

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成22年度)**

本様式の内容は一般に公表されません

研究課題名	新規血小板上受容体 CLEC-2 を標的とした抗血小板薬、抗転移・腫瘍薬、検査の開発
研究機関・ 部局・職名	山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授
氏名	井上 克枝

### 1. 当該年度の研究目的

**血栓止血における役割**：これまでに、頸動脈でレーザー照射と塩化鉄傷害で血管閉塞時間を検討した。その結果、レーザーでは CLEC-2 キメラの閉塞時間が WT-キメラと同様であったが、塩化鉄では有意に延長した。ヒト冠動脈の動脈硬化巣では血管平滑筋に沿う形で組換え CLEC-2 の結合が認められ、培養冠動脈血管平滑筋細胞 (CASMC) に組換え CLEC-2 が結合することをフローサイトメーターで確認した。さらに、CASMC に全血を流すと血小板凝集が認められた。これより、血管平滑筋上に未知の CLEC-2 のリガンドが存在し、塩化鉄で血管壁が深く傷害されて平滑筋が露出すると、ロックアウトで閉塞時間が有意に延長するが、レーザーによる表層の傷害では差が出ないと考えた。今年度は、GFP 発現 CLEC-2 キメラマウスを用いた生体内 real time imaging で血栓形成過程の初期段階を直視下に観察し、レーザー照射と塩化鉄傷害を比較する。また、平滑筋等に存在する CLEC-2 リガンドを同定するための最適な方法を検討する。

**soluble CLEC-2 測定系の開発**：これまで、動脈血栓症発症の予知マーカーとなるという仮説のもとに、血中 soluble CLEC-2 を測定するための、サンドイッチ ELISA 系を開発した。23年度から患者、健常者の検体を大量に測定するための準備をする。

**CLEC-2 低分子化合物リガンドの検索**：これまでに検索用の ELISA 法を確立した。23年度より約2万という大量のライブラリーのスクリーニングを滞りなく進めるための準備をする。

### 2. 研究の実施状況

**血栓止血における役割**:GFP 発現 CLEC-2 キメラマウスの大腿動脈を、まず塩化鉄で傷害して、血栓形成の初期段階(血小板の傷害部位への粘着)を real time imaging で観察した。表層の血管障害しか生じないと考えられる低濃度塩化鉄では、CLEC-2 キメラの傷害部位に粘着した血小板数が、野生型キメラより少ないということにはなかった。今後、この実験を再検討するとともに高濃度の塩化鉄も検討する。CASMC 上のリガンドを検索するため、CASMC 表面をビオチンラベルして可溶化し、リコンビナント CLEC-2 とコントロール蛋白でプルダウンして結合した蛋白を、アビジン HRP で検出することを試みた。しかしながら、再現性のある結果が得られず、MS/MS による解析は断念し、別の方法でリガンド検索を試みることにした。

**soluble CLEC-2 測定系の開発**：まず、測定にあたって血小板の contamination が問題となりそうなので、最適な検体の採取方法(抗凝固剤の種類、真空採血管の容量)、遠心条件、検体の保存条件を検討して、決定した(現時点での結果の公表は差し障りがあるため、後日行います)。

**CLEC-2 低分子化合物リガンドの検索**：スクリーニングのための ELISA 系とスクリーニング方法を共同研究先に送付してスクリーニングを行い、すでに複数の化合物がヒットしている。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

雑誌論文 計1件	(掲載済み一査読有り) 計0件  (掲載済み一査読無し) 計0件  (未掲載) 計1件 <u>Katsue Suzuki-Inoue, Osamu Inoue, Yukio Ozaki. The novel platelet activation receptor CLEC-2. Platelets 2011 in press (Manuscript ID: CPLA 556274)</u>
会議発表 計0件	専門家向け 計0件  一般向け 計0件
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件
Webページ (URL)	
国民との科 学・技術対話 の実施状況	
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	113,000,000	0	50,827,000	62,173,000
間接経費	33,900,000	0	15,248,100	18,651,900
合計	146,900,000	0	66,075,100	80,824,900

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	50,827,000	0	50,827,000	1,100,000	49,727,000
間接経費	0	15,248,100	0	15,248,100	330,000	14,918,100
合計	0	66,075,100	0	66,075,100	1,430,000	64,645,100

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	1,060,400	CO2インキュベータ、実験試薬等
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	39,600	マウス輸送費
直接経費計	1,100,000	
間接経費計	330,000	
合計	1,430,000	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
CO2インキュベータ	和研薬株式会 社・370	1	947,625	947,625	2011/3/15	山梨大学
				0		
				0		