

# ヘミンは CLEC-2 と GPVI/FcR $\gamma$ を介して血小板を活性化し、横紋筋融解による急性腎障害を悪化させる

大竹志門\*<sup>1</sup> 大石沙織\*<sup>2</sup> 築地長治\*<sup>2</sup> 大石直輝\*<sup>3</sup> 佐々木知幸\*<sup>2</sup> 白井俊光\*<sup>2</sup>  
高野勝弘\*<sup>4</sup> 近藤哲夫\*<sup>3</sup> 井上克枝\*<sup>1,2</sup>

\*1 山梨大学医学部附属病院検査部 \*2 山梨大学医学部臨床検査医学 \*3 山梨大学医学部人体病理学  
\*4 山梨大学医学部附属病院輸血細胞治療部

key words : CLEC-2, GPVI, 横紋筋融解症, 急性腎障害

## 要旨

血小板は一次止血において中心的な役割を担うが、近年の研究により、血小板が免疫、炎症、がんの転移など、幅広い病態にも関与していることが示されている。最近、横紋筋融解による急性腎障害において、血小板が一定の役割を持つことが明らかになった。この機序は、横紋筋細胞から放出されたミオグロビン由来のヘムにより活性化された血小板が、マクロファージ細胞外トラップを誘導し、尿細管障害を介して腎機能障害の増悪に寄与すると説明されている。しかし、ヘムがどのように血小板を活性化しているのかは不明である。私たちは、ヘムに似たポルフィリン化合物が、血小板活性化受容体 C 型レクチン様受容体-2 (C-type lectin-like receptor 2; CLEC-2) に結合し、そのリガンドとの結合を阻害することから着想を得て、ヘムが CLEC-2 に結合して血小板を活性化するという仮説をたてた。その結果、ヘムが血小板上の受容体である CLEC-2 と Glycoprotein VI (GPVI) に直接結合し、ヒトおよびマウスの血小板を活性化することを確認した。さらに、血小板上からこれらの分子を除去したマウスでは、横紋筋融解症モデルにおける腎機能の増悪、尿細管損傷、細胞外トラップ形成が有意に抑制されていた。以上のことから、本モデルにおける急性腎障害について、血小板上の CLEC-2 と GPVI の両方が重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 1 緒言

横紋筋融解症は、骨格筋の挫滅により筋由来成分が血中に流入することで生じ、重症の場合は急性腎障害 (Acute kidney injury; AKI) を合併し致命的となる<sup>1)</sup>。筋挫滅が外傷による場合はクラッシュ症候群と呼ばれ、災害犠牲者にしばしばみられる。血液透析を含む対症療法が行われるが、災害現場では透析設備が稼働できない状況も想定され、合併する AKI の治療法開発は重要である。横紋筋融解症における AKI (Rhabdomyolysis-induced AKI; RAKI) 増悪の機序は、以下の通り説明されている。まず、損傷を受けた骨格筋から放出されたミオグロビンに由来するヘムは、直ちに血中でヘミンに変換される<sup>2)</sup>。ヘミンは炎症、細胞損傷、内皮活性化などの複数の病態を誘導し、その結果として活性酸素種を発生させるため、ヘミンによる酸化ストレスは AKI を直接的に悪化させると考えられている<sup>3,4)</sup>。近年の研究で、活性化された血小板を介したマクロファージの細胞外トラップ (Macrophage extracellular traps; METs) 放出が、腎尿細管障害を促進し、腎機能障害を引き起こすという、RAKI の新しいメカニズムが提案されているが、この血小板活性化の機序についてその詳細は明らかになっていない<sup>5)</sup>。血小板は、コラーゲン、アデノシン二リン酸 (Adenosine diphosphate; ADP) およびトロンビンなどの複数の物質によって活性化され、対応する受容体および下流のシグナル伝達カスケードを有することが知られている。たと

えば、血小板活性化受容体のうち、C型レクチン様受容体-2 (C-type lectin-like receptor 2; CLEC-2) と Glycoprotein VI (GPVI) は、それぞれ内因性リガンド (ポドプラニンとコラーゲン) が異なるが、下流のシグナル伝達分子の Spleen tyrosine kinase (SYK), SH2 domain-containing leukocyte protein (SLP-76), phospholipase C  $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) を共有している。さらに、CLEC-2 と GPVI は、血栓症だけでなく、免疫、炎症、がんの進行など様々な病態に関与していることが多くの論文で報告されている<sup>6-8)</sup>。私たちはこれらの受容体を中心に RAKI の病態への関与について検討を進め、CLEC-2 と GPVI が共に血小板を活性化する新規ヘミン受容体であり、RAKI に関与していることを新たに示した。

## 2 方法

### 2-1 血小板凝集実験

ヒトおよびマウス洗浄血小板 ( $2.0 \times 10^8$ /mL) を調製し、0~10  $\mu$ g/mL のヘミン (ナカライテスク, 日本) で刺激した。ヘミン刺激の5分前に 0.2 mM RGDS (ペプチド研究所, 日本), 50  $\mu$ M PP2 (メルク, ドイツ) を洗浄血小板に添加した。血小板凝集は、HEMATRACER 712 (LMS, 日本) を用いて評価した。

### 2-2 ウェスタンブロッティング

リン酸化ヒト SYK (Y525/526) (CST, MA), ヒト SYK (サンタクルスバイオテクノロジー, TX), リン酸化ヒト PLC $\gamma$ 2 (CST) およびヒト PLC $\gamma$ 2 (サンタクルスバイオテクノロジー) に対する抗体を用いて各蛋白を検出した。

### 2-3 表面プラズモン共鳴分光法

ヒト CLEC-2-ヒト Fc, ヒト GPVI-ヒト Fc およびヒト Fc 組換えタンパク質を、まず CM チップ (GE ヘルスケア, 英国) に共有結合させた。組換えタンパク質でコーティングされたチップにヘミンを灌流し、共鳴単位 (Resonance Unit; RU) の変化を記録した。ヘミン-CLEC-2 またはヘミン-GPVI 相互作用を示す RU の曲線は、ヒト CLEC-2-ヒト Fc またはヒト GPVI-ヒト Fc の RU からヒト Fc の RU を差し引くことによって得た。

### 2-4 横紋筋融解症モデルマウス

純水により希釈した 50% グリセロール (Sigma, MO) 7.5 mL/kg 体重を、マウス大腿四頭筋に注入した。血小板上から CLEC-2 を除去するために、抗マウス CLEC-2 抗体 (8 mg/kg 体重) をグリセロール注入の1週間前に静脈内に注入した。腎機能、尿細管損傷および METs 形成は、血清クレアチニン、PAS 染色および F4/80 (Thermo Fisher Scientific, MA), Citrullinated Histone H3 (Abcam, UK) の免疫組織化学によって評価した。

### 2-5 統計的解析

統計解析は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, CA) を用いて、Student の t 検定または Tukey の多重比較検定を用いて行った。

### 2-6 倫理面への配慮

本研究は、山梨大学倫理委員会の承認 (承認番号: A1-18) を受けており、学内における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠している。

## 3 結果と考察

RAKI における血小板の役割について、ヘム (ヘミン) 添加により血小板が活性化するか検討したところ、ヘミンはヒト洗浄血小板の光透過率を用量依存的に増加させた (図 1A)。その一方で、インテグリン介在性血小板凝集抑制ペプチドである RGDS は、ヘミンによる光透過率の上昇をほぼ完全に阻害した (図 1B)。また、ヘミン誘導血小板凝集は、SFK (Src family tyrosine kinase) 阻害剤である PP2 によっても阻害された (図 1C)。さらに、ウェスタンブロッティングでは、SYK および PLC $\gamma$ 2 のリン酸化レベルがヘミンによって高まり、その変化は PP2 によって阻害された (図 1D)。これらの結果から、ヘミンが SFK-SYK-PLC $\gamma$ 2 経路を介してヒト血小板を活性化することを推察できる。血小板活性化受容体の中で、CLEC-2 と GPVI は血小板活性化に SFK-SYK-PLC $\gamma$ 2 シグナルを必要とすることから<sup>9)</sup>、ヘミンがヒト CLEC-2・GPVI に直接結合しているかどうか、表面プラズモン共鳴現象を用いた Biacore システム (GE ヘルスケア) により調べた。興味深いことに、ヘミンはヒト CLEC-2 とヒト GPVI の両方に結合することが確認された (図 1E)。以上の

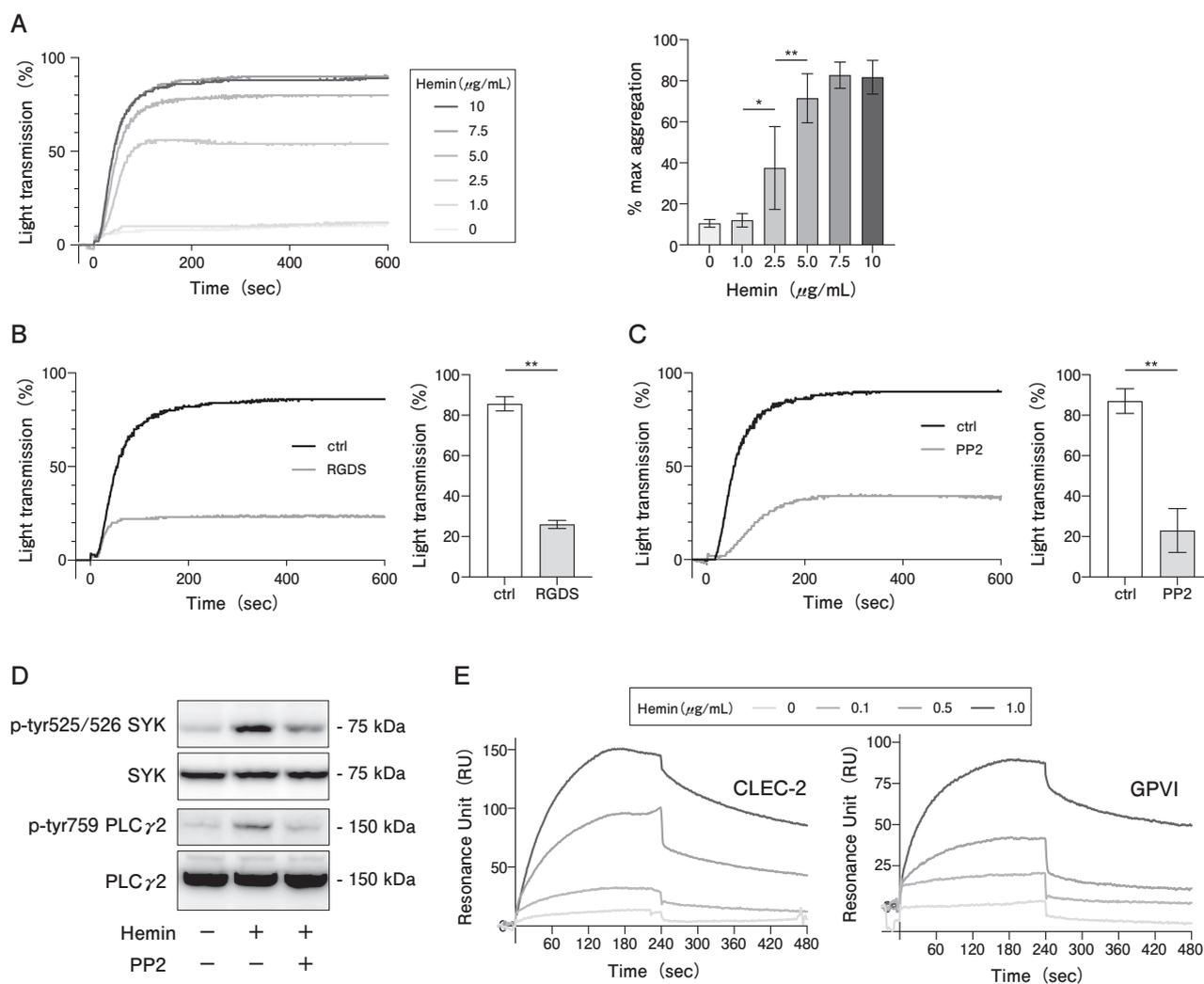


図1 In vitro におけるヘミンと CLEC-2・GPVI の相互作用

ヘミンは、SFK-SYK-PLC $\gamma$ 2 経路を介してヒト血小板を活性化し、CLEC-2 と GPVI の両方に直接結合する。

結果から、ヘミンは CLEC-2 と GPVI に直接結合して血小板を活性化することが判明した。

次に、マウスにおけるヘミンによる血小板凝集や血小板活性化が、CLEC-2・GPVI にどれほど依存しているかを調べた。ヘミンは、野生型マウスにおいて、ヒトと同様のヘミン濃度の範囲で血小板凝集を誘導した (図 2A)。同様の実験を、1. CLEC-2 欠損血小板、2. GPVI 発現を欠損している Fc 受容体  $\gamma$  (Fc receptor  $\gamma$ ; FcR $\gamma$ ) 欠損血小板、3. CLEC-2 欠損 FcR $\gamma$  欠損 (double knockout; DKO) 血小板を用いて行った。ヘミンによる血小板凝集は、野生型と比較して CLEC-2 欠損血小板ではわずかながら有意に減少し、FcR $\gamma$  欠損血小板ではより減少した (図 2B)。さらに、DKO 血小板では、5.0  $\mu$ g/mL のヘミンによる血小板凝集は完全に抑制され、最高濃度として設定した、10.0  $\mu$ g/

mL のヘミンでもわずかな凝集しか誘導されなかった (図 2B)。これらの知見は、ヘミンによる血小板活性化が、CLEC-2 と GPVI の両方に大きく依存していることを意味している。ヘミンがヒトおよびマウスの血小板を活性化すること、ヒト CLEC-2 およびヒト GPVI の両方に結合すること、さらに、マウスにおいてヘミンによる血小板活性化が CLEC-2 および GPVI の発現に依存していることが確認されたことから、血小板上の CLEC-2 および GPVI の両方が、RAKI に関与していると考えてさらに検討をすすめることにした。RAKI モデルマウスとして、大腿四頭筋ヘグリセロールを注入するモデルを選択し、野生型マウスと DKO マウスにおける RAKI が病態に影響を及ぼすかを確認した。このモデルでは、腎臓についての肉眼的所見の比較のほか、血清クレアチニン値、尿細管損傷、および

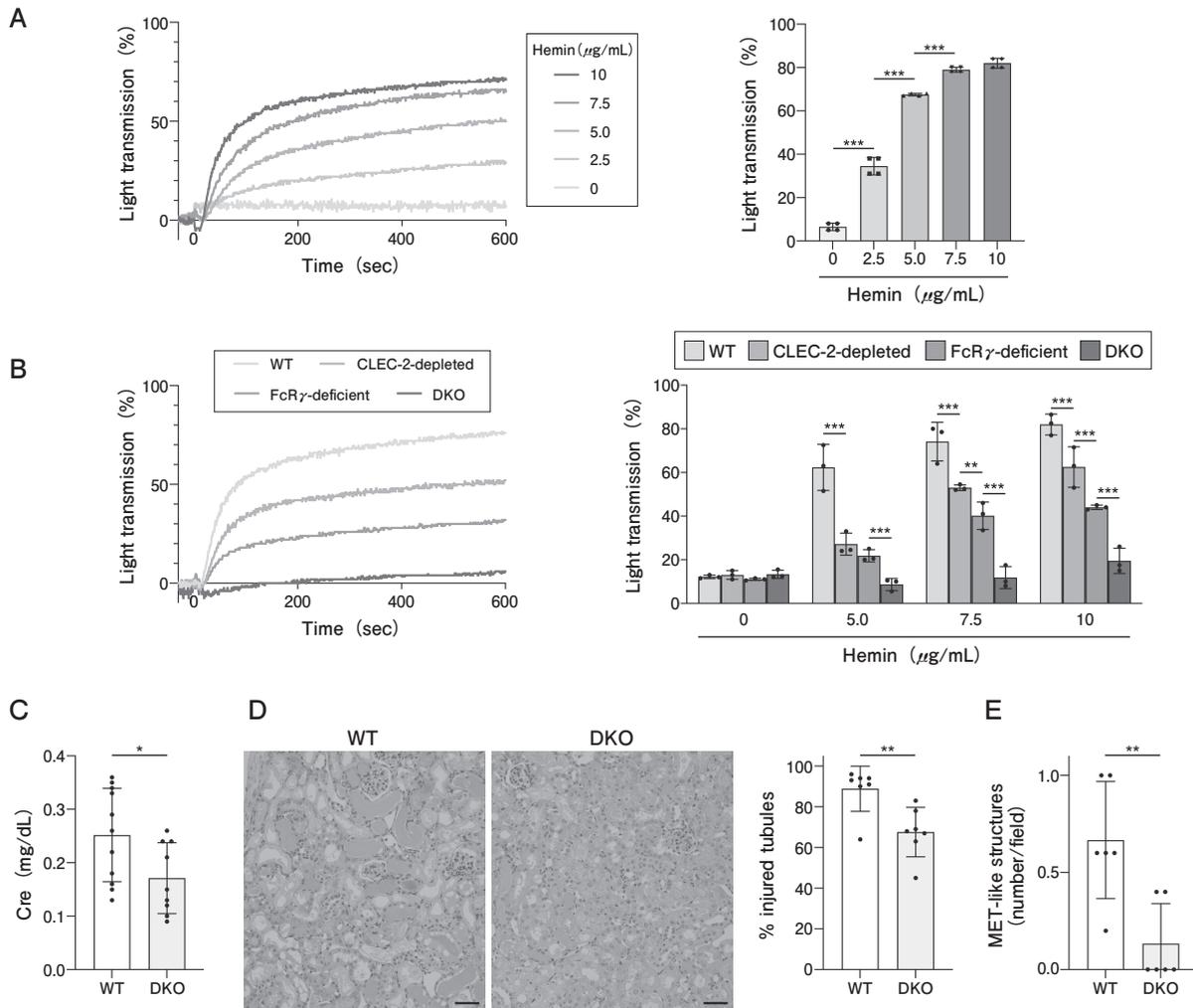


図2 In vivoにおけるヘミンと CLEC-2・GPVI の相互作用

ヘミンは CLEC-2 と GPVI/FcRγ を介してマウス血小板活性化を誘導し、RAKI の増悪に寄与する。

WT：野生型，DKO：ダブルノックアウト（CLEC-2 欠損 FcRγ 欠損），MET：Macrophage extracellular trap

METs 形成が変化するかどうか評価した。グリセロールを投与した野生型マウスでは、両側腎とも重度の組織虚血を示唆する淡赤色の腎臓が観察されたが、DKO マウスではこれらの所見は認めず、概ね野生型の正常個体と同様の色調の腎臓が観察された。さらに、DKO マウスの血清クレアチニン値は野生型に比べて有意に低値を示した (図 2C)。組織学的解析では、DKO マウスにおいて尿細管損傷と METs 形成の両方が減少していることが明らかになった (図 2D および 2E)。これらの結果は、血小板上の CLEC-2 と GPVI が RAKI の増悪に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。以上の結果から、ヘミンが CLEC-2/GPVI と結合することで血小板を活性化し、この経路が RAKI の病態増悪に関与していることが示唆された。CLEC-2

や GPVI に対する阻害剤がヘミンによる血小板活性化と引き続く腎機能障害を抑制するかどうかについてはさらなる検討が必要であるが、横紋筋融解症患者に合併する重篤な AKI を回避するための新たな戦略として、抗 CLEC-2 薬や抗 GPVI 薬は有望であると考えられた。

#### 4 結語

本研究の結果、血小板上の受容体である CLEC-2 と GPVI が新規ヘミン受容体であり、RAKI の病態増悪に関与していることが示唆された。これらの受容体を阻害することがヘミンによる血小板活性化と腎機能障害を阻害するかどうかについてはさらなる検討が必要であるが、横紋筋融解症患者に合併する重篤な AKI を回避するための新たな戦略として、これらの受容体

を阻害するという新たな介入方法が示唆された。

本研究は、平成30年度日本透析医会公募研究助成によるものである。この成果については他医学雑誌に原著論文として投稿中のため、二重投稿となることを避ける目的でその概要について総説的に記載した。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

#### 文 献

- 1) Bosch X, Poch E, Grau JM : Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med* 2009; 361 : 62-72.
- 2) Cannon JB, Yunker MH, Luoma N : The effect of aggregation inhibitors and antioxidants on the stability of hemin solutions. *PDA J Pharm Sci Technol* 1995; 49 : 77-82.
- 3) Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, et al. : Heme in pathophysiology : a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol* 2014; 5 : 61. doi: 10.3389.
- 4) Bolisetty S, Zarjou A, Agarwal A : Heme Oxygenase 1 as a Therapeutic Target in Acute Kidney Injury. *Am J Kidney Dis* 2017; 69 : 531-545.
- 5) Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, et al. : Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nat Med* 2018; 24 : 232-238.
- 6) Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, et al. : Platelet CLEC-2 : Roles Beyond Hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2018; 44 : 126-134.
- 7) Rayes J, Watson SP, Nieswandt B : Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest* 2019; 129 : 12-23.
- 8) Suzuki-Inoue K : Platelets and cancer-associated thrombosis : focusing on the platelet activation receptor CLEC-2 and podoplanin. *Blood* 2019; 134 : 1912-1918.
- 9) Ozaki Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O : Novel interactions in platelet biology : CLEC-2/podoplanin and laminin/GPVI. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1 : 191-194.