【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- 診療ガイドライン
- ・研修医のお役立ち論文コンテンツ
- ・用語集

本編は次ページより掲載しております。

血小板による器官形成・再生メカニズム —CLEC-2/Podoplanin 研究が明らかにし た新たな血小板機能─

築地長治*, 井上克枝

Platelet functions in development and regeneration

Nagaharu TSUKIJI, Katsue SUZUKI-INOUE

要約: 血小板の血栓止血以外の新たな機能,いわゆる "Beyond clotting な機能" が注目を浴びている。これまで器官形成および再生のメカニズムの多くは、その器官にすでに存在する組織・細胞間の相互作用で説明されてきた。しかし、近年、器官形成および再生にも血小板が関与していることが報告されており、とくに注目されているのが血小板活性化と共に放出される多種多様な生理活性物質である。血小板活性化受容体には様々なものがあるが、今回主に取り上げる CLEC-2 は、リガンドが Podoplanin という膜タンパク質であることから標的細胞周辺で局所的に生理活性物質を放出させるのに適している。本稿では、とくに CLEC-2/Podoplanin シグナルに注目して、リンパ管/リンパ節形成、皮膚創傷治癒、肝再生における血小板の役割について最新の知見を交え紹介したい。



築地長治

2004年3月 東北大学理学部生物学科 卒業

2009年3月

東北大学大学院 生命科学研究科生命機能科学 専攻 博士後期課程修了

国立遺伝学研究所 哺乳動物遺伝研究室

特任研究員 2012年12月

> 山梨大学大学院総合研究部 医学域臨床医学系

臨床検査医学 特任助教 2013年9月

> 山梨大学大学院総合研究部 医学域臨床医学系 臨床検査医学 助教

Key words: platelets, development, regeneration, CLEC-2/Podoplanin signaling

1. はじめに

血小板は血栓止血において中心的な役割を果たす 細胞であるが、近年、血栓止血以外のいわゆる "Beyond clotting な血小板機能"が次々に明らかにされている。血栓止血における血小板機能としては、もちろん血小板凝集能がその中心となる。しかしながら、Beyond clotting な血小板機能、とくに器官形成および再生等においては、血小板から放出される生理活性物質の作用に注目されることが多い。血小板 α 顆粒には VWF や Fibrinogen など血小板凝集に関与する分子だけでなく、TGF-β や PDGF、bFGF、VEGF、

*責任者連絡先:

山梨大学大学院総合研究部医学域臨床医学系臨床検査医学

〒 409-3898 山梨県中央市下河東 1110 Tel: 055-273-1111, Fax: 055-273-6713 E-mail: ntsukiji@yamanashi.ac.jp EGF など多種多様な成長因子群が含まれている¹⁾. さらに SIP(スフィンゴシン 1 リン酸)など血小板活性化によって産生,放出される脂質メディエーターも器官形成,再生に関与することが報告されている.

血小板からの生理活性物質の放出は血小板活性化に伴って起こることから、血小板活性化受容体とそのリガンドとの結合によって制御されていると言える。数ある血小板活性化受容体のうち、トロンビン受容体(ヒトでは PAR-1、PAR-4、マウスでは PAR-3、PAR-4)、ADP 受容体(P2Y1、P2Y12)、トロンボキサン A2 受容体等は血中に一過性に出現する遊離のリガンドと結合する受容体であるのに対し、GPVIや、本稿で主に取り上げる CLEC-2 はそれぞれ細胞外基質の Collagen あるいは膜タンパク質の Podoplanin をリガンドとする(図1)ため、特定の組織で局所的な血小板活性化を惹起し、生理活性物質を放出させることが可能である。器官形成や組織再生の過程において、その内部組織では成長因子の産生、

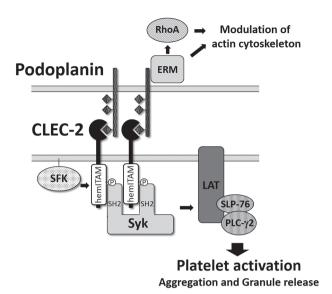


図1 CLEC-2/Podoplanin シグナル

CLEC-2 と Podoplanin の結合は各々の細胞内にシグナルを伝達する. 血小板において CLEC-2 は、Syk や SLP-76 等のチロシンキナーゼカスケードを通じて血小板を活性化させ、最終的に血小板凝集や顆粒内容の放出を惹起する. Podoplanin 発現細胞においては ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)や RhoA を通じてアクチン細胞骨格の調節に関与する.

分泌,標的細胞への作用,そしてそれに伴う転写因子群の発現変化が時空間的に厳密に制御されている.血小板内の生理活性物質が器官形成や再生に関与する場合,その放出のための血小板活性化もやはり時空間的に制御されている必要があると考えられる.

CLEC-2 のリガンドである Podoplanin は膜タンパ ク質であり、多くの器官に発現細胞が存在する²⁾(表 1). これら Podoplanin 発現細胞は通常血管外に存在 するため、CLEC-2 依存性の血小板活性化(図1)が 起こるシチュエーションは時空間的に限定されてい ると考えられる. 私たちが CLEC-2 を血小板活性化 受容体として同定してからまだ10年ほどと他の受 容体に比べ歴史が浅いにもかかわらず、その特異な 活性化のシチュエーションからか CLEC-2 が関与す る Beyond clotting な血小板機能が次々に明らかにさ れており、その多くがPodoplaninとの相互作用によっ て説明されている. 本稿で述べるもの以外では、癌 細胞の血行性転移や巨核球造血、血管透過性調節な どが知られている²⁾. 本稿では、血小板の"Beyond" clotting な血小板機能"の中で器官形成,再生に関連 する機能(胎生期リンパ嚢形成, リンパ節形成, 皮膚 創傷治癒, 肝再生)について, とくに CLEC-2/Podo-

表1 多種多様な Podoplanin 発現細胞(文献 2 より改変)

表1 多性多様な Podoplanin	
Organ	Cell or tissue type
Vasculature	Lymphatic endothelial cells
Lymphoid organs	Stromal reticular cells; Follicular dendritic cells
Skin	Focal expression in basal keratinocytes
Heart	Epicardium; Pericardium
Lung	Type I alveolar cells; Pleura
Kidney	Glomerular podocytes; Parietal epithelial cells of Bowman's capsule
Liver	Bile ducts; Peritoneum; transient expression in sinusoidal endothe- lial cells
Oral cavity	Mucosal epithelium; Tooth germ
Esophagus	Basal keratinocytes
Intestine	Peritoneum
Central nervous system	Choroid plexus; Meninges; Fetal neuroepthelium
Ovary	Follicular granulosa cells; Germinal epithelium
Breast	Myoepithelial cells
Prostate	Myofibroblasts
Testis	Fibromyocytes
Bone	Osteocytes; Periosteum
Joint	Synovial cells

CLEC-2 が巨核球・血小板にほば特異的であるのに対し、 Podoplanin 発現細胞は胎生期から成体まで多様な組織に認め られる。今回は割愛したが Podoplanin 発現腫瘍細胞も多数 存在する.

planin シグナルに注目して概説したい.

2. 胎生期リンパ嚢形成

成体において血管とリンパ管は基本的に分離しており、通常、血液がリンパ管に流入することはない。しかしながら、将来胸管になる初期リンパ嚢(primary lymph sac)は、胎生期に主静脈(cardinal vein)から発生、分離することが知られている。初期リンパ嚢の形成には大きく分けて3つのステップがある。①主静脈血管内皮細胞からリンパ管内皮細胞への分化、②リンパ管内皮細胞の出芽、遊走および初期リンパ嚢形成、③初期リンパ嚢-主静脈の分離である。

まず、主静脈の血管内皮細胞の一部が Notch,

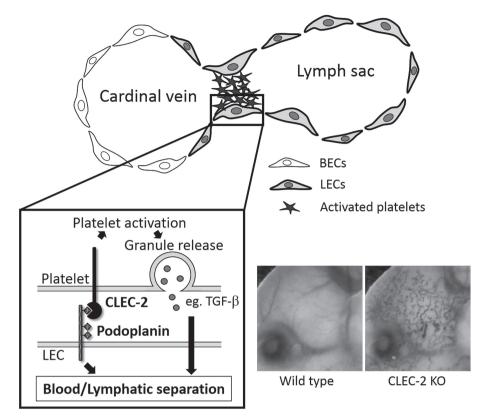


図2 血小板による胎生期リンパ嚢形成機構

主静脈 (Cardinal vein) から分化・出芽したリンパ嚢が分離し、独立した脈管を形成するには血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮 Podoplanin の相互作用が必須である。リンパ嚢の分離には血小板からの TGF- β や Podoplanin によるリンパ管内皮細胞の細胞骨格制御が関与していると予想されている。胎生 17.5 日マウス頭部表皮(右下):野生型マウスでは血管のみに血液が存在するのに対し、CLEC-2 KO マウスでは血管リンパ管分離不全により、リンパ管への血液の流入が観察される。

Wnt, レチノイン酸シグナルなどの影響を受けてリンパ管内皮特異的転写因子である Prox1 を発現し始める. Prox1 はリンパ管内皮に特徴的な遺伝子である VEGFR3 や Podoplanin (CLEC-2 リガンド)等の転写を促進することでリンパ管内皮細胞としての分化を進める(①). リンパ管内皮細胞に運命付けられた細胞群は血管外の特定の組織で産生, 分泌される VEGF-C によって増殖し, さらにその発生源に向かって主静脈から出芽, 遊走して袋状の構造を作る(②). これが初期リンパ嚢である³). 初期リンパ嚢はこの時点で主静脈と分離していないため, 血液が主静脈から初期リンパ嚢に流入し得る. 最終的に初期リンパ嚢を主静脈から分離しているのが血小板であり, 血小板の CLEC-2 とリンパ管内皮の Podoplanin の結合がそのトリガーである(③, 図 2). それを裏付け

るように、CLEC-2 欠損マウスや Podoplanin 欠損マウスでは、③のみが影響を受け、リンパ管は形成されるものの主静脈からの分離が完了せずに血液がリンパ管内に流入する(図2右下).血液の流入がリンパ液の循環に影響するためか、結果として皮下に重篤な浮腫を起こすことが知られている^{4,5)} (data not shown).

血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮 Podoplanin の相互作用によって初期リンパ嚢が分離するメカニズムとしては以下の 2 つの仮説が考えられている.一つは血小板活性化によって放出される顆粒内容の作用である.血小板 α 顆粒には TGF- β が多量に含まれているが, TGF- β にはリンパ管内皮細胞の増殖や遊走,管腔形成を抑制する作用がある.初期リンパ嚢-主静脈の分離部位で局所的に TGF- β が作用し,初期

リンパ嚢の分離を促進していると考えられる 6 . もう一つは Podoplanin 側へのシグナル伝達である. Podoplanin の下流のシグナルは不明な点が多いが Ezrin/Radixin/Moesin を介してアクチン細胞骨格を制御することが知られている 7 (図1). 血小板 CLEC-2とリンパ管内皮細胞 Podoplanin の結合がリンパ管内皮細胞の細胞骨格再編成を引き起こして細胞の形態や運動に影響を与え、初期リンパ嚢の分離を促進している可能性もある 8 . 初期リンパ嚢と主静脈の分離部位に血小板凝集塊が形成される 9 ことから血小板凝集塊が蓋をして分離を促進している可能性も考えられたが、血小板無力症の原因であるインテグリン α IIb β 3 の欠損マウスで初期リンパ嚢 – 主静脈分離不全は報告されておらず、その可能性は低いと考えられている 4,10 .

3. リンパ節形成およびリンパ節高内皮細静脈の 透過性制御

リンパ節に存在する高内皮細静脈を構成する血管 内皮細胞は通常の血管内皮細胞よりも細胞間の結合 が比較的弱く、血管透過性が高いことが知られてい る. 血中を流れる白血球は、リンパ節に到達後、高 内皮細静脈からリンパ節内に移動することで免疫系 構築に寄与している. つまり. 高内皮細静脈血管内 皮細胞の透過性が高いことは、頻繁に白血球が通過 するための生理学的に重要な性質の一つであると考 えられている. しかしながら, 血管透過性の過剰な 亢進は出血につながるため、血管透過性を低下させ る機構も同時に働いている. それを担うのが血小板 CLEC-2 と血管外に存在する Podoplanin 陽性の Fibroblastic reticular cells(FRCs)である. Herzogらは, 血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスのリンパ節が充血 していることを端緒にリンパ節内の環境について詳 細に解析している11). それによると, 血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスのリンパ節では高内皮細静脈の 血管透過性が異常に高まることで赤血球が大量に血 管外に流出していた. この表現型はリガンドである Podoplanin の欠損マウスでも認められている. 高内 皮細静脈周囲で Podoplanin 発現細胞を検索したとこ ろ, リンパ管内皮細胞や高内皮細静脈を取り巻く FRCで Podoplanin の発現が認められ、さらに組織特 異的 Cre マウスを使うことで FRC の Podoplanin が高内皮細静脈の血管透過性に関与することを明らかにした. さらに彼らは CLEC-2 と Podoplanin の結合によって血小板から放出される S1P が高内皮細静脈血管内皮細胞の VE-Cadherin の発現を促し、細胞間結合を強固にすることで血管透過性の過剰な亢進を抑えていることも明らかにした(図3下).

血小板 CLEC-2 はリンパ節自体の形成にも関与し ている可能性がある. Benezech らは CLEC-2 全身性 欠損マウスで、Peters らは Podoplanin 全身性欠損マ ウスでそれぞれ肉眼的なリンパ節形成が認められな いことを報告している12,13). リンパ節は造血系細胞 由来の Lymphoid Tissue inducer (LTi) 細胞とリンパ組 織形成の場となるストローマ細胞の Lymphoid Tissue organizer (LTo) 細胞の相互作用によって胎生後期(胎 生 16 日以降) に形成されるが、CLEC-2 全身性欠損、 Podoplanin 全身性欠損マウス両者でそれら LTi 細胞 と LTo 細胞の予定リンパ節領域への集積が著しく減 少しているという(図3上).しかしながら.血小板 特異的 CLEC-2 欠損(PF4-Cre, CLEC-2^{fl/fl})マウスで は肉眼的リンパ節形成自体は起こるため、Benezech らは血小板や巨核球以外の細胞に発現する CLEC-2 がリンパ節形成に関与する可能性が高いのではない かと考察している¹²⁾. 私たちも血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスを所持しているが、最近になって PF4-Cre による CLEC-2 欠損効率が 100%ではなく、と くに胎生期には血小板上の CLEC-2 の発現が少量だ が維持されていることを見出した. 血小板 CLEC-2 の発現を完全に欠損させることができれば血小板が リンパ節形成に関与しているかどうか本当の答えが 出るのではないかと考えている。

4. 皮膚創傷治癒

創傷治癒過程は、血液凝固期(止血期)から炎症期、増殖期を経て組織再構築期となる。Asai らは、まず背部皮膚全層性欠損(full-thickness wounds)モデルマウスの創傷治癒過程における Podoplanin の発現解析を行った¹⁴⁾。施術日を Day0 とすると、炎症期で創傷部がまだ血小板を含む血栓で覆われている Day1 において創傷部近傍の正常組織の基底層ケラチノサイトで Podoplanin が発現し始めることを見出した。

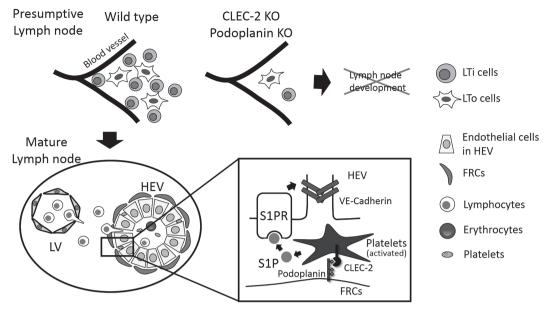


図3 CLEC-2/Podoplanin によるリンパ節形成およびリンパ節高内皮細静脈透過性調節機構通常,予定リンパ節にはLTi 細胞およびLTo 細胞が集積し、それらの相互作用によりリンパ節が形成される。CLEC-2 や Podoplanin 欠損マウスでは、その集積不全からリンパ節形成不全となる。成熟したリンパ節では、FRC の Podoplanin により CLEC-2 依存性に活性化された血小板から S1P が放出される。S1P はリンパ節高内皮細静脈内皮細胞の VE-Cadherin の発現を誘導して高内皮細静脈透過性の過剰な亢進を防いでいる。

基底層ケラチノサイトにおける Podoplanin の発現は、 Day3(血小板血栓が細胞外基質に富む肉芽組織に置 き換わりつつある増殖期)でそのピークを迎え、そ の後緩やかに発現は減少し、ほぼ治癒が完了する Day10 では消失する. さらに Podoplanin 陽性の正常 ヒト表皮ケラチノサイト(NHEK)の培養細胞を用い て、Podoplanin や CLEC-2、血小板の作用を詳細に 解析した. Podoplanin の siRNA によるノックダウン は NHEK の遊走を抑制すると共に上皮マーカーで ある E-cadherin の発現レベルを上昇させた. 一方. 血小板や CLEC-2 リコンビナントタンパク質の添加 によっても Podoplanin のノックダウンと同様、NHEK の E-cadherin の発現レベルが上昇し、遊走能が低下 した. さらに遊走能低下と一致して RhoA 活性の低 下も認められた. これら in vitro の解析結果から Asai らは創傷治癒過程における血小板 CLEC-2 とケラチ ノサイト Podoplanin の作用を次のように考察してい る(図4). 血小板を含む血栓が存在する血液凝固期 から炎症期までは創傷部位で血小板 CLEC-2 と一過 性に発現が上昇した基底層ケラチノサイトの Podoplanin が結合する. その結合は基底層ケラチノサイ

トの RhoA 活性低下や E-cadherin の発現上昇を引き起こし、基底層ケラチノサイトの創傷部位への遊走が一過性に抑制される。その後血栓が消失し肉芽組織に置き換わる増殖期になると CLEC-2-Podoplanin による遊走抑制作用が解除され、肉芽表面をケラチノサイトが覆い、いわゆる再上皮化が進む。すなわち、血小板 CLEC-2 と基底層ケラチノサイト Podoplanin の生理学的作用とは、創傷部位において基底層ケラチノサイトの再上皮化を一時的に遅延させて肉芽組織の増殖に十分な時間を確保することで、より完全な創傷治癒を遂行させることであると考えられる。今後 CLEC-2 および Podoplanin の欠損マウスでの創傷治癒過程の解析が待たれる。

5. 肝再生

肝臓が高い再生能を有する臓器であることはよく 知られている。肝障害や肝切除により肝組織の喪失 が起こると、肝細胞や類洞内皮細胞、星細胞、クッ パー細胞等の相互作用により肝細胞や非実質細胞が 増殖すると共に組織が再構築される。肝細胞の増殖 促進因子としては HGF や IGF-1, EGF, TNF-α, IL-6 などが知られている。肝再生と血小板の関連については多くの報告があるが、肝細胞に対する直接的作用と類洞内皮細胞等を介した間接的作用に分けられる。本稿では肝再生モデルとして最もよく用いられる、肝左葉および中葉を切除する 70% 肝切除モデルマウスについて血小板との関連について概説する.

Murata らは野生型マウス. 抗血小板抗体投与に よる血小板減少マウスおよび TPO 製剤投与による 血小板増多マウスにおいて肝切除後の肝細胞増殖を 解析している15). それによると、血小板数増多群に おいて Ki67 および PCNA(共に細胞増殖マーカー) 発現肝細胞の割合が高く、肝体重比(肝重量/体重) も高かった. 逆に血小板減少群では両パラメータは 低下したため、血小板は肝再生を促進する因子であ ると考えられる. 血小板による肝細胞増殖亢進に は、血小板から放出される様々な分子が関与してい るが、前述のとおり直接的作用と間接的作用に分け られる(図5). 肝切除直後. 残存した肝内には血小 板の集積が起こる. その際, 血小板の類洞内皮細胞 への接着が亢進すると共に、血小板は類洞内皮と肝 細胞の間隙(Disse 腔)にも移行する. Disse 腔に集積 し、何らかの作用で活性化した血小板から放出され る IGF-1 が肝細胞に直接作用し、ERK や Akt のリン 酸化レベルを上昇させて増殖を促すと考えられてい る. Disse 腔には血小板活性化能を持つコラーゲン (type I および type III)が豊富に存在するため、それ が血小板活性化の一因として予想される. また, 血 小板は類洞内皮細胞や Kupffer 細胞との接触を介し て間接的にも肝細胞増殖に寄与する(図5). 血小板 は類洞内皮細胞との接触により活性化されて SIP を 放出し、S1Pが類洞内皮細胞からのIL-6の分泌を 誘導する. IL-6 は肝細胞内で Stat3 のリン酸化レベ ルを上昇させ細胞増殖を促す. 一方, Kupffer 細胞 は血小板との接触によって IL-6 や TNF- α を分泌し、 肝細胞の増殖を促す.

類洞内皮細胞による血小板活性化メカニズムについて、最近 CLEC-2 と Podoplanin の関連性が報告された. Kono らは、野生型マウスに比べて血小板 CLEC-2 欠損マウスでは肝切除後の再生が遅延することを発見し、その原因として Stat3 のリン酸化レベル低下による細胞増殖活性低下があることを示し

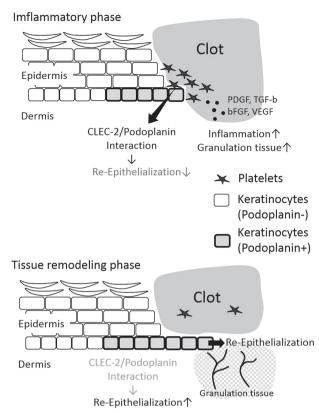


図4 皮膚創傷治癒における血小板 CLEC-2 の機能(仮説) 炎症期において血栓内の血小板からの成長因子等の働きで肉芽組織の増殖が亢進する.一方,基底層ケラチノサイトが一過性に Podoplanin を発現し,血小板 CLEC-2 との結合によって一時的にケラチノサイトの遊走が抑制される.それにより肉芽組織の増殖に十分な時間が確保される.その後血栓の消失と共に CLEC-2/Podoplanin シグナルによるケラチノサイトの遊走抑制が解除され,再上皮化が促進される.

た¹⁶⁾. さらに肝切除後の類洞内皮細胞で一過性にPodoplanin の発現が亢進すること,そして通常なら肝切除後には肝内で血小板凝集塊が多数見られるのに対して血小板 CLEC-2 欠損マウスでは血小板凝集塊がほぼ検出されないことを見出した.類洞内皮が肝再生時に一過性に血小板を活性化するメカニズムはこれまで不明であったが,CLEC-2 と Podoplaninのシグナルこそがその実体であることが強く示唆された.Kupffer 細胞に関しては,サルモネラ菌感染により一過性に Podoplanin を発現することが知られており¹⁷⁾,肝再生における Kupffer 細胞と血小板の相互作用についても CLEC-2 と Podoplanin の相互作用が関与しているかもしれない.

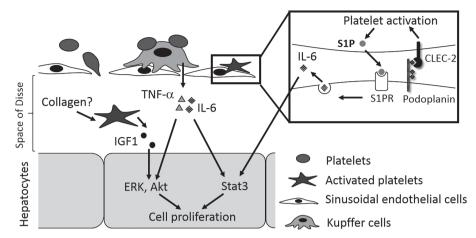


図5 肝切除後の肝再生における血小板の機能

直接的作用:肝切除直後,血小板は Disse 腔に集積し,物理的作用あるいは Collagen によって活性化されると考えられる.活性化血小板から放出された IGF-1 が直接肝細胞に作用して ERK,Akt シグナルを通じて増殖を促す.間接的作用:類洞内皮細胞により血小板が活性化され,SIPが放出される.SIPが類洞内皮細胞から IL-6 を分泌させ,IL-6 が肝細胞内で Stat3 シグナルを活性化することで増殖を促す.この作用に CLEC-2/Podoplanin シグナルが関与する.血小板と接触した Kupffer 細胞からは IL-6 や TNF- α が放出され,肝細胞の増殖を促す.

6. 肺発生

CLEC-2 や Podoplanin の全身性欠損マウスは出生直後にそのほとんどが死亡してしまう⁵⁾. 現在進行中の研究ではあるが、それらのマウスでは、後期肺形成(肺胞形成)に重篤な異常をきたし、出生後も肺に空気が全く取り込めないことがわかった. 私達は血小板特異的 CLEC-2 欠損マウス等の解析を通じて、血小板 CLEC-2 が肺胞形成に必須であり、血小板から放出される生理活性物質が重要であることを発見した. 今後さらなる解析を進め、詳細をご報告できる日を楽しみにしている.

7. おわりに

血小板の Beyond clotting な機能として、胎生期の器官形成および組織再生への関与がここ数年で次々と明らかにされている。とくに血小板の"生理活性物質の貯蔵庫"としての役割が注目を浴びており、多血小板血漿(PRP)を用いた難治性皮膚潰瘍治療は先進医療としてすでに認められている。本稿の中心として取り上げた CLEC-2 は、そのリガンド Podoplaninが細胞膜上のタンパク質という他の血小板活性化受

容体とは異なる特性を持つ. その特性が"特定の時期に局所的に生理活性物質を作用させる"という性質を血小板に与え、細胞増殖や細胞分化が時空間的に制御されるべき器官形成や組織再生という現象に寄与しているのではないかと考えている. 今後、器官形成、組織再生機構における血小板の機能に関する報告はますます増えていくと思われる. 近年次々と明らかになる、血小板の"Beyond clotting な機能"に今後もぜひ注目していただきたい.

著者全員の利益相反(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

- Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K: Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? Biomaterials 76: 371–387, 2016.
- 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 15: 219–229, 2017.
- Aspelund A, Robciuc MR, Karaman S, Makinen T, Alitalo K: Lymphatic System in Cardiovascular Medicine. Circ Res 118: 515–530, 2016.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- Martín-Villar E, Megías D, Castel S, Yurrita MM, Vilaró S, Quintanilla M: Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. J Cell Sci 119: 4541–4553, 2006.
- 8) Pollitt AY, Poulter NS, Gitz E, Navarro-Nuñez L, Wang YJ, Hughes CE, Thomas SG, Nieswandt B, Douglas MR, Owen DM, Jackson DG, Dustin ML, Watson SP: Syk and Src family kinases regulate C-type lectin receptor 2 (CLEC-2)-mediated clustering of podoplanin and platelet adhesion to lymphatic endothelial cells. J Biol Chem 289: 35695–35710, 2014.
- 9) Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H, Fuertbauer 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.
- 10) Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Culleré M, Ross FP, Coller BS, Teitelbaum S, Hynes RO: Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and re-

- duced survival. J Clin Invest 103: 229-238, 1999.
- 11) 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.
- 12) Bénézech C, Nayar S, Finney BA, Withers DR, Lowe K, Desanti GE, Marriott CL, Watson SP, Caamaño JH, Buckley CD, Barone F: CLEC-2 is required for development and maintenance of lymph nodes. Blood 123: 3200–3207, 2014.
- 13) Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, Wucherpfennig K, Turley S, Carroll MC, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK: Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. Immunity 35: 986–996, 2011.
- 14) Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Wada M, Nakamura N, Takenaka H, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Katoh N: Platelets Regulate the Migration of Keratinocytes via Podoplanin/CLEC-2 Signaling during Cutaneous Wound Healing in Mice. Am J Pathol 186: 101–108, 2016.
- Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Hoshi R: Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. World J Surg 31: 808–816, 2007.
- 16) Kono H, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Furuya S, Hirayama K, Akazawa Y, Nakata Y, Sun C, Tsukiji N, Shirai T, Ozaki Y: The platelet-activating receptor C-type lectin receptor-2 plays an essential role in liver regeneration after partial hepatectomy in mice. J Thromb Haemost 15: 998–1008, 2017.
- 17) Hitchcock JR, Cook CN, Bobat S, Ross EA, Flores-Langarica A, Lowe KL, Khan M, Dominguez-Medina CC, Lax S, Carvalho-Gaspar M, Hubscher S, Rainger GE, Cobbold M, Buckley CD, Mitchell TJ, Mitchell A, Jones ND, Van Rooijen N, Kirchhofer D, Henderson IR, Adams DH, Watson SP, Cunningham AF: Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets. J Clin Invest 125: 4429–4446, 2015.