

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590520

研究課題名（和文）血中 sCLEC-2 測定法の確立と臨床応用に向けた検討：動脈血栓症の予防を目指して

研究課題名（英文）Establishment of a method for measuring plasma sCLEC-2 and its clinical application aiming to prevent arterial thrombosis

研究代表者

長田 誠（OSADA MAKOTO）

山梨大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：20569628

研究成果の概要（和文）：

本研究は、血中 soluble CLEC-2 (sCLEC-2) が生体内で血小板活性化を示すマーカーとなり、心筋梗塞や脳梗塞などの動脈血栓症の発症を予測する検査として利用できることを考え、その測定系を構築すると共に臨床応用に向けた検討を行うことを目的とした。作成した sCLEC-2 の ELISA 法は、生体内の血小板活性化を鋭敏に捉えることができ、動脈血栓症の発症を予測する検査法となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that concentration of plasma soluble CLEC-2 is a good marker for platelet activation in vivo and that it could be a useful biomarker for prevention and treatment for myocardial and cerebral infarction. We established ELISA system to measure sCLEC-2 and found that sCLEC-2 is generated upon platelet activation. Moreover, plasma sCLEC-2 is significantly increased in patients of acute coronary syndrome, suggesting that sCLEC-2 is a useful biomarker for prevention and treatment for arterial thrombosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化によるアテローム性プラークが破裂すると、露出した内皮下組織のコラーゲンに、そこに粘着した血小板が活性化して血栓を形成し、心筋梗塞、脳梗塞等の動脈血栓症となる。癌に次ぐ日本人の死因である動脈血栓症の治療・予防は重要な課題である。蛇毒

はヒトの血小板や凝固因子と結合する蛋白を多数含み、血栓止血学の発展に寄与してきた。蛇毒蛋白ロドサイチンはヒト血小板を強く活性化するが、血小板上の受容体は不明であった。我々はロドサイチンの血小板上受容体が、既知の受容体と異なる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(Suzuki-Inoue K, Blood. 2006)。CLEC-2の生体内リガンドは不明であったが、CLEC-2が血小板-巨核球に特異的に発現すること、強力な血小板活性化能を持つことを考え合わせると生体内で血栓止血に何らかの役割を果している可能性は高いと思われ、JSTの支援を受けて国際特許出願に至っている(米、英、独、仏、日)。

腫瘍細胞に発現するポドプラニンという膜蛋白は、血小板凝集を惹起して癌の転移を促進する(Kato Y, J. Biol. Chem. 2003)ため、癌転移抑制薬の有望なターゲットとされていたが、血小板側の受容体は不明であった。我々はCLEC-2がポドプラニン受容体であることを見出した(Suzuki-Inoue K, J. Biol. Chem. 2007)。

我々は世界に先駆けてCLEC-2欠損マウスを作製した。CLEC-2欠損血小板は、予想通りロドサイチンにより凝集しなかった。さらにコラーゲンをコートしたキャピラリーに全血を流して血栓形成を観察するという、生体内の病的血栓形成を模した実験系では、CLEC-2欠損マウスの血液は、コラーゲン上での血栓形成が抑制された。しかしCLEC-2はコラーゲンに結合せず、CLEC-2が直接血小板上の何らかの膜蛋白と結合して凝集塊を安定化すると考えた。我々はCLEC-2組換蛋白が刺激後の血小板に結合することを見出した。CLEC-2は、様々な血小板活性化物質で惹起された血小板凝集塊を安定化する、広く血栓止血に関わる分子といえる。

血小板上のCLEC-2リガンドが何であるか不明であるが、我々は、このCLEC-2組換蛋白が、動脈硬化のプラーク部位にも結合することを見出した。このことは、プラーク破裂の際に血小板上CLEC-2が、プラーク中のリガンドに結合して、病的血栓形成をもたらすことを示唆しており、発症にも関与していることを示す。CLEC-2はこうしてできた血栓を安定化する作用もあり、動脈血栓症発症に深く関わる分子といえる。

我々は、血小板が活性化を受けるとCLEC-2が血小板から遊離するという*in vitro*データを得た。これより、血小板が活性化され、心筋梗塞や脳梗塞の発症準備状態にあるとき、生体内でも遊離CLEC-2(soluble CLEC-2)が増え、これを測定することで、動脈血栓症準備状態を検出できると考えた。現在、 β -トロンボグロブリン(β -TG)やPF4が血小板活性化を測る検査として保険算定されているが、これらは採血や遠心分離の過程で容易に放出され、本当に生体内での血小板活性化を示しているのか、信頼性に乏しい。soluble CLEC-2 (sCLEC-2)は血小板表面からの遊離であり、検体準備過程の人為操作により、遊離してしまう可能性は少ない。これより血中sCLEC-2の測定が動脈血栓症の予防

に有用と考え、臨床応用を目指したELISAによる測定系を構築する。

2. 研究の目的

我々の研究室では、新規血小板活性化受容体CLEC-2を同定した。血栓止血に関わるCLEC-2の生体内リガンドは不明であるが、その強力な血小板活性化能と血小板・巨核球に特異的な発現より、血栓止血に関与していると予想され、JSTの支援を受けて国際特許出願に至っている。我々は、CLEC-2のリガンドがプラーク部位に認められること、血小板が活性化されると、CLEC-2が血小板より遊離することを見出した。これより血中sCLEC-2が生体内で血小板活性化を示すマーカーとなり、心筋梗塞や脳梗塞などの動脈血栓症の発症を予測する検査として利用できると考え、その測定系を構築すると共に臨床応用に向けた検討を行う。

3. 研究の方法

(1) sCLEC-2測定系の構築：

①抗ヒトCLEC-2モノクローナル抗体の作成：human CLEC-2とrabbit IgG Fcのキメラ蛋白(hCLEC-2-rFc2)を抗原としたマウスモノクローナル抗体を作製する。

②ELISAの構築：組み合わせの検討：上記で得られたモノクローナル抗体のうち、血小板やCLEC-2発現培養細胞を使用したフローサイトメーターで、native CLEC-2を認識する抗体をスクリーニングする。それらの抗体を2種類使用してサンドイッチELISAの系を構築するが、得られた抗体すべての組み合わせを検討する。スクリーニング用抗原としては、CLEC-2リコンビナント、血小板lysate、shedding sample、血小板を種々の血小板活性化物質で活性化した後で採取した血清を使用する。

(2)臨床応用を目指した基礎検討：適当な採血管の選定、患者血漿での検討、正常値の設定

①心筋梗塞患者血漿での検討：患者血漿でsCLEC-2の上昇が認められるか、上記のELISAキットを用いて検討する。これらの検討は、山梨大学医学部倫理委員会にて承認された「soluble CLEC-2の測定に関する臨床研究(糖尿病、心筋梗塞、脳梗塞)」の範囲内で行った。

②正常値の設定：本学の職員健康診断時の検体を用いて正常値を設定する。また、この際本検査に適当な採血管の選定も同時に行う。

(3)*in vitro*でsoluble CLEC-2発生のメカニズムを検討する：これまでの検討で、血小板が活性化されるとCLEC-2が血小板より遊離するというデータを得た。

- ① 遊離した CLEC-2 (sCLEC-2) は、活性化血小板より shedding を受けて血小板から遊離するのか、活性化血小板より産生されるマイクロパーティクル上に CLEC-2 が認められるのか、検討する。
- ② どの血小板活性化物質 (トロンビン、ADP、コラーゲン、ロドサイチンなど) で sCLEC-2 が発生するのか検討する。
- ③ shedding が起きているとしたら、CLEC-2 を切断する酵素が何か決定する。

4. 研究成果

抗ヒト CLEC-2 抗体を用いた ELISA 法の開発は、human CLEC-2-rabbit IgG Fc のリコンビナントキメラ蛋白を細胞外に分泌するように IL2 のシグナルペプチドを結合させたプラスミドを COS7 細胞に transient transfection し、精製、マウスへの免疫、抗体価チェック、細胞融合、クローニングにて抗 CLEC-2 抗体を作製後、20 種類の抗体の中から最適な二種類の抗体の組み合わせを決定し、血中 sCLEC-2 測定キットを構築した。しかし、血漿成分の影響を受ける非特異反応が認められたので、それぞれの抗体について F(ab')₂ 化を実施し ELISA 系を再構築したところ、非特異反応が解消された。新規に作製した ELISA 系を用いて、リコンビナント CLEC-2 を抗原とした検量線を作成し血漿検体を測定した。直線性は、0.09~10 ng/ml まで直線性を認め、平均値±2SD で求めた最小検出感度は、50 pg/ml であり、添加回収試験は±20%と良好であった。また、職員 41 例の血漿検体の平均値±SD は、63±8 pg/ml であった。非狭窄患者群と急性冠症候群患者群にて sCLEC-2 測定を実施した結果、急性冠症候群患者群にて有意な高値を認めた (p < 0.05)。今回作成した ELISA 系は、再現性、直線性に優れており、生体内での血小板活性化を知る有用な測定系が構築できたと考える。

生体内での血小板活性化を検討する際、採血時に血小板が活性化されるため、その影響を排除しなければならない。PF4, β-TG 測定法での採血検体は、採血の影響が出ないように特殊な採血管を用いて煩雑な処理を行っている。この採血検体と日常用いられている EDTA、クエン酸の真空採血管を用いた検体について sCLEC-2 測定を実施した結果、PF4, β-TG 測定検体と EDTA、クエン酸の真空採血管検体の間に有意差は認めなかった。以後の検討は、2 ml EDTA 真空採血管を用い、3000 r. p. m. 10 分遠心後の上清 250 μl を測定検体として使用した。

sCLEC-2 発生のメカニズムは 2 通りあり、ひとつは蛋白そのものがメタロプロテアーゼにより分解される場合、もう一つは膜の一部が千切れてできるマイクロパーティクル

上に乗る形で CLEC-2 が遊離する場合である。洗浄血小板をトロンビンで刺激した活性化血小板上清をウエスタンブロットしたところ、CLEC-2 が認められた。活性化血小板上清を遠心した結果、ペレットと上清に CLEC-2 が認められた。これより sCLEC-2 発生のメカニズムは蛋白の分解とマイクロパーティクルの両方が存在することが明らかとなった。

洗浄血小板を CLEC-2 アゴニストのロドサイチン、PAR アゴニストのトロンビン、GPVI アゴニストの polyPHG、GPIIb/IIIa アゴニストの VWF/ristocetin でそれぞれ刺激すると、いずれのアゴニストを用いた血小板刺激でも sCLEC-2 の生成が認められた。

CLEC-2 を分解する酵素については、MMP-2, MMP-9 が血小板に存在し、血小板活性化にもなって放出されるとの報告があるため、これらのインヒビターを用いて実験したところ sCLEC-2 の放出が抑制された。しかし、リコンビナント CLEC-2 と血小板を混ぜた分解実験では、リコンビナント CLEC-2 の分解は明瞭に確認されず、細胞内に存在する MMP-9 などの酵素による sCLEC-2 の分解による産生機序は不明であった。また、血小板には ADAM10 と 17 が発現していることが知られている。ADAM ファミリーを活性化する NEM で血小板を処理すると、sCLEC-2 の放出が認められた。ミトコンドリアの脱共役剤である CCCP は ADAM17 を活性化することが知られているが、CCCP で血小板を処理しても sCLEC-2 放出は認められなかった。また、MMP-2 阻害剤でも sCLEC-2 の放出の抑制を認めたことから、ADAM10, MMP-2 が sCLEC-2 放出の責任酵素ではないかと考えられる。

本研究結果から、血小板活性化による sCLEC-2 の発生は、蛋白が分解されたものとマイクロパーティクル上に存在することが明らかとなった。マイクロパーティクル上の CLEC-2 は、生体内においてさらなる作用を示すかもしれない、今後の検討が必要であると考えられる。sCLEC-2 測定キットは、再現性、直線性に優れた検査法であり、動脈血拴症の発症を予測する検査法となりうると思われた。今後、動脈血拴症以外の疾患においても sCLEC-2 測定を実施し、臨床的意義を確認して行きたいと考えている。また、sCLEC-2 測定法の迅速測定を目的として、汎用測定機器による自動化を検討して行きたいと考えている。

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 2 件)

- ① 長田 誠, 井上 克枝, 井上 修, 尾崎 由基男. 血小板 CLEC-2 のリンパ管発生での

役割と臨床応用. 臨床病理、査読無、
Vol.61, 4, 2013, 318-327.

- ② Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Platelet Activation Receptor CLEC-2 Regulates Blood/Lymphatic Vessel Separation by Inhibiting Proliferation, Migration, and Tube Formation of Lymphatic Endothelial Cells. J Biol Chem. 査読有, 287(26), 2012, 2241-2252.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 長田 誠、血小板 CLEC-2 のリンハ・管発生での役割。日本臨床検査医学会学術集会、2012 年 12 月 1 日、国立京都国際会館 (京都府)
- ② 井上 修、可溶性 CLEC-2 の解析。第 34 回 日本血栓止血学会学術集会、2012 年 6 月 8 日、京王プラザホテル (東京都)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)
特許出願中のため、非公開。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 誠 (OSADA MAKOTO)
山梨大学・医学部附属病院・臨床検査技師
研究者番号：20569628

(2) 研究分担者

井上 修 (INOUE OSAMU)
山梨大学・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・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：30134539
井上 克枝 (INOUE KATSUE)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：10324211
(H22 年度)

(3) 連携研究者

なし