

## 研究テーマ

高転移細胞膜上に発現しているAggrus依存的な血小板凝集誘導機構の解析と  
血行性がん転移予防への応用

## 1. はじめに 緒言 目的 背景 序

最新の統計データでは、日本の死因の第1位はがん(悪性新生物)で占められており、がんによる死亡者数は近年増加傾向にある。がんは、生体内制御機構から逸脱して無秩序な増殖をするといった特徴をもつ疾患であるが、致死率を規定する最も大きな要因は発生した原発巣での増殖ではなく、転移巣における増殖である。がんが転移するには、(1) 原発巣からの離脱と周囲の間質・基質への浸潤、(2) 血管やリンパ管など脈管内への侵入、(3) 脈管内におけるリンパ球・血小板との相互作用、(4) 脈管内の移動、(5) 標的臓器内脈管系への着床・塞栓形成、(6) 脈管外への脱出、(7) 転移先臓器組織中への浸潤と再増殖といった様々なステップを乗り越えなければならない。特に脈管内へと侵入したがん細胞は宿主の免疫系からの攻撃などで0.01%以下しか生き残ることが出来ず、脈管内での生存は転移形成において乗り越えるべき重要なステップとなっている。脈管内で血小板はがん細胞と相互作用するが、一般に高転移性がん細胞は血小板凝集能を有することが多く、できあがった大きな凝集塊が腫瘍塞栓を形成し転移形成を助長するとされる。血小板凝集は心筋梗塞、脳梗塞、動脈硬化、慢性頭痛など様々な疾患の発症にも関与している。血小板凝集はvon Willebrand因子がコラーゲンに付着し、そこに膜タンパク質であるGPIIb/IIIaを介して血小板が結合することにより開始される。このようにして活性化された血小板はADPやセロトニンなどを放出し、周囲の血小板を2次的に活性化する。これら因子により活性化された血小板はGPIIb/IIIaを血小板膜上に発現し、血漿中のvon Willebrand因子やフィブリノゲンが結合することにより血液中の様々な細胞を巻き込んだ凝集塊を形成し血栓を形成する。血小板は腫瘍塊形成に関与するだけでなく凝集に際してサイトカインや様々な生理活性物質を放出し、がん細胞の血管内皮細胞への接着や自身の生存促進にも関わる。実際に抗炎症薬を含め多数の血小板凝集阻害剤が転移抑制薬の候補として挙げられており、血小板凝集はがんの血行性転移に重要な役割を果たしているものと思われる。しかし、がん細胞膜上に発現している血小板凝集促進因子は同定されていなかった。

受賞者である藤田らは2003年に、高転移がん細胞膜上に発現している新規血小板凝集促進因子の遺伝子クローニングに成功し、この分子をAggrusと命名した。Aggrusはその遺伝子配列より、世界各国の研究室でクローニングされたために様々な名前で呼ばれている機能未知の分子(Podoplanin/T1 $\alpha$ /gp38P/OTS-8)と同一であった。このAggrusの血小板凝集促進活性を確認するためにマウスAggrus分子をCHO細胞に発現させて検討したところ、Aggrus発現に伴い血漿成分非存在下でも血小板凝集がおきること、Aggrus発現に伴いCHO細胞の実験的転移が増加すること、マウスAggrusの血小板凝集誘導活性を中和する8F11抗体添加により肺転移形成が阻害されることが確認され、Aggrusは今までに報告の無い新たな血小板凝集促進因子であることが証明されている。また、Aggrusは糖タンパク質であり、付加されている糖鎖が血小板凝集誘導活性に不可欠である。これまでに、糖鎖が付加していると

予想されている34番目並びに52番目のスレオニン残基に変異を入れ糖鎖が付加されないように改変した変異Aggrusでは血小板凝集誘導活性が認められないこと、さらに糖鎖合成不全細胞に発現させたAggrusにも血小板凝集誘導活性が認められないことを明らかにし、糖鎖付加がAggrusの血小板凝集誘導活性に必須であることを証明してきた。

そこで本研究では、糖タンパク質としてのAggrusのシアリル化と、Aggrusの *in vivo* における血小板凝集・転移能との相関を検討するとともに、Aggrusの生理的・病的状態におけるシアル酸量の変化を検討し、Aggrusのシアリル化異常を標的にした治療薬開発につなげることを目的として研究を行なった。

## 2. 方法

(1) 高転移性であり、かつAggrus過剰発現細胞であるマウスNL17細胞より、抗マウスAggrus抗体カラムにてAggrus分子の精製をおこなった。この精製Aggrus分子に非病原性連鎖球菌から精製されたシアリダーゼであるNeuraminidaseを処理し、Aggrusの血小板凝集誘導活性に対する影響を検討した。

(2) 4種のマウスシアリダーゼ (Neu1、Neu2、Neu3、Neu4) 全長遺伝子をイメージクローン (Neu1: MMM4769-99609675、Neu2: MMM1013-99827217、Neu3: MMM1013-99828395、Neu4: MMM1013-9497282) からクローニングした。次にこれら遺伝子にFLAG tagを付加し、レトロウイルス発現ベクターであるpLPCXに挿入した (Fig. 1)。こうしてできたNeu1~4発現ベクターを、レトロウイルス産生細胞であるGP2-293細胞に遺伝子導入し、レトロウイルスを回収した。こうして得られたレトロウイルスを、マウスAggrusを高発現するNL17細胞に感染させ、恒常的にNeu1~4を発現するNL17細胞を作製した (Fig. 2)。

(3) これらシアリダーゼ遺伝子導入NL17細胞を用いて、糖鎖プロファイルの変化に起因するAggrusの分子量のシフトを、ウェスタンブロットにより検討し、さらにFLAG tagに対する抗体を用いた免疫沈降により、Neu1~4とAggrusの *in vivo* での結合を検討した。さらにAggrusのマイクロドメイン・ラフトへの局在を検討した。

## 3. 結果 研究成果

(1) 精製Aggrus分子は、その用量依存的に血小板凝集を促進することを確認した。さらに、精製Aggrus分子をN-glycanaseと *in vitro* で反応させてもその血小板凝集誘導活性には変化がなかったが、シアリダーゼを処理することによりAggrusの血小板凝集誘導活性が失活することが確認され、血小板凝集誘導活性にはAggrusへのシアル酸付加が必須であることが確認された。

(2) シアリダーゼ遺伝子導入NL17細胞におけるNeu1~4の恒常発現は、マウスシアリダーゼ遺伝子に付加したFLAG タグに対する抗体によるウェスタンブロットにより確認された (Fig. 2)。しかし、内在性Aggrus分子の発現量はNeu1~4発現に影響されなかった。

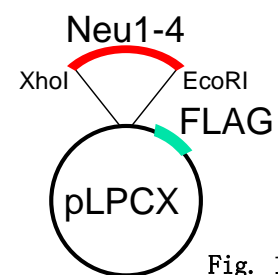


Fig. 1

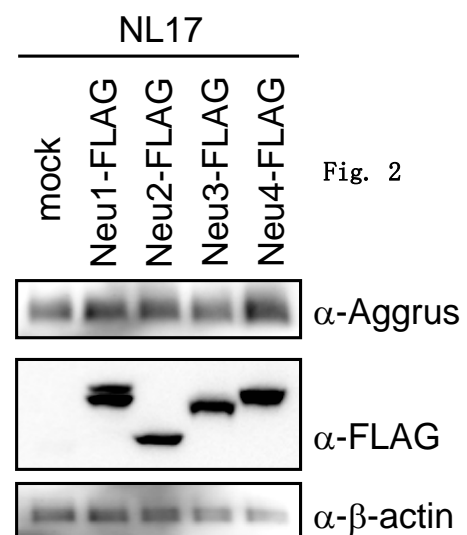


Fig. 2

(3) 脱シアル化に伴う Aggrus の電気泳動上でのバンドシフトは認められなかった (Fig. 2)。そこで、Aggrus とシアリダーゼ間の相互作用を確認するため、抗 Aggrus 抗体で免疫沈降し、FLAG タグが付加した Neu1~4 の共沈を検討した。その結果、Aggrus と Neu1~4 の共沈は観察されず、直接的な相互作用の可能性は低いことが示唆された。さらにシアリダーゼ発現に伴う Aggrus のマイクロドメイン・ラフトへの局在変化も観察されなかった。

#### 4. 考察 まとめ

高転移性がん細胞膜表面上に発現している Aggrus の分子量は約 40 kDa であるが、糖鎖が付加されない大腸菌で発現させた場合、その分子量は約半分の 20 kDa となる。1997 年に Zimmer らは、イヌの Aggrus (当時は gp40 と称していたが) の解析を行なった結果、イヌの Aggrus には 31 カ所の糖鎖結合可能部位があり、そのうちの 14 カ所に実際に糖鎖が結合していると報告している。藤田 らは、Aggrus の血小板凝集活性には糖鎖付加が必須であることを、糖鎖合成不全 CHO 細胞を用いて証明してきた。さらに、Aggrus の血小板凝集誘導活性に不可欠な Aggrus 上の糖鎖結合部位として 34 番目と 52 番目のスレオニン残基を特定していた。Aggrus に付加しているシアル酸を生化学的にシアリダーゼで除去すると血小板凝集誘導活性が認められなくなることが確認されたことから、Aggrus に付加しているシアル酸が血小板凝集誘導活性に不可欠であることが明らかになった。しかし、Aggrus 発現細胞に過剰発現させたシアリダーゼと内在性 Aggrus の結合は観察されず、さらに *in vitro* でのシアリダーゼ処理の際に認められた Aggrus のバンドシフトがシアリダーゼ遺伝子導入 NL17 細胞では認められなかった。また、先に藤田 らが見いだしていたマイクロドメイン・ラフトへの局在による Aggrus の不活性化も、シアリダーゼ遺伝子導入 NL17 細胞では認められなかった。使用したがん細胞 NL17 が本研究に適していなかった可能性も考えられ、ヒト Aggrus 過剰発現細胞株などを用いて再度 Neu1~4 の恒常発現細胞株を樹立する必要があると考えている。しかし、Neu1 遺伝子導入により NL17 細胞の肺転移が抑制されることが他グループより報告されていることから、Neu1 は Aggrus の脱シアル化ではなく別の分子の脱シアル化により NL17 の肺転移を抑制している可能性が示唆された。このことは、Neu2、Neu3、Neu4 発現細胞で転移抑制活性が認められた場合でも、Aggrus の脱シアル化以外の機構で転移抑制が引き起こされた可能性を無視できないことを示しており、今後は Aggrus 以外のがん転移関連シアリダーゼ標的分子の探索を行なう必要があることが示唆された。

#### 5. 発表論文、参考文献

発表論文：無し

参考文献：

1. Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. Youya Nakazawa, Shigeo Sato, Mikihiro Naito, Yukinari Kato, Kazuhiko Mishima, Hiroyuki Arai, Takashi Tsuruo, and Naoya Fujita **Blood**, 112: 1730-1739, 2008.
2. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. Takashi Tsuruo and Naoya Fujita **Proc. Jpn. Acad., Ser. B**, 84: 189-198, 2008.