

腎臓の発生と機能保持における血小板 CLEC-2 の役割

井上克枝

山梨大学大学院総合研究部 医学域 臨床検査医学

【研究の背景】

私達は血小板活性化受容体 CLEC-2 を同定し、その生体内リガンドがある種の癌細胞やリンパ管内皮に発現するポドプラニン(PDPN)であることを見出した¹⁾。血小板 CLEC-2 は癌細胞やリンパ管内皮の PDPN と結合して、癌の血行性転移の促進や、胎生期のリンパ管と血管の分離促進といった、血栓止血以外の病態生理学的機能を果たすことも見出した¹⁾。PDPN は腎足細胞にも発現するため、血小板は CLEC-2 を通じて、腎臓の発生や機能にも何らかの影響を及ぼすのではないかと考えた。血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスの腎臓の HE 染色像では、メザンギウム領域が拡大し、糸球体数が有意に増加していた。

【目 的】

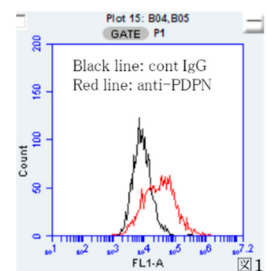
私達は「糸球体毛細血管より漏出した血小板 CLEC-2 がポドプラニンと結合して血小板が活性化されることがメサンギウム細胞(MCs)の収縮を促して増殖を抑制する。その結果メザンギウム領域の過度な拡大が抑制され、腎血流量が維持される」という仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説を検証することである。

【方 法】

1. CLEC-2 が腎臓内のどの細胞の PDPN と結合するのか検討する。足細胞の PDPN は糸球体基底膜の外側にあり、血小板と接触する可能性は少ない。MCs は糸球体毛細血管すぐ外側にあり、接触の機会があると考えられたため、初代培養 MCs の PDPN 発現をフローサイトメーターにて確認する。
2. 初代培養 MCs の増殖が、CLEC-2 あるいは血小板活性化で放出される放出物(APS)による刺激で促進されるか、細胞数カウントあるいは PCNA 染色で検討する。
3. CLEC-2 あるいは血小板活性化で放出される放出物(APS)による刺激で MCs の収縮能に関わる α -smooth muscle actin(α SMA)の発現が変化するかをウエスタンブロットで検討する。
4. 抗 CLEC-2 抗体の腹腔内投与後による CLEC-2 depleted mouse 血清を採取して BUN, Cre を測定する。
5. 電子顕微鏡にて、CLEC-2 欠損マウスと野生型マウスの腎臓の構造に差が認められるか観察する。

【結 果】

1. 初代培養 MCs に PDPN 発現が確認された。
2. 初代培養 MCs に APS、APS-HCl(酸性処理で TGF- β を活性化)、リコンビナント CLEC-2、対照蛋白(rb Fc)を、添加して、48 時間後の細胞数を計測したところ、APS HCl で低下傾向であったが、すべて有意差はなかった。細胞増殖を表す PCNA の発現も同様に、APS HCl で低下傾向であった。



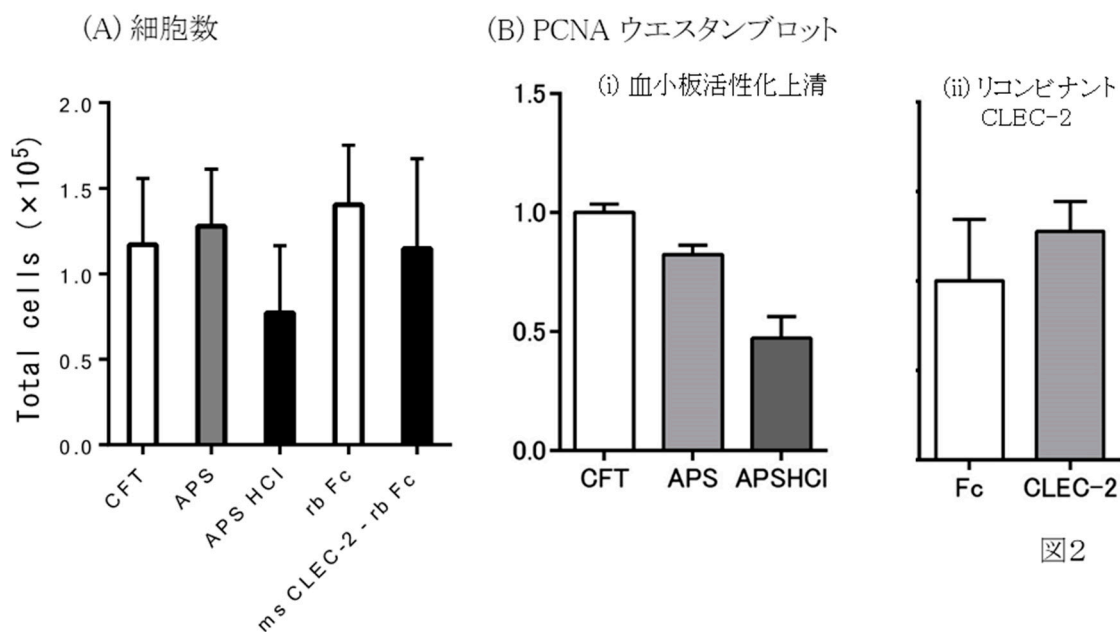


図2

3. リコンビナント CLEC-2, APS, APS-HCl 処理で MCs の α -smooth muscle actin (α SMA) の発現に変化はなかった。

α -SMA ウェスタンブロット

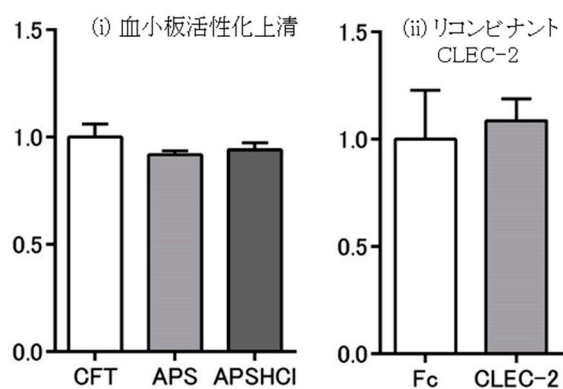


図3

4. 抗 CLEC-2 抗体の腹腔内投与による CLEC-2 depleted mouse の血清 BUN, Cre は control IgG 投与マウスと変化がなかった。

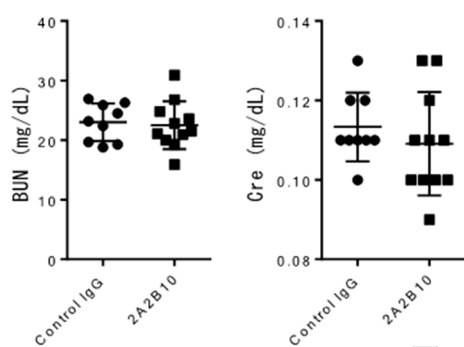


図4

5. 電子顕微鏡にて、CLEC-2 欠損マウスと野生型マウスの腎臓の構造に差が認められるか観察する。共同研究者にサンプルを送付したところで、結果は未着。

【考 察】

APS-HCl で MCs の増殖が、有意差はなかったものの、抑制傾向となったことは、仮説と矛盾しない結果であった。有意差が認められなかったのは MCs の starvation を行わなかったためかもしれない。HCl 処理でより低下傾向となったことから、原因物質は TGF- β が考えられる。APS やリコンビナント CLEC-2 で α SMA の発現に差は認められなかったが、元々 MCs には多くの α SMA が発現しているため、大きな差は認められなかった可能性がある。今後は α SMA 量ではなく、Rho 活性化やミオシン軽鎖のリン酸化など、収縮状態を検討する。抗 CLEC-2 抗体による短期間 CLEC-2 depletion では BUN, Cre に影響が出るほどの作用はなかったが、今後は長期間あるいはイヌリンを使用した GFR の測定を行う。さらに、電子顕微鏡による腎構造の観察を継続する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

血小板の発生や腎機能維持の機序が判明すれば、抗血小板療法の腎機能への詳細な影響の程度が判明する。

【参考・引用文献】

1. Suzuki-Inoue K, Osada M, Ozaki Y. Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 219-229.