マウス骨髄の Podoplanin 陽性傍細胞間質細胞は CLEC-2 を介して巨核球系細胞の増殖と proplatelet formation を促進する

田村彰吾*

Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2

Shogo TAMURA

Key words: CLEC-2, podoplanin, BM FRC-like cell, megakaryopoiesis

1. はじめに

骨髄(bone marrow: BM)は血球細胞の産生に特化した組織である。骨にパッキングされる骨髄は軟組織であるが、細胞外マトリックス、脈管系、そして種々の間質細胞によって複雑な3次元ネットワークが構成されている。間質細胞を含む骨髄間質要素は局所的な微小環境: microenvironment(ニッチ, niche)を構成し、造血幹細胞を含む各種血球前駆細胞の分化・成熟を厳密にコントロールしている。近年、巨核球も分化・成熟・血小板産生について周囲の環境から制御を受けていることがわかってきた^{1,2)}。2016年、筆者らは骨髄細胞の周囲細胞の中に podoplanin 陽性新規間質細胞「BM FRC-like cell」を発見し、BM FRC-like cell が巨核球造血と血小板産生を促進的に制御することを報告した³⁾。受賞論文の内容の概略は2017年度の日本血栓止血学会誌にトピックスとして掲載されているが、本稿ではBM FRC-like cell が構成する新規血小板・巨核球造血微小環境についてより詳細に概説をしていきたい。

2. *C-type lectin-like receptor 2 (Clec-2)* ノックアウトマウスは血小板減少を呈する

CLEC-2 は2006年に山梨大学の井上克枝教授、尾崎由基男前教授らにより発見された血小板活性化受容体である⁴⁾。CLEC-2の生体内リガンドはポドプランイン(podoplanin: PDPN)であり、リンパ管内皮細胞やリンパ節のfibroblastic reticular cell(FRC)に高発現する^{5,6)}。マウスにおいて *Clec-2* のノックアウトおよび血小板・巨核球特異的コンディショナルノックアウト(以下、*Clec-2* cKO)は血小板減少を引き起こすことが知られていた^{7,8)}(図1A)。しかし、その病態メカニズムは解明されていなかった。

Clec-2 cKO マウスの血小板減少を解析するにあたり、われわれは巨核球の分化成熟段階における CLEC-2 の発現を免疫細胞化学染色で確認した(図1B)。骨髄および胎仔肝臓由来造血前駆細胞をトロンボポエチン(TPO)存在下で培養したところ、両系統細胞ともに巨核球分化成熟の早期から CLEC-2 が細胞表面に発現していることがわかった。次に *Clec-2* cKO マウスの骨髄巨核球数を検討したところ、*Clec-2* cKO マウスは巨核球数、とくに CD41⁺CD42b⁺ の幼若巨核球数が顕著に減少していることが明らかになった(図1C)。この結果から *Clec-2* cKO マウスの血小板減少は巨核球分化成熟に CLEC-2 が何らかの関与をしていると仮説をたてた。まず、野生型と *Clec-2* KO 巨核球前駆細胞について MegaCult-C によ

*責任者連絡先:

名古屋大学大学院医学系研究科病態解析学講座
〒461-8673 愛知県名古屋市東区大幸南 1-1-20
Tel & Fax: 052-719-1340
E-mail: stamura@met.nagoya-u.ac.jp

図1 CLEC-2 と PDPN の結合は巨核球前駆細胞の自己増殖を増強する。 ** 統計学的有意差あり (p<0.01)。

A)野生型マウスと *Clec-2* 血小板・巨核球特異的ノックアウト (*Clec-2* cKO)の末梢血血小板数。

B)巨核球分化成熟段階における CLEC-2 の発現パターン。

C)*Clec-2* cKO マウスにおける骨髄の CD41⁺CD42b⁻ 巨核球の減少。 * 統計学的有意差あり (p<0.05)。 N.S.: not-significance。

D)野生型および *Clec-2* cKO 巨核球前駆細胞の細胞自律的コロニー形成能。 Colony-formation assay は MegaCult-C を用いて実施した。 N.S.: not-significance。

E)PDPN リコンビナントタンパク (PDPN-rFC2)による CLEC-2 の刺激は巨核球前駆細胞のコロニー形成を増強する。 ** 統計学的有意差あり (p<0.01)。

る clonal expansion assay を行ったが、それぞれの細胞自律的自己増殖能に差は認めなかった(図 1D)。

そこで、CLEC-2 のアゴニストとして PDPN のリコンビナントタンパク (PDPN-rFC2) を用い colony expansion

図2 マウス骨髄では PDPN 陽性細胞間質細胞の近傍で巨核球系細胞のコロニー形成が認められる

A, B) 野生型マウス大腿骨骨髄凍結組織切片の免疫組織染色像。A. 大腿骨長軸切片, B. 大腿骨短軸切片。Scale bar: 100 μ m

C-E) PDPN 陽性間質細胞に囲まれている骨髄脈管の同定。C, D の Scale bar: 50 μ m. E の Scale bar: 10 μ m. PDPN 陽性間質細胞は骨髄細胞 (CD31⁺Sca-1⁺) を取り囲む間質細胞である。

F) 野生型および *Clec-2* cKO マウス大腿骨骨髄凍結組織切片の免疫組織染色像。Scale bar: 10 μ m. 野生型マウス骨髄では PDPN 陽性細胞間質細胞の近傍で CD41 陽性細胞コロニーが形成されている。

sion assay を行ったところ, CLEC-2 と PDPN の結合 (CLEC-2/PDPN axis) は巨核球前駆細胞の自己増殖を増強することが明らかになった (図 1E)。

3. PDPN 陽性の新規骨髄細胞間質細胞「BM FRC-like cell」

CLEC-2/PDPN axis により巨核球の自己増殖が増

強する知見が得られたが, これまで骨髄内に PDPN を発現する間質細胞の存在は知られていなかった。そこでわれわれは免疫組織化学染色による PDPN 陽性細胞の探索を行った。興味深いことに PDPN は骨髄の特定の脈管に沿ったように検出された (図 2A, B)。骨髄の脈管は中心静脈, 類洞静脈と細胞間質細胞に分類することができ, 類洞静脈と細胞間質細胞は表面抗原パターンにより判別が可能である (類洞内皮細胞:

図3 骨髄 PDPN 陽性細胞脈間質細胞(BM FRC-like cell)の characterization

A) FACS による骨髄 PDPN 陽性細胞脈間質細胞の細胞表面抗原発現解析

B) リンパ節 fibroblastic reticular cell (LN FRC) と骨髄 PDPN 陽性細胞脈間質細胞の細胞表面抗原発現パターンの比較

CD31⁺Sca-1⁻, 細胞脈: CD31⁺Sca-1⁺). われわれは PDPN, CD31, Sca-1 の多重染色により PDPN 陽性細胞が細胞脈を取り囲む周囲細胞であることを同定した(図 2C~E).

また, 傍細胞脈領域において PDPN 陽性間質細胞に関連する形で巨核球系細胞のコロニー形成を認めた(図 2F). 野生型マウスの骨髄では, 大型の成熟した巨核球と小型の幼若巨核球のコロニー(CD41⁺クラスター)が PDPN 陽性間質細胞の近傍に位置していた. 一方, *Clec-2* cKO マウスの骨髄ではこれらの巨核球系細胞コロニーは明らかに減少していた. これらの知見は傍細胞脈領域において PDPN 陽性間質細胞が巨核球造血に関与していることを示唆するものであった.

PDPN 陽性の血管周囲細胞はリンパ節の fibroblastic reticular cell (LN FRC) が知られている⁶⁾. そこでわれわれは骨髄 PDPN 陽性間質細胞とリンパ節 FRC の代表的な表面抗原パターンを比較した(図 3A, B). われわれが検討した範囲では骨髄 PDPN 陽性間質細胞とリンパ節 FRC の間で表面抗原の一致が見られ,

この結果からわれわれは骨髄 PDPN 陽性間質細胞を BM FRC-like cell と命名した.

4. BM FRC-like cell による巨核球自己増殖の促進

巨核球と BM FRC-like cell の相互作用を解析するために, われわれは BM FRC-like cell を含む骨髄間質細胞群を分離し, 巨核球前駆細胞との共培養を行った(図 4A). BM FRC-like cell 共培養下において野生型巨核球は BM FRC-like cell と相互作用する形で顕著なコロニーを形成した(図 4B~D). しかしながら *Clec-2* cKO 巨核球ではこのようなコロニー形成はほとんど認めなかった. また, WT 巨核球と BM FRC-like cell の CLEC-2/PDPN axis を PDPN 中和抗体で阻害することで巨核球自己増殖の減弱が認められた(図 4E~H). これらの結果は先述の PDPN リコンビナントタンパクによる巨核球前駆細胞の自己増殖増強と一致するものであり, BM FRC-like cell による巨核球自己増殖促進は CLEC-2/PDPN axis 依存的事であることが示された.

図4 CLEC-2 と PDPN の結合は巨核球系前駆細胞の自己増殖を増強する

A) BM FRC-like cell を含む骨髓間質細胞 layer と骨髓巨核球系前駆細胞の共培養プロトコール

B) BM FRC-like cell と巨核球系前駆細胞共培養の免疫細胞化学染色像 (ICC). 上段: 野生型巨核球, 下段: *Clec-2* cKO 巨核球. Scale bar: 100 μ m.

C-D) BM FRC-like cell と巨核球系前駆細胞の共培養によりもたらされる巨核球系細胞自己増殖増強の定量解析. 野生型および *Clec-2* cKO 巨核球系前駆細胞の代表的 ICC イメージ (C) と, CD41 陽性細胞の定量結果 (D). Scale bar: 100 μ m. ** 統計学的有意差あり ($p < 0.01$).

E-H) PDPN 中和抗体 (clone: 8F11) は BM FRC-like cell/巨核球共培養における巨核球系細胞自己増殖増強を抑制する. PDPN 中和抗体添加条件下での野生型および *Clec-2* cKO 巨核球系前駆細胞と BM FRC-like cell 共培養の代表的 ICC イメージ (E, G), およびそれぞれの定量結果 (F, H). Scale bar: 100 μ m. ** 統計学的有意差あり ($p < 0.01$). N.S.: not-significance.

5. BM FRC-like cell による血小板産生 (proplatelet formation) の促進

BM FRC-like cell 共培養下の野生型巨核球は極大化した細胞質や胞体突起形成といったいわゆる proplatelet 形成も促進していたが, *Clec-2* cKO 巨核球ではそのような proplatelet 形成巨核球の数が減少していた(図 5A). まず, 野生型と *Clec-2* cKO 巨核球における細胞自律的な proplatelet 形成能の検討として, 胎仔肝臓由来造血前駆細胞を用いた proplatelet formation assay を行った. しかし, 野生型と *Clec-2* cKO 巨核球で自律的な proplatelet 形成能に差は認めなかった(図 5B). 続いて, CLEC-2 のアゴニストとして PDPN-rFC2 を proplatelet formation assay に添加することで CLEC-2 シグナルの proplatelet 形成能への影響を検討した. しかし, CLEC-2 の刺激は巨核球の proplatelet 形成能を促進することはなかった(図 5C). そこでわれわれは BM FRC-like cell が何らかの proplatelet 形成促進因子を放出するという仮説を立て, BM FRC-like cell を CLEC-2 リコンビナントタンパク (CLEC-2-rFC2) で刺激した培養上清 (conditioned medium) を proplatelet formation assay に供した(図 5D). その結果, CLEC-2-rFC2 conditioned medium は巨核球の proplatelet 形成を促進することがわかった(図 5E). この結果は, BM FRC-like cell が CLEC-2/PDPN axis により何らかの proplatelet 促進因子を放出する可能性を示唆するものであった.

6. BM FRC-like cell は CLEC-2/PDPN axis により CCL5 を放出して血小板産生 (proplatelet formation) を促進する

CLEC-2/PDPN axis により BM FRC-like cell が放出する proplatelet formation 促進因子を同定するために, CLEC-2-rFC2 conditioned medium についてサイトカイン/ケモカインアレイを行った. 解析した 40 種類のサイトカイン/ケモカインの中で, CXCL10(interferon gamma induced protein 10[IP-10]), CXCL2(macrophage inflammatory protein-2[MIP-2]), CCL5(RANTES) が CLEC-2-rFC2 conditioned medium で 5 倍以上の含有量を示した(図 6A, B). そこでこれら 3 因子を proplatelet formation assay に供したところ, CCL5 が強

い proplatelet 形成促進能を示した(図 6C). さらに, CCL5 中和抗体は CLEC-2-rFC2 conditioned medium の proplatelet 促進能を抑制した(図 6D). 以上の結果から, CLEC-2/PDPN axis により BM FRC-like cell から放出される proplatelet 促進因子として CCL5 を同定した. なお, CCL5 の proplatelet 促進作用については本研究論文の出版とほぼ同時期に米国の Machlus ら⁹⁾によっても報告された.

7. おわりに

われわれは *Clec-2* cKO マウスの血小板減少の解析を契機に, 新規骨髓細動脈周囲細胞 BM FRC-like cell を発見し, 骨髓細動脈近傍における巨核球の増殖と成熟を促進する新規血小板・巨核球造血微小環境の存在を提唱した(図 7). 巨核球と BM FRC-like cell の CLEC-2/PDPN axis における双方向性の相互作用は巨核球の増殖を直接的に増強し, さらに成熟巨核球の proplatelet 形成を間接的に誘発することで血小板・巨核球造血を促進する.

現在, 骨髓における巨核球造血の時空間的制御は Migration model と Non-migration model が提唱され, 統一的なコンセンサスは得られていない. Migration model は骨内膜ニッチから血管性ニッチへの CXCL12 濃度勾配によって CXCR4 陽性の巨核球前駆細胞が CXCL12 高濃度とされる類洞静脈近傍へ成熟とともに移動するモデルである¹⁰⁾. 一方, Non-migration model は 2 光子励起顕微鏡とコンピューターシミュレーションによる骨髓内血管構造の 3D イメージ構築によって骨髓巨核球系細胞の挙動は動的ではないこと, そして前駆細胞を含む巨核球系細胞は骨髓内全体に分布しているが血管周囲偏在傾向があるという知見を基に提唱された新しいモデルである¹¹⁾. Non-migration model では巨核球造血は血管周囲環境(血管性ニッチ)において一連の分化・成熟過程が進むと考えられている. われわれが提唱する骨髓細動脈近傍における血小板・巨核球造血微小環境はどちらのモデルを支持しうるものかは現時点では知見が乏しく判断が困難である. 今後, BM FRC-like cell による巨核球造血制御メカニズムの解明が進むことで, 骨髓における巨核球造血の時空間的制御が明らかになっていくことが期待される.

図5 BM FRC-like cell との共培養は巨核球の proplatelet 形成を促進する

A) BM FRC-like cell と巨核球系前駆細胞共培養 5 日目の免疫細胞化学染色像 (ICC). 左: 野生型巨核球, 右: *Clec-2* cKO 巨核球. Arrow head: proplatelet 形成巨核球を示す. Scale bar: 50 μ m.

B) 野生型および *Clec-2* cKO 巨核球の細胞自律的 proplatelet 形成能. N.S.: not-significance.

C) PDPN リコンビナントタンパク (PDPN-rFC2) による CLEC-2 の刺激は巨核球の proplatelet 形成を促進しない. N.S.: not-significance.

D) BM FRC-like cell conditioned medium を供する proplatelet formation assay のプロトコール.

E) BM FRC-like cell conditioned medium は巨核球の proplatelet 形成を促進する. *** 統計学的有意差あり ($p < 0.001$).

図6 CLEC-2/PDPN axisにより BM FRC-like cell は proplatelet 形成促進因子 CCL5 を放出する

A) CLEC-2-conditioned medium のサイトカイン/ケモカインアレイ結果 (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Panel A)

B) サイトカイン/ケモカインアレイの spot intensity の定量結果

C) Proplatelet 形成促進候補因子, CXCL10, CXCL2, CCL5 の proplatelet 促進作用の検討結果. * 統計学的有意差あり ($p < 0.05$). CCL5 を proplatelet 形成促進因子として同定した.

D) CCL5 中和抗体は CLEC-2-conditioned medium の proplatelet 形成促進作用を抑制する. * 統計学的有意差あり ($p < 0.05$). ** 統計学的有意差あり ($p < 0.01$).

図7 BM FRC-like cell が構成する骨髄細動脈近傍における血小板・巨核球造血微小環境

マウス大腿骨骨髄では、巨核球系細胞が傍細動脈領域において PDPN 陽性の BM FRC-like cell に関連する形で部分的にコロニーを形成している。巨核球の CLEC-2 と BM FRC-like cell の PDPN の結合 (CLEC-2/PDPN axis) は双方向性のシグナルである。CLEC-2 の活性化は巨核球前駆細胞の自己増殖を直接的に促進し、さらに CLEC-2 の結合を受けた BM FRC-like cell は CCL5 を分泌することで間接的に成熟巨核球の PPF 促進をもたらす。

謝辞

本稿で紹介した内容は筆者が山梨大学臨床検査医学講座に博士研究員として在籍中に実施した研究の成果である。多くのご指導とご助言をいただいた尾崎由基男先生、井上克枝先生をはじめとする山梨大学臨床検査医学講座の皆様に深く感謝いたします。さらに、筆者は受賞対象論文の査読審査中に山梨大学から名古屋大学へ異動しましたが、研究継続と論文完成のために、名古屋大学大学院医学系研究科病態解析学講座の小嶋哲人先生、高木明先生から寛大なるご理解と多大なご支援をいただきました。ここに深く感謝いたします。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Malara A, Balduini A: Blood platelet production and morphology. *Thromb Res* **129**: 241–244, 2012.
- 2) Malara A, Abbonante V, Di Buduo CA, Tozzi L, Currao M, Balduini A: The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. *Cell Mol Life Sci* **72**: 1517–1536, 2015.
- 3) Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Ozaki Y: Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. *Blood* **127**: 1701–1710, 2016.
- 4) Suzuki-Inoue K, Fuller GL, García 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.
- 5) 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.
- 6) Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, Hess PR, Sen A, McDaniel JM, Pan Y, Sheng M, Yago T, Silasi-Mansat R, McGee S, May F, Nieswandt B, Morris AJ, Lupu F, Coughlin SR, McEver RP, Chen H, Kahn ML, Xia L: Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* **502**: 105–109, 2013.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Machlus KR, Johnson KE, Kulenthirarajan R, Forward JA, Tippy MD, Soussou TS, El-Husayni SH, Wu SK, Wang S, Watnick RS, Italiano JE, Battinelli EM: CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. *Blood* **127**: 921–926, 2016.
- 10) Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S: Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* **10**: 64–71, 2004.
- 11) Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, Gorelashvili MG, Semeniak D, Pinnecker J, Schmithausen P, Meyer I, Friedrich M, Dütting S, Brede C, Beilhack A, Schulze H, Nieswandt B, Heinze KG: Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun* **8**: 127, 2017.