

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701107

研究課題名（和文）血行性転移に関わる血小板依存的ながん増殖機構の解明と阻害剤の創製

研究課題名（英文）Molecular mechanism and inhibitor development of platelet-dependent tumor growth progression in hematogenous metastasis

研究代表者

高木 聡 (TAKAGI SATOSHI)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター基礎研究部・研究員

研究者番号：20582240

研究成果の概要（和文）：

本研究は、血小板との相互作用依存的に活性化されるがん細胞内のシグナル伝達経路を明らかにし、その経路の阻害剤を創製することで血行性転移阻害剤とすることを目的に行った。研究代表者は、血小板と肉腫細胞の直接的相互作用が、肉腫細胞の増殖と薬剤抵抗性を亢進することで腫瘍悪性化に寄与することを見出し、その鍵となるシグナル伝達経路として PI3K-Akt を特定した。さらに、肉腫細胞は血小板凝集促進因子 Aggrus 依存的に血小板凝集を誘導することが示されたことから、抗 Aggrus 中和抗体が血行性転移阻害剤として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to clarify the signal transduction pathways in cancer cells activated by interaction with platelets and to develop inhibitors against these signaling pathways. I found that direct interaction of platelets and sarcoma cells contributes to tumor malignancy by enhancing both tumor growth and tumor drug resistance, and identified PI3K-Akt pathway as a key signal transduction pathway which causes platelet-mediated tumor malignancy. Furthermore, sarcoma cell-induced platelet aggregation is dependent on platelet-aggregation inducing factor Aggrus, suggesting that anti-Aggrus neutralizing antibodies would be useful as hematogenous metastasis inhibitors against some types of cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：がん、血行性転移、血小板

1. 研究開始当初の背景

血小板はがんの血行性転移成立に大きく寄与する。がん細胞は、血中で血小板凝集を誘導し凝集塊を形成することが知られており、この凝集塊の形成はがん細胞が転移先臓器の微小血管にトラップされ易くする役目を果たしている（Brit J Exptl Pathol,

53:301-13, 1972)。また、血小板ががん細胞表面を覆うことで、血管内すり応力や宿主免疫系による細胞障害からの防御となることも知られている（Int J Cancer, 60:413-417, 1995)。さらに近年では、血小板が腫瘍血管新生や腫瘍微小環境の構築に寄与することが報告されている（Cancer Res, 69:5623-6,

2009; Blood, 115:3427-36, 2010)。臨床所見では、血小板数とがんの悪性度には正の相関性が見出されており (J Lab Clin Med, 84:615-9, 1974)、血小板数の増加は、子宮体がん、子宮頸がん、卵巣がん、胃がん、食道がんなど様々ながん腫における負の予後因子とされている (Anticancer Res, 20:3983-5, 2000; Gynecol Oncol, 103:902-5, 2006; Cancer, 69:2975-7, 1992; Am J Obstet Gynecol, 170:549-54, 1994; Ann Surg Oncol, 9:287-91, 2002; J Am Coll Surg, 198:737-41, 2004)。さらに、静脈血栓や肺塞栓を有するがん患者では、術後予後が不良であることも報告されている (N Engl J Med, 338:1169-73, 1998)。以上の知見から、血小板はがんの血行性転移成立に多大な貢献を果たしており、血小板や血小板-がん細胞間の相互作用を阻害する薬剤開発は、有用な血行性転移阻害剤となることが期待される。

これまでの解析から研究代表者は、血小板とある腫のがん細胞を共培養することで、がん細胞と血小板からなる凝集塊が形成され、さらにはがん細胞の増殖が亢進することを見出してきた。また、チャンバーを用いた共培養実験から、血小板依存性ながん細胞の増殖亢進は、がん細胞と血小板の直接的な相互作用が必要である可能性が示唆されている。そこで研究代表者は、がん細胞と血小板の直接的相互作用の起点となる分子やその下流のシグナル伝達分子を特定し、特定された分子に対する特異的阻害剤を創製することができれば、有用な血行性転移阻害剤になるのではないかと考えた。本研究課題を遂行することで、がん細胞が転移先臓器の微小血管内で生存・増殖する新規分子機構の解明が見込まれ、有用ながん分子標的治療薬の創製へと繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題は、がんの根治を目指した新規治療法開発の為に、がんの血行性転移阻害剤の開発を行うことを目的とする。すなわち、血行性転移の際にがん細胞と血小板が形成する凝集塊を *in vitro* 共培養系で再現することで、血小板との相互作用依存的に活性化されるがん細胞内のシグナル伝達経路を明らかにし、その経路に対する阻害剤を創製することで血行性転移阻害剤とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血小板依存的に活性化されるがん細胞内シグナル伝達分子の同定

①血小板と共培養したがん細胞の細胞破砕液を phospho-receptor tyrosine kinase アレイおよび phospho-kinase アレイで解析し、リン酸化量に差異が生じる酵素群を網羅的

に検出することで、血小板依存的に活性化されるがん細胞内のシグナル伝達経路を推定する。なお、血小板はマウスから単離したものをを用いるが、マウス血小板とヒトがん細胞の共培養がヒトがん細胞の増殖を亢進することは既に確認済みである。

②血小板と共培養したがん細胞の細胞破砕液を対象に、アレイ解析で同定されたシグナル伝達分子に対する個々の抗体を用いたウエスタンブロット法を行うことで、アレイ解析の整合性を検証する。

(2) 同定されたシグナル伝達経路に対する阻害剤ががん細胞の増殖に与える影響の検討

①アレイ解析の結果から絞り込まれた分子やそのシグナル伝達経路に対する既存の阻害剤を、血小板-がん細胞共培養系に処理することで、特定された分子やシグナル伝達経路が血小板依存性ながん細胞の増殖亢進に需要である可能性を検討する。

②候補分子の遺伝子導入あるいは siRNA を用いたノックダウン実験を行い、血小板依存性ながん細胞の増殖亢進に与える影響を検討する。

(3) 同定された分子の上流レセプターを標的とした中和抗体の作製

解析により同定された分子の上流に位置するレセプターに関して立体構造等の情報が存在する場合、基質結合部位に相当するペプチドを GST 融合型として大腸菌で発現・精製することで抗原とし、当研究室で確立されているモノクローナル抗体作製法に乗っ取り中和抗体を作製する。なお、上流のレセプター分子に対する中和抗体が既に報告されている場合には、その抗体を入手して以降の検討に用いる。また、上流のレセプター分子が特定困難な場合は、同定された分子を含むシグナル経路に対する既存の阻害剤などで代用する。

(4) 種々がん細胞におけるレセプター分子の発現量と転移能との相関性に関する検討
同定されたレセプター分子に対する中和抗体を用いて、様々ながん細胞間における発現量をウエスタンブロット法で比較する。また、各種がん細胞の *in vitro* 浸潤・遊走アッセイを行い、レセプター分子の発現量と相関性が見られるか否かを検討する。

(5) 作製した中和抗体の転移抑制効果に関する検討

①取得した中和抗体を血小板-がん細胞共培養系に処理し、がん細胞の増殖亢進に与える

影響を評価する。

②取得した中和抗体を実験的肺転移モデルマウスに投与し、血行性転移抑制効果を検討する。血管新生阻害剤ベパシズマブのマウス投与実験を参考に、300 マイクログラム/マウスを最高濃度として10 マイクログラム/マウスの範囲内で用いる。がん細胞と抗体を同時に尾静脈注射し、30 から60 日後に肺重量と肺への転移結節数をカウントすることで、作製した中和抗体の血行性転移抑制効果の評価する。

4. 研究成果

血小板との共培養により増殖能が亢進するがん腫を探索したところ、ある肉腫細胞において顕著な増殖能の亢進を認めたことから、この肉腫細胞株を主たる解析対象とした(図1)。

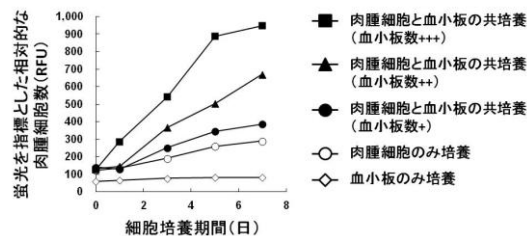


図1 血小板依存的な肉腫細胞の増殖亢進。

血小板と共培養した肉腫細胞株の細胞破碎液をリン酸化タンパク質検出アレイで解析したところ、共培養開始2時間後に複数のシグナル伝達分子がリン酸化されることを見出した。複数のシグナル伝達分子に対するリン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったところ、血小板との共培養は肉腫細胞のAktリン酸化を亢進することが示された。Aktの上流PI3Kの阻害剤であるLY294002処理が血小板依存的な肉腫細胞の増殖亢進に与える影響を検討したところ、LY294002処理は血小板依存的な肉腫細胞のAktリン酸化および増殖亢進をキャンセルした。さらに、血小板と共培養した肉腫細胞は抗腫瘍剤Adriamycinにより誘導されるアポトーシスに抵抗性を示すことが確認され、この抵抗性はLY294002処理によりキャンセルされた。

以上より、血小板と肉腫細胞の相互作用は肉腫細胞のAkt経路を活性化することで、増殖亢進や化学療法剤に対する抵抗性を付与することが示唆された。

次に、血小板により活性化される肉腫細胞のAktシグナルの上流に位置するレセプター分子を探索したが、アレイ解析から有望な分子は特定されなかった。そこで、血小板と直接相互作用することが報告されているがん細胞膜上のタンパク質の発現をウェスタン

ブロット法で検出したところ、肉腫細胞における血小板凝集促進因子Aggrusの高発現を見出した。Aggrusと血小板の相互作用を阻害する抗Aggrus中和抗体は当研究室で既に樹立されているので、この中和抗体を用いて以降の解析を行った。肉腫以外の種々がん細胞株におけるAggrus発現を検討したところ、複数のがん細胞株におけるAggrus発現が確認され、これらのがん細胞株は血小板と共培養することで増殖を亢進することが示された。なお、これらがん細胞株におけるAggrus発現量と浸潤・遊走能の間に相関性は見られなかった。そこで、抗Aggrus中和抗体が血小板依存的ながん細胞の増殖亢進に与える影響を共培養系で評価したが、中和抗体の投与は血小板依存的ながん細胞の増殖亢進に大きな影響を与えなかった。最後に、抗Aggrus中和抗体がAggrus陽性がん細胞株の血行性転移に与える影響を検討した結果、抗Aggrus中和抗体はいくつかのAggrus陽性がん細胞株の血行性転移を有意に阻害することが示された。

以上より、血小板と肉腫細胞の相互作用は、肉腫細胞の増殖能と薬剤抵抗性を亢進することで腫瘍悪性化に寄与することや、その鍵となるのはPI3K-Akt経路であるという新たな知見を得た。さらに、抗Aggrus中和抗体がある腫瘍のがんの血行性転移阻害剤として有用である可能性が示唆された。

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 2件)

① Fujita N and Takagi S, The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumor metastasis. J Biochem., 査読有り, 152, 407-413 (2012). DOI: 10.1093/jb/mvs108.

② Nakazawa Y, Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Koike S, Takami M, Arai H, Fujita N, Prevention of hematogenous metastasis by neutralizing mice and its chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. Cancer Sci., 査読有り, 102, 2051-2057 (2011). DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02058.x.

[学会発表] (計 11件)

① Takagi S and Fujita N, Targeting Aggrus/podoplanin for suppressing the growth and metastasis of lung squamous cell carcinoma *in vivo*. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. 2013/2/21-25 (Maui, USA)

② Takagi S and Fujita N, Aggrus/podoplanin-induced pulmonary metastasis is regulated by O-glycosylation. International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences. 2012/11/30-12/01 (Tokyo)

③ 高木聡、佐藤重男、藤田直也. 抗ヒト Aggrus 中和抗体による腫瘍増殖の抑制. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)

④ 大原智子、高木聡、藤田直也. 膀胱がんにおける Aggrus 発現と肺転移への関与. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)

⑤ 高見美穂、高木聡、藤田直也. 抗体を用いた Aggrus 依存的な血小板凝集に必要な機能ドメインの同定. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)

⑥ 高木聡、藤田直也. 血小板凝集促進因子 Aggrus を標的とした中和抗体の抗腫瘍効果. 第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会 2012 年 7 月 12 日-13 日 (広島)

⑦ Takagi S and Fujita N, Suppression of hematogenous metastasis by mouse and murine/human chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. AACR Annual Meeting 2012/3/31-4/4 (Chicago, USA)

⑧ Takagi S and Fujita N, Suppression of tumor metastasis by anti-Aggrus/podoplanin neutralizing antibodies. The 16th JFCR-ISCC 2012 1/25-26 (Tokyo)

⑨ Takagi S and Fujita N, Prevention of hematogenous metastasis by mouse and murine/human chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日-5 日 (名古屋)

⑩ 高木聡、藤田直也 Prevention of hematogenous metastasis by mouse and murine/human chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. 平成 23 年度 がん若手研究者ワークショップ 2011 年 8 月 31 日-9 月 3 日 (蓼科)

⑪ 高木聡、藤田直也 血小板凝集促進因子 Aggrus を標的とした抗体による血行性転移

の阻害. 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会 2011 年 6 月 30 日-7 月 1 日 (浜松)

〔図書〕(計 1 件)

① 高木聡、藤田直也 日本臨牀 70 巻 増刊号 8、分子標的薬 -がんから他疾患までの治療をめざして-、2012、159-163

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 聡 (TAKAGI SATOSHI)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター基礎研究部・研究員

研究者番号：20582240