

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03709

研究課題名（和文）血小板のリンパ組織発生における役割：生理活性物質の運び手としての血小板

研究課題名（英文）A role of platelets in lymphoid tissue development: platelets as a cargo of bioactive substances

研究代表者

井上 克枝（Suzuki-Inoue, Katsue）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10324211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,800,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ節発生には、血小板CLEC-2と、リンパ管内皮あるいはLto細胞のPDPNの結合により、血小板が活性化されることが必要である。但し、リンパ節原基の発生にCLEC-2/PDPNは必要ではなく、Lti細胞の十分なリンパ節原基への誘導や、リンパ嚢の形成といった、リンパ節の成熟に必要と考えられた。血小板CLEC-2とリンパ管内皮PDPNの結合と、それに引き続く血小板活性化は、リンパ管と血管の分離のみでなく、正常なリンパ管構造の形成にも必要と考えられた。CLEC-2/PDPNの欠損により、リンパ管の構造に何らかの異常が生じ、リンパ球が遊出し、異所性リンパ組織を形成すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで発生学において、血球は酸素を運んだり、止血をするなど、後方支援としての役割しか考えられてこなかった。この研究成果は、血小板がリンパ節の正常な発生や、恐らく（血管との分離のみでなく）正常なリンパ管構造の発生そのものに必要であること、また血小板によるリンパ節発生促進の機序の一端を解明し、血球は能動的に生理活性物質を運び、発生を制御するという新たな役割を明らかにした。血小板という血球による個体発生制御という新たな血液学・発生学の分野を開いたともいえる。

研究成果の概要（英文）：Lymph node development requires platelet activation by binding of platelet CLEC-2 and PDPN of lymphatic endothelium or Lto cells. However, CLEC-2/PDPN was not required for lymph node primordium development, but rather for lymph node maturation, such as induction of sufficient Lti cells into the lymph node primordium and formation of lymphatic cysts. The binding of platelet CLEC-2 to lymphatic endothelial PDPN and subsequent platelet activation were required not only for the separation of lymphatic vessels from blood vessels, but also for the formation of normal lymphatic structures. We proposed that the CLEC-2/PDPN deficiency induces some abnormality in the structure of lymphatic vessels, resulting in lymphocyte release, and formation of ectopic lymphoid tissue.

研究分野：血小板生物学、血栓止血学、臨床検査医学

キーワード：血小板 ポドブラニン リンパ節発生 異所性リンパ組織 リンパ管

1. 研究開始当初の背景

私達は血小板活性化受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) と、そのリガンドが膜蛋白 Podoplanin (PDPN) であることを発見し、さらに CLEC-2 null マウスの詳細な解析から、肺およびリンパ管の発生にはリンパ管内皮の PDPN と血小板 CLEC-2 の結合により活性化された血小板から放出される TGF- β が必須であることを報告した (Blood 2018 他)。さらに CLEC-2 null マウスでは全身のリンパ節が欠損し、肺、肝臓などにリンパ球の集簇した異所性リンパ組織 (Ectopic lymphoid structures: ELS) が認められた。これらの知見を基に私達は、「胎生期に生理活性物質を満載した血小板が、CLEC-2 を介して様々な細胞の PDPN に触れ、特異的な箇所では活性物質を放出して器官発生が進行する」という全身に共通且つ、血液学・発生学上の新たな概念としての血小板による発生制御機構が存在すると考えた。本課題では、リンパ節発生をモデルとし、血小板がいつ、どこで、どのようにしてリンパ節発生を制御するかと、併せて血小板が運ぶ生理活性物質の実態を明らかにすることを目的とし、各種遺伝子欠損マウスや骨髄移植キメラマウス、CLEC-2 除去抗体等、独自のリソースと実験技術を駆使して、血小板による器官形成の共通原理に迫る。

2. 研究の目的

血小板 CLEC-2 によるリンパ組織発生機序を明らかにする。「胎生期に生理活性物質を満載した血小板が、CLEC-2 を介して様々な細胞の PDPN に触れ、特異的な箇所では活性物質を放出して発生が進行する」という血小板による発生制御機構が存在すると考えた。

3. 研究の方法 (研究開始当初の予定)

問 1 リンパ節発生

- (i) CLEC-2/PDPN 結合による血小板活性化がリンパ節発生に必要なのか? : CLEC-2 下流のシグナル分子である Syk null マウスのリンパ節の有無を確認する。
- (ii) どの細胞に発現する PDPN がリンパ節発生に必要なのか? : PDPN null マウス、リンパ管内皮、間葉系細胞特異的に PDPN を欠損した Tie2-Cre; Pdpn^{fl/fl}, Pdgfrb(or Nestin)-Cre;Pdpn^{fl/fl}、リンパ管のない Ccbe1 null マウスにリンパ節が存在するか検討する。
- (iii) 発生途上のリンパ節に血小板が存在するか? いつ存在するか? : リンパ節の凍結切片、リンパ管と血小板 (CD41) で免疫染色する。リンパ節近傍のリンパ管に血小板が存在するか whole mount 免疫染色する。
- (iv) in vitro 実験で、血小板によるリンパ節形成の機序は何か? :
 - ・ Flow cytometer で L_{Ti} 細胞 (CD45⁺, CD4⁺) と L_{To} 細胞 (ICAM-1 high VCAM-1 high CD45⁻) の PDPN の発現を確認する。
 - ・ L_{To}, L_{Ti} 細胞に影響する因子の検索: 組換え CLEC-2 活性化リンパ管内皮上清や、組換え PDPN 活性化血小板上清をアレイにかけ、対照と比べて上昇するサイトカインを見出す。
 - ・ 磁気ビーズにて分離した L_{To} 細胞、L_{Ti} 細胞に上記で見出したサイトカインを添加して、遊走や増殖をボイデンチェンバーや MTT assay 等で測定する。L_{To} 細胞の分離が不首尾の場合、細胞バンクより胸腺間葉系細胞由来のストローマ細胞株 TSt-4 を入手する。
- (v) リンパ節発生に必要な血小板由来生理活性物質は何か? CLEC-2 cKO マウスでは血小板にわずかな CLEC-2 が残存することが原因でリンパ節が形成されると考えられる。活性化血小板上清あるいは活性化リンパ管内皮上清がリンパ節発生を促進すると考え、2021 年度に in vitro 実験で見出したサイトカインに対する中和抗体を CLEC-2 cKO マウスの妊娠マウスに投与してリンパ節形成が阻害されるか検討する。

問 2 ELS

- (i) ELS はどこにいつから存在するか? ELS は全身のどこにいつから存在するか? : 胎生期から生後 8 週まで経時的に肺と肝臓の HE 染色を行い、どの時点で ELS が生じるか検討する。最も ELS が認められた時期に、腎臓、脾臓、腸管、脳についても検討する。
- (ii) ELS はどの細胞で構成されるか? B220, CD4, CD8, CD11b, Ly-6G, F4/80 など各種白血球マーカーで免疫染色する。
- (iii) PDPN/CLEC-2 結合による血小板活性化が欠如すると ELS が出現するのか? 問 1 で使用した PDPN null, 組織特異的 PDPN 欠損、CLEC-2 下流のシグナル分子 PLC 2 欠損マウスで ELS を HE 染色する。ラットリンパ管よりリンパ液を採取し、血小板の存在をフローサイトメーターなどで確認する。

- (iv) リンパ節の機能を持つか？
LPS 投与により免疫反応活性時に、ELS 増大の有無を確認する。
- (v) 髄外造血や慢性炎症が原因か？
輸血やステロイド投与で消失するか？
- (vi) リンパ管に血液が存在することが原因か？
CLEC-2 関連以外の原因でリンパ管血管不分離を示す *Spred1/2 null* マウス等で ELS の有無を検討する。また、後天的に CLEC-2 を欠損させる CLEC-2 欠損骨髓キメラマウスや CLEC-2 抗体による CLEC-2 depletion マウスでは、明らかなリンパ管血管吻合を示さないが、ELS の有無を検討する。また、ラットリンパ管に血液を輸血して ELS が形成されるか検討する。
- (vii) リンパ管機能不全が原因か？
Aspp1 欠損マウスはリンパ管機能不全で強い浮腫がある。本マウスで ELS があるか検討する。
- (viii) ELS の原因となる生理活性物質は何か？
S1P を第一候補とする。血小板スフィンゴシンキナーゼ欠損マウスで ELS が認められるか検討する。ラットリンパ管に S1P を注入して ELS が認められるか確認する。S1P ではない場合、ラットリンパ液と血漿で濃度差の大きいサイトカインでリンパ球遊走促進作用のある物質を候補とする。

4. 研究成果（実施した検討項目の結果のみ、青字で記す）

問1 リンパ節発生

(i) CLEC-2/PDPN 結合による血小板活性化がリンパ節発生に必要なのか？ :

(ii) どの細胞に発現する PDPN がリンパ節発生に必要なのか？ :

(i)(ii)まとめて、*Syk null*、*PDPN null*、リンパ管内皮特異的に PDPN を欠損した *Tie2-Cre; Pdpn^{fl/fl}* マウスのリンパ節の有無につき検討した。

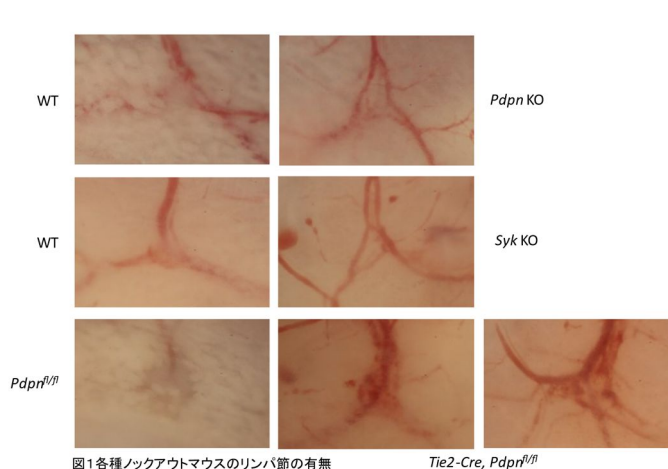


図1 各種ノックアウトマウスのリンパ節の有無

Tie2-Cre, Pdpn^{fl/fl}

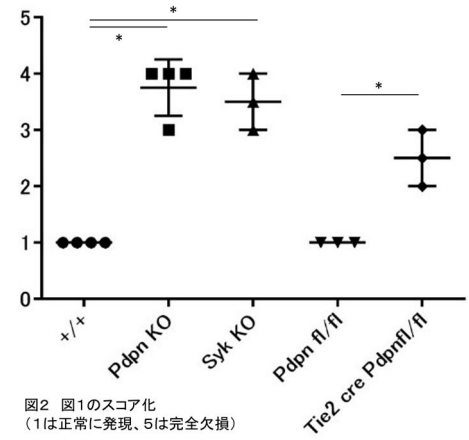


図2 図1のスコア化
(1は正常に発現、5は完全欠損)

Syk 欠損マウスと PDPN 欠損マウス

ではリンパ節がほぼ欠如していたが、低形成のリンパ節が存在する個体もあった。*Tie2 cre PDPN* マウスはリンパ管内皮のみ PDPN が欠損するマウスである。当マウスも野生型に比べて有意にリンパ節の低形成が認められたが、完全抑制ではなく、PDPN 完全欠損マウスよりに比べてわずかなリンパ節形成が認められた。以上より、リンパ管内皮の PDPN と血小板 CLEC-2 の結合により血小板側に生じる活性化シグナルがリンパ節の形成に重要と思われた。ただ、低形成のリンパ節が認められる個体もあり、CLEC-2/PDPN はリンパ節原基の形成には不要だが、その後 LTi 細胞が集積するのに必要なのではないかと考えた。

(iv) *in vitro* 実験で、血小板によるリンパ節形成の機序は何か？ :

・ Flow cytometer で LTi 細胞 (CD45+, CD4+) と LTo 細胞 (ICAM-1 high VCAM-1 high CD45-) での PDPN の発現を確認する。

胎生 15.5 日野生型マウス胎仔の鼠径リンパ節を免疫染色したところ、CD4 と重ならない PDPN 陽性細胞の集団が認められた (図4)。Lto 細胞の可能性があるが、Lto 細胞のマーカーである LT R の染色は、染色自体が上手くいかなかった (図5)。以上より、さらなる検証が必要であるが、LTo には PDPN の発現はないが、LTo には発現する可能性がある。

E15.5 WT

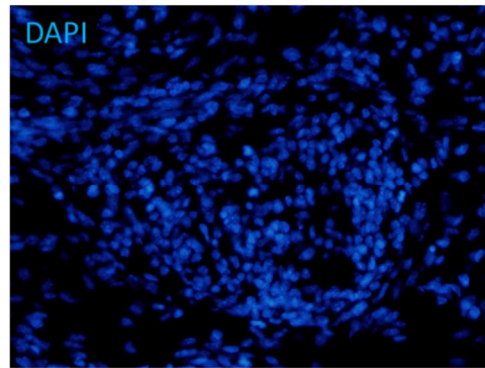
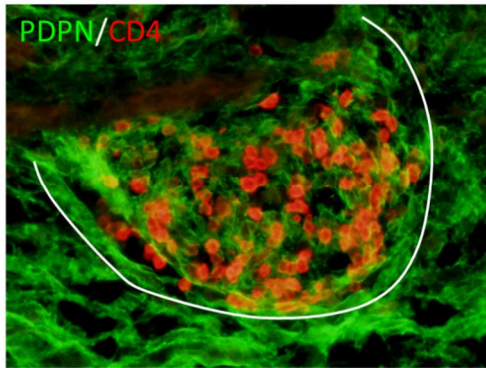
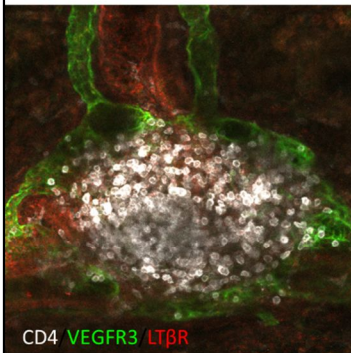


図4 鼠経リンパ節内(白線内)にCD4と重ならないPDPN陽性細胞あり(Lto cells?)

CLEC-2 欠損 E17.5 胎仔(KO)の、通常鼠経リンパ節が存在する部位の免疫染色を行い、残存するリンパ節構成成分の残存状況を検証した(図5)。KOでも Lti 細胞 (CD4+)はわずかに存在していた。また、リンパ管内皮を VEGFR3 で染色したところ、リンパ節のカプセル構造は小さく、粗雑な構造をとっていた。

E17.5 WT



E17.5 CLEC-2 KO

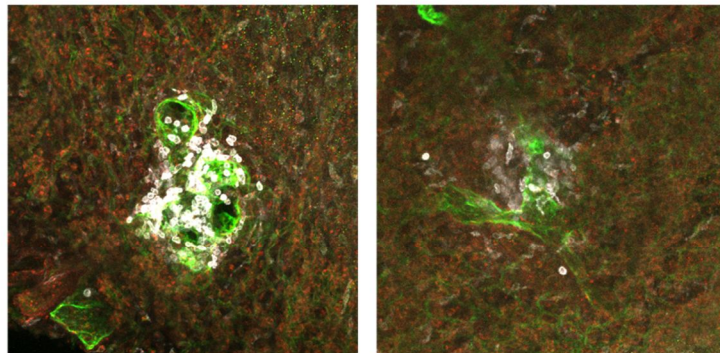


図5

- ・LTBRの染色はうまくいっていない
- ・KOでもCD4陽性細胞(Lti)はかなり少ないが集まらないわけではない
- ・KOではリンパ管内皮によるカプセル構造ができていない乱雑な構造
→Lti誘引によるリンパ節原基形成は可能だがLtoやリンパ管内皮などによる成熟段階に問題がある?
- ・Tie2cre,Pdnpfl/flはPdpn KOよりも表現型が弱い(違う可能性もある)ため、リンパ管PDPN, Lto PDPN両方が寄与している可能性大

以上、リンパ管内皮特異的 PDPN 欠損マウスには、PDPN 完全欠損マウスに比べて、わずかに低形成のリンパ節が認められたことも考え合わせると、以下の推論が成り立つ。

- ・ CLEC-2/PDPN の結合で、血小板側に発生するシグナルがリンパ節発生には必要である。
- ・ CLEC-2/PDPN が欠損しても、Lti を誘導してリンパ節原基の形成は可能だが、Lto 細胞やリンパ管内皮の PDPN と血小板の結合による成熟(リンパ囊の形成や Lti 細胞の十分な誘導)が抑制され、リンパ節原基のみ、または少量の Lti 細胞による低形成リンパ節しか形成されない。
- ・ リンパ管内皮の PDPN と Lio 細胞の PDPN の両方が、リンパ節の成熟には必要である。

問2 ELS

(i) ELSはどこにいつから存在するか?

ELSは全身のどこにいつから存在するか? : 胎生期から生後8週まで経時的に肺と肝臓のHE染色を行い、どの時点でELSが生じるか検討する。最もELSが認められた時期に、腎臓、脾臓、腸管、脳についても検討する。

肺と肝臓の異所性リンパ組織は胎生期には認められず、肺では生後2週間後から、肝臓では生後3週間後から認められた。

(ii) ELSはどの細胞で構成されるか?

B220, CD4, CD8, CD11b, Ly-6G, F4/80 など各種白血球マーカーで免疫染色する。異所性リンパ組織はほぼB細胞で構成されていた(図6)。

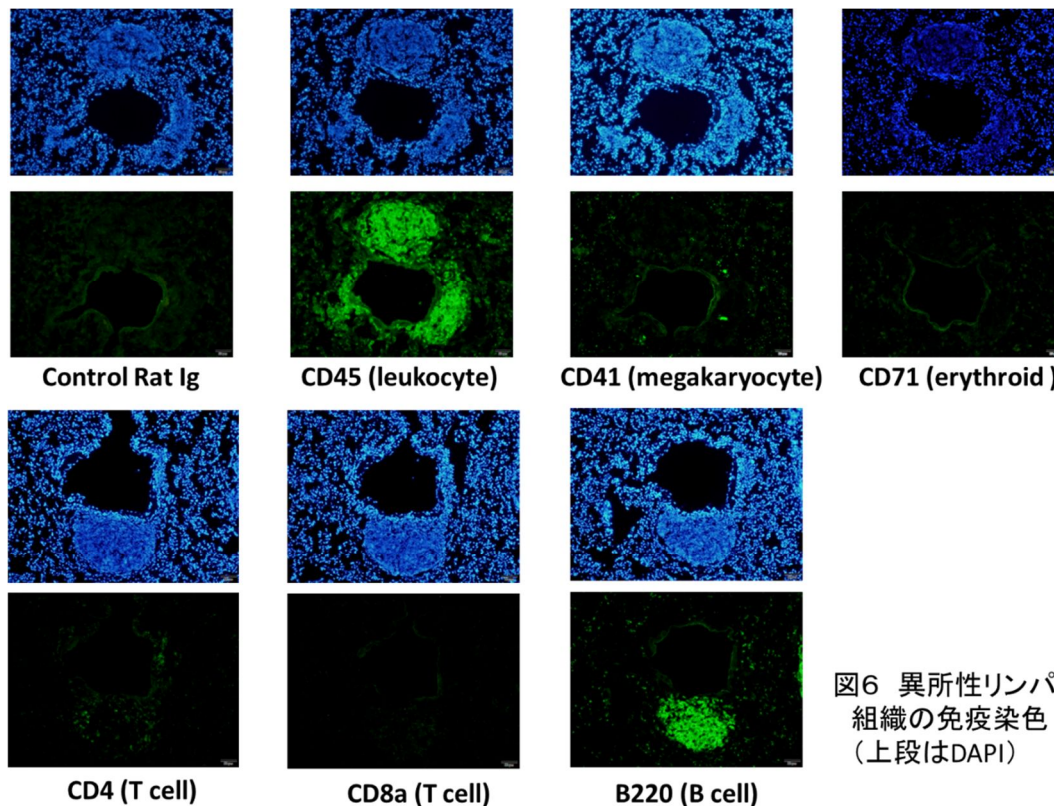


図6 異所性リンパ組織の免疫染色 (上段はDAPI)

(iii) PDPN/CLEC-2 結合による血小板活性化が欠如すると ELS が出現するのか？

問1で使用した PDPN null, 組織特異的 PDPN 欠損、CLEC-2 下流のシグナル分子 PLC 2 欠損マウスで ELS を HE 染色する。ラットリンパ管よりリンパ液を採取し、血小板の存在をフローサイトメーターなどで確認する。

異所性リンパ組織は CLEC-2 下流のシグナル分子 PLC 2 欠損マウスでも認められた。PDPN null, リンパ管特異的 PDPN 欠損マウスは出生直後致死であり、生後 2-3 週で生じる異所性リンパ組織を検証できなかった。

(vi) リンパ管に血液が存在することが原因か？

CLEC-2 関連以外の原因でリンパ管血管不分離を示す Spred1/2 null マウス等で ELS の有無を検討する。また、後天的に CLEC-2 を欠損させる CLEC-2 欠損骨髓キメラマウスや CLEC-2 抗体による CLEC-2 depletion マウスでは、明らかなリンパ管血管吻合を示さないが、ELS の有無を検討する。

放射線照射骨髓キメラマウスを作製した。野生型マウス (WT) と巨核球血小板特異的 CLEC-2 欠損マウス (CLEC-2 cKO) に致死量の放射線を照射して、WT あるいは cKO の胎仔肝臓を移植し、以下の 4 パターンのマウスを作製した。放射線照射 WT マウスに cKO 胎仔肝臓を移植 (WT cKO), WT WT, cKO cKO, cKO WT。このうち、WT cKO, WT WT は異所性リンパ組織が認められなかったが、cKO cKO, cKO WT は認められた。WT cKO では、血液の充満したリンパ節 (hemo lymph) は認められたが、リンパ管への血液の流入はわずかであった。WT WT では hemo lymph もリンパ管への血液の流入も認められなかった。

5. これまでの結果をもとにした推論

- (1) リンパ節発生： リンパ節発生には、血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮 PDPN、さらにおそらく Lto 細胞の PDPN も必要である。これらの結合で、血小板側に発生するシグナルが、正常なリンパ節発生には必要である。但し、リンパ節原基の発生に CLEC-2/PDPN は必要ではなく、Lti 細胞の十分なリンパ節原基への誘導や、リンパ嚢の形成といった、リンパ節の成熟に必要である。
- (2) 異所性リンパ組織： 血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮 PDPN の結合は、リンパ管と血管の分離のみでなく、正常なリンパ管構造の形成にも必要である。CLEC-2 あるいは PDPN の欠損により、リンパ管の構造に何らかの異常が生じ、リンパ球が遊出し、異所性リンパ組織を形成すると考えられた。PLC 2 欠損マウスのデータから、正常なリンパ管構造の形成には、おそらく両者の結合により活性化された血小板から放出される何らかの物質が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 井上克枝	4. 巻 34
2. 論文標題 血小板の基礎から臨床応用 「血小板活性化受容体CLEC-2の基礎研究から臨床応用に向けた取り組み」	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 -
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 12件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 血小板の血栓止血機能を越えた役割
3. 学会等名 第10回Platelet Immunology研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katsue Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Platelets beyond hemostasis
3. 学会等名 The 10th congress of the Asian Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 血小板活性化受容体CLEC-2の発見から展望まで：血小板の血栓止血以外の役割
3. 学会等名 第29回 東北生活習慣病研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 血小板活性化受容体CLEC-2の発見と臨床検査への応用
3. 学会等名 第59回全国国立大学臨床検査技師会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 血小板活性化受容体CLEC-2の発見と臨床検査への応用
3. 学会等名 第6回 上州越後血栓止血研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上克枝
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 Katsue Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Crosstalk Between Hemostasis and Lymphangiogenesis
3. 学会等名 International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) 2022 Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 血小板活性化受容体CLEC-2の同定と機能からその臨床応用まで
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会 キャッチアップセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 sCLEC-2 の基礎と新展開
3. 学会等名 第17回 日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 血小板活性化受容体CLEC-2の病態生理学的役割と臨床応用
3. 学会等名 血液凝固ウエブセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Katsue Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Platelets and ferric iron
3. 学会等名 Cell Biology of Megakaryocytes and Platelets, Gordon Research Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上克枝
2. 発表標題 蛇毒を利用した血小板活性化受容体CLEC-2の同定とその臨床応用
3. 学会等名 第2回 梨大医工融合セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023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	築地 長治 (Tsukiji Nagaharu) (20710362)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	
研究分担者	平島 正則 (Hirashima Masanori) (40383757)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	佐々木 知幸 (Sasaki Tomoyuki) (40739124)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	
研究分担者	白井 俊光 (Toshiaki Shirai) (50710381)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (13501)	

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