

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：37114  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22390345  
 研究課題名（和文）リンパ管内微小環境におけるCLEC2-PLAG複合体の癌性形質誘導に関する研究  
 研究課題名（英文）CLEC2-PLAG complex-induced oncogenic transformation in the intra-lymphatic microenvironment  
 研究代表者  
 沢 禎彦 (SAWA YOSHIHIKO)  
 福岡歯科大学・歯学部・教授  
 研究者番号：70271666

### 研究成果の概要（和文）：

本研究では、抗マウスポドプラニン抗体 (PMab-1) ならびに抗ヒトポドプラニン抗体 (NZ-1.2) を開発した (MBL, Millipore など販売)。口腔癌の検索ではリンパ管で腫瘍接着部位に血小板が介在することが明らかとなり、血小板が口腔扁平上皮癌のリンパ行性転移に関与する可能性が示唆された。ポドプラニン発現性口腔癌細胞のリンパ管内皮細胞に対する接着はポドプラニン非発現細胞より強く、接着はNZ-1.2によって阻害され、ポドプラニン抗体が転移の阻止に有用である可能性が示された。

### 研究成果の概要（英文）：

We developed novel antibodies specific for human and mouse podoplanin (PMab-1, NZ-1.2) sold in MBL, Imgenex, Sigma, and Millipore. Immunohistochemical studies on the oral squamous cell carcinoma (SCC) revealed that platelets exist between SCC and lymphatic endothelial cells at the luminal side of lymphatic vessels where SCC attached. The platelets may contribute to the lymphogenous metastasis of SCC. The adhesion activity to human lymphatic endothelial cells was higher in podoplanin-positive SCC than in podoplanin-negative SCC, and the adhesion of SCC was blocked by NZ-1.2. Anti-podoplanin may be useful for the inhibition of the lymphogenous metastasis of SCC.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）・微小循環

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) リンパ管内皮細胞における免疫機能分子の発現について

申請者はこれまで、リンパ管が toll-like receptor で細菌成分を認識し白血球接着因子と貪食細胞特異的ケモカインを発現することによりリンパ節求心性の免疫学的応答を促進する可能性を示した。

### 2) ポドプラニンの分子生物学的解析

共同研究者の加藤は、膠芽腫や肺扁平上皮癌が発現するムチン型蛋白ポドプラニンの分子構造を明らかにし、血小板と結合することを示した。

## 2. 研究の目的

ポドプラニンは口腔扁平上皮癌の浸潤領域に強く発現し、リンパ節転移に相関する。本研究では、扁平上皮癌が血小板を介してリンパ管内皮細胞に結合する可能性、ポドプラニンが扁平上皮癌の内皮細胞への接着を促進させる可能性、ポドプラニンが腫瘍細胞に癌幹細胞形質を誘導する可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) 扁平上皮癌のリンパ管内皮細胞への CELC2-PLAG 複合体を介した接着の解明

(1) 市販の口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 にポドプラニン遺伝子を導入した HSC3-PDPN を用いた。

(2) マトリゲルにて培養したヒトリンパ管内皮細胞に対する HSC3-PDPN の浸潤試験とポドプラニン遺伝子特異抗体による接着阻害試験を行った。

(3) マウスポドプラニン遺伝子により作製したトランスジェニックマウス頬粘膜下に

ポドプラニンを強く発現するマウスメラノーマ B16-F10 を移植、組織切片を作製し、リンパ管と移植細胞を二重免疫染色した。

2) リンパ管内皮細胞に CELC2-PLAG を介して接着した腫瘍細胞の癌性形質発現の解析

ヒトリンパ管内皮細胞と HSC3-PDPN を共培養し増殖・浸潤能を検討した。HSC3-PDPN をヌードマウス頬粘膜下に移植、肺転移細胞を分離培養し、癌性形質発現を分析した。

## 4. 研究成果

### 1) ポドプラニンを介した接着

HSC3-PDPN は接着と浸潤が HSC3 より有意に増大し、ポドプラニン特異抗体によって阻害された (投稿準備中)。

### 2) ポドプラニン依存性リンパ行性転移

ヌードマウス頬粘膜下に移植した HSC3-PDPN について、我々が新しく開発した抗ヒトポドプラニン抗体による肺転移阻止効果が見られた (投稿準備中)。

### 3) リンパ節転移した移植細胞の podoplanin 依存性癌性形質発現の解析

ヌードマウスの頬粘膜下に移植し、顎下リンパ節を摘出して移植細胞を分離培養した結果、増殖・浸潤能、また MMP1 と MMP3 の産生が飛躍的に増大することが明らかとなり、ポドプラニン発現細胞は基底膜分解を促進させることで転移能が高くなる可能性が考えられた。

### 4) 健常個体の頭頸部正常組織における podoplanin の発現

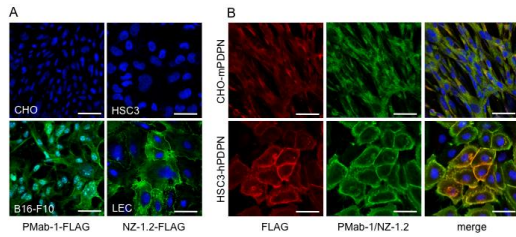
抗 podoplanin 抗体による治療を考えた時に、健常個体における podoplanin 発現組織を精査する必要がある。ヒトとマウスの組織検索の結果、唾液腺筋上皮、歯胚上皮と象牙質形成期の象牙芽細胞、神経周皮細胞および脈絡叢上皮と軟膜における podoplanin 発現

が新たに見出された。

### 5) 新規抗 podoplanin 抗体の開発

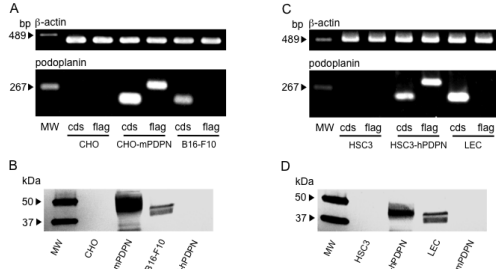
マウスとヒト podoplanin の血小板結合性 PLAG 領域を特異的に認識する新しい抗体を開発した：①ラット抗マウスポドプラニン抗体 (PMab-1)、②ラット抗ヒトポドプラニン抗体 (NZ-1.2)、PCT/JP2010/067141) (MBL, Imgenex, Sigma, Millipore で販売)。

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 と抗ヒト podoplanin 抗体 NZ-1.2 の反応



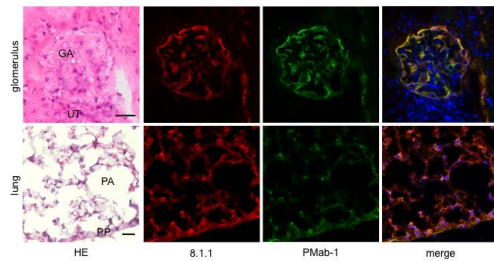
A) PMab-1 は podoplanin 陰性の CHO に反応しないが、内因性に発現する マウスメラノーマ B16-F10 とは反応した。また NZ-1.2 は podoplanin 陰性のヒト口腔がん細胞株 HSC3 に反応しないが、内因性に発現するリンパ管内皮細胞 LEC とは反応した。  
B) FLAG-podoplanin 遺伝子導入 CHO と HSC3 はすべて FLAG と podoplanin が陽性となった。Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 と抗ヒト podoplanin 抗体 NZ-1.2 の反応



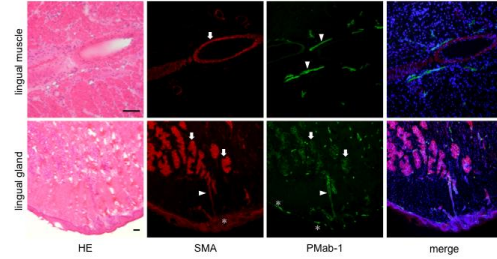
A, B) PMab-1 は podoplanin 陰性の CHO に反応しないが、FLAG-podoplanin 遺伝子導入 CHO、および内因性に発現する マウスメラノーマ B16-F10 とは反応した。  
C, D) NZ-1.2 は podoplanin 陰性のヒト口腔がん細胞株 HSC3 に反応しないが、FLAG-podoplanin 遺伝子導入 HSC3 と内因性に発現するリンパ管内皮細胞 LEC とは反応した。Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 の反応



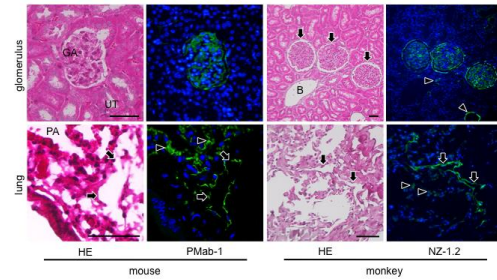
PMab-1 はマウス腎系球体と肺上皮に反応した。  
Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 の反応



PMab-1 はマウスリンパ管と唾液腺筋上皮に反応した。  
Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗ヒト podoplanin 抗体 NZ-1.2 の反応



NZ-1.2 は免疫源の PLAG 含有ペプチドのアミノ酸配列が同じであるサルにおいて、腎系球体と肺上皮・肺リンパ管に反応した。  
Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

**Products** **Wako**

**脳腫瘍細胞マーカー抗体**  
抗ヒトポドプラニン、モノクローナル抗体  
抗マウスポドプラニン、モノクローナル抗体

ポドプラニンは、Aggrus、gp44、T1α などとしても知られ、さまざまな作用が報告されている I 型膜貫通型タンパク質です。細胞外領域である N 末端側には血小板凝集性に関わる PLAG ドメインを持ちます。ポドプラニンは血管内皮細胞には発現せずリンパ管内皮細胞に発現しているためリンパ管のマーカーとして注目されている他、さまざまな腫瘍で発現が亢進され、腫瘍マーカーとしても利用が進められています。脳腫瘍においては悪性度に応じてポドプラニン発現量が上昇することが報告されています。

本品は、ポドプラニンの PLAG 領域を認識する抗体で、腫瘍やリンパ管のマーカータンパク質ポドプラニンを検出する他、血小板凝集活性抑制に使用することができます。

- 形状：PBS (-)、0.05% アジ化ナトリウム
- 抗体濃度：1mg/ml

(参考文献)  
1) Kaji, C. et al.: Acta. Histochem. Cytochem. In press.

コード No.	品名	クローン No.	免疫動物	用途	規格	容量	希釈納入価格 (円)
018-24101	Anti Human Podoplanin, Monoclonal Antibody	NZ-1.2	ラット	ELISA, WB, FC, IP, IHC	免疫化学用	100 µg	34,000
015-24111	Anti Mouse Podoplanin, Monoclonal Antibody	PMab-1	ラット	ELISA, WB, FC, IP, IHC	免疫化学用	100 µg	34,000

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者・分担者に下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Noda Y, Sawa Y. Immunohistochemical examination on the distribution of cells expressed lymphatic endothelial marker podoplanin and LYVE-1 in the mouse tongue tissue. Acta Histochem Cytochem 2010;43:61-68

2. Hata, Tsuruga E, Sawa Y. Immunoelectron microscopic study of podoplanin localization in mouse salivary gland myoepithelium. *Acta Histochem Cytochem* 2010;43:77-82.
3. Imaizumi Y, Tsuruga E, Sawa Y. Immunohistochemical examination for the distribution of podoplanin-expressing cells in developing mouse molar tooth germs. *Acta Histochem Cytochem* 2010;43:115-121.
4. Yamauchi Y, Tsuruga E, Sawa Y. Ishikawa H. Fibulin-4, and -5, but not Fibulin-2, are associated with tropoelastin deposition in elastin-producing cell culture. *Acta Histochem Cytochem* 2010; 43:131-138.
5. Nakatomi Y, Tsuruga E, Sawa Y. EMILIN-1 regulates the amount of oxytalan fiber formation in periodontal ligaments in vitro. *Connect Tissue Res* 2011;52:30-35.
6. Nakashima K, Tsuruga E, Sawa Y. Stretch stimuli increase fibulin-5 /EMILIN-1 complex on oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. *Orthodontic Waves* 2011;70:15-20.
7. Kaneko MK, Sawa Y, Kato Y. Establishment of a novel monoclonal antibody SMab-1 specific for IDH1-R132S mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406:608-613.
8. Hatakeyama Y, Oka K, Tsuruga E, T, Sawa Y. The effect of valproic acid on mesenchymal pluripotent cell proliferation and differentiation in extracellular matrices. *Drug Target Insights* 2011;5:1-9.
9. Yahiro J, Sawa Y. Immunohistochemical and Immunocytochemical Localization of Amylase in Rat Parotid Glands and von Ebner' s Glands by Ion Etching-Immunoscanning Electron Microscopy *Acta Histochem Cytochem* 2011;44:201-212.
10. Amano I, Sawa Y. Expression of podoplanin and classical cadherins in salivary gland epithelial cells of klotho- deficient mice, *Acta Histochem Cytochem* 2011;44:267-276.
11. Hatakeyama Y, Oka K, Tsuruga E, Sawa Y. Growth Differentiation Factor 5 induces matrix metalloproteinase 2 expression in periodontal ligament cells and modulates MMP-2 and MMP-13 activity in osteoblasts. *Bone and Tissue Regeneration Insights* 2011;4:1-10.
12. Kaji C, Kato Y, Sawa Y. The expression of podoplanin and classic cadherins in the mouse brain. *J Anat* 2012;220:435-446.
13. Yamanouchi K, Tsuruga E, Oka K, Sawa Y. Fibrillin-1 and fibrillin-2 are essential for formation of thick oxytalan fibers in human nonpigmented

- ciliary epithelial cells in vitro. Connect Tissue Res 2012;53:14-20.
14. Nakatomi Y, Tsuruga E, Sawa Y, Intracellular interaction of EMILIN-1 with fibrillin-1 in human periodontal ligament cells. Orthodontic Waves 2012;71:66-69.
  15. Tsuruga E, Oka K, Hatakeyama Y, Sawa Y. Latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 2 negatively regulates coalescence of oxytalan fibers induced by stretching stress. Connect Tiss Res 2012;53:521-527.
  16. Kaji C, Tsujimoto Y, Kaneko, MK, Kato Y and Sawa Y. Immunohistochemical examination of novel rat monoclonal antibodies against mouse and human podoplanin. Acta Histochem Cytochem 2012;45:227-237.
  17. Kaneko MK, Sawa Y, Kato Y. A chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis via neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cancer Sci 2012;103:1913-1919.
  18. Oka K, Tsuruga T, Hatakeyama Y, Sawa Y. Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. J Histochem Cytochem 2012;60:57-68.
  19. Oka K, Sawa Y, Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. Eur J Oral Sci 2012;120:484-494.
  20. Nishimura S, Sawa Y. Risk factors to cause tooth formation anomalies in chemotherapy of paediatric cancers. Eur J Cancer Care, 2013;22:353-360.
  21. Takata S, Sawa Y, Expression of Toll-Like Receptor 4 in Glomerular Endothelial Cells under Diabetic Conditions. Acta Histochem Cytochem 2013;46:35-42.
  22. Uchiyama, Sawa Y. Altered dynamics in the renal lymphatic circulation of type 1 and type 2 diabetic mice. Acta Histochem Cytochem 2013;46:97-104.
- (総説)
1. Sawa Y. New trends in the study of podoplanin as a cell morphological regulator. Japanese Dental Science Review 2010;46:165-172.
- [図書] (計 2 件)
1. 沢 (分担)、臨床免疫・アレルギー サイトカインのすべて、科学評論社 292-295
  2. 沢 (分担)、ネッター頭頸部・口腔顎顔面の臨床解剖アトラス、医歯薬出版社 399-492

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沢 禎彦 (SAWA YOSHIHIKO)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：70271666

### (2) 研究分担者

加藤幸成 (KATO YUKINARI)  
東北大学・医学部・教授  
研究者番号：00571811

谷口邦久 (TANIGUCHI KUNIHISA)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：90105685

敦賀英知 (TSURUGA EICHI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：30295901

鍛冶屋浩 (KAJIYA HIROSHI)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：80177378

畠山雄次 (HATAKEYAMA YUJI)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：40302161

岡暁子 (OKA KYOKO)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：60452778