

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10436

研究課題名(和文)血小板依存的な骨軟部肉腫の増殖・転移機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of proliferation and metastasis mechanism of platelet-dependent bone soft tissue sarcoma and development of novel therapeutic method

研究代表者

市川 二郎 (ICHIKAWA, Jiro)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：00456469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、骨肉腫ポドプラニン(Pod)と血小板CLEC-2の相互作用が増殖・転移における役割を解明し、それを治療につなげることである。骨肉腫と血小板との凝集を確認した。この凝集は、ポドプラニン抗体、ないしCLEC-2ブロッキングペプチドで抑制された。血小板と骨肉腫共培養により得られた上清は骨肉腫の遊走を誘導したが、EMTの誘導は部分的であった。血小板CLEC-2抗体を投与すると肺転移が有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the role of the interaction of osteosarcoma podoplanin and both platelet CLEC-2 interaction in proliferation / metastasis and lead it to therapy. (1)Platelet Aggregation induced by osteosarcoma was confirmed. This aggregation was suppressed with podoplanin antibody and CLEC-2 blocking peptide. (2) Supernatant obtained by coculture with platelet and osteosarcoma induced osteosarcoma migration and EMT partially. (3) Lung metastasis was significantly suppressed when platelet CLEC-2 antibody was administered.

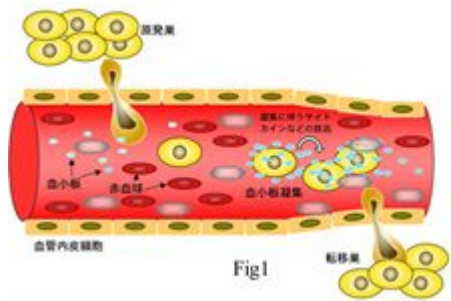
研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 CLEC-2 血小板 ポドプラニン

1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は年間新規患者数が約 3000 人程度であるが、若年者の発症が比較的多く、化学療法不応例や遠隔転移例の予後は極めて不良である。骨軟部肉腫の中でも、骨肉腫は患者数も多く、10~20 代の未来ある若者の発症がほとんどであることから、新たな治療法が望まれている。しかし、新規抗がん剤や分子標的剤の登場はなく、化学療法のレジメンも変わらない。骨軟部肉腫の予後は肺転移の有無によって決まるため、腫瘍の増殖と共に肺転移を抑制できれば、大幅な予後改善が見込まれる。

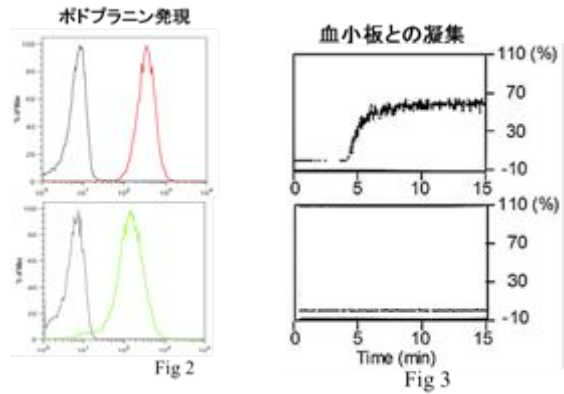
以前より他の癌腫ではその血行性転移に血小板が促進的に働くとの報告がある。その機序としては(1)血管内で腫瘍表面に凝集した血小板が活性化され、血管内のシエアストレスや免疫細胞の攻撃から腫瘍細胞を守る、(2)粘着した血小板が、腫瘍細胞に血管外浸潤の足場を提供する、(3)血管外浸潤後、転移巣にて活性化血小板から放出された増殖因子



や血管新生因子により、腫瘍の転移が促進される、と考えられている (Fig.1)。また、活性化血小板より放出された顆粒内容が、原発巣の腫瘍に Endothelial Mesenchymal Transition (EMT)を惹起し、転移を促進するという報告もある (Cancer cell. 2011;20:576-590)。この EMT は骨肉腫でも他の癌腫と同様に転移のステップに必須である (Cancer Res. 70:9483-93:2010)。

腫瘍への血小板の凝集と活性化の機序の一つに、扁平上皮癌の一部などに発現する膜蛋白、ポドプラニン(Pod)があり、以前より in vitro での血小板活性化能は報告されていた (J Biol Chem. 279:38838-43:2004)。さらに、その発現が多い腫瘍ほど、悪性度が高く、予後が悪いという臨床研究も報告されている (Acta Neuropathol. 111:483-8:2006)。このことから、Pod と血小板の結合を抑制できれば癌の増殖・転移を抑制できると考えられたが、Pod の血小板上受容体は長らく不明であった。以上のような背景から、申請者らは血小板上に新規活性化受容体 C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) を同定し (Blood 2006)、そのリガンドがポドプラニンであることを発見した (J Biol Chem 2007)。また、我々は予備実験で、ヒト骨肉腫細胞株 (TE85) とそれ由来の高肺転移株 (143B) では Pod

発現が高肺転移株で過剰であることを FACS で確認した。加えて、高肺転移株のみが血小板凝集を惹起することも明らかにしている (Fig2、3)。血小板と肉腫の相互作用の有無とその際の Pod - CLEC-2 の役割を解明し、血小板依存的な骨軟部肉腫の増殖・転移の仕組みを明らかにすることが、新規肉腫治療への第一歩となる。



2. 研究の目的

本研究では、ポドプラニンと血小板 CLEC-2 の相互作用が骨肉腫の増殖・転移における役割を解明し、それを治療につなげることを目的とする。具体的には、

- (1) 骨肉腫 Pod と血小板 CLEC-2 との凝集
- (2) 血小板活性化による骨肉腫の増殖・遊走・EMT への影響
- (3) 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性

について以下の実験を行い検討する。

- (1)では、様々な骨肉腫細胞株における Pod 発現量の検討と血小板凝集の有無を確認する。また、血小板 CLEC-2 の抑制ないし腫瘍 Pod の抑制による凝集の変化も検討する。(2)では、肉腫細胞と血小板の共培養モデルを用いて、Pod-CLEC-2 に依存した血小板活性化の有無、また活性化による肉腫細胞への増殖、浸潤能の変化、EMT 誘導の有無を検討する。(3)では、マウスモデルにおける抗 CLEC-2 抗体投与による原発と転移への治療効果、手術検体での Pod 発現を免疫組織化学染色 (IHC) により判定し患者予後との相関について検討する。

3. 研究の方法

- (1)骨肉腫 Pod と血小板 CLEC-2 との凝集

骨肉腫細胞株とそれ由来の高肺転移株を用いて (TE85 と 143B、Dunn と LM8 など) それらの Pod 発現を FACS で比較し、ヒトおよびマウスからの洗浄血小板との凝集試験を行う。

抗 CLEC-2 抗体投与を行い、CLEC-2 欠損状態のマウスと IgG 投与マウス、未投与マウスから洗浄血小板を採取し高肺転移株とそれぞれの血小板との凝集の有無を確認する。

また、高肺転移株の Pod 発現を siRNA にて

低下させた株とコントロール株を作成し、それらとヒトおよびマウスの洗浄血小板との凝集の有無を確認する。

(2) 血小板活性化による骨肉腫の増殖・遊走・EMTへの影響

肉腫細胞 Pod による血小板活性化の有無

(A)ヒト骨肉腫細胞高肺転移株とヒトおよびマウスからの洗浄血小板を 30 分共培養のうち、遠心して得られた上清を ELISA に用いる。血小板活性の際に血小板顆粒中に含有する Platelet Factor-4 (PF-4) が特異的に放出されるので、PF-4 の測定で血小板活性の有無を確認する。

(B)血小板活性化における Pod-CLEC-2 の役割 抗 CLEC-2 抗体投与、IgG 抗体投与、未投与のマウスから採血し、それぞれの血小板を分離する。骨肉腫細胞との 30 分共培養ののち得られた上清を用いて、やはり PF-4 の測定を行い血小板活性の有無を確認する。

血小板活性化による肉腫細胞の変化

(A)細胞増殖への影響；96 穴プレートに骨肉腫細胞を播き、1 日待機する。FCS なしの培地に変更し洗浄血小板を添加する。培養後 24 時間、48 時間、72 時間で WST アッセイにて細胞増殖の変化を見る。

(B)浸潤能への影響；Boyden Chamber アッセイを用いる。上層には無血清条件で 1.骨肉腫細胞のみ 2.骨肉腫細胞と血小板の共培養 3.血小板のみとし、下層には 10%FCS 入りの基本培地を置く。培養時間として 24 時間、48 時間、72 時間を設定し、膜の下側をクリスタルバイオレットで染色し、移動した細胞数を顕微鏡下に計測する。

(C)上皮間葉転換 (EMT) への影響；プレートに骨肉腫細胞を播き、1 日待機する。培地を FCS なしに変え、洗浄血小板を添加する。添加後 24 時間、48 時間、72 時間で細胞を回収する。

得られた細胞から DNA を抽出し、EMT-PCR アレイを用いて網羅的に解析し、特に発現変化が大きいものはウエスタンブロットでそのタンパク発現も確認する。

(D)上記の A)から C)の実験でも、抗 CLEC-2 抗体投与、IgG 抗体投与、未投与のマウス血小板を用いてその変化を確認する。

(3) 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した 143B を脛骨に移植するモデルを使用する。(写真右) 治療としては、CLEC-2 抗体群、IgG 抗体群、未投与群の 3 群とする。移植後 6 週間での肺転移を予備実験で確認しているため、2 週、4 週、6 週の時間経過でルシフェラーゼアッセイにより治療効果判定を行う。また、治療中は血小板機能評価のため、2, 4, 6 週で採血を行い、凝固能 (PT, APTT) 血小板数を測定する。副作用の有無に関しては毎週ごとに体重測定を行う。

当院で得られた骨肉腫患者サンプルを用いて、Pod の発現を免疫組織学的に検討する。また、その発現強度と患者予後について関連性を検討する。

4. 研究成果

(1)骨肉腫 Pod と血小板 CLEC-2 との凝集

骨肉腫細胞株とそれ由来の高肺転移株を用いて (TE85 と 143B、K12 と K7M3 など)、それらの Pod 発現を FACS で比較し、ヒトおよびマウスからの洗浄血小板との凝集試験を行う。Pod の発現は 143B、K7M3 の高肺転移株が低転移株の TE85、K12 より高かった。次いで、143B、TE85 を用いてヒト血小板との凝集の有無を確認した。予備実験と同様に TE85 では起こらなかったが、143B では凝集が認められた。また、マウス血小板と K12、K7M3 との凝集を確認したが、こちらも K7M3 のみで凝集が認められた。

以下の実験では 143B 骨肉腫細胞を用いた。ヒト洗浄血小板に CLEC-2 ブロッキングペプチドを投与した群と未投与群の凝集の有無を比較する。更に、Pod をブロッキング抗体で前処置した細胞との凝集の有無を確認した。Fig4 に示すように、未投与 (コントロール) では、凝集が起こるが、確認されたが、CLEC-2 ブロッキングペプチドを用いた群 (紫) また Pod 抗体を用いた場合は凝集が

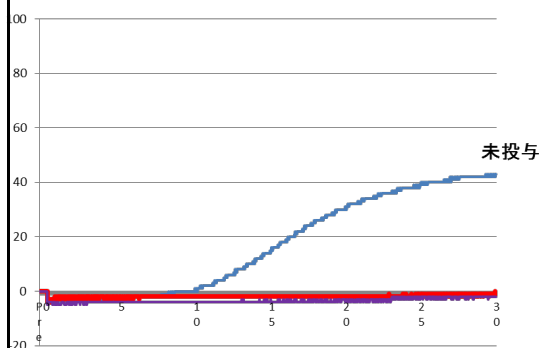


Fig4

ほぼ完全に抑制された。

(2)血小板活性化による骨肉腫の増殖・遊走・EMTへの影響

肉腫細胞 Pod による血小板活性化の有無

(A)ヒト骨肉腫細胞高肺転移株とヒトおよびマウスからの洗浄血小板を 30 分共培養ののち、遠心して得られた上清を用いて、Platelet Factor-4 (PF-4) を ELISA で測定した。その結果、血小板と骨肉腫を共培養することで有意に産生が増加した。

(B)血小板活性化における Pod-CLEC-2 の役割を明らかにするため、CLEC-2 ブロッキングペプチドの効果調べた。A)で明らかとなった PF-4 の産生増加が、ペプチドを用いると有意に抑制された (Fig5)。

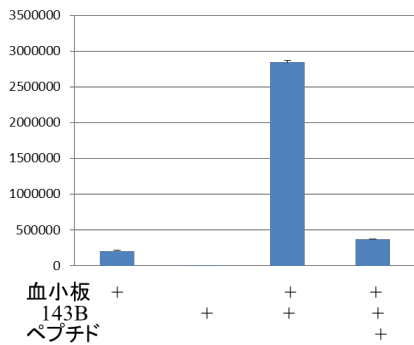


Fig5

血小板活性化による肉腫細胞の変化
洗淨血小板に骨肉腫細胞を 15 分間、添加した場合としない場合の上清を回収して、以下の実験を行った。

(A)細胞増殖への影響；96 穴プレートに骨肉腫細胞を播き、1 日待機する。FCS なしの培地に変更し上記 2 群の上清を加え、培養後 24 時間、48 時間、WST アッセイにて細胞増殖の変化を見たが、骨肉腫添加群で有意に増加していた。

(B)浸潤能への影響；Boyden Chamber アッセイを用いて、24 時間で Assay を行った。その結果、増殖と同様に骨肉腫添加群で有意に浸潤が高かった。(Fig6)

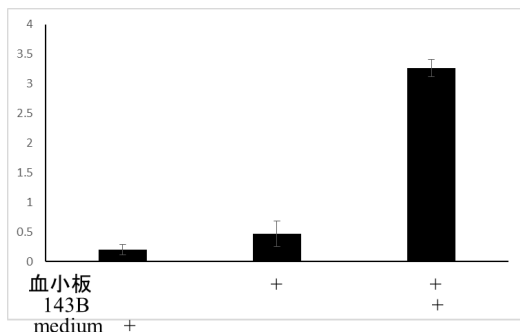


Fig6

(C)上皮間葉転換 (EMT) への影響；培地を FCS なしに変え、上述の 2 種類の上清を添加する。添加後 24 時間、48 時間で細胞を回収し、WB を行った。N-cadherin にはほぼ変化なく、E-cadherin は発現低下がみられ、Snail、Fibronectin は発現上昇が認められた。

(3) 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した 143B を脛骨に移植するモデルを使用する。治療としては、CLEC-2 抗体群、IgG 抗体群の 2 群とする。移植後 6 週間での肺転移を予備実験で確認しているため、2 週、4 週、6 週の時間経過でルシフェラーゼアッセイにより治療効果判定を行う予定であったが、肺転移が確認できなかったため、尾静脈からの転移モデルを行った。また、治療中は血小板機能評価のため、2, 4, 6 週で採血を行い、凝固能(PT,APTT)

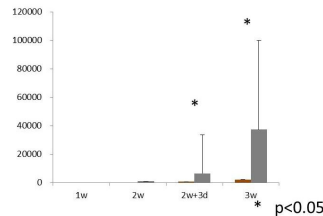
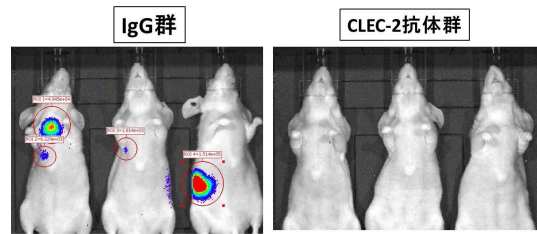


Fig7

血小板数を測定する。副作用の有無に関しては毎週ごとに体重測定を行った。Figure 7 の通り、IgG 群では尾静注し 2 週間には転移が確認できたが、CLEC-2 抗体群では転移が抑制され、ルシフェラーゼの蛍光強度 (ROI) でも同様の結果であった。また、経過中、血小板数や凝固能、体重減少などが認めなかった。

当院で得られた骨肉腫患者サンプルを用いて、Pod の発現を免疫組織学的に検討し、全例で発現を認めたものの、発現と転移などの予後の相関に関しては有意な差を認めなかった。これに関しては、今後症例数を増やすことと、同一患者での肺転移と原発での比較などを行う予定である。

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 2 件)

1. Sasaki T, (4 名), Ichikawa J, (4 名) . Recombinant expression and functional characterization of snake venom rhodocytin: inhibitory mutant rhodocytin blocks CLEC-2/podoplanin-dependent platelet aggregation and experimental lung metastasis. Journal of Thrombosis and Haemostasis. Accepted(査読有) doi: 10.1111/jth.13987.
2. Sato N, Ichikawa J, et al. Thrombin induced by the extrinsic pathway and PAR-1 regulated inflammation at the site of fracture repair. Bone. 2016 Feb;83:23-34. doi: 10.1016/j.bone.2015.10.005.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Ando T, Ichikawa J, et al. TGF- β limits thymic stromal lymphopoietin production in mouse myoblast cells upon TNF- α stimulation by suppressing NF- κ B pathway. 63th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2017
2. 安藤隆, 高山義裕, 市川二郎ら.TNF- α 刺激にてマウス筋芽細胞から産生される

TLSPはTGF-βがNF-κB経路を抑制することにより減少する.第32回日本整形外科学会基礎学術集会.2017

3. 市川二郎ら. 骨肉腫ポドプラニンによる血小板凝集と活性化. 第32回日本整形外科学会基礎学術集会.2017
4. 安藤隆, 齋藤正憲, 市川二郎ら. 骨肉腫細胞の組織因子発現におけるTGF-βを介する血小板との相互作用.第32回日本整形外科学会基礎学術集会.2017
5. 齋藤正憲, 市川二郎ら. 骨肉腫細胞におけるTGFβの凝固系、線溶系に対する作用. . 第32回日本整形外科学会基礎学術集会.2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

山梨大学医学部 整形外科

<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

市川二郎 (ICHIKAWA Jiro)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：00456469

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

井上克枝 (INOUE Katsue)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：10324211
波呂浩孝 (HARO Hirotaka)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：10313264
安藤隆 (ANDO Takashi)
山梨大学・総合研究部・講師
研究者番号：10377492

(4)研究協力者

なし