

平成22年 6月 25日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790671
 研究課題名（和文） 新規血小板活性化受容体 CLEC-2：巨核球での役割とアダプタ蛋白 CARD9
 の関与
 研究課題名（英文） The novel platelet activation receptor CLEC-2: The role of CLEC-2
 for megakaryopoiesis, platelet production and its signaling mechanism
 研究代表者
 井上 修（INOUE OSAMU）
 山梨大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：00432154

研究成果の概要（和文）：CLEC-2 信号伝達系におけるアダプター蛋白 CARD-9 の関与を検討したが CARD-9 は CLEC-2 を介した血小板活性化および血小板凝集には関与していない事が判明した。また CLEC-2 欠損マウスの作製に成功したが、CLEC-2 null マウス胎仔は胎生致死であった。そこで造血幹細胞を多く含む CLEC-2 欠損マウス胎仔の肝細胞を放射線照射により骨髄を破壊した健常マウスに移植し、CLEC-2 を欠損した骨髄造血幹細胞をもつ CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスを作製した。今後骨髄巨核球採取を行い、血小板造血における CLEC-2 の役割の検討を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：C-type lectin like receptor 2 (CLEC-2) is a novel platelet activating receptor. We are trying to elucidate the physiological role and signaling mechanism of CLEC-2. CARD-9 is an adaptor protein that plays a role in signalling downstream of another C-type lectin like receptor dectin-1. The platelet aggregation induced by a CLEC-2 specific agonist rhodocytin was not altered in the absence of CARD-9, suggesting that CARD-9 is not involved in the signaling mechanism downstream of CLEC-2. Although we have successfully generated CLEC-2 deficient mice, they were almost embryonic lethal. Since some of CLEC-2 null fetus can survive around E15, we further performed transplantation of liver cells of CLEC-2 null fetus to recipient mice that were irradiated to kill the hematopoietic stem cells in the bone marrow, and made chimera mice that have CLEC-2 deficient blood cells including platelets. Our CLEC-2 chimera mice successfully produce CLEC-2 deficient blood and we can investigate the physiological role of CLEC-2 using these mice. We are going to isolate bone marrow megakaryocytes from the chimera mice next and try to identify the role of CLEC-2 in megakaryopoiesis and platelet production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：血栓、止血学、CLEC-2

1. 研究開始当初の背景

C-type lectin like receptor-2 (CLEC-2) は 2006 年に我々が血小板膜上に初めて同定した新規血小板活性化受容体である。CLEC-2 は骨髄巨核球、血小板、肝類洞上皮細胞のみに発現が認められ、比較的細胞特異的発現様式をとる。CLEC-2 は血小板を強く凝集させる活性化受容体であることから、血栓性疾患において重要な役割を演じている可能性が考えられている。また、血小板に比較的特異的に発現するため、CLEC-2 を抗血栓薬の標的蛋白とすれば血小板機能以外への影響が非常に少ない抗血小板薬の創薬が可能になると期待される。さらに、骨髄巨核球にも発現することから、骨髄巨核球の分化や血小板産生に関わる可能性も予想されるが、未解明である。CLEC-2 の生体内リガンドは当初不明であったが、われわれはこれを同定し、2007 年に報告してきた。しかし CLEC-2 の生理的な機能の解明や、詳細なシグナル分子の解明など、依然として不明の点が多く残されており、これらの詳細な解明が待たれている。CLEC-2 の血小板活性化機序は未だ完全には解明できていない。これは CLEC-2 がユニークな血小板活性化メカニズムを持つためである。CLEC-2 は細胞内ドメインにチロシンを含む YXXL モチーフをひとつだけ持つ (atypical ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif)。このモチーフのチロシンが Src kinase によりリン酸化され、そこに Syk がその SH2 ドメインで結合することにより活性化される。通常 Syk はリン酸化されたふたつの YXXL motif (ITAM) に結合して活性化されることが知られている。しかし CLEC-2 の活性化メカニズムは、ひとつの YxxL (atypical ITAM) により Syk が活性化を受けるといふ、全く新しい Syk 活性化機構であることがわかった。同じ c-type lectin like receptor である dectin-1 も同様の Syk 活性化機構をもつことが、ほぼ同時期に発表された。Dectin-1 はサイトカイン産生に関わる膜蛋白で、アダプター蛋白 CARD-9 を介して NF- κ B の産生に関わっている。CLEC-2 と CARD-9 は atypical ITAM による Syk 活性化が両者共通の細胞活性化機構である可能性が示唆されるが、詳細は不明であった。そんな中、CARD-9 の欠損マウスが利用可能となり、本研究のテーマの一つとして取り上げ CLEC-2 血小板活性化機構での役割を検討することとした。また、当時 CLEC-2 欠損マウ

スの作製に成功した研究グループは無く、この作製を目指した。さらに CLEC-2 欠損マウスと健常マウスの比較でのみ検証が可能となる骨髄巨核球での CLEC-2 の役割、特に血小板造血での役割の解明も計画した。

2. 研究の目的

- (1) 末梢血血小板での CLEC-2 シグナル伝達系における CARD-9 の関与、役割について検討する。
- (2) CLEC-2 欠損マウスの作製と、骨髄巨核球系細胞の分化および血小板産生における CLEC-2 の役割を解明する。

3. 研究の方法

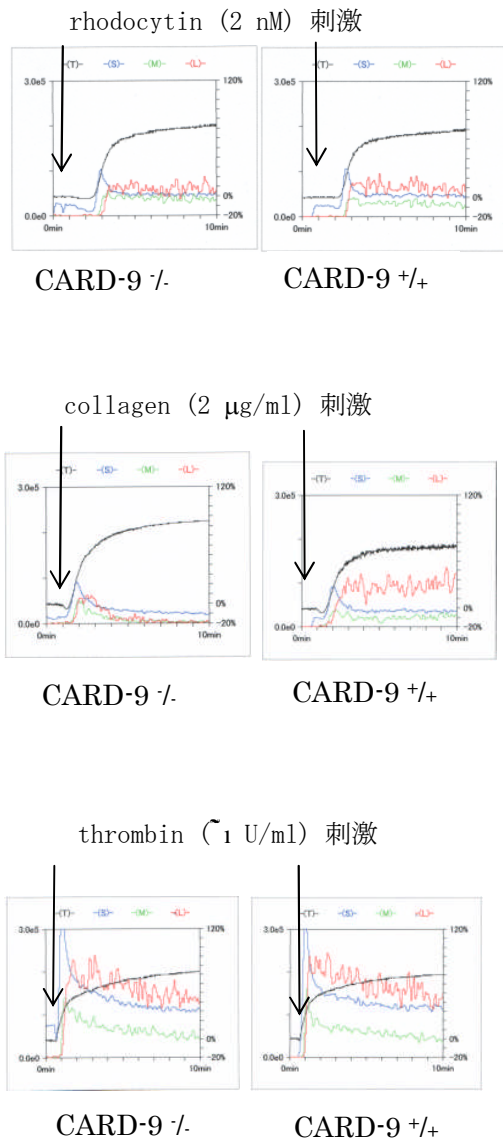
- (1) マウス下大静脈より採血し、血漿成分を除いた洗浄血小板を作製する。この洗浄血小板をロドサイチン、その他のアゴニストで刺激し、惹起血小板凝集を CARD9 欠損マウスと野生型マウスとで比較する。ロドサイチンの他、コラーゲン、トロンビン、ADP など通常のアゴニスト惹起血小板凝集を、CARD9 欠損と野生型マウスとで比較する。
- (2) 差が認められれば、どの時点で活性化シグナルが抑制されているかを検討する。：CLEC-2 による血小板活性化は Src family kinase の活性化→Syk の活性化→アダプタ蛋白のリン酸化→PLC γ 2 の活性化へと進んでゆく。CLEC-2 惹起血小板凝集に CARD9 欠損血小板と野生型血小板とで差が認められたら、先に述べた活性化シグナルを順に検討し、CARD9 非存在かではどのシグナル分子の活性化が抑制されるのかを検討し、CARD9 の役割を決定する。主として免疫沈降、ウエスタンブロットの手法を用いて行う。
- (3) CLEC-2 欠損マウスの作製
- (4) 健常マウス、CLEC-2 欠損マウス、CARD-9 欠損マウス大腿骨からそれぞれ骨髄巨核球を採取し、in vitro で培養し、血小板産生の指標となる ploplatelet formation の程度の差異を検討する。

4. 研究成果

- (1) 健常マウスと CARD-9 欠損マウス下大静脈から採血し、血漿成分を除去した洗浄血小板を作製した。CARD-9 欠損マウス血小板をコラーゲン、トロンビンなど各種血小板刺激物で刺激したが、健常マウス血小板と比べ凝集反応に抑制は認められなかった。

また、予想に反し、CLEC-2 刺激薬の rhodocytin 刺激でも有意な凝集抑制は認められなかった(図1参照)。

図1 各種アゴニスト刺激による血小板凝集反応



(2) CLEC-2 欠損マウスの作製には 2009 年に成功したが、ほぼ胎生致死であることも判明した。このため、CLEC-2 欠損胎児マウスの肝臓を摘出し、細胞懸濁液の状態にし、放射線照射により骨髄造血能を破壊したレシピエントマウスに注入し骨髄キメラマウスを作製した。この CLEC-2 欠損マウスからの肝細胞を移植した骨髄キメラマウスでは、血小板膜上で CLEC-2 の発現が欠損している事がフローサイトメトリーにより確認できた (図2参照)。また、

CLEC-2 欠損キメラマウス血小板は、コラーゲン凝集は健常マウス同様に惹起されるが rhodocytin 刺激に反応せず、凝集が惹起されないことを確認した (図3参照)。

図2 骨髄キメラマウス末梢血血小板膜上の CLEC-2 発現量の比較

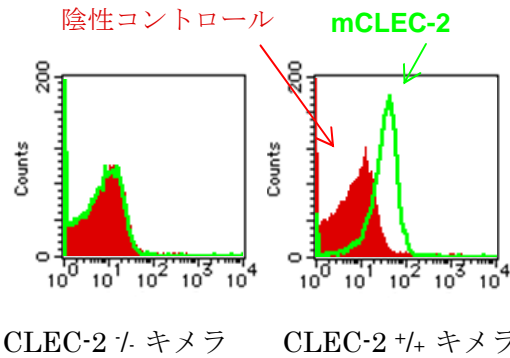
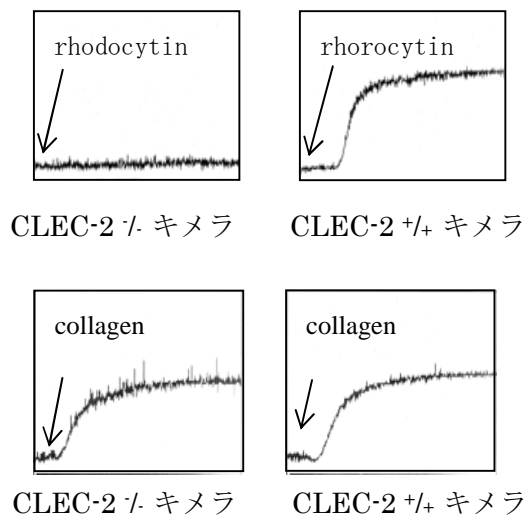


図3 各種アゴニスト刺激による骨髄キメラマウス血小板の凝集反応



- (3) 健常マウス的大腿骨から骨髄細胞を採取し、骨髄巨核球の分離精製にも成功した。今後健常マウス、CARD-9 欠損マウス、CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスからそれぞれ骨髄巨核球を採取し培養後、血小板産生の目安となる proplatelet formation 形成の差異を検討する予定である。
- (4) CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスでは、同じ操作で健常肝細胞を移植した健常骨髄キメラマウスと比べ骨髄回復後の末梢血血小板数が少ないことが判明した。このことから、血小板造血に骨髄巨核球上の CLEC-2 が一定の役割を演じている可能性が強く

示唆されている。

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)

[学会発表] (計1件)

① 井上 修、井上克枝、尾崎由基男、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年4月24日、鹿児島市城山観光ホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 修 (INOUE OSAMU)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00432154

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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

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