

**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25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：血管平滑筋上に発現する CLEC-2 のリガンドをできれば特定する。CLEC-2 の動脈硬化での役割などを検討する。
- 2) リンパ管発生における役割：CLEC-2 刺激で血小板より放出される TGFβ and/or BMP-9 が胎生期の血管とリンパ管の分離に重要であることが示唆されたので、マウスモデルで検証する。腫瘍や炎症におけるリンパ管新生での CLEC-2 の役割も検討する。
- 3) 癌転移における役割：腫瘍細胞上のポドプラニンと CLEC-2 の結合により活性化された血小板が腫瘍の血行性転移を促進しているが、リンパ行性転移と増殖は、CLEC-2 欠損キメラマウスでより多く見られる傾向があり、本年度はこの原因を探る。
- 4) 血小板造血における役割の解明：巨核球に発現する CLEC-2 が、骨髄中の何らかのリガンドと結合して、血小板造血が促進するという仮説を立てたのでこれを検討する。
- 5) soluble CLEC-2 (sCLEC-2) 測定系の開発：血中 sCLEC-2 が上昇するか臨床症例で確認する。また、sCLEC-2 発生のメカニズムについても引き続き検討する。
- 6) CLEC-2 低分子化合物リガンドの検索：低分子化合物ライブラリーの2次スクリーニングで残った2種類の化合物の dose response を検討するとともに、CLEC-2 アゴニスト惹起血小板凝集に対する効果、in vivo 血栓形成や癌転移に対する効果を検討する。

2. 研究の実施状況

- 1) 血栓止血における役割：血管平滑筋上の CLEC-2 リガンドが、S100 蛋白の一種であることがわかった。この蛋白の機能を阻害すると、内膜肥厚が抑制されるという報告がある。光化学的に血栓を惹起したマウスの血管内膜肥厚は、CLEC-2 欠損キメラで有意に抑制された。ApoE 欠損マウスの大動脈への脂質沈着は、抗 CLEC-2 抗体投与により抑制された。これらのデータは CLEC-2 は動脈硬化の進展にも何らかの役割を担っている可能性を示唆している。
- 2) リンパ管発生における役割：血小板内 TGFβ の胎生期の血管リンパ管分離での役割を示すため、TGFβ 受容体を血小板内に発現する TG マウスを作製した。今後解析予定である。
- 3) 癌転移における役割：ポドプラニン発現腫瘍の血行性転移は CLEC-2 欠損キメラで有意に抑制されたが、リンパ行性転移と増殖は野生型と差がなかった。腫瘍を皮下移植したマウスに抗 CLEC-2 抗体を投与すると生存が延長する傾向があり、原因を調査中である。
- 4) 血小板造血における役割の解明：巨核球・血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスでは血小板数と成熟早期巨核球数が有意に低下していた。colony formation assay と liquid expansion assay で組換えポドプラニン添加群で巨核球数の増加を示したことから、CLEC-2 は巨核球の成熟段階早期から細胞表面上に存在し、巨核球前駆細胞の増殖に関与する可能性が示唆された。
- 5) soluble CLEC-2 測定系の開発：血中 sCLEC-2 は血栓症患者で有意に高値であった。sCLEC-2 産生には、血小板上コラーゲン受容体と異なり、ADAM10 が関与しないことが示唆された。
- 6) CLEC-2 低分子化合物リガンドの検索：低分子化合物ライブラリーの二次スクリーニングで2種類の化合物を得た。このうち1種は CLEC-2 惹起血小板を比較的特異的に抑制し、in vivo 血栓形成マウスモデルで血栓形成を抑制することがわかった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件 1) Satoh K, Hirayama T, Takano K, Suzuki-Inoue K, Sato T, Ohta M, Nakagomi J, Ozaki Y. VacA, the vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori, binds to multimerin 1 on human platelets. Thromb J. 2013;11:23. 2) Wannemacher KM, Jiang H, Hess PR, Shin Y, Suzuki-Inoue K, Brass LF. An expanded role for semaphorin 4D in platelets includes contact-dependent amplification of Clec-2 signaling. J Thromb Haemost. 2013;11:2190-3. 3) Ozaki Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O. Platelet receptors activated via multimerization: glycoprotein VI, GPIb-IX-V, and CLEC-2. J Thromb Haemost. 2013;11 Suppl 1:330-9.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 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 2013;61:318-27</p> <p>(未掲載) 計 1 件 1) Jin JW, Inoue O, Suzuki-Inoue K, 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. 2014 Apr;20(3):278-84</p>
<p>会議発表 計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件</p> <p>1) 長田誠、井上克枝、井上修、中村純也、尾崎由基男. 「血中 soluble CLEC-2 測定法の基礎検討」 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013.11.2 神戸</p> <p>2) 井上克枝、大森司、柏木浩和、羽藤高明、横山健二. 「血小板性出血性疾患」 第一回血栓止血学会教育セミナー 2013.10.19, 20 東京</p> <p>3) 井上克枝. 「血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓形成、癌転移、リンパ管新生における役割」 研究医養成コンソーシアム 四大学夏のリトリート 2013.8.19 山梨</p> <p>4) Shogo Tamura ,Takanori Moriyama ,Kazuhiko Matsuno ,Katsue Suzuki-Inoue ,Yukio Ozaki. BDNF acts as an autocrine cell proliferation factor in TPO stimulated megakaryocytic cell line. Poster XXIV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013.7.4 Amsterdam</p> <p>5) Osamu Inoue, Kazuya Hokamura, Kazuo Umemura, Kinta Hatakeyama, Yujiro Asada, Yukio Ozaki, Katsue Suzuki-Inoue. A role of platelet C-type lectin like receptor-2 (CLEC-2) in thrombus formation in vivo. Poster XXIV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013.7.3 Amsterdam</p> <p>6) Yukio Ozaki, Katsue Suzuki-Inoue, Osamu Inoue. Platelet receptors activated via multimerization: GPVI, GPIb-IX-V and CLEC-2. State of the Art lecture. XXIV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013.7.2 Amsterdam</p> <p>7) Osamu Inoue, Junya Nakamura, Makoto Osada, Mitsuru Oosawa, Yukio Ozaki, Katsue Suzuki-Inoue. Soluble CLEC-2 was released upon platelet activation and detected in human plasma. Poster XXIV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013.7.2 Amsterdam</p>

様式19 別紙1

	<p>8) Toshiaki Shirai ,Osamu Inoue ,Kazuyoshi Hirayama ,Hiroshi Endo ,Hideki Fujii ,Hitomi Utida-Sato ,Yukio Ozaki ,Katsue Suzuki-Inoue. A role of CLEC-2 in tumor growth and metastasis. Oral presentation XXIV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013.7.1 Amsterdam</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>1) 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-」山梨県下高校生への公開授業 2013.7.26 山梨</p> <p>2) 井上克枝「血小板を究める～かさぶたを作るだけではなかった、小さな細胞～」第5回連続市民講座 2013.9.21 山梨</p>
<p>図書 計1件</p>	<p>1) 井上克枝「血小板機能異常症」血液疾患 最新の治療 2014-2016 直江知樹、小澤敬也、中尾眞二 編集 2014: 225-229</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計(1)件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計1件(昨年度未公開であったもの)</p> <p>発明の名称:可溶性 CLEC-2 に基づく血小板活性化測定方法 特許権者:国立大学法人山梨大学、三菱化学メディエンス 発明者:井上克枝、尾崎由基男、中村純也、大沢満 出願番号:特願 2012-215900 号 出願日:平成 24 年 9 月 28 日</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>山梨大学大学院医学工学総合研究部 臨床検査医学講座 http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1) 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-」山梨県下高校生への公開授業 2013.7.26 山梨 参加者 13 人</p> <p>2) 井上克枝「血小板を究める～かさぶたを作るだけではなかった、小さな細胞～」第5回連続市民講座 2013.9.21 山梨 参加者 140 人</p> <p>3) 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」(http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/index.html)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>4) 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(http://www.yamanashi.ac.jp/modules/gcoe/index.php?content_id=1)。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計2件</p>	<p>1) 読売新聞 2013.9.27 P.31 山梨大・読売講座詳報「血小板を究める～かさぶたを作るだけではなかった、小さな細胞～井上克枝准教授」「血栓予防 鍵握る新物質」</p> <p>2) 読売新聞 2013.9.22 P.26 山梨大・読売講座「血小板 脳梗塞の原因に 井上准教授 仕組み解説 新薬研究も」</p>
<p>その他</p>	<p>Website “Atlas of Genetics” CLEC1B (C-Type Lectin Domain Family 1, Member B) の項執筆 http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CLEC1B.html 2013.11</p>

4. その他特記事項

なし

実施状況報告書(平成25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せん

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	86,120,000	26,880,000	0	0
間接経費	33,900,000	25,836,000	8,064,000	0	0
合計	146,900,000	111,956,000	34,944,000	0	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	1,685,206	26,880,000	0	28,565,206	28,565,206	0	0
間接経費	0	8,064,000	0	8,064,000	8,064,000	0	0
合計	1,685,206	34,944,000	0	36,629,206	36,629,206	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	17,126,789	マクロ顕微鏡システム, 実験試薬等
旅費	824,410	研究成果発表旅費(国際血栓止血学会)等
謝金・人件費等	8,860,547	研究員派遣, 研究補助者人件費
その他	1,753,460	Tgマウス作製, マウス微生物学的検査等
直接経費計	28,565,206	
間接経費計	8,064,000	
合計	36,629,206	

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
マクロ顕微鏡シ ステム	MVX10-3-2特別組 合せ オリンパス	1	2,109,450	2,109,450	2013/5/27	山梨大学
				0		
				0		