

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25460677

研究課題名(和文) 血中 sCLEC-2 測定法の臨床応用と実用化に向けた検討

研究課題名(英文) Examination for clinical applications and practical use of blood sCLEC-2 measurement method.

研究代表者

長田 誠 (Osada, Makoto)

山梨大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：20569628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、sCLEC-2 測定の抗血小板薬のモニター法としての可能性を探るとともに、扁平上皮癌、セミノーマ、脳腫瘍などの転移予測、慢性関節リウマチ患者検体での病因マーカーの可能性を検討した。また、汎用装置に対応するsCLEC-2測定試薬の構築を目指した。sCLEC-2測定法は、生体内の血小板活性の指標となる簡便な検査であり、糖尿病性血管障害や慢性関節リウマチなどで健常者と比べて高値となることから、生体内の血小板活性化マーカーとなり得ることが示唆された。汎用装置に対応する測定試薬を構築できなかったが、新規の臨床検査項目としての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether plasma sCLEC-2 can be used for a drug monitoring of anti-platelet drug and whether it can be used for a predictive factor of distant metastasis in patients with squamous cell carcinoma, seminoma, and brain tumor. In addition, we investigated whether plasma sCLEC-2 is elevated in patients with rheumatoid arthritis. We also aimed to establish a sCLEC-2 measuring method using general-purpose equipment. Measurement of sCLEC-2 is simple compared with the conventional method. Moreover, we found that plasma sCLEC-2 is elevated in patients with rheumatoid arthritis and diabetes mellitus. Therefore, it is suggested that plasma sCLEC-2 can be used for a marker of in vivo platelet activation. Unfortunately, we were not able to establish a sCLEC-2 measuring method using general-purpose equipment. But sCLEC-2 is expected as a novel laboratory test for detecting in vivo platelet activation.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：soluble CLEC-2 ポドプラニン 血小板活性化マーカー 慢性関節リウマチ 抗血小板薬

## 1. 研究開始当初の背景

蛇毒蛋白ロドサイチンはヒト血小板を強く活性化するが、我々はその血小板上受容体が C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) であることを見出した (Blood 2006)。さらに我々は CLEC-2 の生体内リガンドがポドプラニンという膜糖蛋白であることを見出した (JBC 2007)。ポドプラニンはある種の癌細胞やリンパ管内皮に発現しており、CLEC-2 との結合でがんの転移を促進したり、胎生期のリンパ管と血管の分離が促進したりすることを報告した (JBC 2007, 2010)。

我々は、血小板が活性化を受けると CLEC-2 が血小板から遊離するというデータを得ており、洗浄血小板をトロンピンで刺激した活性化血小板上清をウエスタンブロットしたところ、CLEC-2 が認められた。活性化血小板上清を遠心した結果、ペレットと上清に CLEC-2 が認められたことから、soluble CLEC-2 (sCLEC-2) 発生のメカニズムは二通りあり、一つは蛋白そのものがメタロプロテアーゼにより分解されるものと、もう一つは膜の一部が千切れてできるマイクロパーティクル (MP) 上に乗る形で CLEC-2 が遊離する場合の両方が存在することが明らかとなった。これら sCLEC-2 を測定するため、サンドイッチ ELISA を構築した。サンドイッチ ELISA に用いるモノクローナル抗体 (MoAb) の組み合わせを行い、固相側と標識抗体側の MoAb を決定し ELISA 系を作製した。リコンビナント CLEC-2 を抗原とした検量線を作成し、基礎的検討を実施した結果、0.09~10 ng/ml まで直線性を認めた。平均値 $\pm$ 2SD で求めた最小検出感度は、0.05 ng/ml であり、添加回収試験は $\pm$ 20%と良好であった。また、41 例のボランティア血漿の平均値+3SD で求めたカットオフ値は、0.25 ng/ml であった (井上修ら 日本血栓止血学会誌 2012; 23; 171)。急性冠症候群患者の血中 sCLEC-2 を測定したとこ

ろ、健常者に比べ患者検体が有意に高値となった (未発表)。また、in vitro で血小板活性化抑制剤を使用したところ、sCLEC-2 の産生が完全に抑制された。このことから、血中 sCLEC-2 測定は、生体内での血栓止血状態を示すよいマーカーになると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、sCLEC-2 測定が抗血小板薬モニター法として利用できるか否か検討する。また、扁平上皮癌、セミノーマ、脳腫瘍などのある種のガン細胞に発現するポドプラニンは、CLEC-2 と結合して血小板凝集を惹起し、癌の転移を促進する。我々は、マウスの実験的肺転移モデルにおいて抗ポドプラニン抗体がポドプラニン発現細胞の肺転移を強く抑制することを報告した (Cancer Sci 2008)。これより、ポドプラニンを発現した転移性癌細胞が血中内に存在すると血小板が活性化され、血中に sCLEC-2 が遊離することが予想される。本研究では、血中 sCLEC-2 の測定が腫瘍の転移を反映できるか検討する。

血小板は活性化すると 0.1 ミクロン以下の MP を放出する。慢性関節リウマチ (RA) 患者や炎症性関節炎患者の関節液内には MP が存在するが、変形性関節症患者の関節液内には認められず、MP が RA の増悪因子になっているとの報告がある。慢性関節リウマチ患者の血清や関節液などの sCLEC-2 を測定することにより、病態判定や抗血小板剤が治療の一助になるかを検討したい。また、プレート ELISA 法は、手技が煩雑で迅速性に欠けているため、患者への迅速な病態診断測定法となり得ない。外来患者が診察前にデータを参照することが可能となるよう、本研究ではランダム測定可能な汎用機器に用いられる自動測定試薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗血小板薬の効果判定

動脈血栓症予防に抗血小板薬（アスピリン、クロピドグレル）を服用する予定の患者（脳梗塞患者、心筋梗塞患者、糖尿病患者）血漿中 sCLEC-2 を服用前後の2回にわたって測定する。30症例を目標とする。

(2) ポドプラニン発現腫瘍における sCLEC-2 測定の検討：

ポドプラニン発現腫瘍は多いが、比較的患者数が多いと考えられる食道扁平上皮癌と口腔癌に対象を絞り、転移のない症例と転移を有する症例で比較する。各20症例を目標とする。セミノーマ患者、中皮腫患者、脳腫瘍患者など他のポドプラニン発現患者に関しても、数症例ずつでも可能な限り測定する。

(3) 慢性関節リウマチ患者の sCLEC-2 測定の検討：

慢性関節リウマチ患者と変性関節症患者の血漿と関節液の sCLEC-2 を測定し、関節内のマイクロパーティクルの存在と sCLEC-2 の発現を確認する。各20症例を目標にする。関節液については診療上採取する予定のある患者についてのみ行う。

(4) 自動測定装置に対応可能な sCLEC-2 測定試薬の構築：

マイクロプレートでの sCLEC-2 の測定値は、pg/mL から ng/mL の範囲であった。この測定域をカバーすべく全自動測定装置 STACIA 用の sCLEC-2 測定試薬を新規に開発する。具体的にはビーズへの抗体固相、B/F 洗浄回数、アビジン-ビオチン系を用いたアルカリフォスファターゼ増感法を検討する。

(5) 自動測定試薬の基礎検討：

優れた自動測定試薬を構築するため、再現性、希釈直線性、最小検出感度、マイクロプレート ELISA 法との相関、共存物質の影響などを検討する。

#### 4. 研究成果

血小板活性に伴い血中に放出される2種類の sCLEC-2 を測定可能な ELISA 法を用いて検討を行った。抗血小板薬のモニターによる効果判定とポドプラニン発現癌患者の癌転移による sCLEC-2 測定値の検討については、倫理手続きの面から実施が遅れた。抗血小板薬のモニターによる効果判定は、倫理をクリアできた5例について検討することができた。冠動脈疾患発症時に冠動脈血管形成術を実施後、動脈血栓症予防に抗血小板薬（アスピリン、クロピドグレル、ワーファリン）を服用する患者について、冠動脈疾患発症時と冠動脈血管形成術直後、1日後、3日後、7日後の検体を収集し sCLEC-2 の測定を実施した。sCLEC-2 測定値は、各ポイントにて上下動したが一定の傾向を認めなかった。

ポドプラニン発現癌患者転移を認める扁平上皮癌患者の sCLEC-2 測定値の検討については、倫理手続きが遅れたことにより対象となる食道扁平上皮癌、口腔癌の血漿を収集することができなかった。

ヘモグロビンA1c(HbA1c)が10%(NGSP)以上の糖尿病患者15名の血漿を収集し sCLEC-2 測定を実施したところ、有意差は認めなかったが、健常人10名に比べ高値となった（健常人平均 98 pg/mL、糖尿病患者平均 157 pg/mL）。慢性関節リウマチ患者(7名)の血漿検体においても、健常人(8名)より高値であったが有意差を認めなかった（健常人平均 138 pg/mL、慢性関節リウマチ患者平均 198 pg/mL）。また、慢性関節リウマチ患者24名の血漿を単独で測定した sCLEC-2 値の平均は 173 pg/mL となった。慢性関節リウマチ患者の関節液を採取できた患者については、採取時に血液が混入した関節液について遠心を実施したが、関節液の粘性が強いため血液と関節液を分離することができず測定不能であった。また、関節液の粘性が強くと測定することが難しかった。

汎用測定装置による自動化については、臨床上的有用性に関するデータが得られなかつ

たため、pg/mLの範囲を測定可能な汎用装置を用いたsCLEC-2測定試薬の構築ができなかった。このため、自動測定試薬の基礎検討についても実施することができなかった。

当初の目標は達成できなかったが、生体内での血栓止血状態を反映する血漿sCLEC-2が、慢性関節リウマチ患者と糖尿病患者にて上昇することを確認できたため、臨床的有用性が認められる測定法であると考え、倫理手続きの面が解消されたので、今後は改めて当初の目的を研究したい。

## 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 1 件)

F Kazama, M Osada, O Inoue, M Oosawa, S Tamura, N Tsukiji, K Aida, A Kawaguchi, S Takizawa, M Kaneshige, S Tanaka, K Suzuki-Inoue, Y Ozaki. Measurement of soluble C-type lectin-like receptor 2 in human plasma. *Platelets*, 査読有, 26: 2015, 711-719, 10.3109/09537104.

[学会発表](計 5 件)

北川 直也, 血中 Soluble CLEC-2 測定法の基礎的臨床的検討. 第 31 回山梨県医学検査学会. 2016 年 3 月 21 日, 山梨大学(山梨県・中央市).

井上 修, 可溶性 CLEC-2 は血小板活性化に伴って生成される: GPVI との比較検討. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会, 2015 年 5 月 23 日, 甲府市総合市民会館(山梨県・甲府市).

長田 誠, 血中 soluble CLEC-2 測定法の基礎検討. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会. 2014 年 11 月 2 日, 神戸国際会議場(兵庫県・中央区).

長田 誠, 可溶性 CLEC-2 は血小板活性化により生成され, ELISA 法で測定できる. 第 34 回甲信血液血管セミナー. 2014 年 7 月 12 日, 信州大学(長野県・松本市).

風間 文智, 可溶性 CLEC-2(sCLEC-2)測定系の構築とその評価. 第 63 回医学検査学会. 2014 年 5 月 17 日, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 可溶性 CLEC-2 に基づく血小板活性化測定方法.

発明者: 井上克枝, 尾崎由基男, 中村純也, 大澤 満.

権利者: 国立大学法人 山梨大学, 三菱化学メディエンス.

種類: 特許

番号: 2012-215900 号

出願年月日: 2013 年 9 月 28 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 誠 (OSADA Makoto)

山梨大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号: 20569628

### (2) 研究分担者

井上 修 (INOUE Osamu)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 00432154

尾崎由基男 (OZAKI Yukio)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 30134539

### (3) 連携研究者

該当なし