

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591147

研究課題名(和文) 新規血小板活性化受容体CLEC-2の第二リガンドの同定とその生体内機能の検討

研究課題名(英文) Identification of the second ligand of the novel platelet activation receptor CLEC-2 and investigation of its physiological roles

研究代表者

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

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血小板を活性化して癌の転移を促進している。今回、ポドプラニン以外で CLEC-2 に結合して活性化する蛋白を検索した。蛋白の同定まではできなかったが、ポドプラニン以外の CLEC-2 結合蛋白癌を発現する癌を 2 種類発見した。また、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も見出した。

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 results in platelet activation and facilitates cancer metastasis. In the present study, we sought to identify an internal ligand of CLEC-2 other than podoplanin. We found two cancer cell lines, which express a CLEC-2 ligand other than podoplanin, although we were not able to identify the protein. We also found that CLEC-2 forms homophilic association in a manner depending on platelet activation, which stabilizes thrombus formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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、癌転移

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。CLEC-2 の生体内リガンドは不明であったが、CLEC-2 の血小板-巨核球に特異的な発現と、強力な血小板活性化能

を考えると、生体内で血栓止血に何らかの役割を果たす可能性は高いと思われた。最近我々は、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が、ポドプラニンが発現する腫瘍細胞の種類は限られており、これのみを標的とした癌転移の制御には限界がある。さらに、ポドプラニンが血栓止血領域で役割を果しているとは考えづらい。

2. 研究の目的

(1) CLEC-2は、ポドプラニンを発現していない癌の転移は促進するのか検討するため、腫瘍細胞上に CLEC-2 のポドプラニン以外の第二のリガンドがないか検索する。(2) 血栓止血領域において役割を果たす、CLEC-2 のリガンドを検索する。

3. 研究の方法

(1) ① 2種類の腫瘍のセルラインにリコンビナント CLEC-2-Fc あるいは GPVI-Fc を加えて、あるいは抗ポドプラニン抗体を加えて、結合をフローサイトメータで確認する。② マウス尾静脈より腫瘍細胞を投与する。2週間後に、安楽死の上肺を摘出し、50 ml シリンジに入れて陰圧をかけて十分に膨らませた後、転移巣を目視にてカウントする。(2) CLEC-2 欠損マウスを作製した。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、血小板凝集実験、血栓形成実験などを行った。

4. 研究成果

(1) ポドプラニンの発現しない2種類の腫瘍細胞のセルラインに、CLEC-2 組換蛋白が結合した (図1)。

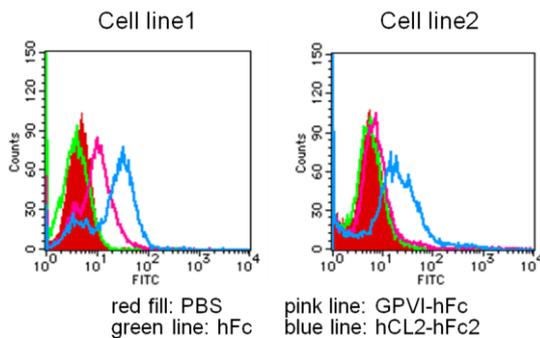


図1 腫瘍細胞へのリコンビナント CLEC-2、リコンビナント GPVI の結合

これより、これらの細胞の表面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思われた。二つのセルラインは血小板凝集を惹起するが、これらは CLEC-2 リコンビナント蛋白で抑制されなかった。これより、これらのセルライン惹起血小板凝集における CLEC-2 の関与は少ないと考えられた。ポドプラニン以外の CLEC-2 リガンドを MS/MS で同定しようとしたが、(2)で述べるように、プ

ルダウンされる蛋白に再現性が乏しく難航が予想されること、また、セルライン惹起血小板凝集における CLEC-2 の関与が少ないと予想されることから、これ以上追及しなかった。

図1に示すように、cell line1 は GPVI との結合部位も持つと考えられた。このセルラインによる血小板凝集は、GPVI/FcR γ -chain 欠損血小板では野生型に比べて delay が見られるため (図2)、GPVI と腫瘍細胞上のリガンドの結合が血小板凝集を促進することで、ある種の癌の転移が促進される可能性が示唆された。

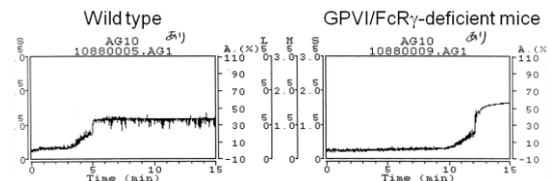


図2 Cell line1 惹起血小板凝集

これは初めての知見となるため、多少本題から外れるものの、追及することにした。

GPVI/FcR γ -chain 欠損マウスと野生型の尾静脈から Cell line1 (使用したマウスと同系の腫瘍) を投与して肺転移を比較したが、両者に差は認められず、明らかに GPVI がこの腫瘍の転移を促進しているという証拠は得られなかった。

(2) ①血栓止血関連の CLEC-2 リガンド候補として、血管壁に存在するプロテオグリカンの一種を考えていたが、純粋な物質の精製が困難であり、証明は断念した。②CLEC-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。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見出した。つまり血栓止血に関わる CLEC-2 の第二のリガンドは CLEC-2 自身であることを見出した (文献③)。③血管平滑筋の細胞表面に CLEC-2 リコンビナント蛋白が結合することをフローサイトメータで確認した。また、血管平滑筋上に全血を流すと血栓が形成されることを見出した。これより血管平滑筋上に何らかのリガンドが発現していることが示唆された。それを同定するためにビオチ

ンラベルした細胞を可溶化してリコンビナント CLEC-2 あるいはコントロール蛋白でプルダウンし、アビジンにより結合蛋白の検出を試みた。しかしながら対照蛋白に認められず、リコンビナント CLEC-2 のみに結合する蛋白は、実験ごとに変化して一定の結果が得られず、期間内の同定はかなわなかった。病態生理学的な意義づけとして、冠動脈疾患に対するステント留置後に生じる再狭窄は、血管平滑筋の増生が主因と言われている。増生による内腔の物理的な閉塞の他に、平滑筋上の CLEC-2 リガンドが CLEC-2 と結合して血小板を活性化することがステント血栓の一因ではないかと考えている。

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. Platelet 2011 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 2009.6.9 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 2009.7.16 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 「がんとう血小板」 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/clin01lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

佐藤 金夫 (SATO KANEO)
山梨大学・医学部・助手
研究者番号：20242662