

**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23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

**血栓止血における役割**：我々は血小板活性化受容体 CLEC-2 を見出し、腫瘍細胞やリンパ管内皮に発現するポドプラニンが生体内リガンドであることを見出した。血管平滑筋上と血小板にも未知の CLEC-2 リガンドが存在する可能性を見出しており、その検索を行う。**リンパ管発生における役割**：(1) マウスでは CLEC-2 は血小板以外にも発現するため、血小板・巨核球系のみで CLEC-2 を欠損するマウスのリンパ管の組織学的解析を行い、血小板の CLEC-2 が胎生期のリンパ管・血管分離に重要なのか検討する。(2) CLEC-2 によるリンパ管と血管の分離のメカニズムを検討する。**癌転移における役割**：CLEC-2 は腫瘍細胞表面に発現するポドプラニンと結合して血小板を活性化して腫瘍の血行性転移を促進することを見出した。今回、CLEC-2 の血行性転移における役割を再確認するとともに、リンパ行性転移における役割を検討する。**血小板造血**：CLEC-2 は血小板・巨核球にかなり特異的に発現している。そのため、血小板造血における CLEC-2 の役割を検討する。**soluble CLEC-2 測定系の開発**：in vitro の実験で血小板活性化に伴って CLEC-2 が切断されて遊離することを見出した。そこで血中の遊離(soluble) CLEC-2 の測定が、血栓症発症の予知マーカーや抗血小板薬のモニターとなる検査法とにならないか検討する。今年度は測定用 ELISA 系を構築する。**CLEC-2 低分子化合物リガンドの検索**：CLEC-2 を標的とした抗血小板や抗転移薬開発のため、CLEC-2 低分子化合物リガンドを検索する。今年度はライブラリーのスクリーニングを行う。

### 2. 研究の実施状況

**血栓止血**：ビオチンラベルした血管平滑筋と血小板を可溶化して組換え CLEC-2 蛋白に結合する蛋白をアビジン HRP で検出して MS/MS に出すという方法を考えていたが、再現性が得られず、MS/MS 解析は断念した。蛋白質アレイで、組換え CLEC-2 に結合するが対照蛋白に結合しない膜蛋白あるいは分泌蛋白を 5 種類ほど見出した。各々の組換え蛋白と組換え CLEC-2 の結合をビアコアで検討したが、すべて結合が認められなかった。そこでリガンド不明のままこれまでのデータをまとめて国際血栓止血学会で発表した。**リンパ管発生**：血小板・巨核球系のみで CLEC-2 を欠損するマウスの解析を行ったところ、リンパ管・血管の不分離が認められ、血小板上の CLEC-2 が重要であることを見出した。また、血小板の CLEC-2 とリンパ管内皮のポドプラニンが結合し、血小板活性化と共に放出される顆粒内容が、リンパ管内皮の遊走、増殖、管腔形成を抑制することで、リンパ管と血管の分離が促進されるという機序を提唱した。さらに BMP-9 が血小板顆粒内容であることを初めて見出し、これが抑制に中心的な役割を果たすことも、J. Biol. Chem 誌と国際血栓止血学会で発表した。**癌転移**：マウスの肺転移、リンパ節転移モデルを構築した。CLEC-2 欠損キメラマウスでは、血行性肺転移が有意に抑制されることを見出した。**血小板造血**：CLEC-2 欠損キメラマウスでは野生型と血小板数に差がなかったが、血小板・巨核球特異的 CLEC-2 欠損マウスでは血小板数が有意に低く、CLEC-2 が血小板造血に何らかの役割を担うと考えられた。**soluble CLEC-2 測定系**：ELISA 系を構築して最適な採血方法と採血管と検体分離法を決定し、暫定正常値を決定した。**CLEC-2 低分子化合物リガンド**：ELISA 測定系を開発し、ヒット化合物が約 60 種見つかった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 10 件</p>	<p>(掲載済み－査読有り) 計 3 件                  1) <u>Suzuki-Inoue K</u>, Inoue O, Ozaki Y.                  Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects. J Thromb Haemost. 2011 Jul;9 Suppl 1:44-55.                  2) <u>Suzuki-Inoue K</u>, Inoue O, Ozaki Y. The novel platelet activation receptor CLEC-2. Platelets. 2011;22(5):380-4.                  3) <u>Suzuki-Inoue K</u>.                  Essential in vivo roles of the platelet activation receptor CLEC-2 in tumour metastasis, lymphangiogenesis and thrombus formation. J Biochem. 2011 Aug;150(2):127-32.</p> <p>(掲載済み－査読無し) 計 3 件                  1) 井上克枝 「遺伝子改変動物から学ぶ血栓症」 CLEC-2 欠損マウス 血栓と循環 2011;19(4):4-8                  2) 井上克枝、井上修、尾崎由基男 新規血小板活性化受容体 CLEC-2: その発見から今後の展望まで 日本血栓止血学会誌 2011;22(6): 348-362                  3) 井上克枝 DATA ANALYSIS 「Critical role for Syk in response to vascular injury Andre P. et al. Blood 2011; 118: 5000-10」 International Review of Thrombosis 2012;7(1):72-3</p> <p>(未掲載) 計 4 件                  1) Osada M, Kaneko M, Sakamoto M, Endoh M, Takigawa K, <u>Suzuki-Inoue K</u>, Inoue O, Satoh K, Enomoto N, Yatomi Y, Ozaki Y.                  Causes of Thrombocytopenia in Chronic Hepatitis C Viral Infection. Clin Appl Thromb Hemost. 2012 Feb 12. [Epub ahead of print]                  2) Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, <u>Suzuki-Inoue K</u>, 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. jbc.M111.329987. First Published on May 3, 2012,                  3) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 と血管・リンパ管新生 Parma Media 2012年5月号                  4) 井上克枝 感染・炎症と血小板 日本血栓止血学会誌 2012;23(3)</p>
<p>会議発表 計 11 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件                  1) <u>井上克枝</u> 「Essential in vivo roles of CLEC-2: lymphangiogenesis and thrombosis/hemostasis」免疫学・分子情報伝達学・薬理学合同プロGRESSミーティング 山梨大学医学部キャンパス 山梨 2011.5.25                  2) <u>井上克枝</u> 「血栓止血を超えた血小板の役割: 新規血小板活性化受容体 CLEC-2 を中心として」(招待講演) 第 12 回 Organ Microcirculation Forum 慶応大学信濃町キャンパス 東京 2011.6.23                  3) <u>井上克枝</u> 「血小板活性化受容体 CLEC-2: 癌、発生、血栓での役割」(特別講演) 第 58 回トキシシンポジウム 順天堂大学 東京 2011.7.6-7                  4) <u>Suzuki-Inoue K</u>, Inoue O, Ozaki Y “Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects” (State of the Art) Kyoto 2011.7.23-28 XXIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis                  5) Inoue O, Hokamura K, Uemura K, Hatakeyama K, Asada Y, Ozaki Y, <u>Suzuki-Inoue K</u>. “A role of platelet A-type lectin like receptor-2 (CLEC-2) in thrombus formation in vivo” (Oral presentation) Kyoto 2011.7.23-28 XXIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis                  6) Osada M, Inoue O, Ding G, Hirashima M, Ozaki Y, <u>Suzuki-Inoue K</u>. “CLEC-2 regulates lymphangiogenesis by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells” (Oral presentation) Kyoto</p>

様式19 別紙1

	<p>2011.7.23-28 XXIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis</p> <p>7) <u>Suzuki-Inoue K</u> “Recent advances in the novel platelet activation receptor CLEC-2” (Invited speaker) 7<sup>th</sup> Aso International Meeting, Hotel Greenpia Minamiaso, Kumamoto, 2011.7.29-31</p> <p>8) 井上克枝 「新規血小板活性化受容体 CLEC-2 の癌転移、リンパ管新生、血栓形成における役割」(招待講演) 第16回近畿血栓症研究会 北浜フォーラム 大阪 2011.10.29</p> <p>9) <u>Suzuki-Inoue K</u>, Inoue O, Ozaki Y “Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects” (Invited speaker) JSPS-NWO Joint Seminar (日蘭二国間交流セミナー), Showa Pharmaceutical University, Tokyo, 2011.11.4-6</p> <p>10) 井上克枝 「新規血小板活性化受容体 CLEC-2 の癌転移、リンパ管新生、血栓形成における役割」(招待講演) 第11回山梨再生・移植研究会 山梨大学医学部キャンパス 山梨 2011.11.9</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>1) 井上克枝 「血小板凝集を惹起する新しい受容体 CLEC-2 (C-type lectin-like receptor-2) 」(パネル展示) 第6回山梨産学官連携シンポジウム ベルクラシック甲府 山梨 2012.2.13</p>
<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/index.html">http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/index.html</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1) <u>井上克枝</u> 「医学研究の話」 広報ちゅうおう 2012年2月号 No.72 p.7 「みなさんの健康」欄 (山梨県中央市広報誌にて、本プログラム採択プロジェクトについて説明する)</p> <p>2) <u>井上克枝</u> 「医学研究の話」 広報しょうわ 2012年2月号 No.412 p.19 「みなさんの健康」欄 (山梨県中巨摩郡昭和町広報誌にて、本プログラム採択プロジェクトについて説明する)</p> <p>3) <u>井上克枝</u> 「血小板凝集を惹起する新しい受容体 CLEC-2 (C-type lectin-like receptor-2) 」(パネル展示) 第6回山梨産学官連携シンポジウム ベルクラシック甲府 山梨 2012.2.13 (一般企業との連携を行うため)</p> <p>4) <u>井上克枝</u> 「副作用のない、血栓予防薬を開発し、心筋梗塞や脳梗塞をなくせ」 p.231 河合塾編 『ポスト 3.11 変わる学問 気鋭大学人からの警鐘』 朝日新聞出版社 2010.3.16 発行 (学校法人河合塾が各分野で先導的な研究に携わる若手・女性研究者を広く一般にご紹介するための書籍・ウェブサイトの制作を企画し、研究者にアンケート調査を行った。その回答の中で、行っている研究について一般にわかるように説明し、上記書籍となった。)</p> <p>5) 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>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載計1件	1) 井上克枝 「副作用のない、血栓予防薬を開発し、心筋梗塞や脳梗塞をなくせ」 p. 231 河合塾編 『ポスト 3.11 変わる学問 気鋭大学人からの警鐘』 朝日新聞出版社 2010.3.16 発行
その他	

4. その他特記事項

特になし

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 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	0	62,173,000	0
間接経費	33,900,000	15,248,100	0	18,651,900	0
合計	146,900,000	66,075,100	0	80,824,900	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	49,727,000	0	0	49,727,000	35,714,644	14,012,356	0
間接経費	14,918,100	0	0	14,918,100	11,421,170	3,496,930	0
合計	64,645,100	0	0	64,645,100	47,135,814	17,509,286	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,241,639	レーザー血流計装置、実験試薬等
旅費	744,780	研究成果発表旅費(国際血栓止血学会)等
謝金・人件費等	8,320,393	研究員派遣、研究補助者人件費
その他	3,407,832	ペプチド合成、マイクロアレイ受託等
直接経費計	35,714,644	
間接経費計	11,421,170	
合計	47,135,814	

## 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
レーザー血流計	アドバンス社製 ALF-211RD	1	4,792,725	4,792,725	2011/5/31	山梨大学
ImageQuant LAS400miniシステム	GEヘルスケア・シヤパ ン	1	3,937,500	3,937,500	2012/2/24	山梨大学
動物用麻酔器	アコマ医科工業 株)FO-20A	1	612,266	612,266	2012/3/23	山梨大学