

平成 2 8 年 6 月 2 3 日現在

機関番号： 1 4 3 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2013 ~ 2015

課題番号： 2 5 8 3 0 0 7 9

研究課題名（和文）血小板とがん細胞の細胞融合：悪性度への関与を探る

研究課題名（英文）Blood platelet-to-cancer cell fusion and metastasis

研究代表者

森岡 洋子（田村洋子）（MORIOKA, YOKO）

京都大学・人間・環境学研究科（研究院）・研究員

研究者番号：5 0 5 9 8 3 4 9

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：血小板は、止血、血栓形成や炎症における詳細な役割が古くから知られているが、最近では、がんの血行性転移にも関与することが示されている。本研究では、血小板とがん細胞が融合するという観察を端緒として、がんの悪性度の亢進に関与するメカニズムの解明を目指した。その結果、血小板と自発的に細胞融合したがん細胞株では、いくつかの遺伝子について転写レベルが変化し、また足場非依存性増殖能が増加することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：While the contribution of blood platelets to carcinogenesis has been known for more than a century, the molecular mechanisms through which they do so remain poorly understood. Our work has established that blood platelets have the abilities to fuse with specific cancer cell lines. By fusing with platelets, cancer cells were found to undergo transcriptional reprogramming and display enhanced adhesive abilities. These findings may provide novel therapeutic opportunities for the treatment of metastatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血小板 がん 細胞融合

1. 研究開始当初の背景

血小板は、古くから止血、血栓形成や炎症における詳細な役割について明らかにされてきたが、がんとの関わりについては関与を示唆する報告がなされるも、その詳細は長い間解明に至ることはなかった。近年になって、血小板とがんの進展との関連が注目されており、なかでも血行性転移について以下のような関与が挙げられている。(i) 血管内に侵入したがん細胞と凝集して、免疫細胞による攻撃から防御するほか、血流による物理的ストレスから保護する(ii) 転移先の臓器において、血管内皮細胞との接着を補助して、がん細胞の血管外への離脱を促す(iii) 転移巣でのがん細胞に栄養を補給する。加えて、EMT（上皮間葉転換）において、がん細胞の血管外への離脱の際には、血小板由来の TGF- β が必須であるという報告がある (Labelle *et al.*, 2011)。血小板は、血液凝固因子や増殖因子など多種多様な分子を細胞内にある分泌顆粒中に貯蔵しており、がん細胞もこれを大いに利用して生存を維持することを示唆している。また、腫瘍モデルマウスでは、血管内の他に、がん周辺の微小環境にも血小板が存在することが明らかとなっている (Stone *et al.*, 2012)。さらに、がん細胞が細胞膜上の分子を介して血小板と相互作用すること、及びそれらの分子を標的として血小板機能を欠損したマウスでは、がんの転移能が低下するという報告もなされている。多くのがん患者で血小板数上昇が見られることを考慮すると、がんにおける血小板の役割についてさらなる解明が必要とされており、これにより、新たながん治療の確立に寄与することが期待される。

2. 研究の目的

我々は、血小板とがん細胞を共培養したところ、いくつかのがん細胞株において、血小板と接着するのみでなく、血小板-がん細胞によ

る細胞融合が起こることを確認した。がん細胞の融合については、間質細胞や血管内皮細胞、そして骨髄由来細胞である白血球やマクロファージを相手として起こり、その結果ががんの悪性度を増加させることが既に知られている。本研究では、これらに次ぐがん細胞と融合する骨髄由来細胞の一つとしての血小板に注目し、がんの悪性度に寄与するメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

血小板とがん細胞間で起こる細胞融合とがんの悪性度との因果関係を明らかにするため、以下のような研究を実施した。

(1) 血小板-がん細胞の細胞融合に関わる分子の同定とそのメカニズムの解明

(2) 血小板と細胞融合したがん細胞の *in vitro*、または *in vivo* での腫瘍形成能の評価

4. 研究成果

(1) 血小板-がん細胞の細胞融合に関わる分子の同定とそのメカニズムの解明

血小板-がん細胞の細胞融合の有無を確認するため、がん細胞株を一定時間に渡って血小板と共培養したのちに、免疫染色を行った(図1)。融合細胞では、細胞膜表面に多数接着している血小板が見られる上に、血小板由来の分子(図1ではvWF [フォン・ヴィレブランド因子 von Willebrand Factor])が取り込まれてからも分解・消化されずに細胞内に長く存在していることが観察できた。我々はこれまでに、47種類の中から少なくとも7種類のがん細胞株について自発的に血小板との細胞融合を起こすことを確認している。またこれらの融合細胞では、がんの悪性度に関わるとされる遺伝子のいくつかに関して、融合前とは発現量に明らかな変化が見られることから、転写レベルでのリプログラミングが起きていることも明らかとなった。

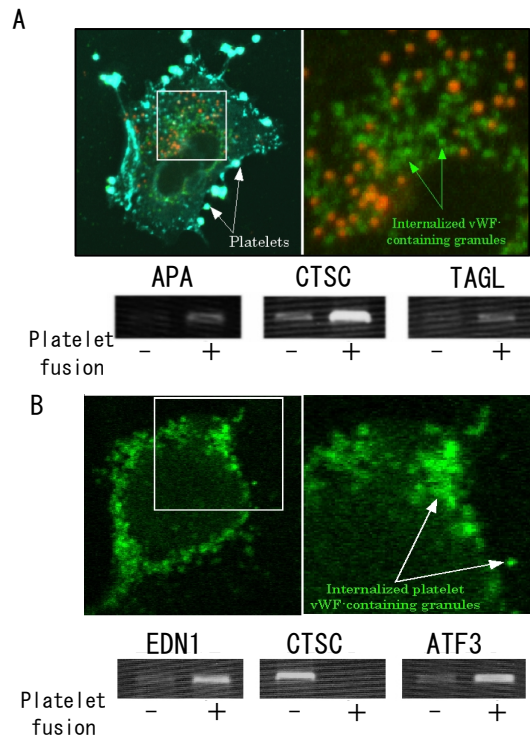


図 1. 血小板とがん細胞の細胞融合
血小板と共培養後のがん細胞の免疫染色像と RT-PCR の結果。A. 肺腺がん由来細胞。B. 腎臓がん由来細胞。細胞表面に血小板 (Platelets) が接着している (A 左図 : 矢印) が、細胞内には血小板由来の vWF が分解されずに存在する (A, B 右図 : 矢印。左図囲み部分の拡大)。

2) 血小板と細胞融合したがん細胞の in vitro、in vivo での腫瘍形成能の評価

(1) で得られた血小板-がん細胞の融合細胞の悪性形質転換を調べるために、ソフトアガーアッセイを行った。その結果、血小板-がん細胞の融合細胞では、非融合細胞に比べて腫瘍形成能において有意に増加しており、細胞融合によって、足場非依存的な増殖能の亢進が導かれることが明らかとなった。以上のことから、血小板とがん細胞の融合によって出来上がった「雑種細胞」内では、がん細胞の悪性度変化を導く何らかのシグナルが存在することが考えられた。

がん患者では、血小板産生の亢進と血管内での血栓の頻発が多くみられるが、その原因はまだ明らかになっていない。我々はこれまで

に、血栓形成に必須である血漿たんぱく質 vWF に、ジスルフィド結合を挿入して立体構造を維持し、その結果、vWF の特異的切断酵素 ADAMTS13 による切断を受けないように変異を加えることで、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) のモデルマウスを作成することに成功し報告した (Morioka *et al.*, 2014)。

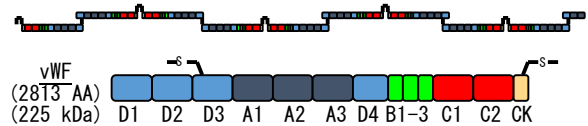


図 2. vWF の構造

vWF は 2,050 残基から成るマルチドメインタンパク質で、モノマーがジスルフィド結合で多数連なったホモマルチマーとして血中へ分泌される。血中では、vWF A2 ドメインの折りたたみ構造がほぐれ、ADAMTS13 による切断を受ける。

vWF は、止血機構において、血小板-血小板、血小板-コラーゲン線維が結合する際に重要な役割を果たし、また血液凝固第Ⅷ因子 (FⅧ) との複合体形成による FⅧの血中分解の抑制および局在的血栓形成を促進する。主に血管内皮細胞で合成される vWF は、モノマーがジスルフィド結合で多数連なったホモマルチマーとして血中に分泌される (図 2)。ADAMTS13 は血漿中のプロテアーゼであり、これによる vWF 切断は、vWF マルチマーと血小板結合による不必要な血栓形成を抑制するためにも欠かすことができない。一方で、*Adamts13* ノックアウトマウスでは、超高分子量 vWF マルチマーの増加が確認されるも、予想に反して内因性の血栓形成亢進が見られず、外部要因による刺激下でのみ血小板血栓形成能の上昇が認められた (Motto *et al.*, 2005)。このことから、血栓形成メカニズムには、ADAMTS13 に更に付加的要因の存在が予想され、我々が樹立したモデルマウスはこれを解明することに貢献することが期待される。また、vWF については、

ADAM28 によるがん細胞表面での vWF 分解が、がん細胞の転移を促進すると近年報告された (Mochizuki *et al.*, 2012)。加えて我々は、血小板-がん細胞の融合細胞において、vWF 発現量の変化も確認しており、これは vWF が血栓形成のみならずがんの悪性化に寄与することを示唆している。今後、血小板とがん細胞の融合に関わる分子の網羅的な同定を進めたい。

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 Yoko Morioka, Caterina Casari, Nikolett Wohner, Sungyun Cho, Sachiko Kurata, Ayumi Kitano, Olivier D Christophe, Peter J. Lenting, Renhao Li, Cecile V. Denis, and Nicolas Prevost

Expression of a structurally constrained von Willebrand factor variant triggers acute thrombotic thrombocytopenic *purpura* in mice. *Blood*. (2014) 123, 3344-3353.
査読あり

② Glicia Maria de Almeida, Mako Yamamoto, Yoko Morioka, Shuichiro Ogawa, Tomoko Matsuzaki and Makoto Noda
Critical roles for murine Reck in the regulation of vascular patterning and stabilization. *Scientific Reports*. (2015) 5, 17860-17869. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

① Nicolas Prevost, Yoko Morioka, Caterina Casari, Sachiko Kurata, Olivier Christophe, Cecile Denis, A novel cleavage-resistant and highly prothrombotic von Willebrand factor mutant, 24th Congress of the

International Society on Thrombosis and Haemostasis, Jul 4, 2013, Amsterdam, Netherlands

② Nicolas Prevost, Stefan Woelke, Sachiko Kurata, Yoko Morioka, Juergen Heesemann, Guy Cornelis, Expression of exogenous proteins in platelets: All you need is Yop, 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Jul 3, 2013, Amsterdam, Netherlands

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡 洋子 (MORIOKA, Yoko)
京都大学 大学院人間・環境学研究科・
研究員
研究者番号：5 0 5 9 8 3 4 9

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者