

機関番号：72602

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008~2010

課題番号：20390029

研究課題名 (和文) 血行性転移促進分子 Aggrus 依存的な血小板凝集の制御法開発

研究課題名 (英文) Suppression of platelet aggregation mediated by metastasis-promoting Aggrus protein

研究代表者

藤田 直也 (FUJITA NAOYA)

財団法人癌研究会・癌化学療法センター基礎研究部・部長

研究者番号：20280951

研究成果の概要 (和文)：研究代表者が同定したがん転移促進に関わる血小板凝集促進因子 Aggrus に対する抗体作製を行ない、別々のエピトープを認識する 5 種類のモノクローナル抗体作製に成功した。そのうち 1 種類の抗体に Aggrus 阻害活性を認めた。また、Aggrus 阻害活性を示す Aggrus 結合分子として Tetraspanin ファミリー分子である CD9 を同定し、その結合ドメインならびに阻害機構を明らかにした。個体レベルでの CD9 の転移抑制効果を、イメージング技術により可視化することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：We have previously identified Aggrus protein as a metastasis-promoting platelet aggregation-inducing factor expressed on the surface of metastatic tumor cells. We established 5 different monoclonal antibodies (mAbs) recognizing human Aggrus protein and found that a mAb suppressed Aggrus-mediated platelet aggregation. We also identified a tetraspanin family CD9 protein as an Aggrus-inhibitory binding protein. Using *in vivo* imaging system, we successfully visualized the effect of CD9 on pulmonary metastasis and lung retention of GFP-expressing tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：がん化学療法、細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：Aggrus/podoplanin、血小板凝集、がん転移

1. 研究開始当初の背景

(1)血小板凝集は心筋梗塞、脳梗塞、動脈硬化、慢性頭痛、片頭痛、回転性めまいなど様々な疾患の発症に関与している。血小板凝集は von Willebrand 因子がコラーゲンに付着し、その von Willebrand 因子に膜タンパク質である GPIb を介して血小板が結合することにより開始される。このようにして活性化され

た血小板は ADP やセロトニン、TXA₂などを放出し、周囲の血小板を 2 次的に活性化する。これら因子により活性化された血小板は GPIIb/IIIa を血小板膜上に発現し、この GPIIb/IIIa に血漿中の von Willebrand 因子やフィブリノゲンが結合することにより血液中の様々な細胞を巻き込んだ大きな凝集塊を形成し血栓を形成する。がんの転移形成

過程においても血小板凝集の関与が知られている。実際に高転移性がん細胞は血小板凝集能を有することが多く、できあがった大きな凝集塊が腫瘍塞栓を形成することにより転移形成を助長するとされる。血小板は凝集塊形成に関与するだけでなく、凝集に際してサイトカインや様々な生理活性物質を放出し、がん細胞の血管内皮細胞への接着やがん細胞自身の生存促進にも関わる。実際に抗炎症薬を含め多数の血小板凝集阻害剤が転移抑制薬の候補として挙げられており、血小板凝集はがんの血行性転移に重要な役割を果たしているものと思われる。しかし、がん細胞膜上に発現している血小板凝集促進因子は同定されていなかった。

(2)研究代表者の所属する研究室では、Mouse colon adenocarcinoma 26 より分離された高転移細胞株 NL-17 と低転移細胞株 NL-14 を比較検討することにより、その転移能と血小板凝集能に正の相関が認められることを発見していた。そこで、高転移株 NL-17 をラットに免疫することによりモノクローナル抗体を樹立した。その結果、NL-17 に対して強い反応性を示す抗体の中に、NL-17 細胞依存的な血小板凝集を阻害するモノクローナル抗体 8F11 が見出された。8F11 抗体は NL-17 細胞上に発現している約 40 kDa の膜表面タンパク質を認識することが明らかとなった。そこで常法に従い Aggrus の蛋白精製・ペプチドシーケンスを行なったが、糖鎖が多数付いていたため、アミノ酸配列に関する情報は得られなかった。

(3)研究代表者らは 2003 年にこの新規血小板凝集促進因子の遺伝子クローニングに成功し、この分子を Aggrus と命名した。Aggrus はその遺伝子配列より、世界各国の研究室でクローニングされたために様々な名前 (Podoplanin/T1 α /gp38P/OTS-8) で呼ばれている機能未知の分子と同一であることが明らかとなった。この Aggrus の血小板凝集促進活性を確認するために、マウス Aggrus 分子を CHO 細胞に発現させて検討したところ、Aggrus 発現に伴い血漿成分非存在下で血小板が凝集すること、Aggrus 発現に伴い CHO 細胞の実験的転移が増加すること、マウス Aggrus の血小板凝集誘導活性を中和する 8F11 抗体添加により肺転移形成が阻害されることが確認され、Aggrus は今までに報告の無い新たな血小板凝集促進因子であることが証明された。さらに研究代表者らは、血小板凝集を誘導させる機能との相関から、その

血小板凝集誘導活性に必須な部位 (PLAG domain と命名) を見出すとともに、多量に付加されている糖鎖の機能を明らかにしてきた。

(4)Aggrus のノックアウトマウスはアメリカで既に作製されていた。その報告によると、Aggrus ノックアウトマウスにはリンパ浮腫が認められ、リンパ管ネットワークにも異常が認められると報告されていた。さらに Aggrus ノックアウトマウスは誕生直後に呼吸不全で死亡することも報告されており、Aggrus は呼吸系およびリンパ管系において生理的に重要な役割を果たしていることが示唆されているがその詳細は明らかでなかった。またがんにおける発現を念頭に置いた解析より、Aggrus を高発現しているヒトがん腫について研究代表者らは報告していた。さらに他の研究者より、カポジ肉腫や骨肉腫、頭頸部腫瘍など様々ながんにおける Aggrus の高発現が報告され、Aggrus 発現は何らかの病的状態の維持に関わっている可能性が示唆されていた。このように、これまでリンパ管内皮細胞・I 型肺胞上皮細胞・腎の糸球体上皮細胞など正常細胞のマーカー分子として知られていた Aggrus が、様々な疾患、特にがん細胞での発現亢進が報告されるようになり、注目の的となっていた。

2. 研究の目的

(1)既に同定している血小板凝集誘導活性を標的にし、血小板凝集中和活性を示すモノクローナル抗体を作製することを目標とする。ヒト Aggrus の断片タンパク質を免疫することにより、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立することを目的とする。

(2)これまでの検討により、Aggrus の活性制御に関わる新規 Aggrus 結合分子を幾つか見いだしている。そこで、この分子による Aggrus の血小板凝集誘導活性に対する影響を検討し、その機構を応用した阻害剤開発を目指す。

(3)血小板凝集を伴ったがん転移機構に関して、生体内における挙動などの詳細が明らかでないので、イメージングを行なうことによりがんの転移形成過程を可視化することも試みる。

3. 研究の方法

(1)中和活性を示す抗体が得られると予測される PLAG domain 周辺の合成ペプチドを 4 種

類準備し、マウスに免疫することで、ヒト Aggrus の血小板凝集誘導活性を阻害する中和抗体を作製を試みる。樹立された抗ヒト Aggrus 抗体を精製し、①エピトープ確認、②リンパ管内皮細胞への反応性を、Western blot、FACS、免疫組織染色法などで検討、③血小板凝集中和活性の検討、④Aggrus 発現腫瘍の組織型の検討を行う。

(2)既に見いだしている Aggrus 結合分子は、がん転移抑制分子としての報告も既になされている。そこで、①まずこの Aggrus 結合分子の deletion mutant を作製し、Aggrus との結合に関わる部位の特定を行なう。②さらに必要に応じて、各種強度の異なる界面活性剤を用いて、Aggrus との結合強度を検討する。③Aggrus 結合分子を認識できる市販抗体を用いて、Aggrus とこの結合分子両者ともに発現している細胞株をスクリーニングし、その細胞を用いて内在性タンパク質同士の結合も確認する。④Aggrus または Aggrus 結合分子の発現を減少させる siRNA をデザインし、それぞれの遺伝子をノックダウンした際の血小板凝集誘導活性の変化を検討する。⑤上記 siRNA または過剰発現系を用いて、各々の細胞をヌードマウスの尾静脈より移植し、*in vivo*での肺転移能変化を検討する。⑥細胞膜上での共局在が認められるか、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察する。⑦Aggrus 結合活性を喪失した Aggrus 結合分子の deletion mutant を用い、この変異体には Aggrus の血小板凝集誘導活性に対する中和活性・転移抑制活性が認められないことを、血小板凝集アッセイ系ならびに研究代表者が既に確立済みの肺転移アッセイ系で証明する。

(3)血小板凝集を伴ったがん転移形成過程において、がん細胞がどのような挙動を示すのかは明らかでない。そこで、GFP 遺伝子を導入したがん細胞をマウスに移植し、その血管内並びに転移先臓器である肺における挙動を、*In vivo* imaging system で検討する。

4. 研究成果

(1)ヒト Aggrus 全長タンパク質あるいは PLAG2 ドメインを含むリコンビナントペプチドをマウスに免疫し、モノクローナル抗体作製を行なった。様々なエピトープを認識するモノクローナル抗体を 5 種類作製することに成功し、そのうちの YM-1 抗体という 1 種類のみが、中和活性発揮に必須であることが示唆されている PLAG2 ドメイン近辺を認識してい

ることを見いだした。具体的には Aggrus の各種 deletion mutant (図 1) を作製し、YM-1

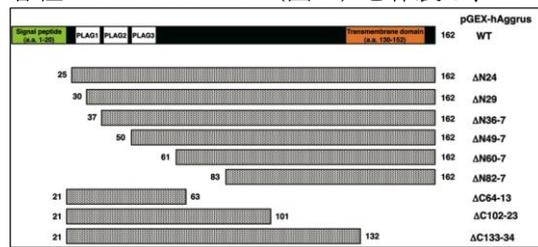


図 1 Aggrus deletion mutant の作製

抗体のこれら変異タンパク質認識能を検査することにより詳細なエピトープ同定を行った。その結果、YM-1 抗体認識部位が、ヒト Aggrus の 38~51 番目のペプチド部分を認識することを見いだした (図 2)。

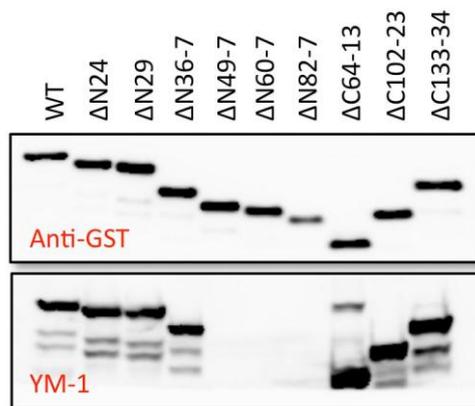


図 2 YM-1 抗体の Aggrus 認識エピトープ

さらに、Aggrus 依存的な血小板凝集を測定する系を用いて、YM-1 抗体の Aggrus 中和活性を確認した。しかし、YM-1 抗体を産生するハイブリドーマの安定性は悪く、安定した抗体取得が非常に難しかった。さらに YM-1 抗体産生ハイブリドーマより、抗原認識に関わる相補性決定領域 (CDR) のクローニングを試みたが、中和活性を保持した CDR のクローニングには成功せず、これらの結果より、新たな中和抗体の作製が今後必要と考えられた。

(2)Aggrus 結合タンパク質のスクリーニングを行ない、Tetraspanin ファミリー分子である CD9 を同定した。実際に Aggrus と CD9 の共局在が、共焦点顕微鏡による解析の結果確認された。CD9 を過剰発現させると、内在性 Aggrus の血小板凝集誘導活性を阻害することが確認された。さらに CD9 の各種 deletion mutant を作製して結合部位の同定を行なった結果、CD9 の細胞外ドメイン (39 番目から 56 番目のペプチド部分) と結合することが見いだされた。CD9 は Tetraspanin Web と

呼ばれる膜上の高分子複合体形成のオーガナイザーとして機能するが、Aggrus は CD9 と結合することで Tetraspanin Web に取込まれ、その結果、取込まれた Aggrus はその血小板凝集促進活性を失う事が明らかとなった。さらに、CD9 の細胞外ドメインを欠失した CD9 deletion mutant には血小板凝集抑制活性が認められず、転移抑制効果も認められなかった。この理由を検討した結果、CD9 変異体は Aggrus を Tetraspanin Web へとリクルートする活性を失っており、その結果血小板凝集抑制活性や転移抑制活性を示さない事が明らかになった。(図 3)。

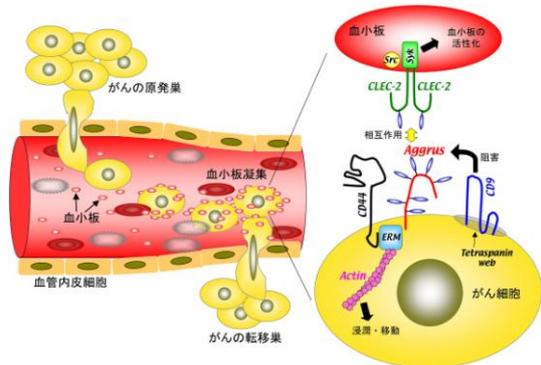


図 3 CD9 による Aggrus 依存的な血小板凝集の抑制モデル

(3)血小板凝集を伴ったがん転移機構解析を目指して、HT1080 細胞に AcGFP 発現プラスミドを導入した細胞株を樹立した。この HT1080/AcGFP 細胞を移植したマウスでの転移を *in vivo* で観察したが、転移先臓器である肺は皮膚表面から深く、そのままでは観察できなかつた。肺を摘出して観察する *ex vivo* 法により、定量的に肺転移を観察することに成功した。特に転移初期過程の肺への物理的なトラップの時間変化を観察することが可能となった。また、この HT1080/AcGFP 細胞に CD9 を発現させた細胞株を移植することで、CD9 による肺転移抑制効果を可視化すること(図 4)に成功し、その定量化(図 5)も可能となった。

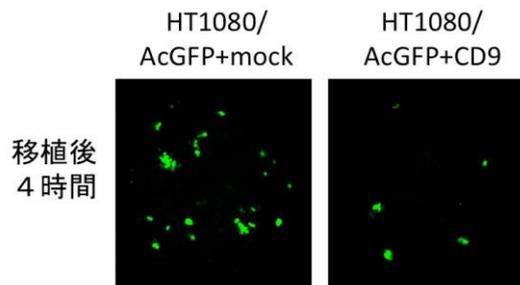


図 4 CD9 による肺転移抑制効果の可視化

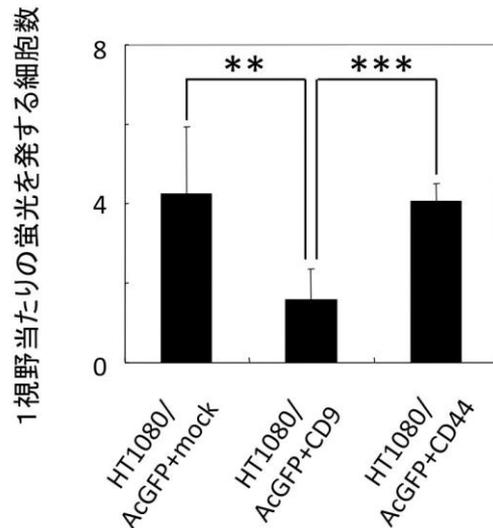


図 5 イメージング技術を用いた肺転移の定量化

本研究課題では、当初計画した目的を全て達成し、Aggrus を阻害する中和抗体や低分子阻害剤の開発につながる成果を得た。さらに、これら Aggrus 阻害剤の評価につながるイメージング技術の確立や Aggrus 阻害分子の同定に成功した。本研究課題で遂行された成果は、学術雑誌・国内外の学会で発表すると共に特許申請を既に行っていることから分かるように、非常にインパクトのある独創的な成果となっている。特に Aggrus の血小板凝集促進作用は国内外で高い注目を浴びており、多くの研究者が Aggrus 研究に参入してきている。その結果、Aggrus の血小板凝集誘導作用が、個体発生期における血管とリンパ管の分離に関わるという新たな発見・新規分野の開拓などにつながってきている。また、様々ながん腫における Aggrus 発現検討が国内外で進められたことにより、抗がん剤開発における新たな分子標的として Aggrus が注目されている。

今後は、本研究課題で得た細胞株、転移評価系、中和抗体などを用い、Aggrus 阻害剤の開発へと展開していく必要がある。また、臨床応用の面から、新たな中和抗体の作製ならびに低分子阻害剤の創製などが今後求められる。さらに、Aggrus 阻害剤をがん転移阻害剤として開発していくためには、標的となるがん腫・組織型の詳細な解析を行うことで、標的がん腫を早急に決定し、日本人臨床検体における発現確認を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 20 件)

- ① Youya Nakazawa, Hiroyuki Arai, and Naoya Fujita. The novel metastasis promoter *Merml/Wbscr22* enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing *Zac1/p53*-dependent apoptosis. **Cancer Res.** 査読有, 71: 1146-1155, 2011.
- ② Shogo Ehata, Erik Johansson, Ryohei Katayama, Sumie Koike, Akira Watanabe, Yukari Hoshino, Yoko Katsuno, Akiyoshi Komuro, Daizo Koinuma, Mitsunobu R. Kano, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Hiroyuki Aburatani, Naoya Fujita, and Kohei Miyazono. Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. **Oncogene** 査読有, 30: 1693-1705, 2011.
- ③ Aya Misawa, Ryohei Katayama, Sumie Koike, Akihiro Tomida, Toshiki Watanabe and Naoya Fujita. AP-1-dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. **Oncol. Res.** 査読有, 19: 23-33, 2010.
- ④ Akito Nakamura, Hiroyuki Arai, and Naoya Fujita. Centrosomal Akl1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. **J. Cell Biol.** 査読有, 187: 607-614, 2009.
- ⑤ Ryohei Katayama, Sumie Koike, Shigeo Sato, Yoshikazu Sugimoto, Takashi Tsuruo, and Naoya Fujita. Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. **Cancer Sci.** 査読有, 100: 2060-2068, 2009
- ⑥ Youya Nakazawa, Shigeo Sato, Mikihiko Naito, Yukinari Kato, Kazuhiko Mishima, Hiroyuki Arai, Takashi Tsuruo, and Naoya Fujita. Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. **Blood** 査読有, 112: 1730-1739, 2008.
- ⑦ Takashi Tsuruo and Naoya Fujita.

Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B** 査読有, 84: 189-198, 2008.

〔学会発表〕 (計 29 件)

- ① Youya Nakazawa, Hiroyuki Arai, Naoya Fujita, 新規ヒストンメチルトランスフェラーゼ *Merml* は、腫瘍抑制因子 *Zac1* の発現抑制を介して、癌転移を促進する。第 69 回日本癌学会総会 (2010 年 9 月 24 日、大阪) (口演)
- ② Aya Misawa, Ryohei Katayama, Sumie Koike, Akihiro Tomida, Toshiki Watanabe, Naoya Fujita, AP-1 依存的な miR-21 の発現亢進によるがん幹細胞様 SP 細胞の抗がん剤耐性化。第 69 回日本癌学会総会 (2010 年 9 月 24 日、大阪) (示説)
- ③ Naoya Fujita, Molecular mechanisms of pulmonary metastasis induced by a tumor cell surface Aggrus protein. The 14th JFCR-ISCC symposium (第 14 回癌研-国際癌化学療法シンポジウム) (2009 年 12 月 2 日、東京) (招待講演)
- ④ Naoya Fujita, Hematogenous metastasis induced by platelet aggregation-inducing factor Aggrus. The 14th IMCB Symposium (第 14 回東京大学分子細胞生物学研究所シンポジウム) (2009 年 10 月 28 日、東京) (招待講演)
- ⑤ 藤田直也, Aggrus を介した癌転移の促進機構。第 137 回染色体研究会 (2009 年 4 月 11 日、東京) (招待講演)

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 藤田直也, 羊土社, がんの分子標的と治療薬事典, 42-62 頁, 2010
- ② 片山量平, 藤田直也, 金芳堂, がん分子標的治療研究 実践マニュアル, 188-194 頁, 2009
- ③ 藤田直也, 南山堂, がんの分子標的治療, 101-106 頁, 2008

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: マウス抗 Aggrus モノクローナル抗体
発明者: 藤田直也、中澤侑也
権利者: 財団法人癌研究会
種類: 特許
番号: 特願 2011-062686
出願年月日: 2011 年 3 月 22 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

<http://www.jfcr.or.jp/english/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 直也 (FUJITA NAOYA)

(財) 癌研究会・癌化学療法センター
基礎研究部・部長

研究者番号：20280951

(2) 研究協力者

佐藤 重男 (SATO SHIGEO)

(財) 癌研究会・癌化学療法センター
基礎研究部・主任研究助手

研究者番号：無し

高見 美穂 (TAKAMI MIHO)

(財) 癌研究会・癌化学療法センター
基礎研究部・研究補助員

研究者番号：無し

中澤 侑也 (NAKAZAWA YOUYA)

(財) 癌研究会・癌化学療法センター
基礎研究部・研究生

研究者番号：無し