

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830125

研究課題名(和文)血小板による腫瘍増殖亢進機構の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of platelet-dependent tumor cell proliferation

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・研究員

研究者番号：20582240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血小板との相互作用により増殖能を亢進するがん細胞内において、どのようなシグナル経路が活性化されるのかを明らかにし、その経路を標的とした阻害剤の抗腫瘍剤としての有用性を検証した。具体的には、血小板と骨肉腫細胞の相互作用が血小板を活性化し、活性化血小板から放出されるPDGF-BBが骨肉腫細胞のPDGFR-Akt経路を活性化することを見出した。さらに、PDGFR阻害剤SunitinibやPI3K阻害剤LY294002が、血小板依存的な骨肉腫細胞の増殖亢進を抑制することを見出し、これら阻害剤や抗血小板薬が抗腫瘍剤となりうる可能性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the signal transduction pathway which was activated in cancer cells by the interaction with platelets and investigated the efficacy of inhibitors which target the identified pathway. We found that osteosarcoma cells could activate platelets via the direct cell-cell interaction and the PDGF-BB released by activated-platelets activated PDGFR-Akt axis in the osteosarcoma cells. Furthermore, we found that Sunitinib, a PDGFR inhibitor, and LY294002, a PI3K inhibitor, suppressed platelet-dependent sarcoma cells proliferation. These findings suggest that these inhibitors targeting PI3K-Akt axis and/or anti-platelet agents might be the anti-tumor drugs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨肉腫 血小板 血小板凝集 PDGF Akt

1. 研究開始当初の背景

血小板はがんの血行性転移の成立に大きく寄与している。がん細胞は、血流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 (Cancer Metastasis Rev, 11: 325-51, 1992)。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、血小板内にはトランスフォーミング増殖因子 beta (TGF-beta) や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) など多様なサイトカインを内包する顆粒が存在し、血小板凝集に伴い顆粒内サイトカインが放出されることが知られている。特に血小板から放出される TGF-beta はがん細胞に上皮間葉転移 (EMT) を誘導し、がん細胞が血管外へ脱出するのを補助しているとも報告されている (Cancer Cell, 20: 576-90, 2011)。さらに、臨床所見では、血小板数の増加とがんの悪性度の間には正の相関性が見い出されており (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種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)。以上の知見から、血小板はがんの血行性転移の成立に多大な貢献を果たすことが示されている。

一方、血小板が原発腫瘍に与える影響に関して検討を行った例はほとんどない。原発腫瘍に新生する腫瘍血管は、正常血管よりも未熟で血液成分を血管外漏出し易い傾向にあることから、原発腫瘍の周囲や内部にも血小板が存在することが知られている。従って、原発腫瘍が血小板凝集能を有する場合、原発腫瘍を取りまく腫瘍微小環境には血小板内顆粒に由来する多様なサイトカインが放出されており、これが原発腫瘍に何らかの影響を及ぼしていることが示唆されていた。

そこで研究代表者は、血小板とがん細胞の共培養系を構築し、血小板とがん細胞の相互作用が腫瘍増殖に与える影響を検討したところ、骨肉腫細胞の増殖が血小板数依存的に亢進することを見出していた。

2. 研究の目的

本研究課題では、がんの根治を目指した新規治療法開発の為に、がん細胞と血小板の相互作用を標的とした新たな作用機序を有する抗腫瘍剤を開発することを目的とする。具体的には、血小板によるがん細胞の増殖亢進の鍵となる分子とその下流のシグナルを特定し、抗腫瘍剤の新たな標的としての可能性を検証する。本応募課題の遂行により、これまで見過ごされていた血小板による腫瘍微

小環境の構築といった新規分子機構が明らかにされるだけでなく、血小板とがん細胞の相互作用を標的とした新たなタイプの抗腫瘍剤の開発が見込まれる。

3. 研究の方法

(1) 血小板の顆粒成分と膜成分が骨肉腫細胞の増殖に与える影響の検討。

これまでの研究結果より、血小板依存的な骨肉腫細胞の増殖亢進メカニズムは2つあると考えられる。1つは、血小板から分泌される顆粒内サイトカインに依る場合であり、残りの1つは血小板膜上に局在する分子との結合に依る場合である。そこで、どちらのメカニズムが寄与するのか、あるいは両方が係るのかを明らかにするため、マウス血小板の顆粒内成分と膜成分を単離し、各成分との共培養時が骨肉腫細胞の増殖に与える影響を評価する。なお、マウス血小板との共培養が、ヒト骨肉腫細胞の増殖を亢進することは確認済みである。

(2) 骨肉腫細胞の増殖に重要な血小板顆粒内サイトカインの同定。

(1)の検討から、血小板の顆粒内サイトカインが骨肉腫細胞の増殖亢進に重要であった場合は、以下を検討する。血小板と共培養した骨肉腫細胞の細胞破砕液を Phospho-kinase アレイで解析し、血小板依存的な増殖亢進の鍵となるシグナル伝達経路を特定することで、上流に位置するサイトカインを明らかにする。シグナル伝達経路が特定された後、改めて血小板から分泌されるサイトカインを ELISA で定量すると共に、血小板との共培養時に活性化される個々のシグナル伝達分子のリン酸化をウエスタンブロット法で検出する。

(3) 骨肉腫細胞の増殖に重要な血小板膜上分子の同定。

(1)の検討から、血小板膜上の分子が重要であった場合には、以下を検討する。ビオチン標識した血小板膜成分とがん細胞を一定時間共培養した後、未反応の血小板膜成分を洗浄除去し細胞破砕液を調整する。細胞破砕液とアビジンビーズを反応させた後、アビジンビーズに結合したタンパク質の一部を SDS-PAGE で泳動し、アビジン-HRP や銀染色法で検出し結合タンパク質の有無や精製度を確認する。精製が確認されたら、試料の残りを質量分析法で解析することで、がん細胞の増殖亢進に寄与する血小板膜上分子を特定する。なお、ネガティブコントロールとしてがん細胞破砕液のみをビーズと反応させたサンプルを置くことで、非特異的な吸着タンパク質を排除する。多量の血小板膜成分が必要になる場合には、血小板産生細胞である巨核球を株化した MEG01S 細胞を大量培養することで対応する。

(4) 同定された分子の過剰発現あるいはノックダウン実験。

同定された分子を発現ベクターにクローニングし、予めがん細胞と共培養してもがん細胞の増殖に大きな影響を与えないことが判明している CHO 細胞などへ安定的に遺伝子導入する。その後、がん細胞と共培養することで、血小板と共培養した際と同様にがん細胞の増殖が亢進することを確認する。組換えタンパク質が入手可能な場合はそれを用いる。また、同定された分子のレセプターをノックダウンしたがん細胞では、共培養による増殖亢進がキャンセルされることを確認する。うまくいかない場合は、同定された分子に対する中和抗体や下流分子の阻害剤を用いて検討することで対処する。

(5) 同定された分子のレセプターをノックダウンした骨肉腫細胞の *in vivo* での腫瘍増殖性に関する検討。

(4) で作製したノックダウン細胞を免疫不全マウスに移植し親株と増殖を比較する。また、同定された分子に対する中和抗体や下流分子の阻害剤の影響も検討し、同定された分子の抗腫瘍剤の標的としての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) 血小板の顆粒成分と膜成分が骨肉腫細胞の増殖に与える影響の検討。

活性化血小板を含む懸濁液を遠心操作で上清と沈殿に分離することで、血小板の顆粒成分と膜成分の単離を試みた。しかし、活性化血小板の膜成分は粘性を伴う強固な沈殿を形成したため、単離は困難を極めた。一方、血小板の顆粒成分を含む上清成分の添加は骨肉腫細胞の増殖を優位に亢進することが明らかとなった(図1)。そこで、以降の検討は血小板内の顆粒成分に着目して行った。

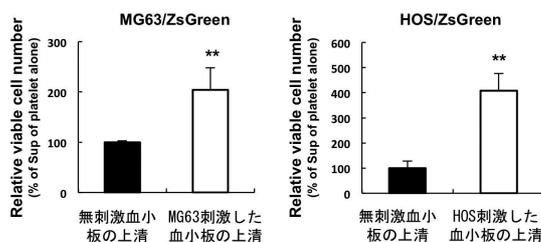


図1 血小板の顆粒成分による骨肉腫細胞の増殖亢進

(2) 骨肉腫細胞の増殖に重要な血小板顆粒内サイトカインの同定。

(1) の結果より、活性化血小板から放出される顆粒成分が骨肉腫細胞の増殖亢進に重要な役割を担うことが示唆された。そこで、血小板と骨肉腫細胞を共培養し、その細胞破砕液を Phospho-kinase アレイで解析したところ、PDGFR-alpha, -beta および Akt のリン酸化が亢進することが示された。さらに、血小板の顆粒成分の添加により骨肉腫細胞における PDGFR-beta と Akt のリン酸化が亢進

することが明らかとなった(図2)。

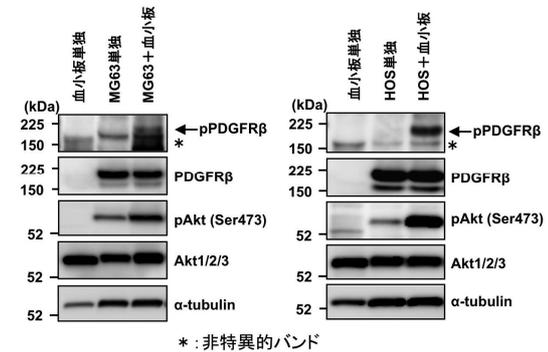


図2 血小板の顆粒成分の添加は骨肉腫細胞における PDGFR および Akt のリン酸化を亢進する

(3) 骨肉腫細胞の増殖に重要な血小板膜上分子の同定。

血小板の顆粒成分が骨肉腫細胞の増殖に重要である可能性が示唆されたため、本項目は検討せずに以下の項目へ注力した。

(4) 同定された分子の過剰発現あるいはノックダウン実験。

PDGFR-alpha および -beta どちらも結合し得るのは PDGF-BB である。そこで、血小板の顆粒成分に含まれる増殖因子を ELISA で検出したところ、確かに PDGF-BB が含まれていることが示された。さらに、PDGFR 阻害剤 Sunitinib を骨肉腫細胞に前処理することで、血小板顆粒成分の添加に誘導される PDGFR-beta および Akt のリン酸化がキャンセルされることが明らかとなった(図3)。このことから、血小板の顆粒成分に含まれる PDGF-BB が骨肉腫細胞の PDGFR-Akt 経路を活性化していることが示された。

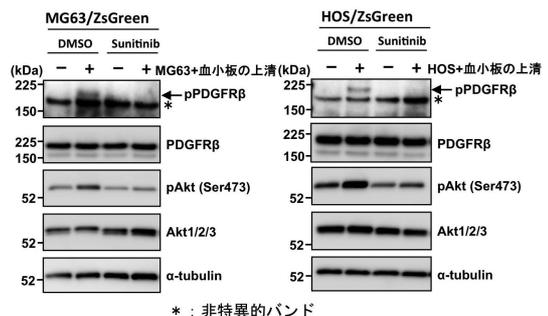


図3 血小板の顆粒成分に含まれる PDGF-BB が、骨肉腫細胞の PDGFR-Akt 経路を活性化する

(5) 同定された分子のレセプターをノックダウンした骨肉腫細胞の *in vivo* での腫瘍増殖性に関する検討。

種々骨肉腫細胞株のマウス移植を試みたが、マウスに生着可能な細胞株を同定することはできなかった。そこで、*In vitro* の系での検討を行った。骨肉腫細胞株を Sunitinib, PI3K 阻害剤 LY294002 および EGFR 阻害剤 Erlotinib 存在下で血小板と共培養し、増殖能を比較したところ、Sunitinib および

LY294002 処理により血小板依存的な骨肉腫細胞の増殖亢進が抑制されることが示された(図4)。以上より、血小板から放出される PDGF-BB が骨肉腫細胞の増殖亢進に重要であることが示された。

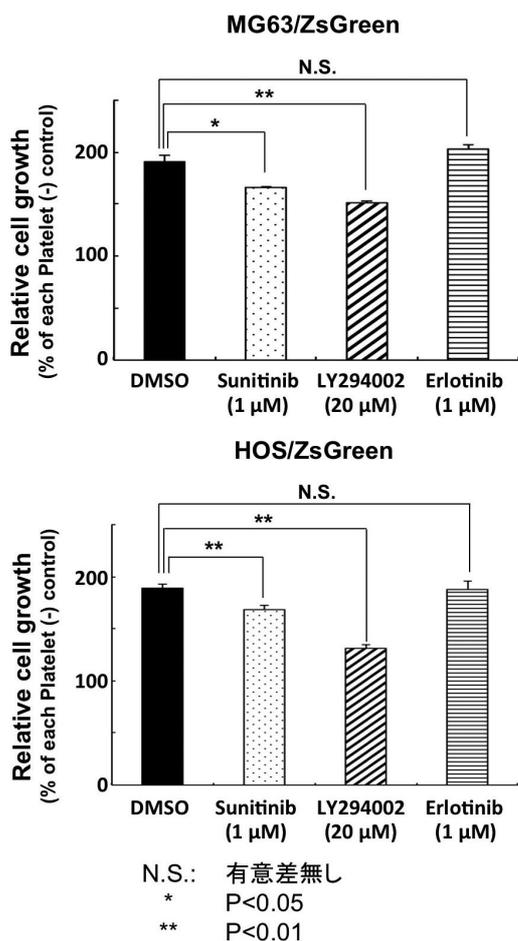


図4 血小板依存的な骨肉腫細胞の増殖亢進に、PDGFR-Akt 経路は重要な役割を果たす

しかしながら、PDGFR-Akt 経路の阻害は、血小板依存的な骨肉腫細胞の増殖を優位に抑制したものの、完全に阻害するまでには至らなかった。これは、血小板の顆粒内に含まれる PDGF-BB 以外のさらなる因子が、骨肉腫の増殖亢進に寄与し得ることを示唆している。実際に、血小板の顆粒内には、骨肉腫の増殖を亢進し得る IGF-1 が含まれているとする報告も存在する。従って、血小板依存的な骨肉腫細胞の増殖亢進を完全に阻害するためには、複数のシグナル経路の同時阻害もしくは血小板の活性化そのものを阻害することが重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Miyata K, Takagi S, Sato S, Morioka H, Shiba K, Minamisawa T, Takami M, Fujita N. Suppression of Aggrus/podoplanin-induced platelet

aggregation and pulmonary metastasis by a single-chain antibody variable region fragment. *Cancer Medicine*, 査読有り, 3(6):1595-1604, 2014. DOI: 10.1002/cam4.320.

Takagi S, Takemoto A, Takami M, Oh-Hara T, Fujita N. Platelets promote osteosarcoma cell growth through activation of the PDGFR-Akt signaling axis. *Cancer Science*, 査読有り, 105(8):983-988, 2014. DOI: 10.1111/cas.12464.

Takagi S, Oh-hara T, Sato S, Gong B, Takami M, Fujita N. Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. *International Journal of Cancer*, 査読有り, 134 (11): 2605-2614, 2014. DOI: 10.1002/ijc.28602.

Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Takami M, Koike S, Mishima Y, Hatake K, Fujita N. Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between Aggrus/podoplanin and CLEC-2. *PLoS One*, 査読有り, 8 (8): e73609, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0073609.

[学会発表](計7件)

竹本愛、高木聡、高見美穂、大原智子、藤田直也 Platelets promoter the malignancy of osteosarcoma through activation of the PDGF-Akt signaling. 第73回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜、横浜)2014年9月25日

大原智子、高木聡、竹本愛、佐藤重男、高見美穂、藤田直也 Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. 第73回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜、横浜)2014年9月27日

宮田憲一、高木聡、藤田直也 一本鎖抗体による Aggrus/podoplanin 依存的な血小板凝集及び肺転移の抑制 第23回日本がん転移学会学術集会・総会(金沢市文化ホール、金沢)2014年7月10日

Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Takami M, Koike S, Fujita N. Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between Aggrus/podoplanin and CLEC-2. AACR-Special Conference 2014 Cellular Heterogeneity in the Tumor Microenvironment (San Diego, CA, USA) 2014年2月28日

高木聡、佐藤重男、藤田直也 Suppression of tumor growth in vivo by a murine/human chimeric anti-Aggrus

neutralizing antibody. 第 72 回日本癌
学会学術総会 (パシフィコ横浜、横浜)
2013 年 10 月 3 日

藤田直也、高木聡 Development of
anti-Aggrus/podoplanin antibodies
suppressing hematogenous metastasis
and tumor growth in vivo. 第 72 回日本
癌学会学術総会 (パシフィコ横浜、横浜)
2013 年 10 月 4 日

高木聡、藤田直也 Aggrus/podoplanin を
標的とした中和抗体による抗転移効果と
抗腫瘍効果 第 22 回日本がん転移学会学
術集会・総会 (プエナビスタ、松本) 2013
年 7 月 11 日

〔その他〕

ホームページ等

<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

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

(2)研究協力者

佐藤 重男 (SATO, Shigeo)

大原 智子 (OH-HARA, Tomoko)

高見 美穂 (TAKAMI, Miho)

野田 幸恵 (NODA, Sachie)