

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16185

研究課題名(和文)血小板受容体CLEC-2の敗血症病態との関連の解明及び新しい治療標的としての応用

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between the platelet receptor CLEC-2 and the pathophysiology of sepsis and its application as a new therapeutic target

研究代表者

佐々木 知幸(SASAKI, Tomoyuki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：40739124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々は敗血症病態における血小板活性化受容体CLEC-2の役割を解明するために、敗血症マウスモデルと好中球のNETs形成モデルを用いた。その結果、敗血症モデルでは、血小板CLEC-2の発現による生存率は、誘導法で異なった。盲腸穿孔による誘導では、CLEC-2欠損により有意に生存を延長したが、LPS投与による誘導では差異は認めなかった。好中球NETs形成においては、LPSと血小板と共培養することでNETs形成が誘導され、さらにCLEC-2ブロッカーによって抑制された。このことから、自然免疫に関与する好中球のNETs形成に血小板CLEC-2が寄与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板CLEC-2の病態生理学的役割は、血小板血栓の形成のみならず、血栓の安定化、癌の転移に寄与することが報告されていたが、敗血症との関連は不明であった。本研究において、血小板CLEC-2が敗血症と好中球のNETs形成に寄与することが示唆された。そのメカニズムなどのさらなる解析を進める必要があるが、血小板CLEC-2が抗血小板効果と抗NETs形成効果の両者によって敗血症性DICへの新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we used a mouse model of sepsis and a model of neutrophil NETs formation to elucidate the role of the platelet-activated receptor CLEC-2 in the pathogenesis of sepsis. As a result, the survival rate due to platelet CLEC-2 expression in the sepsis model differed in the induction method. Induction by appendectomy significantly prolonged survival with CLEC-2 deficiency, but no difference was observed with LPS administration. In neutrophil NETs formation, co-culture with LPS and platelets induced NETs formation and was further inhibited by CLEC-2 blockers. This indicates that platelet CLEC-2 contributes to the formation of neutrophil NETs, which are involved in innate immunity.

研究分野：血栓止血学

キーワード：CLEC-2 血小板 敗血症 好中球 NETs

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当講座は血小板凝集を惹起する蛇毒タンパク質 Rhodocytin の受容体として新規血小板活性化受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)を同定し(文献 1), さらに CLEC-2 の生体内リガンドとして Podoplanin を同定した(文献 2). 血小板 CLEC-2 の生理機能については, 当研究室をはじめとする世界各国の研究グループから 血小板活性化による血栓形成促進と安定化(文献 3, 4), 胎生期の血管・リンパ管分離の促進(文献 3, 5), リンパ節高内皮細静脈の integrity 維持(文献 6), 腫瘍の転移・増殖への関与(文献 7, 8)などが報告されている.

しかしながら, これまでに CLEC-2 と敗血症との関連についての知見は皆無であった. 好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular traps; NETs)は, 2004 年 Science に新たな自然免疫防御機構として報告された(文献 9). NETs とは, 好中球が NETosis と呼ばれる細胞死によって DNA を投げ網のように細胞外へ放出することで, 感染細菌を捉え, 除去する機構である.

予備実験において, 血小板 CLEC-2 による NETs 形成への寄与を検証した. *in vitro* において緑膿菌由来 LPS 刺激によりヒト好中球の NETs 形成が誘導されるが, さらに野生型マウス血小板を添加すると, 血小板非添加群と比較して約 4 倍の NETs を形成した. 一方, 血小板添加による NETs 形成促進効果は, CLEC-2 欠損血小板により野生型血小板の約 70%に減弱することを見出している. さらに, *in vivo* において盲腸穿孔による敗血症マウスモデルを構築し生存解析を行った結果, CLEC-2 欠損マウス(抗 CLEC-2 抗体投与による)は, 野生型マウス(コントロール IgG 投与による)に比して有意にその生存率を改善することを見出している.

2. 研究の目的

本研究の目的は『敗血症病態における CLEC-2 の役割の解明』である. 我々の仮説は「血小板 CLEC-2 が, 好中球の活性化に寄与し, NETs 形成を促進する. NETs はさらに血小板を活性化し新たな血栓の誘発ループが完成し, 敗血症病態を悪化させる」であり, CLEC-2 の抑制が敗血症病態の改善を期待できると考えた.

3. 研究の方法

(1) 敗血症マウスモデルにおける CLEC-2 の役割の解析: CLEC-2 欠損あるいは野生型マウスに大腸菌(0111:B4)由来 LPS 投与(予備検討では盲腸穿孔)により敗血症を誘発させ, 生存率を評価した. 抗マウス CLEC-2 抗体(クローン名: 2A2B10)を腹腔内投与することで, 血小板の CLEC-2 を欠損状態を作製した. 2A2B10 の投与によって CLEC-2 依存性の血小板凝集が起こるため一過性の血小板減少を来すが, 4 日後には 2A2B10 投与前の血小板数に戻ることを確認した. 2A2B10 投与の対照としてラット IgG を腹腔内投与した. タイムスケジュールとしては, 敗血症誘導の 4 日前に 2A2B10 あるいはラット IgG を投与し, LPS 投与後は 10 日間生存の有無を検証した.

(2) 血小板による NETs 形成促進効果における CLEC-2 の役割の解析: 健常者より得られた静脈血(倫理申請承認済)を用いて, ヒト血小板の共存下におけるヒト好中球 NETs 形成を評価した. ヒト好中球の NETs 形成は PMA 刺激で確認した. また, 大腸菌(0111:B4)由来 LPS, 血小板, および CLEC-2 抑制剤 Co-HP(当講座で発見した低分子量化合物で特許出願済および論文文化済)を組み合わせた条件でヒト好中球を 4 時間培養し, SytoxGreen 染色によって NETs 形成を解析した.

4. 研究成果

(1) 敗血症マウスモデル

結果, 有意差は無かったが, 2A2B10 投与群では, 生存率が低かった(図 1). 盲腸穿孔による敗血症モデルでは 2A2B10 投与群では生存が有意に改善されたことと一致しなかった. その理由として, LPS による敗血症が, CLP 法に比して, 急激に起こってしまうことで, CLEC-2 の影響が反映していないことを示唆した. CLP 法では生存曲線において生存率は緩やかに減少であるが, LPS では 2 日ほどで急激に生存率が減少していた. また, 低用量の LPS では全く敗血症を誘導できないことも確認した. つまり, LPS による敗血症の誘導は, あるいは閾値を超えた場合は, 一過性に起こる. しかし, 閾値以下の場合には, まったく敗血症が起こらない. さらに, LPS の感受性は, 飼育環境の影響を受けることも明らかとなり, さらなる検証が必要であった.

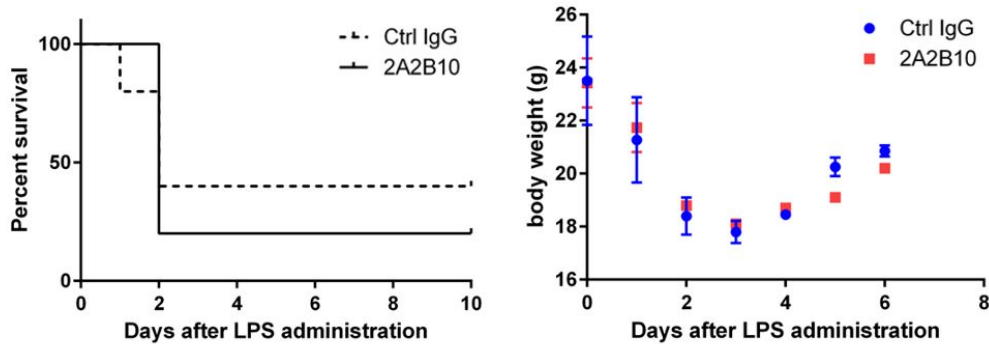


図 1 . 敗血症マウスモデル

(2) ヒト好中球の NETs 形成

単離精製したヒト好中球が NETs 形成を引き起こすことを PMA 刺激によって確認した (図 2). 好中球の単離に際して一般的に行われる赤血球の溶血操作は NETs 形成率を下げる傾向があることが判明した .

LPS あるいは血小板との共培養によっては, NETs 形成はほとんど認めなかったが, LPS と血小板と共に培養すると NETs 形成を認め, さらに CLEC-2 ブロッカーによって抑制されたことから, ヒト好中球の NETs 形成に血小板 CLEC-2 が寄与していることを示唆した (図 3).

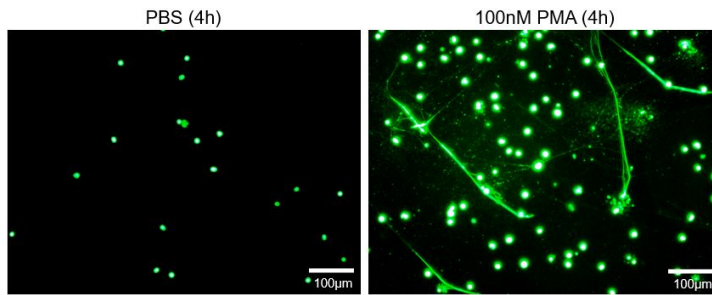


図 2 . PMA による好中球の NETs 形成

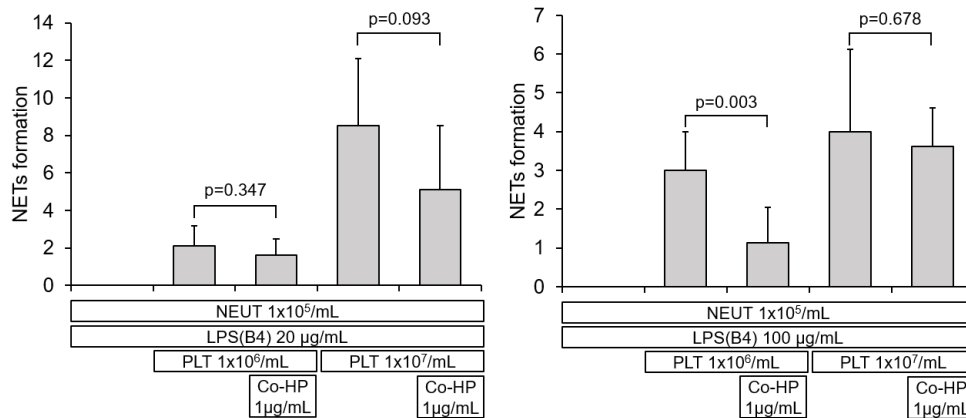


図 3 . LPS および血小板による好中球の NETs 形成

以上より, 敗血症モデルでは, CLEC-2 の発現の有無による死亡率は, 誘導する方法によって異なった. 盲腸穿孔誘導敗血症モデルでは, CLEC-2 の欠損は生存を延長したが, LPS 投与による敗血症モデルでは, 差異は認められなかった. 好中球を用いた検証では, LPS あるいは血小板による好中球の NETs 形成の誘導はほとんど認めなかった. しかし, LPS と血小板と共培養すると NETs 形成を認め, さらに CLEC-2 ブロッカーによって抑制されたことから, 自然免疫に関与する好中球の NETs 形成に血小板 CLEC-2 が寄与していることが明らかとなった. メカニズムに関してはさらなる検証が必要であり, 今後進める予定である.

<引用文献>

- 1) Suzuki-Inoue K et al., Blood. 2006;107(2):542-549.
- 2) Suzuki-Inoue K et al., J Biol Chem. 2007;282(36):25993-26001.
- 3) Suzuki-Inoue K et al., J Biol Chem. 2010;285(32):24494-24507.
- 4) Bender M et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 May;33(5):926-34.
- 5) Osada M et al., J Biol Chem. 2012;287(26):22241-22252.
- 6) Herzog BH et al., Nature. 2013;502(7469):105-109.
- 7) Kato Y et al., Cancer Sci. 2008 Jan;99(1):54-61.
- 8) Takagi S et al., PLoS One. 2013;8(8):e73609.
- 9) Brinkmann V et al., Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue O, Osada M, Nakamura J, Kazama F, Shirai T, Tsukiji N, Sasaki T, Yokomichi H, Dohi T, Kaneko M, Kurano M, Oosawa M, Tamura S, Satoh K, Takano K, Miyuchi K, Daida H, Yatomi Y, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K	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 Int J Hematol.	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 52449
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, 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 Sasaki T., Shirai T., Tsukiji N., Otake S., Tamura S., Ichikawa J., Osada M., Satoh K., Ozaki Y., Suzuki-Inoue K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Functional characterization of recombinant snake venom rhodocytin: rhodocytin mutant blocks CLEC-2/podoplanin-dependent platelet aggregation and lung metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 960 ~ 972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.13987	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17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tsukiji N, Oishi S, Otake S, Sasaki T, Takano K, Suzuki-Inoue K
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 ISTH 2019 Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Otake S, Shirai S, Tsukiji N, Sasaki T, Satoh K, Tamura S, Takano K, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K
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 ISTH 2019 Congress (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 ヘ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 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 2019年

1. 発表者名 大竹志門, 白井俊光, 築地長治, 佐々木知幸, 佐藤金夫, 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80回日本血液学会学術集会, 大阪(2018.10.12-14)
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 GPVI依存性血小板凝集を惹起する蛇毒コンバルキシンの遺伝子組換え体の作製と機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会, 京都(2018.9.24-26)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
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, 札幌(2018.6.28-30) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅谷徳彦, 白井俊光, 築地長治, 佐々木知幸, 田村彰吾, 佐藤金夫, 大竹志門, 高野勝弘, 横道洋司, 尾崎由基男, 井上克枝
2. 発表標題 脳梗塞の増悪因子であるアクロレインの抗血小板作用
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会, 札幌(2018.6.28-30)
4. 発表年 2018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, 佐藤金夫, 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、赤芽球の分化、成熟に及ぼす役割
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会, 札幌(2018.6.28-30)
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え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, 札幌(2018.6.28-30)
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子組換え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, 札幌(2018.6.28-30)
4. 発表年 2018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 関節リウマチにおける血小板活性化受容体CLEC-2の役割の解明
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸(2017.12.6-9)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長田誠, 大澤満, 佐々木知幸, 井上修, 井上克枝, 藤田清貴
2. 発表標題 血小板活性化により生成される可溶性CLEC-2の測定法に関する有用性
3. 学会等名 日本臨床化学会 第57回年次学術集会, 札幌(2017.10.6-8)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sasaki T, Shirai T, Tsukiji N, Otake S, Tamura S, Osada M, Satoh K, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K
2. 発表標題 An inhibitory mutant of snake venom rhodocytin blocks CLEC-2/Podoplanin interaction dependent platelet aggregation and experimental lung metastasis.
3. 学会等名 ISTH 2017 Congress, Berlin, Germany. (July 8-13 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017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 関節リウマチにおける血小板CLEC-2の役割
3. 学会等名 第39回日本血栓止血学会学術集会, 名古屋(2017.6.8-10)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第39回日本血栓止血学会学術集会, 名古屋(2017.6.8-10)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学医学部臨床検査医学講座 https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/ 山梨大学医学部臨床検査医学講座 http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/
--

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