

## 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24年度)

本様式の内容は一般に公表されます

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

- 1) 血栓止血における役割: CLEC-2 は活性化に伴って CLEC-2 同士が結合して血栓を安定化する作用があることを報告した。さらに血管平滑筋上にも CLEC-2 のリガンドが発現していることを見出した。動脈硬化進展などにおける CLEC-2 の役割を、疾患モデルマウスを用いて検討する。
- 2) リンパ管発生における役割: 昨年度までに、血小板の CLEC-2 が胎生期のリンパ管と血管の分離に必要であること、血小板活性化で放出される TGF beta ファミリーが分離に重要であることを示し、目標は大体達成された。今後は TGF beta ファミリーに関する検討などを行う。
- 3) 癌転移における役割: 血小板 CLEC-2 の血行性転移における役割を CLEC-2 抑制で再確認する。癌の増殖やリンパ管構成転移における CLEC-2 の役割を検討する。
- 4) 血小板造血における役割の解明: CLEC-2 は巨核球にも発現する。骨髄中の何らかのリガンドと CLEC-2 の結合により、血小板造血が促進されるという仮説を立てたのでこれを検討する。
- 5) soluble (s) CLEC-2 測定系の開発: 昨年度までに血中 sCLEC-2 測定系を確立した。健常者と血栓症患者で血中 sCLEC-2 を比較検討する。また、sCLEC-2 発生機序についても検討する。
- 6) CLEC-2 低分子化合物リガンドの検索: 昨年度までに 65 種の CLEC-2 とポドプラニンの結合を阻害する化合物がヒットした。ヒット化合物の再確認、用量依存性について検討する。

### 2. 研究の実施状況

- 1) 血栓止血: 血管平滑筋上にも CLEC-2 のリガンドが発現し、CLEC-2 との結合で血栓形成、血小板内顆粒放出が見られた(投稿準備中)。この結合は平滑筋と血流に接触するステント留置部での血栓形成に関与するかもしれない。3 種類のリガンド候補を検討中である。動脈硬化進展における CLEC-2 の役割を検討するため、ApoE & CLEC-2 欠損マウスの作製を進めている。
- 2) リンパ管発生: TGF beta ファミリーの生体での重要性を示すため、血小板の同物質が奏効しない遺伝子改変マウスの作製を進めている。
- 3) 癌: CLEC-2 は血行性転移を促進し、試験管内での腫瘍細胞の増殖を促進する。しかし、CLEC-2 を持たないマウスに腫瘍細胞を移植すると、増殖もリンパ管転移も通常のマウスに比べて抑制されず、むしろ増加傾向が見られた(学会発表予定)。これは CLEC-2 が生体内で癌の増殖やリンパ管転移を抑制する役割を持つということを示しており、今後原因を究明する。
- 4) 血小板造血: 血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスは血小板と赤血球数が減少していた。CLEC-2 欠損巨核球はコロニー形成とコロニーあたりの細胞数が少なかった。CLEC-2 は、巨核球、巨核球・赤芽球系共通前駆細胞の分化や増殖に関与する可能性があり、今後検討を続ける。
- 5) sCLEC-2 測定: 血小板活性化に伴い、CLEC-2 は血中に遊離することを見出し、血栓症患者で有意に血中 sCLEC-2 が上昇した(投稿準備中)。sCLEC-2 は血栓症発症や抗血小板薬のモニター法となる可能性がある。
- 6) CLEC-2 低分子化合物リガンド: 65 種類の一次スクリーニングヒット化合物を、二次スクリーニングした結果、2 種類が残った。1 種類は CLEC-2 惹起血小板凝集を特異的に抑制する傾向があった。今後、類似の化合物を数種類検討する。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 8 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件</p> <p>1) Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, <b>Suzuki-Inoue K (corresponding author)</b>, 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. 2012 Jun 22;287(26):22241-52. <b>(Faculty of 1000 に選出) (vol.287, No.26 の表紙を飾る) (筆頭著者が臨床検査医学会学会賞(検査・技術賞)受賞)</b></p> <p>2) Osada M, Kaneko M, Sakamoto M, Endoh M, Takigawa K, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Satoh K, Enomoto N, Yatomi Y, Ozaki Y. Causes of thrombocytopenia in chronic hepatitis C viral infection. Clin Appl Thromb Hemost. 2012 Jun;18(3):272-80.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 4 件</p> <p>1) 井上克枝 感染・炎症と血小板 日本血栓止血学会誌 23: 259-264, 2012</p> <p>2) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 と血管・リンパ管新生 Pharma Media 30: 49-53, 2012</p> <p>3) 井上克枝 データ解説 血管傷害に対する反応における Syk の重要な役割 International Review of Thrombosis 7: 72-73, 2012</p> <p>4) 井上克枝 血栓性疾患—薬効薬理と病態生理に基づいた治療戦略の展開 キーワード「CLEC-2 とポドプラニン」カレントセラピー 31: 93, 2013</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <p>1) Ozaki Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O. Platelet glycoproteins with platelet-activating property, GPVI, GPIb/IX-V and CLEC-2. J Thromb Haemost. 2013 in press</p> <p>2) Jin JW, Inoue O, <b>Suzuki-Inoue K (corresponding author)</b>, Nishikawa G, Kawakami Y, Hisamoto M, Okuda T, Ozaki Y. Grape Seed Extracts Inhibit Platelet Aggregation by Inhibiting Protein Tyrosine Phosphatase. Clin Appl Thromb Hemost. 2013 in press</p>
<p>会議発表 計 9 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件</p> <p>1) Katsue Suzuki-Inoue “A role of platelet activation receptor CLEC-2 in tumor metastasis, lymphangiogenesis, and thrombus formation” シンポジウム 15 多彩な生理機能を持つ血小板へのアプローチ 第 90 回生理学会大会 2013.3.27 東京 船堀</p> <p>2) 井上克枝 「CLEC-2 の発見と最新の知見」化血研 KIKUCHI バイオセミナー「三風会」2012.11.2 熊本 (招待講演)</p> <p>3) 井上克枝 「血小板活性化受容体 CLEC-2 のリンパ管新生、癌転移、血栓形成における役割」第 2 回血小板・巨核球学術講習会 (招待講演) 2012.10.6 大阪</p> <p>4) 井上克枝、大森司、柏木浩和 「血小板系出血疾患」Conference of Haemostasis Academy for Next Generation 2012.10.7, 8 大阪</p> <p>5) 井上克枝「血小板活性化受容体 CLEC-2 のリンパ管新生における役割」第 9 回病理学会カンファレンス 2012.8.3 山口 (招待講演)</p> <p>6) 井上克枝 「血小板活性化受容体 CLEC-2 のリンパ管新生、癌転移、血栓形成における役割」第 36 回日本リンパ学会総会 2012.6.30 東京 (招待講演)</p> <p>7) 井上 修、井上克枝、中村純也、長田 誠、大澤満、尾崎由基男 「可溶型 CLEC-2 の解析」第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6.8 東京</p> <p>8) 長田 誠、井上克枝、井上 修、白井俊光、尾崎由基男「新規血小板活性化受容体 CLEC-2 による血管とリンパ管の分離メカニズム—血小板顆粒内物質の検索—」第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6.8 東京</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>1) 井上克枝 「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」やまなし産学官連携研究交流事業 2012.9.6 甲府</p>

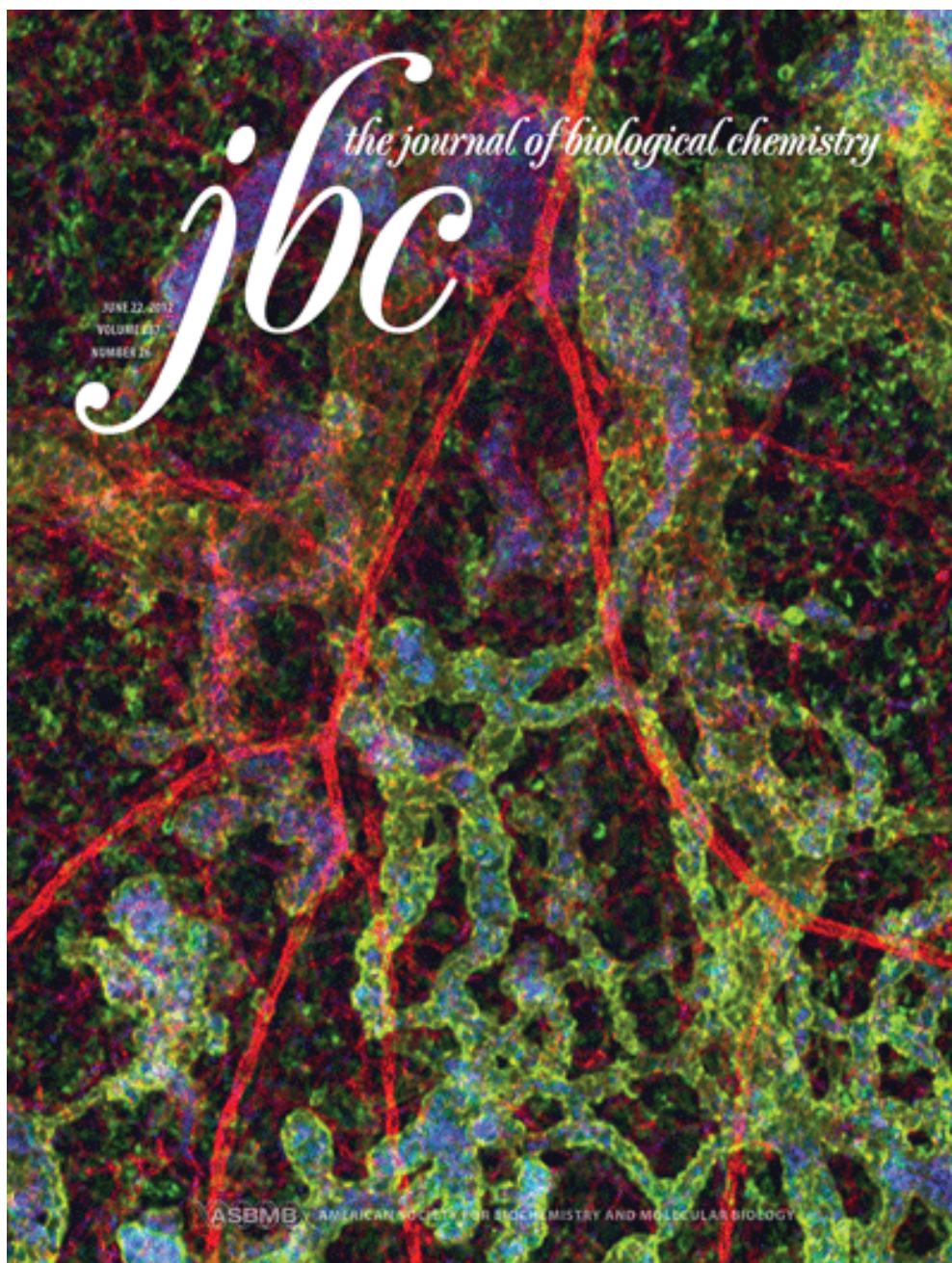
様式19 別紙1

<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/">http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>1) 人物発掘 「井上克枝 准教授」 山梨大学広報 Vine vol.19, P.4-5, 2013.3 (本プロジェクトについて触れた)</p> <p>2) 井上克枝 「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」 やまなし産学官連携研究交流事業 2012.9.6 ベルクラシック甲府 口演</p> <p>3) 井上克枝 「血小板研究の最前線-本当は怖い「かさぶた」のはなし-」 山梨県下の高校生を対象とした公開授業 2012.7.23 山梨大学医学部キャンパス 山梨県の高校生約40名</p> <p>4) ホームページ「臨床検査医学講座 山梨大学大学院医学工学総合研究部」(<a href="http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/index.html">http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/index.html</a>)上で、「最先端次世代研究開発支援プログラム関連情報」コーナーを設け、成果について説明した。「ご意見、ご質問はこちらまで」として連絡先メールアドレス、住所、電話、ファックス番号を記載した。</p> <p>5) 山梨大学ホームページのトップページ「教育研究採択プロジェクト」の欄にも本プロジェクトに関して掲載した(<a href="http://www.yamanashi.ac.jp/modules/gcoe/index.php?content_id=1">http://www.yamanashi.ac.jp/modules/gcoe/index.php?content_id=1</a>)。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計1件</p>	<p>1) 人物発掘 「井上克枝 准教授」 山梨大学広報 Vine vol.19, P.4-5, 2013.3 (本プロジェクトについて触れた)</p>
<p>その他</p>	<p>業績1)の論文が</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Faculty of 1000 に選出</li> <li>・筆頭著者の長田誠(大学院生、臨床検査技師)が日本臨床検査医学会学会賞(検査・技術賞)受賞 H24.11.30</li> <li>・J. Biol. Chem. 誌 vol.287, No.26 の表紙を飾る。</li> </ul>

様式19 別紙1

4. その他特記事項

J. Biol. Chem. 誌 vol.287, No.26 の表紙は以下のとおり



## 実施状況報告書(平成24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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	113,000,000	50,827,000	35,293,000	26,880,000	
間接経費	33,900,000	15,248,100	10,587,900	8,064,000	
合計	146,900,000	66,075,100	45,880,900	34,944,000	0

## 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	当該年度 返還額
直接経費	14,012,356	35,293,000	0	49,305,356	47,620,150	1,685,206	0
間接経費	3,496,930	10,587,900	0	14,084,830	14,084,830	0	0
合計	17,509,286	45,880,900	0	63,390,186	61,704,980	1,685,206	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	26,155,861	BD Accuri C67ローサイトメーター、実験試薬等
旅費	100,720	生殖工学技術研修in新潟2012参加旅費等
謝金・人件費等	17,302,752	研究員派遣、研究補助者人件費
その他	4,060,817	ラットモノクロナール抗体受託作成等
直接経費計	47,620,150	
間接経費計	14,084,830	
合計	61,704,980	

## 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
BD Accuri C67 ローサイトメーター	米国ベクトン・ディッキンソン 社	1	5,869,500	5,869,500	2012/6/27	山梨大学
極微量分光光 度計	NanoDrop2000C本 体、ソフトウェア、PR-1	1	1,937,250	1,937,250	2012/10/3	山梨大学
大型滑走式ミ クローム(搬入費含)	REM-710/SBF240W マイクローム大和光機	1	994,718	994,718	2013/2/28	山梨大学