

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390268

研究課題名（和文） 新規血小板活性化受容体CLEC-2と生体内リガンドポドプラニンの血栓症での役割

研究課題名（英文） A role of the novel platelet activation receptor CLEC-2 and its internal ligand podoplanin in thrombotic diseases

研究代表者

尾崎 由基男 (OZAKI YUKIO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30134539

研究成果の概要（和文）：

血小板活性化受容体 CLEC-2 は、ある種の癌に発現するポドプラニンという蛋白と結合して癌の転移を促進するが、血栓止血での役割は不明であった。CLEC-2 欠損マウスを作製したところ、野生型マウスに比べて血栓の増大が抑制された。機序として、血小板が活性化すると CLEC-2 同士で結合して血栓を安定化することを見出した。しかし出血傾向の有意な増加はなく、CLEC-2 を標的とした抗血小板薬は、出血の副作用の少ない良い薬剤となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Novel platelet activation receptor CLEC-2 binds to podoplanin expressed on the surface of several kinds of cancer cells, which facilitates cancer metastasis. However, its role in thrombosis and hemostasis has not been elucidated to date. We generated CLEC-2-deficient mice and found that thrombus formation was inhibited in vivo and in vitro. We also found that CLEC-2 forms homophilic association in a manner depending on platelet activation, which stabilizes thrombus formation. Tail bleeding was not significantly increased in CLEC-2-deficient platelets, suggesting that CLEC-2 may be a good target protein for anti-platelet drug, which inhibits pathological thrombosis, but not physiological hemostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：血栓止血学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血小板、CLEC-2、ポドプラニン、血栓症

1. 研究開始当初の背景

血小板活性化蛇毒、ロドサイチンの血小板上受容体が、新しい血小板活性化経路を持つ C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) であ

ることを見出した。さらに我々は、CLEC-2 の生体内リガンドが腫瘍膜上に発現するポドプラニンであることを見出した。ポドプラニンは血小板凝集を惹起して自身が発現して

いる腫瘍の転移を促進するため、CLEC-2/ポドプラニンの結合を抑制することで、癌転移を抑制できる可能性がある。このように癌転移との関係で注目された CLEC-2 ではあるが、血小板—巨核球での特異的発現、強力な血小板活性化能などにより、我々は CLEC-2/ポドプラニンの相互作用は癌のみに関連するのではなく、血栓症発症に関与するとの仮説を立てた。すなわち、ポドプラニンは正常な血管内皮には発現しないことが知られているが、動脈硬化部位にのみ発現して血栓形成に関わる可能性を考えた。

2. 研究の目的

(1) ポドプラニンは正常な血管内皮には発現しないことが知られているが、動脈硬化部位にのみ発現して血栓形成に関わるとの可能性を検討する。(2) ポドプラニンに限らず、CLEC-2 が血栓止血領域において果たす役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化部位でのポドプラニンの発現の確証を得る。①病理標本で動脈硬化部位のポドプラニンの発現を免疫染色で確認する。②培養細胞を用いてポドプラニンの発現を確認する。動脈硬化部位を構成する細胞の培養細胞にポドプラニンが発現するか確認する。発現していない場合、炎症性サイトカインを作用させるなど、病的条件下では発現しないかフローサイトメーターで確認する。(2) CLEC-2 欠損マウスを作製して、血小板凝集能、血栓形成能、出血時間などを野生型と比較する。CLEC-2 欠損マウスは胎生致死であったため、放射線照射マウスに CLEC-2^{-/-}胎仔肝細胞を移植した放射線キメラマウスを作製して、上記の実験を行った。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化部位の病理標本では、平滑筋と思われる細胞がポドプラニン抗体で染色され、リコンビナント CLEC-2 の結合が認められた。これより、血管平滑筋細胞にポドプラニンが発現し、これに対してリコンビナント CLEC-2 が結合すると考えた。次に血管平滑筋にポドプラニンが発現するか検討するため、培養平滑筋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が、明らかな発現は見いだせなかった (図 1 A)。ヒト

fibrosarcoma で、TGFβによりポドプラニンの発現が誘導されたという報告があったため (FEBS Lett. 582, 341–345, 2008)、血管平滑筋に TGFβを加えて3日間培養したところ、

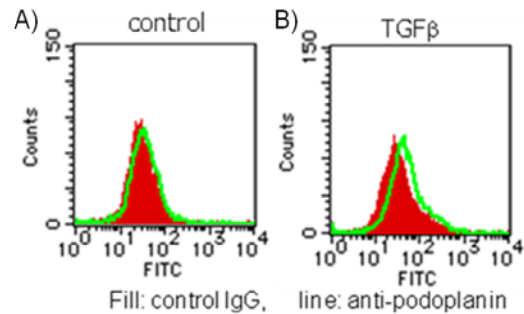


図1 血管平滑筋細胞でのポドプラニンの発現

わずかなポドプラニンの発現増加が認められた (図 1 B)。リアルタイム PCR でも、血管平滑筋では TGFβ処理でポドプラニン mRNA が 1.54 ± 0.14 倍 (mean \pm SE, n=5) 増加した。しかしながら、この程度のわずかな発現のポドプラニンが血小板を活性化できるか疑わしく、これ以上の検索はしなかった。その他、TNFα、IL-3、IFNγ など、他のサイトカインも検討したが、ポドプラニンの増加は認められなかった。リコンビナント CLEC-2 が結合することは確実なため、血管平滑筋細胞にはポドプラニン以外の CLEC-2 リガンドが発現していると考えられた。(2) CLEC-2 の血栓止血における役割を検討するために作製した CLEC-2^{-/-}キメラマウスを作製した。その血小板はロドサイチンに反応しなかったが、それ以外の血小板活性化物質には野生型と同様に反応して活性化され、コラーゲン等の細胞外マトリクスにも野生型と同様に粘着した。しかし、コラーゲン上にフロー条件下で全血を流した際の血栓形成 (図 2) や、レーザー傷害による in vivo 血栓形成は CLEC-2^{-/-}で著しく抑制され、CLEC-2 は生体内で血栓の増大や安定化を担っていることが示唆された。

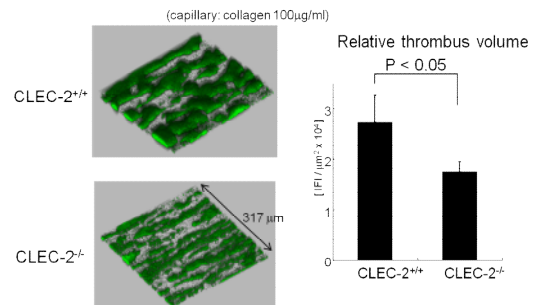


図2 フロー条件下におけるコラーゲンコートキャピラリー上での血栓形成

さらに我々は、そのメカニズムとして、血小板の CLEC-2 同士がホモフィリックに結合することで血栓を安定化していることを、表面プラズモン共鳴解析などにより見出した(図3)。

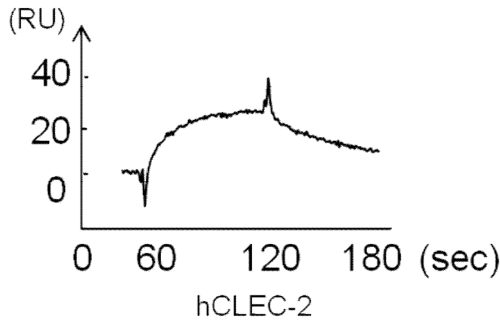


図3 表面プラズモン共鳴解析
アナライト、リガンドとも
リコンビナントCLEC-2を用いて解析

CLEC-2 キメラと野生型キメラの尾を麻酔下に 1 mm 切断し 20 分間の出血量を比較したところ、野生型に比べて出血量が多い傾向はあったものの、有意な差は認められなかった(図4)。

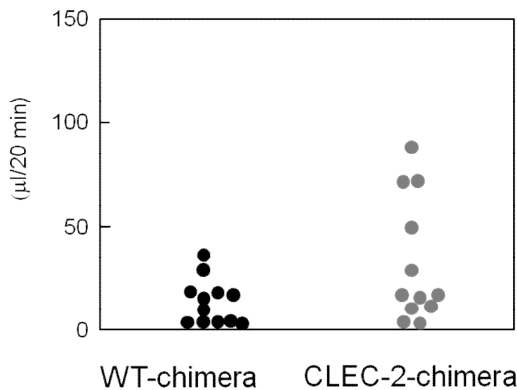


図4 tail bleeding

CLEC-2 欠損は血栓形成を完全には抑制しないが、血栓が血管を閉塞しなければ血栓症の発症は防ぐことが出来る。さらに、CLEC-2 キメラマウスは、出血傾向の有意な増加もないため、CLEC-2 をターゲットとした抗血小板剤は、出血傾向の増強なしに病的血栓を抑制する、良い抗血小板剤となる可能性がある。

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5件)

- ① Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y. The novel platelet activation receptor CLEC-2. Platelet2011 In press 査読有り
- ② 井上克枝, 井上修, 尾崎由基男 新規血小板受容体 CLEC-2 の同定と機能. 臨床病理 58, 2010, 1193-1202 査読なし
- ③ Suzuki-Inoue K, Inoue O, (10名), Ozaki Y. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. J Biol Chem 285, 2010, 24494-24507 査読有り
- ④ 井上克枝. 新規血小板活性化受容体 CLEC-2 日本血栓止血学会誌 20(4), 2009, 401-405 査読なし
- ⑤ Ozaki Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O. Novel interactions in platelet biology: CLEC-2/podoplanin and laminin/GPVI. J Thromb. Haemost. Suppl.1, 2009, 191-194 査読有り

[学会発表] (計9件)

- ① Suzuki-Inoue K The novel platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation and migration of lymphatic endothelial cells. The American Society of Hematology Annual Meeting 2010.12.4 Orland
- ② 井上克枝. 新規血小板活性化受容体 CLEC-2 の同定と機能. 臨床検査医学会(学会賞受賞講演(学術賞)) 2010.9.10 東京
- ③ Suzuki-Inoue K. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. 血液血管オルビス 2010.8.21 東京
- ④ 井上克枝. 新規血小板活性化受容体 CLEC-2 のリンパ管発生における役割. 日本血栓止血学会 2010.4.23 鹿児島
- ⑤ 井上修. 新規血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓止血における役割. 日本血栓止血学会 2010.4.23 鹿児島
- ⑥ 井上克枝. CLEC-2 信号伝達系における血小板膜マイクロドメインの役割. 第32回日本血栓止血学会学術集会 2009/06/09 小倉
- ⑦ Suzuki-Inoue K. A role of platelet membrane microdomains in CLEC-2-mediated signal transduction. XXII The international Society on Thrombosis and Haemostasis 2009/07/16 Boston
- ⑧ Ozaki Y. Novel interactions in platelet

biology. State of the Art lectures. XXII
The international Society on Thrombosis
and Haemostasis 2009.7.14 Boston

- ⑨井上克枝. 新規血小板活性化受容体 CLEC-2.
シンポジウム 2S7a「血栓症の分子メカニ
ズム：最近の進歩」第 82 回日本生化学会大
会 2009.10.22 神戸

〔図書〕(計 2 件)

- ①井上克枝. 中外医学社 「がんと血小板」
坂田洋一他編集 Annual Review 血液
2010 2010 8 頁(井上分)
②井上克枝. 中外医学社 「個体発生におけ
る血小板の役割」 坂田洋一他編集
Annual Review 血液 2011 2011 7 頁(井
上分)

〔その他〕

ホームページ

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/cl
in0lab/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 由基男 (OZAKI YUKIO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教
授

研究者番号：30134539

(2)研究分担者

井上 克枝 (SUZUKI-INOUE KATSUE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准
教授

研究者番号：10324211

井上 修 (INOUE OSAMU)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助
教

研究者番号：00432154

佐藤 金夫 (SATO KANEKO)

山梨大学・医学部・助手

研究者番号：20242662

(3)連携研究者

浅田 祐士郎 (ASADA YUJIRO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70202588