

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08834

研究課題名(和文) 血小板が関与する新たな肺線維化機構の解明と治療標的としての可能性

研究課題名(英文) Pathological role of platelet CLEC-2 in pulmonary fibrosis.

研究代表者

築地 長治 (Tsukiji, Nagaharu)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：20710362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、以前血小板のCLEC-2という分子が胎生期肺の筋線維芽細胞の分化を通じて出生後の正常な呼吸機能獲得に必須の役割を果たすことを明らかにした。この成果から、成体肺において筋線維芽細胞が過剰に分化・増殖する肺線維化に血小板CLEC-2が関与しているのではないかと考えた。CLEC-2抗体投与に肺線維化抑制効果が観察された。血小板が関与していることは、さらなる解析の過程でいくつかの実験手法上の問題点が生じた。その解決及び別の複数のアプローチによって肺線維化と血小板の関連性についての調査を試みたものの、完全に解決するには至らず、さらなる解析が必要となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維化は進行性の慢性疾患であり、呼吸困難などから致命的となる疾患である。現在、2種類の抗線維化薬が使用可能であるが、線維化機構に不明な部分が多いことから新たな治療標的の探索が精力的に行われている。肺間質や実質など肺に存在する細胞を対象にした研究が多い中、我々は血小板と胎仔肺発生の関連に関する研究から、血小板が新たな肺線維化抑制のための標的になるのではないかと考えた。血小板が何らかの形で肺線維化を増悪させることを見出したことから血小板を標的にした新しい治療薬の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that the platelet CLEC-2 plays an essential role in the fetal lung development through the differentiation of interstitial myofibroblasts. We hypothesized that platelet CLEC-2 may exacerbate pulmonary fibrosis via excessive myofibroblast differentiation and proliferation. Although we observed that CLEC-2 antibody administration attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis, several experimental technique problems arose, and we attempted to resolve them and to investigate the relationship between pulmonary fibrosis and platelets using several different approaches. Unfortunately, these other approaches did not provide sufficient results.

研究分野：血液内科学(血栓止血学)

キーワード：血小板 肺線維化 CLEC-2

1. 研究開始当初の背景

近年、血栓止血以外の、いわゆる”beyond clotting”な血小板機能に注目が集まっている。我々がこれまで注目してきた血小板上の受容体 CLEC-2 は癌転移、免疫、炎症、発生、再生等、多彩な生命現象への関与が報告されており、血小板 CLEC-2 を標的とした様々な疾患への治療法開発の可能性が示唆されている。

本研究の端緒となった新たな血小板機能が、最近我々が報告した胎生後期肺発生である。通常、胎生後期の肺胞周囲には α -smooth muscle actin (SMA) 陽性の筋線維芽細胞が分化・遊走し、エラスチンやコラーゲン等の ECM を産生して肺胞に伸縮性、柔軟性を与える。しかし、CLEC-2 や CLEC-2 リガンドの Pdpn の欠損マウスでは筋線維芽細胞の分化が著しく阻害されることで肺胞の拡張能が低下し、出生直後に呼吸不全で死亡する。以上より、血小板 CLEC-2 が肺の筋線維芽細胞分化と最終的な呼吸機能獲得に必須であることが明らかになった (Blood 2018)。胎生期肺の筋線維芽細胞は肺胞構築完了後次第に消失する。それゆえ筋線維芽細胞は成体肺ではほとんど認められないが、線維化肺の原因となる重要な細胞である。我々は、胎生期肺発生での知見から、成体肺で血小板を介した不適切な筋線維芽細胞の分化増殖が肺線維化の一因になっているのではないかという仮説を立てた。

当研究室には独自のリソースとして、CLEC-2 欠損マウスや抗 CLEC-2 抗体、CLEC-2 阻害薬などを保持している。特に抗 CLEC-2 抗体はマウスに投与することで一過性の血小板特異的 CLEC-2 欠損状態を作ることができる。予備検討において、プレオマイシン誘導性肺線維化モデルマウス (以下プレオマウス) に抗 CLEC-2 抗体を投与すると生存率及び肉眼的炎症レベルが改善することを見出し、血小板 CLEC-2 が肺線維化の増悪因子である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

過去の成果及び予備検討の結果より、血小板 CLEC-2 が肺線維化増悪因子である可能性が示唆されたことから、本研究では、「血小板 CLEC-2 が肺線維化に關与する作用機序の解明と CLEC-2 拮抗薬、既存の抗血小板薬の有用性について検証する」ことを目的とした。

3. 研究の方法

血小板 CLEC-2 による肺線維化増悪機序の解明

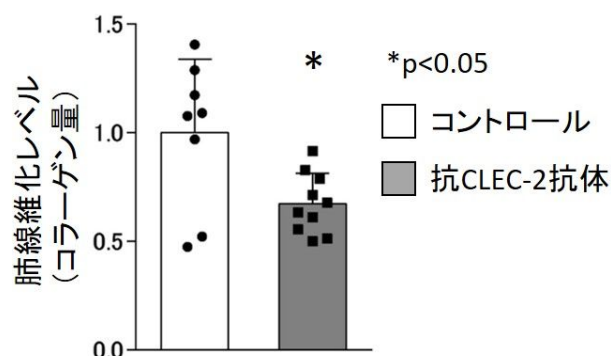
抗 CLEC-2 抗体投与プレオマウスで、病理組織標本のコラーゲン染色や、肺葉溶解液のコラーゲン定量、炎症性サイトカインのタンパク質及び mRNA レベルでの発現解析、呼吸機能解析などを実施する。

既存の抗血小板薬や当研究室で開発した CLEC-2 阻害薬が肺線維化の抑制に有効かを と同様の方法で実施する。

4. 研究成果

・抗 CLEC-2 抗体による肺線維化軽減機構の解析

抗 CLEC-2 抗体投与プレオマウスの肺線維化軽減効果を定量的に解析するために、線維化レベルと比例関係にあるコラーゲン量を肺葉溶解液で測定した。結果、抗 CLEC-2 抗体投与群ではコントロール群に比べてコラーゲン量の有意な低下を認めた。



・抗 CLEC-2 抗体による実験系の問題点

抗 CLEC-2 抗体は、初回投与時には血小板に発現している CLEC-2 と反応することで血小板減少を起こす。抗 CLEC-2 抗体は同時に巨核球にも作用して巨核球上から CLEC-2 を消失させ CLEC-2 欠損血小板が産生され始める。血小板 CLEC-2 欠損中であれば、以降の投与時には血小板減少は起こらず CLEC-2 欠損状態の延長効果のみが得られる。1 回の投与による CLEC-2 欠損維持期間は病態モデルによって変化し得るが概ね週一回の投与で 4 週間ほど CLEC-2 欠損状態を維持することがわかってきた。本計画でも週一回の投与で実施したが、2 回目の投与以降抗体の有効期間が予想以上に短縮し、CLEC-2 欠損状態を維持できていないことがわかった。有

効期間の短縮により、CLEC-2 発現血小板が産生された状態で抗 CLEC-2 抗体を投与すると抗 CLEC-2 抗体が血小板と反応し、初回投与時のような血小板減少が起こってしまったと考えられる。これら実験系の問題が特定されるまでに、抗体産生のハイブリドーマのリクローニングや抗体の機能解析、マウスでの検証に多大な時間を要したため、予定していた計画を円滑に進めることが困難であった。今回得られた抗 CLEC-2 抗体投与による肺線維化軽減効果が CLEC-2 欠損によるものなのか、血小板減少によるものなのか不明ではあるものの、血小板がなんらかの増悪作用を持つことは間違いないと思われ、今後 CLEC-2 または血小板自体に注目した肺線維化機構の解明を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Otake Shimon, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Tamura Shogo, Takano Katsuhiko, Ozaki Yukio, Suzuki Inoue Katsue	4. 巻 19
2. 論文標題 CLEC 2 stimulates IGF 1 secretion from podoplanin positive stromal cells and positively regulates erythropoiesis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1572 ~ 1584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.15317	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 Oishi Saori, Tsukiji Nagaharu, Otake Shimon, Oishi Naoki, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Yoshikawa Yuri, Takano Katsuhiko, Shinmori Hideyuki, Inukai Takeshi, Kondo Tetsuo, Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 5
2. 論文標題 Heme activates platelets and exacerbates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via CLEC-2 and GPVI/FcR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2017 ~ 2026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020001698	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 Ichikawa Jiro, Ando Takashi, Kawasaki Tomonori, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Kimura Yujiro, Aoki Kaoru, Hayakawa Keiko, Suzuki Inoue Katsue, Saitoh Masao, Haro Hirotaka	4. 巻 35
2. 論文標題 Role of Platelet C Type Lectin Like Receptor 2 in Promoting Lung Metastasis in Osteosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1738 ~ 1750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4045	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 Suzuki Inoue Katsue, Tsukiji Nagaharu, Otake Shimon	4. 巻 18
2. 論文標題 Crosstalk between hemostasis and lymphangiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 767 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14726	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 Suzuki Inoue Katsue, Tsukiji Nagaharu	4. 巻 4
2. 論文標題 Platelet CLEC 2 and lung development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 481 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rth2.12338	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 Inoue Osamu, Osada Makoto, Nakamura Junya, Kazama Fuminori, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Sasaki Tomoyuki, Yokomichi Hiroshi, Dohi Tomotaka, Kaneko Makoto, Kurano Makoto, Oosawa Mitsuru, Tamura Shogo, Satoh Kaneo, Takano Katsuhiko, Miyauchi Katsumi, Daida Hiroyuki, Yatomi Yutaka, Ozaki Yukio, Suzuki-Inoue Katsue	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 International Journal of Hematology	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 井上 克枝、築地 長治	4. 巻 60
2. 論文標題 血小板の止血機能を超えた役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1283 ~ 1291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.1283	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 Suzuki Inoue Katsue, Tsukiji Nagaharu, Otake Shimon	4. 巻 18
2. 論文標題 Crosstalk between hemostasis and lymphangiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 767 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14726	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 大竹 志門, 大石 沙織, 築地 長治, 大石 直輝, 佐々木 知幸, 白井 俊光, 高野 勝弘, 近藤 哲夫, 井上 克枝	4. 巻 36
2. 論文標題 ヘミンはCLEC-2とGPVI/FcR を介して血小板を活性化し、横紋筋融解による急性腎障害を悪化させる	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本透析医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 141-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 築地 長治	4. 巻 42
2. 論文標題 リンパ管内皮Podoplaninと血小板CLEC-2の相互作用が関与する肺発生機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本リンパ学会機関誌	6. 最初と最後の頁 12~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 築地 長治	4. 巻 30
2. 論文標題 CLEC-2/podoplaninシグナルを介した血小板による肺発生メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 652~659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 築地 長治	4. 巻 78
2. 論文標題 肺発生における血小板の生理的役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 877~882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 築地長治
2. 発表標題 リンパ管内皮と血小板の相互作用による胎生期器官形成機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大竹 志門, 佐々木 知幸, 白井 俊光, 築地 長治, 高野 勝弘, 田村 彰吾, 尾崎 由基男, 井上 克枝
2. 発表標題 CLEC-2はPDPN発現間質細胞からのIGF-1分泌を促進し、赤血球造血を正に制御する
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石沙織、築地長治、大竹志門、大石直輝、佐々木知幸、白井俊光、吉河佑莉、高野勝弘、新森英之、犬飼岳史、近藤哲夫、井上克枝
2. 発表標題 横紋筋融解症に併発する腎障害における血小板CLEC-2及びGPVIの役割
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saori Oishi, Nagaharu Tsukiji, Shimon Otake, Naoki Oishi, Tomoyuki Sasaki, Toshiaki Shirai, Yuri Yoshikawa, Katsuhiko Takano, Tetsuo Kondo, Katsue Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Heme Activates Platelets and Exacerbates Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury via CLEC-2 and GPVI/FcR
3. 学会等名 ISTH 2020 congress (国際学会)
4. 発表年 2020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 血小板受容体CLEC-2による関節リウマチの病態形成への関与
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石沙織、築地長治、大竹志門、大石直輝、佐々木知幸、白井俊光、吉河佑莉、高野勝弘、近藤哲夫、井上克枝
2. 発表標題 横紋筋融解症に併発する腎障害における血小板CLEC-2およびGPVIの役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020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、高野勝弘、尾崎由基男、井上克枝
2. 発表標題 巨核球・血小板上C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)の赤血球造血における役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Otake, T. Shirai, N. Tsukiji, T. Sasaki, K. Satoh, S. Tamura, K. Takano, Y. Ozaki, K. Suzuki-Inoue
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 第27回国際血栓止血学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N. Tsukiji, S. Oishi, S. Otake, T. Sasaki, K. Takano, K. Suzuki-Inoue
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 第27回国際血栓止血学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagaharu Tsukiji
2. 発表標題 Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会（招待講演）
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 へ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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	井上 克枝 (Suzuki-Inoue Katsue) (10324211)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	
研究分担者	佐藤 篤靖 (Sato Atsuyasu) (30706677)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
研究分担者	佐藤 晋 (Sato Susumu) (40378691)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	

	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
研究協力者	佐々木 知幸 (Sasaki Tomoyuki) (40739124)		
研究協力者	大竹 志門 (Otake Shimon) (50813060)		

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
---------	---------