

## 血小板凝集因子ポドプラニン (Podoplanin) の分子生物学的解析

加藤幸成・金子(加藤)美華・成松 久

(独) 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター

マウス高転移性細胞株より同定されたポドプラニン (Podoplanin; 別名 Aggrus) は、血小板凝集能/転移促進活性を持つ I 型膜貫通型糖タンパクである。機能部位解析により、ポドプラニンの活性部位 (**PLAG domain**) が種を超えて保存されていることがわかった。さらに詳細な糖鎖構造解析により、ヒトポドプラニンの **PLAG domain** に含まれる、52 番目のスレオニンに付加された disialyl-core1 構造がその機能に重要であることがわかってきた。また近年、ポドプラニンの血小板上のレセプターとして、CLEC-2 が同定された。ポドプラニンは、特異的なリンパ管マーカーであるだけでなく、種々のヒト腫瘍にも悪性度と関連した発現が認められている。

### はじめに

癌細胞の血行性転移において、癌細胞による血小板凝集が認められることが報告されている (図①)。癌細胞は血管に侵入すると、宿主の免疫系による攻撃を受け、また物理的衝撃により即座に破壊され、わずかな癌細胞しか生き残れない。しかし、血小板凝集を引き起こすことにより、これらの過程から守られると考えられている。また、血小板凝集は癌細胞の血管内皮細胞への接着を促し、また増殖因子を放出することにより、癌細胞の局所的な増殖を引き起こすとも考えられている。さらに、癌細胞と血小板の凝集塊が、毛細血管に詰まることも血行性転移の促進に寄与している。このように、癌細胞による血小板凝集が転移形成に重要であることが示唆されていたが、癌細胞膜上に発現している血小板凝集因子は同定されていなかった。本節では、新規血小板凝集因子の発見、遺伝子クローニング、機能部位決定、糖鎖構造解析、さらにレセプターの発見まで、我々の一連の研究成果について概説する。

### I、新規血小板凝集因子ポドプラニンの発見

鶴尾らは、マウス結腸癌細胞株 colon 26 を繰り返し実験的に肺転移させることで、高転移性株 NL-17 細胞と低転移性株 NL-14 細胞を取得した<sup>1)</sup>。さらに NL-17 細胞に高反応

性を示し、NL-14細胞には低反応性を示すモノクローナル抗体8F11抗体を作製した。*in vitro*の実験で、NL-17細胞はマウスの血小板凝集を引き起こすが、8F11抗体によりその活性は阻害された。また、*in vivo*の実験で、NL-17細胞の実験的肺転移が8F11抗体の投与によって阻害された。これらのことから、NL-17細胞は8F11抗体に認識される血小板凝集因子gp44（後にAggrusと命名したが、現在はポドプラニンという名前で統一されている）によりマウス血小板を凝集し、その結果、肺転移を起こすことが示唆された。その後、豊島、中島らは、8F11抗体カラムとWGAカラムを使ってNL-17細胞からマウスのポドプラニタンパク質を精製した<sup>2)</sup>。精製ポドプラニンは、血漿成分非存在下で、濃度依存的にマウスの血小板凝集を引き起こし、さらにこの凝集反応は8F11抗体によって完全に阻害された。

## II、ポドプラニンの遺伝子クローニングと活性部位の同定

近年我々は、癌細胞上の血小板凝集因子ポドプラニンの遺伝子クローニングに成功した<sup>3)</sup>。ポドプラニンはC末端に膜貫通部位を有したI型膜貫通型タンパク質である（図②）。ヒトポドプラニンはマウスポドプラニンとホモロジーが低いにも関わらず、マウスの血小板凝集を引き起こし、逆に、マウスポドプラニンはヒトの血小板凝集を引き起こす（図③A,B）。マウスポドプラニンの中和抗体（8F11）のエピトープ解析、および詳細な変異実験により、EDxxVTPG という配列の3回繰り返し（PLAG domain）のスレオニン（Thr）がポドプラニンによる血小板凝集の活性中心であり、種を超えて保存されていることが明らかとなった（図③C）<sup>4)</sup>。ポドプラニンはその分子量の約半分が糖鎖であるが、糖鎖合成不全の変異CHO細胞株（Lec1, Lec2, Lec8）を用いることにより、PLAG domainのThrに付加されているO-結合型糖鎖のシアル酸が血小板凝集の活性中心であることがわかった<sup>5)</sup>。

## III、ポドプラニンの糖鎖構造解析

内在性の糖タンパク質を精製するには、感度・特異度の高い抗体が必須である。我々はまず、ヒトポドプラニンに特異度の高いモノクローナル抗体（NZ-1）を作製した<sup>6)</sup>。NZ-1抗体は、Western-blotやflow cytometry、免疫組織染色に有用なだけでなく、免疫沈降にも感度・特異度共に高いことがわかった。さらに、質量分析計（MS）を使った詳細な糖鎖構造解析（特にO-結合型糖鎖）には、数十μgの精製蛋白が必要となる。よって、ヒトポドプラニンを高発現している癌細胞株のスクリーニングも同時に行っ

た。その結果、NZ-1 抗体を用いて、ヒトポドプラニンを高発現しているヒト膠芽腫細胞 LN319 からヒトポドプラニンを大量に精製した<sup>7)</sup>。

MS を用いて、ポドプラニンの糖鎖構造を解析した結果、ポドプラニンは m/z 1257 の糖鎖を持つことがわかった (図④A)<sup>7)</sup>。さらに、m/z 1257 の MS/MS 解析により、ポドプラニンは disialyl-core1 構造を持つことがわかった (図④B)。また、ポドプラニンを Asp-N で処理し、PLAG domain を含む糖ペプチド (Ala23-Glu57) を分離したところ、disialyl-core1 構造が一カ所のみ付加されていることがわかった。

レクチンアレイを用いた解析によっても、同様の結果が示唆された<sup>7)</sup>。すなわち、ポドプラニンは sialo-mucin binders である MAH や WGA に反応したが、core1-binder である PNA や BPL には反応しなかった。また、ポドプラニンをシアリダーゼ処理することにより、core1 binder のシグナルが見られ、sialo-mucin binders のシグナルが消失した。core1±sialic acid binders の ABA、ACA、MPA、Jaccalin には、ポドプラニンのシアリダーゼ処理の有無に関わらず反応した。

ヒトポドプラニンの PLAG domain には、O-結合型糖鎖付加部位が 4 カ所ある。そこで、Edman 分解法によりペプチドシーケンスを行った結果、Thr52 のみに糖鎖が付加されていることが示唆された (図④C)。さらに、ヒトポドプラニンの糖鎖付加部位もすべて同様の方法で決定した (図②)。以上の詳細な解析により、ヒトポドプラニンによる血小板凝集の活性中心は、PLAG domain の Thr52 に付加された disialyl-core1 構造であることが明らかとなった。

#### IV、ポドプラニンの血小板上レセプターの同定

最近我々は、井上、尾崎らとともに、ポドプラニンの血小板上受容体として、C型レクチン様受容体のCLEC-2を同定した<sup>8)</sup>。レセプター発見のきっかけとなったのは、刺激からのlag timeが長いという、特徴的なポドプラニン誘導性の血小板凝集パターンである (図③A, B)。この凝集パターンを示す血小板上のレセプターとして、コラーゲンレセプターであるGPVIや、蛇毒ロドサイチンのレセプターとして発見されたCLEC-2が報告されていた。GPVIノックアウトマウスの血小板に対しては、ポドプラニンが血小板凝集を引き起こしたことから、GPVIはポドプラニンのレセプターではないことがわかった。

そこで、CLEC-2のFcキメラや膜型発現株を作製し、ポドプラニンとの結合を調べたところ、ポドプラニンとCLEC-2が特異的に結合した。さらに、CLEC-2のFcキメラによってポドプラニンによる血小板凝集が阻害された。GPVIによっては、これらの反応は

見られなかった。さらに、ポドプラニンとCLEC-2の反応がPLAG domainを介して起こっていることを確かめるため、PLAG domainの Thr52のみにO-結合型糖鎖を付加した様々な糖ペプチドを*in vitro*で合成した。その結果、PLAG domainにdisialyl-core1 構造を付加した糖ペプチドのみがCLEC-2と高い反応性を示した<sup>9)</sup>。

我々が作製した抗ヒトポドプラニン抗体 (NZ-1)は、ポドプラニンとCLEC-2との結合を阻害し (図②)、ポドプラニンによる血小板凝集も濃度依存的に阻害した (図⑤A)<sup>6)</sup>。また、NZ-1抗体をポドプラニン発現細胞と共に尾静注すると、肺転移も有意に抑制した (図⑤B)<sup>9)</sup>。以上の結果より、ヒトポドプラニンは、CLEC-2に結合することにより血小板凝集を起こし、さらに血行性転移に重要な役割を果たすことが示された。

## おわりに

以上のように、我々はここ数年間で、血小板凝集因子ポドプラニンのクローニング、血小板凝集活性や転移促進活性の評価、活性部位である糖鎖構造の解析、血小板上のレセプターの同定とその機能解析を行った。ポドプラニンによる血小板凝集メカニズムは、非常に複雑で解析が困難であると予想していたが、実際には、disialyl-core1 構造が付加された Thr52 を含む PLAG domain が、血小板の CLEC-2 に結合し血小板を活性化するという、意外に単純かつ明快なものであった。

現在、ポドプラニンは主にリンパ管マーカーとして利用されているが、脳腫瘍、種々の扁平上皮癌、精巣腫瘍、悪性中皮腫などに高発現していることを我々は報告してきた<sup>10-13)</sup>。特に、脳腫瘍の中でも astrocytic tumor においては、悪性度と相関してポドプラニンが発現しており、腫瘍マーカーとしての可能性も考えられる<sup>12)</sup>。また、癌細胞特異的な抗ポドプラニン抗体の開発により、癌治療のターゲットとしても期待される。

我々は、ポドプラニンの血小板凝集活性や転移促進活性に注目して研究を行ってきた。しかし未だに、ポドプラニンの生理的機能については不明な点が多い。ポドプラニンのノックアウトマウスはすでに作製されており、呼吸不全が原因で出生後すぐに死亡するが、リンパ管の異常によるリンパ管浮腫なども認められる<sup>14)</sup>。よって、ポドプラニンがリンパ管の発生に何らかの役割を果たしていることが推測される。また、ポドプラニンが細胞の運動能や浸潤能を亢進するという報告も見られる<sup>15,16)</sup>。ポドプラニンの機能解明のために、解決しなければならない課題は多く、今後の進展が待たれる。

## 参考文献

- 1) Tsuruo T., Yamori T. et al., *Cancer Res.* 43, 5437-5442, 1983.
- 2) Toyoshima M., Nakajima M. et al., *Cancer Res.* 55, 767-773, 1995.
- 3) Kato Y., Fujita N. et al., *J. Biol. Chem.* 278, 51599-51605, 2003.
- 4) Kaneko MK., Kato Y. et al., *Gene* 378C:52-57, 2006
- 5) Kaneko M., Kato Y. et al., *J. Biol. Chem.* 279, 38838-38843, 2004.
- 6) Kato Y., Kaneko MK. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349:1301-1307, 2006
- 7) Kaneko MK., Kato Y. et al., *FEBS Lett.* 581, 331-336, 2007.
- 8) Suzuki-Inoue K., Kato Y. et al., *J. Biol. Chem.* 282, 25993-26001, 2007.
- 9) Kato Y., Kaneko MK. et al., *Cancer Sci.* 99, 54-61, 2008.
- 10) Kato Y., Sasagawa I. et al., *Oncogene* 23, 8552-8556, 2004.
- 11) Kato Y., Kaneko M. et al., *Tumor Biol.* 26, 195-200, 2005.
- 12) Mishima K., Kato Y. et al., *Acta Neuropathol.* 111(5):483-488, 2006a
- 13) Mishima K., Kato Y. et al., *Acta Neuropathol.* 111(6):563-568. 2006b
- 14) Schacht V., Ramirez M.I. et al., *EMBO J.* 22, 3546-3556, 2003.
- 15) Martin-Villar E., Megias D. et al., *J. Cell Sci.* 119, 4541-4553, 2006.
- 16) Wicki A., Lehembre F. et al., *Cancer Cell* 9, 261-272, 2006.

## Figure legend

### 図① 癌の血行性転移における血小板凝集の役割

癌細胞は血小板凝集を引き起こすことにより、宿主の免疫系による攻撃や物理的衝撃から守られる。また、癌細胞の血管内皮細胞への接着や、癌細胞の局所的な増殖を引き起こす。癌細胞と血小板の凝集塊が毛細血管に詰まることも、血行性転移の促進に寄与している。

### 図② NZ-1 抗体によるポドプラニンと CLEC-2 の結合阻害

ポドプラニンは C 末端に膜貫通部位を有した I 型膜貫通型タンパク質であり、血小板上のレセプターである CLEC-2 は N 末端に膜貫通部位を有した II 型膜貫通型タンパク質である。ポドプラニンの PLAG domain と CLEC-2 の C-type lectin like domain が結合し、血小板凝集を引き起こされる。ヒトポドプラニンでは、52 番目 Thr の O-glycan が重要な役割を果たしている。ヒトポドプラニンには、それ以外に 11 カ所に O-glycan が付加されている。ポドプラニンと CLEC-2 の結合を NZ-1 抗体が中和し、ポドプラニンによる血小板凝集や転移促進が阻害される。

### 図③ ポドプラニンによる血小板凝集

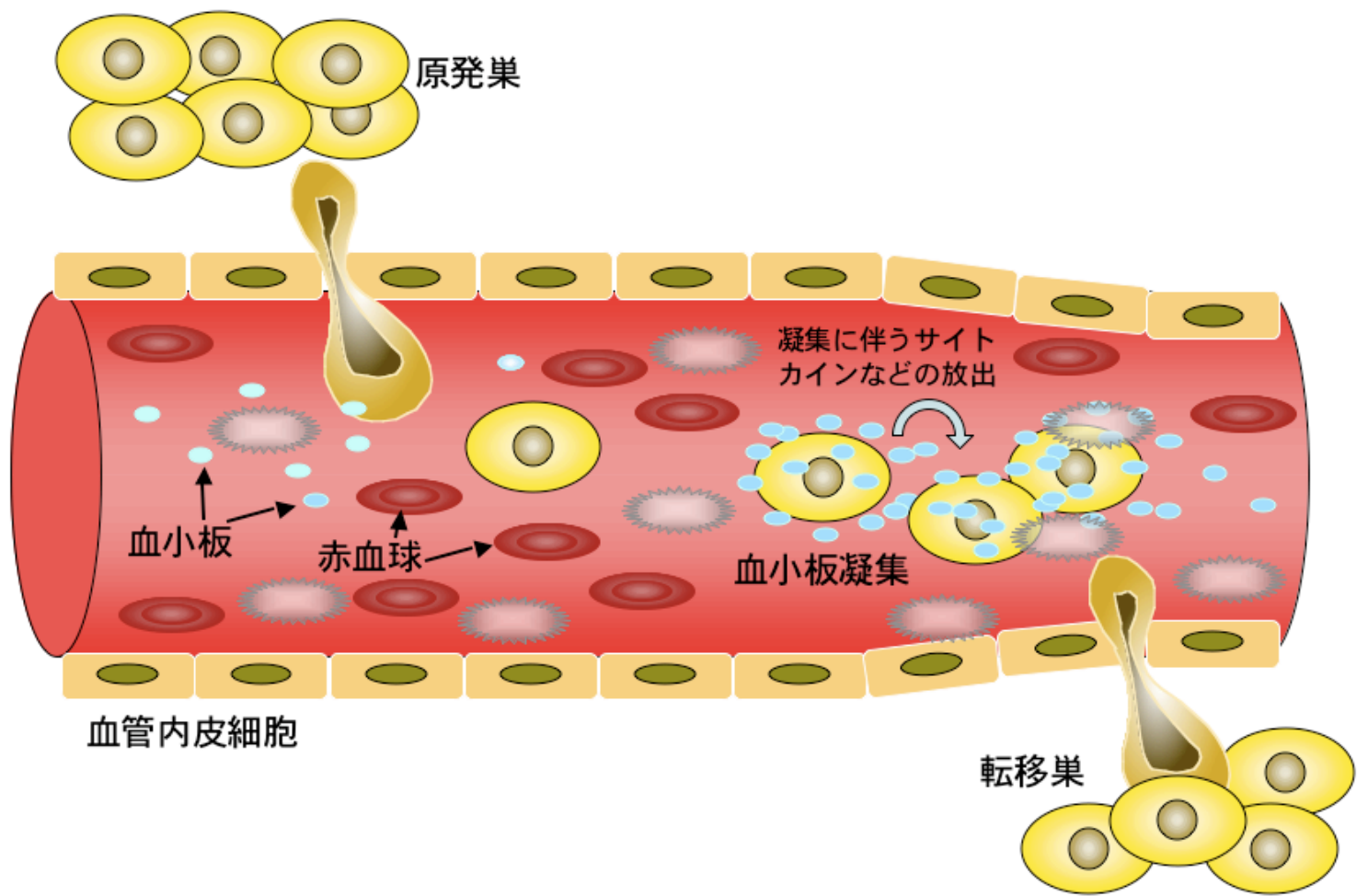
(A) CHO 細胞にマウスポドプラニンやヒトポドプラニンを発現させた細胞（それぞれ CHO/mPod、CHO/hPod）は、マウスの血小板凝集を引き起こした。(B) CHO/mPod、CHO/hPod は、ヒトの血小板凝集を引き起こした。(C) ポドプラニンの血小板凝集活性中心 (PLAG domain) は、種を超えて保存されている。

### 図④ ポドプラニンに付加されている糖鎖構造解析と糖鎖付加部位解析

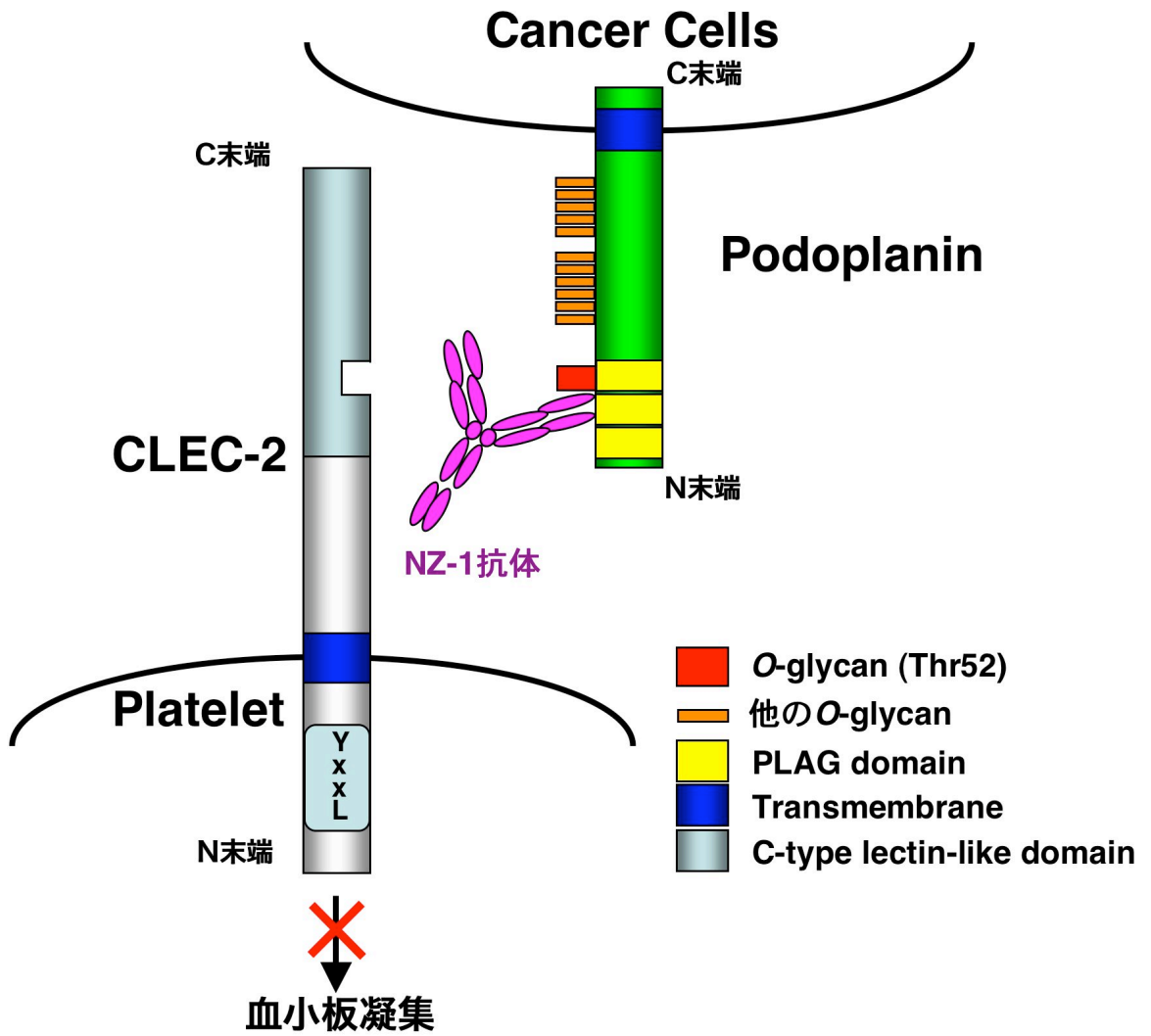
(A) 膠芽腫細胞 LN319 から NZ-1 抗体を用いてヒトポドプラニンを精製した。精製したポドプラニンに付加されている糖鎖を切り出し、完全メチル化した後、質量分析計により構造を解析した。その結果、ポドプラニンは m/z 1257 の糖鎖を持つことがわかった。(B) m/z 1257 の MS/MS 解析により、ポドプラニンは disialyl-core1 構造を持つことがわかった。(C) Asp-N 消化したポドプラニンの糖ペプチドを HPLC により分画し、Ala52-Glu57 の糖ペプチドについて、Edman 分解を行った。いくつかの O-glycan 予想付加部位のうち、Thr52 のみ Thr のピークが消失しており、O-glycan が付加されていることがわかった。

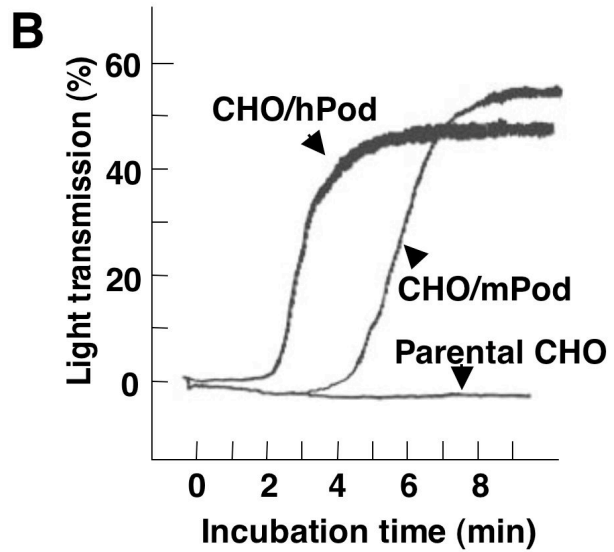
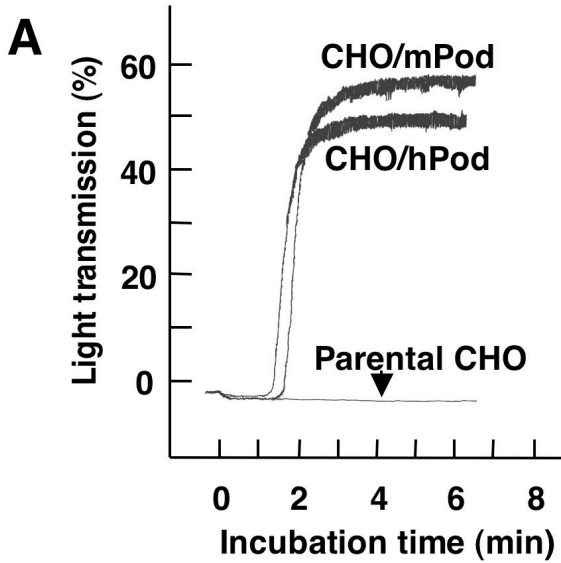
図⑤ NZ-1 抗体によるポドプラニン誘導性血小板凝集および転移の抑制

(A) NZ-1 抗体は、ポドプラニン誘導性の血小板凝集を濃度依存的に阻害した。(B) NZ-1 抗体、NZ-1 抗体の  $F(ab')_2$  は、ポドプラニン発現株の実験的転移を有意に抑制した (\* $p < 0.01$ )。



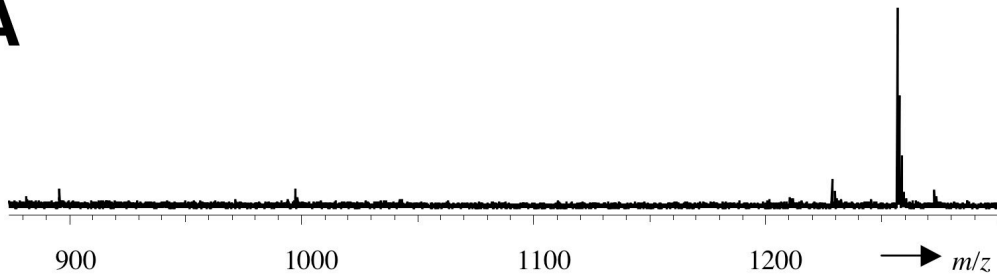
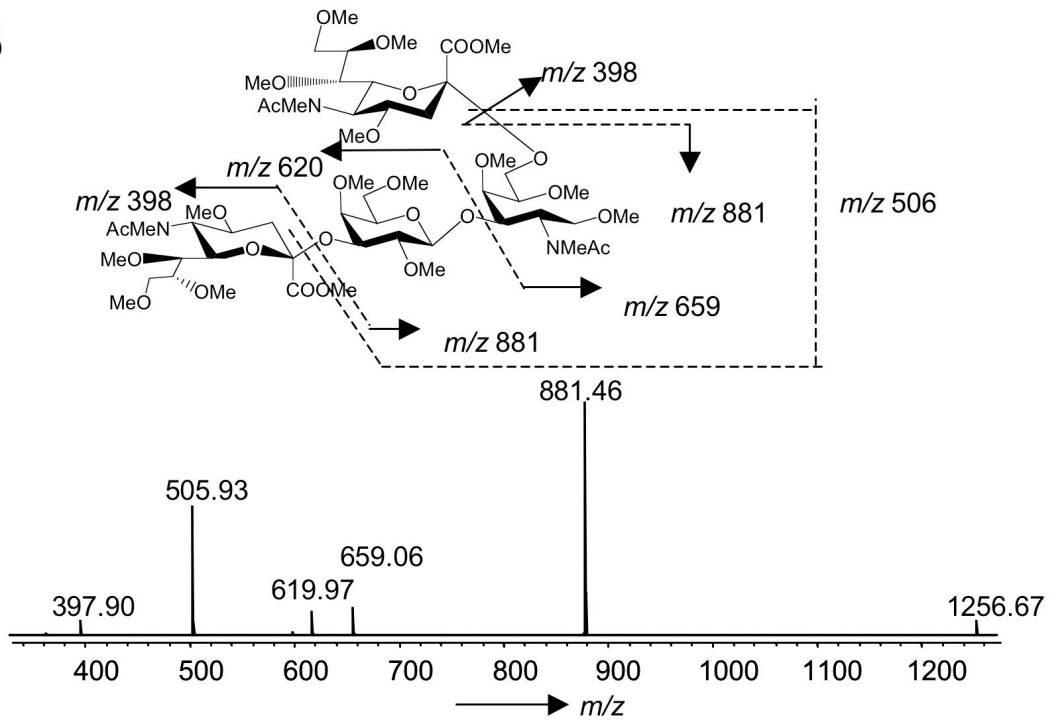






**C**

		PLAG1	PLAG2	PLAG3	
		EDXXVTPG	EDXXVTPG	EDXXVTPG	
human	1: MWKVSALLFVLGSASLWVLAEGASTGOP.....	EDDTEETGLEGGVAMPGAEDDVVTPGTS			: 56
mouse	1: MWTPVLEFVVLGSVWFWD SAOGGIIIGNV.....	EDDIIVTPGTGDMVPPGIEDKIIITIGAT			: 56
rat	1: MWTA PVLLWVLGSVWFWD SAOGGAIGAL.....	EDDLVTPGPGDDMVNPGLEDRIETDIT			: 56
hamster	1: MWKAPVLLWVLGSAWLWHFAOGGAIGRL.....	EDDIIVTPGARDGMVTPGLEDRIGITIGAT			: 56
dog	1: MWRVPVLLVVLGGAGLRVPAAGASTVRPDDIIPGV.....	EDSVVTPGTEDSVVTPGAEDNVVTDGAT			: 63
bovine	1: MWKVPVLEFVLGSASFVLAEGASTVRP.....	EDD.VITGVTSKTTLGVEDYTTTPAAS			: 55
consensus	1: ***** . * * . . .	*****	. . . * . . .	* * . . .	: 63
		▲		▲	
		34T		52T	
	<u>NXS (Mouse and hamster)</u>				
human	57: EDR.YKSGLTTLVAISVNSVIGRIRIEDLPTSESTVHAOEOSPSATASNVATSHSSTEKVDGD..:116				
mouse	57: GGLNESTGKAPLVPTORERGTKPLEELSTSATSDHDHREHESITTTVKVVTSHSVDKKTSHPN:119				
rat	57: GELDKSTAKAPLVPTO.....PPIEELPTSGTSDHDHKEHESITTTVKAVTSHSTDKKTTSHN:113				
hamster	57: EVLNESTGKAPLVPTH.....TKIPFEELPTPGISDHDGEEHTSTTTVRVVTSHSADKETSHPN:115				
dog	64: EEP.YESGLTPLVTKNTESVIDLHLEDGPTOESTVHAKESOSITTTLNVTSHSREKVGED..:123				
bovine	56: KESLAIPMPACTENVSHDHREDLPTAEGTAEGLTAKSTPARSTPARSTTVLIRVPATSHS.:117				
consensus	64: . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . :126				
human	117: .....TOTTVEKDGLSTVTLVGIIVGVLLAIGFIGGIIIVVMRKMSGRYSP:162				
mouse	120: RDNAGDETOTTDKDGLPVVTLVGIIVGVLLAIGFVGGIIVVMKKISGRFSP:172				
rat	114: RDNAGRETOTTDKDGLAVVTLVGIIVGVLLAIGFVGGIIVVMRKISGRFSP:166				
hamster	116: RDNTADETOTTDKRDGLAVVTLVGIIVGVLLAIGFVGGIIVVMKKISGRYSP:168				
dog	124: .....TETTVEKDGLATVTLVGIIVGVLLAIGFIGGIIIVVARKMSGRYSP:169				
bovine	118: OGKTDGEEKPKSTOKGGLSVGTLVGIIVGVLLAIGVIGGIIISVIVRKM.GRYSP:169				
consensus	127: . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . :179				

**A****B****C**