

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16080

研究課題名(和文) 赤血球造血における血小板活性化受容体CLEC-2の役割の解明

研究課題名(英文) Essential role of platelet-expressed C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) in erythropoiesis

研究代表者

大竹 志門(Otake, Shimon)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：50813060

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、血小板活性化受容体CLEC-2を巨核球・血小板特異的にノックアウトしたマウスが、なぜ貧血を呈するかを検証した。このマウスの骨髄を解析した結果、TER119陽性赤芽球数が減少、この赤芽球における死細胞割合が増加していた。CLEC-2の生体内リガンドとしてポドプランニンが知られるが、骨髄中に存在するポドプランニン陽性細胞は、CLEC-2の刺激を受けることで赤芽球細胞死抑制効果を持つIGF-1を分泌した。以上の結果から、ポドプランニンを発現する間質細胞と、CLEC-2を発現する巨核球の形成する骨髄微小環境が、赤芽球造血におけるIGF-1の適切な分泌に重要であることが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、巨核球が発現するCLEC-2と、そのリガンドであるポドプランニンが赤芽球造血に影響をすることを特定した。すでに系統の決定した血球細胞が、他の系統の造血に影響を及ぼしているという機序はユニークであり、学術的な興味を惹かれるものである。また、高齢者における貧血症の1/3は原因が不明であるとされる。本研究で特定されたCLEC-2-ポドプランニン軸を介したIGF-1の分泌制御機構の解明は、これまで原因不明であった貧血の機序解明にもつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：CLEC-2 is a podoplanin (PDPN) receptor expressed on the surface of platelets and megakaryocytes (Mgk). We have previously reported that PDPN+ bone marrow (BM) stromal cells facilitate Mgk expansion and maturation through the CLEC-2/PDPN axis. Although deletion of Mgk/platelet CLEC-2 causes anemia, its contribution to erythropoiesis remains unknown. To reveal the mechanism of this anemia, we first obtained BM cells from CLEC-2 conditional KO (cKO) mice and analyzed them using flow cytometry. In the CLEC-2 cKO mice, the number of TER119+ erythroblasts was decreased due to increased apoptosis. In vitro experiments showed that PDPN+ bone marrow stromal cells secreted IGF-1 upon stimulation with CLEC-2. In CLEC-2 cKO mice, IGF-1 concentrations in serum and BM extracellular fluid were decreased. These data reveal a novel mechanism of erythropoiesis regulation; BM microenvironment consisting of Mgk and PDPN+ stromal cells supports erythropoiesis via appropriate secretion of IGF-1.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：CLEC-2 赤血球造血 骨髄間質細胞 巨核球

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私たちは、血小板活性化蛇毒ロドサイチンの受容体として血小板上に C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) を同定した (Blood, 2006) . さらに、その生体内リガンドがポドプラニン (PDPN) であることを見出した (JBC, 2007) . 以来、CLEC-2 と PDPN の相互作用が、胎生期のリンパ管・肺発生や、がんの転移促進など、血栓止血にとどまらない多彩な役割を持つことを明らかにしてきた .

くわえて、CLEC-2 を巨核球・血小板特異的にノックアウトした (CLEC-2 cKO) マウスが血小板減少をきたすことから着想を得て、骨髄の細動脈周囲に、リンパ節の細網線維芽細胞に類似し、PDPN を発現する間質細胞を同定した . この細胞と巨核球の結合による CLEC-2 の活性化は、巨核球前駆細胞の自己増殖を促進し、加えて、CLEC-2 の結合を受けた PDPN 発現間質細胞は CCL5 を分泌し、巨核球の胞体突起形成を誘導した .

CLEC-2 cKO マウスは血小板減少に加えて貧血を呈することが報告されていたものの、CLEC-2 が赤芽球造血にどのような影響を及ぼすかは、これまで不明であった . 成熟した巨核球・血小板が他系統である赤芽球の造血に影響を及ぼすというストーリーは私たちの興味を強く惹くものであり、検討をすすめることとした .

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、血小板活性化受容体である CLEC-2 が、どのように別の系統である赤芽球の造血を制御しているかを解明することである .

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨髄中赤芽球の成熟度、アポトーシス、細胞周期の解析

この変化を定量的に評価するために、フローサイトメトリー法を用いた . 成熟度の検討については CD71/TER119 の各抗体を、アポトーシスの解析には AnnexinV と 7-AAD を、細胞周期の解析にはリン酸化ヒストン/Ki-67 の各抗体および 7-AAD を用いた .

#### (2) PDPN 発現間質細胞が放出する液性因子の解析

In vitro で PDPN 発現間質細胞を培養し、リコンビナント CLEC-2 蛋白で刺激した培養上清をサイトカインアレイおよび ELISA 法にて半定量・定量した .

#### (3) CLEC-2 cKO マウスにおけるサイトカイン値の解析

前出(2)で変化がみられたサイトカインについて、個体レベルでも変化がみられるか ELISA 法にて定量した .

### 4. 研究成果

まず、CLEC-2 cKO マウス骨髄における赤芽球の成熟度を解析したところ、TER119 陽性を示す、好塩基性赤芽球以降の細胞割合がコントロールマウスを比べて有意に減少していた . この原因を特定するために、アポトーシス細胞割合および細胞周期解析を行った . すると、AnnexinV+ 7-AAD- を示す早期アポトーシス細胞割合、AnnexinV+ 7-AAD+ を示す後期アポトーシス細胞割合の両者が増加していることが判明した . その一方で、TER119 陽性赤芽球における細胞周期に変化はみられなかった .

その他の造血臓器である脾臓については、CLEC-2 cKO マウスにおいて脾腫がみられ、髄外造血を反映しているものと考えられた .

CLEC-2 が赤芽球に発現しており、PDPN を発現する骨髄間質細胞と直接結合して何らかの影響を及ぼしている可能性を想定したが、どの分化段階の赤芽球にも CLEC-2 は発現していなかった . このことから、巨核球造血に及ぼす仕組みと同様、CLEC-2 を発現する巨核球と、PDPN を発現する骨髄間質細胞の相互作用が、なんらかの機序を介して赤芽球造血にも影響しているのではないかと考えた .

そこで、回収したマウス骨髄を培養し、浮遊細胞を新しいメディアムに毎日交換することで接着細胞のみを培養することで、PDPN 発現間質細胞を得た (接着細胞のうち 15%ほどが PDPN を発現することを確認した) . この間質細胞をリコンビナント CLEC-2 蛋白で刺激をし、どのようなサイトカイン・ケモカインが培養液中に増加するか、サイトカインアレイ法を用いて半定量した .

その結果、IGF-1 がおよそ 1.6 倍と増加を示した一方で、同程度の増加を示すサイトカインは他に確認できず、また赤芽球に影響を及ぼすことが知られている IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, SCF の濃度は変化がみられなかった . IGF-1 濃度については、ELISA 法でも有意な増加がみられることを追加で確認した .

IGF-1 はすでに赤芽球造血に対し一定の効果を示すことが報告されているが、引き続きリコンビナント IGF-1 を用いて赤芽球造血にどのような影響を示すか確認した . 具体的には、胎仔肝より分取した未熟な赤芽球を培養し、そこに IGF-1 を添加することで影響がでるか確認した . 予想に反し IGF-1 の添加は影響を及ぼさなかったが、培養液中に Bovine IGF-1 が潤沢に含まれており、じゅうぶんな IGF-1 がすでに添加されていることが変化のなかった原因と考えた . そこで、IGF-1 受容体阻害剤の添加が培養環境の赤芽球分化に影響を及ぼすか確認した . すると、1  $\mu$ M の IGF-1 受容体阻害剤添加で CD71 陽性赤芽球のアポトーシス細胞割合は著明に増加し、細胞数自体も有意に減少した .

In vitro の効果に加えて、血清中・骨髄細胞外液中の IGF-1 濃度についても比較をしたところ、CLEC-2 cKO マウスにおいて IGF-1 濃度は有意に減少していた。その一方で、赤芽球上の IGF-1 受容体発現には差がみられなかった。IGF-1 は主に肝臓で合成されることが知られていることから、IGF-1 mRNA をリアルタイム PCR 法で半定量を行ったが、変化を認めなかった。このことから、血清中の IGF-1 濃度低下は骨髄における産生量の低下が最も関与していると結論づけた。

最後に、IGF-1 の欠乏が貧血に寄与しているかを確認するため、CLEC-2 cKO マウスにマウス IGF-1 を皮下投与し、ヘモグロビン値の変化を確認した。その結果、IGF-1 投与後 2 週間後から有意な貧血改善効果がみられ、またアポトーシス細胞割合も有意に低下した。また CLEC-2 cKO マウスにおいて明らかだった脾腫も改善した。その一方で、コントロールマウスに対する IGF-1 投与はヘモグロビン値に影響を与えなかった。

以上の結果から、巨核球・血小板に発現する CLEC-2 は、PDPN 発現間質細胞との相互作用において、間質細胞から IGF-1 の分泌を促し、赤芽球のアポトーシス抑制効果を示すことで赤芽球造血を正に制御していると考えられた。系統の決定した血球細胞が、別の系統の造血に影響を及ぼすという造血制御機構はユニークであり、本研究によりこれまで知られていなかった赤芽球造血制御機構を解明することができた。

5. 主な発表論文等

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

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Otake Shimon, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Tamura Shogo, Takano Katsuhiko, Ozaki Yukio, Suzuki Inoue Katsue | 4. 巻<br>19                |
| 2. 論文標題<br>CLEC 2 stimulates IGF 1 secretion from podoplanin positive stromal cells and positively regulates erythropoiesis in mice          | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Thrombosis and Haemostasis  | 6. 最初と最後の頁<br>1572 ~ 1584 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jth.15317  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>S. Otake, T. Shirai, N. Tsukiji, T. Sasaki, K. Satoh, S. Tamura, K. Takano, Y. Ozaki, K. Suzuki-Inoue |
| 2. 発表標題<br>Platelet C-type Lectin-Like Receptor 2 (CLEC-2) is Required for Optimal Regulation of Erythropoiesis  |
| 3. 学会等名<br>27th International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (国際学会)                                |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>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<br>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<br>第41回日本血栓止血学会学術集会                           |
| 4. 発表年<br>2019年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>N. Tsukiji, S. Oishi, S. Otake, T. Sasaki, K. Takano, K. Suzuki-Inoue  |
| 2. 発表標題<br>Heme Induces Platelet Aggregation via Two ITAM Receptors: Implications in Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury |
| 3. 学会等名<br>27th International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>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<br>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<br>第41回日本血栓止血学会学術集会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大竹志門  |
| 2. 発表標題<br>Essential role of platelet-expressed C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) in erythropoiesis |
| 3. 学会等名<br>日本血液学会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大竹志門  |
| 2. 発表標題<br>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、成熟に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>日本血栓止血学会                                      |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|