

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17374

研究課題名(和文) 癌関連血栓症の病態形成における血小板活性化受容体CLEC-2の寄与

研究課題名(英文) Contribution of platelet-activating receptor CLEC-2 in the pathogenesis of cancer-associated thrombosis.

研究代表者

白井 俊光 (Shirai, Toshiaki)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：50710381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：3種類の癌細胞株(LLC, Pan02, MC-38)をマウスに移植した。全ての腫瘍においてポドプラニン陽性癌関連線維芽細胞(CAFs)が豊富に存在することを発見した。LLC腫瘍から単離培養したCAFから細胞外小胞(EVs)を精製し、EVsにポドプラニンが存在すること、CAF-EVsがCLEC-2依存的に血小板を活性化することを明らかにした。

LLC担癌マウスでは血中ポドプラニン濃度が上昇していた。塩化鉄傷害による血栓症モデルにおいて、CAF-EVsおよびLLC腫瘍は血管閉塞時間を短縮した。抗体を用いたCLEC-2欠損マウスは、CAF-EVsおよび腫瘍による血栓形成増悪効果を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CLEC-2は血小板・巨核球にほぼ特異的に発現している。そのリガンドのポドプラニンは正常状態では血管内に存在しない。したがって、CLEC-2の止血機能への寄与は非常に小さく、実際にCLEC-2欠損マウスは出血傾向を示さない。しかし腫瘍が形成されると、癌細胞やCAFからポドプラニンが発現し、細胞間相互作用あるいはEVsによってCLEC-2依存的な血小板活性化を惹起する。すなわち、ポドプラニン/CLEC-2はCAT特異的な血栓形成機序である。すなわち、抗CLEC-2療法は、従来の抗血小板薬よりも安全に使用できる抗CAT戦略と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Three cancer cell lines (LLC, Pan02, MC-38) were transplanted into mice. Immunohistological analysis revealed abundant podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts (CAFs) in tumors. Extracellular vesicles (EVs) isolated from cultured CAFs from LLC tumors revealed the presence of podoplanin in the EVs and that CAF-EVs activate platelets in a CLEC-2-dependent manner.

Plasma podoplanin levels were elevated in LLC-bearing mice. In a model of femoral vein thrombosis induced by ferric chloride injury, CAF-EVs administration and LLC tumorigenesis shortened the vascular occlusion time. Antibody-induced CLEC-2 depletion inhibited the exacerbating effects of CAF-EVs and tumor in venous thrombosis.

研究分野：血栓止血学

キーワード：血小板 CLEC-2 癌関連血栓症

### 1. 研究開始当初の背景

癌関連血栓症 (CAT) はがん患者における 2 番目の死因である。近年、がん治療の進歩に反して CAT 発症率は増加傾向にある。一般的に CAT は静脈血栓症である場合が多いため、CAT の治療・再発予防には抗凝固療法が用いられている。

血小板は腫瘍増殖、血管新生、血行性転移など癌進展の様々なプロセスに寄与するため、抗血小板療法が癌の進展および CAT の予防に効果的であると考えられているが、従来薬は止血機能に重要な分子を標的としているため、出血リスクの増加を免れない。したがって、現在抗血小板療法は CAT の治療には推奨されていない。

ポドプラニンはある種の癌細胞に過剰発現する膜タンパクで、遊走能の向上などにより癌の進展に寄与する事が知られている。また、ポドプラニンは血小板活性化受容体 CLEC-2 を介して血小板を活性化する事が明らかとなっており、癌細胞におけるポドプラニン発現が静脈血栓症 (VTE) に寄与すると考えられている。しかしながら、ポドプラニンを発現する癌種は多くなく、また CAT 発症率も高くない。

腫瘍微小環境では、癌細胞のみならず癌関連線維芽細胞 (CAFs) もポドプラニンを発現する。CAFs は最も豊富な癌間質細胞であり、細胞間相互作用あるいは細胞外小胞 (EVs) により癌細胞に作用し、癌進展に寄与する。CAFs のポドプラニン発現は CAT の発症リスクの高い肺癌や膵癌を含む、様々な癌種で報告されている。しかし、CAFs の CAT への寄与はこれまで全く報告がない。我々は、CAFs がポドプラニンを発現することで CLEC-2 を介した血小板活性化を惹起し、CAT を増悪する可能性を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、CAFs が CAT に寄与するかを明らかにする事を目的として、特にポドプラニン / CLEC-2 相互作用に注目して調査を行った。

### 3. 研究の方法

3 種類のポドプラニン陰性癌細胞株 (LLC, Pan02, MC-38) をマウスに移植し、腫瘍微小環境においてポドプラニン発現細胞が存在するか、またポドプラニン発現細胞が CAFs であるか免疫組織化学的解析を行った。LLC 腫瘍から単離培養した CAFs から細胞外小胞 (CAF-EVs) を精製し、血小板活性化能をフローサイトメトリー法で解析した。LLC 担癌マウスの血中ポドプラニン濃度を ELISA 法で測定した。塩化鉄傷害による大腿静脈血栓症モデルにおいて、CAF-EVs 投与および LLC 腫瘍の血栓形成増悪効果について検証した。その後、抗 CLEC-2 抗体を用いた CLEC-2 欠損マウスモデルを作成し、CAF-EVs および LLC 腫瘍による血栓形成の増悪効果を抑制できるか調査した。

### 4. 研究成果

腫瘍細胞自体にはポドプラニンが陰性であるにもかかわらず、3 種類全ての腫瘍組織においてポドプラニン発現細胞が特に辺縁部に豊富に存在する事を発見した。(図 1) LLC 腫瘍では、ポドプラニン発現細胞は CD90, CD34, PDGFR, HSP47, Vimentin 陽性の CAFs であった。また、Pan02 および MC-38 腫瘍では血小板とポドプラニンの共同存在が観察されたことから、CAFs は直接的に血小板と接触している事が明らかになった。

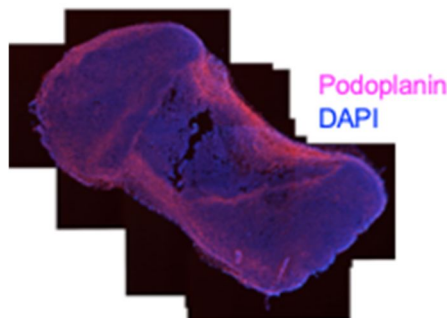


図 1. LLC 腫瘍におけるポドプラニン発現

腫瘍増殖が良好な LLC を選択し、引き続き実験を行った。LLC 腫瘍から CD90 陽性 CAFs を単離培養し、超遠心法を用いて培養上清から細胞外小胞 (EVs) をそれぞれマイクロベジクル (MV) およびエクソソーム (Exo) 分画に分けて精製した。ウエスタンブロット法により、MV、Exo 両分画にポドプラニンが存在する事を発見した。(図 2) 次に、MV と Exo を混合した CAF-EVs を用いて血小板活性化能を評価した。マウス多血小板血漿を CAF-EVs で刺激した後、血小板活性化マーカーの P-selectin およびインテグリン IIb 3 活性化フォームをフローサイトメトリー法で解析した。野生型マウス血小板 (*Clec1b<sup>fl/fl</sup>*, *WT*) では、CAF-EVs による P-selectin の発現およびインテグリン活性化が惹起された。CAF-EVs による血小板活性化は血小板/巨核球特異的 CLEC-2 欠損マウス (*Clec1b<sup>fl/fl</sup>*, *Pf4-Cre*) で

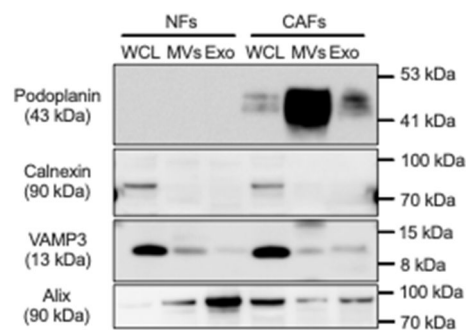


図 2. CAFs 由来 EVs にポドプラニンが存在する

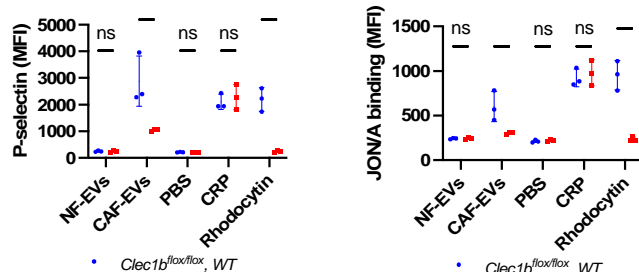


図 3. CAF-EVs による血小板活性化

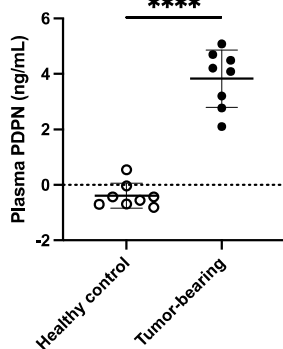


図 4. 血中ポドプラニン濃度

損血小板を産生する。血小板減少のみを誘導するため、コントロール群には抗 GPIIb/IIIa 抗体 R300 を投与した。2A2B10 による CLEC-2 欠損は、正常状態における大腿静脈の閉塞時間を延長しなかった。一方、CAF-EVs 存在下では CLEC-2 欠損マウスは閉塞時間を有意に延長した。(図 5 中央、右)したがって、CAF-EVs は血小板 CLEC-2 を介して静脈血栓症を増悪する事が明らかとなった。最後に、LLC 腫瘍の担癌マウスで同様の結果を得られるか調査した。癌進展には個体差があるため、経時的にマウスを観察し、腫瘍体積が 900 mm<sup>3</sup> を超えた時点で抗体を投与した。2A2B10 による CLEC-2 欠損は腫瘍増殖に影響を与えず、塩化鉄傷害を誘導する時点において腫瘍体積に変化を与えなかった。しかしながら、血管閉塞時間は CLEC-2 欠損によって有意に延長した。

本研究では、3 種類の癌種において CAFs がポドプラニンを過剰発現する事を確認した。CAFs は細胞間相互作用だけでなく EVs を介してポドプラニンを全身に循環していた。その結果、CAF-EVs は CLEC-2 を介して血小板活性化を惹起し、静脈血栓症を増悪する結果を得た。従来の抗血小板薬は止血機能への寄与の大きな分子が標的となっているため、血液凝固異常を来しやすいがん患者では使用が困難であった。CLEC-2 はほぼ血小板/巨核球に特異的に発現している。一方、ポドプラニンは様々な組織で発現するが、正常状態では血管内には存在しない。したがって、CLEC-2 の止血機能への寄与は非常に小さく、実際に CLEC-2 欠損マウスは出血時間を延長しない。しかし腫瘍が形成されると、腫瘍細胞や CAFs にポドプラニンが過剰発現するため、CLEC-2 を介した血小板活性化機序が促進される。すなわち、ポドプラニン/CLEC-2 の相互作用は CAT 特異的な血小板活性化機序と考えることが可能であり、CLEC-2 を標的とした抗血小板療法は出血リスクを増加させない抗 CAT 戦略になると考えられる。

は有意に抑制された。(図 3) したがって、CAF-EVs 上のポドプラニンは CLEC-2 活性化能を維持されていた。

In vivo において CAFs がポドプラニンを EVs とともに放出するのかを調査するため、LLC 腫瘍をコラゲナーゼ処理して Tumor tissue-EVs を精製した。In vitro と同様に、MVs と Exo 両分画にポドプラニンが存在しており、CLEC-2 依存的な血小板凝集

を認めた。これらの結果を踏まえてマウスの血中ポドプラニン濃度を測定した所、LLC 担癌マウスは正常マウスに比べて血中ポドプラニン濃度が有意に上昇しており、腫瘍微小環境から産生・放出された CAF-EVs が全身を循環している事が示唆された。(図 4)

この CAF-EVs の循環が CAT に寄与するか調査を行った。一般的に CAT は静脈で発症する事が多いため、我々はマウス大腿静脈を塩化鉄で傷害する血栓症モデルを作成した。野生型マウスに CAF-EVs をマウスに静脈注射すると、PBS 投与群に比べて血管閉塞時間が有意に短縮しており、CAF-EVs が in vivo における静脈血栓形成を増悪する事を発見した。(図 5 左)

*Clec1b<sup>f1/f1</sup>*, *Pf4-Cre* は血小板減少、貧血、血管/リンパ管不分離の表現型を示すため、In vivo の実験には適していない。そこで我々は抗 CLEC-2 抗体 2A2B10 をマウスに投与し CLEC-2 欠損状態を作成した。2A2B10 投与は一過性の血小板減少の後に CLEC-2 欠

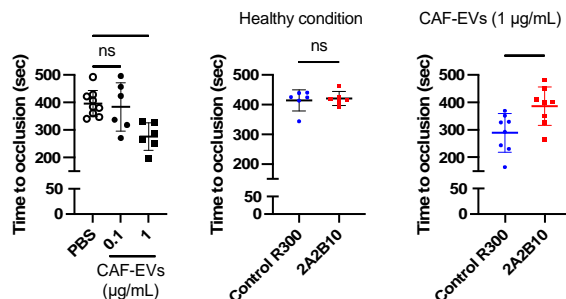


図 5. CAF-EVs は静脈血栓症を増悪する

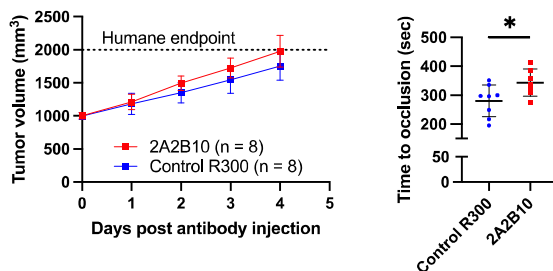


図 6. LLC 担癌マウスにおける静脈血栓症モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白井俊光
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞はCLEC-2/PDPNを介して癌関連血栓症を増悪させる
3. 学会等名 日本血栓止血学会学術集会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井俊光
2. 発表標題 Cancer-associated fibroblasts promote venous thrombosis through C-type lectin-like receptor 2/podoplanin in 3LL lung cancer mouse model
3. 学会等名 国際血栓止血学会学術集会2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井俊光
2. 発表標題 血小板活性化受容体CLEC-2と癌関連血栓症の病態
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------