

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860723

研究課題名(和文) 巨核球・赤芽球の成熟に対するCLEC-2の病態生理学的作用の解析

研究課題名(英文) Pathophysiological function of CLEC-2 for megakaryocyte and erythrocyte development

研究代表者

田村 彰吾 (Tamura, Shogo)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・助教

研究者番号：60722626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)はリンパ管内皮細胞などに発現する podoplanin (PDPN)をリガンドとする血小板活性化受容体である。本研究ではCLEC-2の血小板・巨核球造血に対する作用を解析した。CLEC-2とPDPNの結合は直接的に巨核球前駆細胞の自己増殖を促進することが明らかになった。我々は骨髓細動脈の周皮細胞にPDPN陽性細胞、BM FRC-like cellを同定した。骨髓細動脈近傍にはBM FRC-like cellにより構成されるCLEC-2/PDPN依存的な新たな血小板・巨核球造血微小環境が存在することを見出した。

研究成果の概要(英文)：C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) is a platelet activating receptor which binds to podoplanin (PDPN). In this study, we investigated a physiological function of CLEC-2 and/or PDPN for megakaryo/thrombopoiesis. The interaction of CLEC-2 with PDPN directly accelerated expansion of megakaryocyte progenitors. We also newly identified PDPN expressing bone marrow stromal cells adjacent to arterioles in the bone marrow, and termed as BM FRC-like cells. Now, we propose that BM FRC-like cells provide a novel CLEC-2/PDPN dependent megakaryopoietic microenvironment in the vicinity of arterioles in the bone marrow.

研究分野：医歯薬学

キーワード：巨核球 CLEC-2 骨髓微小環境

1. 研究開始当初の背景

C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)は血小板凝集を惹起する蛇毒タンパク rhodocytin の受容体として 2006 年に山梨大学の井上らによって同定された血小板活性化受容体である (Blood, 2006)。CLEC-2 の生体内リガンドは翌年の 2010 年に podoplanin (PDPN) が、同じく井上らによって同定されている (JBC, 2007)。PDPN との相互作用による血小板 CLEC-2 の生理機能については、血小板活性化による血栓形成促進、胎生期の血管・リンパ管分離の促進、リンパ節高内皮細静脈の integrity 維持、腫瘍の転移・増殖への関与などが報告されている。しかしながら、これまでに CLEC-2 の血球造血に関する知見は皆無であった。

2. 研究の目的

CLEC-2 KO マウスは血小板と赤血球数が減少する事が報告されている (Nat Biotech, 2010)。これまでの検討により、我々は新たに、CLEC-2 が巨核球前駆細胞で既に発現している事、巨核球・血小板特異的 CLEC-2 KO マウスで巨核球前駆細胞が減少している事、赤血球系細胞にも CLEC-2 が発現している事を見出した。これらは CLEC-2 が巨核球・赤血球造血に関与する事を強く示唆するものである。そこで本研究は巨核球の分化成熟における CLEC-2 の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス

本研究は、巨核球血小板特異的 CLEC-2 ノックアウト (conditional knock-out: cKO)マウスとして、*Pf4-Cre, Clec1b^{flox/flox}* マウスを用いて行った。

巨核球造血への CLEC-2 の作用 (clonal expansion への影響)

巨核球前駆細胞の clonal expansion は MegaCult-C を用いた semisolid collagen culture による colony formation assay で評価した。

骨髄内 PDPN 陽性細胞の探索

大腿骨骨髄の凍結組織切片に対し、免疫組織化学染色で PDPN 陽性細胞と巨核球(CD41 陽性)系細胞の局在を蛍光顕微鏡下で観察した。その他、骨髄間質細胞のマーカー抗原として、CD31(血管内皮細胞)、Sca-1 (骨髄細動脈内皮細胞)の免疫染色を実施した。

巨核球造血への CLEC-2 の作用 (巨核球成熟度への影響)

巨核球の成熟度に対する CLEC-2 の解析は proplatelet formation (PPF)で行った。PPF assay は E13.5 の胎仔肝臓細胞を対象に行い、TPO 存在下で巨核球へ分化させた細胞の proplatelet 形成率を光学顕微鏡でカウントすることで実施した。

4. 研究成果

CLEC-2 と PDPN の相互作用は巨核球系細胞の clonal expansion を促進する

CLEC-2 WT と CLEC-2 cKO マウスの大腿骨骨髄に存在する巨核球数を比較したところ、CLEC-2 cKO マウスにおいて、巨核球系細胞、特に CD41 陽性 CD42b 陰性の未熟巨核球の減少が認められた (図 1A)。In vitro における colony expansion assay では、TPO 刺激だけでは CLEC-2 WT と CLEC-2 cKO 巨核球のコロニー形成数は変わらなかったが、CLEC-2 のリガンドである PDPN のリコンビナントを添加した条件では、CLEC-2 WT 巨核球のコロニー形成増強が認められた (図 1B)。この結果から、巨核球 CLEC-2 の刺激は巨核球前駆細胞の clonal expansion を促進することがわかった。

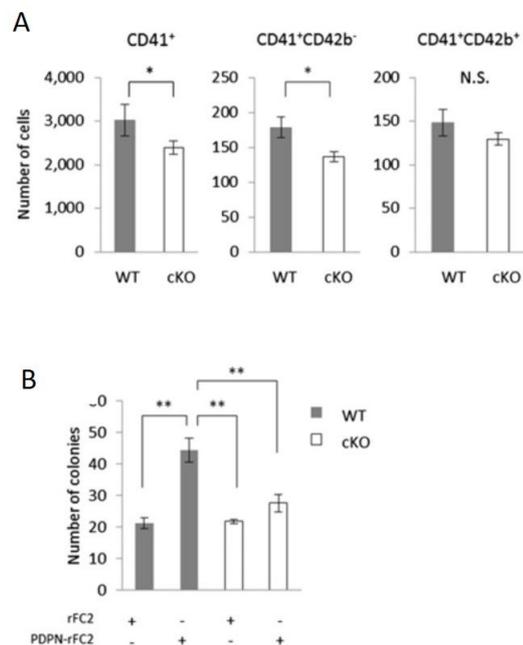


図 1. PDPN による巨核球 CLEC-2 刺激は巨核球前駆細胞の自己増殖を促進する. A) CLEC-2 WT, cKO マウス大腿骨骨髄の巨核球系細胞数. B) MegaCult-C colony expansion assay. rFC2, rabbit immunoglobulin FC2 domain. PDPN-rFC2, podoplanin-rabbit immunoglobulin FC2 domain fusion recombinant protein.

骨髄における PDPN 陽性間質細胞の同定

CLEC-2 WT マウス的大腿骨凍結切片を抗 PDPN 抗体で免疫染色することで、骨髄内の PDPN 陽性細胞を探索した。骨髄細動脈の周囲細胞が PDPN 陽性であることがわかり、さらにその近傍に巨核球系細胞のコロニーが局在していることが明らかになった (図 2)。PDPN 陽性細動脈周囲細胞の immunophenotype は、我々が検討した範囲ではリンパ節に存在する fibroblastic reticular cell (FRC)と一致しており (図 3)、骨髄細動脈 PDPN 陽性細胞を BM FRC-like cell と名付けた。これらの知見は傍細動脈領域において

PDPN 陽性間質細胞が巨核球造血に関与していることを示唆するものであった。

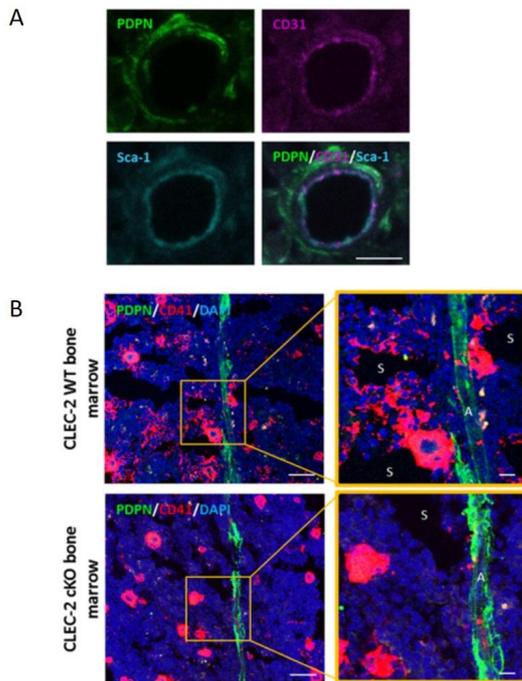


図 2. マウス大腿骨髄免疫組織化学染色結果. A) 骨髄細動脈の周囲細胞は PDPN 陽性である. 細動脈血管内皮細胞は CD31 陽性 Sca-1 陽性である. B) 骨髄細動脈近傍における巨核球系細胞のコロニー形成像.

	LN FRCs ^{11, 13, 14}	BM PDPN ⁺ stromal cells
PDPN	(+)	(+)
CD45	(-)	(-)
LYVE1	(-)	(-)
CD31	(-)	(-)
CD35	(-)	(-)
CD44	(+)	(+)
CD106	(+)	(+)
CD140a	(+)	(+)

図 3. 骨髄 PDPN 陽性間質細胞の immunophenotyping 結果

BM FRC-like cell は巨核球系細胞のコロニー形成を促進する

BM FRC-like cell を含む骨髄間質細胞を *in vitro* で分離・培養する方法を確立し、巨核球前駆細胞との共培養を行った。BM FRC-like cell は CLEC-2 WT 巨核球のコロニー形成を促進したが、CLEC-2 cKO 巨核球ではその作用は認められなかった (図 4)。BM FRC-like cell と WT 巨核球の共培養に抗 PDPN 中和抗体を添加すると巨核球コロニーの形成が減弱した。以上の結果から、BM FRC-like cell は CLEC-2 と PDPN の結合 (CLEC-2/PDPN

axis) によって巨核球のコロニー形成を促進することが明らかになった。

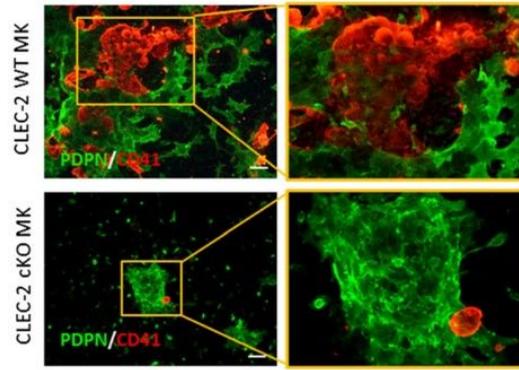


図 4. BM FRC-like cell と巨核球前駆細胞の共培養結果.

BM FRC-like cell は CCL5 を放出することで成熟巨核球の血小板産生も促進する

BM FRC-like cell と巨核球の共培養では、巨核球コロニー形成だけではなく、成熟巨核球の血小板産生 (proplatelet formation: PPF) も促進されていた。巨核球への PDPN リコンビナントの添加は PPF を促進することではなく、巨核球における CLEC-2 刺激 (活性化) が直接 PPF を促進しているわけではないことがわかった。すなわち、共培養における血小板産生促進作用は BM FRC-like cell による別の経路でもたらされていると考えられた。そこで、BM FRC-like cell を CLEC-2 リコンビナントで刺激し、その培養上清 (conditioned medium) を巨核球に添加したところ、PPF の明らかな促進が認められた (図 5)。この結果から、BM FRC-like cell の PDPN が CLEC-2 と結合すると、BM FRC-like cell が何らかの PPF 促進因子を放出することが考えられた。

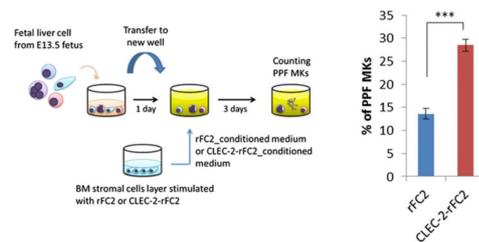


図 5. BM FRC-like cell conditioned medium による巨核球の PPF 促進.

BM FRC-like cell が放出する PPF 促進因子を同定するために、conditioned medium について Proteome Profiler Mouse Cytokine Array を行った。その結果、CXCL10, CXCL2, CCL5 が候補因子として挙げられた。PPF assay に各因子のリコンビナントを供し、PPF 促進作用を検討したところ、CCL5 (RANTES) が PPF 促進因子として同定された (図 6)。

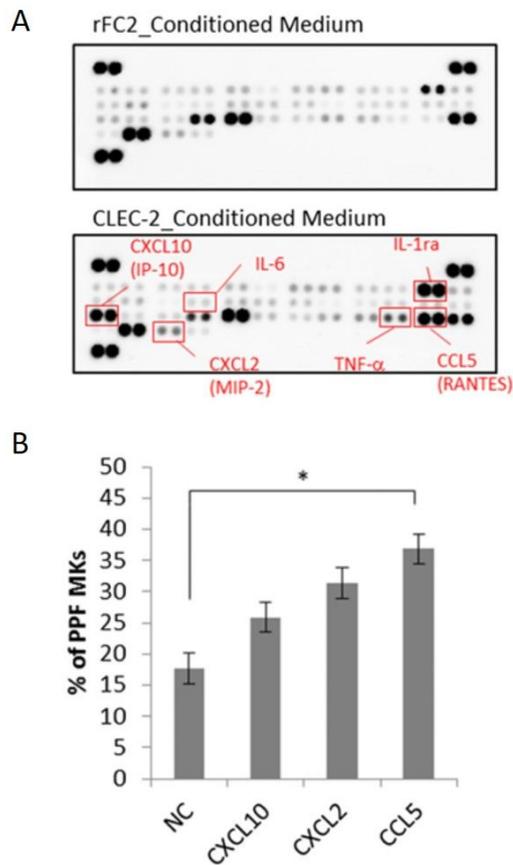


図 6. BM FRC-like cell conditioned medium の PPF 促進作用は CCL5 によるものと同等。A) Proteome Profiler Mouse Cytokine Array の結果。B) 候補ケモカインを供した PPF assay 結果。

骨髓細動脈近傍において BM FRC-like cell は CLEC-2/PDPN 依存的な血小板・巨核球造血の場、すなわち微小環境を提供していると考えられた。これまで、巨核球の増殖は骨髓内の骨周辺部分で起こり、類洞周辺に移動して血小板造血が起こると考えられてきた。本研究によって、我々は骨髓細動脈近傍でも BM FRC-like cell により構成される CLEC-2/PDPN 依存的な新たな血小板・巨核球造血微小環境が存在することを提唱した。

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(査読有)](計9件)

Furuya F, Ishii T, Tamura S, Takahashi K, Kobayashi H, Ichijo M, et al. The ligand-bound thyroid hormone receptor in macrophages ameliorates kidney injury via inhibition of nuclear factor-κB activities. *Sci Rep.* 2017 Mar 8;7(March):43960.

Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, et al. CLEC-2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing

mice. *J Thromb Haemost.* 2016 Dec 27;38(1):42–9.

Ozaki Y, Tamura S, Suzuki-Inoue K. New horizon in platelet function: with special reference to a recently-found molecule, CLEC-2. *Thromb J. Thrombosis Journal*; 2016;14(Suppl 1):27.

Takagi Y, Murata M, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Tamura S, et al. Missense mutations in the gene encoding prothrombin corresponding to Arg596 cause antithrombin resistance and thrombomodulin resistance. *Thromb Haemost.* 2016 Sep 8;116(6):1–10.

Kozuka T, Tamura S, Kawamura N, Nakata Y, Hasebe R, Makiyama A, et al. Progesterin isoforms provide different levels of protein S expression in HepG2 cells. *Thromb Res.* 2016 Sep;145:40–5.

Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, et al. Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. *Blood.* 2016 Mar 31;127(13):1701–10.

Masuda Y, Tamura S, Matsuno K, Nagasawa A, Hayasaka K, Shimizu C, et al. Diverse CD36 expression among Japanese population: defective CD36 mutations cause platelet and monocyte CD36 reductions in not only deficient but also normal phenotype subjects. *Thromb Res.* 2015;135(5):951–7.

Kazama F, Nakamura J, Osada M, Inoue O, Oosawa M, Tamura S, et al. Measurement of soluble C-type lectin-like receptor 2 in human plasma. *Platelets.* 2015;28(8):711–9.

Moriyama T, Tamura S, Nakano K, Otsuka K, Shigemura M, Honma N. Laboratory and clinical features of abnormal macroenzymes found in human sera. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jun;1854(6):658–67.

[雑誌論文(査読無)](計2件)

田村彰吾, 増田裕弥, 松野一彦, 尾崎由基男. CD36 の発現多様性 欠損症および健常者の発現分子数のバラつき. *検査と技術.* 2015; 43:186-188

田村彰吾, 尾崎由基男, 小嶋哲人, 井上克枝. 血小板・巨核球造血微小環境を構成する骨髓間質細胞. *日本血栓止血学会誌.* 2017;28(1):59–63.

[学会発表](計14件)

Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Ozaki Y. A novel function of CLEC-2 in megakaryopoiesis: CLEC-2/PDPN microenvironment facilitates expansion and

maturation of megakaryocytes. XXV congress of The international society on Thrombosis and Hemostasis. 2015年6月25日

Masuda Y, Tamura S, Matsuno K, Hayasaka K, Shimizu C, Moriyama T. The defective CD36 gene mutations cause a molecular expression diversity on platelets and monocytes even in non-deficient phenotype population. XXV congress of The international society on Thrombosis and Hemostasis. 2015年6月24日

Sasaki T, Tamura S, Shirai T, Tsukiji N, Satoh K, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Construction of expression system for biologically functional recombinant rhodocytin. XXV congress of The international society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH2015). 2015年6月23日

Tsukiji N, Inoue O, Tamura S, Shirai T, Sasaki T, Satoh K, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Unexpected role of platelets in lung development depending on a platelet activation receptor, CLEC-2. XXV congress of The international society on Thrombosis and Hemostasis. 2015年6月22日

佐々木知幸, 田村彰吾, 白井俊光, 築地長治, 佐藤金夫, 井上克枝, 尾崎由基男. 血小板活性化受容体 CLEC-2 結合蛇毒ロドサイチンの機能を保持したリコンビナント体発現系の構築. 第37回日本血栓止血学会学術集会. 2015年5月23日

築地長治, 井上修, 田村彰吾, 白井俊光, 佐々木知幸, 佐藤金夫, 井上克枝, 尾崎由基男. 血小板は肺発生に必須である: 血小板 CLEC-2 の機能解析. 第37回日本血栓止血学会学術集会. 2015年5月23日

井上修, 長田誠, 中村純也, 風間文智, 横道洋司, 土肥智貴, 金子誠, 蔵野信, 大澤満, 田村彰吾, 佐藤金夫, 高野勝弘, 宮内克己, 代田浩之, 矢富裕, 井上克枝, 尾崎由基男. 可溶性 CLEC-2 は血小板活性化に伴って生成される: 可溶性 GPVI との比較検討. 第37回日本血栓止血学会学術集会. 2015年5月23日

田村彰吾, 井上克枝, 白井俊光, 築地長治, 佐々木知幸, 佐藤金夫, 尾崎由基男. CLEC-2/PDPN axis による骨髓内微小環境の可能性: CLEC-2 は巨核球造血を促進させる. 第37回日本血栓止血学会学術集会. 2015年5月23日

Tamura S, Suzuki-Inoue K, Shirai T, Tsukiji N, Satoh K, Ozaki Y. A novel function of CLEC-2 for megakaryopoiesis: CLEC-2/PDPN niche promotes megakaryocyte expansion. Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer Signal Network in Tumor

Microenvironment. 2015年1月12日

増田裕弥, 田村彰吾, 松野一彦, 早坂光司, 渋谷斉, 清水力, 森山隆則. 血小板・単球における CD36 分子発現の多様性と遺伝子変異との関連 (口頭発表). 第61回日本臨床検査医学会学術集会. 2014年11月23日

田村彰吾, 井上克枝, 白井俊光, 築地長治, 佐藤金夫, 尾崎由基男. 巨核球造血における CLEC-2 の病態生理学的作用の解析 (口頭発表). 第61回日本臨床検査医学会学術集会. 2014年11月23日

Satoh K, Hirayama T, Ohta M, Tamura S, Ozaki Y. Vacuolating cytotoxin A (VacA) of Helicobacter Pylori binds to Multimerin1 (Poster presentation). The 3rd World Congress on Controversies in Hematology. 2014年9月12日

増田裕弥, 田村彰吾, 長澤あゆみ, 松野一彦, 進藤由衣香, 早坂光司, 渋谷 斉, 清水 力, 尾崎由基男, 森山隆則. 血小板における CD36 分子発現量の多様性と一塩基多型(C268T)の関連 (口頭発表). 第36回日本血栓止血学会学術集会. 2014年5月30日

Nagaharu Tsukiji, Osamu Inoue, Shogo Tamura, Toshiaki Shirai, Katue Suzuki-Inoue, Yukio Ozaki. Unexpected role of blood platelets in lung development depending on a novel platelet activation receptor, CLEC-2 (血小板が正常な肺発生を可能にする -新規血小板活性化受容体 CLEC-2 の機能解析- (口頭およびポスター発表). 第47回日本発生生物学会. 2014年5月27日

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科病態解析学講座血液・遺伝子研究室 HP

http://square.umin.ac.jp/bloodlab/Hematol_%26_Gene_Res_Lab/Welcome.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村彰吾 (TAMURA Shogo)

機関名: 名古屋大学

部局名: 医学系研究科 (保健)

職名: 助教

研究者番号: 60722626

(2)研究協力者

井上克枝 (Suzuki-Inoue Katsue)

(3)研究協力者

尾崎由基男 (Ozaki Yukio)

(4)研究協力者

築地長治 (Tsukiji Nagaharu)

(5)研究協力者
白井俊光 (Shirai Toshiaki)