis and Vascular Biology, FACEB Science Research Conference (invited speaker) 2015.6.8, Keystone, USA

8) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓止血とそれ以外における役割. 特別講演 (招待講演) 第 35 回大阪血液学セミナー 2015.7.24 大阪 大阪大学

9) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓止血、癌転移、リンパ管新生における役割 第 17 回さくら造血細胞セミナー 特別講演 (招待講演) 15.7.1 東京 日本大学医学部リサーチセンター

10) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 の癌転移、リンパ管新生、血栓止血における役割 第 8 回千葉血管障害の原点を考える会 特別講演 (招待講演)

14.11.12 千葉

11) 井上克枝 血小板とリンパ管発生 日本血液学会学術集会 教育講演 (招待講演) 2014.11.2 大阪
〔図書〕(計4件)

1) Katsue Suzuki-Inoue, C-Type Lectin-Like Receptor 2 (CLEC-2), Editors: Sho Yamasaki, C-Type Lectin Receptors in Immunity 2016 Springer P.83-98 (著書)

2) 井上克枝: 血小板反応とそのシグナル伝達機構. 一瀬白帝、丸山征郎、内山真一郎 編著 新・血栓止血学 血管と血小板 金芳堂, 2015; 153-157

3) 井上克枝: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 受容体と血管統合性維持 高久史麿、小澤敬也、坂田洋一、金倉 譲、小島勢二 編集、Annual Review 2015 血液 中外医学社, 2015; 218-224.

4) 井上克枝: 血小板機能異常症 直江知樹、小澤敬也、中尾眞二 編集 血液疾患最新の治療 2014-2016 南江堂, 2014; 225-229.

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

1) 名称: CLEC-2 拮抗剤、血小板凝集抑制剤、抗血栓薬、及び抗転移薬、並びにボルフィリン骨格を有する化合物、及びその製造方法
発明者: 井上克枝、長田誠、小嶋聡一、齋藤臣雄、佐々木知幸、白井俊光、新森英之、望月ちひろ

権利者: 国立大学法人 山梨大学

種類: 特許

出願番号: PCT/JP2017/000059

出願年月日: 2017年1月4日

国内外の別: 外国

2) 名称: 機能抑制型の遺伝子組換えロドサイチン変異体

発明者: 佐々木知幸、白井俊光、井上克枝

権利者: 国立大学法人 山梨大学

種類: 特許

出願番号: 特願 2016-94203

出願年月日: 2016年5月9日

国内外の別: 国内

3) 名称: CLEC-2 拮抗剤、血小板凝集抑制剤、抗血栓薬、及び抗転移薬、並びにボルフィリ

ン骨格を有する化合物、及びその製造方法
発明者: 井上克枝、長田誠、小嶋聡一、齋藤臣雄、佐々木知幸、白井俊光、新森英之、望月ちひろ

権利者: 国立大学法人 山梨大学

種類: 特許

出願番号: 特願 2016-00267

出願年月日: 2016年1月4日

国内外の別: 国内

4) 名称: 蛇毒ロドサイチンの機能を保持した遺伝子組換え体の作製方法

発明者: 佐々木知幸、井上克枝、尾崎由基男

権利者: 国立大学法人 山梨大学

種類: 特許

出願番号: 特願 2015-053625

出願年月日: 2015年3月17日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 克枝 (SUZUKI-INOUE, Katsue)

山梨大学・総合研究部医学域・教授

研究者番号: 10324211

(2) 研究協力者

佐々木知幸 (SASAKI, Tomoyuki)