



【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- ・ [診療ガイドライン](#)
- ・ [研修医のお役立ち論文コンテンツ](#)
- ・ [用語集](#)
- ・ [1\) 血栓止血の臨床-研修のために【第2版】（前編）](#)
2018年29巻6号 p. 537-764, 2018.
 - ・ オーバービュー 1編
 - ・ 検査 14編
 - ・ 血小板・血管の異常による出血性疾患 12編
 - ・ 凝固・線溶系異常による出血性疾患 17編
 - ・ 出血性疾患の治療（血液製剤など） 8編
- ・ [2\) 血栓止血の臨床-研修のために【第2版】（後編）](#)
2019年30巻1号 p. 3-247, 2019.
 - ・ 血栓性疾患 17編
 - ・ 血栓性疾患の治療薬 13編
 - ・ 血小板減少を伴う血栓性疾患 18編

本編は次ページより掲載しております。

CLEC-2/podoplanin シグナルを介した 血小板による肺発生メカニズム

築地長治*

Platelets play an essential role in murine lung development through CLEC-2/podoplanin interaction

Nagaharu TSUKIJI

Key words: CLEC-2, podoplanin, lung development, TGF- β

1. はじめに

血小板研究は血栓止血に留まらず、特にここ10年ほどの間にがん、炎症、免疫、再生など多方面に広がりを見せている。この多面的な機能発現の基盤となるシステムの柱の一つが血小板活性化受容体とその活性化により放出される生理活性物質である。特に血小板の α 顆粒にはTGF- β やPDGF、VEGF、FGFなど多種多様な成長因子が多量に含まれており、様々な病態生理学的機能を持つと考えられている。一方、血小板活性化受容体はトロンビン受容体(PAR)、ADP受容体(P2Y)、コラーゲン受容体(GPVI)等多岐にわたり、それぞれが異なるリガンドとの結合により血小板を活性化する。当講座井上らにより発見された血小板活性化受容体C-type lectin-like receptor-2(CLEC-2、マウス遺伝子名*Clec1b*)はリガンドpodoplaninにより活性化される。例えば胎生期リンパ管-血管分離やリンパ節の高内皮静脈透過性制御、がん転移などは血小板CLEC-2と標的細胞のpodoplaninの結合が発端となる¹⁾。

詳細は後述するがCLEC-2欠損により影響を受ける肺の発生段階はcanalicular phaseからsaccular phase(マウス胎生16.5日から出生当日)に相当し、

単純な管腔構造から葡萄の房状の肺嚢が形成される大きな形態的变化を伴う時期である。その過程で重要な役割を果たすのがalveolar duct myofibroblast(ad-MYF)という α -smooth muscle actin(α -SMA)陽性間質細胞で、コラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリクスを分泌することで肺に強度と柔軟性を与える。これまで臓器発生は、当該原基内あるいは周囲組織との相互作用によって進み、血液の役割は心臓発生における血流せん断力といった例外を除いて栄養や酸素の供給といった基本的な物質循環のみと考えられてきた。今回われわれは、CLEC-2欠損マウスの出生直後致死という表現型を端緒に詳細な解析を進め、血小板が肺発生に必須の役割を果たすことを発見した²⁾。本稿ではその詳細について解説したい。

2. CLEC-2欠損による肺発生異常

全身性CLEC-2欠損(CLEC-2欠損、*Clec1b*^{-/-})新生仔はチアノーゼを示し、出生後1時間以内にすべて死亡する(図1A)。CLEC-2欠損肺には全く空気が取り込まれていなかったが(図1B)、呼吸運動は正常であったことから、肺発生異常が推察された。CLEC-2欠損胎仔肺について発生段階を遡って観察すると、胎生17.5日から明瞭な肺葉および肺嚢の形態異常を認めた(図1C、D)。さらに通常肺胞壁内に形成される弾性線維がCLEC-2欠損肺ではほとんど認められなかった(図1E)。

*責任者連絡先:

山梨大学大学院総合研究部医学域臨床医学系臨床検査医学
〒409-3898 山梨県中央市下河東1110
Tel: 055-273-9884, Fax: 055-273-6713
E-mail: ntsukiji@yamanashi.ac.jp

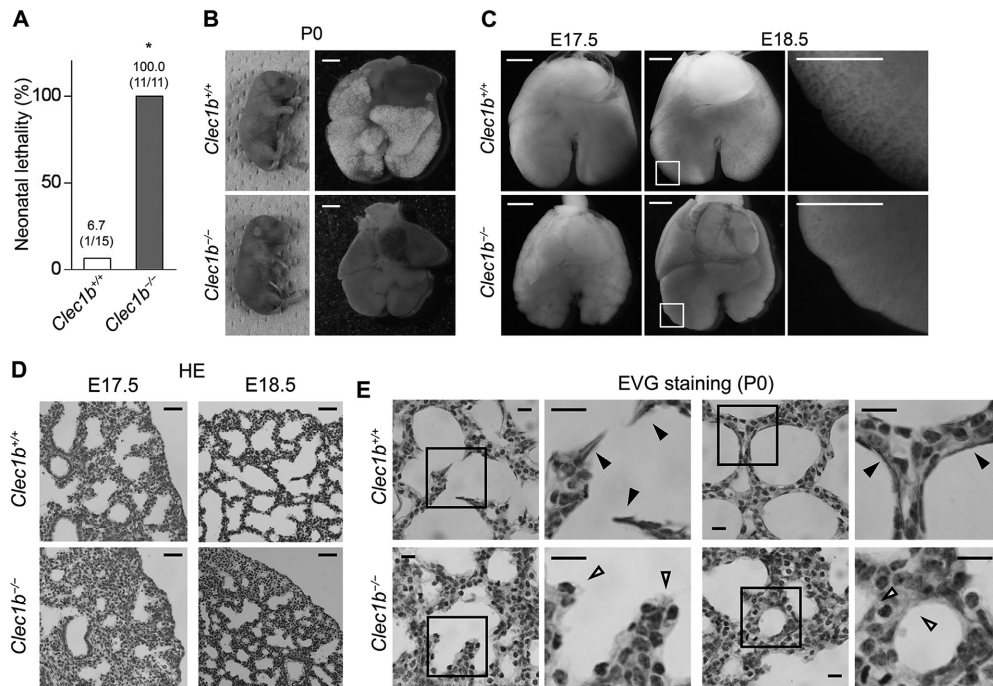


図1 CLEC-2欠損による肺発生異常

(A) 野生型 (*Clec1b*^{+/+}) マウスおよび CLEC-2 欠損 (*Clec1b*^{-/-}) マウスの出生当日の死亡率. (B) 出生直後の野生型および CLEC-2 欠損新生仔の全身像と肺. (C) 胎生 17.5 日, 18.5 日の野生型および CLEC-2 欠損胎仔肺. 中央の白線で囲まれた領域の拡大図を右に示す. (D) 胎生 17.5 日, 18.5 日の野生型および CLEC-2 欠損胎仔肺の HE 染色像. (E) 出生直後の野生型および CLEC-2 欠損新生仔肺の Elastica van Gieson 染色像. 黒線で囲まれた領域の拡大図をそれぞれの右側に示す. 矢尻(黒)は棘状あるいはリング状の弾性線維, 矢尻(白)は弾性線維のない肺胞壁を示す. Scale bars: 1 mm (B, C), 25 μ m (D), 10 μ m (E)

肺胞壁弾性線維を産生する adMYF に異常があるかどうか α -SMA の発現を確認したところ, 形態異常が現れ始める胎生 17.5 日の野生型では明瞭な発現が観察されるが, CLEC-2 欠損ではほぼ認められなかった (図 2A). adMYF の主要な起源は肺表面に存在する肺中皮 (lung mesothelial cell: luMC) と考えられている³⁾. CLEC-2 欠損が adMYF 分化を妨げる原因を探るため luMC の分化 (細胞増殖, 特異的転写因子の発現) についても調査した. BrdU の取り込みで肺胞上皮, 間質および中皮の細胞増殖を評価したところ, CLEC-2 欠損中皮のみが高い BrdU 陽性率を示した (図 2B). luMC 特異的転写因子の Wilms' tumor 1 (Wt1) の発現を調べたところ, 胎生 17.5 日の野生型 luMC がある特徴的な発現パターンを示すことを見出した. それは luMC の 20% 程度が Wt1 陰性であるという点である. 一方 CLEC-2 欠損 luMC の Wt1 陰性率は 3% にも満たなかった (図 2C, D). 過去の研究によれば Wt1 は luMC の細胞

増殖を亢進すると同時に N-cadherin や α -SMA など間質系への分化を抑制する^{4,5)}. すなわち, CLEC-2 欠損による Wt1 陰性細胞の減少 (Wt1 陽性細胞の増加) が luMC の過増殖および adMYF 欠損をもたらすと考えた. また luMC の分化異常は肺形態異常が見られる胎生 17.5 日より前から認められたこと (図 1D) から, CLEC-2 欠損マウスの死亡原因の発端は luMC の分化異常である可能性が強く示唆された.

3. 肺発生における血小板の重要性

野生型胎仔肺において CLEC-2 の発現を調査したところ, 血小板特異的発現を示した (図 3A). この結果は血小板 CLEC-2 の関与を支持する一方, 血小板巨核球特異的 CLEC-2 欠損 (血小板 CLEC-2 欠損, *Pf4-Cre, Clec1b*^{fl/fl}, 図では *Clec1b*^{APLT}) マウスが生存可能であることがすでに示されており⁶⁾, 一見矛盾

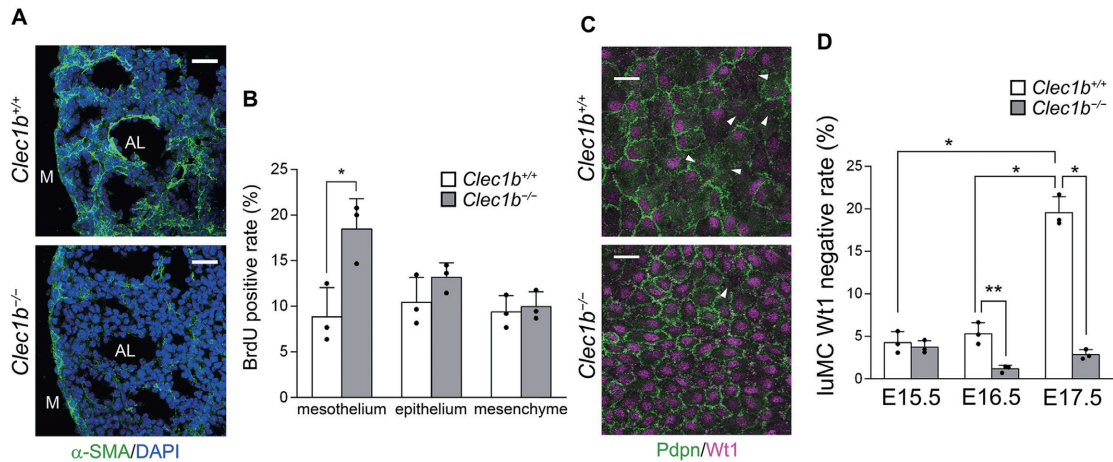


図2 CLEC-2欠損によるadMYFおよびluMCの分化異常

(A)胎生17.5日(以降記載がない場合はすべて胎生17.5日)の野生型およびCLEC-2欠損胎仔肺におけるadMYFマーカー α -SMAの発現(緑). 青はDAPIによる核染色. M: 中皮, AL: 肺嚢. (B)野生型およびCLEC-2欠損胎仔肺における肺中皮(luMC), 肺胞上皮, 間質のBrdU陽性細胞率. Mean \pm SD, $n=3$, $*P=0.0014$, Holm-Sidak test. (C)野生型およびCLEC-2欠損胎仔luMCにおけるPdpn(緑)とWt1(マゼンタ)の発現. Pdpn染色はluMCの輪郭の可視化を目的に実施. 矢尻はWt1陰性luMCを示す. (D)Cの染色像を用いて定量化したluMCのWt1陰性率. Mean \pm SD, $n=3$, $*P<0.0001$, $**P=0.0074$, Holm-Sidak test. Scale bars: 25 μ m (A, C)

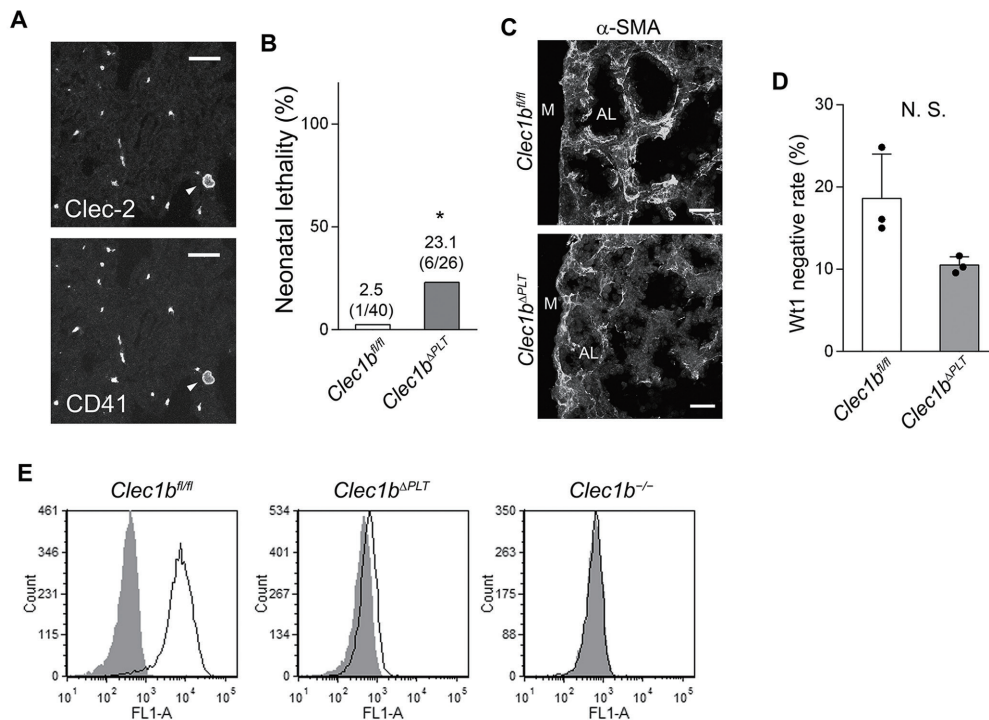


図3 血小板CLEC-2欠損マウスの軽度な肺発生異常

(A)野生型胎仔肺におけるCLEC-2と血小板マーカーCD41の発現. (B)野生型($Clec1b^{fl/fl}$)マウスおよび血小板CLEC-2欠損($Clec1b^{APLT}$)マウスの出生当日の死亡率. (C)野生型および血小板CLEC-2欠損($Clec1b^{APLT}$)胎仔肺における α -SMAの発現. (D)野生型およびCLEC-2欠損胎仔luMCのWt1陰性率. Mean \pm SD, $n=3$, N.S. = not significant ($P=0.062$), Holm-Sidak test. (E)野生型($Clec1b^{fl/fl}$), 血小板CLEC-2欠損($Clec1b^{APLT}$)およびCLEC-2欠損($Clec1b^{-/-}$)血小板におけるCLEC-2の発現. Scale bars: 25 μ m (A, C)

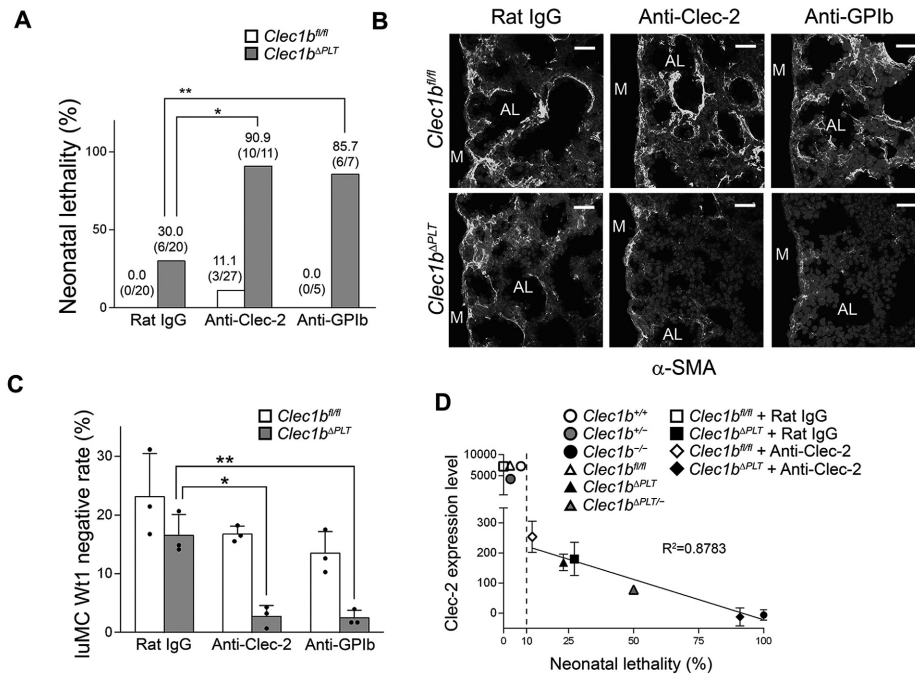


図4 肺発生における血小板 CLEC-2 の重要性

(A) Rat IgG(control), 抗 CLEC-2 抗体および抗 GPIb 抗体投与による野生型 (*Clec1b^{fl/fl}*) および血小板 CLEC-2 欠損 (*Clec1b^{APLT}*) マウスの出生当日の死亡率. $*P=0.0021$, $**P=0.0237$, Fisher's exact test. (B) 各抗体投与の野生型および血小板 CLEC-2 欠損胎仔肺における α -SMA の発現. (C) 各抗体投与の野生型および血小板 CLEC-2 欠損胎仔 luMC の Wt1 陰性率. Mean \pm SD, $n=3$, $*P=0.0019$, $*P=0.0022$, Tukey's test. (D) 本研究で用いた各種 CLEC-2 欠損マウス (抗体投与を含む) の出生当日の死亡率と胎生 17.5 日の血小板 CLEC-2 発現レベルの相関. Scale bars: 25 μ m (B)

する. そこで血小板 CLEC-2 欠損マウスの出生後の死亡率を調査したところ, 確かに生存個体は確認されるが 23.1% が死亡していることを発見した (図 3B). 加えて野生型と全身性 CLEC-2 欠損マウスの中間の軽度な肺発生異常を示すこともわかった (図 3C, D). 血小板 CLEC-2 欠損マウスが軽度な肺発生異常を示す原因を究明するにあたり, まず血小板 CLEC-2 の欠損状態を確認した. すると野生型の 2% 程度ではあるが CLEC-2 の発現が残存していることを見出した (図 3E). この残存した CLEC-2 の発現が軽度な表現型の原因であり, 血小板 CLEC-2 が肺発生に必須ならば, ①残存 CLEC-2 を何らかの方法で除去し完全欠損に近づける, または②血小板減少を起こすことで表現型が重篤化するはずである. 幸いにも, それぞれ抗 CLEC-2 抗体 (①) と抗 GPIb 抗体 (②) の投与により成獣では実現できることが知られており⁷⁻⁹⁾, さらに両抗体は IgG で胎盤を通過可能なため, 妊娠マウスに投与すれば胎仔に作用させ

ることが可能であると考えた. 血小板 CLEC-2 欠損胎仔を妊娠した雌マウスに抗体を投与し胎仔に作用させたところ両抗体ともに血小板 CLEC-2 欠損マウスの死亡率および肺発生異常を全身性 CLEC-2 欠損マウス並みに重篤化させた (図 4A~C). さらに血小板 CLEC-2 発現レベルと死亡率に非常に強い相関があった (図 4D). 以上より血小板 CLEC-2 が肺発生に必須であることが示された.

4. 肺発生に必要な podoplanin 発現細胞の同定

Podoplanin (Pdpn) が CLEC-2 リガンドとして同定される以前, Pdpn 欠損マウスが肺の形態異常と呼吸不全を示すことはすでに報告されていたが呼吸不全の明らかな原因を特定するには至っていなかった¹⁰⁾. あらためて Pdpn 欠損胎仔の表現型を調査したところ CLEC-2 欠損胎仔同様 adMYF 欠損と luMC 分化異常を示した (data not shown)²⁾. Pdpn は肺胞上

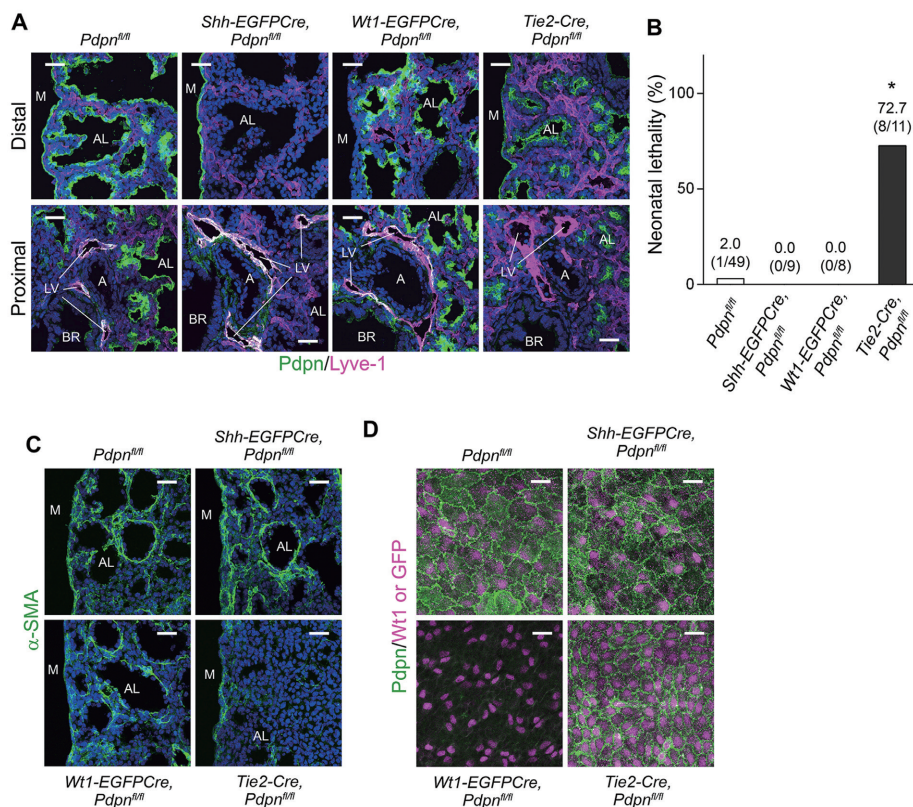


図5 肺発生に必要な Pdpn 発現細胞の同定

(A)野生型(*Pdpn^{fl/fl}*), 肺胞上皮特異的 Pdpn 欠損(*Shh-EGFP-Cre, Pdpn^{fl/fl}*), 中皮特異的 Pdpn 欠損(*Wt1-EGFP-Cre, Pdpn^{fl/fl}*), リンパ管内皮特異的 Pdpn 欠損(*Tie2-Cre, Pdpn^{fl/fl}*)胎仔肺における Pdpn の発現(緑). マゼンタはリンパ管内皮マーカー Lyve-1, 青は DAPI による核染色. M: 中皮, AL: 肺嚢, LV: リンパ管, A: 動脈, BR: 気管支. (B)各組織特異的 Pdpn 欠損マウスの出生当日の死亡率. * $P=0.0000$, Fisher's exact test. (C)各組織特異的 Pdpn 欠損胎仔肺における α -SMA の発現(緑). 青は DAPI による核染色. (D)各組織特異的 Pdpn 欠損胎仔 luMC における Pdpn(緑)と Wt1 または GFP(マゼンタ)の発現. Pdpn 染色は luMC の輪郭の可視化を目的に実施. 矢尻は Wt1 陰性 luMC を示す. 中皮特異的 Pdpn 欠損(*Wt1-EGFP-Cre, Pdpn^{fl/fl}*)マウスの EGFP-Cre はノックインであり Wt1 がヘテロとなる. そのため Wt1 の発現が弱く検出が困難であったため GFP で代替した. Scale bars: 25 μ m (A, C, D).

皮のマーカーとして用いられるほど肺胞上皮で明瞭な発現を示すため, 上記の報告でも肺胞上皮 Pdpn の重要性が推測されていた. 肺発生に必要な Pdpn 発現細胞を同定するために Pdpn 発現細胞を探索したところ, 肺胞上皮に加え肺中皮やリンパ管内皮にも Pdpn の発現が確認された(図 5A). その3組織それぞれに特異的な Pdpn 欠損マウス(肺胞上皮: *Shh-EGFP-Cre*, 中皮: *Wt1-EGFP-Cre*, リンパ管内皮: *Tie2-Cre*)を作製して表現型解析を行ったところ, 高い死亡率と肺発生異常を示したのはリンパ管内皮特異的 Pdpn 欠損マウスのみであった(図 5A~D). この結果から肺発生に必要な Pdpn 発現細胞は肺胞上皮や中皮ではなくリンパ管内皮であることが判明

した.

5. CLEC-2/Pdpn シグナルによる肺発生機構における TGF- β の関与

CLEC-2 と Pdpn はともに膜タンパク質であるため, その結合によりそれぞれの発現細胞内にシグナルを伝達する. In vitro の実験で血小板顆粒内容(特に TGF- β 1)が luMC 培養細胞の adMYF 様分化を促進すること, さらに CLEC-2 の下流分子 Syk の欠損マウスが肺発生異常を示すことがわかった(data not shown)²⁾. この結果から血小板の活性化により放出される TGF- β 1 が肺発生に関与するのではないかと

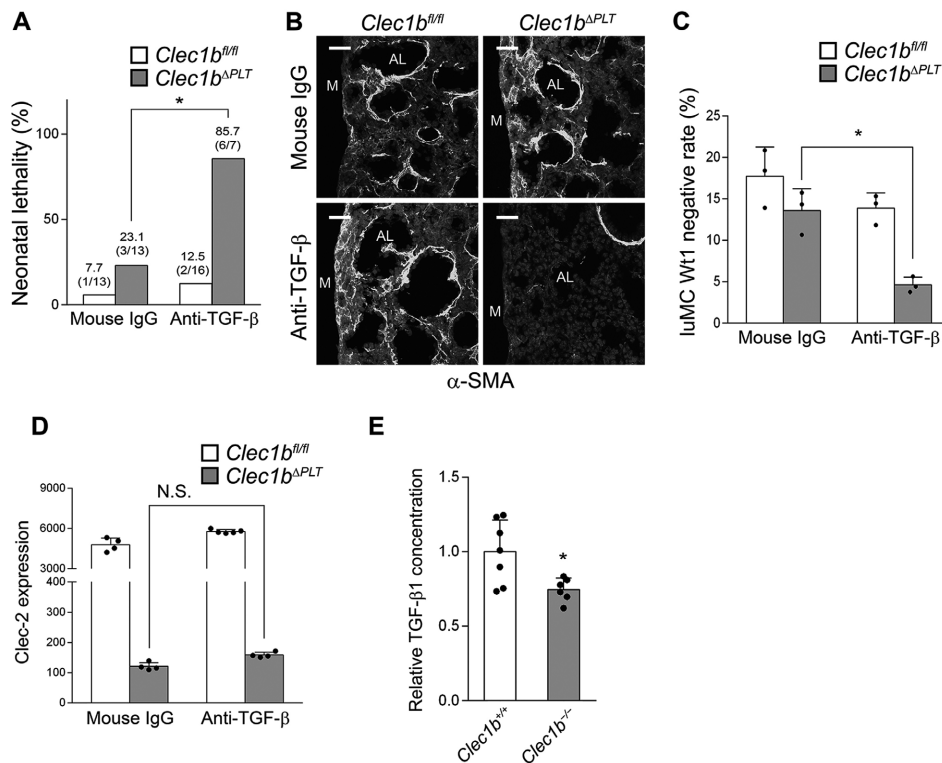


図6 血小板 CLEC-2 による肺発生への TGF- β の関与

(A) Mouse IgG (control), TGF- β 中和抗体投与による野生型 (*Clec1b^{fl/fl}*) および血小板 CLEC-2 欠損 (*Clec1b^{ΔPLT}*) マウスの出生当日の死亡率. * $P=0.0049$, Fisher's exact test. (B) TGF- β 中和抗体投与の野生型および血小板 CLEC-2 欠損胎仔肺における α -SMA の発現. (C) TGF- β 中和抗体投与の野生型および血小板 CLEC-2 欠損胎仔 luMC の Wt1 陰性率. Mean \pm SD, $n=3$, * $P=0.0084$, Tukey's test. (D) TGF- β 中和抗体投与野生型および血小板 CLEC-2 欠損胎仔の血小板 CLEC-2 の発現レベル. (E) 野生型および CLEC-2 欠損胎仔肺に含まれる TGF- β 1 量. Mean \pm SD, $n=6-7$, * $P=0.0187$, Student t-test. Scale bars: 25 μ m (B).

考えた。そこで血小板 CLEC-2 欠損胎仔の軽度な肺発生異常を TGF- β 中和抗体が重篤化させるかどうか検証した。すると TGF- β 中和抗体は血小板 CLEC-2 欠損胎仔に残存する血小板 CLEC-2 の発現を低下させることなく出生直後の死亡率と肺発生異常を重篤化させた(図 6A~D)。加えて CLEC-2 欠損肺では野生型肺に比べ有意に TGF- β 1 量が少なかった(図 6E)。以上より、CLEC-2 を介した血小板活性化に伴って放出される TGF- β 1 が肺発生に関与していることが示唆された。

6. おわりに

われわれは今回 CLEC-2 欠損マウスの出生直後致死という表現型を契機に luMC および adMYF の分化異常による肺発生異常を発見し、さらに血小板

CLEC-2 とリンパ管内皮 Pdpn が必須であること、そして血小板活性化により放出される TGF- β 1 が関与することを示した(図 7)。しかしながらいまだ解明されていない部分も多い。例えば血小板がどこで活性化するのか、すなわち血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮 Pdpn がどこで結合するかはいまだ不明である。それら未解決の問題はあるものの全身を循環する血球(血小板)が実質臓器(肺)の発生に必須であることを示した本研究は血小板の新たな機能とともに臓器形成の新たなコンセプトも提示できたのではないかと考えている。血小板に含まれる様々な生理活性物質に多彩な役割があることが次々と明らかにされ、血小板の“生理活性物質を必要な場所に運ぶ”役割が注目を集めている。以前から血小板活性化を起こすために数多くの受容体ーリガンドの組み合わせがある必然性とはなにか疑問に思っていたが、その

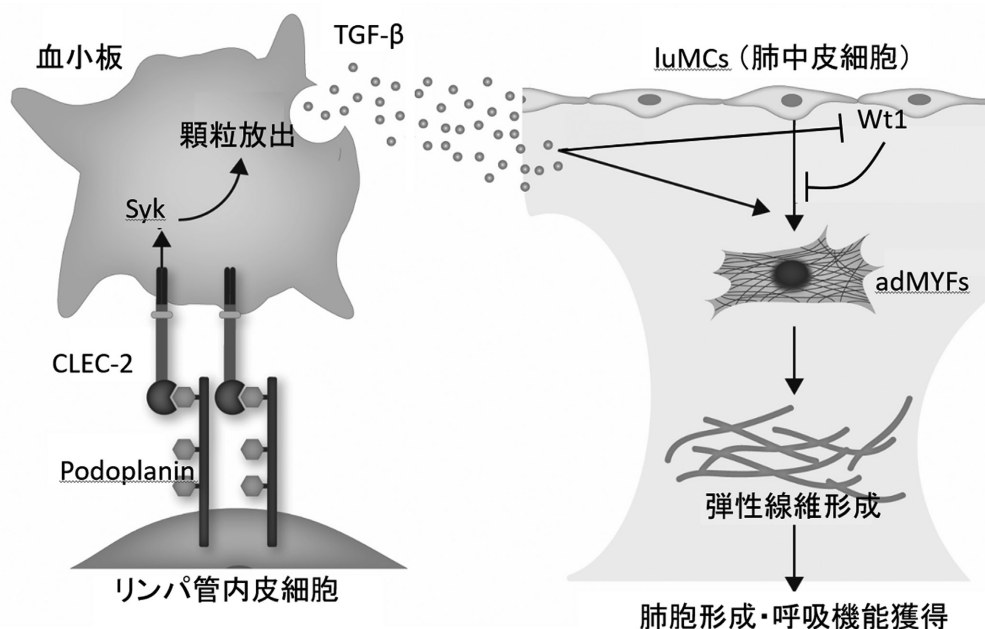


図7 CLEC-2/Pdpn シグナルによる肺発生機構

血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮 Pdpn の結合により血小板が Syk を介して活性化する。活性化血小板から放出された TGF-β1 が肺中皮に作用して Wt1 の発現を適切に制御することで luMC の維持および adMYF への分化のバランスを保つ。正常に分化した adMYF によりエラスチン等の細胞外マトリクスが分泌され肺胞の構造維持および柔軟性を確保し、出生後の呼吸機能獲得に寄与する。

多様性は状況に応じて生理活性物質を様々な場所に供給するために進化した精巧なシステムなのかもしれない。今後も未知の血小板機能の発見に貢献すべく精進していきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、共同研究として多大なご協力をくださいました理化学研究所森本充先生、東京慈恵会医科大学辰巳徳史先生、岡部正隆先生、立花利公先生、新潟大学大学院医歯学総合研究科平島正則先生、神戸大学医学部植田康司先生、山梨大学医学部総合分析実験センター長友啓明先生に深く感謝申し上げます。また、山梨大学医学部臨床検査医学講座にてお世話になった尾崎由基男先生(現・笛吹中央病院)、田村彰吾先生(現・名古屋大学大学院)と当講座の皆様にも深く感謝申し上げます。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益

相反なし

文献

- 1) Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Osada M, Inoue O, Ozaki Y: Platelet CLEC-2: Roles beyond hemostasis. *Semin Thromb Hemost* **44**: 126–134, 2018.
- 2) Tsukiji N, Inoue O, Morimoto M, Tatsumi N, Nagatomo H, Ueta K, Shirai T, Sasaki T, Otake S, Tamura S, Tachibana T, Okabe M, Hirashima M, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K: Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction. *Blood* **132**: 1167–1179, 2018.
- 3) Que J, Wilm B, Hasegawa H, Wang F, Bader D, Hogan BL: Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 16626–16630, 2008.
- 4) Cano E, Carmona R, Muñoz-Chápuli R: Wt1-expressing progenitors contribute to multiple tissues in the developing lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **305**: L322–332, 2013.
- 5) Batra H, Antony VB: The pleural mesothelium in development and disease. *Front Physiol* **5**: 284, 2014.
- 6) Finney BA, Schweighoffer E, Navarro-Núñez L, Bénézech C, Barone F, Hughes CE, Langan SA, Lowe KL, Pollitt AY, Mourao-Sa D, Sheardown S, Nash GB, Smithers N, Reis e Sousa C, Tybulewicz VL, Watson SP: CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood* **119**: 1747–1756, 2012.

- 7) Nieswandt B, Bergmeier W, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H: Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood* **96**: 2520–2527, 2000.
- 8) Lorenz V, Stegner D, Stritt S, Vögtle T, Kiefer F, Witke W, Schymeinsky J, Watson SP, Walzog B, Nieswandt B: Targeted downregulation of platelet CLEC-2 occurs through Syk-independent internalization. *Blood* **125**: 4069–4077, 2015.
- 9) Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Saitoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K: C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost* **15**: 513–525, 2017.
- 10) Ramirez MI, Millien G, Hinds A, Cao Y, Seldin DC, Williams MC: T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol* **256**: 61–72, 2003.