血小板活性化受容体 CLEC-2 とその内因性リガンドが ポドプラニンであることの同定と、 両者の結合の病態生理学的役割の解明

井上克枝*

Identification of the platelet activation receptor CLEC-2, its endogenous ligand podoplanin, and pathophysiological roles of their interaction

Katsue SUZUKI-INOUE

要約：私達は、血小板活性化蛇毒ロドサイチンの受容体として、新規血小板活性化受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) を血小板上に同定した。また CLEC-2 の生体内リガンドが、ポドプラニンと呼ばれる膜蛋白であることを発見した。ポドプラニンはある種の腫瘍細胞や、リンパ節の細網細胞、腎臓のポドサイト、リンパ管内皮に発現しているが、血管内皮には発現していない。血小板の CLEC-2 は通常の状態ではポドプラニンと接触できないが、発生の途中や、病的状態では接触しうる。私達は CLEC-2 とポドプラニンの結合が様々な病態生理学的役割を持つことを解明した。血小板 CLEC-2 は腫瘍細胞に発現するポドプラニンと結合して、腫瘍の血行性転移を促進する。また、血小板 CLEC-2 は胎生期に血管から分化して分離するリンパ管内皮細胞のポドプラニンと結合することで、リンパ管と血管の分離を促進する。CLEC-2 はヒトではほぼ血小板・巨核球特異的に発現しているが、流血中で血小板活性化依存性にホモフィリックに結合することで血栓を安定化している。私達は骨髓中にポドプラニンを発現する骨髓細網細胞様細胞を同定した。巨核球の CLEC-2 と骨髓細網細胞様細胞のポドプラニンとの結合で、巨核球の増殖や血小板産生が促進されるという新しい骨髓微小環境を提唱した。CLEC-2 の臨床応用として、血小板活性化に伴って遊離する soluble CLEC-2 を開発し、生体内血小板活性化のマーカーとすることを試みた。以上、私達は CLEC-2 とそのリガンドの同定を通じて、血小板が様々な血栓止血以外の役割を持つことを示し、臨床応用に向けた取り組みを展開している。

Key words: platelets, CLEC-2, podoplanin, tumor metastasis, lymphangiogenesis

1. はじめに

蛇毒は、多種類のヒトの血小板や凝固因子を活性化する成分を含み、その研究は血栓止血学の発展に貢献してきた。私達は、血小板活性化蛇毒ロドサイチンの受容体として、新規血小板活性化受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) を同定した¹⁾。ま

た CLEC-2 の生体内リガンドが、ポドプラニンと呼ばれる膜蛋白であることを発見した²⁾。ポドプラニンはある種の腫瘍細胞や、リンパ節の細網細胞、腎臓のポドサイト、リンパ管内皮に発現しているが、血管内皮には発現していない³⁾。血小板の CLEC-2 は通常の状態ではポドプラニンと接触できないが、発生の途中や、病的状態では接触しうる。私達は CLEC-2 とポドプラニンの結合が様々な病態生理学的役割を持つことを解明した。また、血小板活性化に伴って遊離する soluble CLEC-2 を開発し、生体内血小板活性化のマーカーとすることを試みた。本稿では、CLEC-2 研究に関して、私達のこれまで 10 年

*責任者連絡先：
山梨大学大学院総合研究部医学域臨床検査医学
〒409-3815 山梨県中央市下河東 1110
Tel: 055-273-1111, Fax: 055-273-6924
E-mail: katsuei@yamanashi.ac.jp

間の研究を中心に概説する。

2. C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) とポドプラニン

CLEC-2 の存在は 2000 年より知られていた。CLEC-2 は当初、ヒトの C-type lectin 様受容体をバイオインフォマティックスの手法を用いて解析することで同定された⁴⁾。Reverse transcriptase-PCR やノザンブロットでは、CLEC-2 mRNA (遺伝子は C-type lectin domain family 1, member B (Clec1b)) はヒト肝臓と、単球、樹状細胞、NK 細胞、顆粒球などいくつかの血球細胞に発現していたが、血小板や巨核球での発現は検討されていなかった⁴⁾。私達は、これまで知られていた血小板活性化物質とも異なる性質を持つ血小板活性化蛇毒ロドサイチンの受容体検索を行い、ロドサイチンのアフィニティークロマトグラフィーと MS/MS を通じて、血小板上に CLEC-2 を同定した¹⁾。ロドサイチンは辛、森田らによって精製されたが⁵⁾、現在では Huang らによって報告されていたアグレチン⁶⁾と同等と考えられている。CLEC-2 蛋白の発現解析では、ヒトでは、血小板と巨核球に多量に発現しており、わずかに肝臓 Kupffer 細胞と類洞内皮細胞に発現しているという報告がある⁷⁻¹⁰⁾。マウスでは、好中球¹¹⁾、樹状細胞¹²⁻¹⁴⁾、マクロファージ¹⁵⁾にも発現しているという。ただ、CLEC-2 欠損マウスを陰性対照に使用した最近の報告では、白血球の CLEC-2 の発現は、細胞の存在場所や炎症の有無によって異なることが報告された¹⁶⁾。CLEC-2 蛋白は恒常的に樹状細胞に発現しているわけではなく、リポ多糖によって刺激された際、腸管リンパ節内の一部の樹状細胞に CLEC-2 は発現している。また、CD11b^{high} Gr-1^{high} 細胞 (単球、顆粒球、NK 細胞の一部と B 細胞の一部) は CLEC-2 蛋白を発現している。しかし B 細胞の CLEC-2 蛋白は内因性に発現しているものではなく、血小板などから MHC-II 抗原提示やトロゴサイトーシス、マイクロパーティクルによって B 細胞表面に移動した蛋白であるという¹⁶⁾。

私達は CLEC-2 を血小板に同定した後、CLEC-2 の血小板での活性化機序を研究した。Dr. Steve P. Watson との共同研究で、様々なノックアウトマウ

スの血小板を使用した実験と、免疫沈降、ウエスタンブロットの結果、CLEC-2 はチロシンキナーゼ依存性の信号伝達系を持つことがわかった^{1, 17)}。CLEC-2 は細胞内に YXXL (X は任意のアミノ酸) というチロシンを含むシグナルモチーフをひとつ持つ。これは二つの YXXL を持つ、Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM, YXXL-(X6-8)-YXXL) の半分であることから、half ITAM とも呼ばれる。ロドサイチンあるいはポドプラニンにより CLEC-2 がクラスターリングされるとチロシンキナーゼの Src ファミリーキナーゼあるいは Syk により half ITAM のチロシンがリン酸化される。リン酸化 YXXL にチロシンキナーゼ Syk がその二つの SH2 ドメインで結合してさらに活性化される。Syk は SLP-76, LAT, といったアダプター蛋白や Vav1/Vav3 をチロシンリン酸化する。これらの反応によりチロシンキナーゼ Btk と phospholipase C γ 2 の活性化が生じ、細胞内 Ca²⁺ の増加と protein kinase C の活性化に続いて血小板凝集が生じる。このシグナル伝達は免疫グロブリンファミリーのコラーゲン受容体 glycoprotein (GP) VI と極めて似ている。GPVI は、細胞膜内で ITAM を持つ Fc γ R-chain と恒常的に結合しており、GPVI/Fc γ R-chain がコラーゲンによりクラスターリングされると、GPVI に恒常的に結合している Src ファミリーキナーゼにより ITAM がリン酸化される。以下のシグナル伝達経路は CLEC-2 と同様である。

CLEC-2 と GPVI は極めて類似した信号伝達経路を持つ。これらの受容体は後述するように、炎症時の毛細血管の統合性を維持する働きを持つ。また、詳細な機序は不明なものの、共同して止血機能も担い、単独で欠損したマウスは出血傾向を示さないが、両者を欠損した場合は著しい出血傾向を示す¹⁸⁾。

蛇毒であるロドサイチンは通常、生体内には存在しないため、CLEC-2 の生体内リガンドが存在すると考えられた。ポドプラニンはタイプ I のシアル酸に富む膜蛋白であり、ある種の癌細胞の他、リンパ管内皮細胞、I 型肺胞上皮、腎臓の足細胞など、いくつかの正常組織にも発現するが、血管内皮には発現しない¹⁹⁻²²⁾。癌細胞のポドプラニンは、血中に入ると血小板を活性化し、癌の血行性転移を促進することが知られていた^{19, 23)}。そのため、ポドプラニンとその血小板上の受容体との結合を抑制すれば、血

行性転移が抑制できるとして、ポドプラニン受容体の同定が待たれていた。私達はポドプラニン発現細胞による血小板凝集のパターンが、ロドサイチン惹起血小板凝集と類似していることに着目し、ポドプラニンが CLEC-2 の生体内リガンドであることを発見した²⁾。次項では、CLEC-2 とポドプラニンの結合がもたらす病態生理学的役割について解説する。

3. 癌細胞の血行性転移と、癌関連血栓症の促進 (図 1A)

癌細胞が血小板を活性化して血行性転移を促進すると言われているが²⁴⁻²⁶⁾、その機序については、癌細胞に粘着した血小板が、癌細胞を血管内のシェアストレスや NK 細胞の攻撃から守る²⁷⁾、癌細胞が血管外へ遊出する際の足場を提供する、あるいは、活性化血小板から放出される成長因子や血管新生因子が転移先での癌の増殖を助けると推察されている。ポドプラニンは、ある種の扁平上皮癌^{28, 29)}、セミノーマ³⁰⁾、脳腫瘍³¹⁻³³⁾等に発現し、血小板を活性化する¹⁹⁾。ポドプラニンの発現が、癌の転移や進行と関連しているという臨床研究も報告されている^{31, 34)}。

私達は、ヒトポドプラニン発現 CHO 細胞をヌードマウスの尾静脈から投与した際の実験的肺転移が、抗ポドプラニン抗体を細胞に加えてから投与すると、著しく抑制されることを報告した²³⁾。逆に、CLEC-2 欠損骨髓キメラマウスや、抗 CLEC-2 抗体で CLEC-2 欠損状態にしたマウスに、ポドプラニン発現メラノーマ細胞株 B16/F10 を尾静脈投与すると、対照マウスに比べて著しく肺転移が抑制されることを示した³⁾。以上より、CLEC-2 は癌細胞のポドプラニンと結合して血行性転移を促進することが示され、抗転移薬のターゲットとして有用であることが示唆された。

生体内で CLEC-2 とポドプラニンの結合が癌の増殖に及ぼす影響を検討するため、マウス背部に B16/F10 を移植したところ、CLEC-2 欠損状態のマウスと対照マウスとでその増殖に変化はなかった³⁾。また、皮下移植では自発的な肺転移を惹起することはできなかった。それにもかかわらず、CLEC-2 非存在下では担癌マウスの生存が有意に延長した。癌による死亡の原因は、遠隔転移や悪液質など腫瘍その

ものの進展と、血栓症によることが多い。CLEC-2 欠損状態の担癌マウスでは、野生型担癌マウスよりも、肺における血栓が有意に減少していた。また、血中の炎症性サイトカインが有意に少なかった。さらに、貧血の程度が有意に軽度であり、悪液質の指標である大腿四頭筋重量が有意に高値であった。血栓の存在は炎症を引き起こし、炎症は悪液質や貧血をもたらす。私達は、CLEC-2 非存在下では、腫瘍細胞上のポドプラニンと CLEC-2 との結合による血栓が生じにくいため、引き続く慢性炎症とそれによる悪液質や貧血が生じにくく、生存が延長するのではないかと考えている。CLEC-2 とポドプラニンの結合を阻害する薬剤は、癌の血行性転移を抑制し、癌関連血栓症を予防して、生存を延長させる可能性があるのではないかと考えている。

4. 胎生期のリンパ管と血管の分離促進 (図 1B)

リンパ管内皮のポドプラニンは、通常血小板 CLEC-2 と結合する機会がない。しかし胎生期には、主静脈の血管内皮の一部がリンパ管内皮に分化して、出芽して分離することで初期リンパ管が形成され、これが延長することで末梢のリンパ管が形成される³⁵⁾。この時期なら血小板が初期リンパ管に流入して、リンパ管内皮のポドプラニンと結合することが可能である。2003 年、Mark Kahn のグループは、SLP-76 や Syk 欠損マウスは、リンパ管と血管の分離不全により、血液の流入したリンパ管が認められることを報告した³⁶⁾。Syk と SLP-76 は前述の通り、CLEC-2 の下流で活性化されるシグナル分子である。以上より私達は、血小板の CLEC-2 とリンパ管内皮のポドプラニンの結合が、リンパ管と血管の分離を促進する役割を担っているのではないかと仮説を立てた。私達は 2010 年に、CLEC-2 null マウスを作製したところ、胎生期あるいは出生直後にほとんど死亡し、胎仔にはリンパ管と血管の分離不全により、体表に血液が流入した赤いリンパ管が認められたと発表した³⁷⁾。その 3 カ月ほど前に前述の Kahn のグループも CLEC-2 欠損マウスを作製し、同様の表現型を発表していた³⁸⁾。血小板・巨核球特異的 CLEC-2 欠損マウス (CLEC-2 flox/flox; PF-4-Cre) は生存するが、やはりリンパ管と血管の分離不全は認め

られ、腸管膜など、血液の流入したリンパ管が認められた³⁹⁾。また、ポドプラニン欠損マウスもリンパ管と血管の不分離が認められると報告されている⁴⁰⁾。さらに、前述の Syk や SLP-76 といった CLEC-2 下流のシグナル分子を欠損したマウスでも不分離表現型が認められることから、血小板の CLEC-2 とリンパ管内皮のポドプラニンの結合により、血管とリンパ管内の分離が促進されると考えられた。

CLEC-2 が胎生期に血管とリンパ管の分離を促進する機序については、諸説あり、決着を見ていないが、私達は以下のように考えている。胎生期に血管とリンパ管の分岐部で、CLEC-2 とポドプラニンの結合により血小板が活性化されて放出された TGF- β ファミリーがリンパ管内皮の遊走と増殖を抑制する。TGF- β ファミリーは血管内皮の増殖や遊走には影響しないことから、リンパ管と血管の分離が促進されると考えている³⁹⁾。末梢リンパ管は胸管という太いリンパ管に流入し、胸管は静脈角に流入する。Kahn のグループは、この接合部分で、胸管内にわずかに流入した血液中の血小板が、CLEC-2 とポドプラニンの結合により活性化され、血栓ができることで胸管内への血液の流入を防いでいるという説をとっている。また、Watson のグループは、CLEC-2 とポドプラニンの結合により、Syk 依存性にポドプラニンがクラスタリングされることで、リンパ管内皮の遊走が抑制されるという説をとっている。これらの説はどれか一つが正しいというものではなく、いずれの機序も存在するのではないかと考えている。

5. 流血中での血栓安定化作用 (図 1C)

CLEC-2 は血小板・巨核球にほぼ特異的に発現しているが、血栓止血における役割はどのようなものであろうか。前述の通り、CLEC-2 null マウスは胎生あるいは出生直後に死亡するため、私達は放射線照射成獣マウスに CLEC-2^{-/-}あるいは CLEC-2^{+/-}胎仔肝臓を移植して、末梢血と骨髓のみ CLEC-2 欠損となる骨髓キメラマウスを作製した。in vitro での、Born の比濁法による血小板凝集能測定では、CLEC-2 欠損血小板は予想通り、ロドサイチン惹起血小板凝集能が欠如していた。また、コラーゲン、トロンビン、ADP 凝集はいずれも正常であった。さ

らに、コラーゲン、フィブリノゲン、von Willebrand factor 上での血小板粘着、進展も正常であった。しかし、コラーゲンを固相化したキャピラリーに 2000 1/s の高いシェアストレスをかけて全血を流して血栓形成を惹起すると、CLEC-2 欠損血液は血栓の体積は、野生型血液に比べて有意に小さかった³⁷⁾。また、マウス腹腔内毛細血管をレーザーで傷害すると、CLEC-2 欠損骨髓キメラマウスでは、傷害部位への血小板粘着数が有意に少なかった。ポドプラニンは健常な血管壁には存在しない。ポドプラニンもロドサイチンも存在しない健常血管壁やコラーゲンコートキャピラリーで、何故有意に血栓の体積が小さいのかについて、詳細な機序は不明である。しかし私達は、リコンビナント CLEC-2 と Biacore[®]を用いた分子間相互作用解析や、固相化リコンビナント CLEC-2 への血小板粘着の解析から、血小板の活性化依存性に CLEC-2 同士がホモフィリックな結合をするのではないかと考えている。しかし CLEC-2 の有無で、シェアストレスが 400 1/s では固相化コラーゲン上の血栓の体積には変化はないこと、マウスの毛細血管ではなく、大腿動脈にレーザー照射した場合の血栓の体積に変化はないことから、その重要性は限られているのかもしれない。

マウス尾静脈をわずかに切断した際の出血を比較すると、CLEC-2 欠損骨髓キメラマウスで、わずかに多い傾向はあったが有意差はなかった³⁷⁾。これは他の報告でもほぼ同様であった^{18, 41)}。コラーゲン受容体 Glycoprotein (GP) VI/Fc receptor γ -chain (FcR γ -chain) の欠損マウスも出血傾向の有意な延長はないが、GPVI/FcR γ -chain と CLEC-2 を同時に欠損させると、出血傾向が著しく延長する¹⁸⁾。詳細な機序は不明であるが、CLEC-2 のホモフィリックな結合は、コラーゲンと GPVI/FcR γ -chain との結合と相補的な役割を果たしているのかもしれない。

6. Soluble CLEC-2 (図 1D)

私達は、血小板活性化依存性に CLEC-2 が蛋白分解酵素により切断される形で、あるいは、マイクロパーティクルにのる形で血小板から soluble CLEC-2 となって遊離することを見出した。GPIb, GPVI/FcR γ -chain, CD40 ligand などの血小板上膜蛋白は血

図1 当講座で説明した CLEC-2 の病態生理学的役割と臨床応用
 (A) 癌血行性転移の促進.
 (B) 胎生期のリンパ管と血管の分離促進.
 (C) 流血中での血栓の安定化.

血小板活性化に伴って、あるいは静止時より切断を受けて遊離することが知られている。その生理的意義は明らかではないが、血小板活性化を抑制するネガティブフィードバックとの説もある。Soluble GPVI と比較して、soluble CLEC-2 の産生にはいくつかの特徴が認められた。Soluble GPVI はマイクロパーティクルにはほとんど存在せず、切断型がほとんどを占めるが、CLEC-2 は逆で、マイクロパーティクル上に多く存在し、切断型は少ない⁴²⁾。GPVI は ADAM10 という血小板膜上に発現するメタロプロテイナーゼによって切断されるが、CLEC-2 はその基質とはならない。そのため切断型が少ないと考えられた⁴³⁾。動脈血栓症は、生体内で血小板が不適切に活性化されることがトリガーとなって生じる。私達は、血中

soluble CLEC-2 を測定することで、動脈血栓症の発症予測や抗血小板剤の薬効判定に使用できないかと考え、LSI メディエンスと共同で soluble CLEC-2 測定 ELISA を作製した⁴²⁾。これまで生体内の血小板活性化のマーカーとして保険適応になっている検査項目として、platelet factor 4 と β -thromboglobulin がある。これらの測定には、専用の採血管で 20 G 以上の採血針を用いて、できれば駆血帯を使用しないで 2 分以内にシリンジで採血し、反転混和の後、15~30 分氷冷するなど、混雑する採血室では、順守することが著しく困難な採血法が必要となっている。Soluble CLEC-2 は通常の EDTA 採血管やクエン酸ナトリウム採血管で、駆血帯や 21 G 採血針で採血した血液でも測定可能であり、臨床の場で利用しやすい利点

図1 つづき

(D)soluble CLEC-2 と生体内血小板活性化マーカーとしての応用.

(E)巨核球増殖と血小板産生の促進.

を持つ。急性冠症候群の患者で血中 soluble CLEC-2 は有意に上昇していることを見出したが^{8,43)}、臨床的有用性の判断にはもう少し検討が必要である。

7. 血小板造血(図1E)

血小板・巨核球特異的 CLEC-2 欠損マウスは、野生型に比べて軽度であるが有意に血小板数が少な

い⁸⁻¹⁰⁾。血小板・巨核球の CLEC-2 が血小板造血に何らかの役割を持つ可能性がある。私達は、骨髄中にポドプラニンを発現する間質細胞を同定し、bone marrow fibroblastic reticular cells(BM FRC-like cells)と名付けた¹⁰⁾。野生型の巨核球は骨髄中で BM FRC-like cells に隣接して存在する様が観察されたが、CLEC-2 欠損巨核球では認められなかった。In vitro で野生型巨核球にリコンビナントポドプラニンを加

えると巨核球の増殖が促進されたが、CLEC-2 欠損巨核球では増殖は促進されなかった。野生型巨核球と、骨髓より分離培養した BM FRC-like cells を *in vitro* で共培養すると、血小板産生を示す胞体突起形成の促進が認められたが、リコンビナントポドプラニンを BM FRC-like cells に加えても、巨核球の胞体突起形成促進は認められなかった。CLEC-2 からのシグナルは巨核球の増殖を促進するが、胞体突起形成は促進しないことが示唆される。私達は、BM FRC-like cells をリコンビナント CLEC-2 で刺激すると、chemokine(C-C motif)ligand 5(CCL5)が分泌され、CCL5 が巨核球の胞体突起形成を促進することを見出した。BM FRC-like cells と巨核球のコロニーは骨髓中の最小動脈周囲に認められた。私達は、巨核球の CLEC-2 と BM FRC-like cells のポドプラニンの相互作用が、最小動脈周囲で生じており、これを新しい巨核球・血小板造血微小環境として提唱した。

8. おわりに

私達がバーミンガム大学の Steve P. Watson 研究室との共同研究で、2006 年に血小板上に新規血小板活性化受容体を同定してから約 10 年が経過した。ポドプラニンを生体内リガンドとして同定してから、血小板はリンパ管発生といった血栓止血とは全く関連のない意外な役割を担うことがわかった。また、海外のグループからも CLEC-2 とポドプラニンの相互作用が多く、病態生理学的作用を持つことが報告されている。CLEC-2 と細網細胞のポドプラニンなどとの相互作用で、炎症時の毛細血管や、免疫反応惹起時のリンパ節高内皮静脈の統合性を維持していることが報告された。CLEC-2 非存在下では、炎症時や免疫時に皮膚毛細血管やリンパ節での出血が生じる。昔から血小板減少時に炎症が生じると出血が生じることが知られているが、少なくとも一部は CLEC-2 の血管統合性維持作用によるものであった。また、深部静脈血栓症モデルマウスでは、血栓が惹起されると炎症が生じ、静脈壁にポドプラニンが発現し、CLEC-2 を介して血栓が生じることが報告された。おそらく、私達が経験した CLEC-2 による癌関連血栓症促進作用も、悪性腫瘍末期の炎症によりポドプラニンが発現している可能性がある。血

栓と炎症は互いに促進しあうことが知られており、輸送する好中球の影響が大きいと言われているが、この thromboinflammation 促進作用にも、CLEC-2 とポドプラニンが関与している。この、いわば「子宮から成体まで」の長い付き合いのパートナーは他にも様々な役割があるに違いないと感じている。私達は、さらなる役割の解明と、CLEC-2 とポドプラニンの結合を抑制する拮抗剤の開発を試みている。

謝辞

本研究は、多くの先生方との共同研究の賜物です。また、卓越した実験技術で研究を支えて下さった技術補佐員の方々のお陰です。ここにお名前をあげさせていただいていない多くの方々にも多大なご協力をいただいております。この場をお借りして心より厚く御礼申し上げます。

尾崎由基男先生、森田隆先生、辛英哲先生、Steve P. Watson 先生、井上修先生、Angel Garcia 先生、山崎泰男先生、加藤幸成先生、金子美香先生、矢富裕先生、平島正則先生、江藤浩之先生、西村智先生、富山佳昭先生、柏木浩和先生、外村和也先生、梅村和夫先生、浅田裕士郎先生、長田誠先生、中村純也先生、大澤満先生、風間文智先生、白井俊光先生、築地長治先生、田村彰吾先生、佐藤金夫先生、佐々木知幸先生、高野勝弘先生、大竹志門先生、小松千亜紀様、中澤久一郎様、弓納持勉様、中澤久美子様、福田初葉様、大塚貴子様

著者の利益相反(COI)の開示：

講演料(LSI メディエンス、積水メディカル、シスメックス)

文献

- 1) Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Garcia A, Eble JA, Pöhlmann S, Inoue O, Gartner TK, Hughan SC, Pearce AC, Laing GD, Theakston RD, Schweighoffer E, Zitzmann N, Morita T, Tybulewicz VL, Ozaki Y, Watson SP: A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* **107**: 542–549, 2006.
- 2) Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y: Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* **282**: 25993–

- 26001, 2007.
- 3) Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K: C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost* **15**: 513–525, 2017.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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** (Pt 3): 1021–1027, 1995.
 - 7) Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, Geier M, Stewart EA, Eisemann J, Steinkasserer A, Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Pearce AC, Watson SP, Hoxie JA, Baribaud F, Pöhlmann S: DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol* **80**: 8951–8960, 2006.
 - 8) Tang T, Li L, Tang J, Li Y, Lin WY, Martin F, Grant D, Solloway M, Parker L, Ye W, Forrest W, Ghilardi N, Oravec T, Platt KA, Rice DS, Hansen GM, Abuin A, Eberhart DE, Godowski P, Holt KH, Peterson A, Zambrowicz BP, de Sauvage FJ: A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat Biotechnol* **28**: 749–755, 2010.
 - 9) Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T: CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med* **212**: 2133–2146, 2015.
 - 10) Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Ozaki Y: Podoplanin-positive periaerteriol stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. *Blood* **127**: 1701–1710, 2016.
 - 11) Kerrigan AM, Dennehy KM, Mourão-Sá D, Faro-Trindade I, Willment JA, Taylor PR, Eble JA, Reis e Sousa C, Brown GD: CLEC-2 is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils. *J Immunol* **182**: 4150–4157, 2009.
 - 12) Acton SE, Astarita JL, Malhotra D, Lukacs-Kornek V, Franz B, Hess PR, Jakus Z, Kuligowski M, Fletcher AL, Elpek KG, Bellemare-Pelletier A, Sceats L, Reynoso ED, Gonzalez SF, Graham DB, Chang J, Peters A, Woodruff M, Kim YA, Swat W, Morita T, Kuchroo V, Carroll MC, Kahn ML, Wucherpfennig KW, Turley SJ: Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity* **37**: 276–289, 2012.
 - 13) Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, Song K, Kondo Y, Woodruff MC, Gogineni A, Onder L, Ludewig B, Weimer RM, Carroll MC, Mooney DJ, Xia L, Turley SJ: The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* **16**: 75–84, 2015.
 - 14) Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, Song K, Kondo Y, Woodruff MC, Gogineni A, Onder L, Ludewig B, Weimer RM, Carroll MC, Mooney DJ, Xia L, Turley SJ: The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* **16**: 75–84, 2015.
 - 15) Chang CH, Chung CH, Hsu CC, Huang TY, Huang TF: A novel mechanism of cytokine release in phagocytes induced by aggretin, a snake venom C-type lectin protein, through CLEC-2 ligation. *J Thromb Haemost* **8**: 2563–2570, 2010.
 - 16) Lowe KL, Navarro-Núñez L, Bénézec C, Nayar S, Kingston BL, Nieswandt B, Barone F, Watson SP, Buckley CD, Desanti GE: The expression of mouse CLEC-2 on leucocyte subsets varies according to their anatomical location and inflammatory state. *Eur J Immunol* **45**: 2484–2493, 2015.
 - 17) Fuller GL, Williams JA, Tomlinson MG, Eble JA, Hanna SL, Pöhlmann S, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Watson SP, Pearce AC: The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J Biol Chem* **282**: 12397–12409, 2007.
 - 18) Bender M, May F, Lorenz V, Thielmann I, Hagedorn I, Finney BA, Vögtle T, Remer K, Braun A, Bösl M, Watson SP, Nieswandt B: Combined in vivo depletion of glycoprotein VI and C-type lectin-like receptor 2 severely compromises hemostasis and abrogates arterial thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**: 926–934, 2013.
 - 19) Tsuruo T, Fujita N: Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* **84**: 189–198, 2008.
 - 20) Tomooka M, Kaji C, Kojima H, Sawa Y: Distribution of podoplanin-expressing cells in the mouse nervous systems. *Acta Histochem Cytochem* **46**: 171–177, 2013.
 - 21) Del Rey MJ, Faré R, Izquierdo E, Usategui A, Rodríguez-Fernández JL, Suárez-Fueyo A, Cañete JD, Pablos JL: Clinicopathological correlations of podoplanin (gp38) expression in rheumatoid synovium and its potential contribution to fibroblast platelet crosstalk. *PLoS ONE* **9**: e99607, 2014.
 - 22) Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y: The novel platelet activation receptor CLEC-2. *Platelets* **22**: 380–384, 2011.
 - 23) Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y, Narimatsu 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.
 - 24) Katagiri Y, Hayashi Y, Baba I, Suzuki H, Tanoue K, Yamazaki H: Characterization of platelet aggregation induced by the human melanoma cell line HMV-I: roles of heparin, plasma adhesive proteins, and tumor cell membrane proteins. *Cancer Res* **51**: 1286–1293, 1991.
 - 25) Kitagawa H, Yamamoto N, Yamamoto K, Tanoue K, Kosaki G, Yamazaki H: Involvement of platelet membrane glycoprotein Ib and glycoprotein IIb/IIIa complex in thrombin-dependent and -independent platelet aggregations induced by tumor cells. *Cancer Res* **49**: 537–541, 1989.
 - 26) 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.
- 27) Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN: Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* **59**: 1295–1300, 1999.
 - 28) 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.
 - 29) Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M: Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* **26**: 195–200, 2005.
 - 30) Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T: Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene* **23**: 8552–8556, 2004.
 - 31) Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M: Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol* **111**: 483–488, 2006.
 - 32) Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nakazawa Y, Kunita A, Fujita N, Tsuruo T, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M: 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.
 - 33) Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Uchiyama N, Amano K, Chiba Y, Hasegawa Y, Hirabayashi J, Narimatsu H, Mishima K, Osawa M: 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.
 - 34) Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L: Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* **107**: 563–569, 2006.
 - 35) Tammela T, Alitalo K: Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **140**: 460–476, 2010.
 - 36) Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mocsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, Kahn ML: Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* **299**: 247–251, 2003.
 - 37) Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y: Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem* **285**: 24494–24507, 2010.
 - 38) Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, Hess PR, Zou Z, Chen M, Chen CY, Xu B, Lu MM, Zhou D, Sebzda E, Santore MT, Merianos DJ, Stadtfeld M, Flake AW, Graf T, Skoda R, Maltzman JS, Koretzky GA, Kahn ML: Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* **116**: 661–670, 2010.
 - 39) Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, Suzuki-Inoue K, 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* **287**: 22241–22252, 2012.
 - 40) Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H, Fuerbauer E, Moser M, Haiko P, Fässler R, Alitalo K, Binder BR, Kerjaschki D: Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood* **115**: 3997–4005, 2010.
 - 41) Hughes CE, Navarro-Núñez L, Finney BA, Mourão-Sá D, Pollitt AY, Watson SP: CLEC-2 is not required for platelet aggregation at arteriolar shear. *J Thromb Haemost* **8**: 2328–2332, 2010.
 - 42) Kazama F, Nakamura J, Osada M, Inoue O, Oosawa M, Tamura S, Tsukiji N, Aida K, Kawaguchi A, Takizawa S, Kaneshige M, Tanaka S, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y: Measurement of soluble C-type lectin-like receptor 2 in human plasma. *Platelets* **26**: 711–719, 2015.
 - 43) Inoue O, Nakamura N, Osada M, Oosawa M, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K: Soluble CLEC-2 was released upon platelet activation and detected in human plasma. *J Thromb Haemost (Abstract of the XXIV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis)* **11**(Suppl 2): 633, 2013.