

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19549

研究課題名(和文)新規血小板活性化受容体CLEC-2を標的とした分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of molecular-targeted therapeutic agent targeting novel platelet activation receptor CLEC-2

研究代表者

佐々木 知幸(SASAKI, Tomoyuki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：40739124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血小板活性化受容体CLEC-2は、ある種の癌細胞表面に発現するポドプラニンと結合することで、癌の転移を促進する。それゆえに、抗CLEC-2薬は、抗血小板および抗転移効果が期待される。その創薬ソースとして蛇毒ロドサイチンに注目した。ロドサイチンのCLEC-2との結合部位および複合体の形成メカニズムを検証するために、哺乳類細胞株を用いて遺伝子組換え野生型および変異型ロドサイチンを作製した。その結果、抗CLEC-2効果のある変異型ロドサイチンを見出した。マウスモデルにおいて、この変異型ロドサイチンは、血小板凝集を惹起することなく、ポドプラニン依存性の癌転移を強く抑制した。

研究成果の概要(英文)：Platelet activation receptor CLEC-2 binds to podoplanin expressed on the surface of several kinds of cancer cells, which facilitates cancer metastasis. Therefore, anti-CLEC-2 drugs are expected to have anti-platelet and anti-metastatic effects. We focused on snake venom rhodocytin as its drug discovery source. In order to verify the binding site of rhodocytin with CLEC-2 and the formation mechanism of the complex, recombinant wild-type and mutant rhodocytin were produced with mammalian cell line. As a result, we found mutant rhodocytin with anti-CLEC-2 effect. In the mouse model, this mutant rhodocytin strongly inhibited podoplanin-dependent cancer metastasis without inducing platelet aggregation.

研究分野：血栓・止血学

キーワード：血小板 CLEC-2 ロドサイチン

## 1. 研究開始当初の背景

先進国では 2 人に 1 人以上が癌か心筋梗塞か脳梗塞で亡くなる。心筋梗塞や脳梗塞は血小板が血管の中で不適切に活性化されて、血管の中に血栓を作ることが原因で生じる。心筋梗塞や脳梗塞を予防する薬剤として、抗血小板薬はあるが、問題も少なくない。最近、血小板の細胞表面の受容体タンパク質である C-type lectin-like receptor 2(CLEC-2)が当講座にて同定され(Suzuki-Inoue et al. Blood 2006)、その生体内リガンドが膜タンパク質ポドプランリン(Pod)であることも見出された(Suzuki-Inoue et al. JBC 2007)。さらに CLEC-2 は、血流条件下で血小板同士の結合を強化して、血栓を安定に保つ、癌細胞の Pod と結合してその血行性転移を促進するという病態生理学的機能をもつことを報告した(Kato et al. Cancer Sci 2008)。

我々は CLEC-2 が血栓症と癌転移の予防ターゲットとして有望であると考え、CLEC-2 の生体外リガンドである蛇毒由来タンパク質ロドサイチンに注目した。天然ロドサイチンが、強力な Pod-CLEC-2 抑制作用を示すことを確認しており、血小板活性化作用のない遺伝子組換えロドサイチン変異体を作製できれば抗 CLEC-2 薬として利用できると考えた。

ロドサイチンは独立した遺伝子にコードされた  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットから構成されるヘテロ二量体を基本構造にしており、その構造の複雑さのためから、遺伝子組換え体の成功例は報告されていなかったが、我々は、活性のある遺伝子組換えロドサイチンの作製に成功していた。しかしながら、CLEC-2 との結合部位などのその機能検証は試みられていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋梗塞・脳梗塞、癌の予防や有効な治療を目指した抗血小板薬および抗転移薬として可能性のある CLEC-2

を標的とした分子標的治療薬(抗 CLEC-2 薬)の開発を目指し、CLEC-2 結合能を持つが血小板活性化能を欠く変異組換えロドサイチンの抗血小板効果および抗癌転移効果の検証を行い、実用化に向け最適化することである。

## 3. 研究の方法

CLEC-2 結合蛇毒ロドサイチンの遺伝子組換え体にアミノ酸置換や部分欠損変異を施し、CLEC-2 と結合するが血小板を活性化しない変異体を抗 CLEC-2 薬として作製する。さらに、これらの変異体の抗血小板凝集効果およびマウスモデルを用いた癌転移抑制効果を検討する。この作製のための基礎的検討として、CLEC-2 の結合部位の同定やロドサイチンの複合体形成メカニズムを明らかにすることを試みる。

## 4. 研究成果

### (1) CLEC-2 結合部位の同定

野生型ロドサイチン( $\alpha$ WT $\beta$ WT)は、ヒト洗浄血小板を凝集させるが、 $\alpha$  サブユニットの 4 番目のアスパラギン酸(D4)をアラニンに置換した変異体( $\alpha$ D4 $\beta$ WT)は、凝集能を失った(図 1 上)。CLEC-2 を発現した CHO 細胞を用いたフローサイトメトリーにより解析した結果、 $\alpha$ WT $\beta$ WT は CLEC-2 に結合するが、 $\alpha$ D4 $\beta$ WT は CLEC-2 に結合しなかった(図 1 下)。このことから、ロドサイチンにおける CLEC-2 との結合部位は  $\alpha$  サブユニットの D4 であることが示唆された。

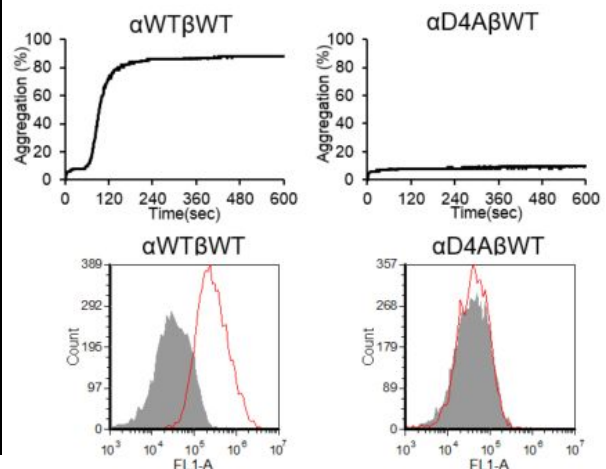


図1. CLEC-2との結合部位は $\alpha$ サブユニットのD4である。

## (2) ロドサイチンの複合体形成

ロドサイチンは $\alpha$ と $\beta$ サブユニットがジスルフィド結合しヘテロ二量体となり、さらに水素結合などによってさらに大きな複合体となると報告されていたが、そのメカニズムは不明のままであった。 $\alpha$ サブユニットの酸性アミノ酸と $\beta$ サブユニットの塩基性アミノ酸が水素結合すると仮説を立てて、これらを検証した。その結果、天然ロドサイチンおよび野生型ロドサイチンはヘテロ八量体(およそ 120kDa、すなわち  $\alpha\beta$  のヘテロ二量体 30kDa  $\times$  4)、 $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A はヘテロ四量体であることが、Blue-Native PAGE より明らかとなった(図 2)。また、 $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A は CLEC-2 に結合するが、血小板凝集能を失っていた(図 3)。つまり、 $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A は機能抑制型ロドサイチン変異体であった。

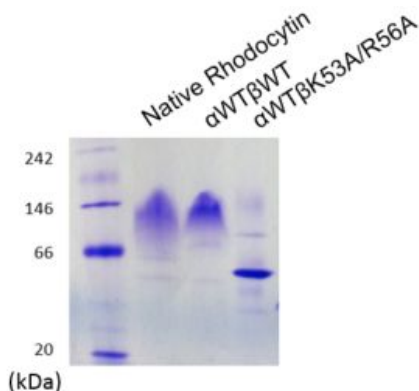


図2. ロドサイチンはヘテロ八量体である。

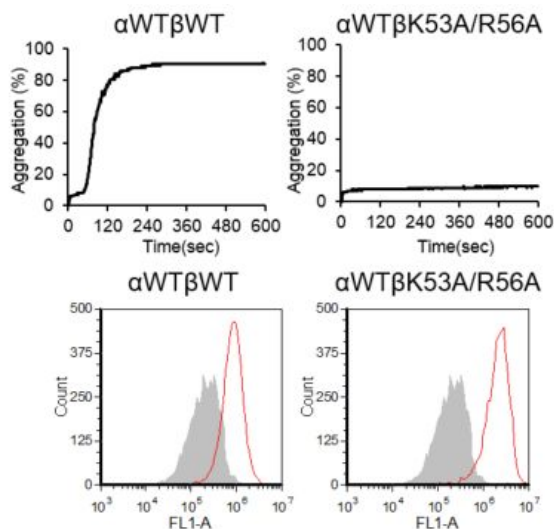


図3. ロドサイチン変異体は血小板凝集能を失う。

## (3) 機能抑制型ロドサイチン変異体によるロドサイチン惹起血小板凝集の抑制効果

機能抑制型ロドサイチン変異体  $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A を、ヒト洗浄血小板とともにインキュベートした後に、0.6  $\mu$ g/mL ロドサイチンで血小板を刺激し、凝集率を経時的にモニタリングした(図 4)。その結果、血小板凝集を完全に抑制するための濃度は、192 ng/mL であった。この濃度はアゴニストの 1/3 であり、 $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A が極めて強い血小板凝集抑制能を持つことを示唆した。

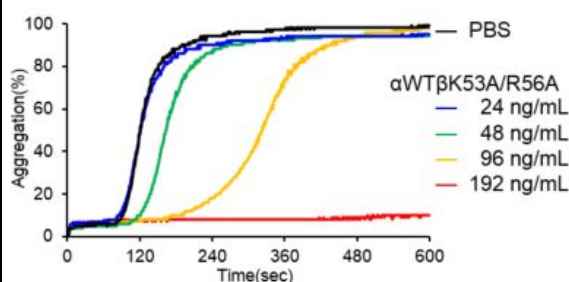


図4. ロドサイチン変異体は血小板凝集を抑制する。

## (4) 機能抑制型ロドサイチン変異体によるポドプラニン依存性の癌転移の抑制効果

機能抑制型ロドサイチン変異体  $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A が、CLEC-2 とポドプラニンの結合をブロックするならば、ポドプラニンを発現した癌細胞の遠隔転移を抑制するはずである。このことを検証するために、ポドプラニンを発現した癌細胞をマウスに尾静注することで二週間後に肺へ癌転移するモデルを構築した。その結果、PBS の投与では、肺の表面が凸凹しているが、 $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A の投与(24 $\mu$ g/マウス)では、肺の表面が滑らかであった(図 5 左)。さらに、癌細胞によって形成される結節の数は、 $\alpha$ WT $\beta$ K53A/R56A の投与によって、有意に減少した(図 5 右)。つまり、機能抑制型ロドサイチン変異体はポドプラニン依存性の癌転移を抑制することを示唆した。

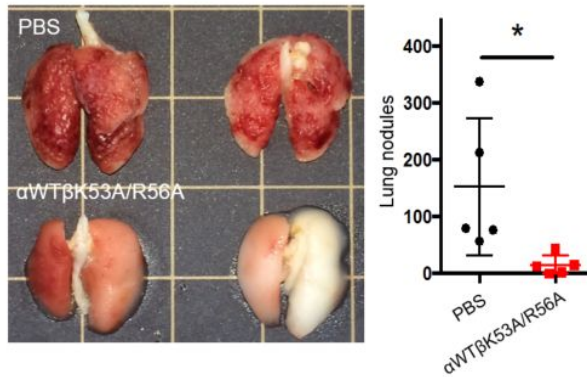


図5. ロドサイチン変異体は肺癌転移を抑制する。

#### (5) まとめ

機能抑制型ロドサイチン変異体  $\alpha$ WT K53A/R56A は、ロドサイチン惹起血小板凝集を低濃度で抑制し、さらに、ポドプランリン発現癌細胞の遠隔転移を抑制することを見出し、ロドサイチンが、抗 CLEC-2 薬の有望な創薬ソースであることを示した。現在、この免疫原性を下げするために CLEC-2 との結合部位に注目し低分子化を試みている。

#### 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)

Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost.* 2017 Mar;15(3):513-525.

doi: 10.1111/jth.13604. 査読有

Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Ozaki Y. Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. *Blood.* 2016 Mar 31;127(13):1701-10.

doi: 10.1182/blood-2015-08-663708. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

Sasaki T, Shirai T, Tsukiji N, Otake S, Tamura S, Osada M, Satoh K, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K; An inhibitory mutant of snake venom rhodocytin blocks CLEC-2/Podoplanin interaction dependent platelet aggregation and experimental lung metastasis. ISTH 2017 Congress, 2017 July 10, Berlin (Germany).

佐々木知幸, 白井俊光, 築地長治, 小山賢介, 田村彰吾, 大竹志門, 長田誠, 佐藤金夫, 波呂浩孝, 尾崎由基男, 井上克枝; 関節リウマチにおける血小板 CLEC-2 の役割. 第39回日本血栓止血学会学術集会, 2017年6月9日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).

佐々木知幸, 白井俊光, 築地長治, 田村彰吾, 長田誠, 佐藤金夫, 尾崎由基男, 井上克枝; 変異型ロドサイチンによるポドプランリン依存性の癌細胞血行性転移の抑制. 第89回日本生化学会大会, 2016年9月26日, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市).

佐々木知幸, 白井俊光, 築地長治, 田村彰吾, 長田誠, 佐藤金夫, 尾崎由基男, 井上克枝; 遺伝子組換えロドサイチンを用いた CLEC-2 依存性血小板凝集の制御解析. 第38回日本血栓止血学会学術集会, 2016年6月17日, 奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市).

佐々木知幸, 田村彰吾, 白井俊光, 築地長治, 佐藤金夫, 井上克枝, 尾崎由基男; CLEC-2 依存性血小板凝集を惹起する蛇毒ロドサイチンの遺伝子組換え体の作製と機能解析. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015年12月1日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市).

Sasaki T, Tamura S, Shirai T, Tsukiji N, Satoh K, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y;

Construction of expression system for  
biologically functional recombinant  
rhodocytin. ISTH 2015 Congress, 2017  
June 22, Toronto (Canada).

佐々木知幸, 田村 彰吾, 白井 俊光, 築  
地 長治, 佐藤 金夫, 井上 克枝, 尾崎由基  
男; 血小板活性化受容体 CLEC-2 結合蛇毒口  
ドサイチンの機能を保持したリコンビナン  
ト体発現系の構築. 第 37 回日本血栓止血学  
会学術集会, 2015 年 5 月 22 日, 甲府市総合  
市民会館 (山梨県・甲府市).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称: CLEC-2 拮抗剤, 血小板凝集抑制  
剤, 抗血栓薬, 及び抗転移薬, 並びにポルフ  
イリン骨格を有する化合物, 及びその製造方  
法

発明者: 井上克枝, 佐々木知幸, 白井俊光,  
長田誠, 新森英之

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/000059

出願年月日: 2017 年 1 月 4 日

国内外の別: 海外

名称: 機能抑制型の遺伝子組換え口ドサ  
イチン変異体

発明者: 佐々木知幸, 白井俊光, 井上克枝

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-94203

出願年月日: 2016 年 5 月 9 日

国内外の別: 国内

名称: 蛇毒口ドサイチンの機能を保持し  
た遺伝子組換え体の作製方法

発明者: 佐々木知幸, 井上克枝, 尾崎由基男

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-053625

出願年月日: 2015 年 3 月 17 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/cl  
in0lab/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/cl<br/>in0lab/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 知幸 (SASAKI, Tomoyuki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 40739124

### (2) 研究協力者

白井 俊光 (SHIRAI, Toshiaki)

築地 長治 (TSUKIJI, Nagaharu)

新森 英之 (SHINMORI, Hedeyuki)

井上 克枝 (INOUE, Katsue)

尾崎 由基男 (OZAKI, Yukio)