様 式 Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９ （共通）

科学研究費助成事業　研究成果報告書

平成 ２７ 年　６ 月 １６ 日現在

機関番号：１３５０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５９２１５６

研究課題名（和文）新規血小板活性化受容体ＣＬＥＣ－２の悪性グリオーマの増殖能及び浸潤能への関与

研究課題名（英文）Involvement of a novel platelet activation receptor CLEC-2 in the proliferative capability and invasive capability of the malignant glioma

研究代表者
佐藤　浩企（SATO, Hiroki）

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：５０５９６９９７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、グリオーマの浸潤能と増殖能へのCLEC-2の役割を解明することを目的とした。ヒトグリオーマ細胞株を用い、Scratch wound healing assayとCell migration assayにて検討したが、CLEC-2とグリオーマ細胞株の増殖能や遊走能との間に明らかな関連性を認めなかった。
　また、CLEC-2ノックダウンヌードマウス群とコントロールヌードマウス群にヒトグリオーマ細胞を皮下移植し、腫瘍体積の変化を検討したが、CLEC-2とグリオーマの増殖との間に明らかな関連性を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to elucidate the role of CLEC-2 in the cell migration and proliferation capabilities of glioma. Using the human glioma cell lines, we examined the Scratch wound healing assay and Cell migration assay. In addition, subcutaneously transplanted with human glioma cells to CLEC-2 knockdown nude mouse group and the control nude mouse group, and the changes in the tumor volume were evaluated.
As as result, it was concluded that there was no obvious relationship between the invasion and proliferation and the function of the CLEC-2 in glioma cell lines.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：CLEC-2　グリオーマ　ポドプラニン

１．研究開始当初の背景

(1) 近年 CLEC-2(C-type lectin-like receptor 2)という全く新しいクラスの血小板活性受容体が同定され、この CLEC-2 のリガンドが、細胞外基質蛋白であるポドプラニンである事が最近になり発見された。このポドプラニンは一部の腫瘍細胞膜上に発現しており、ポドプラニンが血小板凝集を惹起して癌の転移を促進していると考えられ、新たな癌の抗転移薬のターゲットとしても注目されている。

(2) ヒトグリオーマにもポドプラニンの発現が確認され、そのグリオーマの悪性度とポドプラニンの蛋白レベルや mRNA レベルでの発現量が相関することが報告されている。従ってグリオーマの脳内の浸潤能・増殖能と、ポドプラニンによる血小板活性能が関連していると考えられ、ポドプラニンと血小板 CLEC-2 を介した血管新生因子や増殖因子の放出による機序が示唆された。

２．研究の目的

共同研究者である Suzuki-Inoue K らが開発した CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスおよび抗 CLEC-2 抗体を用いて、
グリオーマ細胞の浸潤・増殖能における CLEC-2 のもつ役割の解明を行い、新たなグリオーマ治療の可能性を追求することを目的とした。

３．研究の方法

(1) CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスの作成：共同研究者である Suzuki-Inoue K らの報告(J Biol Chem. 285: 24494-24507, 2010)に従い、CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスを作成する。

(2) CLEC-2 欠損血小板の準備：CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスより抽出した血液を不活化および洗浄し、modified Tyrode's buffer に血小板浮遊液として抽出する。

(3) In vitro での CLEC-2 とポドプラニンの結合によるヒトグリオーマ細胞の浸潤能および増殖能への影響を判定：ポドプラニン発現陽性のヒトグリオーマ細胞と、CLEC-2 欠損血小板およびコントロール血小板（CLEC-2 陽性）を共培養し、Cell migration assay 法および Scratch wound healing assay 法を用いて浸潤能と増殖能の CLEC-2 の有無による変化を定量的に判定する。

(4) In-vivo でのグリオーマの増殖能の判定：ヌードマウスに共同研究者である Suzuki-Inoue K らが開発した抗 CLEC-2 抗体を投与し、CLEC-2 ノックアウトヌードマウスを作成し、ポドプラニン陽性のヒトグリオーマ細胞株をコントロールヌードマウスと CLEC-2 ノックダウンヌードマウスに皮下移植し、移植後の腫瘍体積の変化を比較する。

４．研究成果

(1) 本研究分担者の協力のもと、CLEC-2 欠損骨髄キメラマウスの作成を行い、更にそのマウスから CLEC-2 欠損血小板の抽出を行った。

(2) フローサイトメトリーを用いてヒトグリオーマ細胞株におけるポドプラニン発現の確認を行い、ポドプラニン陽性のグリオーマ細胞とポドプラニン陰性のグリオーマ細胞をその後の研究実験用に培養継代した。

(3) In vitro での CLEC-2 とポドプラニンの結合によるヒトグリオーマ細胞の浸潤能および増殖能への影響を判定した。

①ポドプラニン陽性グリオーマ細胞株に対しコントロールとしてポドプラニン陰性グリオーマ細胞株を用い、それぞれに CLEC-2 陽性血小板と CLEC-2 欠損血小板を共培養し、Cell migration assay（浸潤能の評価）および Scratch wound healing assay（増殖能の評価）を行い、CLEC-2 の有無によるそれぞれの変化を定量的に判定したが、細胞株の違いや結果毎のばらつ

きが大きく、CLEC-2 とポドプラニンの反応による変化を評価することは困難であった（図 1 および図 2)。

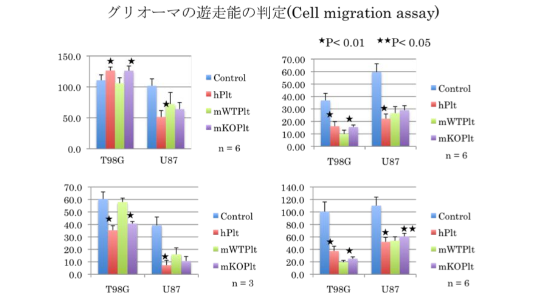

図 1　Cell migration assay

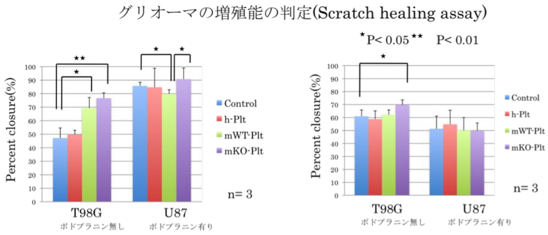

図 2　Scratch woulnd healing assay

②次に同一のグリオーマ細胞株でのポドプラニンの有無による違いを評価するため、ポドプラニン陽性グリオーマ細胞株に対して si-RNA を用いてポドプラニンのノックダウンを行い、フローサイトメトリーで確認し、同一グリオーマ細胞株でポドプラニンの陽性株と陰性株を樹立した。

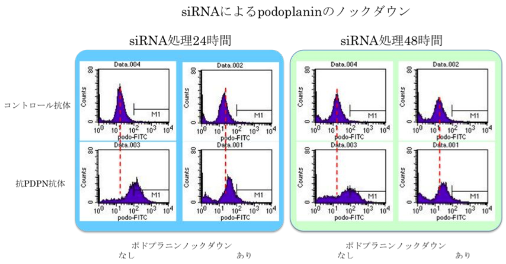

図 3　ポドプラニンのノックダウン

③同一グリオーマ細胞株でポドプラニンの陽性株と陰性株を用いて、再度 Cell migration assay（浸潤能の評価）を行い、CLEC-2 の有無によるそれぞれの変化を定量的に判定したが、実験結果ごとのばらつきもあり、ポドプラニンの有無によるグリオーマ細胞の遊走能の違いに有意差を証明できなかった（図 4)。

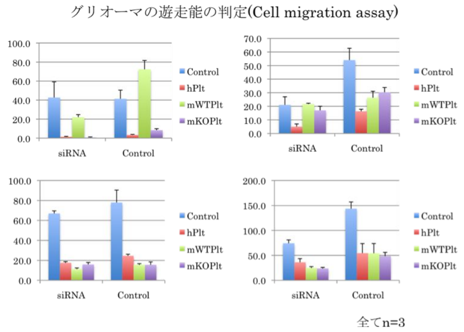

図 4　Cell migration assay

(4) In vivo での実験を行うため、ヌードマウスに本研究分担者らが開発した抗 CLEC-2 抗体を投与し、CLEC-2 ノックダウンヌードマウスを作成した。ポドプラニン陽性のヒトグリオーマ細胞株を、コントロールのヌードマウス(n=9)と CLEC-2 ノックダウンヌードマウス(n=9)の皮下にそれぞれ移植し、移植後の腫瘍体積の変化と体重変化を比較した。移植後 26 日目までの観察を行い、マウスの体重変化（図 5) においては CLEC-2 ノックダウン群がコントロール群より有意に増加した(p=0.01)が、移植した腫瘍体積変化（図 6）においては、コントロール群と CLEC-2 ノックダウン群に有意差を認めなかった(p=0.34)。

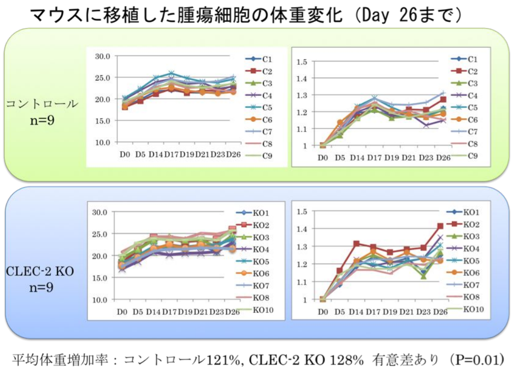

図 5　マウスの体重変化

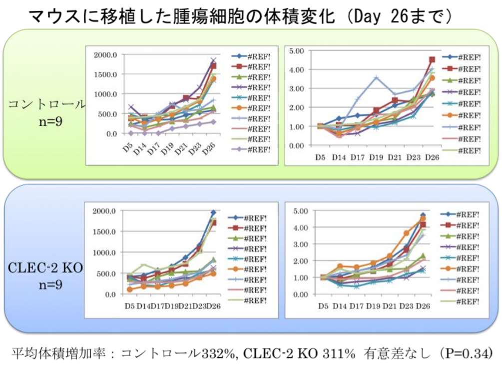

図６　移植した腫瘍体積変化

以上より、今回の研究において、ヒトグリオーマ細胞の遊走能と増殖能に対する、ポドプラニンと CLEC-2 の関与は明らかではなかった。

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　０件）

〔学会発表〕（計　０件）

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
佐藤　浩企（SATO, Hiroki）
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：50596997

(2)研究分担者
川瀧　智之（KAWATAKI, Tomoyuki）
山梨大学・総合研究部・講師
研究者番号： 20303406

尾崎　由基男（OZAKI, Yukio）
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号： 30134539

井上　修（INOUE, Osamu）
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号： 00432154

(3)連携研究者
井上　克枝（INOUE, Katsue）
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号： 10324211