

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22572

研究課題名（和文）がん免疫微小環境の新規制御因子である腫瘍内血小板の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of intratumoral platelets: a novel regulator of tumor immune microenvironment

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍内血小板が抗腫瘍免疫応答に与える影響を明らかにし、免疫チェックポイント阻害剤の治療応答性の改善に繋がる分子や経路を提示することを目的とした。その結果、がん細胞における血小板活性分子PDPNの発現亢進により、腫瘍内部の免疫細胞の存在比が変化することや、免疫細胞の遊走に寄与するケモカインの発現変動が生じることが明らかになった。本研究結果から、ある種のケモカイン分子の機能制御により抗腫瘍免疫の活性化を誘導することができる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板は、核こそないもののRNAを豊富に内包し、エクソソーム様小胞の放出と吸収を行うなど、止血応答のみならず生理的に多様な役割を持つ機能性膜分子である一方で、その小ささ故に解析が困難であることなどの理由から、腫瘍微小環境における役割は不明なままであった。本研究の遂行により、腫瘍内部の血小板が腫瘍微小環境を制御するその機序の一端を解明することができ、将来的には、免疫チェックポイント阻害剤の治療応答性の改善にも繋がり得る成果を提示することができた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the role of platelets in tumor microenvironment and to identify the key molecules and pathways for the anti-tumor immune that can improve the therapeutic response to immune checkpoint inhibitors. As a result, we found that expression of the platelet-activating molecule PDPN in cancer cells alters the ratio of immune cells in the tumor microenvironment and causes changes in the expression of chemokines that contribute to immune cell invasion. These results suggest that regulation of the chemokines might improve the anti-tumor immune response.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍微小環境 血小板 PDPN

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤は、進行がん患者に対しても劇的な抗腫瘍効果をもたらす一方で効果が期待される患者は限定的であり、その治療応答性や抵抗性を規定する因子の解明が喫緊の課題となっている。研究代表者らは、これまで、ある種のがんでは腫瘍内部に血小板が入り込んで活性化していることを実験的マウスモデルと臨床検体を用いて確認し、腫瘍内血小板から放出される増殖因子などが腫瘍増殖に直接的に寄与することを報告してきた (Takagi S et al. Clin Cancer Res. 2018;24(10):2430-2439, Takagi S et al. Cancer Sci. 2014; 105(8):983-988)。また、がん細胞に発現する血小板凝集促進因子 Aggrus/podoplanin (PDPN) が、血小板活性化を介した TGF- 放出を誘導し、がん細胞の上皮間葉転換を促進することを報告している (Takemoto A, Takagi S et al. Sci Rep. 2017;7:42186)。近年、腫瘍間質における TGF- が、免疫チェックポイント阻害剤治療の鍵となる T 細胞の不活性化をもたらすことが複数誌に報告されたが、TGF- の由来は不明なままであった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、腫瘍内血小板が抗腫瘍免疫応答に与える影響を明らかにし、免疫チェックポイント阻害剤の治療応答性の改善に繋がる分子や経路を提示することを目的とした。本研究の遂行により、これまで見過ごされてきた腫瘍内部の血小板によるがん免疫微小環境の制御機構が解明され、その制御原理に基づく新規がん治療法の開発が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、免疫チェックポイント阻害剤治療に感受性もしくは抵抗性を示す細胞株を同系統マウスに移植したモデルを用いて、腫瘍内血小板が免疫チェックポイント阻害剤の治療効果に与える影響や、血小板から放出される因子とそれによる免疫細胞への影響などを検証する。具体的には、以下を検証する。

- (1) 血小板活性化能が亢進した細胞株の樹立
- (2) 腫瘍内部における血小板活性化が腫瘍免疫微小環境に与える影響の検討
- (3) PDPN 発現が免疫チェックポイント阻害剤による治療効果に与える影響の検証

### 4. 研究成果

#### (1) 血小板活性化能が亢進した細胞株の樹立

PDPN は、血小板表面の CLEC-2 受容体と結合することで血小板活性化を誘導する I 型膜貫通タンパク質であり、がん細胞における PDPN の過剰発現は腫瘍内部への血小板の集積をもたらすことを研究代表者らは報告している (Takagi S et al. PLoS One. 2013;8:e73609)。そこで、腫瘍内部における血小板の集積が亢進した同系マウスモデルを作製する目的で、マウス大腸がん MC38 細胞にマウス PDPN を過剰発現させた細胞株 (MC38/PDPN) を樹立した。樹立した MC38/PDPN 細胞において PDPN が機能的であることを確認するために、マウス CLEC-2 のリコンビナントタンパク質 (rCLEC-2) を細胞に添加して細胞表面への結合度をフローサイトメトリー法で解析したところ、コントロール細胞 (MC38/CTRL) においては rCLEC-2 の結合が検出されないのに対し、MC38/PDPN 細胞に対してはその細胞表面に rCLEC-2 が結合することが示された (図 1)。次に、C57BL/6 マウスから単離した洗浄血小板を用いて、MC38/PDPN 細胞の血小板活性化能を血小板凝集計で計測した。その結果、MC38/PDPN 細胞は MC38/CTRL 細胞と比べて高い血小板活性化能を示した (図 2)。これらのことから、MC38/PDPN 細胞における PDPN 分子が機能的であり、MC38/PDPN 細胞は CLEC-2 との結合能や血小板活性化能を保持していることが確認された。

そこで、樹立した細胞株の *in vitro* における増殖能を比較したところ、MC38/PDPN 細胞の増殖能は MC38/CTRL 細胞のそれと同等であることが示された。次に、樹立した細胞を C57BL/6 マウスの背部皮下に移植し、腫瘍形成能の差異を比較したところ、MC38/PDPN 細胞は MC38/CTRL 細胞と比べて高い腫瘍形成能を持つことが示された (図 3)。形成された腫瘍をマウスから単離し、抗血小板抗体で免疫組織化学染色したところ、MC38/PDPN 細胞の腫瘍内部において、活性化された血小板の集合体である血小板凝集塊の形成が亢進していることが確認された。これらのこと

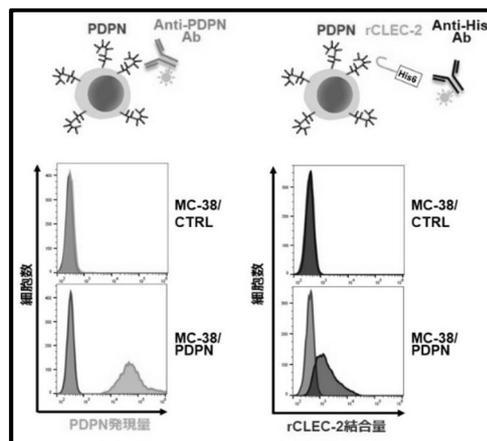


図 1 PDPN 過剰発現細胞の樹立. MC38/PDPN 細胞において、PDPN が細胞膜表面に発現していることや、リコンビナント CLEC-2 タンパク質が細胞表面に結合することをフローサイトメトリー法で解析した。

から、MC38 細胞における PDPN の過剰発現は、MC38 細胞の腫瘍増殖を亢進することや、その腫瘍内部では血小板が活性化状態にあることが示唆された。

血小板は活性化されると、自身の内部に存在する顆粒や濃染顆粒に蓄えられた様々な生理活性物質を放出することが知られており、それらには PDGF、EGF、VEGF、TGF- $\beta$  などの複数の増殖因子が含まれている。そこで次に、PDPN を介して活性化された血小板から放出される増殖因子が、MC38 細胞の増殖亢進に寄与する可能性を *in vitro* で検証した。C57BL/6 マウスから単離した洗浄血小板を活性化し、遠心分離後に得られる上清を血小板由来の生理活性物質として細胞に添加したところ、MC38/CTRL と MC38/PDPN 細胞どちらにおいても、添加の有無で細胞増殖の変化は見られなかった。そこで、C57BL/6 マウスから単離した洗浄血小板を MC38 細胞と同時にマウス背部皮下に移植し、腫瘍増殖に与える影響を検討したところ、血小板との共移植は MC38 細胞の腫瘍増殖を亢進することが確認された。これらのことから、血小板は MC38 細胞の増殖を直接的に亢進するのではなく、腫瘍微小環境に影響を及ぼすことで間接的に腫瘍増殖の亢進に寄与する可能性が示唆された。

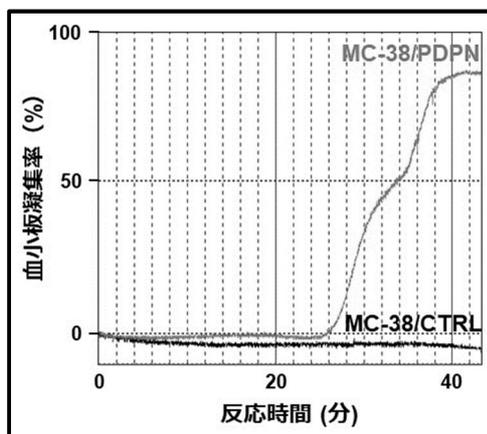


図2 PDPN 過剰発現細胞における血小板活性化能. マウス洗浄血小板と MC38/CTRL および MC38/PDPN 細胞を混和し、血小板凝集塊の形成度を経時的に観察した。

### (2) 腫瘍内部における血小板活性化が腫瘍免疫微小環境に与える影響の検討

血小板が MC38 細胞の腫瘍増殖を間接的に亢進する可能性を受けて、次に、MC38/CTRL および MC38/PDPN 細胞により形成される腫瘍微小環境に、どのような細胞集団がどの程度存在しているのかを明らかにするために、フローサイトメトリー法および免疫組織化学染色法を用いた解析を実施した。なお、MC38/CTRL と MC38/PDPN 細胞で腫瘍増殖能に差がみられるため、解析は腫瘍サイズを揃えた上でを行った。その結果、MC38/PDPN 腫瘍において、ある種の免疫抑制性細胞の腫瘍内浸潤が有意に亢進していることが示唆された。このことから、MC38/PDPN 腫瘍では免疫チェックポイント阻害剤の治療応答性が変化している可能性が示唆された。

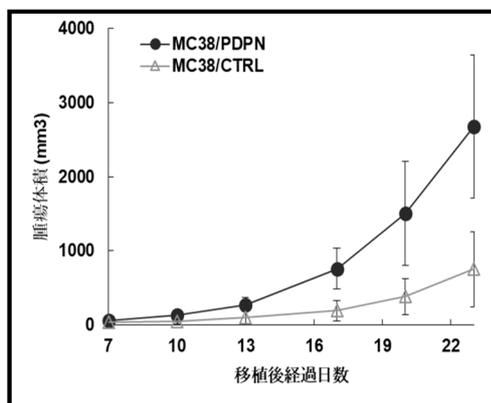


図3 PDPN の過剰発現が腫瘍増殖に与える影響. マウス背部皮下に MC38/CTRL および MC38/PDPN 細胞を移植し、腫瘍体積の変化を経時的に観察した。

### (3) PDPN 発現が免疫チェックポイント阻害剤による治療効果に与える影響の検証

最後に、腫瘍における PDPN 発現が免疫チェックポイント阻害剤による治療効果に与える影響を検討するため、MC38CTRL および MC38/PDPN 細胞を移植したマウスにある種の免疫チェックポイント阻害剤を投与することで、その治療効果の差異を比較検討した。その結果、PDPN 発現の有無は、必ずしも免疫チェックポイント阻害剤の治療抵抗性に寄与するわけではないことが示唆され、がん種の差異により治療応答性が異なることも明らかとなった。そこで次に、PDPN 発現に伴い発現変動するケモカインをケモカインアレイで解析したところ、PDPN 陽性腫瘍内部において、ある種の免疫抑制性細胞の遊走に寄与するケモカインが発現変動していることを見出した。引き続き、同定されたケモカインやケモカイン受容体の機能を阻害する中和抗体や阻害剤を用いた治療効果を検証することで、抗腫瘍免疫応答の活性化を誘導できる可能性の検証を行う。

がん免疫微小環境に関するこれまでの研究の多くは、細胞 - 細胞間の相互作用に着目したものがほとんどであったが、本研究では、細胞よりはるかに小さく無核な血液成分である血小板とがん細胞、さらには免疫細胞の相互作用に着目して実施した。血小板は、核こそないものの RNA を豊富に内包し、エクソソーム様小胞の放出と吸収を行うなど、止血応答のみならず生理的に多様な役割を持つ機能性膜分子である一方で、その小ささ故に解析が困難であることなどの理由から、腫瘍微小環境における役割は不明なままであった。本研究を遂行することで、腫瘍内部の血小板が腫瘍微小環境を制御することで腫瘍増殖に寄与するその機序の一端を明らかにすることができた。本研究成果を足掛かりにさらなる研究を継続することで、将来的には、免疫チェックポイント阻害剤の治療応答性の改善へと繋がる成果の創出に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizuta Hayato, Okada Koutaroh, Araki Mitsugu, Adachi Jun, Takemoto Ai, Kutkowska Justyna, Maruyama Kohei, Yanagitani Noriko, Oh-hara Tomoko, Watanabe Kana, Tamai Keiichi, Friboulet Luc, Katayama Kazuhiro, Ma Biao, Sasakura Yoko, Sagae Yukari, Kukimoto-Niino Mutsuko, Shirouzu Mikako, Takagi Satoshi, Simizu Siro, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Gilteritinib overcomes lorlatinib resistance in ALK-rearranged cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21396-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ukaji Takao, Takemoto Ai, Shibata Harumi, Kakino Mamoru, Takagi Satoshi, Katayama Ryohei, Fujita Naoya	4. 巻 112
2. 論文標題 Novel knock in mouse model for the evaluation of the therapeutic efficacy and toxicity of human podoplanin?targeting agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2299 ~ 2313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizawa Takahiro, Uchibori Ken, Araki Mitsugu, Matsumoto Shigeyuki, Ma Biao, Kanada Ryo, Seto Yosuke, Oh-hara Tomoko, Koike Sumie, Ariyasu Ryo, Kitazono Satoru, Ninomiya Hironori, Takeuchi Kengo, Yanagitani Noriko, Takagi Satoshi, Kishi Kazuma, Fujita Naoya, Okuno Yasushi, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 5
2. 論文標題 Microsecond-timescale MD simulation of EGFR minor mutation predicts the structural flexibility of EGFR kinase core that reflects EGFR inhibitor sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-021-00170-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高木聡、小池清恵、藤田直也、片山量平
2. 発表標題 Podoplanin enhances tumor progression by modulating the tumor immune microenvironment
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Platelet-osteosarcoma cell interactions promote tumor cell invasion via lysophosphatidic acid secretion from platelets
2. 発表標題	小池清恵、高木聡、藤田直也、片山量平
3. 学会等名	第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	高木聡、小池清恵、藤田直也、片山量平
2. 発表標題	骨肉腫細胞が誘導する血小板活性化はリゾホスファチジン酸分泌を介して浸潤能亢進に寄与する
3. 学会等名	第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	高木聡、片山量平、竹本愛、藤田直也
2. 発表標題	血小板活性化因子Podoplaninを介した腫瘍細胞社会ダイバーシティの理解と制御
3. 学会等名	第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Takemoto A, Gyobu N, Kakino M, Fujihara S, Goda N, Maeda J, Takami M, Ukaji T, Takagi S, Katayama R, Tsuji-Takayama K, Ichihara K, Nakayama S, Ohsugi Y, Fujita N.
2. 発表標題	Development of a humanized anti-podoplanin antibody inhibiting tumor-dependent platelet activation.
3. 学会等名	The 24th JFCR-ISCC Symposium (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 古賀美菜穂, 小池清恵, 藤田直也, 竹本愛, 片山量平, 高木聡,
2. 発表標題 血小板活性化因子Podoplaninが作り出すがん免疫逃避環境の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木聡, 小池清恵, 藤田直也, 片山量平
2. 発表標題 ポドプランンを介した腫瘍免疫微小環境の制御
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木聡, 小池清恵, 藤田直也, 片山量平
2. 発表標題 血小板活性化因子PDPNを介した腫瘍免疫微小環境の制御
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------