

## 総 説

# 新規血小板受容体 CLEC-2 とその生体内リガンド、ポドプラニン

井 上 克 枝

山梨大学大学院医学工学総合研究部臨床検査医学講座

**要 旨**：血小板は止血機能を担うだけでなく、脳梗塞や心筋梗塞など動脈血栓症の原因ともなるため、血小板活性化メカニズムの研究は動脈血栓症の治療、予防に重要である。これまで血小板凝集を惹起する受容体として、ADP 受容体やトロンビン受容体などの7回膜貫通型 G 蛋白結合型受容体と、コラーゲン受容体 glycoprotein VI などの免疫グロブリンスーパーファミリーが知られている。我々は強い血小板凝集を惹起する蛇毒蛋白、ロドサイチンの血小板上受容体の検索を通じて、上記のいずれでもない C-type lectin family に属する血小板活性化受容体、C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) を見出した。当初 CLEC-2 の生体内リガンドは不明であったが、それが新しいクラスの血小板活性化受容体であることと、その強い血小板活性化能から、抗血小板薬の新規ターゲット蛋白として注目された。最近我々は、ある種の腫瘍細胞に発現し、血小板を活性化することで転移を促進するといわれているポドプラニンという膜糖タンパクが CLEC-2 の生体内リガンドであることを見出した。CLEC-2 は抗血小板薬だけでなく、抗悪性腫瘍転移薬のターゲット蛋白としての可能性もはらんでいる。

**キーワード** 血小板, クレック 2, ポドプラニン, 血栓症, 癌の転移

### はじめに

動脈硬化によるアテローム性プラークが破裂すると、露出した内皮下組織のコラーゲンに、血小板が粘着し、活性化されて血管壁上に血栓が形成される。血栓が成長して血管内腔を塞ぐと心筋梗塞、脳梗塞といった動脈血栓症となる。動脈血栓症は癌に次ぐ日本人の死因であり、その発症の主役である血小板の研究は、動脈血栓症の治療・予防のために必須の研究である。

蛇毒は、凝固因子や血小板に作用する様々な蛋白を含み、血栓止血学の発展に寄与してきた<sup>1)</sup>。その中のひとつロドサイチン (rhodocytin) は、マレーまむし (*Calloselasma rhodostoma*) より精製された蛇毒で、強い血小板活性化能をも

つ。ロドサイチンは、1997年に明治薬科大学の森田らによって精製された（現在では Huang らが *aggrexin* として発表した蛇毒と同一とみられている<sup>2,3)</sup>）。筆者は、山梨医科大学大学院1年であった1997年に、森田らよりロドサイチンの供与を受け、その血小板活性化メカニズムの研究を始めた。ロドサイチン惹起血小板凝集は、コラーゲンと同じく、チロシンキナーゼ依存性であったが、血小板のコラーゲン受容体 glycoprotein (GP) VI/FcRγ-chain を欠損したマウスの血小板でも血小板活性化を惹起することから、もうひとつのコラーゲン受容体である integrin  $\alpha 2\beta 1$  に結合して血小板を活性化するのではないかという仮説を立てた。その後得られたデータはこの仮説を支持するものであり、この成果は2001年1月、*Journal of Biological Chemistry (JBC)* に掲載された<sup>4)</sup>。その2ヵ月後に、ドイツのグループよりロドサイチン

〒409-3898 山梨県中央市下河東1110

受付：2008年2月25日

受理：2008年2月26日

は integrin  $\alpha 2\beta 1$  には結合しないという論文が同じ JBC に掲載された<sup>5)</sup>。さらに4ヵ月後、スイスのグループから、「ロドサイチンは integrin  $\alpha 2\beta 1$  と glycoprotein (GP) Ib に結合して血小板を活性化する」ことが、やはり JBC で報告され<sup>6)</sup>、さながら「ロドサイチン論争」の様相を呈していた。そのわずか1ヵ月後、別のドイツのグループが、「ロドサイチンは、integrin  $\alpha 2\beta 1$  ノックアウトマウスの血小板、あるいは GP Ib のリガンド結合部位を欠いた血小板を活性化する」ことを JBC に報告した<sup>7)</sup>。この報告により、ロドサイチンは integrin  $\alpha 2\beta 1$  (あるいは GPIb) に結合するかもしれないが、別の未知の受容体にも結合し、血小板活性化はその受容体を介して起こっていることがほぼ確実となった。

その2年後、我々は初心に帰って、ロドサイチンのアフィニティークロマトグラフィーとマススペクトロメトリーを使用して、ロドサイチンの血小板上受容体の同定を試みた。得られたロドサイチン受容体は、今までに知られていない全く新しいクラスの血小板活性化受容体であった<sup>8)</sup>。

### C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)

ロドサイチンあるいは、陰性コントロールとしてグリシンを共有結合させた Sepharose 4B beads を作成し、ロドサイチン結合蛋白の血小板からの分離を試みた。細胞表面蛋白をビオチンラベルした後に可溶化した洗浄血小板に、ロドサイチンあるいはグリシンビーズを加えて結合する蛋白を電気泳動して、ストレプトアビジンで検出した。図 1A に示すように、32 kDa の蛋白のロドサイチンビーズへの特異的な結合が認められた。その他の蛋白はコントロールビーズでも認められるため、非特異と考えられる。次に、ビオチンラベルしない血小板を用いて上記を繰り返し、32 kDa 蛋白が含まれる部分のゲルを切り出してトリプシン消化の後、マススペクトロメトリーを行った。その結果、C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) がロドサイチ

ンビーズのみに特異的に結合することがわかった (図 1B)。この蛋白は2000年に報告された C-type lectin superfamily に属するタイプ II の膜蛋白で、肝臓や胎盤、骨髄に多くの発現が認められるとされていたが、その機能やリガンドは全く不明であった<sup>9)</sup>。CLEC-2 の血小板への発現は、抗 CLEC-2 抗体を用いたフローサイトメーター (図 1C) で確認された。ウエスタンブロット (図 1D) では 32 と 40 kDa のダブルバンドとして検出された。興味深いことに、CLEC-2 は細胞内ドメインに YXXL というアミノ酸配列がひとつある。これは、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM; YXXL-(X)<sub>10-12</sub>-YXXL) というシグナリングモチーフの半分である。ITAM は免疫系細胞の受容体に多くみられ、チロシンキナーゼ依存性の活性化信号を惹起するのに必須の配列である。ロドサイチン惹起血小板凝集はチロシンキナーゼ依存性であることから、CLEC-2 がロドサイチン受容体である可能性がいつそう高まった。

### ロドサイチン刺激による CLEC-2 発現培養細胞の蛋白質チロシンリン酸化反応

CLEC-2 がロドサイチンの活性化受容体で、チロシンリン酸化依存性の活性化信号を惹起するという確証を得るために、CLEC-2 を発現する培養細胞を使用した。CLEC-2 遺伝子をトランスフェクションした 293T-Rex 細胞は、ドキシサイクリンを加えることで、その発現が誘導される (図 2A)。図 2B に示すように、ロドサイチン刺激はドキシサイクリン処理した (CLEC-2 を発現した) 細胞にのみ、蛋白質チロシンリン酸化反応を惹起し、溶媒で処理した (CLEC-2 を発現していない) 細胞には変化をもたらさない。このことから CLEC-2 はロドサイチンの血小板活性化受容体であることが確認された。これまで血小板凝集を惹起する受容体として、ADP 受容体やトロンビン受容体などの7回膜貫通型 G 蛋白結合型受容体と、コラーゲン受容体 GPVI などの免疫グロブリンスーパーファミリーが知られている。CLEC-2 は上

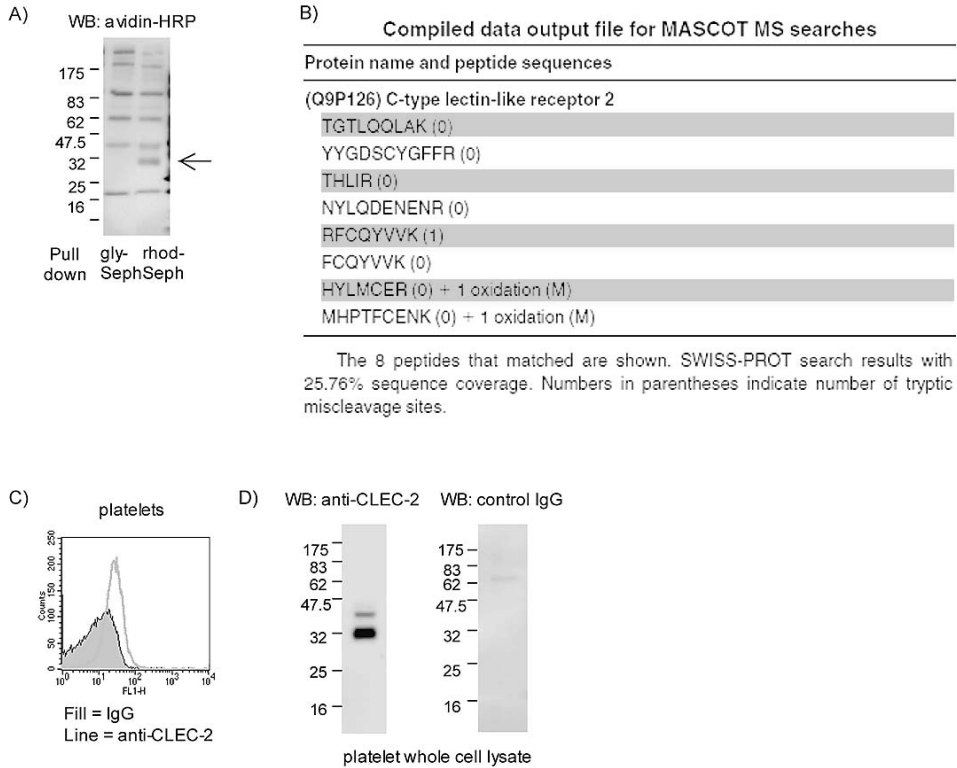


図1. ロドサイチンビーズに特異的に CLEC-2 が結合した

A) ビオチンラベルした洗浄血小板を lysis buffer で可溶化した。これらをプレクリアした後、ロドサイチンビーズ (rhod-Seph) あるいはグリシンビーズ (gly-Seph) を加え、4°C で4時間インキュベートした。ビーズを洗浄後、SDS sample buffer でビーズに結合した蛋白を horse radish peroxidase-avidin で検出した。B) MASCOT search tool で SWISS-PROT を検索した結果。C) ヒト洗浄血小板をコントロールヤギ IgG あるいは抗 CLEC-2 抗体とインキュベート後、FITC ラベル抗ヤギ IgG 抗体で染色し、フローサイトメーターで検出した。D) 洗浄血小板を SDS sample buffer で可溶化、SDS-PAGE 電気泳動の後、抗 CLEC-2 抗体あるいはコントロールヤギ IgG でウエスタンブロットした。(文献8より引用、改変)

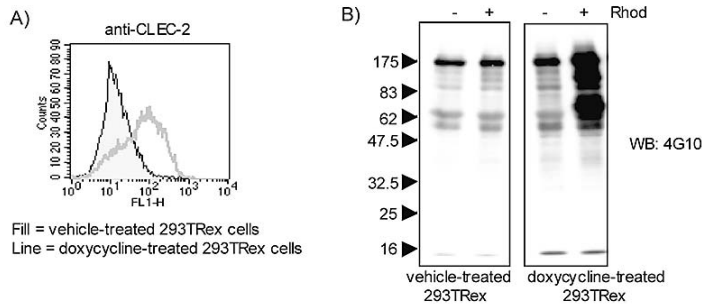


図2. CLEC-2 発現 293T-Rex 細胞がロドサイチンに選択的に反応する

A) CLEC-2 を tet repressor のもとに発現している 293T-Rex 細胞に、溶媒あるいはドキシサイクリンを加えた。24-48 hr 後に CLEC-2 の発現をフローサイトメーターで確認した。B) 溶媒あるいはドキシサイクリン処理 293T-Rex 細胞をロドサイチンで刺激し、SDS sample buffer で溶解した。SDS-PAGE 電気泳動後、抗ホスホチロシン抗体 (4G10) で蛋白質チロシン酸化を検出した。(文献8より引用、改変)

記のいずれでもない C-type lectin family に属し、全く新しいクラスの血小板活性化受容体であった。

### CLEC-2 による血小板活性化信号

次に CLEC-2 による血小板活性化メカニズムを検討した。この過程の詳細は省き、結果のみを図 3A に示す。ロドサイチンが CLEC-2 に結合すると、チロシンキナーゼの一種である Src family kinase が CLEC-2 の YXXL をリン酸化する。リン酸化された YXXL モチーフに、別のチロシンキナーゼである Syk がその SH2 ドメインというリン酸化チロシン結合モチーフで結合して、活性化される。Syk はその後、LAT, SLP-76 といったアダプター蛋白をチロシンリン酸化し、最終的には phospholipase Cgamma2 の活性化、血小板凝集へとつながってゆく。

この活性化メカニズムは、コラーゲン受容体 GPVI による血小板活性化メカニズムに酷似している<sup>10)</sup>。GPVI は ITAM モチーフを持つ FcR $\gamma$ -chain と恒常的に結合している。コラーゲンが GPVI に結合すると、Src family kinase が活性化され、FcR $\gamma$ -chain の ITAM がチロシンリン酸化される。リン酸化された ITAM には、チロシンキナーゼ Syk がその 2 つの SH2 domain を用いて結合することで活性化を受け、その後の活性化信号は CLEC-2 と同様である (図 3B)。コラーゲン惹起血小板凝集と異なる点は、GPVI/FcR $\gamma$ -chain はふたつの YXXL (ITAM) を用いて Syk を活性化するが、CLEC-2 はひとつの YXXL モチーフで (atypical ITAM) で Syk を活性化している点である。Syk の活性化メカニズムとして、ITAM によるもの、integrin  $\beta$ 3 の細胞内ドメインにある NPTY モチーフによるものがある<sup>11)</sup>。このデータが得られた当時は、atypical ITAM による Syk の活性化は報告がなく、新しい Syk の活性化メカニズムを発見したと色めきたったが、程なく他の C-type lectin family 蛋白である  $\beta$ glucan 受容体 dectin-1 も細胞内ドメインにひとつの YXXL をもち、Syk を活性化することが報告された<sup>12)</sup>。Atypical

ITAM による Syk の活性化は、普遍的な第 3 の Syk 活性化メカニズムと考えられ、ITAM による活性化とどのような差があるのか興味深い。

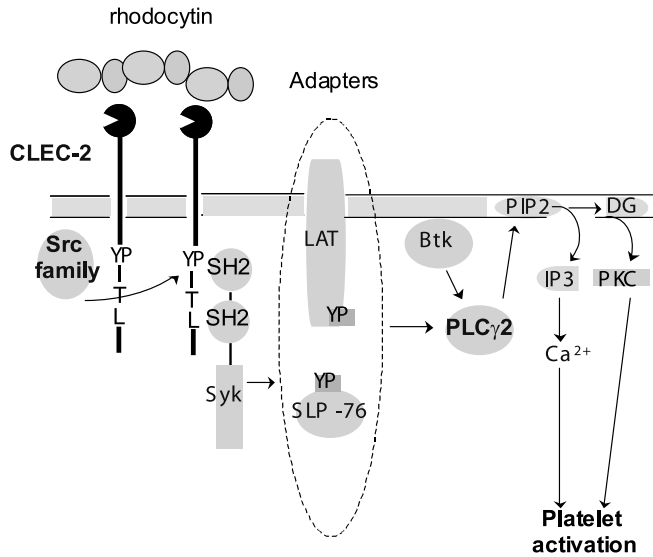
### CLEC-2 の生体内リガンドは何か?

CLEC-2 は血球系では単球、樹状細胞、NK 細胞、顆粒球に発現していると報告された<sup>9)</sup>。しかし、マウス巨核球とその他 30 系統の血球由来細胞の serial analysis of gene expression (SAGE) library による検討 (Michael G. Tomlinson, Victoria L. Heath, Stephen P. Cobbold, and Steve P. Watson, 未発表データ) と、フローサイトメーターと免疫染色による蛋白レベルでの発現解析の結果<sup>13)</sup>、CLEC-2 は巨核球・血小板系に特異的な蛋白であることが明らかとなった。以上のデータと、CLEC-2 の強力な血小板凝集惹起能を考えあわせると、CLEC-2 が生体での血栓止血において何らかの役割を担っている可能性は高く、巨核球・血小板系に特異的な発現も、抗血小板薬の新規ターゲット蛋白として有用な性質である。これまで血小板凝集を惹起する受容体として、ADP 受容体やトロンビン受容体などの 7 回膜貫通型 G 蛋白結合型受容体と、Fc 受容体 Fc $\gamma$ RIIA やコラーゲン受容体 GPVI などの免疫グロブリンスーパーファミリーが知られていた。CLEC-2 はこれらのいずれでもない C-type lectin family に属する全く新しいクラスの受容体であり、CLEC-2 をターゲットとする薬剤は既存の抗血小板薬との併用でも相加、相乗効果を示す可能性もある。

抗血小板薬のターゲット蛋白としての開発には、CLEC-2 は蛇毒ロドサイチンと結合するが、生体内ではどのようにして活性化されるのかを検討することが必須であり、次に我々は CLEC-2 の生体内リガンドの検索にとりかかった。

CLEC-2 が動脈血栓症の発症に関わっていると仮定すると、その生体内リガンドは血管内皮下組織にある物質ではないかと考え、網羅的な検索を行うことを検討した。しかし、CLEC-2 の生体内リガンドはロドサイチンと類似の配列を持つのではないかと考え、まずデータベース

A) CLEC-2 信号伝達系



B) GPIIb/IIIa 信号伝達系

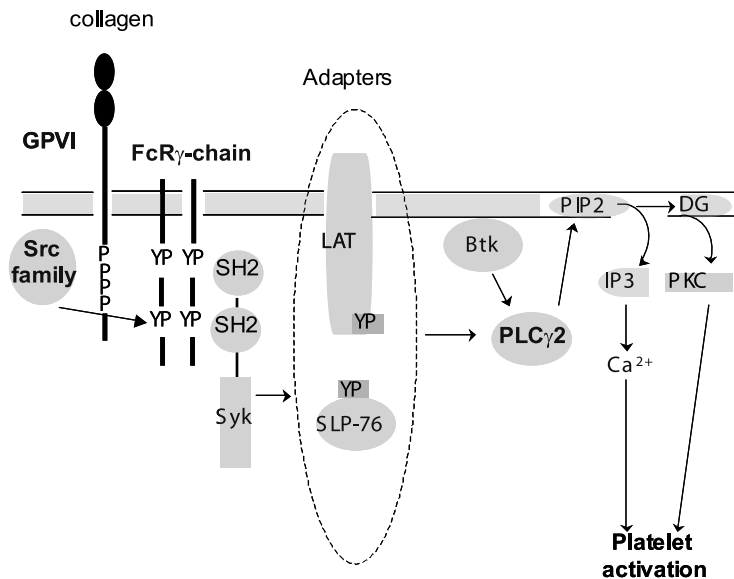


図 3. CLEC-2 と GPIIb/IIIa 信号伝達系の比較

で検索してみたところ、versican というプロテオグリカンのコア蛋白にホモロジーが認められた。Versican は動脈硬化巣に多く集積し、血小板粘着を促進するという報告もされており<sup>14)</sup>、CLEC-2 のリガンドとして申し分ない (?) 性

質を兼ね備えていた。早速、食肉流通センターよりウシ大動脈を貰い受け、versican を粗精製 (というより versican が多く含まれる分画) した。粗精製物とリコンビナント CLEC-2 蛋白の結合は Biacore で確認できたが、粗生成物によ

る血小板の活性化が確認できないこと、純粋な versican を得ることがきわめて困難であることなどから、研究は行き詰った。

### 膜糖タンパク、ポドプラニン (podoplanin)

そのような折、知り合いの研究者からひとつの論文を紹介された。それは、ある種の腫瘍細胞の表面に発現しているポドプラニンという膜糖蛋白が、血小板凝集を惹起するというものであった<sup>15)</sup>。昔から癌細胞は血小板を活性化することで、自身の転移を促進するといわれていた<sup>16,17)</sup>。そのメカニズムと考えられているのが、1) 癌細胞の膜蛋白や放出される血小板活性化因子が血小板を活性化し、癌細胞周囲に血小板が粘着する、血小板に囲まれることで、癌細胞は血管内で免疫系やシェアストレスから保護される、2) 癌細胞を取り囲む血小板上の接着分子により、転移の足場が提供される、3) 活性化血小板から放出される血管新生因子や増殖因子、あるいは接着分子により、癌とその栄養血管が成長し、腫瘍の定着が促進される、というものである。ポドプラニンは高転移性マウス大腸癌細胞株に高発現する血小板凝集惹起蛋白として同定され<sup>18)</sup>、aggrus と名づけられたが、後にポドプラニンと同一分子であることがわかった<sup>15)</sup>。ポドプラニンは扁平上皮癌、脳腫瘍、精巣腫瘍、中皮腫などのヒト腫瘍で発現が亢進しており<sup>19,24)</sup>、悪性度と相関しているという報告もある<sup>23,25)</sup>。その転移促進活性のため、血小板上のポドプラニン受容体が何かということに大きな関心が寄せられていた。

件の論文では、ポドプラニン発現細胞を血小板浮遊液に加えると、長いラグタイムを伴って、血小板凝集が惹起されていた<sup>15)</sup>。長いラグタイムがどのような意味を持つのか、またどのようなメカニズムによるのかは不明であるが、コラーゲンやロドサイチンも長いラグタイムの後に血小板凝集が惹起される。このことから単純に、ポドプラニンはロドサイチン受容体である CLEC-2 を介して血小板凝集を惹起するのではないかと考えた我々は、ポドプラニン惹起血

小板凝集の性質を、既知の血小板活性化物質 (アゴニスト) による凝集の性質と比較することから実験を開始した<sup>26)</sup>。

### CLEC-2 の生体内リガンド、ポドプラニン

洗浄血小板をポドプラニン発現 CHO 細胞で刺激すると、強い血小板凝集が惹起される (図 4Ai)。これは、刺激前の血小板浮遊液は濁った状態で光がほとんど透過しないが、アゴニスト刺激で血小板同士が凝集塊を形成すると光の透過度が上昇することを利用した比濁法で検討している。この凝集は、ポドプラニンを発現しない CHO 細胞では惹起されない上 (図 4Aii)、抗ポドプラニン抗体で抑制されるため (図 4B)、特異的にポドプラニンにより惹起されたものであるといえる。ポドプラニン惹起血小板凝集は、チロシンキナーゼである Src family kinase の特異的抑制剤の PP2 で完全に抑制されるが、そのネガティブコンパウンドである PP3 では抑制されない (図 4C)。このようにチロシンキナーゼ依存性に血小板凝集を惹起するアゴニストとして、GPVI を介したコラーゲン惹起血小板凝集と CLEC-2 を介したロドサイチン惹起血小板凝集がある。そこで、GPVI/FcR $\gamma$ -chain を欠損したマウスの血小板を、これらのアゴニストとポドプラニンで刺激したところ、予想通りロドサイチン凝集は惹起され、コラーゲン凝集は惹起されなかった (図 5)。ポドプラニンはロドサイチン同様、コラーゲン受容体 GPVI/FcR $\gamma$ -chain を欠損したマウスの血小板においても凝集を惹起した (図 5)。このことから、ポドプラニンは GPVI に作用するものではないことが明らかとなった。ポドプラニン受容体が CLEC-2 である可能性を検討するため、我々はリコンビナント CLEC-2 とポドプラニン発現 CHO 細胞の結合をフローサイトメーターで確認することにした。

CLEC-2 の細胞外ドメインと IgG Fc の融合蛋白を、ポドプラニン発現、非発現細胞に加えてその結合を、蛍光標識した抗 IgG 抗体で検出した。図 6 に示すように、リコンビナント

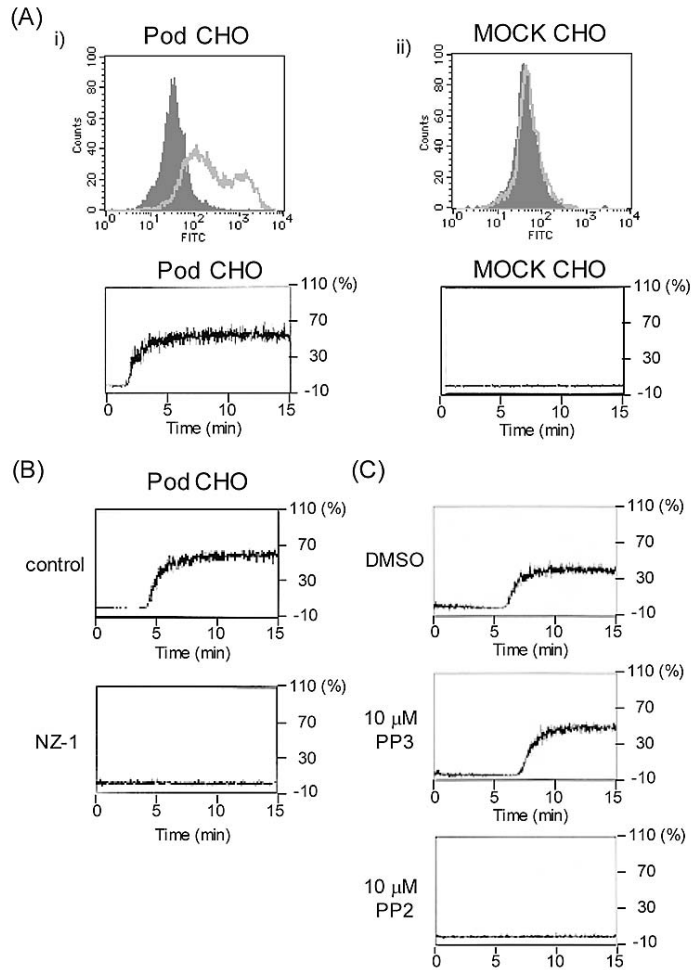


図4. Src kinase 依存性のポドプラニン惹起血小板凝集

A) CHO細胞にポドプラニンをコードするプラスミド (i Pod CHO) あるいはコントロールプラスミド (ii MOCK CHO) を一過性発現させ、発現をフローサイトメーターで確認した.  $1.5 \times 10^6/ml$ ポドプラニン発現 CHO細胞 (i Pod CHO) あるいはコントロール CHO細胞 (ii MOCK CHO) で洗浄血小板 ( $1 \times 10^9/ml$ ) を刺激し、血小板凝集を観察した. B) 血小板を  $50 \mu g/ml$ コントロール抗体あるいは抗ポドプラニン抗体 (NZ-1) で処理した後、ポドプラニン発現 CHO細胞で刺激して血小板凝集を観察した. C) 血小板を DMSO,  $10 \mu M$  PP3あるいは  $10 \mu M$  PP2で処理した後、ポドプラニン発現 CHO細胞で刺激して血小板凝集を観察した. (文献26より引用, 改変)

CLEC-2はポドプラニン発現細胞に結合するが (図6Aii), リコンビナント GPVIは結合しない (図6Aiii) ことが示された。逆に, CLEC-2発現細胞へのリコンビナントポドプラニンの結合も確認された (図6B)。次に, ポドプラニン発現 CHO細胞にリコンビナント CLEC-2を加え

て, ポドプラニンの CLEC-2 結合部位を飽和させてから血小板浮遊液に加えると, 血小板凝集は完全に抑制された (図6C)。これらのことから, ポドプラニンが CLEC-2 のリガンドであることが示された。

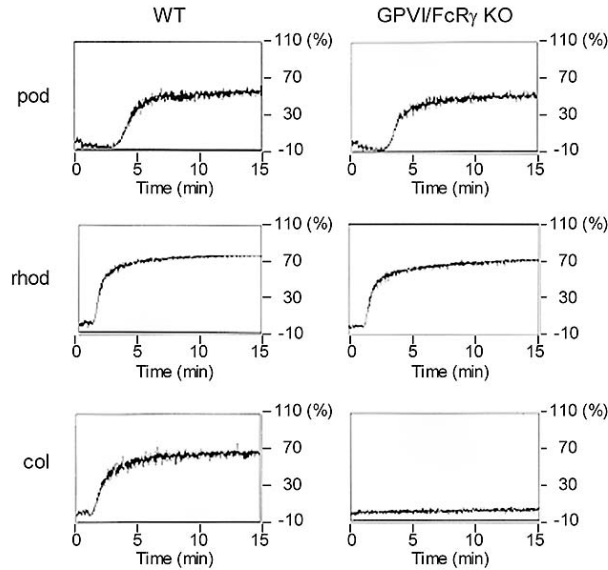


図5. GPVI非依存性であるポドプラニン惹起血小板凝集  
野生型あるいはGPVI/FcR $\gamma$ chain欠損マウスより採血し、洗浄血小板を作成し、 $1.5 \times 10^6$ /mlポドプラニン発現CHO細胞 (pod), 10 nMロドサイチン (rhod),  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ コラーゲン (col) で刺激、血小板凝集を観察した。(文献26より引用, 改変)

### CLEC-2—ポドプラニン相互作用の病態生理学的役割

CLEC-2—ポドプラニン相互作用は癌の血行性転移を促進しているのだろうか？ポドプラニンとCLEC-2との結合を阻害する抗ヒトpodoplanin抗体 (NZ-1) は、ポドプラニン惹起血小板凝集を阻害した<sup>26,27)</sup> (図4B)。ヒトポドプラニン発現CHO細胞をコントロールIgGで処理したのち、ヌードマウスの尾静脈から投与すると、肺に血行性転移を起こすが、NZ-1あるいはNZ-1F (ab)<sup>2)</sup>とともに投与すると肺転移が有意に抑制された (図7)<sup>27)</sup>。以上の結果より、ヒトpodoplaninは、CLEC-2に結合することにより血小板凝集を起こし、さらに血行性転移に重要な役割を果たすことが示された。これより、CLEC-2—ポドプラニンの相互作用を抑制する薬剤が、癌の血行性転移の抑制薬となる可能性がでてきた。しかし、CLEC-2—ポドプラニン結合の抑制薬が、万能の抗悪性腫瘍転移薬になるとは考えづらい。ポドプラニ

ンはすべての癌に発現しているわけではなく、扁平上皮癌、脳腫瘍、精巣腫瘍、中皮腫などに限られ、ヒトの場合腺癌では発現が見られない。また、癌が血小板を活性化するメカニズムもポドプラニンに限らず、腫瘍が産生するトロンビンによる活性化や他の腫瘍細胞膜蛋白による活性化も報告されている。それでもなお、転移のメカニズムは千差万別であり、一網打尽に転移が抑制できるという夢の抗悪性腫瘍転移薬はおそらく存在しないといわれている現状では、一部の血行性転移であっても抑制できる可能性のある抗悪性腫瘍転移薬は大いに価値があると思われる。

CLEC-2—ポドプラニン相互作用は血栓止血領域ではどのような役割を果たしているのだろうか？ポドプラニンは血管内皮には発現せず (もともと、発現していたら血管内で血小板凝集が惹起されてしまうかもしれないが)、内皮下組織に存在する蛋白でもない。現在我々は、血管の病的部位にのみポドプラニンが発現して



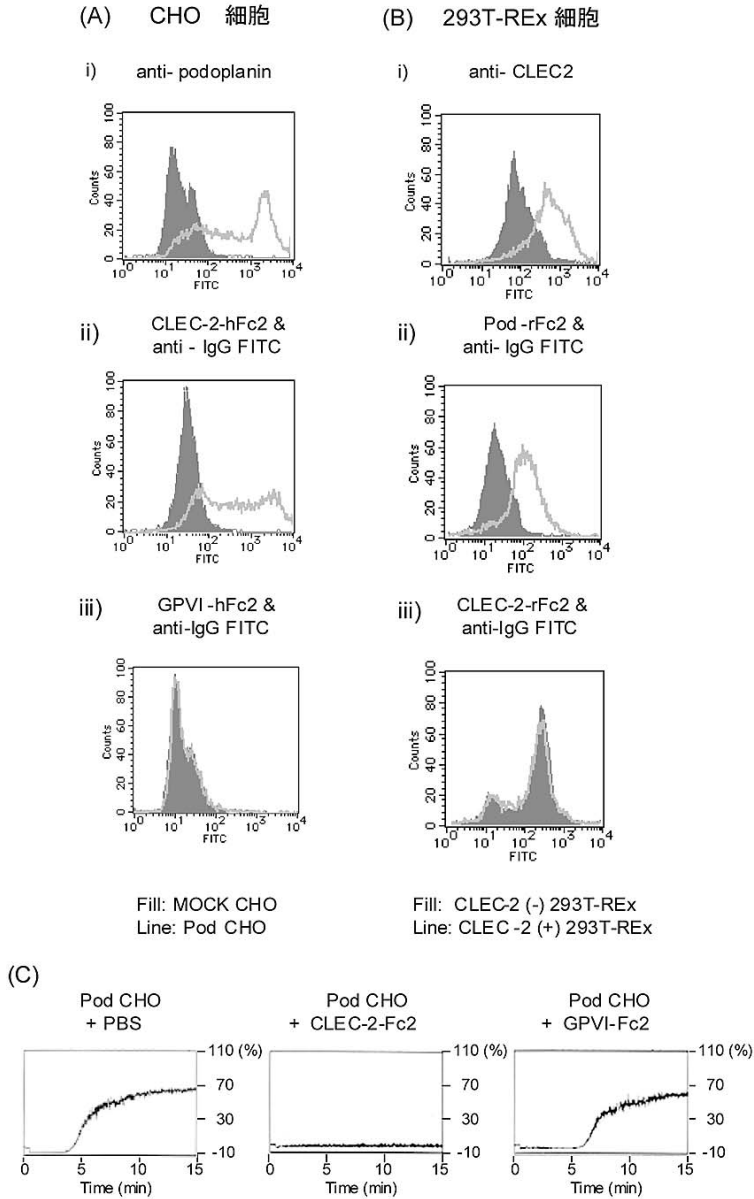


図6. ポドプランインと CLEC-2 の結合

A) i) ポドプランインをコードしたプラスミド (Pod CHO) とコントロールプラスミド (MOCK CHO) を CHO 細胞に一過性発現させ、ポドプランインの発現をフローサイトメーターで確認した。ii) iii) ポドプランイン発現、非発現 CHO 細胞とリコンビナント CLEC-2 あるいはリコンビナント GPVI の結合をフローサイトメーターで確認した。B) i) ドキシサイクリンあるいは溶媒で処理した 293T-REx 細胞での CLEC-2 発現をフローサイトメーターで確認した。ii) iii) CLEC-2 発現、非発現 CHO 細胞とリコンビナントポドプランインあるいはリコンビナント CLEC-2 (negative control) の結合をフローサイトメーターで確認した。C) ポドプランイン発現 CHO 細胞と PBS, リコンビナント CLEC-2, あるいはリコンビナント GPVI をインキュベートした後、洗浄血小板に加えて血小板凝集を観察した。(文献 26 より引用, 改変)

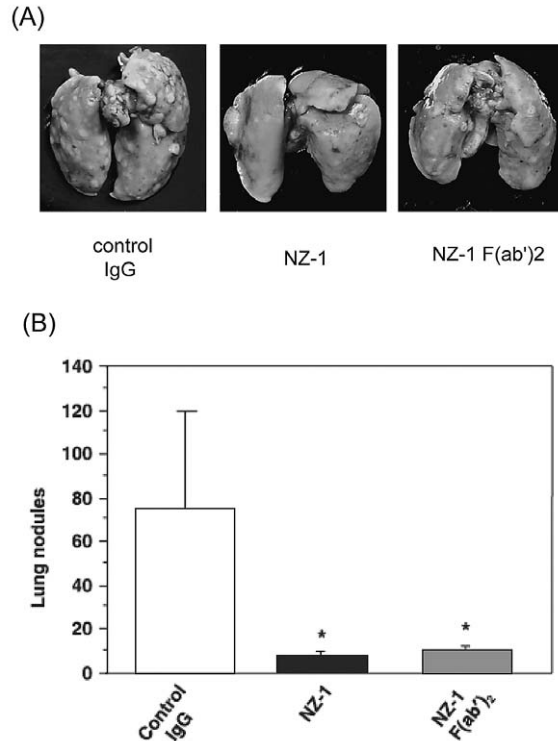


図7. 抗ポドプラニン抗体 (NZ-1) のポドプラニン発現 CHO 細胞の肺転移に及ぼす影響  
 ポドプラニン発現 CHO 細胞 ( $2.5 \times 10^6$  cells/ml) を  $150 \mu\text{g}$  コントロール IgG, NZ-1 あるいは NZ-1 F (ab)'<sub>2</sub> とインキュベートした後, Balb/cnu/nu マウス 1 匹あたり  $2.5 \times 10^6$  cells を尾静脈より投与した。20 日後, マウスを解剖して肺の写真撮影するとともに (A), 表面の結節数を計数した (B)。各群 5 匹ずつ, データは平均  $\pm$  SD で表示した。\* は t 検定により  $p < 0.01$  となった群。(文献 27 より引用, 改変)

いる可能性を検討するとともに, CLEC-2 の他のリガンドについても可能性を探っている。

ポドプラニン腫瘍以外の正常組織にも発現している。例えば, リンパ管内皮には発現しているが, 血管内皮には発現していないので, リンパ管の特異的なマーカーとして広く利用されている。ポドプラニン欠損マウスはリンパ管の発生異常が起こることから<sup>28)</sup>, リンパ管発生に必須な分子であることがわかるが, そのメカニズムは不明である。通常, リンパ管内皮と血小板は触れる機会はないが, 発生の段階では触れる可能性があると考えられる。CLEC-2 による血小板活性化に必須のシグナル分子, SLP-76

あるいは Syk ノックアウトマウスではリンパ管と血管の分離異常が生じるが, これらの分子は内皮細胞に発現していないという報告があり<sup>29)</sup>, これらの分子を発現している血球がこの過程に関わっていることが示唆される。また, 抗血小板薬を妊娠メスマウスに投与すると胎児にリンパ管異常が発生するという学会報告<sup>30)</sup>があり, これらを考え合わせると, ポドプラニンによる CLEC-2 を介した血小板活性化がリンパ管と血管の分離に関わっている可能性もあるといえる。

## おわりに

これまで血小板というと動脈血栓症の担い手(?)としての側面でしか研究されてこなかったきらいがある。CLEC-2 とその生体内リガンド, ポドプラニンの発見は, 血小板の癌の転移や増殖での役割, あるいはリンパ管新生での役割, といった新たな側面に光を当てる効果もあったのではないか。山梨大学発のこの研究を大きく発展させて行きたいと考えている。

## 文 献

- 1) Morita T: Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant, procoagulant, and platelet-modulating activities. *Toxicon*, **45**: 1099–1114, 2005.
- 2) Huang TF, Liu CZ, Yang SH: Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from snake (*Calloselasma rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a glycoprotein Ia/IIa agonist. *Biochem J*, **309**: 1021–1027, 1995.
- 3) Shin Y, Morita T: Rhodocytin, a functional novel platelet agonist belonging to the heterodimeric C-type lectin family, induces platelet aggregation independently of glycoprotein Ib. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**: 741–745, 1998.
- 4) Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Kainoh M, Shin Y, Wu Y, *et al*: Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin alpha 2beta 1). Involvement of GPIa/IIa-associated src and protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **276**: 1643–1652, 2001.
- 5) Eble JA, Beermann B, Hinz HJ, Schmidt-Hedrich A: alpha 2beta 1 integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *J Biol Chem*, **276**: 12274–12284, 2001.
- 6) Navdaev A, Clemetson JM, Polgar J, Kehrel BE, Glauner M, *et al*: Aggretin, a heterodimeric C-type lectin from *Calloselasma rhodostoma* (malayan pit viper), stimulates platelets by binding to alpha 2beta 1 integrin and glycoprotein Ib, activating Syk and phospholipase Cgamma 2, but does not involve the glycoprotein VI/Fc receptor gamma chain collagen receptor. *J Biol Chem*, **276**: 20882–20889, 2001.
- 7) Bergmeier W, Bouvard D, Eble JA, Mokhtari-Nejad R, Schulte V, *et al*: Rhodocytin (aggretin) activates platelets lacking alpha (2) beta (1) integrin, glycoprotein VI, and the ligand-binding domain of glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem*, **276**: 25121–25126, 2001.
- 8) Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Garcia A, Eble JA, Pohlmann S, *et al*: A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*, **107**: 542–549, 2006.
- 9) Colonna M, Samaridis J, Angman L: Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol*, **30**: 697–704, 2000.
- 10) Nieswandt B, Watson SP: Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, **102**: 449–461, 2003.
- 11) Woodside DG, Oberfell A, Talapatra A, Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH: The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem*, **277**: 39401–39408, 2002.
- 12) Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, *et al*: Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity*, **22**: 507–517, 2005.
- 13) Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, *et al*: S. DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol*, **80**: 8951–8960, 2006.
- 14) Mazzucato M, Cozzi MR, Pradella P, Perissinotto D, Malmstrom A, Morgelin M, Spessotto P, Colombatti A, De Marco L, Ferris R: Vascular PG-M/versican variants promote platelet adhesion at low shear rates and cooperate with collagens to induce aggregation. *FASEB J*, **16**: 1903–1916, 2002.
- 15) Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, Tsuruo T: Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem*, **278**: 51599–51605, 2003.
- 16) Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK: Platelets and cancer. *Lancet Oncol*, **3**: 425–430, 2002.
- 17) Gupta GP, Massagué J: Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest*, **114**: 1691–1693, 2004.
- 18) Watanabe M, Okochi E, Sugimoto Y, Tsuruo T: Identification of a platelet-aggregating factor of murine colon adenocarcinoma 26: Mr 44,000 membrane protein as determined by monoclon-

- al antibodies. *Cancer Res*, **48**: 6411–6461, 1988.
- 19) Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M: Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*, **166**: 913–921, 2005.
  - 20) Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, *et al.*: Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*, **26**: 195–200, 2005.
  - 21) Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, *et al.*: Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene*, **23**: 8552–8556, 2004.
  - 22) Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nakazawa Y, Kunita A, *et al.*: Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol*, **111**: 563–568, 2006.
  - 23) Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, *et al.*: Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol*, **111**: 483–488, 2006.
  - 24) Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Uchiyama N, Amano K, *et al.*: Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **349**: 1301–1307, 2006.
  - 25) Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, *et al.*: Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer*, **107**: 563–569, 2006.
  - 26) Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, *et al.*: Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem*, **282**: 25993–26001, 2007.
  - 27) Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, *et al.*: H. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci*, **99**: 54–61, 2008.
  - 28) Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, *et al.*: T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*, **22**: 3546–3556, 2003.
  - 29) Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, *et al.*: Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*, **299**: 247–251, 2003.
  - 30) Uhrin P, Zaujec J, Bauer M, Breuss J, Alitalo K, *et al.*: Binder Podoplanin-induced platelet aggregation mediates separation of blood and lymphatic vessels. *Vasc. Pharm*, **45**: 190, 2006.

### The Novel Platelet Activation Receptor CLEC-2 and Its Internal Ligand Podoplanin

Katsue SUZUKI-INOUE

*Department of Clinical and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi*

**Abstract:** Platelets play a critical role in the events that lead to thrombus formation and cessation of bleeding at sites of damage to the vasculature. They also play a major role in thrombotic diseases such as stroke and myocardial infarction. A full understanding of the mechanism of platelet activation is essential toward an understanding of cardiovascular disease and new forms of therapeutic intervention. Two types of platelet activation receptors have been identified to date, G protein-coupled receptors and immunoglobulin super family. We have recently identified a novel class of platelet activation receptor, c-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2), which belongs to c-type lectin superfamily and induces powerful platelet aggregation when it is stimulated by the snake toxin rhodocytin. Although its physiological ligand had not been identified, CLEC-2 attracted attention of researchers as a novel target of anti-platelet drug because of its ability to stimulate powerful platelet aggregation and its specific expression in platelets and megakaryocytes. We have recently revealed that the CLEC-2 ligand that acts in vivo is podoplanin, which is a sialoglycoprotein on the surface of tumor cells and involved in tumor cell-induced platelet aggregation and tumor metastasis. CLEC-2 may be not only a novel target of anti-platelet drug but also that of anti-metastatic drug.

**Key words:** platelets, CLEC-2, podoplanin, thrombosis cancer metastasis