

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640108

研究課題名(和文)腫瘍増殖抑制に関わる血小板の機能解析と治療法の開発

研究課題名(英文)Molecular analysis of platelet-mediated tumor suppression and development of the anti-tumor therapy

研究代表者

藤田 直也(Fujita, Naoya)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・所長

研究者番号：20280951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血小板は腫瘍増殖や転移を促進している。しかし、抗血小板抗体投与により血小板除去を行うと腫瘍体積の増大という想定外の現象を観察したため、その分子機構解明を試みた。

抗血小板抗体投与群とコントロール群より腫瘍を摘出してmRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行なったが、腫瘍増大に繋がる可能性がある遺伝子は特定されなかった。免疫染色の結果、抗血小板抗体投与により血管新生が促進されていたため血中PDGF濃度を測定したところ、予想に反して減少していた。使用した抗血小板抗体には弱い血小板凝集誘導活性が認められたため、この血小板凝集に伴い放出される何らかの増殖因子が腫瘍増殖を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Platelets are well known to be associated with tumor growth and metastasis. We previously obtained unexpected results that platelet depletion by an anti-mouse platelet antibody (anti-GPIIb/IIIa antibody) led to the increase in xenografted tumor volume. Thus, we tried to clarify the molecular mechanisms underlying platelet depletion-mediated tumor growth. We firstly performed cDNA microarray using mRNA samples from xenografted tumors that had been treated with an anti-GPIIb/IIIa antibody or a control antibody. We could not find out any candidate genes. Immunohistochemical analysis revealed that platelet depletion induced angiogenesis without changing plasma PDGF concentration. Rather, platelet depletion resulted in the decrease in plasma PDGF concentration. Since the used anti-platelet antibody exhibited platelet aggregation-inducing ability, the antibody might promote in vivo tumor growth by enhancing the secretion of some growth factors from platelets.

研究分野：がん化学療法学

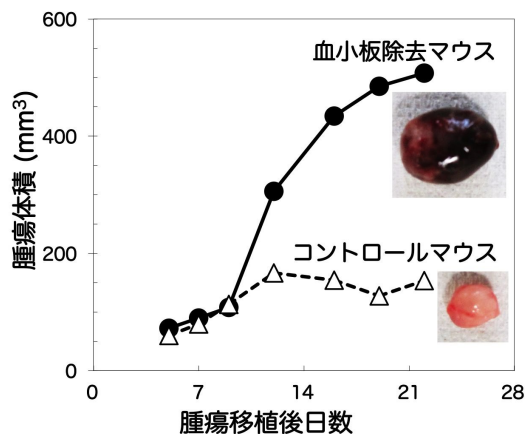
キーワード：癌 分子標的治療 血小板

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は、高転移性のがん細胞に発現し、血小板凝集を介してがん転移を促進する因子として Aggrus/podoplanin を同定し (a) これまでに、Aggrus の血小板凝集誘導活性を喪失させるとがん転移促進能が失われること (b-d) や、Aggrus の血小板凝集誘導活性を中和する抗体を作製し、その抗体投与によりがん転移が抑制されること (e-g) などを報告し、血小板の作用ががん抑制の標的として有望であることを実証してきた。これに加えて近年国内外から、血小板によって腫瘍増殖・がん転移が促進されることが報告されている。例えば、血小板凝集に伴い放出される TGF- β などの増殖因子が、がん細胞の上皮間葉転換 (EMT) を誘導してがん転移を促進していること (h) や、血小板由来の TGF- β により NK 細胞の抗腫瘍活性低下が引き起こされていること (i)、がん細胞の表面を覆った血小板が、がん細胞に対する免疫系細胞の攻撃を鎧のように防御していること (j) などが示され、がんの悪性化過程における血小板の役割が注目されている。そこで本研究代表者は、がん化学療法等の過程で生じる血小板減少症と似た症状を抗マウス血小板抗体投与により再現することで、血小板数減少による腫瘍抑制を担がんマウスモデルで確認しようとした。しかし、予想に反し、血小板を除去したマウスでは腫瘍増殖が著しく促進されることを見出した。

2. 研究の目的

抗マウス血小板抗体 (anti-GPIb) を投与して血小板減少症を惹起したヒト肺扁平上皮がん PC-10 担がんマウスモデルにおいて、その腫瘍増殖を検討したところ、腫瘍体積の増大という予想外の現象を観察した (下図)。



そこで本研究課題では、この血小板除去の際の腫瘍増殖に関わる分子機構を解明し、その分子機構を阻害する新たながん治療薬探索

に繋げることを目的とした。それにより、がん治療において起こり得る血小板減少による腫瘍増悪化を食い止める新治療法開発を目指した。

3. 研究の方法

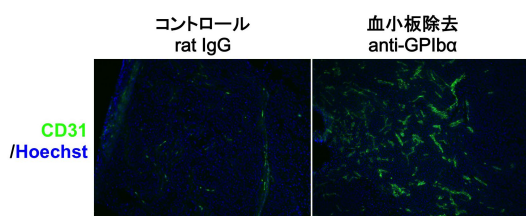
血小板除去の際に促進される腫瘍増殖の分子機構を明らかにすることで、この分子機構を標的とした新治療法の開発を目指し、以下の点について解析を行った。

- (1) 血小板除去による腫瘍への影響の解析：ヒト肺扁平上皮がん PC-10 細胞を皮下移植し作製した担がんマウスに、抗マウス血小板抗体を投与することで血小板を除去し、腫瘍増大の促進が認められた腫瘍3つとコントロール IgG 抗体投与した対照群の腫瘍から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、発現遺伝子の比較検討を行った。腫瘍の凍結切片を用いて、マイクロアレイ解析から変動が観察された因子や血管への影響も免疫組織染色法によって検討した。
- (2) 血小板除去による宿主への影響の解析：抗血小板抗体投与により変化する血中サイトカインのレベルを ELISA 法で定量比較した。
- (3) 抗血小板抗体による血小板への作用および血小板による細胞増殖への影響の in vitro 解析：血小板に抗血小板抗体を作用させ、血小板への影響を凝集活性化について調べた。血小板の作用による腫瘍細胞への影響を増殖アッセイで検討した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍側の血小板除去による影響の解析：抗血小板抗体投与により、増大が観察された腫瘍とコントロール抗体投与の対照群の腫瘍から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行なった。抗血小板抗体投与により増殖が促進された腫瘍で発現が上昇あるいは低下した遺伝子群を抽出したところ、GO 解析で epithelium/epidermis development, epithelial/epidermal cell differentiation, peptidase activity の制御に関わる因子が減少したものにリストアップされ、がん細胞の運動能、浸潤能などの性質の変化が予想された。2 サンプル以上で共通して発現変動した個々の遺伝子をみると、ADAMDEC1 といくつかの MMP を含む matrix metalloprotease の減少、cell differentiation に関わる可能性のある WNT9B の減少、クロマチン機能に関わる SP011, DNMT3L, などの減少が観察されたが、腫瘍増大に繋がる可能性がある遺伝子群は抽出さ

れなかった。一方、抗血小板抗体投与による血小板除去で変化する腫瘍内環境を検討するために、腫瘍の凍結切片を作製し、血管内皮マーカーCD31を認識する抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、コントロールに比べて血小板を除去した場合の腫瘍内では血管が増生していた(下図)。すなわち、抗

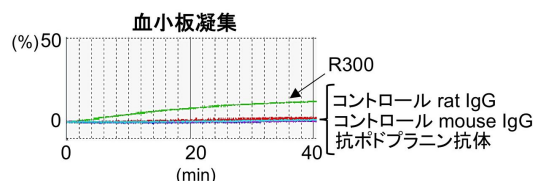


血小板抗体投与により血管新生が促進されたことが示唆された。しかしながら、マイクロアレイの結果からは、血管新生を制御する因子の発現変動は観察されなかった。

(2) 宿主側の血小板除去による影響の解析: まず、抗血小板抗体投与時の血中の血小板数について抗CD61抗体を用いたFACSで解析したところ、抗血小板抗体投与24時間後には血中の血小板が通常の0.3%以下に減少し、120時間後には数~20%程度まで回復することが確認された。前述の通り、抗血小板抗体投与により血小板を除去することで増大した腫瘍中に血管の増生が観察されたため、血管新生に関与することが知られている血小板に多く含まれるPDGFのレベルをELISA法により測定した。その結果、通常マウス血漿中におよそ1 ng/ml程度存在するPDGFは、抗血小板抗体投与後24時間で検出限界(30 pg/ml:3%)以下まで減少し、120時間後には50%近いレベルまで回復していた。すなわち、PDGFをはじめとする血中サイトカインのレベルは、血小板の数によって大きく影響を受けることが示唆された。血小板には、血管新生を抑制する因子であるTSP-1やendostatinなども含まれることから、これら因子の血中レベルの減少が血小板除去時の血管新生に関与している可能性がある。また、PDGF同様血小板中に多量に濃縮されているTGF- β の血中レベルの減少による増殖抑制の解除が腫瘍の増大に繋がった可能性も考えられた。少なくともTGF- β によって誘導されることが知られるepithelial-mesenchymal transition (EMT)について腫瘍細胞中のEMTマーカータンパク質レベルをウェスタンブロッティングにより調べたところ、EMT関連因子の変動が確認された。

(3) 抗血小板抗体による血小板への作用および血小板による細胞増殖への影響の in

vitro 解析: 抗血小板抗体投与による血小板の減少とそれに伴う血中サイトカインレベルの変動が観察されたが、さらに抗血小板抗体による血小板への直接的な作用を調べるために、マウス血液から調製した血小板に抗血小板抗体を作用させ、in vitroでの影響を検討した。その結果、部分的ではあるが使用した抗血小板抗体には血小板凝集を誘導する活性があることが観察された(下図)。



したがって、抗血小板抗体投与により惹起された血小板凝集が血小板からの増殖因子の遊離を促進し、その増殖因子が腫瘍限局的に作用を及ぼした可能性もある。すでに血小板とのin vitroでの共培養がPC-10細胞の増殖を促進することは見出ししていたが(e)、今回さらに、血小板凝集後の上清を処理することによってもPC-10細胞の増殖が促進されることを確認することに成功している。抗血小板抗体投与直後から経時的に血中サイトカインレベルや腫瘍の増殖シグナルを網羅的に解析することで、抗血小板抗体投与時の血管新生と腫瘍増大に関与する因子を明らかにできるものと期待される。

<引用文献>

- a. Kato Y, Fujita N, et al., J. Biol. Chem., 278: 51599-51605, 2003.
- b. Nakazawa Y, Fujita N, et al., Blood, 112: 1730-1739, 2008.
- c. Kunita A, Fujita N, et al., Am. J. Pathol., 170: 1337-1347, 2007.
- d. Kaneko M, Fujita N, et al., J. Biol. Chem., 279: 38838-38843, 2004.
- e. Takagi S, Fujita N, et al., PLoS One, 8: e73609, 2013.
- f. Nakazawa Y, Fujita N, et al., Cancer Sci., 102: 2051-2057, 2011.
- g. Sekiguchi T, Fujita N et al. Oncotarget, 7:3934-3946, 2016.
- h. Labelle M, et al. Cancer Cell, 20: 576-590, 2011.
- i. Kopp HG, et al. Cancer Res., 69: 7775-7783, 2009.
- j. Placke T, et al. Cancer Res., 72: 440-448, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takaya Sekiguchi, Ai Takemoto, Satoshi Takagi, Kazuki Takatori, Shigeo Sato, Miho Takami, Naoya Fujita. Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis. **Oncotarget**, 査読有、7(4): 3934-3946, 2016.
DOI: 10.18632/oncotarget.6598

〔学会発表〕(計4件)

藤田直也. Regulation of tumor microenvironment and metastasis by interaction with platelets. 第73回日本癌学会総会. 2014年9月25-27日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(招待講演)

竹本愛, 大原智子, 藤田直也. Aggrus 依存的な血小板凝集は EMT を介してがん転移を促進する. 第19回日本がん分子標的治療学会. 2015年6月10-12日. 松山全日空ホテル(愛媛県・松山市)

Naoya Fujita. Targeting platelet-tumor interaction for cancer therapy. Lithuania - Japan Joint Life Science Symposium. 2015年10月7日. 東京大学(東京都・文京区)(招待講演)

藤田直也, 竹本愛. Targeting tumor-induced platelet aggregation for cancer therapy. 第74回日本癌学会総会. 2015年10月8-10日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)(招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 直也 (FUJITA, Naoya)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・所長

研究者番号: 20280951

(2) 研究協力者

竹本 愛 (TAKEMOTO, Ai)

佐藤 重男 (SATO, Shigeo)

高木 聡 (TAKAGI, Satoshi)

高見 美穂 (TAKAMI, Miho)

関口 貴哉 (SEKIGUCHI, Takaya)

宮田 憲一 (MIYATA, Kenichi)

高鳥 一樹 (TAKATORI, Kazuki)